

Joachim Benedikt Krysl, BSc

**Charakterisierung von Interaktionspartnern  
der  
„Adipose Triglyceride Lipase“  
und  
„Comparative Gene Identification 58“**

**MASTERARBEIT**

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

Masterstudium Biochemie und Molekulare Biomedizin

eingereicht an der

**Technischen Universität Graz**

Betreuer

Assoz. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Günter Hämmerle

Institut für Molekulare Biowissenschaften

8010 Graz, Heinrichstraße 31/II

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

---

Datum

---

Unterschrift

# Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Betreuer Assoz. Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Günter Hämmerle für die offene Zusammenarbeit danken. Ohne sein Fachwissen und seine Erfahrung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Großer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. phil. Rudolf Zechner, der es mir ermöglicht hat in seinem renomierten Labor zu arbeiten.

Besonderer Dank geht an Ass.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Karina Preiß-Landl für die allgemeine Unterstützung im letzten Jahr und für Hilfestellungen beim praktischen Arbeiten.

Weiters möchte ich mich bei all meinen Laborkolleginnen und Kollegen, PhDs und Postdocs für das konstruktive Arbeitsklima bedanken. Insbesondere möchte ich hier MSc. Peter Hofer hervorheben, der mich in die Laborpraxis und etliche Methoden eingeführt hat und mir immer scharfsinnig mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meinen Freunden, meiner Freundin und meiner Familie bedanken - für die motivierenden Worte und die Rücksicht! An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, zumal sie mich die gesamte Studienzeit mental unterstützt haben und immer hinter mir gestanden sind. Sie haben mir dieses Studium ermöglicht!

Vielen Dank!

# Abstract

Coordinated lipolysis requires multiple enzymes, which together with regulatory and scaffolding proteins form a network called „lipolysome“. Two important proteins are Adipose Triglyceride Lipase (Atgl) and its activator Comparative Gene Identification 58 (Cgi-58). Together they catalyze the first, rate-limiting step of triacylglycerol (TG) breakdown. Previous Work showed interaction between Cgi-58 and “Fatty acid binding protein 4” (Fabp4). Also Heatshock protein 90 (Hsp90) and 14-3-3 $\beta$  were identified to be part of the lipolysomal network. While Hsp90 only interacts with Atgl, 14-3-3 $\beta$  was shown to interact with Cgi-58 as well as with Atgl. This thesis focused on two aims. Firstly, 8 different protein variants of Fabp4 were generated *via* site directed mutagenesis to isolate a non-Cgi-58 binding variant. After purification, their capability of binding to Cgi-58 was determined in Solid-phase assays (SPAs). Secondly, the role of Hsp90 and 14-3-3 $\beta$  in adipocyte differentiation and lipolysis was examined in mature murine adipocytes. Therefore OP9-K cells, stably overexpressing Hsp90 or 14-3-3 $\beta$  were generated. While isolation of a non-Cgi-58 binding Fabp4 protein variant failed, the results confirmed the importance of the  $\alpha$ 2-Helix residues for Fabp4/Cgi-58 binding. Lentiviral mediated Hsp90 overexpression in differentiated OP9-K cells led to slightly but significantly increased stimulated lipolysis and enhanced protein levels of Atgl and Cgi-58. Overexpression of 14-3-3 $\beta$  in mature OP9-K drastically reduced Cgi-58 protein levels and increased Atgl levels without affecting TG breakdown. Both lipolysomal proteins Hsp90 and 14-3-3 $\beta$  seem to alter protein stability of Atgl and Cgi-58, possibly enabling a finely tuned regulation of Atgl-mediated TG breakdown in the cell. Neither overexpression of Hsp90 nor of 14-3-3 $\beta$  did change the differentiation of the murine stromal OP9-K cells to mature adipocytes.

# Zusammenfassung

Für einen koordinierten Abbau von Triglyzeriden (TG) im Fettgewebe ist ein komplexes und dynamisches Zusammenspiel vieler Proteine notwendig, welches auf meist transienten Protein-Protein Interaktionen basiert. Dieses lipolytische Netzwerk, assoziiert mit den Substrat liefernden Lipidtropfen (LDs) wird auch Lipolysom genannt und verknüpft die Lipolyse mit anderen wichtigen biologischen Prozessen in der Zelle. Zwei zentrale Komponenten im Lipolysom sind die „Adipose Triglyceride Lipase“ (Atgl) und ihr Aktivatorprotein „Comparative Gene Identification 58“ (Cgi-58). Zusammen katalysieren sie den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des TG-Abbaus in der Zelle.

In vorangegangenen „Tandem affinity purification-“ und „label transfer screenings“ konnte das „fatty acid binding protein 4 (Fabp4) als spezifischer Interaktionspartner von Cgi-58, das ATP-abhängige Chaperon Hsp90 als Partner der Atgl, sowie zahlreiche Mitglieder der hoch konservierten 14-3-3 Proteinfamilie als Interaktionspartner von sowohl Atgl als auch Cgi-58 identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde erstens durch gerichtete ortsspezifische Mutagenese („site specific mutagenesis“) und Bindungsstudien mittels „Solid-phase assay“ (SPA) versucht, jene Aminosäurereste zu identifizieren, die essentiell für die Fabp4/Cgi-58 Interaktion sind und zweitens die Wirkung von Lentivirus-vermittelter Überexpression der Proteine Hsp90 und 14-3-3 $\beta$  auf die Adipogenese und den TG-Abbau in reifen OP-9-K Adipozyten untersucht. Die essentiellen Aminosäurereste für die Fabp4/Cgi-58 Interaktion konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Die Experimente lieferten aber Hinweise darauf, dass die Aminosäuren der  $\alpha$ 2-Helix in Fabp4 eine entscheidende Rolle in der Bindung mit Cgi-58 spielen. Die Überexpression von Hsp90 zeigte eine geringe aber signifikante Steigerung der stimulierten Lipolyse, und eine deutliche Steigerung der Atgl und Cgi-58 Proteinlevels. Die Überexpression von 14-3-3 $\beta$  führte zu stark verringerten Cgi-58 Proteinlevels, aber auch zu erhöhten Atgl Proteinlevels. Eine Veränderungen im TG-Abbau konnte dabei nicht detektiert werden. Beide lipolysomale Proteine scheinen stabilisierende bzw. destabilisierende Wirkung auf ihre „client“-Proteine Atgl und Cgi-58 zu haben und damit ein „fine tuning“ des TG-Abbaus zu ermöglichen. Weder Hsp90 noch 14-3-3 $\beta$  Überexpression beeinflussten die Differenzierung der murinen OP9-K Stromazellen wesentlich.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Das Fettgewebe</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2 Die Differenzierung zu Adipozyten (Adipogenese)</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3 Das Lipolysom</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Adipozyten Triglyzerid Lipase .....	13
1.3.2 „Comparative Gene Identification 58“ .....	13
1.3.3 „Fatty acid binding protein 4“ .....	14
<b>1.4. Identifizierung möglicher neuer Proteine im Lipolysom</b> .....	<b>15</b>
1.4.1 Hitzeschock Protein 90 (Hsp90).....	15
1.4.2 14-3-3 Proteine .....	16
<b>1.5 Die Lipolyse</b> .....	<b>18</b>
1.5.1 Regulation der Lipolyse.....	18
<b>1.6 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>2. Material</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>22</b>
2.1.1 Allgemeine Puffer .....	22
2.1.2 Puffer zur Proteinreinigung .....	22
2.1.3 Puffer und Lösungsmittel zur Plasmidisolierung .....	23
2.1.4 Agarose Gelelektrophorese .....	23
2.1.5 Western Blot.....	24
2.1.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	25
<b>2.2 Medien, Lösungen und Antibiotika für bakterielle Kulturen und Kulturen höherer eukaryontischer Zellen</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3 Plasmide</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4 Oligonukleotide</b> .....	<b>29</b>
<b>2.5 Organismen</b> .....	<b>30</b>
2.5.1 Höhere eukaryontische Zellen.....	30

2.5.2 Bakterielle Stämme.....	31
<b>2.6 Antikörper .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Inhibitoren und Stimulatoren .....</b>	<b>33</b>
<b>2.8 Differenzierungszusätze .....</b>	<b>34</b>
<b>3. Methoden.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 DNA Analyse Methoden.....</b>	<b>36</b>
3.1.1 Gerichtete ortsspezifische Mutagenese („site-specific-mutagenesis“).....	36
3.1.2 Restriktionsanalyse.....	37
3.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	38
3.1.4 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -NEB 5- $\alpha$ Zellen.....	38
3.1.5 Plasmidisolierung.....	39
3.1.6 Sequenzierung .....	40
<b>3.2 Protein Analyse Methoden.....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (BioRad Assay, Bio-Rad Laboratories, Deutschland).....	41
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Biuret (Pierce BCA protein assay, Rockford, Illinois, USA) .....	41
3.2.3 Diskontinuierliche, denaturierende Natrium Dodecylsulfat-Polyacrylamid Elektrophorese (SDS PAGE) .....	42
3.2.4 Western Blotting.....	44
3.2.5 Quantifizierung von Western Blot Signalen .....	44
3.2.6 „Stripping“ von Membranen .....	45
<b>3.3. Zellkulturmethoden .....</b>	<b>45</b>
3.3.1.1 Herstellung von stabil überexprimierenden Zelllinien mittels „Lenti-X Tet-Off Advanced inducible System“ .....	46
3.3.1.2 Transfektion der Verpackungszellen HEK 293 T .....	47
3.3.1.3 Infektion von OP9-K Zellen .....	49
3.3.2 Differenzierung der rekombinanten 3T3-L1 Zellen .....	50
3.3.3 Differenzierung der rekombinanten OP9-K Zellen .....	51
3.3.4 Fotografie.....	51
3.3.5 Transfektion von COS-7 Zellen mit Metafectene .....	52
3.3.6 Herstellung von Zelllysaten für Western blotting und SPAs.....	52
3.3.7 Herstellung von Zelllysaten für Western blotting.....	53
<b>3.4 Biochemische Analysen.....</b>	<b>53</b>
3.4.1 Bestimmung von freien FS mittels NEFA Kit ACS-ACOD (Wako Diagnostics) .....	53

3.4.2 Bestimmung von Glycerol mittels Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich).....	54
3.4.3 Ölrot Färbung zur Quantifizierung der zellulären TG .....	55
<b>3.5 Heterologe Expression und Proteinreinigung .....</b>	<b>56</b>
3.5.1 Reinigung von rekombinanten Fabp4 Proteinvarianten aus <i>E.coli</i> -NEB 5-alpha .....	56
<b>3.6 Nachweis von Protein-Protein Interaktion mittels SPA.....</b>	<b>57</b>
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
<b>4.1 Charakterisierung der oberflächennahen Proteindomänen, die an der Fabp4/Cgi-58</b>	
<b>Interaktion beteiligt sind .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2 Einfluss von Hsp90, überexprimiert in OP9-K Adipozyten, auf die Differenzierung dieser</b>	
<b>Zellen bzw. auf ihren Triglyceridmetabolismus .....</b>	<b>74</b>
4.2.1 Einfluss von Hsp90 Überexpression auf den Abbau von TG zu freien FS und Glycerol.....	74
4.2.2 Einfluss von Hsp90 Überexpression auf die Differenzierung der OP9-K Adipozyten.....	81
4.2.3 Einfluss von Hsp90 Überexpression auf die zellulären Proteinlevels von Atgl und Cgi-58..	84
4.2.4 Einfluss von Hsp90 Überexpression auf die TG-Einlagerung in OP9-K Zellen .....	86
<b>4.3 Die Einfluss von 14-3-3<math>\beta</math> Überexpression auf die TG-Einlagerung in 3T3-L1 Zellen .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4 Einfluss von 14-3-3<math>\beta</math>, überexprimiert in OP9-K Adipozyten, auf die Differenzierung dieser</b>	
<b>Zellen bzw. auf ihren TG-Metabolismus .....</b>	<b>88</b>
4.4.1 Einfluss von 14-3-3 $\beta$ Überexpression auf den Abbau von TG zu freien FS und Glycerol ....	88
4.4.2 Einfluss von 14-3-3 $\beta$ Überexpression auf die Differenzierung der OP9-K Adipozyten.....	94
4.4.3 Einfluss von 14-3-3 $\beta$ Überexpression auf die zellulären Proteinlevels von Atgl und Cgi-5897	
4.4.4 Einfluss von 14-3-3 $\beta$ Überexpression auf die TG-Einlagerung in OP9-K Zellen .....	99
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>100</b>
<b>5.1 Die Suche nach nicht-Cgi-58 bindenden Fabp4 Proteinvarianten .....</b>	<b>101</b>
<b>5.2 Die Rolle von Hsp90 in der Lipolyse und der Adipogenese .....</b>	<b>103</b>
<b>5.3 Die Rolle von 14-3-3<math>\beta</math> in der Lipolyse und der Adipogenese.....</b>	<b>105</b>
<b>6. Quellen .....</b>	<b>107</b>

# Abkürzungsverzeichnis

AMPK	AMP aktivierte Proteinkinase
Atgl	Adipose triglyzerid lipase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (engl. Bicinchoninic acid)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cgi-58	„Comparative Gen identification 58“
DG	Diglyzerid
DMEM	„Dulbecco's modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
Fabp4	„Fatty acid binding protein 4“
FS	Fettsäure
G0s2	„G0/G1 switch protein 2“
Gapdh	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HNSQ	Heteronukleare Single Quantum Kohärenz
HRP	„horse reddish peroxidase“
Hsl	Hormonsensitive Lipase
IP	Immunopräzipitation
LD	Lipidtropfen (engl. lipiddroplet)
MG	Monoglyzerid
ONC	„over night culture“
PKA	Proteinkinase A
Ppar $\gamma$	„Peroxisome Proliferator aktivating Rezeptor $\gamma$ “
PPRE	„Ppar-responsive elements“
Scd1	Stearoyl Co-A Desaturase 1
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SPA	„Solid-phase assay“, auch ELISA genannt
TAP	„Tandem affinity purification“
TET	Tetracyclin
TG	Triglyzerid
TRE	„Tet-response Element“
tTA	Tetracyclin regulierter Transaktivator
ZMV	Zytomegalievirus

# **1. Einleitung**

## **1.1 Das Fettgewebe**

Das Fettgewebe übernimmt im Körper die Aufgabe der Fetteinlagerung, Speicherung und des Abbaus. Bei Überangebot an energiereicher Nahrung werden Kohlenhydrate verbrannt und Fett in Form von Neutrallipiden in Fettzellen (Adipozyten) eingelagert. Dort wird es gespeichert um es bei Energiemangel bereitzustellen. In Neugeborenen und Kleinkindern gibt es neben dem weißen Fettgewebe auch noch braunes Fettgewebe, welches die Aufgabe hat, den Wärmehaushalt zu regulieren. Hierzu wird Fett verbrannt um die Körpertemperatur aufrecht zu halten [63]. Bei andauerndem Nahrungsüberschuss und gleichzeitigem Bewegungsmangel kommt es zu Hyperplasie und Hypertrophie der Adipozyten (ugs. Übergewicht). Chronische Übergewichtigkeit wird als Fettleibigkeit bezeichnet und erhöht das Diabetes Typ 2- und Herz-Kreislauf-Erkrankungsrisiko [70].

## **1.2 Die Differenzierung zu Adipozyten (Adipogenese)**

Ausgangspunkt für die Entstehung von Adipozyten sind pluripotente mesenchymale Stammzellen. Diese sitzen im durchbluteten Bindegewebe (vaskularisiertes Stroma) und im Knochenmark. Sie entwickeln sich zu Präadipozyten bevor sie sich durch mitotische klonale Expansion vermehren und zu ausdifferenzierten Adipozyten heranreifen [70]. In Zellkultur wird die Differenzierung der Präadipozyten durch Einlagerung von anfangs vielen kleinen zu später wenigen großen LDs sichtbar. Auf molekularer Ebene zeichnet sich der Differenzierungsprozess durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „Peroxisome Proliferator activating Rezeptor  $\gamma$ “ (Ppar $\gamma$ ) und „CCAAT enhancer binding protein“  $\alpha$  und  $\beta$  (C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ ) aus. Ihr Zusammenspiel aktiviert die Transkription der am Lipidstoffwechsel beteiligten Enzyme, wie der Fettsäure Synthase (FASN), der Carnitin Palmitoyltransferase 1A (CP1A), der „Fatty acid binding protein“ Familie (Fabp), der Stearoyl CoA-Desaturase 1 (Scd1) u.v.m. [60]. Damit zählen neben Ppar $\gamma$  und C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  auch das Fabp4 und Stearyl-CoA-Desaturase (Scd1) zu den Differenzierungsmarkern [27]. Fabp4 und Scd1 werden aber im Gegensatz zu den beiden Transkriptionsfaktoren erst in der terminalen Phase der Differenzierung exprimiert [27].

### 1.3 Das Lipolysom

Die katalytisch aktiven Enzyme Atgl, Hsl und Mgl stehen in dynamischer Wechselwirkung mit multiplen Faktoren wie regulatorischen, Fettsäure (FS) bindenden Proteinen, Proteinen, die die intrazelluläre Lokalisation der Enzyme steuern, Komponenten von „hormone signalling pathways“ oder „scaffolding proteins“. Dieses komplexe lipolytische Netzwerk, assoziiert mit den Substrat liefernden LDs, wird Lipolysom genannt und verknüpft die Lipolyse mit anderen biologischen Prozessen, wie z.B. Ppar-vermittelte Transkriptionregulation in der Zelle [33, 38].

Als Beispiele für liposomale Proteine wären zu nennen Ubx8, „Golgi Brefeldin A resistance factor 1“ (Gbf1), Fabp4 (siehe Abschnitt 1.3.3 „Fatty acid binding protein 4“) und G0/G1 switch protein 2 (G0s2) (siehe Abschnitt 1.5.1 Regulation der Lipolyse). Ubx8 Protein wurde identifiziert als Sensor für ungesättigte FS. In Abwesenheit von ungesättigten FS blockiert es die Umwandlung von Diglyzeriden (DG) zu TG. Binden jedoch ungesättigte FS an Ubx8 wird diese Blockade aufgehoben und die Bildung von TG ermöglicht [39]. 2011 wurde von Ellong *et al.* gezeigt, dass der „Golgi Brefeldin A resistance factor 1“ (Gbf1) mit der N-terminalen Domäne der Atgl interagiert und auch dessen Transport zum LD unterstützt [21]. Gbf1 verbindet daher gemeinsam mit „ADP-Ribosylation Faktor 1“ (Arf 1) den Lipidmetabolismus mit dem intrazellulären Vesikeltransport und dem Transport von Proteinen zwischen Golgi-Apparat, endoplasmatischem Retikulum, Zellmembran und den LDs.

Das lipolysomale Protein Fabp4 wurde neben seiner Rolle in der Lipolyse auch als potentielles Adipokin identifiziert und könnte damit intrazelluläre Lipolyse mit „cross-talk“ Prozessen zwischen unterschiedlichen Geweben verbinden [75, 81].

### **1.3.1 Adipozyten Triglyzerid Lipase**

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Hormonsensitive Lipase (Hsl) allein und geschwindigkeitsbestimmend für den Abbau von TG verantwortlich sei. Erst durch die Beobachtungen im Jahr 2002, dass Hsl defiziente Mäuse, DG in Hoden, Muskel und Fettgewebe akkumulieren, führte zum Schluss, dass ein anderes Enzym für den ersten Schritt der Lipolyse verantwortlich sein muss [29]. Zwei Jahre später wurde dieses Enzym, die „Adipose Triglyzeride Lipase“ (Atgl, Pnpla2 und Desnutrin) in Arbeiten von drei verschiedenen Labors beschrieben [34, 73, 83]. Atgl ist für die Lipolyse geschwindigkeitsbestimmend. An ihrem N-terminalen Ende befindet sich die „patatin“-ähnliche Domäne ( $\alpha/\beta$  Hydrolase), welche ursprünglich in einer Phospholipase der Kartoffel entdeckt wurde [4]. Die Kristallisierung und die Erforschung der Struktur der Atgl verliefen bisher vergebens. Dennoch konnte auf Grund von Analogien zu bekannten  $\alpha/\beta$  Hydrolase Domäne enthaltenden Proteinen, die katalytisch aktive Dyade (Serin47 und Aspartat 166) experimentell durch Aminosäureaustausch gegen Alanin bestätigt werden [19, 20]. Während der basalen Lipolyse befindet sich Atgl teilweise sowohl an LDs als auch im Cytoplasma [83]. Unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation, z.B. aufgrund von Nahrungskarenz, bindet Atgl zusammen mit Cgi-58 am LD und es kommt zu einer 10-20 fach höheren Lipolyse. Neben der obengenannten TG-Hydrolase Aktivität, zeigt die Atgl auch schwache DG Hydrolase-, Transacylase- und Phospholipase Aktivität [34].

Menschen, die eine „Loss-of-function“-Mutation im ATGL-Gen tragen, entwickeln eine „neutral lipid storage disease“ (NLS-D-M *ohne* Ichthyose, *mit* Myopahtie), bei der sich TG krankhaft systemisch einlagern [24, 64].

### **1.3.2 „Comparative Gene Identification 58“**

„Comparative Gene Identification 58“ (Cgi-58) ist ein 39 kDa großes Protein, welches, wie der zweite Name „Abhydrolase domain containing Protein 5“, (ABHD5) sagt, als  $\alpha/\beta$  Hydrolase Protein gefaltet ist. Trotz dieser charakteristischen Domäne, zeigt Cgi-58 keine

Hydrolaseaktivität *in vitro* [37]. Der Grund für das Ausbleiben der katalytischen Aktivität ist, dass Cgi-58 ein Asparagin an Stelle des Serin in der katalytischen Triade aufweist [40].

In der Zelle liegt Cgi-58 inaktiv an Perilipin A gebunden, an der Oberfläche der LDs vor [68, 80]. Erst durch Phosphorylierung durch Proteinkinase A (PKA) löst sich Cgi-58 von Perilipin A ab und kann Atgl stimulieren [62]. Cgi-58 wird in beinahe allen Geweben exprimiert [3, 38]. So wie Atgl wird auch Cgi-58 im Fettgewebe von gefasteten Mäusen deutlich stärker exprimiert als von gefütterten. Im Jahr 2006 konnte von Lass *et al.* experimentell nachgewiesen werden, dass Cgi-58 Atgl *in vitro* stimuliert, selbst aber keine Hydrolase Aktivität besitzt [37].

Auch in der Entstehung von Erbkrankheiten spielt Cgi-58 eine entscheidende Rolle. Cgi-58 „knock-out“ Mäuse weisen neben systemischer TG Anhäufung und steatotischer Leber, einen letalen Defekt der Hautbarriere aufgrund veränderter Acylceramid Synthese auf. Dieser Defekt lässt darauf schließen, dass Cgi-58 weitere, Atgl unabhängige, Funktionen wie z. B. die Aktivierung von noch nicht charakterisierten Lipasen katalysiert [47, 58]. Auch bei menschlichen Erbkrankheiten spielt Cgi-58 eine Rolle. Bereits 2001 wurden 8 Mutationen in Cgi-58 beschrieben, welche mit der Diagnose Chanarin-Dorfman Syndrom (CDS), einer NLSD mit Ichthyose (NLSI-I), einhergehen [40]. Die Mutationen führen zum Funktionsverlust von Cgi-58. Den endgültigen Beweis für den ursächlichen Zusammenhang brachten 2006 Lass *et al.*, als es gelang, den Lipidstoffwechsel in Hautzellen von CDS-Patienten durch adenovirales Einbringen des intakten Cgi-58 Gens wieder zu normalisieren [37].

### **1.3.3 „Fatty acid binding protein 4“**

Das „Fatty acid binding protein 4“ (Fabp4, aP2) ist ein 15 kDa großes „ $\beta$ -Barrel“ Protein mit einem Deckel, der aus zwei  $\alpha$ -Helices besteht. Bisher sind 9 gewebsspezifische Isoformen bekannt: Fabp1 (Leber), Fabp2 (Intestinum), Fabp3 (Herz und Muskel), Fabp4 (Fettgewebe), Fabp5 (Epidermis), Fabp6 (Ileum), Fabp7 (Gehirn), Fabp8 (peripheres Nervensystem) Fabp9 (Hoden) [12]. Fabp4 kann in seinem hydrophoben Inneren FS und andere lipophile Substanzen binden und diese unter anderem in den Zellkern transportieren. Interessanterweise weist erst die dreidimensionale Struktur die nukleare Lokalisationssequenz (NLS) und nukleare Export Sequenz (NES) auf. In der Sekundärstruktur

sind diese nicht konserviert [5]. Hofer *et al.* bestätigten, dass die Anwesenheit von Fabp4 und dessen FS Bindung zu verstärkter Expression von Genen, die unter der Kontrolle eines „Ppar-responsive elements“ (PPRE) stehen, führt. Außerdem kann eine zusätzliche Steigerung der Atgl vermittelten Lipolyse in Anwesenheit von Fabp4 gemeinsam mit Cgi-58 beobachtet werden [33]. Fabp4 ist ein Differenzierungsmaker für die Adipogenese und dient auch als Biomarker für gewisse Krankheiten. So gibt es eine Korrelation zwischen hohen Fabp4 Spiegel in im Serum von Patienten mit Fettleibigkeit, Diabetes Typ 2 und Polyzystischem Ovarien Syndrom [13, 17, 26]. Neueste Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Fabp4 auch als Adipokin wirken kann. Scherer *et al.* konnten zeigen, dass Fabp4 über die Blutbahn zur Bauchspeicheldrüse gelangt und dort die Insulinproduktion in den  $\beta$ -Zellen stimuliert [75, 82].

#### **1.4. Identifizierung möglicher neuer Proteine im Lipolysom**

Um neue Interaktionspartner im Lipolysom, im speziellen aber von Atgl und Cgi-58 zu finden wurden „Tandem Affinity Purification screenings“ (TAP) durchgeführt. Damit konnten etwa 30 interagierende Proteine identifiziert werden, die in differenzierten 3T3-L1 Zellen unter basalen und Hormon stimulierten Bedingungen entweder mit Atgl oder mit Cgi-58 interagierten. Jeweils mehrere Hitzeschockproteine wie Hsp9, Bag2 und Hsp90, sowie einige Isoformen der 14-3-3 Proteinfamilie konnten identifiziert werden.

##### **1.4.1 Hitzeschock Protein 90 (Hsp90)**

Hsp90 ist ein Hitzeschock Protein welches vor allem bei Hitzestress von Zellen vermehrt gebildet wird [9]. Es wirkt als Chaperon, welches die Faltung anderer Proteine katalysiert. Sein Anteil kann 1-2% des Gesamtproteingehalts einer Zelle betragen [42]. Kodiert wird das Protein auf dem Gen HSP90 $\alpha\beta$ 1. Es kommt in allen Eukaryonten vor und seine Sequenz ist hochkonserviert. Es existieren zwei Isoformen, wobei Hsp90 $\alpha$  bei Zellstress und Hsp90 $\beta$ , konstitutiv exprimiert wird. Heute sind mehr als 200 „client“-Proteine bekannt mit denen Hsp90 interagiert. Es gilt als der Knotenpunkt für sowohl Proteinstabilisierung als auch

Proteindegradierung. In Abhängigkeit von seinen posttranslationalen Modifizierungen und den „Co-Chaperones“ wie Hsp70, Hop/Sti1, p23/Sba1 und Cdc37 schützt Hsp90, sich faltende Proteine vor der Aggregation oder führt sie dem Proteinabbau zu [41, 71]. Zusammen mit Cdc37 stabilisiert es eine Vielzahl an Kinasen in Hefe. 2007 zeigten Mandal *et al.*, dass eine Mutation im *Cdc37* Gen in Hefe zu einem Stabilitätsverlust in 51 von 65 untersuchten Kinasen führt [45]. In Kombination mit Hsp70 hingegen führt Hsp90 zu Ubiquitinierung und führt Proteine wie beispielsweise Apoprotein B (ApoB) dem proteasomalen Abbau zu [28].

Hsp90 bildet Dimere, hat eine V-förmige Struktur und eine intrinsische ATPase Funktion, die für seine Funktion *in vivo* essentiell ist. Durch das Antibiotikum Geldanamycin, das an Hsp90 an Stelle des ATP bindet, wird dessen Funktion selektiv inhibiert [53]. Erst kürzlich wurde publiziert, dass die Inhibierung von Hsp90 durch Geldanamycin zu einer Inhibierung der Differenzierung von Adipozyten führt. Dies wurde durch signifikant geringere Ppar $\gamma$  Levels sowohl auf Ebene der mRNA und als auch auf Ebene der Protein Expression sichtbar. Zusätzlich konnte eine Verringerung der Fetteinlagerung bei 3T3-L1 Zellen beobachtet werden [15].

Hsp90 ist bei vielen Tumorarten dereguliert und der relative Anteil steigt auf 4-6% des Gesamtproteingehalts an. Dadurch stabilisiert es viele onkogene Proteine. Aufgrund dieser Beobachtung befinden sich heute einige Hsp90 Inhibitoren in klinischen Versuchen zur Bekämpfung von Krebs [42].

#### **1.4.2 14-3-3 Proteine**

In TAP „screenings“ ebenso prominent vertreten waren die zahlreichen Mitglieder der 14-3-3 Proteinfamilie. So wurde eine Interaktion von 14-3-3 $\beta$  mit Atgl als auch mit Cgi-58, allerdings nur unter Hormon stimulierten Bedingungen festgestellt. Mit Atgl interagierten zusätzlich die 14-3-3 Isoformen  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$ . Die Interaktion des ATP-abhängigen Chaperons Hsp90 mit Atgl als auch die Interaktion von 14-3-3 $\beta$  mit Cgi-58 konnten mittels Co-Immunopräzipitation (IP) bestätigt werden [23, 84].

Die aus 7 Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) bestehende 14-3-3 Familie kommt in allen Eukaryonten vor und ist so hoch konserviert, dass Hefe mit letalem 14-3-3 Doppelknockout durch das Einbringen von menschlichen oder gar Arabidopsis Isoformen gerettet werden kann [67, 72, 82]. Es ist derzeit noch nicht eindeutig bestimmt ob sie unterschiedliche Funktionen haben. Bekannt ist, dass die Expression der Isoformen in unterschiedlichen Geweben sehr unterschiedlich sein kann, dennoch scheinen die einzelnen Isoformen trotz gewisser Bindungspräferenzen gegeneinander austauschbar zu sein [43, 54, 78]. 14-3-3 Proteine erkennen ihre „clients“ über zwei Erkennungssequenzen [RSXpSXP] und [RXY/FXpSXP]. Essentiell für die Bindung an bis dato 200 bekannte „clients“ ist das Phosphoserin an Position 4 bzw. 5 [2, 35, 78]. 14-3-3 Proteine spielen eine Rolle in zellulären Prozessen, wie dem Zellzyklus, dem intrazellulärem Transport und der interzellulären Kommunikation, aber auch in der „DNA damage response“, der transkriptionellen Kontrolle bis hin zur Apoptose oder der Autophagie [48, 57]. Man findet 14-3-3 Proteine in fast allen Geweben, wobei ihre Expression im Gehirn und im weißen Fettgewebe besonders hoch ist [51]. 14-3-3 Protein Expressionsmuster sind bei schweren neuronalen Erkrankungen wie, Schizophrenie und Parkinson auffällig verändert oder zeigen in Tiermodellen veränderte Aktivität [25, 65]. Dies zeigt, dass 14-3-3 Proteine im Gehirn allgemein eine entscheidende Rolle spielen. Bock *et al.* postulierten 2014, dass 14-3-3 Proteine die Insulin Signalkaskade im Gehirn modulieren und daher ein potentiell „target“ zur Behandlung von Insulin Resistenz seien [8].

Die Kristallstruktur von 14-3-3  $\zeta$  wurde schon in den 90er Jahren bestimmt. Dabei zeigte sich, dass sie aus einem Monomer aus 9 antiparallelen  $\alpha$ -Helices bestehen. 14-3-3 Monomere dimerisieren über die N-terminalen Enden zu hufeisenförmigen Dimeren und binden über den C-Terminus an ihre „clients“ [2, 54, 56]. Auch in biochemischen Stoffwechselwegen spielen sie eine regulatorische Rolle. Dies wurde besonders gut in Pflanzen gezeigt. In Arabidopsis spielen 14-3-3 Proteine eine zentrale Rolle im Kohlenstoff und Stickstoff Metabolismus [16]. 14-3-3 Proteine sind nicht enzymatisch aktiv, können aber durch ihre Bindung, die Lokalisation, die Stabilität, die Aktivität und die Interaktionsaffinität ihrer Bindungspartner ändern [14, 54, 79].

## **1.5 Die Lipolyse**

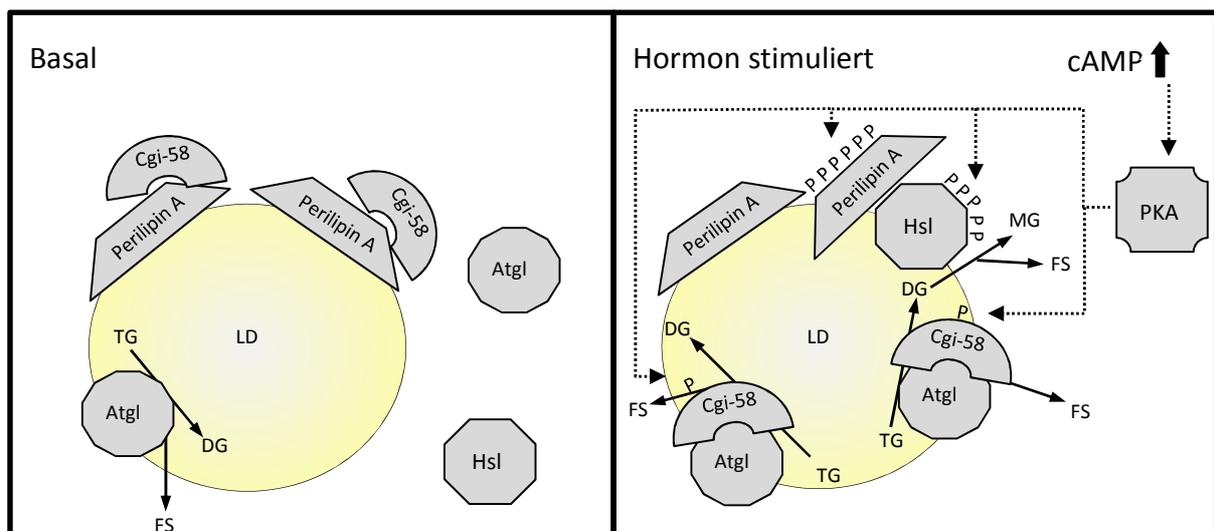
Der koordinierte Fettabbau in der Zelle wird Lipolyse genannt. Dabei werden die in den LDs gelagerten TG schrittweise zu freien FS und Glycerol abgebaut. Der erste Schritt, nämlich der Abbau zu DG und einer freien FS wird hauptsächlich durch die Atgl, die an der Oberfläche der LDs sitzt, katalysiert. DG werden durch die Hormonsensitive Lipase (Hsl) zu Monoglyceride (MG) und einer weiteren freien FS gespalten. Die Monoacylglycerol Lipase (Mgl) spaltet die letzte FS vom Glycerolrückgrad ab. Die freien FS werden von den Adipozyten ins Blut sezerniert und an Serumalbumin gebunden zu den Zielgeweben wie Muskel und Leber transportiert. Dort werden sie in den Mitochondrien über die  $\beta$ -Oxidation und den Zitratzyklus verbrannt und dabei NADH+H und FADH<sub>2</sub> erzeugt.

### **1.5.1 Regulation der Lipolyse**

Bei kohlenhydratreicher Nahrungszufuhr verstoffwechselt der Körper vorwiegend den Zucker über den Weg der Glykolyse und den Zitratzyklus und lagert die über die Nahrung zugeführten Lipide ins Fettgewebe ein. In diesem Fall findet im Fettgewebe nur schwache (basale) Lipolyse statt, und die Fetteinlagerung überwiegt. In diesem Zustand befindet sich nur ein Teil der Atgl am LD. Der Großteil liegt gemeinsam mit der Hsl außer Reichweite des Substrats im Cytoplasma vor. An der Oberfläche der LDs ist Perilipin A angelagert, welches das Fett vor dem Abbau schützt. Cgi-58 ist inaktiv gebunden an Perilipin A (Abbildung 1) [6, 49, 68].

Bei Nahrungskarenz oder erhöhtem Energiebedarf (Stress) wird die Lipolyse in den Adipozyten durch Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin) stimuliert. Diese binden an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren an der Zellmembran und aktivieren die im Zellinneren befindliche Adenylylcyclase (früher Adenylatcyclase), welche cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosin Triphosphat (ATP) produziert. Hohe cAMP Spiegel in der Zelle aktivieren die Protein Kinase A (PKA), welche ihrerseits nun durch Proteinphosphorylierungen zu einer Aktivierung der Lipolyse auf mehreren Ebenen führt [49]: PKA phosphoryliert Hsl an 5 Serinresten, darunter Ser-600 und 660. Dadurch wird sie an

die Oberfläche der LDs rekrutiert und ihre Hydrolaseaktivität gesteigert [6]. Auch Perilipin A wird mehrfach phosphoryliert was zur Freisetzung von Cgi-58 und zur Anlagerung von Perilipin A an Hsl führt [49]. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass auch Cgi-58 durch PKA an Serin239 phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung ist essentiell für die Dissoziation von Perilipin A. Die Stimulation der Atgl wird durch diese Phosphorylierung nicht beeinflusst [62]. Der regulatorische Gegenspieler zu Cgi-58 ist G0/G1 switch protein 2 (G0s2). G0s2 wurde erstmals beschrieben als basisches Protein, welches bei mononuklearen Blutzellen beim Übergang von Interphase (G0) in die Mitose (G1) gebildet wird [61]. Während seine Funktion im Zellzyklus aber noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, wurde 2010 entdeckt, dass es die Aktivität von Atgl auch in Anwesenheit von Cgi-58 nicht kompetitiv inhibieren kann [44]. Während Überexpression von G0s2 zu verminderter basaler und Hormon stimulierter Lipolyse führt, kommt es bei „silencing“ von G0s2 zu gesteigerter basaler als auch Hormon stimulierter Lipolyse [31, 38].



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der basalen und Hormon stimulierten Lipolyse in Adipozyten.** Bei ausreichendem Energiebedarf findet in der Zelle nur basale Lipolyse statt. Bei Nahrungskarenz und erhöhtem Energiebedarf beispielsweise durch Stress, kommt es zur Ausschüttung von Katecholaminen in der Nebenniere. Sie binden an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren. Diese aktivieren eine G-Protein gekoppelte Kaskade welche die Adenylatzyklase aktiviert. Durch den Anstieg an cAMP wird die PKA aktiviert. Sie phosphoryliert Perilipin A, Hsl, und Cgi-58. Diese ändern dadurch ihre Lokalisation und Aktivität: Cgi-58 löst sich von Perilipin A und kann an Atgl binden und ihre lipolytische Aktivität erhöhen. Perilipin A rekrutiert und bindet Hsl, die dadurch an ihr Substrat geführt wird. ;LD = Lipidtropfen, TG = Triglyzerid, DG = Diglyzerid, MG = Monoglyzerid, FS = Fettsäure

## 1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion der lipolysomalen Proteine Fabp4, Hsp90 und 14-3-3 $\beta$  mit Cgi-58 bzw. Atgl zu charakterisieren und in reifen Adipozyten in einen physiologischen Kontext zu stellen. Cgi-58 interagiert mit dem „FS-shuttle“ Fabp4 und funktioniert als Adaptorprotein, welches Fabp4 an die Atgl heranführt, um die durch Lipolyse freiwerdenden FS zu binden und weiter zu transportieren. Kernspinresonanzspektroskopie- (NMR) Analysen zeigten, dass Seitenketten bestimmter Aminosäuren der  $\alpha$ 1- bzw.  $\alpha$ 2-Helix, sowie angrenzender „loops“ an der Protein/Protein-Interaktion beteiligt sind. Durch gerichtete ortsspezifische Mutagenese sollten jene Aminosäuren identifiziert werden, die essentiell für die Fabp4/Cgi-58 Interaktion sind, um in weiterer Folge eine Fabp4 Proteinvariante herzustellen, die nicht mehr an Cgi-58 binden kann.

In vorausgehenden TAP „screenings“ und IP-Experimenten konnte gezeigt werden, dass etliche Isoformen der 14-3-3 Proteinfamilie sowohl mit der Agl und 14-3-3 $\beta$  auch mit ihrem Aktivatorprotein Cgi-58 in Adipozyten interagieren, während das Chaperon Hsp90 lediglich an Atgl bindet. Sowohl Hsp90 als auch 14-3-3 Proteine besitzen multiple regulatorische Funktionen in der Zelle, zeigten bisher aber keine unmittelbare Verbindung mit lipolytischen Prozessen am Lipolysom. Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob bei Überexpression von Hsp90 oder 14-3-3 $\beta$  in reifen murinen Adipozyten die Lipolyse stimuliert oder inhibiert werden kann und sich damit die Menge an sezernierten freien FS verändert. Durch Einsatz unterschiedlicher Inhibitoren wie Hsl-Inhibitor, Atglistatin und Triacsin C sollte festgestellt werden, ob eine Modulation der lipolytischen Aktivität spezifisch auf die katalytische Aktivität der Atgl, aktiviert durch Cgi-58 zurückzuführen ist. Außerdem wurde untersucht, wie sich eine konstante Überexpression von rekombinantem Hsp90 oder 14-3-3 $\beta$  während des Differenzierungsprozesses auf die Entwicklung von reifen Adipozyten und die Einlagerung von TG auswirkt.

## **2. Material**

## 2.1 Puffer und Lösungen

### 2.1.1 Allgemeine Puffer

1x PBS 137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4

---

1x TBS 50 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
pH 8,0

### 2.1.2 Puffer zur Proteinreinigung

1x Protease Inhibitor Mix (Pi) 20 µg/ml Leupeptin (Sigma)  
2 µg/ml Antipain (Sigma)  
1 µg/ml Pepstatin (Roth)

---

1x Puffer W 100 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
1x Pi  
1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Lactan)  
pH 8.0

---

1x Puffer E Puffer W  
5 mM D-Desthiobiotin (Sigma)

### 2.1.3 Puffer und Lösungsmittel zur Plasmidisolierung

Puffer 1	50 mM Tris-HCl 100 µg/ml RNase A 10 mM EDTA, pH 8.0
<hr/>	
Puffer 2	0,2 M NaOH (Merck) 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) (Roth)
<hr/>	
Puffer 3	3 M K-Acetat (Merck) 5 M Eisessig (Roth)
<hr/>	
SEVAC	24 Volumensanteile Chloroform (Sigma) 1 Volumensanteil Isoamylalkohol (Lactan)

### 2.1.4 Agarose Gelelektrophorese

1 x TAE Puffer	40 mM Tris-HCl, pH 7,2 50 mM EDTA 7 % Essigsäure
<hr/>	
5x DNA Ladepuffer	12 % Glyzerol (Promega) 0,25 % Bromphenol Blau (Merck) 0,25 % Xylencyanol

### **2.1.5 Western Blot**

CAPS Transfer Puffer	10 mM CAPS (Sigma) pH 11  10% Methanol (Bartelt)
<hr/>	
1 x TST Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.4  0,1 % Tween-20 (Roth)  150 mM NaCl
<hr/>	
Stripping Puffer	62,5 mM Tris-HCl  2 % SDS  100 mM 2-Mercaptoethanol (Sigma), pH 6,7

## 2.1.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

10x Tris-Glycin Puffer	200 mM Tris 1,6 M Glycin (Merck) 0,83 % SDS
4x Trenngel Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
4x Sammelgel Puffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
4x SDS Ladepuffer	200 mM Tris-HCl pH 6,8 400 mM Dithiothreitol (Roche Diagnostics GmbH) 8 % SDS 40 % Glyzerol 0.05 % Bromphenol Blau
Coomassie Blau Färbelösung	0,25 % Coomassie brilliant Blau (BioRad) 6 % Essigsäure (Merck) 50 % Ethanol (Bartelt)
Coomassie Blau Entfärbelösung	10 % Methanol (Merck) 8 % Essigsäure

## 2.2 Medien, Lösungen und Antibiotika für bakterielle Kulturen und Kulturen höherer eukaryontischer Zellen

Die Medien für bakterielle Kulturen wurden autoklaviert und nach dem Abkühlen für „overnight cultures“ (ONC), Vorkulturen und Hauptkulturen mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert. Für die Herstellung von Festmedien (Platten) wurden 10 g/l Agar-Agar verwendet.

LB-Medium 0,5 % Hefe Extrakt (Bertoni  
Friedrich Dr. GesmbH)  
  
1,0 % Trypton/Pepton aus  
Casein (Roth)  
  
1,0 % NaCl, pH 7,0

---

SOC-Medium 5 g/l Hefe Extrakt  
  
20 g/l Trypton  
  
10 mM NaCl  
  
2.5 mM KCl  
  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
  
20 mM Glukose (Sigma)

---

Ölrot Färbelösung 4 Teile Wasser  
  
6 Teile 0,5 % „Oil Red O“ in  
Isopropanol, gefiltert

**Tabelle 1 Folgende Antibiotika wurden für Selektionsarbeiten verwendet**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Firma</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration in Arbeitslösung</b>
Ampicillin Natrium Salz	Carl Roth GmbH	ddH <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 µg/ml
Puromycin	Sigma Aldrich	ddH <sub>2</sub> O	2 mg/ml	2 µg/ml
Geneticin sulfat (G418 sulfat)	Life Technologies	ddH <sub>2</sub> O	600 mg/ml	600 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	GIBCO Lifetech Austria	Gebrauchsfertige Lösung von GIBCO	10000 U/ml Penicillin 10000 µg/ml Streptomycin	100 U/ml 100 µg/ml

## 2.3 Plasmide

**Tabelle 2 Folgende Plasmide wurden für Klonierungsarbeiten vom Labor von Prof. Zechner zur Verfügung gestellt.**

<b>Plasmid Name</b>	<b>Gen (Organismus)</b>	<b>Markierung „Tag“</b>	<b>Quelle</b>
pHisMaxC_CGI-58	CGI-58 (Maus)	N-term. His	Labor von Prof. Zechner
pHisMaxC_LacZ	<i>lacZ</i> ( <i>E.coli</i> )	N-term. His	Labor von Prof. Zechner
pASK-IBA5+_FABP4	FABP4 (Mensch)	N-term. Strep	Labor von Prof. Zechner
pASK-IBA5+_FABP4_Del31-36	FABP4 (Mensch)	N-term. Strep	Labor von Prof. Zechner

**Tabelle 3: Für das Lenti-X Tet-Off Advanced inducible System wurden folgende Plasmide verwendet**

Plasmid Name	Vektor	Gen (Organismus)	Accession Nr.	Insertlänge	Restriktions-schnittstellen	Markierung „Tag“	Quelle
pLVX-Tight-Puro_HSP90	pLVX-Tight-Puro (7791bp)	HSP90 (Maus)	NM_008302	2507 bp	<i>NotI</i> <i>MluI</i>	C-term His	Labor von Prof. Zechner
pLVX-Tight-Puro_YWHαβ (_14-3-3β)	pLVX-Tight-Puro (7791bp)	YWHαβ (Maus)	NM_018753	741 bp	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	C-term His	Labor von Prof. Zechner
pLVX-tet-Off Advanced	(11607bp)	-	-	-	-	-	Clontech

**Tabelle 4: Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit via Site-directed-mutagenesis hergestellt**

Plasmid	Vektor	Insert	Restriktions-schnittstelle	Größe	Fabp4 Proteinvariante
pASK-IBA5+_FABP4_D77G/D78G	pASK-IBA5+ (3260bp)	humanes FABP4	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	399bp	Fabp4 <sup>D77G/D78G</sup>
pASK-IBA5+_FABP4_G35K/M36E					Fabp4 <sup>G35K/M36E</sup>
pASK-IBA5+_FABP4_R31E/K32E/V33E					Fabp4 <sup>R31E/K32E/V33E</sup>
pASK-IBA5+_FABP4_F58S/K59E					Fabp4 <sup>F58S/K59E</sup>
pASK-IBA5+_FABP4_F58S/K59E/D77G/D78G					Fabp4 <sup>F58S/K59E/D77G/D78G</sup>
pASK-IBA5+_FABP4_R31E/K32E/V33E/D77G/D78G					Fabp4 <sup>R31E/K32E/V33E/D77G/D78G</sup>
pASK-IBA5+_FABP4_R31E/K32E/V33E/D77G/D78G/F58S/K59E					Fabp4 <sup>R31E/K32E/V33E/D77G/D78G/F58S/K59E</sup>

## 2.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei Eurofins Genomics synthetisiert und schließlich mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μl verdünnt.

**Tabelle 5: Oligonukleotide für Sequenzierung und gerichtete ortsspezifische Mutagenese, die veränderten Basen wurden klein geschrieben, Del: Deletion**

Primer	Sequenz	Schmelz-temp.	Annealing temp.
FABP4_D77G/D78G_fw	AGTCACTGCAggcgggaAGGAAAGTCAAGAGC (31)	58°C	
FABP4_D77G/D78G_rv	TCGTCAAATTCCTGGCCC (18)	62°C	69°C
FABP4_G35K/M36E_fw	GAAAGTGGCTaaggagGCCAAACCTAACATG (31)	64°C	
FABP4_G35K/M36E_rv	CTGGTGGCAAAGCCCACT (18)	64°C	64°C
FABP4_R31E/K32E/V33E_fw	agagGCTGGCATGGCCAAACCTAA (24)	70°C	
FABP4_R31E/K32E/V33E_rv	tcctcGGTGGCAAAGCCCACTCC (23)	70°C	70°C
FABP4_F58S/K59E_fw	TGAAAGTACCagtgaaAATACTGAGATTCCTTC (34)	58°C	
FABP4_F58S/K59E_rv	GATTTAATGGTGATCACATCC (21)	58°C	58°C
FABP4_Del31-36_fw	GCCAAACCTAACATGATCATCAGTG (25)	64°C	
FABP4_Del31-36_rv	GGTGGCAAAGCCCACTCC (18)	68°C	67°C
pASK-IBA5+_fw	GAGTTATTTTACCACTCCCT (20)	56°C	
pASK-IBA5+_rv	CGCAGTAGCGGTAAACG (17)	61°C	59°C

## 2.5 Organismen

### 2.5.1 Höhere eukaryontische Zellen

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Zelllinien und Medien sowie Inkubationsbedingungen. Auch die Subkultivierungsbedingungen sind angegeben

Zelllinie	ATCC Nummer	Medium	Subkultivierung	Haltung
COS-7 (Affennieren Fibroblasten)	CRL-1651	Dulbecco's modified Eagle medium, 4,5 g/l Glukose; (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA)  10% fetales Kälberserum (FCS, Sigma Aldrich F0804)  1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Pen/Strep, (GIBCO Lifetech Austria)  = DMEM (+/+)	1:4 alle 2 Tage	Bei 37°C, 95% relative Luft- feuchtigkeit, 7 % CO <sub>2</sub>
3T3-L1 (embryonale Fibroblasten der Maus)	CL-173	DMEM (+/+)	1:6 alle 2 Tage	
HEK 293T/17 (humane embryonale Nierenzellen)	CRL-11268	DMEM (+/+)  1 mM NaPyruvat (Sigma)  = DMEM (+/+)	1:6 alle 2 Tage	
OP9-K (Stroma Knochenmarkszellen der Maus)	J.M. Lane, Massachusetts General Hospital, Boston, USA [36]	modified eagle Medium, 4,5 g/l Glukose, (GIBCO, Invitrogen 12571-063)  20 % FCS  1 % Pen/Strep  = MEM Alpha (+/+)	1:4 alle 2 Tage	

## 2.5.2 Bakterielle Stämme

**Tabelle 7: Verwendeter bakterieller Stamm und Genotyp**

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>
<i>E.coli</i> -NEB 5- $\alpha$ (New England Biolabs)	<i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> )U169 <i>phoA glnV44</i> $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15 <i>gyrA96 recA1 relA1</i> <i>endA1 thi-1 hsdR17</i>

## 2.6 Antikörper

**Tabelle 8: Auflistung aller Antikörper inklusive ihrer Verdünnungen, die für Western Blots verwendet wurden.**

<b>Antikörper</b>	<b>Antikörper hergestellt in</b>	<b>Firma (Bestellnr.)</b>	<b>Western Blot</b>
Anti-Rabbit IgG (H+L), "horse reddish peroxidase" (Hrp)-linked	Ziege	Vector, (Szabo-Scanic) (PI-1000)	1:10000 in 1x TST 5 % Milchpulver
Anti-Maus IgG, Hrp- linked	Schaf	GE Healthcare (Little Chalfont, United Kingdom) (NA931)	1:10000 in 1x TST 5 % Milchpulver
Anti-His-Tag (N-terminal)	Maus	Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) (27-4710-01)	1:5000 in 1x TST 5 % Milchpulver
Anti-His-Tag (C-terminal)	Kaninchen	RELIAtech (102-PA80)	1:1000 in 1x TST 5 % Milchpulver
Anti-Cgi-58	Maus	Abnova (H00051099-M01)	1:1000 in 1x TST 5 % Milchpulver

Anti-Fabp4 (monoklonal.)	Maus	Abcam (Ab81605)	1:2000 in 1x TST 5 % Milchpulver
Anti-Ppary	Kaninchen	Cell signaling (C26H12)	1:1000 in 1x TST 5 % Milchpulver
Anti-Gapdh	Kaninchen	Cell signaling (2118)	1:50000 in 1x TST 5 % BSA
Anti- $\beta$ -Aktin	Maus	Santa cruz (sc-47778)	1:1000 in 1x TST 5 % Milchpulver
Anti-Atgl	Kaninchen	Cell signaling (2138S)	1:1000 in 1x TST 5 % Milchpulver
Anti-Scd1	Kaninchen	Cell signaling (2438)	1:1000 in 1x TST 5 % Milchpulver

## 2.7 Inhibitoren und Stimulatoren

Tabelle 9: Inhibitoren und Stimulatoren, die für Zellkulturexperimente verwendet wurden

Substanz	Firma	Wirkung und Ziel	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration in Arbeitslösung
Atglistatin (Ai)	Cayman (CAY15284-1)	Inhibitor der Atgl	Dimethylsulfoxid (DMSO)	40 mM (1000x)	40 µM
Hsl Inhibitor Hi 76-0079 (Hi)	Novo Nordisk, Denmark NNC 0076-0000-0079	Inhibitor der Hsl	DMSO	25 mM (1000x)	25 µM
Triacsin C (Tc)	Sigma (T4540-1mg)	Inhibitor der Acyl Co-A Synthetase	DMSO	5 mM (1000x)	5 µM
Forskolin	Sigma, Fluka 47735-1 mg	Stimulator der Adenylylcyclase	DMSO	10 mM (500x)	20 µM

## 2.8 Differenzierungszusätze

Tabelle 10: Zusätze, welche dem Medium zur Differenzierung von 3T3-L1 und OP9-K Zellen zugesetzt wurden

Substanz	Firma	Wirkung und Ziel	Lösungs- mittel	Stammlösung	Endkonzentration in Arbeitslösung
Dexamethason	Sigma Aldrich; (D4902)	Entzündungs- hemmend im Immunsystem	Ethanol	0,5 mg/ml (1250x)	0,4 µg/ml
3-Isobutyl-1- methylxanthin (IBMX)	Sigma Aldrich; (I5879)	Inhibitor der cAMP Phosphodiesterase	DMSO	500 mM (1000x)	500 µM
Rosiglitazon	Cayman (CAYM71740- 100)	Aktivierung des Pparγ Rezeptors (erhöht Insulinempfindlichkeit)	DMSO	1 mM (500x)	2 µM
Insulin	Humanes Insulin, rekombinant aus Hefe (Sigma Aldrich, D4902)	Insulinrezeptor, Aktiviert die GLUT4 Translokation an die Zellmembran, dies erhöht die Zuckeraufnahme der Zelle	H <sub>2</sub> O	10 mg/ml (1000x für 3T3- L1, 10000x für OP9-K)	10 µg/ml für 3T3-L1 1 µg/ml für OP9-K
Ölsäure beladendes BSA	BSA (Sigma) Ölsäure (Hartmann Analytics)		1x PBS	1,64 mM FS freies BSA, 9 mM Ölsäure (10x)	900 µM

## **3. Methoden**

## 3.1 DNA Analyse Methoden

### 3.1.1 Gerichtete ortsspezifische Mutagenese („site-specific-mutagenesis“)

Eine Mutation (Basenaustauschmutation) und der daraus folgende Codonwechsel wird erreicht, indem maßgeschneiderte synthetische Primer hergestellt und für inverse PCR von rekombinanten Plasmiden eingesetzt werden. Die Amplifikationsprodukte werden durch Ligation re-zirkularisiert und mit spezifischen Endonukleasen verdaut, die ausschließlich methylierte bzw. hemimethylierte DNA spalten und damit Wildtyp-DNA aus dem Reaktionsansatz entfernen. Die Mutation tragenden Plasmide können schließlich direkt über Transformation in Bakterien vermehrt werden.

Für die Einführung von Mutationen in die FABP4 Sequenz wurde der Q5 Site-specific-mutagenesis Kit (NEB) verwendet und nach den Anweisungen des Herstellers gearbeitet. Die Primer (Tabelle 5) mit den gewünschten Mutationen wurden *in silico* auf der Plattform NEBasechanger des Herstellers NEB entworfen. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gemäß den Angaben in den Tabelle 11 - Tabelle 13 durchgeführt.

Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 1 % Agarose Gel + Ethidiumbromid (Sigma, 0,25 mg/l) analysiert und in *E.coli*-NEB 5- $\alpha$  Zellen (New England Biolabs, siehe Tabelle 7) transformiert.

**Tabelle 11: Zusammensetzung eines „site-specific-mutagenesis“ Ansatzes**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix	12,5 $\mu$ l
Fw & rv Primer (10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l
Template DNA (1-25 $\mu$ g)	x $\mu$ l
Nuklease freies Wasser	25-(15+x) $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	25 $\mu$ l

**Tabelle 12: PCR Standard Programm**

		<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Schritt 1	Initiale Denaturierung	98°C	30 Sekunden
Schritt 2 (30 Zyklen)	Denaturierung	98°C	10 Sekunden
	„Annealing“	Siehe Tabelle 5	30 Sekunden
	Elongation	72°C	90 Sekunden
Schritt 3	„Final extension“	72°C	120 Sekunden
Schritt 4	„Cool down“	4°C	∞

**Tabelle 13: Ansatz für Ligation und Endonukleaseverdau**

<b>Kinase-Ligase-Dpnl (KLD) Reaktion</b>	
PCR Produkt	1 µl
2x KLD Reaktionspuffer	5 µl
10x KLD Enzym Mix	1 µl
Nuklease freies Wasser	3 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 µl</b>

### **3.1.2 Restriktionsanalyse**

Um den korrekten Einbau des Transgens (cDNA flankiert von Schnittstellen) in das Plasmid zu überprüfen, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dabei schneiden Restriktionsenzyme (NEB) nach Einbau der cDNA an definierten Stellen. Bei korrektem Einbau wird ein charakteristisches Bandenmuster nach der Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese sichtbar. Der enzymatische Verdau wurde 1 Stunde lang bei 37°C nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Restriktionsansätze waren gemäß Tabelle 14 zusammengesetzt.

**Tabelle 14: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes**

<b>Restriktionsanalyse</b>	
Plasmid (500 ng)	x µl
Restriktionsenzym 1 (5 U)	0,5 µl
Restriktionsenzym 2 (5 U)	0,5 µl
Restriktionspuffer (10x)	3 µl
Nuklease freies Wasser	30-(4+x) µl
<b>Gesamtvolumen</b>	30 µl

### **3.1.3 Agarosegelelektrophorese**

Um die Größe von DNA Fragmenten und Plasmiden (siehe Tabelle 2) zu überprüfen wurden diese in einem Agarose Gel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde Agarose in kochendem 1x TAE Puffer gelöst, Ethidiumbromid (0,25 mg/l) hinzugefügt und in die Gelkammern gegossen. Nachdem das Gel abgekühlt war, wurde jede Geltasche mit 12 µl Probe (3 µl DNA-Lösung, 2 µl 6x DNA Ladepuffer und 7 µl dd H<sub>2</sub>O (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) befüllt und die DNA-Moleküle mit 90 Volt aufgetrennt. Als Standard diente GeneRuler™ 1 kb Standard (Fermentas Life Sciences, St. Leon Rot, Deutschland).

### **3.1.4 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-NEB 5- α Zellen**

*E. coli* wird durch Inkubation mit CaCl<sub>2</sub> chemisch kompetent, d.h. aufnahmefähig für extern angebotene DNA-Moleküle gemacht. Die Zellen sind kommerziell erhältlich (*E. coli*-NEB 5-α Zellen, New England Biolabs). Die Aufnahme von DNA kann durch Hitzeschock der Zellen noch gesteigert werden.

*E. coli*-NEB 5-α Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurden 25 µl Bakteriensuspension mit 1 ng Plasmid-DNA 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Danach folgte der Hitzeschock bei 42°C und 30 Sekunden lang. Im Anschluss wurden die Zellen wieder 5

Minuten lang auf Eis gestellt. Es folgte eine 60 Minuten lange Inkubation mit 500 µl vorgewärmten SOC Medium (New England Biolabs) bei 37°C. Um Einzelkolonien zu erhalten wurden davon 25 µl und 50 µl auf vorgewärmten LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.1.5 Plasmidisolierung**

Für Sequenzierung und Transfektionen von höheren eukaryontischen Zellen wurde Plasmid DNA aus *E. coli* NEB 5-α isoliert. Dafür wurde eine Vorkultur (5 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) mit einer einzelnen Kolonie beimpft und 8 Stunden lang bei 180 rpm (Multitron HT Infors Triple Stacked Incubator; Alliance Analytical Inc) bei 37°C inkubiert. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (250 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, siehe Tabelle 1) beimpft und über Nacht unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Um hohe Ausbeute reiner DNA zu erhalten wurde der Kit Nucleobond Xtra Midi Kit (Macherey Nagel; Düren, Deutschland) verwendet und gemäß den Angaben des Herstellers gearbeitet. Dabei werden die Zellen unter Einwirkung von NaOH und SDS alkalisch lysiert. Mittels Anionenaustauschchromatografie wird die negativ geladene DNA von denaturierten Proteinen und niedermolekularen Substanzen getrennt. Nach Elution der DNA erfolgt die Präzipitation und Entsalzung.

Alternativ wurden Plasmide über alkalische Lyse mit anschließender Extraktion mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol isoliert. Die Trennung der Nukleinsäuren erfolgte durch 2 Phasen Extraktion (flüssig-flüssig). Dabei werden Lipide in die phenolische Phase überführt und Proteine denaturiert. Diese sammeln sich in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase, während die DNA in der wässrigen Phase bleibt. Die Zugabe von SEVAC erhöht die Reinheit der Nukleinsäuren in der wässrigen Phase durch Fällung weiterer Proteine. Nach Entnahme der wässrigen (oberen) Phase, wird die DNA durch Zugabe von Isopropylalkohol gefällt und mit 70 % Ethanol entsalzt.

Für die Isolierung wurden Puffer 1-3 (siehe Abschnitt 2.1.3 Puffer und Lösungsmittel zur Plasmidisolierung) hergestellt. Puffer 1 wurde bei 4°C und Puffer 3 bei Raumtemperatur gelagert. Puffer 2 (Lysepuffer) wurde unmittelbar vor der Verwendung hergestellt. RNase A

(Roche) wurde vor der Zugabe in Puffer 1 bei 95°C Hitzebehandelt um DNAsen zu inaktivieren.

Das Zellpellet (aus 5ml ONC) wurde in 250 µl Puffer 1 in einem 1,5 ml Eppendorf Röhrchen resuspendiert. Danach folgte die Lyse der Zellen in 250 µl Puffer 2 unter kräftigem Invertieren. Nach Zugabe von 350 µl Puffer 3 und kräftigem Invertieren wurde das Eppendorf Röhrchen auf Eis gekühlt. Danach folgte eine 10 Minuten lange Zentrifugation mit 15000 x g um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt und mit 400 µl Phenol gemischt. Nach kräftigem Schütteln am Vortex wurden 250 µl SEVAC hinzugefügt und abermals am Vortex gemischt. Nach einer 1 Minuten langen Zentrifugation bei 15000 x g wurden 400 µl der oberen wässrigen Phase entnommen, in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt und mit 400 µl 100% Isopropylalkohol vermischt. Nach 5 Minuten langer Zentrifugation bei 15000 x g wurde der Überstand verworfen, das Nukleinsäurepellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Quantifizierung der DNA erfolgte mittels Nanodrop 2000 und die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### **3.1.6 Sequenzierung**

Die Einführung von neuen Mutationen in FABP4 wurde durch Sequenzierung des rekombinanten Plasmids pASK-IBA5+\_FABP4 mit Hilfe der vom Hersteller angegebenen Primer durchgeführt. Die Primersequenzen sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die Sequenzierung nach Sanger erfolgte über die Firma Microsynth AG in Wien.

## **3.2 Protein Analyse Methoden**

In Abhängigkeit der zulässigen Reagenzien wurde die Proteinkonzentration entweder nach Bradford (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad laboratories, München, Deutschland) oder nach Biuret (Pierce BCA protein assay, Rockford, Illinois, USA) bestimmt.

### **3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (BioRad Assay, Bio-Rad Laboratories, Deutschland)**

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffs Triphenylmethan Coomassie-Brillant-Blau (G-250) mit kationischen und unpolaren Aminosäuren. Diese stabilisieren den Farbstoff in seiner anionischen blauen Form. Die Blaufärbung steht daher in direktem Zusammenhang mit der in Lösung befindlichen Proteinkonzentration.

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde eine Standardgerade im Bereich von 25-200 µg/ml BSA (Sigma Aldrich) imselben Puffersystem wie die Probe erstellt. 200 µl der Bradford Lösung (1 Teil Reagenz, 4 Teile ddH<sub>2</sub>O) wurden mit 20 µl Probe gemischt und die Absorption nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bei 592 nm gemessen.

### **3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Biuret (Pierce BCA protein assay, Rockford, Illinois, USA)**

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Biuret beruht auf der Reduktion von Cu<sup>+2</sup> Ionen zu Cu<sup>+1</sup> Ionen durch Proteine in alkalischem Medium. Cu<sup>+1</sup> Ionen bilden mit je 2 Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Chelatkomplex aus, dessen Extinktion bei 562 nm in direktem Zusammenhang mit der in Lösung befindlichen Proteinkonzentration steht.

Für die BCA Bestimmung wurde eine Standardgerade mit BSA im Bereich von 25-1000 µg/ml im selben Puffersystem wie die Probe hergestellt. 200 µl BCA Reagenz (50 Teile A und 1 Teil

B) wurden mit 25 µl der Proben in 96 „well“ Mikrotiterplatten vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm im Plattenfotometer (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) gemessen.

### **3.2.3 Diskontinuierliche, denaturierende Natrium Dodecylsulfat-Polyacrylamid**

#### **Elektrophorese (SDS PAGE)**

Bei der diskontinuierlichen SDS PAGE werden Proteine in einem zweistufigen Prozess unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Dafür werden die Proteine zuerst hitzedenaturiert und durch Anlagerung von SDS Molekülen negativ geladen. Im Sammelgel kommt es nach Anlegen eines elektrischen Feldes zu einer Potentialdifferenz zwischen Leit- und Folge-Ion (Chlorid-Anion bzw. Glycin-Zwitterion). Dies führt in Folge von unterschiedlicher Ionenbeweglichkeit zu Stapelbildung der Proteine zwischen Leit- und Folge-Ionen. Diese Stapel wandern alle gleichschnell bis zum Übergang ins Trenngel (Isotachophorese). Im Trenngel ändert sich der Ladungszustand aller Ionen aufgrund der pH Änderung und die Potentialdifferenz verschwindet. Die Proteinstapel wandern durch das Trenngel und werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt. Dabei gilt, je größer das Protein, desto langsamer die Wanderung durch die Polyacrylamid-Poren.

Die Herstellung des Trenngels erfolgte nach Rezept in Tabelle 15. Dafür wurden die einzelnen Komponenten entsprechend der Reihenfolge in Tabelle 15 gemischt, in die Gel-Gußform eingefüllt und mit Butanol überschichtet. Die vollständige Polymerisierung dauerte ca. 1 Stunde. Danach wurde das Butanol abgegossen und das Sammelgel nach Rezept in Tabelle 15 zubereitet. Dieses wurde binnen 1 Minute, über dem Trenngel eingegossen. Um Geltaschen für die Proben zu erhalten, wurde ein Kamm in das Trenngel gesteckt, bevor es auspolymerisiert war. Die Aushärtung dauerte 15 Minuten.

**Tabelle 15: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für SDS Page, mit Zugabe von TEMED und APS wurden die Polymerisation gestartet**

	Trenngel (pro Gußform 5,5 ml)				Sammelgel
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	4,5 %
ddH <sub>2</sub> O	19,6 ml	16,4 ml	12,8 ml	9,6 ml	1,77 ml
4x Trenngel Puffer	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	-
4x Sammelgel Puffer	-	-	-	-	0,75 ml
30 % Acrylamid (Merck)	10 ml	13,2 ml	16,8 ml	20 ml	0,45 ml
10 % SDS	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	30 µl
TEMED (Sigma)	36 µl	36 µl	36 µl	36 µl	3,9 µl
10 % Ammonium Persulfat (APS)	108 µl	108 µl	108 µl	108 µl	12 µl

Die Probennahme erfolgte durch Abkratzen der Zellen 1x PBS Puffer. Die Zellen wurden mit 1000 x g 1 Minute lang pelletiert und bei -20°C gelagert. Nach Resuspension und Zellaufschluss in 100 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 0,1 % NP-40, auf Eis mittels Ultraschall (10 Sekunden, Stufe 1) wurde die Proteinkonzentration nach Biuret bestimmt. Aufgetragen wurden 10 - 20 µg Gesamtprotein in einem Probenvolumen von maximal 25 µl. Dafür wurde das Zelllysate mit 6x SDS Ladepuffer vermischt und 10 Minuten lang bei 95°C denaturiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Proben in die Geltaschen gefüllt. 5 µl „Precision Plus Protein All Blue“ Standard (BioRad; Hercules, USA) wurde als Referenz verwendet.

Die Gele wurden unter Anlegen von 25-40 mA/Gel in 1x Tris-Glycin Puffer und unter Wasserkühlung entwickelt. Danach wurde das Gel 5 Minuten lang in Coomassie Blau Färbelösung gefärbt und danach 2 Stunden lang in Coomassie Blau Entfärbelösung entfärbt. Alternativ zur Coomassie Blau Färbung wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran geblottet (siehe Abschnitt 3.2.4 Western Blotting).

### **3.2.4 Western Blotting**

Beim Western Blotting werden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert und anschließend über Antikörperbindung identifiziert und quantifiziert. Beim „Blotten“ wandern die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf die Membran und werden über hydrophobe Wechselwirkung daran festgehalten.

Für Western Blot Analysen wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) transferiert. Dafür wurde die Membran 30 Sekunden lang in Methanol aktiviert und in einer Sandwich Vorrichtung auf das SDS Gel gelegt. Über der Membran und unter dem Gel wurden Filterpapiere positioniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen bildeten. Der Transfer fand in CAPS Puffer bei Raumtemperatur und 200 mA 75 Minuten lang im TE22 Tank (Hoefer Inc.; San Francisco, USA) statt. Danach wurde die Membran 1 Stunde lang in 1x TST Puffer, 5 % Milchpulver (Blotting grade, Roth) blockiert. Nach Entfernen der Blockierlösung folgte die Inkubation mit der primären Antikörperlösung (siehe Tabelle 8) auf der Schüttelplattform bei 4°C über Nacht. Nach 3x Waschen mit 1x TST Puffer folgte die Inkubation mit der sekundären Antikörperlösung (1x TST, 5% Milchpulver, 1: 10 000 Hrp gekoppelten Anti-Maus oder Anti-Kaninchen, siehe Tabelle 8) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur. Nach 3x Waschen mit 1x TST Puffer folgte die Detektion mittels ECL Substrat (Pierce ECL 2, Thermo Scientific) im Fotolabor unter Einhaltung der Anweisungen des Herstellers. Dafür wurden Curix Ultra UV-G Filme (Agfa), Entwicklerlösung (Adefovit 90) und Fixiererlösung (Adefofix Mix) verwendet. Alternativ erfolgte die Detektion im ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad).

### **3.2.5 Quantifizierung von Western Blot Signalen**

Die Quantifizierung der Signale auf den Curix Ultra UV-G Filmen erfolgte über die Software Quantity One. Dafür wurden die belichteten Filme mit einem Densitometer (BioRad GS800) eingescannt und die Signale über das Software tool quantifiziert. Für die relative Quantifizierung wurden alle Signale auf „housekeeping“ Proteine normalisiert (=1<sub>x</sub> normalisiert).

Die unterschiedliche Auftragung von Proben wurde herausgerechnet, indem alle „housekeeping“ Signale nivelliert wurden. Dazu wurde das stärkste „housekeeping“ Protein Signal ( $I_{\max \text{ housekeeping protein}}$ ) durch das korrespondierende „housekeeping“ Protein Signal ( $I_{x \text{ housekeeping protein}}$ ) dividiert. Daraus resultierte ein Normalisierungsfaktor  $f_{x n}$ , mit dem alle Signalintensitäten ( $I_x$ ) multipliziert wurden.

$$I_{x \text{ normalisiert}} = I_x * f_n \quad \text{wobei } f_n = I_{\max \text{ housekeeping protein}} / I_{x \text{ housekeeping protein}}$$

Bei Detektion im ChemiDoc Touch Imaging System wurden die Signale mit der Software Image Lab quantifiziert und wie oben normalisiert.

### **3.2.6 „Stripping“ von Membranen**

Um Expressionslevel unterschiedlicher Proteine auf derselben Membran zu testen, wurden die Membranen 1-3 x „gestrippt“, d. h. die Antikörper unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von Detergenz von den Proteinen heruntergelöst. Dafür wurde die Membran in „Stripping“ Puffer für 15 Minuten bei 55°C eingelegt und geschwenkt. Nach 2x Waschen mit 1x TST und ddH<sub>2</sub>O erfolgte das Blockieren in 1x TST und 5 % Milchpulver und die abermalige Inkubation mit primärer und sekundärer Antikörperlösung.

### **3.3. Zellkulturmethoden**

Die Zellen wurden jeden zweiten Tag gemäß Tabelle 5 subkultiviert. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurden sie mit 3 ml Trypsin-EDTA (3 min. 37°C) (Gibco-Life Technologies, San Diego, USA) von der Kulturflasche abgelöst. Die Trypsinisierung wurde mit 10 ml Medium abgestoppt und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. So wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 290 x g 3 Minuten lang pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in frisches Medium aufgenommen und aliquot in sterile Kulturflaschen verteilt. Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 7 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert (siehe Tabelle 6).

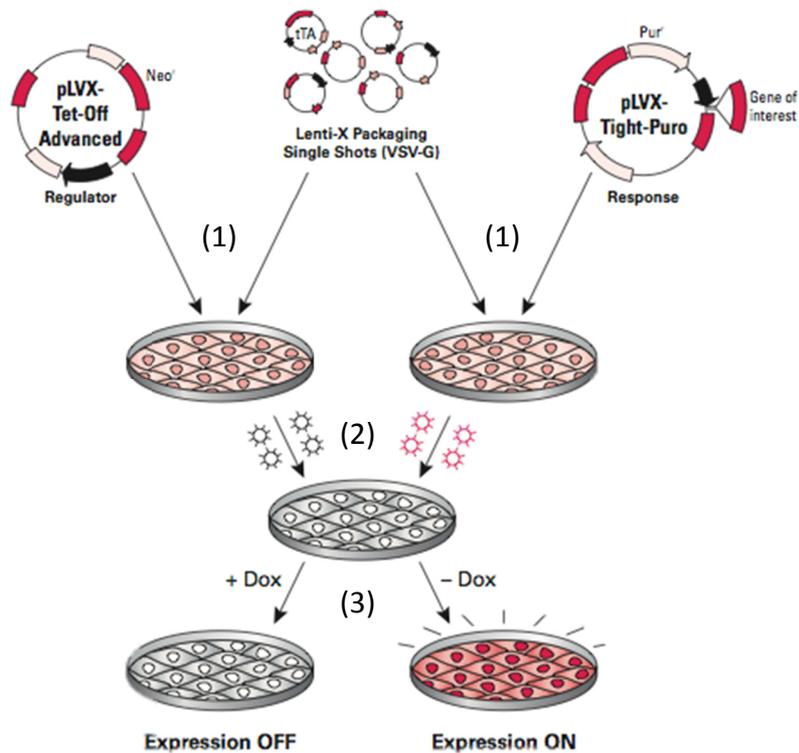
### **3.3.1.1 Herstellung von stabil überexprimierenden Zelllinien mittels „Lenti-X Tet-Off Advanced inducible System“**

Das Lenti-X Tet-Off System dient zur Herstellung von stabil-Transgen-exprimierenden Zellen, wobei die Expression mittels Doxycyclin abgeschaltet werden kann.

Im ersten Schritt werden verschiedene Verpackungsplasmide („Lenti-X packaging single shots“, siehe Tabelle 3) gemeinsam mit entweder dem Regulatorvektor oder dem „Response“-Vektor in HEK 293T Zellen transfektiert. In diesen Zellen bilden sich binnen 48 Stunden zwei Typen von infektiösen viralen Partikeln. Zum einen infektiöse virale Partikel mit der genetischen Information des Regulatorvektors (pLVX-tet-Off Advanced) umhüllt von lentiviralen Hüllproteinen und zum anderen mit der genetischen Information des „Response“-Vektor (pLVX-Tight-Puro\_Transgen) umhüllt von lentiviralen Hüllproteinen. Der Regulatorvektor kodiert für einen Tetracyclin (hier: Doxycyclin) regulierten Transaktivator (tTA), welcher am Tet-response Element (TRE) binden kann. Der „Response“-Vektor kodiert für das gewünschte Transgen. Vor dem Transgen befindet sich ein Tet-response Element und ein Zytomegalievirus (ZMV) Promotor.

Bei gleichzeitiger Infektion mit beiden viralen Partikeln, wird die genetische Information für beide Vektoren ins Genom der Zelle integriert. tTA wird konstitutiv über einen ZMV Promotor exprimiert und bindet an das TRE am „Response“-Vektor. Solange kein Doxycyclin zugesetzt wird, bleibt tTA am TRE und aktiviert die Transkription des gewünschten Transgens und damit die Expression des gewünschten Proteins.

Die doppelinfizierten Zellen können über ihre Resistenz gegen Geneticin und Puromycin selektiert werden (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung zur Herstellung von stabil Transgen exprimierenden Zellen über das „LentiX TetOff advanced inducible System“.** (1) Im ersten Schritt werden zwei Typen von infektiösen viralen Partikeln durch Transfektion generiert. (2) Diese werden geerntet und schließlich zur Infektion von unterschiedlichen Zielzelllinien verwendet. Nach der Selektion mit Geneticin und Puromycin überleben ausschließlich jene Zellen, welche beide Plasmide in ihrem Genom integriert haben. (3) Ohne Doxycyclin exprimieren die Zellen das gewünschte heterologe Protein konstitutiv. Bei Zugabe von Doxycyclin wird die Expression inhibiert. Die Abbildung wurde nachbearbeitet und entstammt der Arbeitsanleitung der Firma Clontech.

### 3.3.1.2 Transfektion der Verpackungszellen HEK 293 T

Mit Hilfe eines Transfektionsreagenz wird ein Set von Verpackungsplasmiden (sie enthalten die genetische Information zur Herstellung eines infektiösen Vesicularis Stomatitis Virus - Spike Glycoprotein (VSV-G) Viruspartikels) zusammen mit dem gewünschten

Expressionsplasmid (Responsevektor) in die Zelle eingebracht [50]. Das Transfektionsreagenz bildet eine Hülle um die DNA, die so durch die Zellmembran ins Zellinnere gelangen kann. Im Zellinneren finden die Transkription des Vektors und die Translation der Hüllproteine statt. Die Hüllproteine verpacken schließlich die Vektor-RNA und bauen zusammen virale Partikel auf. Die fertigen infektiösen Partikel werden aus den Verpackungszellen ins Medium geschleust.

Dazu wurden am ersten Tag  $3 \cdot 10^6$  HEK 293-T Zellen/ 10 cm  $\emptyset$  Zellkulturschale (Tetracyclin frei) ausgesät und mit 10 ml DMEM (+/+ /+) über Nacht kultiviert. Es wurden drei Typen von infektiösen Partikeln aus folgenden LentiX Vektor DNA Plasmiden hergestellt: pLVX-Tight-Puro\_HSP90; pLVX-Tight-Puro\_YWH $\alpha\beta$ ; pLVX-tet-Off Advanced. Pro Konstrukt wurden 3x 10 cm  $\emptyset$  Zellkulturschalen ausgesät.

Am darauffolgenden Tag wurden für jedes Plasmid folgende zwei Komponenten für den Transfektionsmix auf Eis gemischt:

Komponente 1 enthielt 557  $\mu$ l „Xfect Reaction buffer“ + 36  $\mu$ l LentiX HTX Packaging Mix + 7  $\mu$ l LentiX Vektor DNA (pLVX-Tight-Puro\_HSP90 oder pLVX-Tight-Puro\_YWH $\alpha\beta$ ; oder pLVX-tet-Off Advanced, je c=1  $\mu$ g/ $\mu$ l).

Komponente 2 enthielt 592,5  $\mu$ l „Xfect Reaction buffer“ und 7,5  $\mu$ l Xfect Polymer.

Beide Komponenten wurden 1:1 vereinigt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro 10 cm  $\emptyset$  Zellkulturschale wurden die adhärenen HEK 293-T Zellen mit 1,2 ml Transfektionsmix überschichtet und 4 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und durch DMEM (+/+ /+) ersetzt. Nach 44 Stunden wurde das Medium mit den sezernierten Viruspartikeln abgenommen und durch 0,45  $\mu$ m Cellulose Acetat Filter gefiltert um ganze Zellen abzutrennen. Die unterschiedlichen viralen Partikelsuspensionen wurden in 1 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

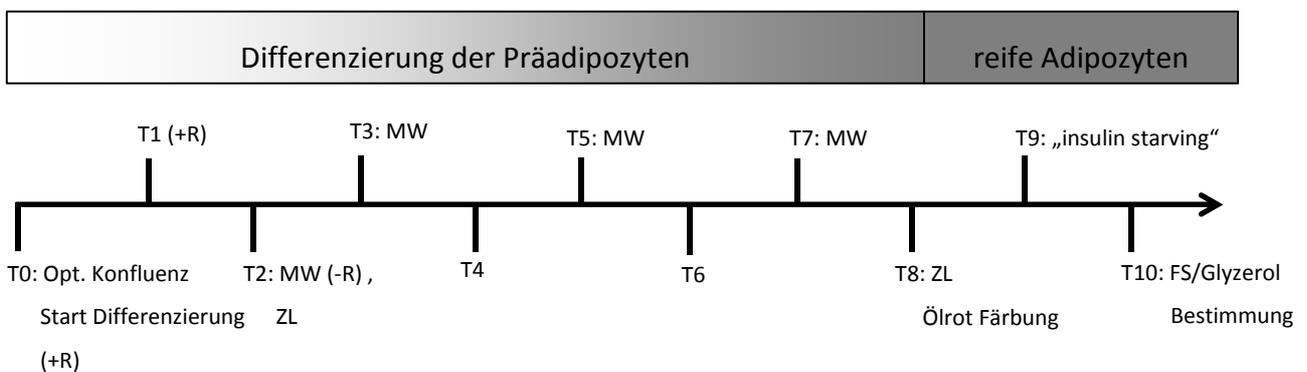
Um besseren Lesefluss zu gewährleisten, werden die Plasmidnamen im Ergebnisteil verkürzt geschrieben. Aus „pLVX-Tight-Puro\_HSP90“ wird [pLVX Hsp90], aus „pLVX-Tight-Puro\_YWH $\alpha\beta$ “ wird [pLVX 14-3-3 $\beta$ ] und aus „pLVX-Tight-Puro\_keinTransgen“ wird [pLVX].

### **3.3.1.3 Infektion von OP9-K Zellen**

Am ersten Tag wurden auf 6-well Platten pro well 30000 OP9-K Zellen mit Passage 45 ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium (MEM Alpha (+/+)) abgesaugt und gegen 1,3 ml MEM Alpha (+/+) mit 2 µl Polybrene (8 mg/ml) ausgetauscht. Zur viralen Infektion wurden 700 µl Infektionsmix (350µl pLVX-Tight-Puro\_YWHαβ bzw. pLVX-Tight-Puro\_HSP90 virale Partikelsuspension zusammen mit jeweils 350µl pLVX-tet-Off Advanced virale Partikelsuspension) auf die Zellen pipettiert und 3 Tage lang unter Standardbedingungen inkubiert. Am dritten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen trypsinisiert und auf 4 „wells“ vereinzelt. Ab diesem Tag wurden erfolgreich infizierte Zellen mittels 2 µg/ml Puromycin (Sigma Aldrich) und 600 µg/ml Geneticin (G418 sulfate, Life Technologies) (MEM Alpha (+/+P+/G+)) selektiert (siehe Tabelle 1). In der Selektionsphase wurden die Zellen alle 2 Tage 1:3 subkultiviert. Nachdem alle nicht infizierten Zellen abgestorben waren, wurden die überlebenden und damit infizierten Zellen schrittweise in größere Zellkulturflaschen überführt und dabei die Antibiotika-Konzentration auf 0,2 µg/ml Puromycin und 60 µg/ml Geneticin im Kultivierungsmedium herabgesetzt. Um die Zelllinie schließlich stabil zu halten wurde dem Medium ständig 50 µg/ml Geneticin zugesetzt. Vor der Differenzierung der rekombinanten OP9-K Zellen wurden die Antibiotika allerdings abgesetzt.

### 3.3.2 Differenzierung der rekombinanten 3T3-L1 Zellen

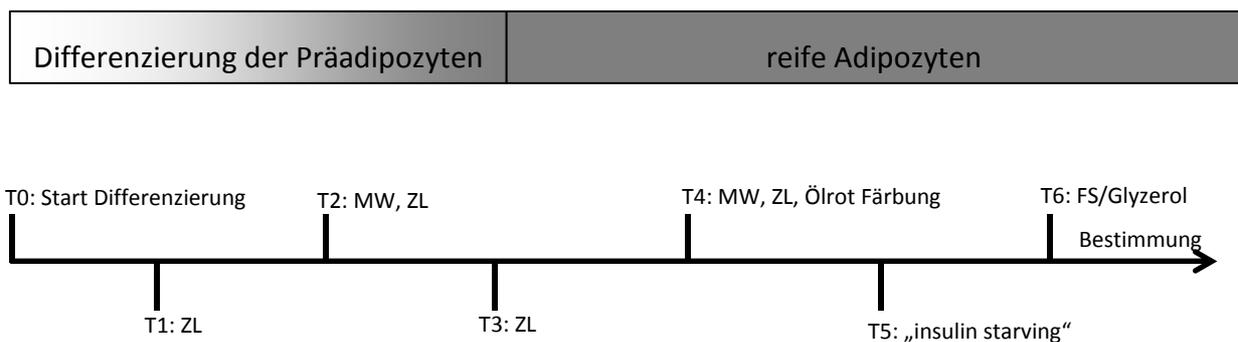
Zur Differenzierung wurden 25000 3T3-L1 Zellen, welche stabil das Protein 14-3-3 $\beta$  exprimierten, pro „well“ auf einer 6-well-Platte ausgesät. Zwei Tage nach Erreichen der optischen Konfluenz (3-5 Tage später) wurde die Differenzierung (Tag 0) mit DMEM (+/+), 0,4  $\mu$ g/ml Dexamethason, 500  $\mu$ M IBMX, 10  $\mu$ g/ml Insulin und 2  $\mu$ M Rosiglitazon (siehe Tabelle 10) gestartet. Nach zwei Tagen wurde das Medium durch DMEM (+/+) 0,4  $\mu$ g/ml Dexamethason, 500  $\mu$ M IBMX, 10  $\mu$ g/ml Insulin ersetzt. Ab Tag 3 wurden die Zellen in DMEM (+/+) mit 10  $\mu$ g/ml Insulin kultiviert. Ab Tag 5 wurde die Insulinkonzentration auf 0,2  $\mu$ g/ml herabgesetzt. Am 9. Tag wurden die Zellen für 24 Stunden mit DMEM (+/+) ohne Insulin inkubiert („insulin starving“). Am 10. Tag wurde der Gehalt an nicht veresterten FS und Glycerol unter Verwendung von Stimulatoren und Inhibitoren (siehe Tabelle 9) in DMEM (-/-) Medium mit 2 % FS-freiem BSA bestimmt. (siehe Abschnitte 3.4.1 Bestimmung von freien FS und Abschnitt 3.4.2 Bestimmung von Glycerol). Abbildung 3 gibt einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Adipozytendifferenzierung und der vorgenommen experimentellen Untersuchungen.



**Abbildung 3: Überblick über den zeitlichen Verlauf der Adipozytendifferenzierung von 3T3-L1 Zellen und der vorgenommen experimentellen Untersuchungen.** T0 – T10 = Tag 0 – 10, ZL: Herstellung von Zellysat für Western blot, MW: Mediumwechsel; (+R): Medium enthält Rosiglitazon. Überblick über den zeitlichen Verlauf der Adipozytendifferenzierung und der vorgenommen experimentellen Untersuchungen

### 3.3.3 Differenzierung der rekombinanten OP9-K Zellen

Zur Differenzierung wurden pro well auf einer 6-well Platte 50000 rekombinante OP9-K Zellen, die stabil 14-3-3 $\beta$  oder Hsp90 exprimierten ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung (Tag 0) mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1  $\mu$ g/ml Insulin und 900  $\mu$ M Ölsäure beladenem BSA (siehe Tabelle 10) gestartet. Am 2. und 4. Tag wurde das Medium gewechselt. Am 5. Tag wurden die Zellen 24 Stunden lang mit MEM Alpha (+/+) ohne Insulin und FS kultiviert („insulin starving“). Am 6. Tag wurde der Gehalt an nicht veresterten FS und Glycerol unter Verwendung von Stimulatoren und Inhibitoren (siehe Tabelle 9) in MEM Alpha (-/-) Medium mit 2% FS-freiem BSA bestimmt. Abbildung 4 gibt einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Adipozytendifferenzierung und der vorgenommenen experimentellen Untersuchungen.



**Abbildung 4: Überblick über den zeitlichen Verlauf der Adipozytendifferenzierung von OP9-K Zellen und der vorgenommenen experimentellen Untersuchungen.** T0 - T6 = Tag 0 – 6, ZL: Herstellen von Zelllysate für Western blot, MW: Mediumwechsel;

### 3.3.4 Fotografie

Viele Prozessschritte wurden auch fotografisch festgehalten. Für makroskopische Fotografie wurde ein iPhone 4 verwendet. Mikroskopische Zellaufnahmen erfolgten mit einer Nikon D70s Spiegelreflexkamera.

### **3.3.5 Transfektion von COS-7 Zellen mit Metafectene**

Bei der Transfektion werden Plasmide in eukaryontische Zellen eingebracht. Das Transfektionsreagenz (Metafectene, Biontex) bildet eine Hülle um die DNA, sodass sie durch die Zellmembran ins Zellinnere gelangen kann. Im Inneren der Zellen kommt es in weiterer Folge zur transienten Expression des rekombinanten Proteins.

Mit einem CASY cell counter (Model TTC; Schärfe Systems; Reutlingen, Deutschland) wurden die Zellen in isotoner „CASY tone“ Messlösung (Schärfe Systems, Reutlingen, Deutschland) gezählt und 900000 COS-7 Zellen pro 10 cm Ø Zellkulturschalen ausgesät und in DMEM (+/+) kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch DMEM mit 10 % FCS und ohne Pen/Strep (=DMEM +/-) ersetzt.

Der Transfektionsmix wurde folgendermaßen hergestellt:

Komponente 1: 30 µl Metafectene (Biontex GmbH, München, Deutschland) und 300 µl DMEM (-/-) wurde mit Komponente 2: 10 µg Plasmid DNA (1 µg/µl) und 300 µl DMEM (-/-) vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsmix wurde auf die Zellen pipettiert und nach 5-6 Stunden durch herkömmliches Medium DMEM (+/+) ersetzt.

### **3.3.6 Herstellung von Zelllysaten für Western blotting und SPAs**

48 Stunden nach der Transfektion wurden die COS-7 Zellen 2x mit 1x PBS gewaschen und in 600 µl Lysatpuffer (1xTBS, 0,05 % NP-40, 1x Pi) durch Abschaben gelöst. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Missonix Sonicator 4000, QSonica; Newtown, USA,) auf Eis aufgeschlossen (3x 10 Sekunden, Stufe 5) und das Gesamtzelllysat bei 4°C und 1000 x g 20 Minuten lang zentrifugiert um Zelltrümmer und ganze Zellen abzutrennen. Der Überstand (= Zelllysate) wurde abgenommen und die Proteinkonzentration nach Biuret bestimmt.

### **3.3.7 Herstellung von Zelllysaten für Western blotting**

Für Western blotting wurden die Zellen (OP9-K) 2x mit 1x PBS gewaschen, von der Oberfläche abgekratzt und in 500 µl 1x PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in Eppendorfröhrchen bei 1000 x g 1 Minute lang abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet bei -20°C gelagert. Für die Proteinbestimmung wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und in 100 µl Lysatpuffer (100 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 0,05 % NP-40) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte auf Stufe 1 und 10 Sekunden lang. Anschließend wurde die Gesamtproteinkonzentration nach Biuret bestimmt.

## **3.4 Biochemische Analysen**

Bei der zellulären Lipolyse werden TG in 3 freie FS und 1 Glycerol gespalten. Zur Quantifizierung der Lipolyse können sowohl FS als auch Glycerol bestimmt werden. Während die basale Lipolyse permanent abläuft und so ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Fettauf- und -abbau besteht, kommt es bei langer Nahrungskarenz, Unterkühlung und Stresspanik zu verstärkter Lipolyse. Diese gesteigerte Lipolyse wird durch Zugabe von Forskolin, einem Stimulator der Adenylylcyclase simuliert.

### **3.4.1 Bestimmung von freien FS mittels NEFA Kit ACS-ACOD (Wako Diagnostics)**

Das Testprinzip von „NEFA kit ACS-ACOD“ beruht auf der Umsetzung der freien FS zu Acyl-CoAs durch das Enzym Acyl-CoA Synthetase (ACS) unter Verbrauch von ATP und Coenzym A. Die dabei entstehenden Acyl-CoAs (=aktivierten FS) werden durch das Enzym Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) zu 2,3 trans-Enoyl-CoA und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt. Das frei werdende Wasserstoffperoxid ermöglicht die oxidative Kupplung von 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Anilin (MEHA) mit 4-Aminoantipyrin (4-AA) in Anwesenheit der Peroxidase zu einem blau-violetten Farbkomplex. Die Farbintensität des Farbkomplexes ist direkt proportional zum Gehalt an FS in der Probe.

Zur Bestimmung von FS aus OP9-K Zellen wurden die Zellen mit MEM Alpha (-/-) mit 2 % FS freiem BSA inkubiert (2 Stunden für basale, 1 Stunde für stimulierte Lipolyse). Die basale Lipolyse wurde in Gegenwart des Hsl Inhibitors, Atglistatin und von Triacsin C und als Negativkontrolle nur in Gegenwart des Lösungsmittels DMSO gemessen. Für die Bestimmung von FS im Medium unter Lipolyse stimulierten Bedingungen wurden die Zellen 1 Stunde mit DMEM (-/-) bzw. MEM Alpha (-/-) mit 2 % FS freiem BSA und 20  $\mu$ M Forskolin inkubiert.

Die Konzentration an FS wurde in 1 ml Medium bestimmt. Die Messung der basalen Lipolyse fand unmittelbar vor der stimulierten statt. Für die fotometrische Bestimmung wurde das Medium in Eppendorf Röhrchen gesammelt und bei -20°C gelagert. Nach der Messung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 1x TBS 0,3 M NaOH, 0,1 % SDS für 2 Stunden auf der Schüttelplattform lysiert und die Proteinkonzentration nach Biuret bestimmt.

Für die fotometrische Bestimmung wurde eine Standardgerade mit demselben Medium, welches auch für die Proben (=Medium+ 2 % BSA) verwendet wurde, durchgeführt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe mit dem FS Standard (1 mM „Non esterified free fatty acids“, Wako) im Bereich von 0-1000  $\mu$ M hergestellt. Die Bestimmung erfolgte mit dem NEFA Kit ACS-ACOD (Wako Diagnostics) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Absorption des Farbkomplexes wurde bei 562nm gemessen.

### **3.4.2 Bestimmung von Glycerol mittels Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich)**

Das Testprinzip von „Free Glycerol Reagent“ beruht auf der Umsetzung des freien Glycerols durch die Glycerol-Kinase zu Glycerol-3-Phosphat (G-3-P) unter Verbrauch von ATP. Glycerol-3-P wird über die Glycerolphosphatoxidase (GPO) und gelöstem O<sub>2</sub> zu Dihydroxyaceton-Phosphat (DAP) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt. Das frei werdende Wasserstoffperoxid ermöglicht die oxidative Kupplung von 4-Aminoantipyrin (4-AAP) mit Natrium N-ethyl-N-(3-sulfopropyl) m-Anisidin (ESPA) zu einen rosafarbenen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 540 nm. Die Farbintensität ist direkt proportional zum Gehalt an Glycerol in den Proben.

Zur Bestimmung von Glycerol aus OP9-K Zellen wurden die Zellen mit MEM Alpha (-/-) mit 2 % FS freiem BSA inkubiert (2 Stunden für basale, 1 Stunde für stimulierte Lipolyse). Die basale Lipolyse wurde in Gegenwart des Hsl Inhibitors, Atglistatin und von Triacsin C und als Negativkontrolle nur in Gegenwart des Lösungsmittels DMSO gemessen. Für die Bestimmung von FS im Medium unter Lipolyse stimulierten Bedingungen wurden die Zellen 1 Stunde mit DMEM (-/-) bzw. MEM Alpha (-/-) mit 2 % FS freiem BSA und 20 µM Forskolin inkubiert.

Die Konzentration an Glycerol wurde in 1 ml Medium bestimmt. Die Messung der basalen Lipolyse fand unmittelbar vor der stimulierten statt. Für die fotometrische Bestimmung wurde das Medium in Eppendorf Röhrchen gesammelt und bei -20°C gelagert. Nach der Messung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 1x TBS 0,3 M NaOH, 0,1 % SDS für 2 Stunden auf der Schüttelplattform lysiert und die Proteinkonzentration nach Biuret bestimmt.

Für die fotometrische Bestimmung wurde eine Standardgerade in demselben Medium, welches auch für die Proben (=Medium+ 2 % BSA) verwendet wurde, durchgeführt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von 0-1000 µM mit dem und Glycerol Standard (2,85 mM, Free glycerol Reagent, Sigma) hergestellt. Die Bestimmung erfolgte mit dem Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Absorption des Farbkomplexes wurde bei 562 nm gemessen.

### **3.4.3 Ölrot Färbung zur Quantifizierung der zellulären TG**

Für die Quantifizierung der TG-Einlagerung wurden die Zellen nach der Differenzierung mit Formalin fixiert und mit Ölrot (Oil Red O, Sigma) gefärbt. Der Farbstoff ist stark lipophil und lagert sich in Zellmembranen und LDs ein. Durch Extraktion des Farbstoffes mit Isopropanol lässt sich die Menge an intrazellulären TG in den unterschiedlichen Proben relativ zueinander vergleichen.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen 2x mit 1x PBS gewaschen und mit 1x PBS, 4 % Formalin 1 Stunde lang bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen ein

weiteres Mal mit 1x PBS und 1x mit 60 % Isopropanol gewaschen, an der Luft getrocknet und mit 0,5 ml Färbelösung (4 Teile Wasser: 6 Teile 0,5 % „Oil Red O“ in Isopropanol, gefiltert) 2 Stunden lang inkubiert. Die Färbelösung wurde abgesaugt und die fixierten Zellen mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und fotografiert. Die Extraktion des an TG gebundenen Farbstoffes erfolgte mit 1 ml 100 % Isopropanol. Die Absorption wurde bei 510 nm gemessen.

### **3.5 Heterologe Expression und Proteinreinigung**

#### **3.5.1 Reinigung von rekombinanten Fabp4 Proteinvarianten aus *E.coli*-NEB 5-alpha**

Die Reinigung des rekombinanten Strep-Fabp4 Proteins sowie der 8 mutierten Strep-Fabp4 Proteinvarianten (siehe Tabelle 4) erfolgte durch induzierte Expression in *E. coli*-NEB 5- $\alpha$ . Dafür wurde eine 5 ml ONC (LB-Medium, 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) mit einer Kolonie (nicht älter als 1 Woche) beimpft und bei 30°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die ONC in die Hauptkultur (125 ml LB-Medium, 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert (Dauer rund 3 Stunden). Danach folgte die 3 stündige Expressionsinduktion mit 200  $\mu$ g/l Anhydrotetracyclin (AHTC, Hartmann, IBA) bei 37°C und 200 rpm. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4500 x g für 12 Minuten bei 4°C pelletiert und bei Bedarf bei -20°C gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis. Dafür wurden die Zellpellets in 1 ml Puffer W resuspendiert und auf Eis mittels Ultraschall (Sonicator, 5x 20 Sekunden, Stufe 10) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 16000 x g für 15 Minuten und 4°C wurden die Zelltrümmer, ganze Zellen, Zellkerne etc. vom Lysat abgetrennt. Die Aufreinigung der Strep-Fabp4 Varianten erfolgte über Affinitätschromatografie mit Strep-Tactin superflow high capacity resins (IBA lifesciences) als Säulenmaterial. Dafür wurde 1 ml Strep-Tactin superflow high capacity resins in Chromatographiesäulen gefüllt und mit Puffer W equilibriert. Darauf folgte die Inkubation mit den Zell-Lysaten 4 Stunden lang am „Top-over“ Mischrad bei 4°C. Nach 2x Waschen der Säule mit Puffer W wurden die rekombinanten Proteine mit Puffer E eluiert und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Die Reinheit der Eluate wurde

durch Auftrennung der Proteine mittels SDS PAGE und Coomassie Blau Färbung sichtbar gemacht. Die Eluate wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.6 Nachweis von Protein-Protein Interaktion mittels SPA**

Die Interaktion der verschiedenen Strep-Fabp4 Proteinvarianten mit murinen His-Cgi-58 im Vergleich zu WT Fabp4 wurde mittels SPA bestimmt. Dafür wurden MaxiSorp Platten über Nacht bei 4°C auf der Schüttelplattform (Thermo Scientific, Rockford, USA) mit 3 µg aufgereinigtem Strep-Fabp4 (=Köder) in „Coating buffer“ (1 TBS, pH 8) beschichtet. Am 2. Tag wurden die „wells“ entleert und für 3-5 Stunden mit 250 µl „blocking buffer“ (1x TBS, 5 % BSA (FS frei, Sigma)) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die „wells“ über Nacht bei 4°C mit frisch hergestelltem COS-7 Zelllysate inkubiert. Die COS-7 Lysate enthielten entweder rekombinantes murines His-Cgi-58 oder His-LacZ als Kontrolle. Pro „well“ wurden 100 µl „Dilution buffer“ (1x TBS, 0,05 % Tween 20, 2 % BSA (FS frei, Sigma)) mit 50-80 µg Gesamtprotein COS-7 Lysat verwendet. Am 3. Tag wurden die „wells“ 3x mit 250 µl Waschpuffer (1x TBS, 0,05 % Tween 20) gewaschen und mit 100 µl primärer Antikörperlösung (N-terminaler Anti-His-Tag, hergestellt in Maus, Amersham Biosciences, 1:3000 in 1x TBS, 0,5 % BSA, 0,05 % Tween20) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte erneut 3x Waschen mit 250 µl Waschpuffer. Im Anschluss wurde mit 100 µl sekundärer Antikörperlösung (Anti-Maus IgG, Hrp- linked, hergestellt im Schaf, GE Healthcare, 1:1000 in 1x TBS, 0,5 % BSA, 0,05 % Tween20) ebenfalls für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor wieder 3x mit 250 µl Waschpuffer gewaschen wurde. Die Detektion erfolgte mit 100 µl Detektionslösung (27 mM Citrat, (Merck) 51 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5.0 + Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma) in DMSO (c= 10 mg/ml) + 0,0002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) (Merck)). Die Reaktion wurde mit 50 µl HCl (Merk) gestoppt und die Absorption bei 450/620 nm gemessen.

Alle Absorptionswerte wurden auf die Absorptionswerte von LacZ normalisiert (=durch den Absorptionswert von LacZ dividiert). Zur Berechnung der relativen Bindungsstärke wurde die Interaktion WT Fabp4/Cgi-58 als 100 % definiert.

## **4. Ergebnisse**

#### **4.1 Charakterisierung der oberflächennahen Proteindomänen, die an der Fabp4/Cgi-58 Interaktion beteiligt sind**

Der kontrollierte und koordinierte Abbau von TG im Fettgewebe erfordert ein komplexes Zusammenspiel des hydrolytischen Enzyms Atgl mit unterschiedlichen Partnerproteinen wie z.B. Cgi-58, welches die enzymatische Aktivität von Atgl um ein Vielfaches erhöht oder G0s2, das die enzymatische Aktivität der Atgl inhibiert [37, 64]. Die Gesamtheit der interagierenden Proteine wird als „Lipolysome“ bezeichnet und scheint den Abbau von TG am LD zu DG- bzw. MG und weiter zu Glycerol und freien FS auch mit anderen intrazellulären Prozessen wie Ppar-vermittelte Transkriptionsregulation zu verbinden [33].

So interagiert Cgi-58 mit dem „FS-shuttle“ Fabp4 und funktioniert als Adaptorprotein, welches Fabp4 an die Atgl heranführt, um die durch Lipolyse freiwerdenden FS zu binden und weiter zu transportieren. NMR-Analysen zeigten, dass Seitenketten bestimmter Aminosäuren der N-terminalen  $\alpha$ 1- bzw.  $\alpha$ 2-Helix, sowie zweier räumlich angrenzender „loops“ an der Protein-Protein-Interaktion beteiligt sind. Wichtige Aminosäuren der Fabp4/Cgi-58 Interaktion sind Arg-31, Lys-32, Val-33, Gly-35 und Meth-36 der  $\alpha$ 2-Helix, sowie Phe-58, Lys-59, Asp-77 und Asp-78 in den angrenzenden loops [33]. Hofer *et al.* zeigten in ersten Interaktionsstudien, dass einzelne Aminosäureaustausche an der Position Phe-59 oder an Position Asp-77 bzw. Asp-78 zu einer Reduktion der Bindung zwischen Cgi-58 und Fabp4 führen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Aminosäureseitenketten an diesen Positionen tatsächlich Teil der Bindungsdomäne von Fabp4 sind, jedoch noch weitere Aminosäureseitenketten essentiell für die Bindung von Cgi-58 und Fabp4 sind. Mit Hilfe von gerichteter ortsspezifischer Mutagenese sollten nun alle bindungsrelevanten Aminosäuren im FABP4 Gen in unterschiedlichen Kombinationen mutiert und die resultierenden Fabp4 Proteinvarianten mittels SPA auf ihre Bindungsfähigkeit mit Cgi-58 untersucht werden. Ziel war es, eine Fabp4 Proteinvariation zu finden, die Cgi-58 nicht mehr bindet. Dazu wurden im humanen FABP4 Gen Punktmutationen gesetzt, sodass positiv geladene Aminosäuren wie z.B. Lysin durch negativ geladene Aminosäuren wie Glutaminsäure ausgetauscht wurden. Aminosäuren mit voluminösen Seitenketten wie z.B. Phenylalanin wurden durch Aminosäuren mit kurzen Seitenketten wie etwa Glycin ausgetauscht. Auf diese Weise entstanden die Proteinvarianten Fabp4<sup>F58S/K59S</sup>, Fabp4<sup>D77G/D78G</sup> und Fabp4<sup>F58S/K59S/D77G/D78G</sup>, die

entweder jeweils 2 oder alle 4 bindungsrelevanten Aminosäuren in den angrenzenden „loops“ ausgetauscht hatten. Auch die bindungsrelevanten Aminosäuren der  $\alpha$ 2-Helix wurden in unterschiedlichen Kombinationen verändert. Dabei entstanden die Proteinvarianten Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E</sup>, Fabp4<sup>G35K/M36E</sup>. In der Proteinvariation Fabp4<sup>del31-36</sup> wurden überhaupt alle bindungsrelevanten Aminosäuren der  $\alpha$ 2-Helix deletiert (zur Verfügung gestellt von P. Hofer). In weiterer Folge wurden Aminosäureaustausche in der  $\alpha$ 2-Helix und in ihren angrenzenden „loops“ kombiniert. Damit entstanden die Proteinvariationen Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E/D77G/D78G</sup> und Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E/F58S/K59E/D77G/D78G</sup>. Alle FABP4 Mutanten wurden sequenziert, um die ortsspezifischen Basenaustausche nachzuweisen (Abbildungen 5-12). Die resultierenden Fabp4 Proteinvarianten wurden in *E. coli* exprimiert und gereinigt (Abbildung 13).

```

Seq_1 1      C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M      60
              TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACTTTGATGATTATATG
Seq_2 1      TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACTTTGATGATTATATG      60
              C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M

Seq_1 61      K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M      120
              AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACATG
Seq_2 61      AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACATG      120
              K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M

Seq_1 121     I I S V N G D V I T I K S E S T S K N T      179
              ATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAATCTGAAAGTACC-TTTAAAAATAC
Seq_2 121     ATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAATCTGAAAGTACCAG-TGAAAAATAC      179
              I I S V N G D V I T I K S E S T S E N T

Seq_1 180     E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V      239
              TGAGATTTTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGATGACAGGAAAAGT
Seq_2 180     TGAGATTTTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGATGACAGGAAAAGT      239
              E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V

Seq_1 240     K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K      299
              CAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAAA
Seq_2 240     CAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAAA      299
              K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K

Seq_1 300     S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K      359
              ATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGAA
Seq_2 300     ATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGAA      359
              S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K

Seq_1 360     G V T S T R V Y E R A *      396
              AGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA
Seq_2 360     AGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA      396
              G V T S T R V Y E R A *

```

**Abbildung 5 Alignment von humanem WT FABP4 (Seq\_1) mit Mutante FABP4<sup>F58S/K59E</sup> (Seq\_2).** Die Annotation erfolgte mit der Software SerialCloner 2.6. Die veränderten Aminosäuren sind rot markiert. Ähnlichkeit: 393/396 (99,24 %)

```

Seq_1 1      C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M      60
              TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTTGATGATTATATG
Seq_2 1      TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTTGATGATTATATG      60
              C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M

Seq_1 61      K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M      119
              AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACC-AGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACAT
Seq_2 61      AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCGAGGAAGA-GGCTGGCATGGCCAAACCTAACAT      119
              K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M

Seq_1 120     I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T      179
              GATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATAC
Seq_2 120     GATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATAC      179
              I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T

Seq_1 180     E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V      239
              TGAGATTTTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGATGACAGGAAAAGT
Seq_2 180     TGAGATTTTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGATGACAGGAAAAGT      239
              E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V

Seq_1 240     K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K      299
              CAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAAA
Seq_2 240     CAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAAA      299
              K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K

Seq_1 300     S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K      359
              ATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGAA
Seq_2 300     ATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGAA      359
              S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K

Seq_1 360     G V T S T R V Y E R A *      396
              AGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA
Seq_2 360     AGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA      396
              G V T S T R V Y E R A *

```

**Abbildung 6 Alignment von humanem FABP4 (Seq\_1) mit Mutante FABP4<sup>R31E/K32E/V33E</sup> (Seq\_2).** Die Annotation erfolgte mit der Software SerialCloner 2.6. Die veränderten Aminosäuren sind rot markiert. Ähnlichkeit: 393/396 (99,24 %)

```

Seq_1 1      C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M
            TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACTTTGATGATTATATG 60
Seq_2 1      TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACTTTGATGATTATATG 60
            C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M

Seq_1 61      K E V G V G F A T R K V A C V A K P N M
            AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCT--GGCATGGCCAAACCTAACA 118
Seq_2 61      AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTAAGGA--GGCCAAACCTAACA 118
            K E V G V G F A T R K V A X E A K P N M

Seq_1 119     I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T
            TGATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATA 178
Seq_2 119     TGATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATA 178
            I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T

Seq_1 179     E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V
            CTGAGATTTCCCTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGATGACAGGAAAG 238
Seq_2 179     CTGAGATTTCCCTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGATGACAGGAAAG 238
            E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V

Seq_1 239     K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K
            TCAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCTCGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAA 298
Seq_2 239     TCAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCTCGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAA 298
            K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K

Seq_1 299     S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K
            AATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGA 358
Seq_2 299     AATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGA 358
            S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K

Seq_1 359     G V T S T R V Y E R A *
            AAGGCGTCACCTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA 396
Seq_2 359     AAGGCGTCACCTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA 396
            G V T S T R V Y E R A *

```

**Abbildung 7 Alignment von humanem FABP4 (Seq\_1) mit Mutante FABP4<sup>G35K/M36E</sup> (Seq\_2).** Die Annotation erfolgte mit der Software SerialCloner 2.6. Die veränderten Aminosäuren sind rot markiert. Ähnlichkeit: 393/396 (99,24 %).

```

Seq_1 1      C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M
            TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTGATGATTATATG 60
            |||
Seq_2 1      TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTGATGATTATATG 60
            C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M

Seq_1 61      K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M
            AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACATG 120
            |||#####
Seq_2 61      AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACC#####GCCAAACCTAACATG 102
            K E V G V G F A T A K P N M

Seq_1 121     I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T
            ATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATACT 180
            |||
Seq_2 103     ATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATACT 162
            I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T

Seq_1 181     E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V
            GAGATTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGATGACAGGAAAGTC 240
            |||
Seq_2 163     GAGATTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGATGACAGGAAAGTC 222
            E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V

Seq_1 241     K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K
            AAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGTGTCTCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAAAA 300
            |||
Seq_2 223     AAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGTGTCTCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAAAA 282
            K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K

Seq_1 301     S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K
            TCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGAAA 360
            |||
Seq_2 283     TCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGAAA 342
            S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K

Seq_1 361     G V T S T R V Y E R A *
            GCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA 396
            |||
Seq_2 343     GCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA 378
            G V T S T R V Y E R A *

```

**Abbildung 8 Alignment von humanem FABP4 (Seq\_1) mit Mutante FABP4<sup>Deletion(31-36)</sup> (Seq\_2).** Die Annotation erfolgte mit der Software SerialCloner 2.6. Die veränderten Aminosäuren sind rot markiert. Ähnlichkeit: 378/396 (95,45 %).

```

Seq_1 1      C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M      60
              TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTTGATGATTATATG
Seq_2 1      TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTTGATGATTATATG      60
              C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M

Seq_1 61      K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M      120
              AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACATG
Seq_2 61      AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACATG      120
              K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M

Seq_1 121     I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T      180
              ATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATACT
Seq_2 121     ATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATACT      180
              I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T

Seq_1 181     E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V      239
              GAGATTTCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGAT-GACAGGAAAAGT
Seq_2 181     GAGATTTCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGGCGGA-AGGAAAAGT      239
              E I S F I L G Q E F D E V T A E G R K V

Seq_1 240     K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K      299
              CAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAAA
Seq_2 240     CAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAAA      299
              K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K

Seq_1 300     S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K      359
              ATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGAA
Seq_2 300     ATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGAA      359
              S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K

Seq_1 360     G V T S T R V Y E R A *      396
              AGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA
Seq_2 360     AGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA      396
              G V T S T R V Y E R A *

```

**Abbildung 9 Alignment von humanem FABP4 (Seq\_1) mit Mutante FABP4<sup>D77G/D78G</sup> (Seq\_2).** Die Annotation erfolgte mit der Software SerialCloner 2.6. Die veränderten Aminosäuren sind rot markiert. Ähnlichkeit: 393/396 (99,24 %).

```

Seq_1 1      C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M      60
              TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACTTTGATGATTATATG
Seq_2 1      TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACTTTGATGATTATATG      60
              C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M

Seq_1 61      K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M      120
              AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACATG
Seq_2 61      AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACATG      120
              K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M

Seq_1 121     I I S V N G D V I T I K S E S T E K N T      179
              ATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAATCTGAAAGTACC-TTTAAAAATAC
Seq_2 121     ATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAATCTGAAAGTACCAG-TGAAAAATAC      179
              I I S V N G D V I T I K S E S T S E N T

Seq_1 180     E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V      238
              TGAGATTTTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGAT-GACAGGAAAG
Seq_2 180     TGAGATTTTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGGCGGA-AGGAAAG      238
              E I S F I L G Q E F D E V T A E E R K V

Seq_1 239     K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K      298
              TCAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCTGTGACATGTGCAGAAATGGGATGGAA
Seq_2 239     TCAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCTGTGACATGTGCAGAAATGGGATGGAA      298
              K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K

Seq_1 299     S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K      358
              AATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGA
Seq_2 299     AATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGA      358
              S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K

Seq_1 359     G V T S T R V Y E R A *      396
              AAGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA
Seq_2 359     AAGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA      396
              G V T S T R V Y E R A *

```

**Abbildung 10 Alignment von humanem FABP4 (Seq\_1) mit Mutante FABP4<sup>F58S/K59E/D77G/D78G</sup> (Seq\_2).** Die Annotation erfolgte mit der Software SerialCloner 2.6. Die veränderten Aminosäuren sind rot markiert. Ähnlichkeit: 390/396 (98,48 %).

```

Seq_1 1      C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M      60
              TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTTGATGATTATATG
Seq_2 1      TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTTGATGATTATATG      60
              C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M

Seq_1 61      K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M      119
              AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACC-AGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACAT
Seq_2 61      AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAGA-GGCTGGCATGGCCAAACCTAACAT      119
              K E V G V G F A T E E E A G M A K P N M

Seq_1 120     I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T      179
              GATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATAC
Seq_2 120     GATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTAAAAATAC      179
              I I S V N G D V I T I K S E S T F K N T

Seq_1 180     E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K V      238
              TGAGATTTTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGAT-GACAGGAAAG
Seq_2 180     TGAGATTTTCCTTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGGCGGA-AGGAAAG      238
              E I S F I L G Q E F D E V T A E E R K V

Seq_1 239     K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K      298
              TCAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGTGTCTCGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAA
Seq_2 239     TCAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGTGTCTCGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGAA      298
              K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G K

Seq_1 299     S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K      358
              AATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGA
Seq_2 299     AATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATGA      358
              S T T I K R K R E D D K L V V E C V M K

Seq_1 359     G V T S T R V Y E R A *      396
              AAGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA
Seq_2 359     AAGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA      396
              G V T S T R V Y E R A *

```

**Abbildung 11 Alignment von humanem FABP4 (Seq\_1) mit Mutante FABP4<sup>R31E/K32E/V33E/D77G/D78G</sup> (Seq\_2).** Die Annotation erfolgte mit der Software SerialCloner 2.6. Die veränderten Aminosäuren sind rot markiert. Ähnlichkeit: 390/396 (98,48 %).

```

Seq_1 1      C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M
            TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTTGATGATTATATG 60
            |||
Seq_2 1      TGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAAAACCTTTGATGATTATATG 60
            C D A F V G T W K L V S S E N F D D Y M

Seq_1 61      K E V G V G F A T R K V A G M A K P N M
            AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACC-AGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAACAT 119
            |||#####|
Seq_2 61      AAAGAAGTAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAGA-GGCTGGCATGGCCAAACCTAACAT 119
            K E V G V G F A T R E R A G M A K P N M

Seq_1 120     I I S V N G D V I T I K S E S T R K N T
            GATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACC-TTTAAAATA 178
            |||#####|
Seq_2 120     GATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCAG-TGAAAATA 178
            I I S V N G D V I T I K S E S T S E N T

Seq_1 179     E I S F I L G Q E F D E V T A D D R K
            CTGAGATTTCCCTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGAT-GACAGGAAA 237
            |||#####|
Seq_2 179     CTGAGATTTCCCTCATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGGCGGA-AGGAAA 237
            E I S F I L G Q E F D E V T A S C R K

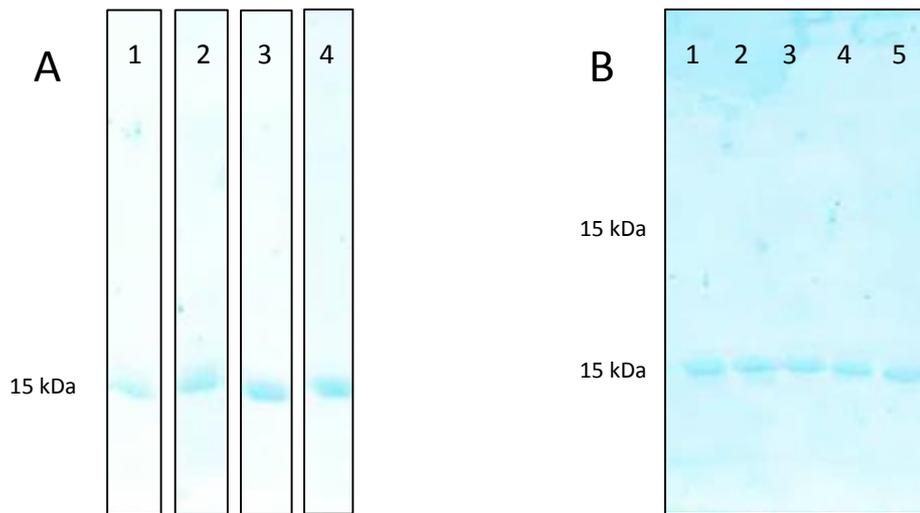
Seq_1 238     V K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G
            GTCAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGA 297
            |||
Seq_2 238     GTCAAGAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGGA 297
            V K S T I T L D G G V L V H V Q K W D G

Seq_1 298     K S T T I K R K R E D D K L V V E C V M
            AAATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATG 357
            |||
Seq_2 298     AAATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGAATGCGTCATG 357
            K S T T I K R K R E D D K L V V E C V M

Seq_1 358     K G V T S T R V Y E R A *
            AAAGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA 396
            |||
Seq_2 358     AAAGGCGTCACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA 396
            K G V T S T R V Y E R A *

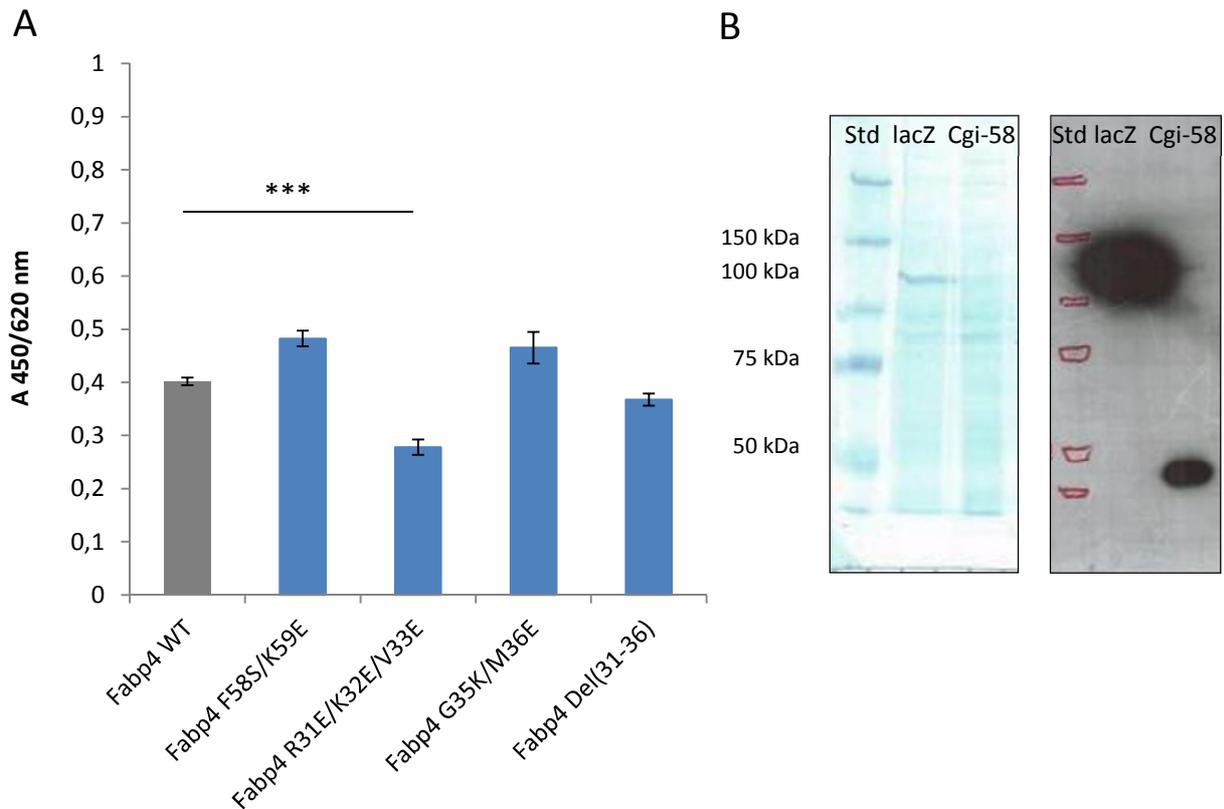
```

**Abbildung 12 Alignment von humanem FABP4 (Seq\_1) mit Mutante FABP4<sup>R31E/K32E/V33E/F58S/K59E/D77G/D78G (Seq\_2)</sup>.** Die Annotation erfolgte mit der Software SerialCloner 2.6. Die veränderten Aminosäuren sind rot markiert. Ähnlichkeit: 387/396 (97,73 %).



**Abbildung 13 SDS-PAGE Analyse von durch Affinitätschromatografie gereinigte Fabp4 Proteinvarianten.** Die Plasmide mit den unterschiedlichen FABP4 Mutanten wurden in *E. coli* NEB5 $\alpha$  transformiert und die Expression mit Anhydrotetracyclin induziert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen geerntet und aufgeschossen. Die Reinigung der Fabp4 Varianten erfolgte über Affinitätschromatografie mit Strep-Tactin superflow high capacity resins. Zur Überprüfung der Reinheit wurden 20  $\mu$ l der Eluate auf ein 12,5 % Polyacrylamid Gel aufgetragen, mit 35 mA entwickelt und anschließend Coomassie-Blau gefärbt. Auftragung: **A)** 1 Fabp4<sup>F58S/K59E</sup>, 2 Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E</sup>, 3 Fabp4<sup>G35K/M36E</sup>, 4 Fabp4<sup>Del(31-36)</sup> **B)** 1 WT Fabp4, 2 Fabp4<sup>D77G/D78G</sup>, 3 Fabp4<sup>F58S/K59S/D77G/D78G</sup>, 4 Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E/D77G/D78G</sup> und 5 Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E/F58S/K59E/D77G/D78G</sup>

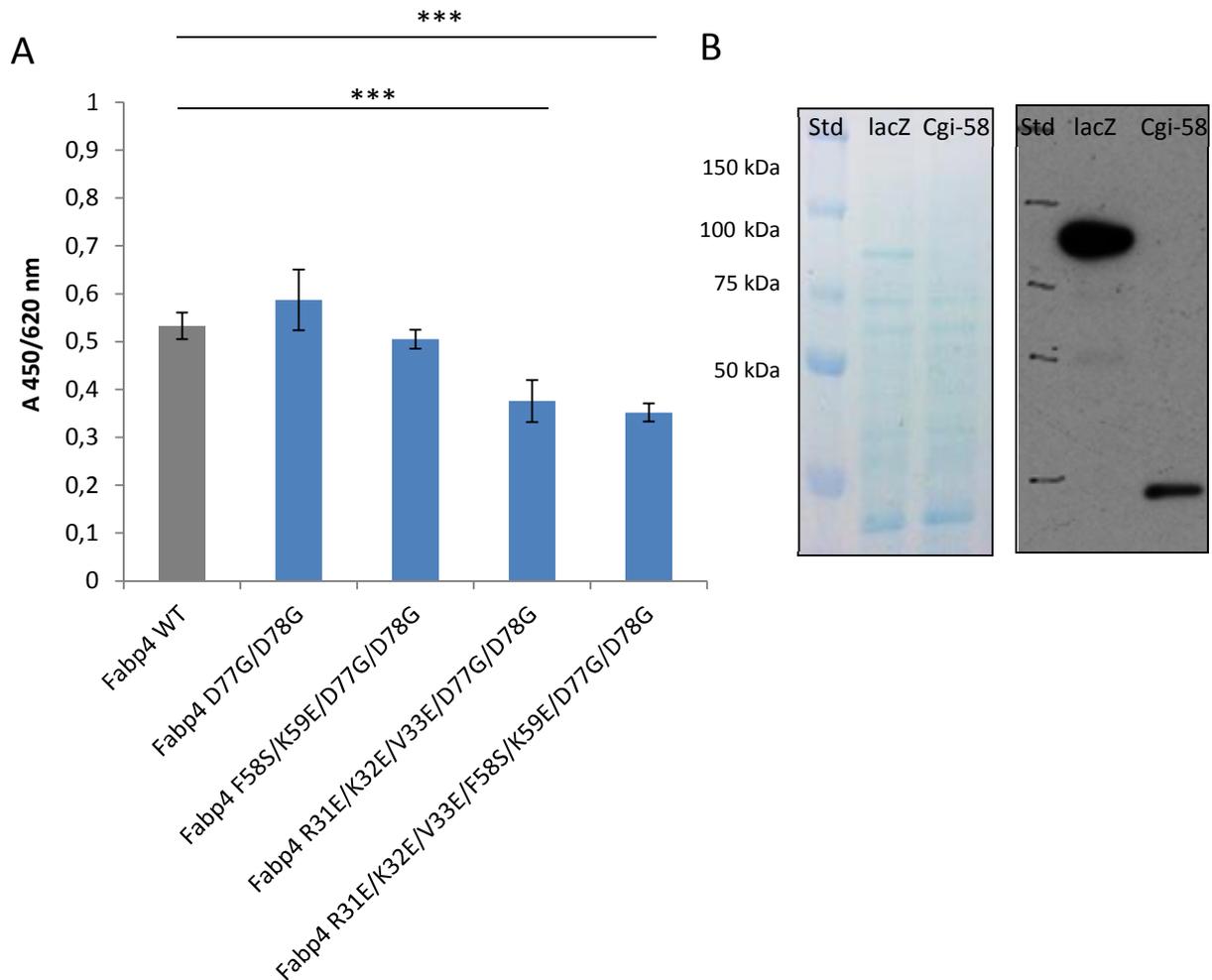
Wie in den Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt, zeigten sich trotz mehrfacher Aminosäureaustausche in den oberflächlichen Proteindomänen von Fabp4 nur geringe bis maximal 30% Reduktion der Bindung zu Cgi-58. Die Absolutwerte der Bindung von WT Fabp4 waren im Vergleich zu den von Hofer *et al.* gemessenen Werte relativ gering und lagen nicht um ein Vielfaches höher als die Absorptionswerte der Negativkontrolle LacZ. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, zeigte nur die Fabp4 Proteinvariante mit einem Austausch von drei Aminosäuren in der oberflächennahen  $\alpha$ 2-Helix Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E</sup> herabgesetzte Bindung von Fabp4 an Cgi-58. Die Aminosäuren Gly-35 und Meth-36, ebenfalls in der  $\alpha$ 2-Helix lokalisiert, schienen in diesem SPA keine Rolle in der Fabp4/Cgi-58 Interaktion zu spielen. Paradoxe Weise schien auch die völlige Deletion aller Bindungs-relevanten Aminosäuren in der  $\alpha$ 2-Helix keine Auswirkung auf die Protein-Protein Interaktion von Cgi-58 und Fabp4 zu haben. Die Proteinvariante Fabp4<sup>F58S/K59S</sup> zeigte in diesem „assay“ keine Veränderung in ihrem Bindungsverhalten zu Cgi-58, obwohl Fabp4, mit jeweils nur einer dieser Aminosäuren ausgetauscht, eine Reduktion in ihrer Bindung zu Cgi-58 zeigten [33].



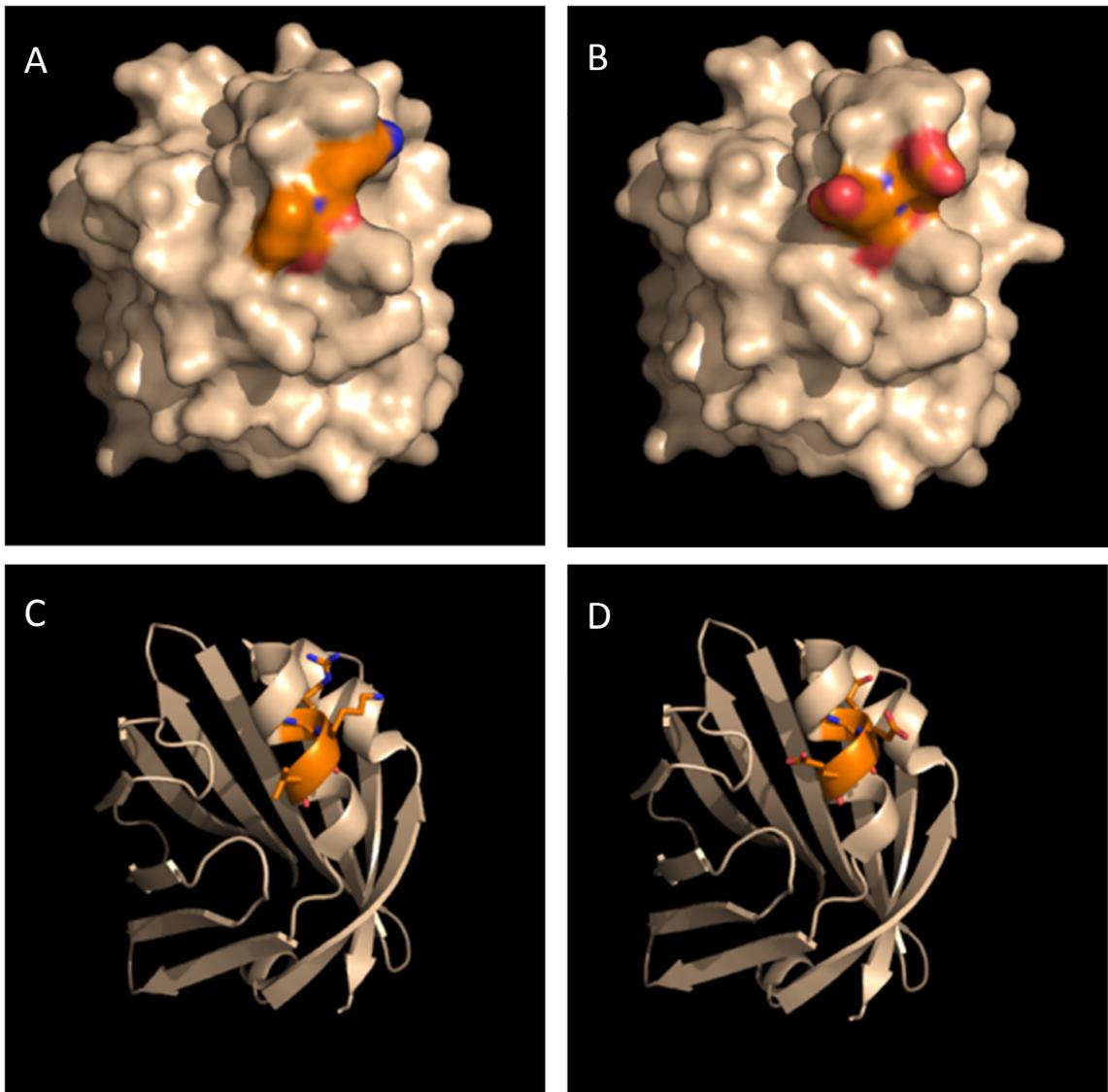
**Abbildung 14: Bindung von unterschiedlichen Fabp4 Proteinvarianten mit Cgi-58. A)** In SPAs wurden Polystyrenplatten mit 3  $\mu$ g gereinigtem WT Fabp4 bzw. mit den jeweils unterschiedlichen Fabp4-Proteinvarianten beschichtet und mit 50  $\mu$ g COS-7 Gesamtzelllysaten, welches rekombinantes murines His-Cgi-58 oder His-lacZ (Negativkontrolle) enthielten, inkubiert. Die Fabp4/His-Cgi-58 Bindungskomplexe wurden gewaschen und mit Hilfe von Anti-His primären Antikörper und Hrp-konjugierten sekundären Antikörper markiert. In einer nachfolgenden Farbreaktion mit Tetramethyl-Benzidine als Substrat wurde die Bindung von Cgi-58 mit Fabp4 durch Absorptionsmessung bei 450/620nm quantifiziert. Aufgetragen sind die auf LacZ normierten Absorptionswerte. Die Daten sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=4) angegeben und repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . **B)** Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel mit korrespondierenden Western Blot. COS-7 Zellen wurden transient mit pHisMaxC\_CGI-58 und pHisMaxC\_LacZ transfektiert und nach 48 Stunden ein Gesamtzelllysat in 1xTBS, 0,05 % NP-40, 1x Pi hergestellt. Rekombinantes His-LacZ sowie His-Cgi-58 wurden mittels primären Anti-His-Antikörper und Hrp-gekoppelten sekundären Antikörper mit nachfolgender ECL Chemilumineszenz-Dektection nachgewiesen.

Dasselbe galt für die Proteinvarianten Fabp4<sup>D77G/D78G</sup> und Fabp4<sup>F58S/K59S/D77G/D78G</sup>, die in diesem SPA unverändertes Bindungsverhalten gegenüber Cgi-58 zeigten (Abbildung 14/Abbildung 15), während Fabp4 Proteinvarianten mit jeweils nur einer dieser Aminosäuren ausgetauscht stark reduzierte Bindung zeigten [33]. Lediglich Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E/D77G/D78G</sup> und Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E/F58S/K59E/D77G/D78G</sup> mit multiplen Austausch von Bindungs-relevanten Aminosäuren sowohl in der  $\alpha$ 2-Helix als auch in den angrenzenden „loops“ zeigten um ca. 30% erniedrigte Bindung zu Cgi-58. Damit konnte hier mit Hilfe des SPAs nicht festgestellt werden, welche Aminosäureseitenketten für die Protein-Protein Interaktion von Cgi-58 und Fabp4 essentiell sind. Es gelang damit auch nicht jene Fabp4 Proteinvariante zu isolieren, die nicht mehr an Cgi-58 bindet.

Es konnte aber bestätigt werden, dass die Aminosäuren Arg-31, Lys-32 und Val-33 wichtig für die Interaktion sind. Abbildung 16 zeigt das WT Fabp4 Strukturmodell im Vergleich zu Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E</sup>. Die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin und das hydrophobe Valin wurden durch sehr hydrophile und saure Glutaminsäuren ersetzt und verursachten lokale Änderungen der Polarität des Proteins. Dies führt zu einer Änderung der Oberflächenstruktur und dadurch zu einer Störung der Fabp4/Cgi-58 Interaktion.



**Abbildung 15: Bindung von unterschiedlichen Fabp4 Proteinvarianten mit Cgi-58. A)** In SPAs wurden Polystyrenplatten mit 3  $\mu$ g gereinigtem WT Fabp4 bzw. mit den jeweils unterschiedlichen Fabp4-Proteinvarianten beschichtet und mit 80  $\mu$ g COS-7 Gesamtzelllysaten, welches rekombinantes murines His-Cgi-58 oder His- $\beta$ -Galaktosidase (Negativkontrolle) enthielten, inkubiert. Die Fabp4/His-Cgi-58 Bindungskomplexe wurden gewaschen und mit Hilfe von Anti-His primären Antikörper und Hrp-konjugierten sekundären Antikörper markiert. In einer nachfolgenden Farbreaktion mit Tetramethyl-Benzidine als Substrat wurde die Bindung von Cgi-58 mit Fabp4 durch Absorptionsmessung bei 450/620nm quantifiziert. Aufgetragen sind die zu LacZ normierten Absorptionswerte. Die Daten sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=4) angegeben und repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\* p  $\leq$  0,001. **B)** Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel mit korrespondierenden Western Blot. COS-7 Zellen wurden transient mit pHisMaxC\_CGI-58 und pHisMaxC\_LacZ transfektiert und nach 48 Stunden ein Gesamtzelllysate in 1xTBS, 0,05 % NP-40, 1x Pi hergestellt. Rekombinantes His-LacZ sowie His-Cgi-58 wurden mittels primären Anti-His-Antikörper und Hrp-gekoppelten sekundären Antikörper mit nachfolgender ECL Chemiluminiszenz-Detektion nachgewiesen.



**Abbildung 16: Strukturmodelle des WT Fabp4 (A, C) und der Proteinvariante Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E</sup> (B, D)**

Die Strukturmodelle wurden mit MacPyMOL 1.3 erstellt. Dafür wurden die Daten der Kristallstrukturanalyse (code: 3Q6L) in PyMOL importiert und die Aminosäuren Arg-31, Lys-32, Val-33 der  $\alpha$ 2-Helix farblich hervorgehoben und bei der Fabp4 Variante gegen Glu-31, Glu-32, Glu-33 ersetzt. oben: Oberflächenstrukturmodelle von WT Fabp4 (A) und Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E</sup> (B) welches 30% Bindungsreduktion zu Cgi-58 zeigt. Unten: Sekundärstrukturen von WT Fabp4 (C) und Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E</sup> (D), Farbcode: Kohlenstoff: orange, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau, Wasserstoffe sind nicht angezeigt.

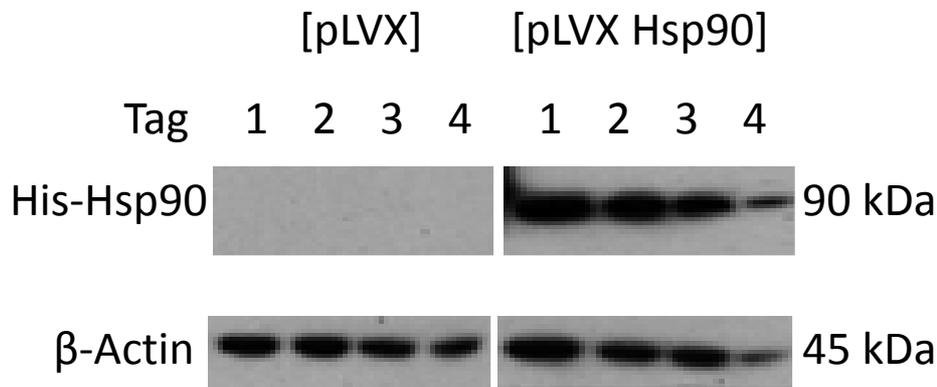
## **4.2 Einfluss von Hsp90, überexprimiert in OP9-K Adipozyten, auf die Differenzierung dieser Zellen bzw. auf ihren Triglyzeridmetabolismus**

Hsp90 ist ein ATP-abhängiges Chaperon, welches in der Zelle in großen Mengen vorkommt. Es katalysiert nicht nur die Reifung von Proteinen, sondern beeinflusst durch die Vielzahl von intrazellulären Bindungspartnern physiologische Prozesse, wie Signaltransduktion, intrazellulären Transport und Proteinabbau. Mit Hilfe von IP konnte gezeigt werden, dass Hsp90 an Atgl bindet und damit Teil des Lipolysoms ist.

### **4.2.1 Einfluss von Hsp90 Überexpression auf den Abbau von TG zu freien FS und Glycerol**

Um die Frage zu beantworten, welchen Einfluss Hsp90 auf den intrazellulären Abbau von TG in Adipozyten hat, wurden OP9-K Präadipozyten mit HSP90 kodierenden Lentiviren bzw. nicht rekombinanten Lentiviren (Kontrollzellen) infiziert und jene Zellen mit erfolgreicher Integration der viralen DNA ins Genom selektiert. Diese wurden schließlich durch Supplementierung des Mediums mit Insulin und komplexierter Ölsäure 4 Tage lang zu reifen Adipozyten differenziert, und nach einer 24 stündigen „insulin starving“ Phase die lipolytische Kapazität der Zellen durch die Quantifizierung der sezernierten FS und Glycerol im Medium bestimmt. Mit Hilfe von Western Blot Analyse wurde die stabile Expression von Hsp90 während der Differenzierung und schließlich in den reifen Adipozyten überprüft. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wird das rekombinante Hsp90 in konstanten Mengen exprimiert. Die scheinbar geringere Menge an Hsp90 in den reifen Adipozyten (Tag 4) ist, wie Ladekontrolle zeigt, auf eine geringere Menge an Gesamtprotein auf der Membran zurückzuführen. Die Negativkontrolle, OP9-K Zellen mit leerem lentiviralem Plasmid, zeigte keine Hsp90 Überexpression. Die lipolytische Kapazität der reifen Adipozyten wurde unter basalen Bedingungen und unter Lipolyse stimulierten Bedingungen, d.h. in Gegenwart von Forskolin bestimmt. TG werden gespalten und die freien FS entweder ins Medium sezerniert oder mittels FA-CoA-Synthetase wieder der TG-Synthese zugeführt. Um die Menge der FS, die durch Atgl-vermittelte TG-Hydrolyse frei und sezerniert werden, getrennt von der Menge an FS, die durch Hsl vermittelte Lipolyse frei und sezerniert werden, zu bestimmen, wurden

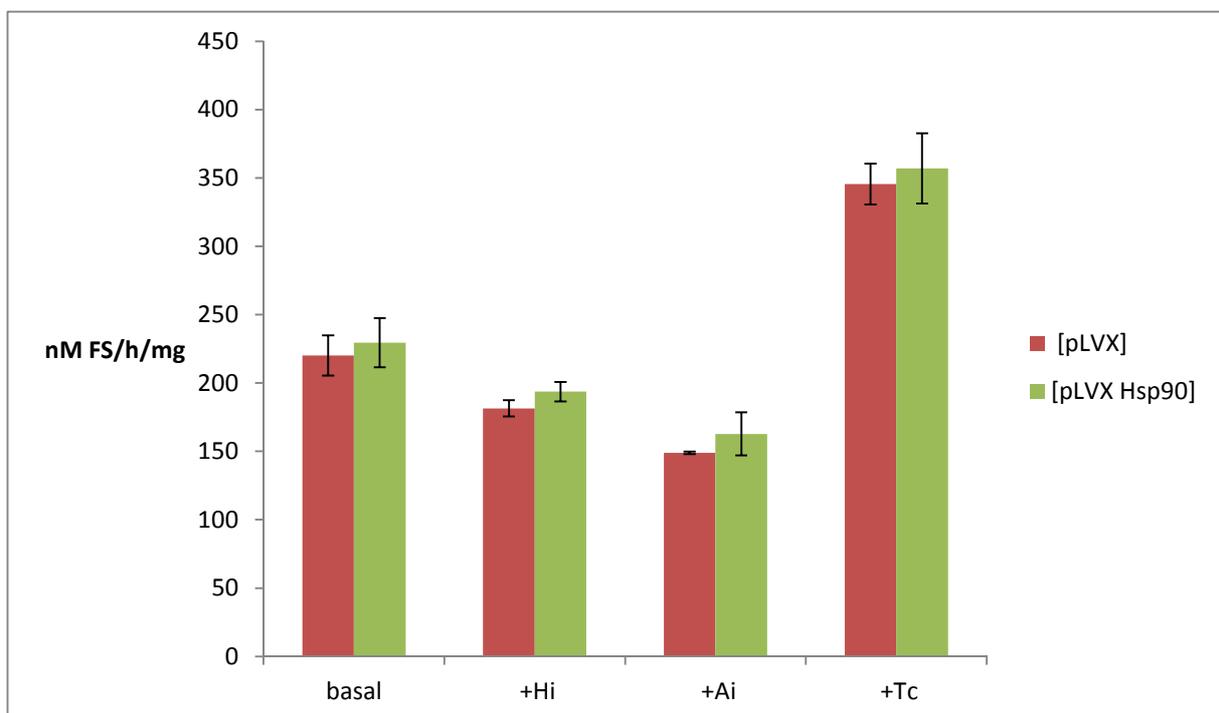
die OP9-K Zellen jeweils mit dem Hsl Inhibitor Hi 76-0079 oder dem Atgl Inhibitor Atlistatin inkubiert und die FS bzw. Glycerol im Medium quantifiziert. Zusätzlich wurden die reifen Adipozyten mit Triacsin C inkubiert, um den intrazellulären Rücklauf der FS über die *de novo* Synthese von TG aus den frei werdenden FS zu blockieren.



**Abbildung 17: His-Hsp90 Protein-Levels in OP9-K Zellen im Verlauf der Differenzierung.**

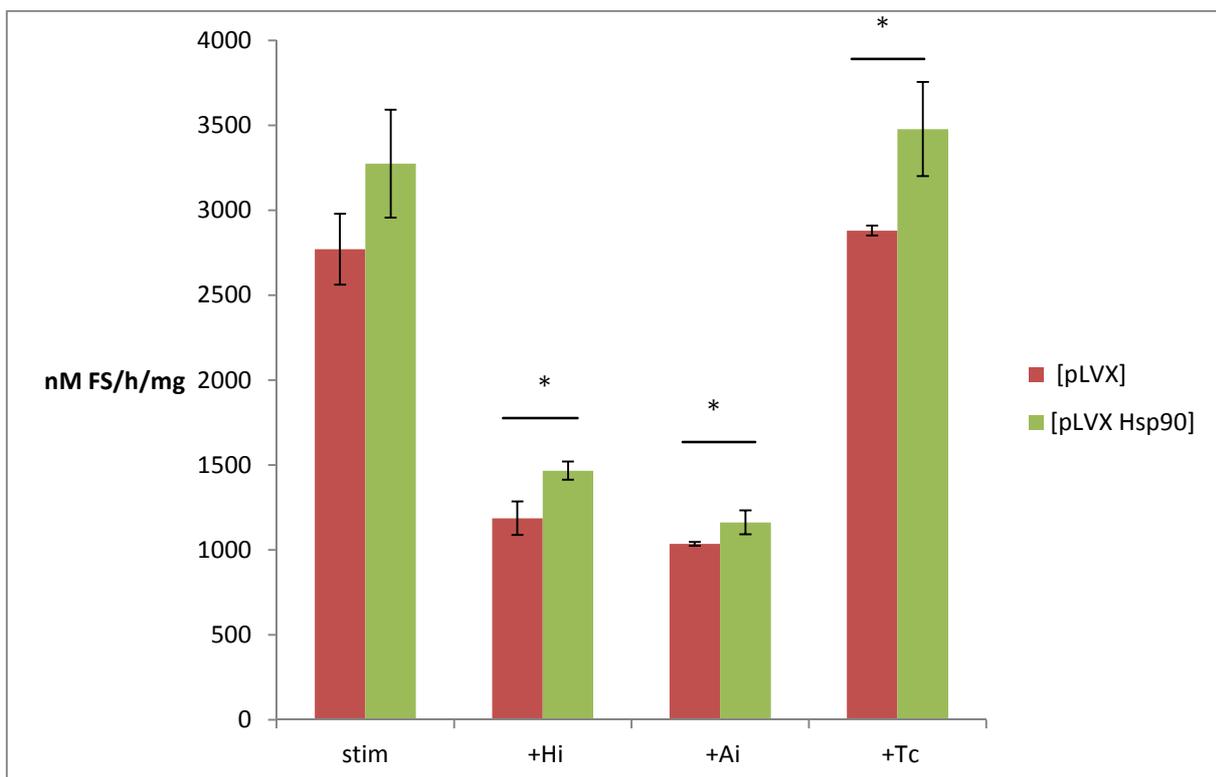
50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro well auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1  $\mu$ g/ml Insulin und 900  $\mu$ M Ölsäure beladenem BSA gestartet. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 (Tag 4) Stunden nach Differenzierungsstart wurden Zellen geerntet, pelletiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für Western Blot Analysen wurden die Pellets resuspendiert und die Zellen lysiert. 10  $\mu$ g Gesamtprotein auf ein 10% Polyacrylamid Gel aufgetragen und mit 40 mA entwickelt. Die Inkubation mit der primären Antikörperlösung (C-terminaler His Antikörper bzw.  $\beta$ -Aktin Antikörper) erfolgte über Nacht, die mit der sekundären Antikörperlösung (Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus) 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Visualisierung der Signale erfolgte über ECL-Chemilumineszenz-Detektion. Die Differenzierung dauerte von Tag 0 – 3. Ab Tag 4 lagen differenzierte bzw. reife Adipozyten vor.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, sezernieren reife Adipozyten mit überexprimierten rekombinanten Hsp90 unter basalen Bedingungen, d.h. nicht Lipolyse stimulierten Bedingungen die gleiche Menge an freien FS wie die Kontrollzellen. In Gegenwart von Triacsin C steigt die Fettsäure-Freisetzung erwartungsgemäß um rund 60%, es zeigt sich jedoch kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und Hsp90 überexprimierenden Zellen. Nach Zugabe des Hsl-Inhibitors verminderte sich die Freisetzung von FS nur um 10%, bei der Zugabe von Atglistatin nur um 30% und es zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und Zellen mit rekombinatem Hsp90.



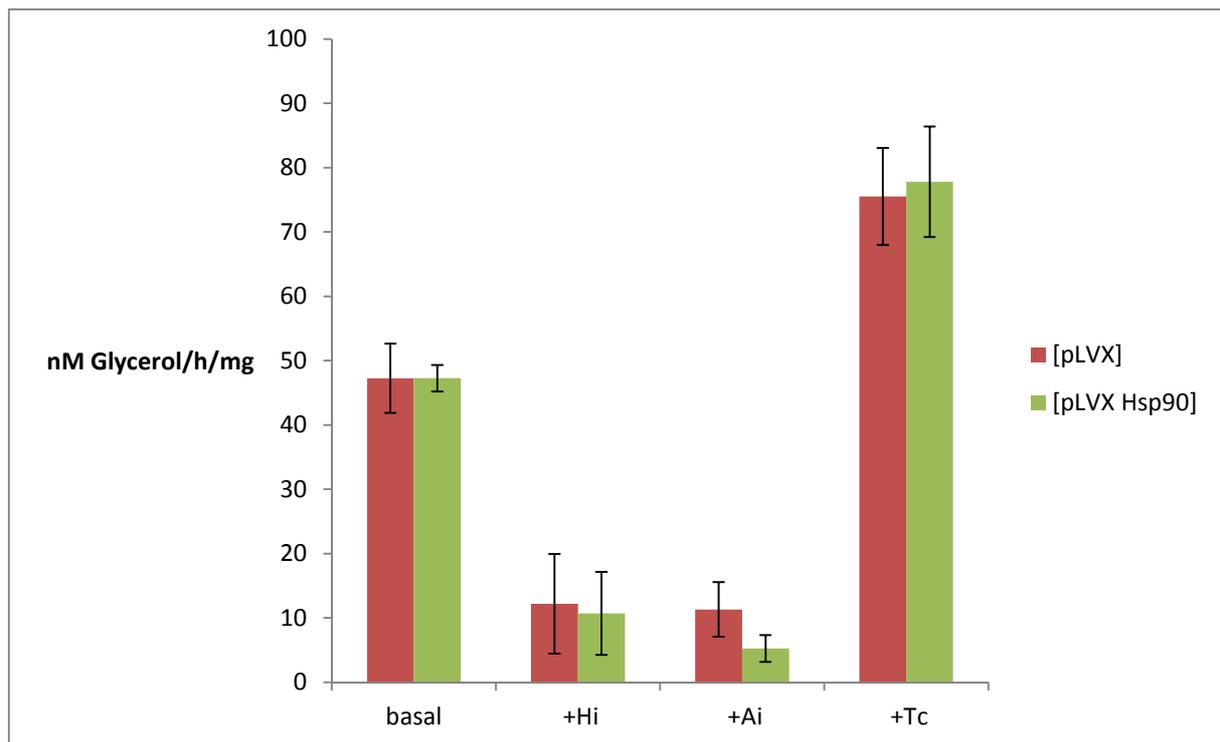
**Abbildung 18: Freisetzung von freien FS aus reifen Adipozyten unter nicht Lipolyse-stimulierten (basalen) Bedingungen.** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM komplexierter Ölsäure gestartet. Am Tag 5 wurden die reifen Adipozyten 24 Stunden lang mit nur MEM alpha (+/+) inkubiert („insulin starving“). Am Tag 6 fand die Messung in MEM Alpha (-/-) mit 2% FS-freiem BSA in Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle), 40 µM Atglistatin (Ai), 25 µM Hsl-Inhibitor (Hi) und 5 µM Triacsin C (Tc). Die Bestimmung erfolgte mittels NEFA Kit ACS-ACOD (Wako Diagnostics) (3fach Bestimmung)

Unter Forskolin stimulierten Bedingungen konnte, wie erwartet eine allgemeine Steigerung der Lipolyse um den Faktor 10 beobachtet werden (Abbildung 19). Unter Zugabe des Hsl Inhibitors sank die Menge an freigesetzten FS um 55 %, unter Zugabe des Atgl Inhibitors Atglistatin um 50 %. Die Hemmung der *de novo* TG-Synthese brachte keine weitere Steigerung an freien FS im Medium im Vergleich zur ungehemmten Wiederveresterung. Wenn in den reifen Adipozyten zusätzlich rekombinantes Hsp90 exprimiert wurde, steigerte sich die Menge an sezernierten FS in Gegenwart von Atglistatin, Hsl-Inhibitor und Triascin C signifikant, aber in geringem Ausmaß.



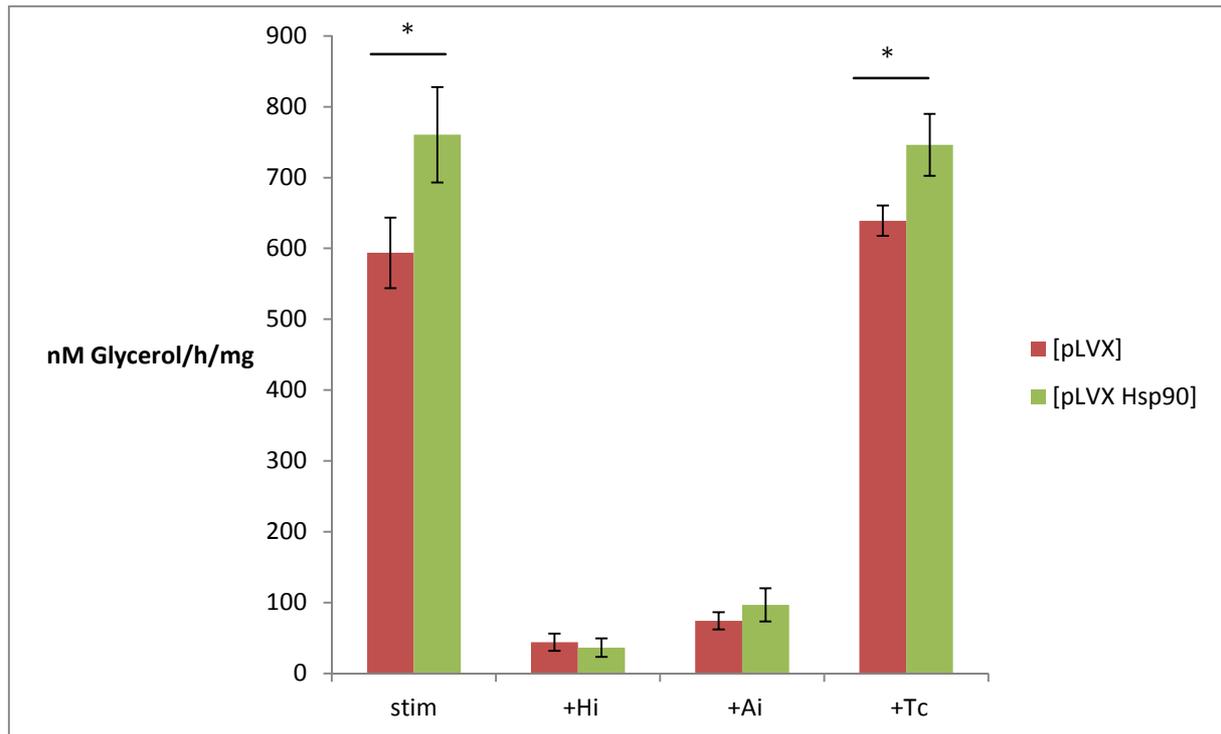
**Abbildung 19: Forskolin stimulierte Freisetzung von freien FS aus reifen Adipozyten unter Lipolyse-stimulierten Bedingungen.** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM komplexierter Ölsäure gestartet. Am Tag 5 wurden die reifen Adipozyten 24 Stunden lang mit nur MEM Alpha (+/+) inkubiert („insulin starving“). Am Tag 6 fand die Messung in MEM Alpha (-/-) mit 2% FS-freiem BSA in Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle), 40 µM Atglistatin (Ai), 25 µM Hsl-Inhibitor (Hi) und 5 µM Triascin C (Tc). Die Bestimmung erfolgte mittels NEFA Kit ACS-ACOD (Wako Diagnostics) (3fach Bestimmung)  
\* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001;

Parallel zur Bestimmung der sezernierten FS im Medium wurde Glycerol, das zweite Abbauprodukt der TG-Hydrolyse quantifiziert. Wie in Abbildung 20 dargestellt, sinkt wie erwartet die Menge an Glycerol im Medium in Gegenwart von Hsl- Inhibitor und Atglistatin auf ca. 40% der Menge von ungehemmten Zellen. Sie erhöht sich um den Faktor 1,6 wenn die Zellen mit Triacsin C behandelt wurden. Jedoch konnte kein signifikanter Effekt von Hsp90 auf die Freisetzung von Glycerol detektiert werden.



**Abbildung 20: Freisetzung von Glycerol aus reifen Adipozyten unter nicht Lipolyse-stimulierten (basalen) Bedingungen.** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM komplexierter Ölsäure gestartet. Am Tag 5 wurden die reifen Adipozyten 24 Stunden lang mit nur MEM alpha (+/+) inkubiert („insulin starving“). Am Tag 6 fand die Messung in MEM Alpha (-/-) mit 2% FS-freiem BSA in Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle), 40 µM Atglistatin (Ai), 25 µM Hsl-Inhibitor (Hi) und 5 µM Triacsin C (Tc). Die Bestimmung erfolgte mittels Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich) (3fach Bestimmung)

Unter Lipolyse stimulierten Bedingungen konnte eine allgemeine Steigerung der Lipolyse um den Faktor 10 beobachtet werden (Abbildung 21). Unter Zugabe des Hsl Inhibitors sank die Menge an freigesetztem Glycerol um 90 %, und unter Zugabe von Atglistatin um 85 %. Die Hemmung der *de novo* TG-Biosynthese brachte keine weitere Steigerung an sezerniertem Glycerol im Vergleich zu Triacsin C unbehandelten Zellen. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied in der Glycerol Freisetzung, wenn Zellen rekombinantes Hsp90 exprimierten. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass durch stimulierte Lipolyse in OP9-K Zellen Glycerol und FS im korrekten Verhältnis (Glycerol:FS=1:3) sezerniert werden. Sowohl der Hsl-Inhibitor als auch Atglistatin blockierten den Abbau der TG im erwarteten Ausmaß und auch die Inhibierung der *de-novo* TG-Biosynthese durch Triacsin C zeigte die erwartete Steigerung in der Freisetzung von FS. Die Überexpression von Hsp90 in OP9-K Zellen zeigte unter basalen Bedingungen keine signifikante Veränderung der Menge an freigesetzten FS oder Glycerol. Nur unter Lipolyse stimulierten Bedingungen konnte eine geringe aber signifikante gesteigerte Freisetzung von FS beobachtet werden, die in Gegenwart von Hsl-Inhibitor und Triascin C deutlicher sichtbar wurde, was auf eine spezifische Wirkung von Hsp90 auf Atgl vermittelte TG-Hydrolyse hinweisen könnte.

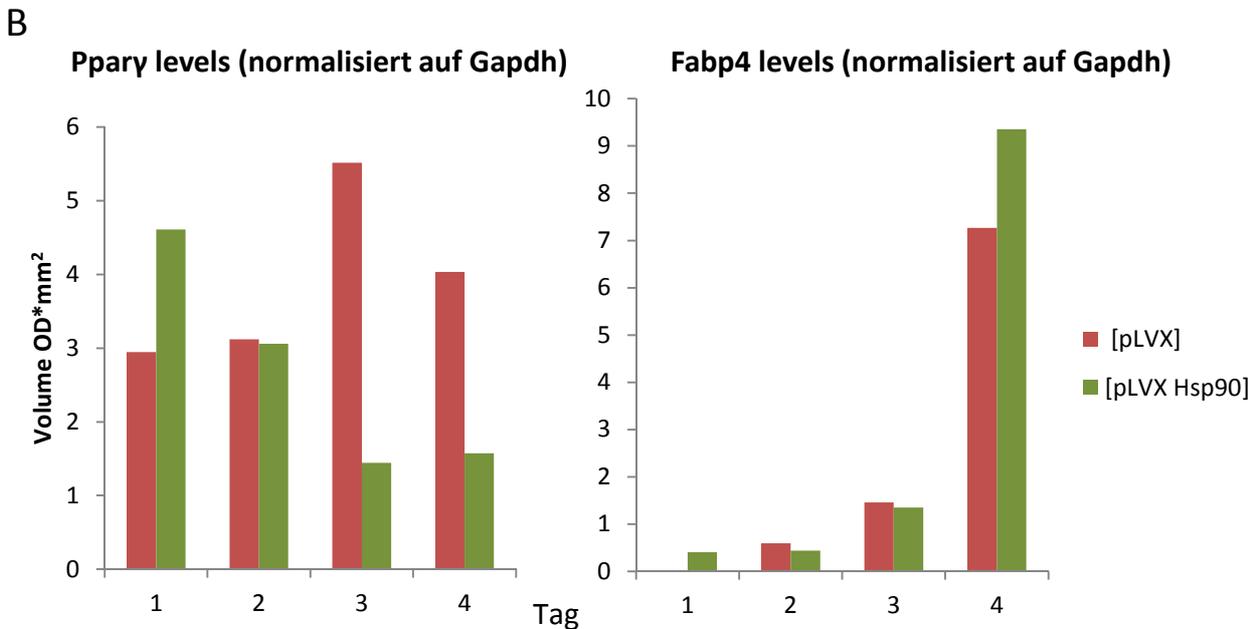
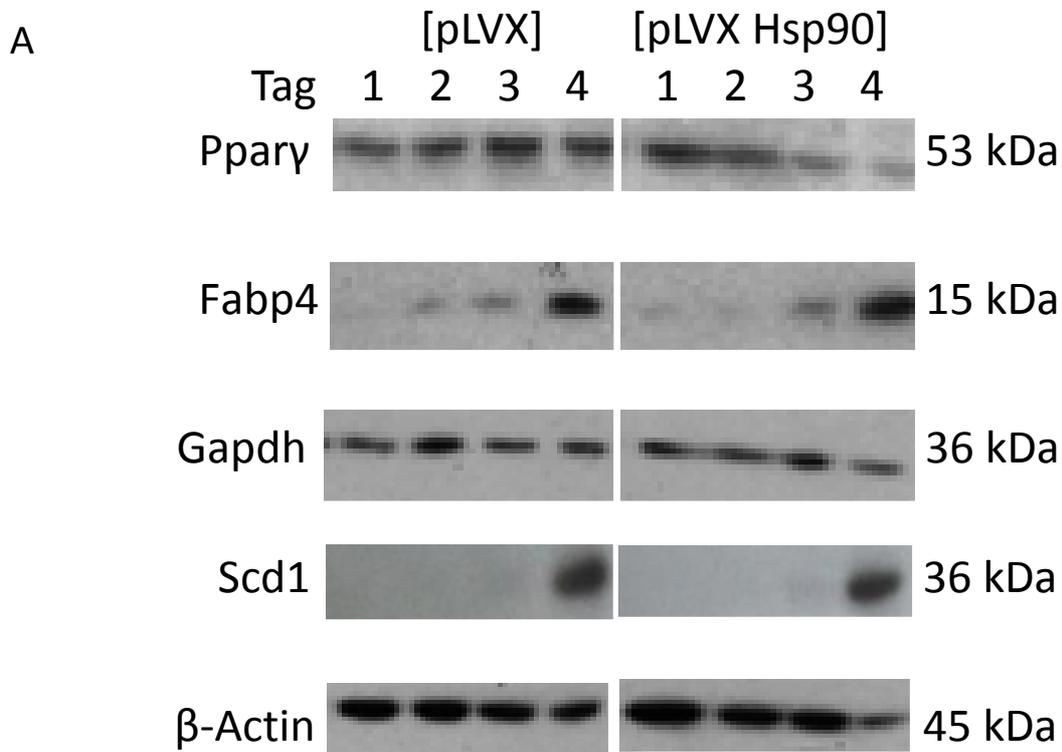


**Abbildung 21: Forskolin stimulierte Freisetzung von Glycerol aus reifen Adipozyten unter Lipolyse-stimulierten Bedingungen.** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM komplexierter Ölsäure gestartet. Am Tag 5 wurden die reifen Adipozyten 24 Stunden lang mit nur MEM alpha (+/+) inkubiert („insulin starving“). Am Tag 6 fand die Messung in MEM Alpha (-/-) mit 2% FS-freiem BSA in Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle), 40 µM Atglistatin (Ai), 25 µM Hsl-Inhibitor (Hi) und 5 µM Triacsin C (Tc). Die Bestimmung erfolgte mittels Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich) (3fach Bestimmung) \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001;

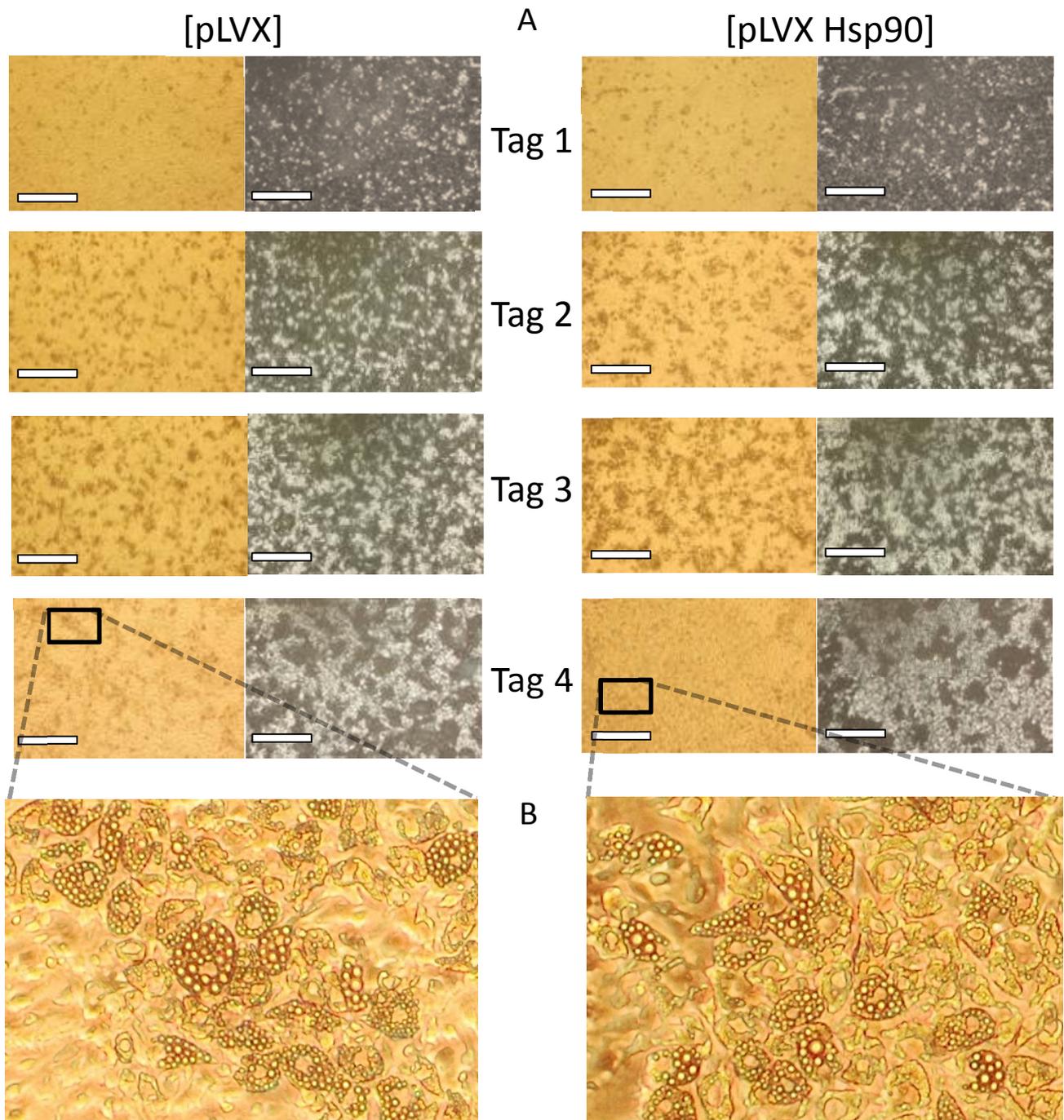
#### **4.2.2 Einfluss von Hsp90 Überexpression auf die Differenzierung der OP9-K Adipozyten**

Da die spezifische Hemmung von Hsp90 mittels Geldanamycin zu einer Störung der Adipozytendifferenzierung und zu einer Anhäufung von TG führt [15], wurde überprüft, ob die Überexpression von Hsp90 die Adipozytendifferenzierung ebenfalls stört und zu Veränderungen des TG-Gehalts der Zellen führt. Dazu wurden die endogene Expression 3 unterschiedlicher Differenzierungsmarkerproteine und zwar der Stearoyl Co-A Desaturase 1 (Scd1), des Fatty acid binding proteins 4 (Fabp4) und des Peroxysome Proliferator-activated receptor  $\gamma$  (Ppar $\gamma$ ) im Verlauf des Differenzierungsprozesses untersucht. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 Stunden (Tag 4) nach Differenzierungsstart der OP9-K Zellen mit und ohne rekombinanten Hsp90 wurden Zelllysate hergestellt und mittels Western Blots analysiert.

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, wurde Scd1 in OP9-K [pLVX] und OP9-K [pLVX Hsp90] 96 Stunden nach Differenzierungsstart in ähnlichem Ausmaß gebildet. Auch für die Expression von Fabp4 konnte in beiden Zelllinien kein Unterschied festgestellt werden. Nur Ppar $\gamma$  wurde in beiden Zelllinien zwar zu allen Zeitpunkten exprimiert, zeigte aber in Gegenwart von rekombinanten Hsp90 in reifen Adipozyten (72 bzw. 96 Stunden nach Differenzierungsstart) geringere Proteinlevels. Parallel dazu wurde die Veränderung der Morphologie von OP9-K[pLVX] und OP9-K[pLVX Hsp90] mikroskopisch verfolgt. Abbildung 20 zeigt keinen Unterschied in der Morphologie der Zellen von Präadipozyten zu reifen Adipozyten, egal ob Hsp90 überexprimiert wird oder nicht. Im nächsten Schritt wurde die relative intrazelluläre Menge an TG in reifen OP9-K-Zellen (96 h nach Differenzierungsstart) mit und ohne überexprimierten Hsp90 durch Ölrotfärbung bestimmt. OP9-K[pLVX] und OP9-K[pLVX Hsp90] Zellen enthielten vergleichbare Mengen an TG. Die Überexpression von Hsp90 scheint damit, im Gegensatz zur Inhibierung von endogenem Hsp90 mittels Geldanamycin zu keiner signifikanten Störung der Adipozytendifferenzierung bzw. zu einer Änderung des intrazellulären TG-Gehaltes zu führen (Abbildung 23).



**Abbildung 22: Ppary, Fabp4, Scd1 Protein-Levels in OP9-K Zellen im Verlauf der Differenzierung. A)** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM Ölsäure beladenem BSA gestartet. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 (Tag 4) Stunden nach Differenzierungsstart wurden Zellen geerntet, lysiert und die Proteine (10 µg Gesamtprotein) auf einem 10%igem Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Die Inkubation mit der primären Antikörperlösung (Anti-Ppary, Anti-Fabp4, Anti-Gapdh, Anti-Scd1, Anti-β-Actin) erfolgte über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 1 Stunde lang mit der sekundären Antikörperlösung (Anti-Maus, Anti-Kaninchen) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Chemiluminiszenz. Gapdh ist die Ladekontrolle für Ppary und Fabp4; β-Actin ist die Ladekontrolle für Scd1; **B)** Quantitative Auswertung der Western Blot Signale von Ppary und Fabp4; die belichteten Filme wurden mit dem Densitometer (BioRad GS800) digitalisiert und mit Hilfe von Quantity one quantifiziert. Dabei wurden die Signale auf die Signale der Ladekontrolle normalisiert.



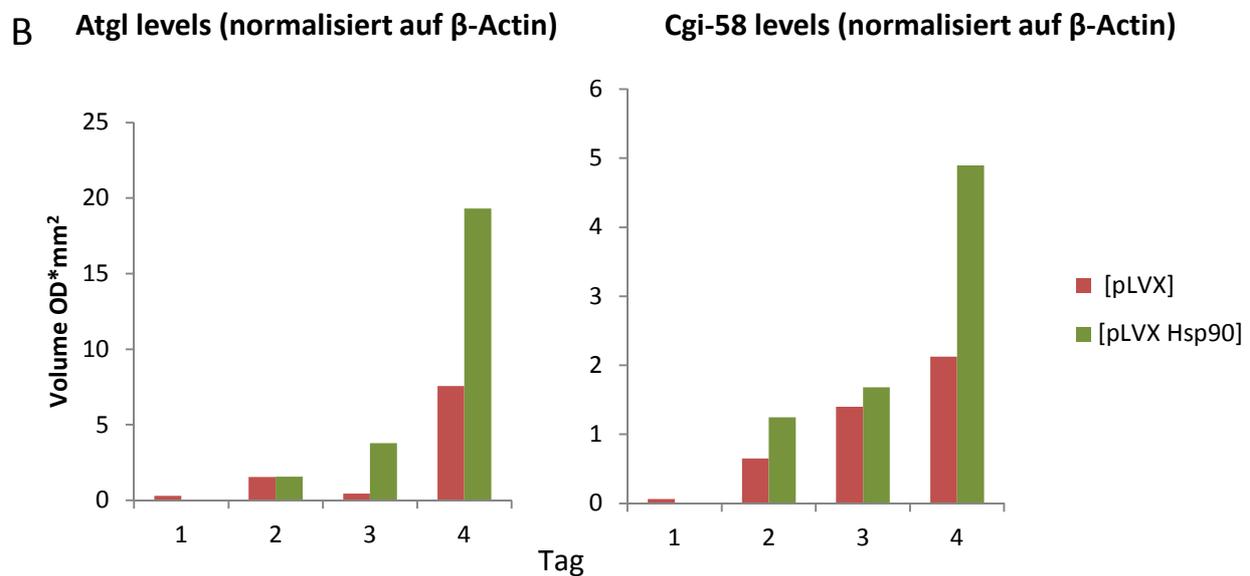
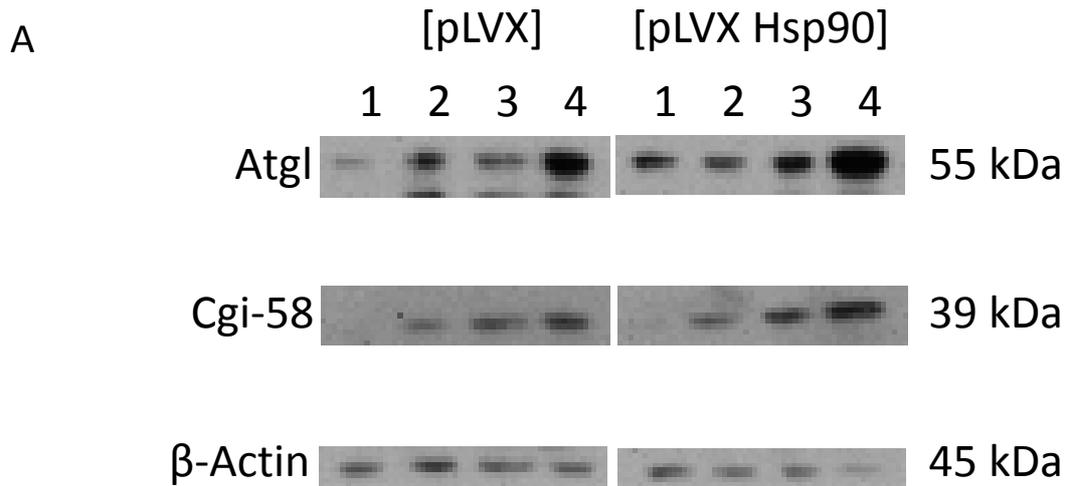
**Abbildung 23 Lichtmikroskopische Aufnahmen von OP9-K[pLVX] und OP9-K[pLVX Hsp90] im Verlauf des Differenzierungsprozesses; A)** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM Ölsäure beladenem BSA gestartet. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 (Tag 4) Stunden nach Differenzierungsstart wurden die Zellen im Lichtmikroskop bei 4x Vergrößerung und Blendenposition PhL und Ph $\infty$ 2 fotografiert. Der Referenzbalken entspricht 500 µm. **B)** Bildausschnitt der differenzierten Zellen am Tag 4.

#### **4.2.3 Einfluss von Hsp90 Überexpression auf die zellulären Proteinlevels von Atgl und Cgi-**

**58**

Hsp90 funktioniert in der Zelle als „Chaperone“ und kann potentielle Partnerproteine entweder stabilisieren oder dem „protein degradation pathway“ zuführen [46, 80]. Außerdem zeigten erste Experimente, dass reife OP9-K Adipozyten bei spezifischer Inhibierung von endogenem Hsp90 geringere Atgl-Proteinlevels aufweisen und deutlich weniger FS sezernieren (pers. Mitteilung, K. Preiß-Landl). Um festzustellen, ob sich der intrazelluläre Proteingehalt von Atgl und Cgi-58 auch bei Überexpression von Hsp90 verändert, wurden OP9-K[pLVX] und OP9-K[pLVX Hsp90] Zellen 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Differenzierungsstart aufgeschlossen und die Zelllysate mittels Western Blot Analyse untersucht. Wie die Abbildung 24 zeigt, wurden Atgl und Cgi-58 mit zunehmender Reife der Adipozyten verstärkt hergestellt. Sowohl Atgl als auch Cgi-58 wurden bei Überexpression von Hsp90 um einen Faktor von 2 angereichert.

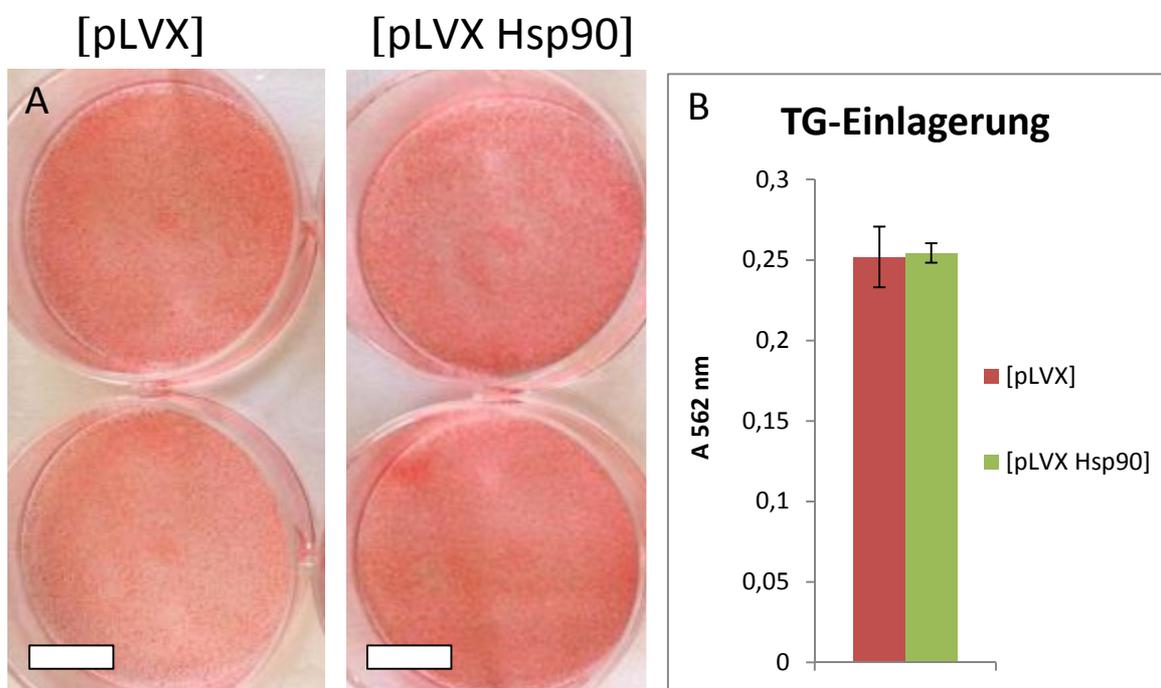
Damit könnte die geringe aber signifikante Steigerung der Atgl vermittelten Hydrolyse von TG und Freisetzung von FS durch die stabilisierende Wirkung von Hsp90 auf das Protein Atgl hervorgerufen werden. Der äußerst schwache Effekt der Hsp90 Überexpression auf die Lipolyse könnte auf die große Menge an bereits endogen vorliegenden Hsp90 zurückzuführen sein.



**Abbildung 24: Atgl und Cgi-58 Protein-Levels in OP9-K Zellen im Verlauf der Differenzierung** **A)** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM Ölsäure beladenem BSA gestartet. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 (Tag 4) Stunden nach Differenzierungsstart wurden Zellen geerntet, lysiert und die Proteine (10 µg Gesamtprotein) auf einem 10%igem Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Die Inkubation mit der primären Antikörperlösung (Anti-Atgl, Anti-Cgi-58) erfolgte über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 1 Stunde lang mit der sekundären Antikörperlösung (Anti-Maus, Anti-Kaninchen) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Chemiluminiszenz. β-Actin ist die Ladekontrolle für Atgl und Cgi-58; **B)** Quantitative Auswertung der Western Blot Signale von Atgl und Cgi-58; die belichteten Filme wurden mit dem Densitometer (BioRad GS800) digitalisiert und mit Hilfe von Quantity one quantifiziert. Dabei wurden die Signale auf die Signale der Ladekontrolle normalisiert.

#### 4.2.4 Einfluss von Hsp90 Überexpression auf die TG-Einlagerung in OP9-K Zellen

Um zu untersuchen, ob die Hsp90 Überexpression auch auf die TG-Einlagerung in OP9-K Zellen einen Einfluss hat, wurden 96 Stunden nach Differenzierungsstart OP9-K[pLVX] und OP9-K[pLVX Hsp90] Zellen mit Formalin fixiert und mit Ölrot gefärbt. Für den relativen Vergleich wurde der Farbstoff nach der Färbung mit Isopropanol extrahiert und die Absorption bei 562 nm gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Überexpression von Hsp90 die Menge an eingelagerten TG in der Zelle nicht ändert (Abbildung 25).

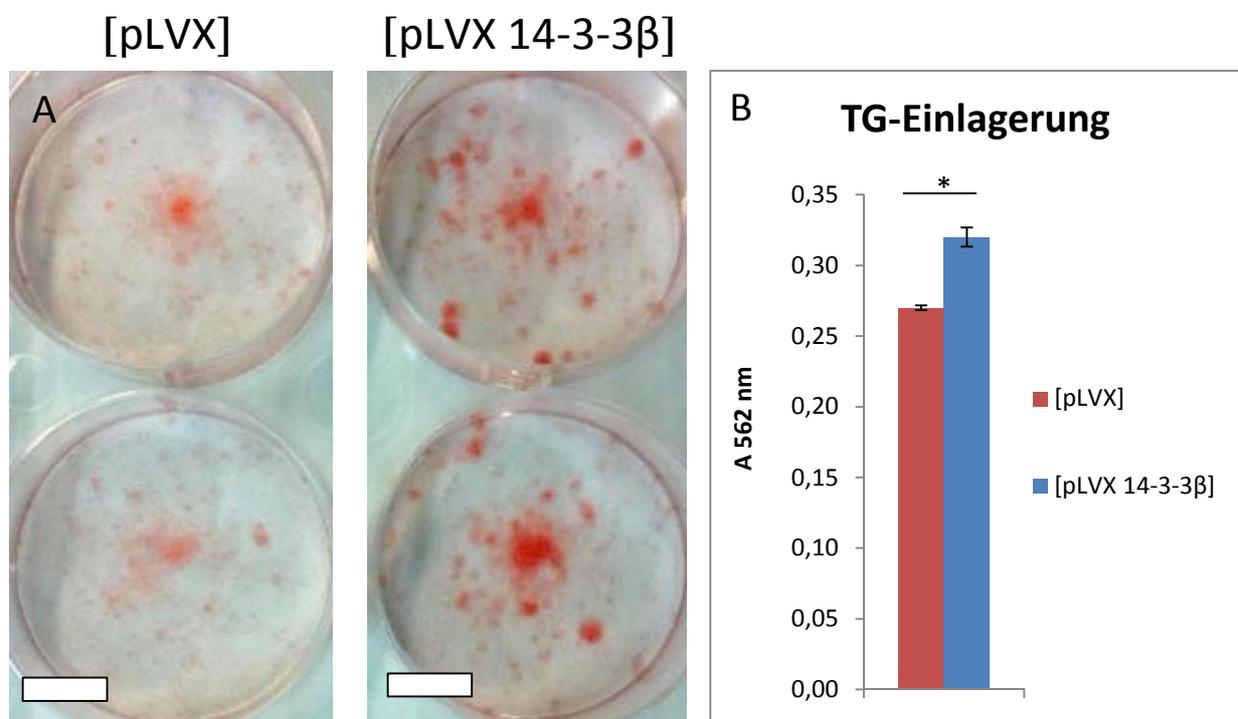


**Abbildung 25: Ölrot gefärbte reife OP9-K Adipozyten zur Darstellung von TG in fixierten Zellen. A)** 96 Stunden nach Start der Differenzierung durch Zugabe von 1 µg/ml Insulin und 900 µM Ölsäure beladenem BSA wurden die Zellen mittels Formalin fixiert und die TG mittels Ölrot gefärbt; der Referenzbalken entspricht 1 cm; **B)** Relativer Vergleich des Ölrot Gehalts, Das in den Zellen eingelagerte Ölrot wurde mit Isopropanol extrahiert und die Absorption bei 562 nm bestimmt.

### 4.3 Die Einfluss von 14-3-3 $\beta$ Überexpression auf die TG-Einlagerung in 3T3-L1

#### Zellen

Vorversuche in unserem Labor deuteten darauf hin, dass 14-3-3 $\beta$  Überexpression zu verminderter Lipolyse und vermehrter Einlagerung von TGs in LDs führt. Um dies zu bestätigen, wurden 3T3-L1[pLVX] und 3T3-L1[pLVX 14-3-3 $\beta$ ] Zellen differenziert, und die TG-Einlagerung mittels Ölrot Färbung bestimmt. Der relative Vergleich zeigte einen geringen (19%) aber signifikanten Unterschied in der TG-Einlagerung zwischen den Kontroll- und den 14-3-3 $\beta$  überexprimierenden Zellen. (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Ölrot gefärbte reife 3T3-L1 Adipozyten zur Darstellung von TG in fixierten Zellen. **A)** 8 Tage nach Beginn der Differenzierung mit Insulin, IBMX, Dexamethason und Rosiglitazon wurden die Zellen mittels Formalin fixiert und die TG mittels Ölrot gefärbt; der Referenzbalken entspricht 1 cm; **B)** Relativer Vergleich des Ölrot Gehalts, Das in den Zellen eingelagerte Ölrot wurde mit Isopropanol extrahiert und die Absorption bei 562 nm bestimmt. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ;

Die niedere Differenzierungsrate von murinen 3T3-L1 Fibroblasten führte allerdings bei ersten Messungen der Lipolyse zu sehr stark schwankenden und daher fragwürdigen Ergebnissen. Aus diesem Grund wurden in allen nachfolgenden Experimenten OP9-K Zellen verwendet.

#### **4.4 Einfluss von 14-3-3 $\beta$ , überexprimiert in OP9-K Adipozyten, auf die Differenzierung dieser Zellen bzw. auf ihren TG-Metabolismus**

14-3-3 $\beta$  ist eine von 7 Isoformen, welche in zentralen Signalwegen eine regulatorische Rolle übernehmen. 14-3-3 $\beta$  Proteine binden über eine phosphorylierte Erkennungssequenz als Mono- oder Dimer an ihre „clients“ und führen so zu mannigfaltigen Effekten: So können Proteine durch 14-3-3 $\beta$  Bindung in ihrer Aktivität, in ihrer Lokalisation oder in ihrer Stabilität beeinflusst werden. Sowohl Atgl als auch Cgi-58 enthalten potentielle 14-3-3 Bindestellen und kommen damit als „clients“ für 14-3-3 $\beta$  in Frage [62, 76].

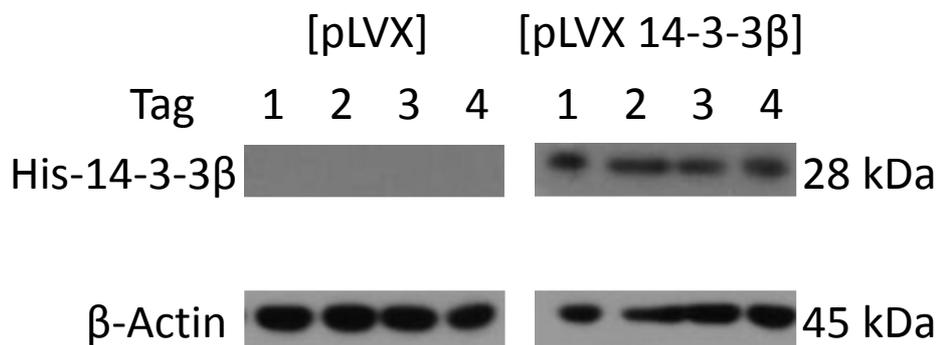
Die Interaktion von Atgl mit etlichen 14-3-3 Isoformen wurde durch „TAP screenings“ entdeckt und die Wechselwirkung mit Atgl mittels IP bestätigt [32]. Eine Interaktion von 14-3-3 $\beta$  mit Cgi-58 wurde ebenfalls gezeigt [32, 51] und damit 14-3-3 $\beta$  zu einem potentiellen lipolysomalen Protein gemacht.

##### **4.4.1 Einfluss von 14-3-3 $\beta$ Überexpression auf den Abbau von TG zu freien FS und Glycerol**

Um die Frage zu beantworten, welchen Einfluss 14-3-3 $\beta$  auf den intrazellulären Abbau von TG in Adipozyten hat, wurden OP9-K Präadipozyten mit 14-3-3 $\beta$  kodierenden Lentiviren bzw. nicht rekombinanten Lentiviren (Kontrollzellen) infiziert und jene Zellen mit erfolgreicher Integration der viralen DNA ins Genom selektiert. Diese wurden schließlich durch Supplementierung des Mediums mit Insulin und komplexierter Ölsäure 4 Tage lang zu reifen Adipozyten differenziert, und nach einer 24 stündigen „insulin starving“ Phase die lipolytische Kapazität der Zellen durch die Quantifizierung der sezernierten FS und Glycerol im Medium bestimmt. Mit Hilfe von Western Blot Analyse wurde die stabile Expression von

14-3-3 $\beta$  in den reifen Adipozyten überprüft. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, wurde das rekombinante 14-3-3 $\beta$  Protein in konstanten Mengen exprimiert.

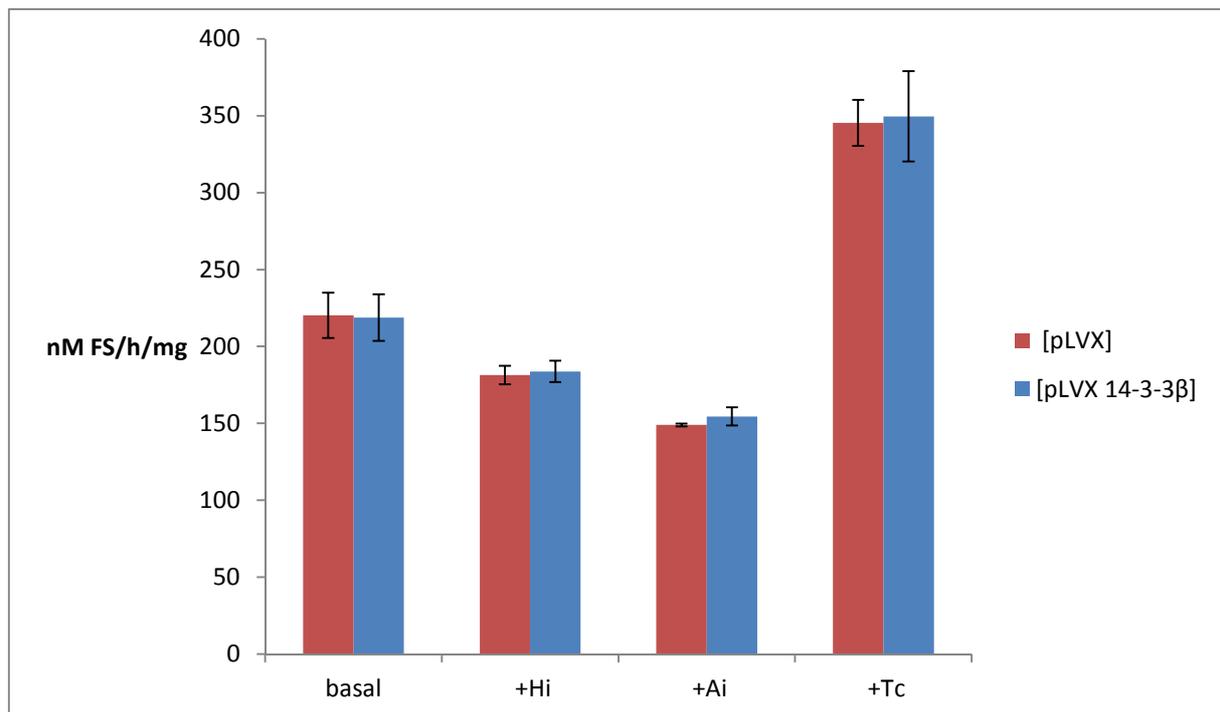
Die Negativkontrolle, OP9-K Zellen mit leerem lentiviralem Plasmid, zeigte keine 14-3-3 $\beta$  Überexpression. Die lipolytische Kapazität der reifen Adipozyten wurde unter basalen Bedingungen und unter Lipolyse stimulierten Bedingungen bestimmt. TG werden gespalten und die freien FS entweder ins Medium sezerniert oder mittels FA-CoA-Synthetase wieder der TG-Synthese zugeführt. Um die Menge der FS, die durch Atgl-vermittelte TG-Hydrolyse frei und sezerniert werden, getrennt von der Menge an FS, die durch Hsl vermittelte Lipolyse frei und sezerniert werden, zu bestimmen, wurden die OP9-K Zellen jeweils mit dem Hsl Inhibitor Hi 76-0079 oder dem Atgl Inhibitor Atlistatin inkubiert und die FS bzw. Glycerol im Medium quantifiziert. Zusätzlich wurden die reifen Adipozyten mit Triacsin C inkubiert, um den intrazellulären Rücklauf der FS über die *de novo* Synthese von TG aus den frei werdenden FS zu blockieren.



**Abbildung 27: His-14-3-3 $\beta$  Protein-Levels in OP9-K Zellen im Verlauf der Differenzierung.**

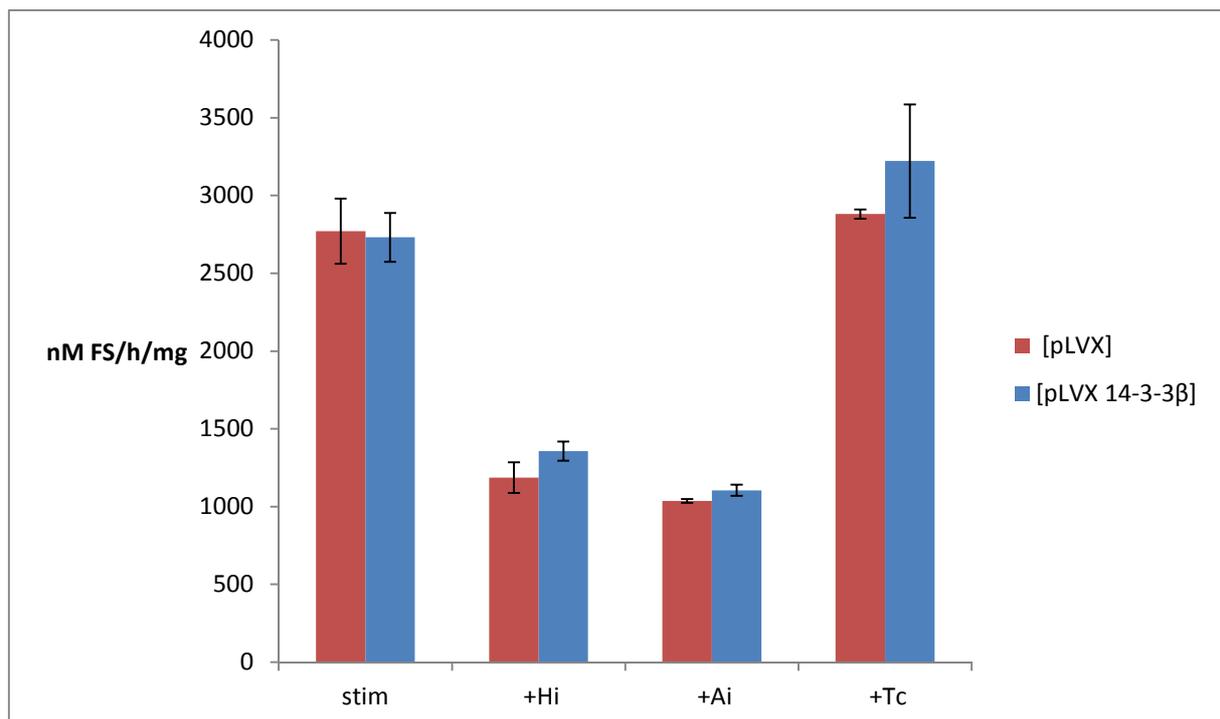
50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro well auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1  $\mu$ g/ml Insulin und 900  $\mu$ M Ölsäure beladenem BSA gestartet. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 (Tag 4) Stunden nach Differenzierungsstart wurden Zellen geerntet, pelletiert und bei -20°C gelagert. Für Western Blot Analysen wurden die Pellets resuspendiert und die Zellen lysiert. 10  $\mu$ g Gesamtprotein auf ein 10% Polyacrylamid Gel aufgetragen und mit 40 mA entwickelt. Die Inkubation mit der primären Antikörperlösung (C-terminaler His Antikörper bzw.  $\beta$ -Aktin Antikörper) erfolgte über Nacht, die mit der sekundären Antikörperlösung (Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus) 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Visualisierung der Signale erfolgte über ECL-Chemiluminiszenz-Detektion. Die Differenzierung dauerte von Tag 0 – 3. Ab Tag 4 lagen differenzierte bzw. reife Adipozyten vor.

Wie in Abbildung 28 dargestellt, sezernierten reife Adipozyten mit rekombinanten 14-3-3 $\beta$  unter basalen Bedingungen, d.h. nicht Lipolyse stimulierten Bedingungen die gleiche Menge an freien FS wie die Kontrollzellen. In Gegenwart von Triacsin C stieg die Fettsäure-Freisetzung erwartungsgemäß um rund 60%, es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und 14-3-3 $\beta$  überexprimierenden Zellen. Nach Zugabe des Hsl-Inhibitors verminderte sich die Freisetzung von FS nur um 10%, bei der Zugabe von Atglistatin nur um 30% und es zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und Zellen mit rekombinatem 14-3-3 $\beta$ .



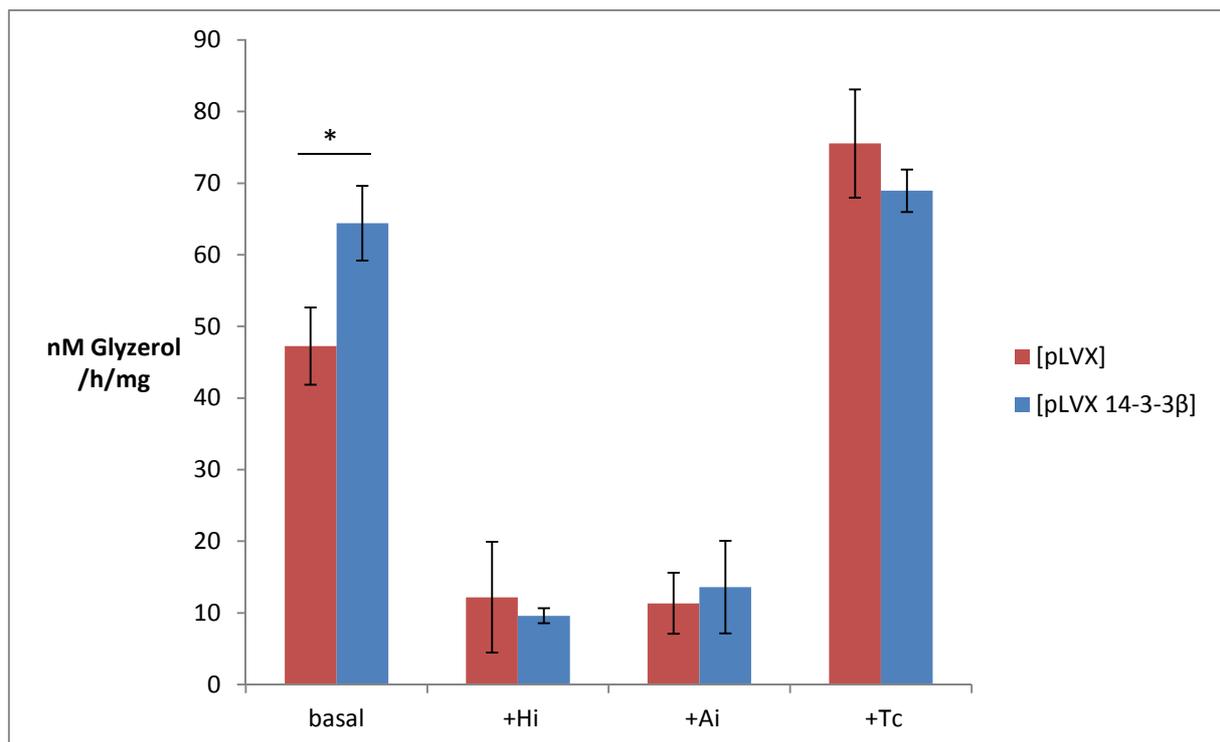
**Abbildung 28 Freisetzung von freien FS aus reifen Adipozyten unter nicht Lipolyse-stimulierten (basalen) Bedingungen.** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1  $\mu$ g/ml Insulin und 900  $\mu$ M komplexierter Ölsäure gestartet. Am Tag 5 wurden die reifen Adipozyten 24 Stunden lang mit nur MEM alpha (+/+) inkubiert („insulin starving“). Am Tag 6 fand die Messung in MEM Alpha (-/-) mit 2% FS-freiem BSA in Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle), 40  $\mu$ M Atglistatin (Ai), 25  $\mu$ M Hsl-Inhibitor (Hi) und 5  $\mu$ M Triacsin C (Tc). Die Bestimmung erfolgte mittels NEFA Kit ACS-ACOD (Wako Diagnostics) (3fach Bestimmung)

Unter Forskolin stimulierten Bedingungen konnte, wie erwartet eine allgemeine Steigerung der Lipolyse um den Faktor 10 beobachtet werden (Abbildung 29). Unter Zugabe des Hsl Inhibitors sank die Menge an freigesetzten FS um 55 %, unter Zugabe des Atgl Inhibitors Atglistatin um 60 %. Die Hemmung der *de novo* TG-Synthese brachte keine weitere Steigerung an freien FS im Medium im Vergleich zur ungehemmten Wiederveresterung. Es konnte kein Unterschied zwischen reifen Adipozyten, die zusätzlich rekombinantes 14-3-3 $\beta$  exprimierten und den Kontrollzellen festgestellt werden.



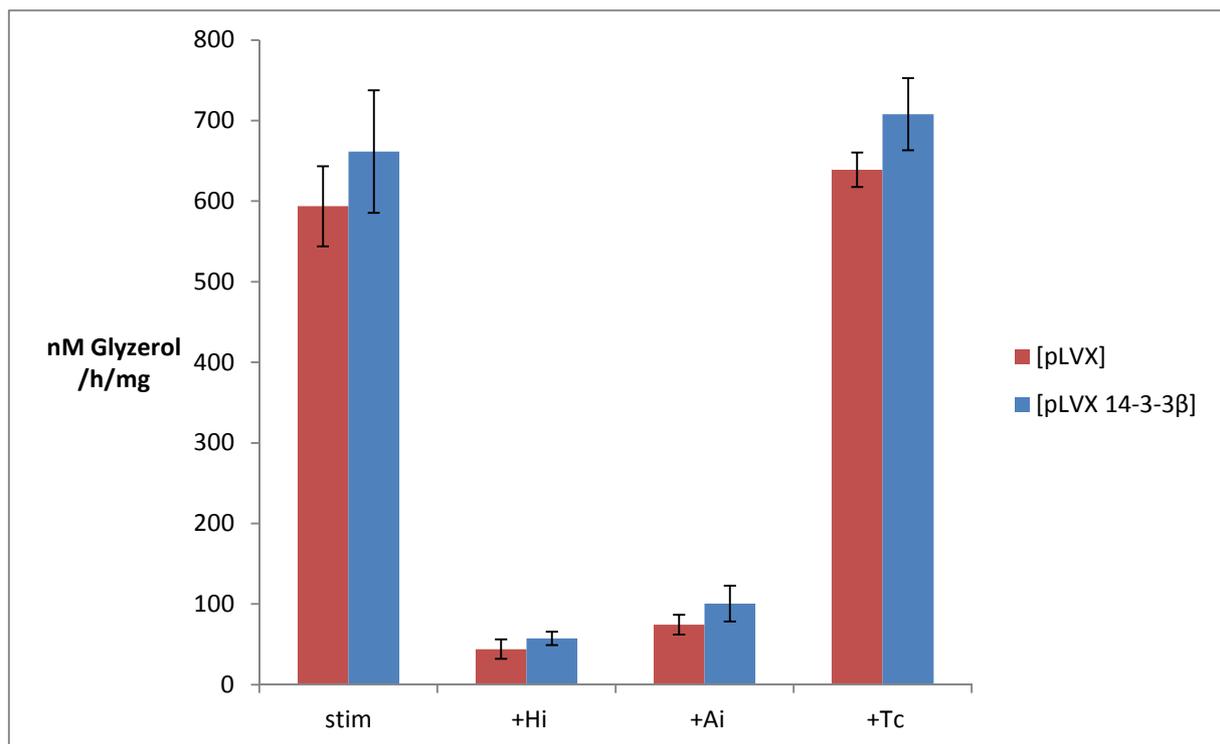
**Abbildung 29 Forskolin stimulierte Freisetzung von freien FS aus reifen Adipozyten unter Lipolyse-stimulierten Bedingungen.** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1  $\mu$ g/ml Insulin und 900  $\mu$ M komplexierter Ölsäure gestartet. Am Tag 5 wurden die reifen Adipozyten 24 Stunden lang mit nur MEM alpha (+/+) inkubiert („insulin starving“). Am Tag 6 fand die Messung in MEM Alpha (-/-) mit 2% FS-freiem BSA in Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle), 40  $\mu$ M Atglistatin (Ai), 25  $\mu$ M Hsl-Inhibitor (Hi) und 5  $\mu$ M Triacsin C (Tc). Die Bestimmung erfolgte mittels NEFA Kit ACS-ACOD (Wako Diagnostics) (3fach Bestimmung)

Parallel zur Bestimmung der sezernierten FS im Medium wurde Glycerol, das zweite Abbauprodukt der TG-Hydrolyse, quantifiziert. Wie in Abbildung 30 dargestellt, sinkt wie erwartet, die Menge an Glycerol im Medium in Gegenwart von Hsl-Inhibitor und Atglistatin auf ca. 20 % der Menge von ungehemmten Zellen. Sie erhöht sich um den Faktor 1,6 wenn die Zellen mit Triascin C behandelt wurden. Unter basalen Bedingungen konnte nur bei ungehemmter Lipolyse ein signifikanter Unterschied zwischen 14-3-3 $\beta$  Überexpression und den Kontrollzellen detektiert werden.



**Abbildung 30 Freisetzung von Glycerol aus reifen Adipozyten unter nicht Lipolyse-stimulierten (basalen) Bedingungen.** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1  $\mu$ g/ml Insulin und 900  $\mu$ M komplexierter Ölsäure gestartet. Am Tag 5 wurden die reifen Adipozyten 24 Stunden lang mit nur MEM alpha (+/+) inkubiert („insulin starving“). Am Tag 6 fand die Messung in MEM Alpha (-/-) mit 2% FS-freiem BSA in Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle), 40  $\mu$ M Atglistatin (Ai), 25  $\mu$ M Hsl-Inhibitor (Hi) und 5  $\mu$ M Triascin C (Tc). Die Bestimmung erfolgte mittels Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich) (3fach Bestimmung) \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ;

Unter Lipolyse stimulierten Bedingungen konnte eine allgemeine Steigerung der Lipolyse um den Faktor 10 beobachtet werden (Abbildung 31). Unter Zugabe des Hsl Inhibitors sank die Menge an freigesetztem Glycerol um 90 %, und unter Zugabe von Atglistatin um 85 %. Die Hemmung der *de novo* TG-Biosynthese brachte keine weitere Steigerung an sezerniertem Glycerol im Vergleich zu Triacsin C unbehandelten Zellen. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Glycerol Freisetzung, wenn Zellen rekombinantes 14-3-3 $\beta$  exprimierten.



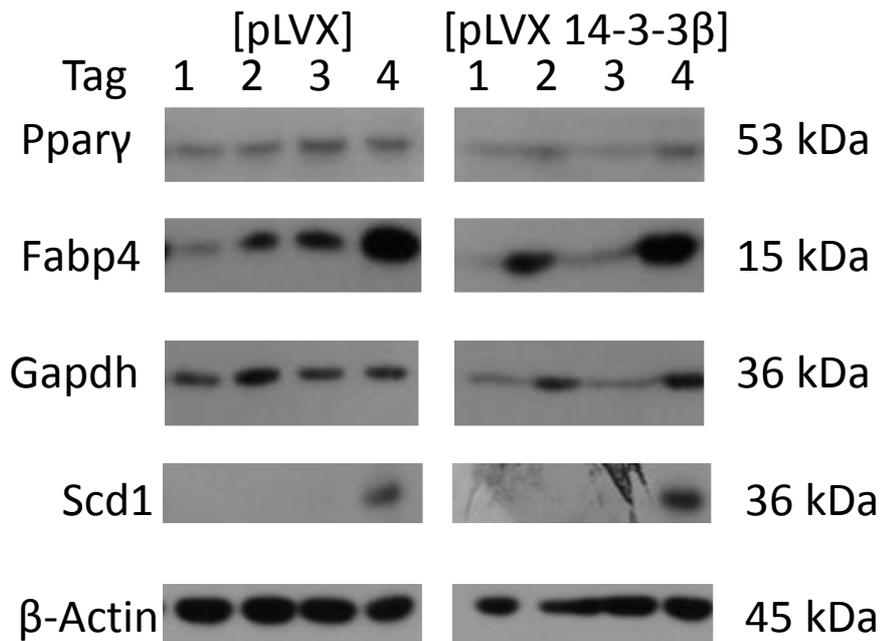
**Abbildung 31** Forskolin stimulierte Freisetzung von Glycerol aus reifen Adipozyten unter Lipolyse-stimulierten Bedingungen. 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1  $\mu$ g/ml Insulin und 900  $\mu$ M komplexierter Ölsäure gestartet. Am Tag 5 wurden die reifen Adipozyten 24 Stunden lang mit nur MEM alpha (+/+) inkubiert („insulin starving“). Am Tag 6 fand die Messung in MEM Alpha (-/-) mit 2% FS-freiem BSA in Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle), 40  $\mu$ M Atglistatin (Ai), 25  $\mu$ M Hsl-Inhibitor (Hi) und 5  $\mu$ M Triacsin C (Tc). Die Bestimmung erfolgte mittels Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich) (3fach Bestimmung)  
 \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ;

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Glycerol und FS bei der Lipolyse von OP9-K Zellen im korrekten Verhältnis quantifiziert werden konnten. Sowohl der Hsl-Inhibitor als auch Atglistatin blockierten den Abbau der TG im erwarteten Ausmaß und auch die Inhibierung der *de-novo* TG-Biosynthese durch Triacsin C zeigte die erwartete Steigerung in der Freisetzung von FS und Glycerol. Die Überexpression von 14-3-3 $\beta$  in OP9-K Zellen führte jedoch unter keinen Bedingungen zu Veränderungen im TG-Abbau und in der Freisetzung von FS und Glycerol.

#### **4.4.2 Einfluss von 14-3-3 $\beta$ Überexpression auf die Differenzierung der OP9-K Adipozyten**

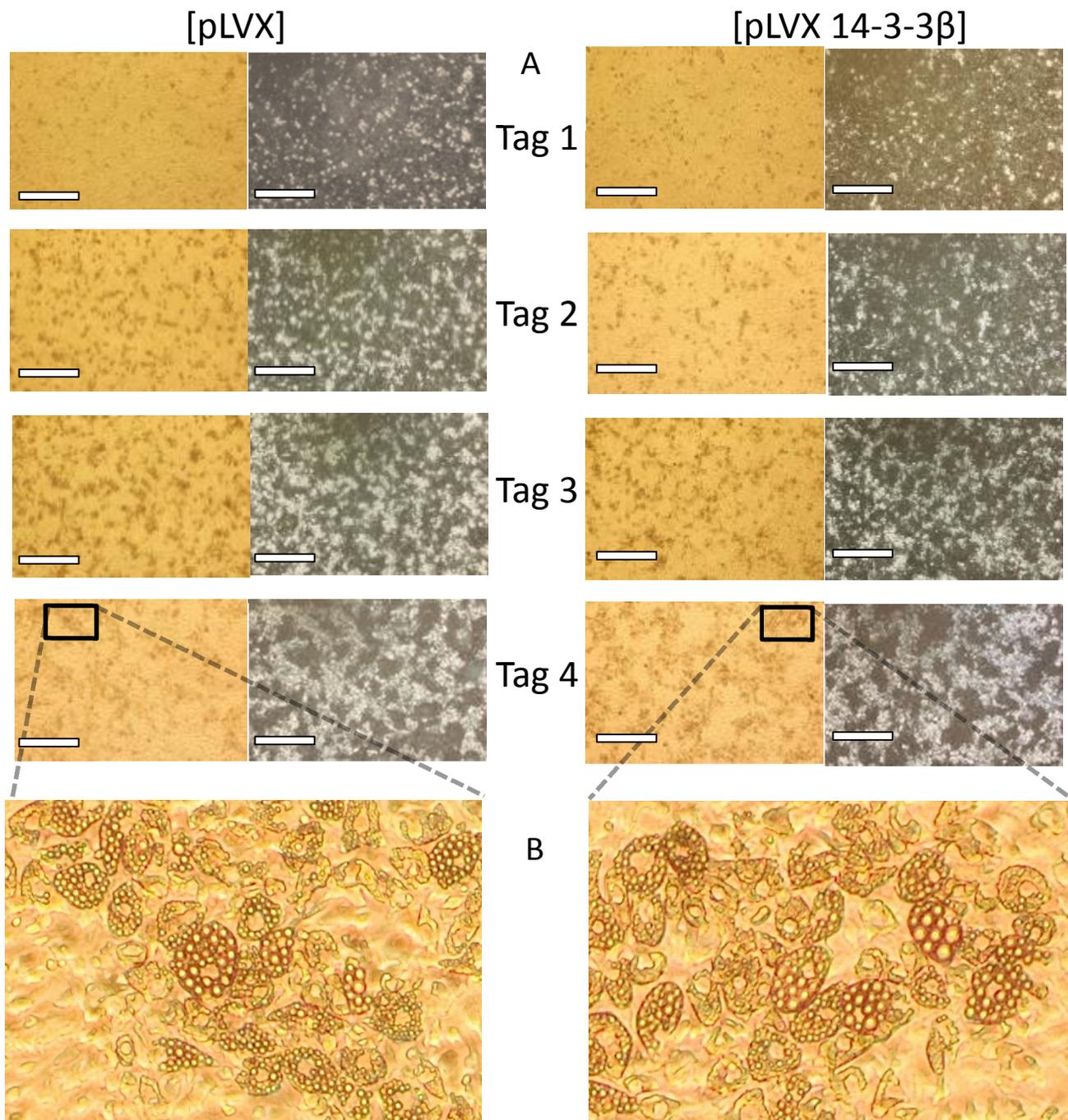
Dass 14-3-3 Proteinen Signale in wichtigen zellulären Prozessen modulieren, wurde mehrfach gezeigt. Die Interaktion mit Atgl und Cgi-58 legt nahe, dass 14-3-3 Proteine auch im Lipidstoffwechsel eine Rolle spielen. Da der Lipidstoffwechsel eng mit der Entwicklung von Adipozyten verknüpft ist, sollte hier untersucht werden, ob die Überexpression von 14-3-3 $\beta$  die Adipozytendifferenzierung beeinflusst und zu Veränderungen des TG-Gehalts der Zellen führt. Dazu wurden die endogene Expression 3 unterschiedlicher Differenzierungsmarkerproteine und zwar der Stearoyl Co-A Desaturase 1 (Scd1), des Fatty acid binding proteins 4 (Fabp4) und des Peroxysome Proliferator-activated receptor  $\gamma$  (Ppar $\gamma$ ) im Verlauf des Differenzierungsprozesses untersucht. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 Stunden (Tag 4) nach Differenzierungsstart der OP9-K Zellen mit und ohne rekombinanten 14-3-3 $\beta$  wurden Zelllysate hergestellt und mittels Western Blots analysiert.

Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, wurde Scd1 sowohl in OP9-K [pLVX 14-3-3 $\beta$ ] als auch in OP9-K [pLVX] 96 Stunden nach Differenzierungsstart in gesteigertem Ausmaß gebildet. Auch die Expression von Fabp4 oder Ppar $\gamma$  änderte sich im Verlauf der Differenzierung nicht.



**Abbildung 32: Pparγ, Fabp4, Scd1 Protein-Levels in OP9-K Zellen im Verlauf der Differenzierung.** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM Ölsäure beladenem BSA gestartet. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 (Tag 4) Stunden nach Differenzierungsstart wurden Zellen geerntet, lysiert und die Proteine (10 µg Gesamtprotein) auf einem 10%igem Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Die Inkubation mit der primären Antikörperlösung (Anti-Pparγ, Anti-Fabp4, Anti-Gapdh, Anti-Scd1, Anti-β-Actin) erfolgte über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 1 Stunde lang mit der sekundären Antikörperlösung (Anti-Maus, Anti-Kaninchen) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Chemiluminiszenz. Gapdh ist die Ladekontrolle für Pparγ und Fabp4; β-Actin ist die Ladekontrolle für Scd1;

Parallel dazu wurde die Veränderung der Morphologie von OP9-K[pLVX] und OP9-K[pLVX 14-3-3β] im Verlauf der Differenzierung mikroskopisch verfolgt. Abbildung 29 zeigt keinen Unterschied in der Morphologie der Zellen von Präadipozyten zu reifen Adipozyten egal ob 14-3-3β überexprimiert wird oder nicht. Im nächsten Schritt wurde die relative intrazelluläre Menge an TG in reifen OP9-K-Zellen (96 Stunden nach Differenzierungsstart) mit und ohne überexprimierten Hsp90 durch Ölrotfärbung bestimmt. OP9-K Zellen enthielten vergleichbare Mengen an TG, wie OP9-K Zellen mit zusätzlich rekombinantem 14-3-3β (Abbildung 33). *Summa summarum* könnten diese Daten darauf hinweisen, dass die Überexpression von 14-3-3β die Adipozytendifferenzierung nicht beeinflusst.

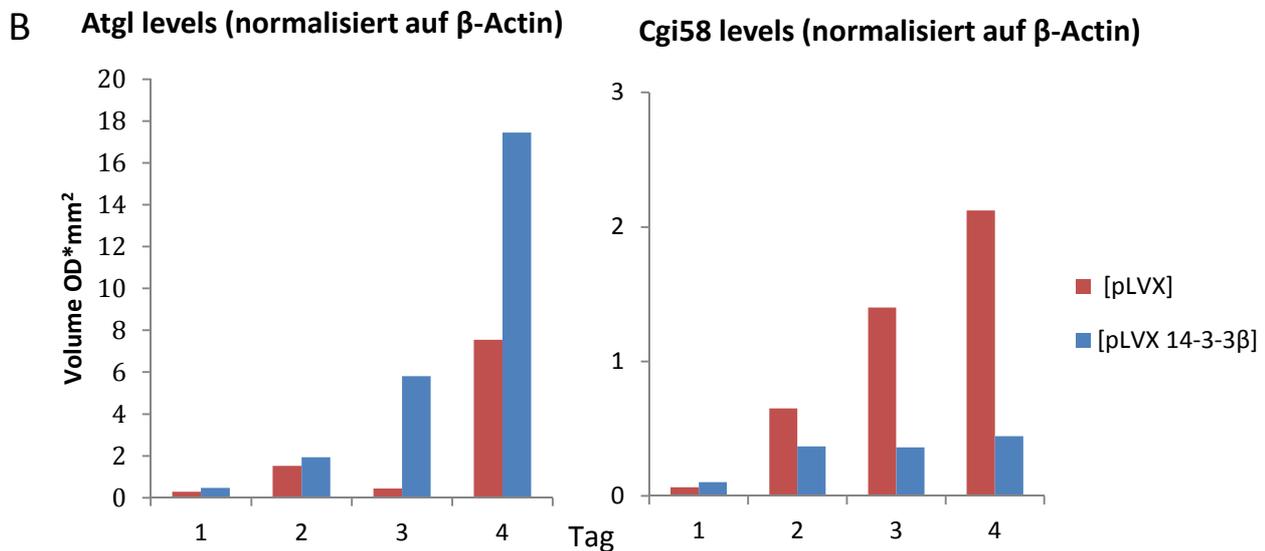
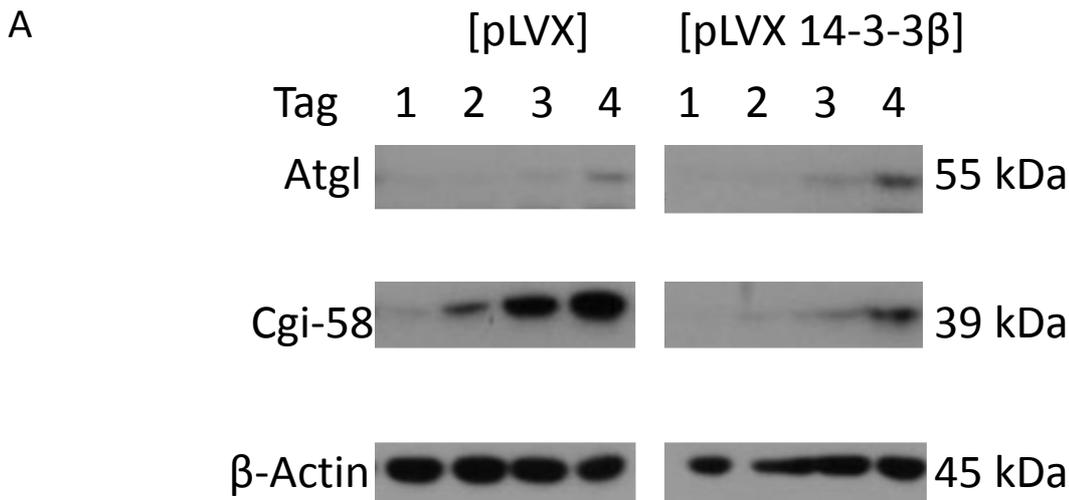


**Abbildung 33** Lichtmikroskopische Aufnahmen von OP9-K[pLVX] und OP9-K[pLVX 14-3-3β] im Verlauf des Differenzierungsprozesses; **A)** 50000 rekombinante OP9-K Präadipozyten wurden pro Well auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM Ölsäure beladenem BSA gestartet. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 (Tag 4) Stunden nach Differenzierungsstart wurden die Zellen im Lichtmikroskop bei 4x Vergrößerung und Blendenposition PhL und Ph∞2 fotografiert. Der Referenzbalken entspricht 500 µm. **B)** Bildausschnitt der differenzierten Zellen am Tag 4.

#### **4.4.3 Einfluss von 14-3-3 $\beta$ Überexpression auf die zellulären Proteinlevels von Atgl und Cgi-**

#### **58**

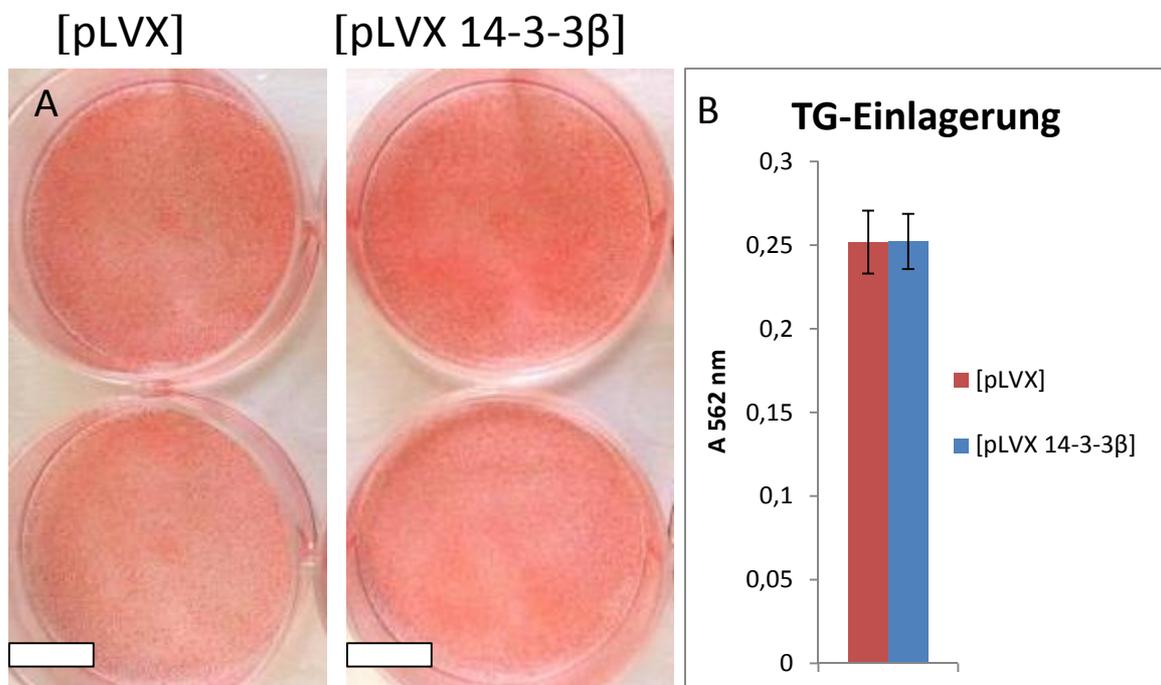
14-3-3 $\beta$  funktioniert in der Zelle als Modulator und kann potentielle Partnerproteine nicht nur aktivieren/deaktivieren sondern auch deren Stabilität ändern. Um festzustellen, ob sich der intrazelluläre Proteingehalt von Atgl und Cgi-58 bei Überexpression von 14-3-3 $\beta$  verändert, wurden OP9-K[pLVX] und OP9-K[pLVX 14-3-3 $\beta$ ] Zellen 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Differenzierungsstart aufgeschlossen und die Zelllysate mittels Western Blot Analyse untersucht. Wie die Abbildung 34 zeigt, verstärkte sich die Atgl Expression mit zunehmender Reife der Adipozyten um den Faktor 2. Der prominenteste Effekt ist aber die deutliche Reduktion von Cgi-58 um rund 75%.



**Abbildung 34 Atgl und Cgi-58 Protein-Level in OP9-K Zellen im Verlauf der Differenzierung** **A)** 50000 rekombinante OP9-K Präädipozyten wurden pro Well auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Differenzierung mit einem Mediumwechsel auf MEM Alpha (+/+), 1 µg/ml Insulin und 900 µM Ölsäure beladenem BSA gestartet. 24 (Tag 1), 48 (Tag 2), 72 (Tag 3) und 96 (Tag 4) Stunden nach Differenzierungsstart wurden Zellen geerntet, lysiert und die Proteine (10 µg Gesamtprotein) auf einem 10%igem Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Die Inkubation mit der primären Antikörperlösung (Anti-Atgl, Anti-Cgi-58) erfolgte über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 1 Stunde lang mit der sekundären Antikörperlösung (Anti-Maus, Anti-Kaninchen) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Chemiluminiszenz.. β-Actin ist die Ladekontrolle für Atgl und Cgi-58; **B)** Quantitative Auswertung der Western Blot Signale von Atgl und Cgi-58; die belichteten Filme wurden mit dem Densitometer (BioRad GS800) digitalisiert und mit Hilfe von Quantity one quantifiziert. Dabei wurden die Signale auf die Signale der Ladekontrolle normalisiert.

#### 4.4.4 Einfluss von 14-3-3 $\beta$ Überexpression auf die TG-Einlagerung in OP9-K Zellen

Um zu untersuchen, ob die 14-3-3 $\beta$  Überexpression auch auf die TG-Einlagerung in OP9-K Zellen einen Einfluss hat, wurden 96 Stunden nach Differenzierungsstart OP9-K[pLVX] und OP9-K[pLVX 14-3-3 $\beta$ ] Zellen mit Formalin fixiert und mit Ölrot gefärbt. Für den relativen Vergleich wurde der Farbstoff nach der Färbung mit Isopropanol extrahiert und die Absorption bei 562 nm gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Dieses Ergebnis deutet an, dass 14-3-3 $\beta$  keinen Einfluss auf die TG-Einlagerung in die Zelle hat (Abbildung 35).



**Abbildung 35: A) Ölrot gefärbte reife OP9-K Adiozyten zur Darstellung von TG in fixierten Zellen. A)** 96 Stunden nach Start der Differenzierung durch Zugabe von 1  $\mu$ g/ml Insulin und 900  $\mu$ M Ölsäure beladenem BSA wurden die Zellen mittels Formalin fixiert und die TG mittels Ölrot gefärbt; der Referenzbalken entspricht 1 cm; **B)** Relativer Vergleich des Ölrot Gehalts, Das in den Zellen eingelagerte Ölrot wurde mit Isopropanol extrahiert und die Absorption bei 562 nm bestimmt.

## **5. Diskussion**

## 5.1 Die Suche nach nicht-Cgi-58 bindenden Fabp4 Proteinvarianten

Fabp4 ist Teil des Lipolysoms und ist eine von zwei Isoformen des „Fatty acid binding proteins“, die im weißen Fettgewebe exprimiert werden. Fabp Proteine haben direkten Einfluss auf die Atgl vermittelte Lipolyseaktivität. Hofer *et al.* konnten zeigen, dass die Aktivität der Atgl in Anwesenheit von Fabp4 höher war, aber nur in Kombination mit Cgi-58. Fabp4 steigert aber auch die Expression von Genen, die unter der Kontrolle des „Ppar responsive elements“ stehen [33]. Damit agiert es an der Schnittstelle zwischen Lipolyse und Transkriptionsregulation. Fabp Proteine scheinen aber auch eine Funktion als Adipokin zu haben. So wurde gezeigt, dass sie eine wichtige Funktion in der systemischen Kontrolle von Lipid- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel haben [22, 75].

Hofer *et al.* konnten über Heteronukleare Single Quantum Kohärenz (HNSQ) die Aminosäurereste in Fabp4 identifizieren, welche an der Bindung von Cgi-58 beteiligt sind. Die relevanten Aminosäurereste befanden sich in den Regionen,  $\alpha$ 1-Helix,  $\alpha$ 2-Helix und angrenzenden loops. In den Arbeiten von Hofer *et al.* konnte in SPAs gezeigt werden, dass die Proteinvarianten Fabp4<sup>F58S</sup>, Fabp4<sup>K59E</sup>, Fabp4<sup>D77G</sup> und Fabp4<sup>D78G</sup> eine zwischen 30 bis 50 % reduzierte Bindung aufwiesen [33]. Auf Basis dieser Experimente sollte untersucht werden, welche Aminosäuren für die Bindung von Fabp4 und Cgi-58 essentiell sind und gemeinsam ausgetauscht werden müssen, um einen vollständigen Bindungsverlust herbeizuführen. Mit einer solchen Fabp4 Proteinvariante, die nicht mehr an Cgi-58 bindet, könnte überprüft werden, ob die Fabp4 vermittelte Expressionssteigerung von PPRE kontrollierten Genen, abhängig von der Fabp4/Cgi-58 Interaktion ist.

Die in dieser Arbeit generierten Proteinvarianten Fabp4<sup>F58S/K59E</sup> und Fabp4<sup>D77G/D78G</sup> die je 2 Aminosäureaustausche kombinierten, für die bereits reduzierte Bindung beobachtet worden war, zeigten wider Erwarten unveränderte Bindungsaffinität zu Cgi-58 anstatt sie noch stärker herabzusetzen. Auch die Kombination dieser beiden Varianten (Fabp4<sup>F58S/K59E/D77G/D78G</sup>) zeigte keine veränderte Affinität.

Nur die Variante Fabp4<sup>R31E/K32E/V33E</sup> bei der 3 Aminosäuren in der oberflächennahen  $\alpha$ 2-Helix ausgetauscht worden waren, zeigte reproduzierbar, egal ob alleine oder mit weiteren Mutationen kombiniert, eine Bindungsreduktion von allerdings nur 30%. Die Variante Fabp4<sup>Del(31-36)</sup>, bei der im selben Abschnitt der  $\alpha$ 2-Helix diese Aminosäuren nicht durch

andere ersetzt, sondern völlig entfernt wurden, zeigte nur geringe Reduktion der Bindungsaffinität, welche aber nicht signifikant war. Es wäre möglich, dass die vollständige Entfernung von 6 Aminosäuren, die Struktur des Deckels von Fabp4 weitreichend ändert und die  $\alpha$ 1-Helix mit ihrem Lysin- und Valinrest an ähnlicher Position die Bindungsfähigkeit zu Cgi-58 wieder teilweise herstellen könnten. Hauptgrund der widersprüchlichen Ergebnisse waren jedoch die äußerst geringen Signalhöhen im Vergleich zur Signalhöhe der Negativkontrolle LacZ im SPA. In den Arbeiten von Hofer *et al.* war die Signalhöhe, welche die WT Fabp4/Cgi-58 Interaktion anzeigte um ein 20 faches höherer als das Signal der Negativkontrolle. In dieser Arbeit ist es nicht gelungen, trotz zahlreicher Optimierungsversuche die Signalhöhe über das Fünffache der Signalhöhe der Negativkontrolle zu heben. Damit ist anzunehmen, dass die Qualität der Signale (Signal-Rausch-Verhältnis) verlässliche Aussagen über Bindung bzw. Nicht-Bindung zwischen Fabp4-Varianten und Cgi-58 nicht zulassen. Es ist somit nicht gelungen, eine nicht-Cgi-58 bindende Variante mittels SPA zu identifizieren. Alternative Methoden wie „Pulldown assays“ oder IPs könnten dafür eingesetzt werden.

## 5.2 Die Rolle von Hsp90 in der Lipolyse und der Adipogenese

Das Hitzeschockprotein Hsp90 funktioniert als dimeres ATP abhängiges Chaperon und ist Teil des Lipolysoms. Es ist hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert aber auch an LDs [10]. Es interagiert mit Atgl, wie durch TAP und in IP-Experimenten gezeigt werden konnte [32, 84]. Seine Funktion ist in Eukaryonten von enormer Bedeutung, da es Proteinstabilität vieler wichtiger Proteine sowohl positiv als auch negativ beeinflusst. Zum einen katalysiert es Proteinfaltung und stabilisiert Proteine, zum anderen führt es Proteine aber auch dem „protein degradation pathway“ zu [80].

In dieser Arbeit konnte bei Hsp90 Überexpression eine Verdopplung des Proteingehalts an Atgl in reifen Adipozyten festgestellt werden, was auf eine stabilisierende Funktion von Hsp90 auf Atgl hinweisen könnte. Bereits A. Zmugg beobachtete, dass bei steigender Menge an rekombinantem Hsp90 in COS-7 Zellen die Atgl stabilisiert werden konnte [84].

Trotz höherer Atgl Spiegel zeigten diese Adipozyten jedoch keinen Unterschied in ihrer basalen lipolytischen Aktivität, allerdings führte die Überexpression von Hsp90 unter Lipolyse stimulierten Bedingungen zu 10-15 % gesteigertem Atgl-vermitteltem TG-Abbau im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieser minimale physiologische Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der endogene Hsp90 Proteinlevel in den Zellen bereits sehr hoch ist. Taipale *et al.* beschrieben Hsp90 als ein Protein, welches schon in ungestressten Zellen 1-2% des Gesamtproteingehalts einnehmen kann [69]. Die zusätzliche Expression an rekombinantem Hsp90 müsste unter diesen Bedingungen nicht unbedingt ins Gewicht fallen.

Nguyen *et al.* konnten zeigen, dass Hsp90 die Proteinstabilität von Ppar $\gamma$  und damit die Adipogenese entscheidend beeinflusst. Sowohl Geldanamycin und Novobiocin verhinderten die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten, wobei Geldanamycin in hohen Konzentrationen auch die Sterblichkeit von Präadipozyten als auch von reifen Adipozyten erhöhte. Außerdem führte die Inhibierung von Hsp90 zur Störung des Hsp90-Ppar $\gamma$  Komplexes was vermehrten Abbau von Ppar $\gamma$  nach sich zog und die Expression der Ppar $\gamma$  „Target genes“ verringerte [15, 46]. Des Weiteren konnte im Mausmodell festgestellt werden, dass die Blockierung von Hsp90 durch Geldanamycin bei gleichzeitiger „high fat diet“ die angelegte Fettmenge signifikant reduzierte [15]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Blockierung von Hsp90 die Adipogenese entscheidend beeinflusst.

In dieser Arbeit konnte weder veränderte TG-Einlagerung noch signifikante Veränderungen des Expressionsmuster verschiedener Differenzierungsmarker festgestellt werden. Auch morphologisch unterschieden sich Hsp90 überexprimierende Zellen nicht von den Kontrollzellen. Da Hsp90 bereits von Natur aus sehr häufig in den Zellen vorkommt, ist hier anzunehmen, dass das Mehr an rekombinantem Hsp90 zu keinen messbaren Effekten führt.

Höchstwahrscheinlich könnten „knock down“ Experimente mittels siRNA aussagekräftigere Ergebnisse liefern. Erste Experimente mit Geldanamycin, welches Hsp90 selektiv inhibiert, senkte die lipolytische Aktivität in reifen Adipozyten und führte parallel dazu zur Reduktion des endogenen Atgl Spiegels. Dies deutet eine Destabilisierung der Atgl an (pers. Mitteilung, K. Preiß-Landl). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Hsp90 die Proteinstabilität der Atgl reguliert.

Auch ein „Knock-out“ von Hsp90 wäre eine weitere Möglichkeit die Rolle von Hsp90 in der Lipolyse und der Proteinstabilität von Atgl zu untersuchen. Allerdings muss hier mit Komplikationen bei eukaryontischen Zellmodellen gerechnet werden. Während Bardwell *et al.* feststellten, dass Hsp90 in *E. coli* überflüssig sei und nur zu einem milden temperatursensitiven Phänotypen führt, stellten Borkovich *et al.* und Hainzl *et al.* fest, dass eine Deletion der beiden Gene HSP82 und HSC82 für Hefe tödlich ist [7, 9, 30, 66]. Auch bei Mäusen führt ein genetischer Knockout von Hsp90 bereits in der Embryonalentwicklung zum Tod der Föten [74].

### 5.3 Die Rolle von 14-3-3 $\beta$ in der Lipolyse und der Adipogenese

In vorgegangenen TAP „screenings“ wurden mehrere Mitglieder der 14-3-3 Proteine als lipolysomale Proteine identifiziert. 14-3-3  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$  binden an die Atgl und 14-3-3  $\beta$  bindet an den Co-Aktivatoren Cgi-58, was auch durch nachfolgende Co-IP-Experimente nachgewiesen werden konnte [23, 33]. Zudem konnte M. Paar in SPAs zeigen, dass Atgl auch 14-3-3 $\beta$  bindet [51]. Damit scheint diese Proteinfamilie eine möglicherweise wichtige Position im Lipolysom zu besetzen, was auch die Proteomanalysen von LDs in *Drosophila* zeigen [10].

Die Familie der 14-3-3 Proteine ist ubiquitär und die einzelnen Isoformen binden an jene Proteine, die eine von zwei hochkonservierten Erkennungssequenzen beinhalten. Essentiell für die Bindung ist ein Phosphothreonin/-serin innerhalb der Erkennungssequenz. Über diese Protein-Protein Interaktion können sie ihre Partnerproteine in mehrerer Hinsicht beeinflussen, und zwar hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität, der intrazellulären Lokalisation und ihrer Stabilität [77].

Atgl beinhaltet mit Ser-406 eine Phosphorylierungsstelle, die sowohl durch AMPK als auch PKA phosphoryliert werden kann [1, 52]. Ahmadian *et al.* zeigten, dass eine Phosphorylierung von Ser-406 die TG-Hydrolyse *in vitro* und *in vivo* steigert [1]. Sowohl die Atgl der Maus als auch die Isoform Atgl-1 in *C. elegans* interagieren nachweislich mit 14-3-3 Proteinen über die Erkennungssequenzen 403-RAQpSLP-408 bzw. 301-RApSAN-305 [76, 83]. M. Paar zeigte in ihrer Arbeit, dass die Phosphorylierung von Ser-406 für die Interaktion der Atgl mit 14-3-3 $\beta$  essentiell ist. Beim Aminosäureaustausch von Ser-406 gegen Ala-406, wodurch die Phosphorylierung der Atgl in der 14-3-3 Erkennungssequenz verhindert wird, konnte reduzierte TG-Hydrolase Aktivität der *in vivo* beobachtet werden [51].

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch Cgi-58 eine Phosphorylierungsstelle beinhaltet. Es wurde nachgewiesen, dass Ser-239 bei Aktivierung der PKA phosphoryliert wird, Cgi-58 sich dadurch von Perilipin A am LD ablöst und auf diese Weise für die Aktivierung der Atgl verfügbar wird. Wurde Ser-239 gegen Glu-239 ersetzt, verblieb Cgi-58 am LD [62]. Obwohl sich dieses Ser-239 in einer 14-3-3 Erkennungssequenz befindet (236-RKYpSSMF-242) wurde die Verbindung zu 14-3-3-Proteinen nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte bei 14-3-3 $\beta$  Überexpression in OP9-K Zellen keine Wirkung auf TG-Einlagerung und den TG-Abbau gezeigt werden, obwohl sich der intrazelluläre Level an Cgi-

58 signifikant reduziert hatte. Parallel dazu zeigte sich allerdings auch eine Steigerung an intrazellulär verfügbarer Atgl, was die Verringerung des Co-Aktivatorspegel möglicherweise wieder ausgleichen könnte. Diese Daten stimmen nur zum Teil mit den Ergebnissen von M. Paar überein. Sie konnte zeigen, dass bei adenoviraler Überexpression von 14-3-3 $\beta$  in OP9 Zellen die Freisetzung von FS sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter Lipolyse stimulierenden Bedingungen um 50 % erhöht ist, der TG-Gehalt der Zellen aber letztendlich auch hier unverändert blieb. [51] In weiterer Folge versuchte M. Paar den Einfluss adenoviraler Überexpression von 14-3-3 $\beta$  in unterschiedlicher Fettzelllinien wie murine Präadipozyten (OP9), murine Fibroblasten 3T3-L1, humanen multipotenten Fettgewebe-abgeleiteten Stammzellen (hMADS) und humanen Simpson Golabi Behmel Syndrome Zellen (SGBS) den Einfluss von 14-3-3 zu untersuchen, brachte jedoch ebenfalls keine schlüssigen Ergebnisse [51]. Die vorerst nicht eindeutigen Daten könnten darauf zurückzuführen sein, dass mehrere Isoformen sowohl an die Atgl als auch an Cgi-58 binden und sich ein komplexes Zusammenspiel ergibt, das ein „fine tuning“ der Lipolyse ermöglicht. Möglicherweise wäre ein selektives aber auch kombiniertes „silencing“ der unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen in dieser Frage zielführender.

Wie in zahlreichen Publikationen beschrieben, ist die Aktivierung der 14-3-3 Proteine Insulin-abhängig [11, 14, 18, 55, 56, 59]. 14-3-3 Proteine könnten hauptsächlich vor dem Fasten bzw. in der „Re-feeding“ Phase, wo Insulin und Zucker in hoher Konzentration vorliegen, aktiv sein. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben eines Effekts könnte daher die Tatsache sein, dass die Messung der Lipolyse erst am Tag 6 und *nach 24 Stunden „Insulin starving“* stattfand. Durch dieses künstlich herbeigeführte Fasten, kommt es zur Aktivierung der AMPK und einer Änderung der Phosphorylierungen bei vielen Proteinen. Cotelle *et al.* konnten außerdem in pflanzlichen Zellen nachweisen, dass die 14-3-3 Bindung an Targetproteine unter Zuckerentzug verschwand und erst *mehrere* Stunden nach Vorhandensein von Zucker wieder auftrat [14]. Vielleicht ist es auch in tierischen Zellen der Fall, dass 14-3-3 Proteine nur in Anwesenheit von Insulin und Zucker an ihre Targetproteine binden, während sie nach „Insulin starving“ durch veränderten Metabolismus/Phosphorylierungen die Affinität zu ihren Targetproteinen im Lipolysom verlieren. In Folgeversuchen sollten die intrazellulären Cgi-58 und Atgl Levels bis inklusive Tag 6 erfasst und die lipolytische Aktivität ohne vorangegangenen „Insulin starving“ gemessen werden.

## 6. Quellen

1. Ahmadian, M. *et al.* Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell metabolism* **13**, 739–48 (2011).
2. Aitken, A. 14-3-3 proteins: a historic overview. *Seminars in cancer biology* **16**, 162–72 (2006).
3. Akiyama, M. *et al.* CGI-58 Is an  $\alpha/\beta$ -Hydrolase within Lipid Transporting Lamellar Granules of Differentiated Keratinocytes. *The American Journal of Pathology* **173**, 1349–1360 (2008).
4. Andrews, D. L., Beames, B., Summers, M. D. & Park, W. D. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *The Biochemical journal* **252**, 199–206 (1988).
5. Ayers, S. D., Nedrow, K. L., Gillilan, R. E. & Noy, N. Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPARgamma by FABP4. *Biochemistry* **46**, 6744–6752 (2007).
6. Badin, P. M., Langin, D. & Moro, C. Dynamics of skeletal muscle lipid pools. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **24**, 607–615 (2013).
7. Bardwell, J. C. & Craig, E. A. Ancient heat shock gene is dispensable. *Journal of bacteriology* **170**, 2977–83 (1988).
8. Bock, H. *et al.* Changes in Brain 14-3-3 Proteins in Response to Insulin Resistance Induced by a High Palatable Diet. *Molecular neurobiology* **52**, 710–8 (2015).
9. Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J. & Lindquist, S. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and cellular biology* **9**, 3919–30 (1989).
10. Cermelli, S., Guo, Y., Gross, S. P. & Welte, M. A. The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Current biology : CB* **16**, 1783–95 (2006).
11. Chen, Q. *et al.* GARNL1, a major RalGAP  $\alpha$  subunit in skeletal muscle, regulates insulin-stimulated RalA activation and GLUT4 trafficking via interaction with 14-3-3 proteins. *Cellular signalling* **26**, 1636–48 (2014).
12. Chmurzyńska, A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of applied genetics* **47**, 39–48 (2006).
13. Choromańska, B., Myśliwiec, P., Dadan, J., Hady, H. & Chabowski, A. The clinical significance of fatty acid binding proteins. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **65**, 759–763 (2011).
14. Cotelle, V. *et al.* 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *The EMBO journal* **19**, 2869–2876 (2000).

15. Desarzens, S., Liao, W.-H., Mammi, C., Caprio, M. & Faresse, N. Hsp90 blockers inhibit adipocyte differentiation and fat mass accumulation. *PLoS one* **9**, e94127 (2014).
16. Diaz, C. *et al.* Determining novel functions of Arabidopsis 14-3-3 proteins in central metabolic processes. *BMC systems biology* **5**, 192 (2011).
17. Doğanay, M. *et al.* Associations between adipocyte fatty acid-binding protein and clinical parameters in polycystic ovary syndrome. *Archives of gynecology and obstetrics* **291**, 447–50 (2015).
18. Dubois, F. *et al.* Differential 14-3-3 affinity capture reveals new downstream targets of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **8**, 2487–99 (2009).
19. Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E. & Sul, H. S. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual review of nutrition* **27**, 79–101 (2007).
20. Duncan, R. E. *et al.* Characterization of desnutrin functional domains: critical residues for triacylglycerol hydrolysis in cultured cells. *Journal of lipid research* **51**, 309–17 (2010).
21. Ellong, E. N. *et al.* Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the Arf1 activator GBF1. *PLoS one* **6**, e21889 (2011).
22. Ertunc, M. E. *et al.* Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. *Journal of lipid research* **56**, 423–34 (2015).
23. Feiler, U. Ursula Feiler Characterization of novel interaction partners of Comparative Gene Identification-58 ( CGI-58 ). **58**, (Karl-Franzens Universität Graz, 2014).
24. Fischer, J. *et al.* The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nature genetics* **39**, 28–30 (2007).
25. Foote, M., Qiao, H., Graham, K., Wu, Y. & Zhou, Y. Inhibition of 14-3-3 Proteins Leads to Schizophrenia-Related Behavioral Phenotypes and Synaptic Defects in Mice. *Biological psychiatry* (2015). doi:10.1016/j.biopsych.2015.02.015
26. Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K. & Miura, T. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights. Cardiology* **8**, 23–33 (2014).
27. G1. Gregoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783–809 (1998). regoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews* **78**, 783–809 (1998).
28. Gusarova, V., Caplan, A. J., Brodsky, J. L. & Fisher, E. A. Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *The Journal of biological chemistry* **276**, 24891–900 (2001).

29. Haemmerle, G. *et al.* Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *The Journal of biological chemistry* **277**, 4806–15 (2002).
30. Hainzl, O., Lapina, M. C., Buchner, J. & Richter, K. The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 22559–22567 (2009).
31. Heckmann, B. L., Zhang, X., Xie, X. & Liu, J. The G0/G1 switch gene 2 (G0S2): regulating metabolism and beyond. *Biochimica et biophysica acta* **1831**, 276–81 (2013).
32. Hofer, P. (MSc). Molecular characterization of the lipolysome. (Karl-Franzens Univesität Graz, 2015).
33. Hofer, P. *et al.* Fatty acid-binding proteins interact with comparative gene identification-58 linking lipolysis with lipid ligand shuttling. *Journal of Biological Chemistry* jbc.M114.628958 (2015). doi:10.1074/jbc.M114.628958
34. Jenkins, C. M. *et al.* Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *The Journal of biological chemistry* **279**, 48968–75 (2004).
35. Johnson, C. *et al.* Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *The Biochemical journal* **427**, 69–78 (2010).
36. Lane, J. M., Doyle, J. R., Fortin, J.-P., Kopin, A. S. & Ordovás, J. M. Development of an OP9 derived cell line as a robust model to rapidly study adipocyte differentiation. *PloS one* **9**, e112123 (2014).
37. Lass, A. *et al.* Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell metabolism* **3**, 309–19 (2006).
38. Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. & Zechner, R. Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in Lipid Research* **50**, 14–27 (2011).
39. Lee, J. N. *et al.* Identification of Ubx8 protein as a sensor for unsaturated fatty acids and regulator of triglyceride synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21424–9 (2010).
40. Lefèvre, C. *et al.* Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *American journal of human genetics* **69**, 1002–12 (2001).
41. Li, J., Soroka, J. & Buchner, J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1823**, 624–635 (2012).

42. Li, Y., Zhang, T., Schwartz, S. J. & Sun, D. New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: Mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resistance Updates* **12**, 17–27 (2009).
43. Lottersberger, F., Panza, A., Lucchini, G., Piatti, S. & Longhese, M. P. The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins are required for the G1/S transition, actin cytoskeleton organization and cell wall integrity. *Genetics* **173**, 661–75 (2006).
44. Lu, X., Yang, X. & Liu, J. Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and GOS2. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **9**, 2719–25 (2010).
45. Mandal, A. K. *et al.* Cdc37 has distinct roles in protein kinase quality control that protect nascent chains from degradation and promote posttranslational maturation. *The Journal of cell biology* **176**, 319–28 (2007).
46. Nguyen, M. T., Csermely, P. & Sőti, C. Hsp90 chaperones PPAR $\gamma$  and regulates differentiation and survival of 3T3-L1 adipocytes. *Cell death and differentiation* **20**, 1654–63 (2013).
47. Oberer, M., Boeszoermenyi, A., Nagy, H. M. & Zechner, R. Recent insights into the structure and function of comparative gene identification-58. *Current opinion in lipidology* **22**, 149–58 (2011).
48. Obsilova, V. *et al.* Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **63 Suppl 1**, S155–64 (2014).
49. Ogasawara, J. *et al.* The Molecular Mechanism Underlying Continuous Exercise Training-Induced Adaptive Changes of Lipolysis in White Adipose Cells. *Journal of obesity* **2015**, 473430
50. Okimoto, T., Friedmann, T. & Miyanojara, A. VSV-G envelope glycoprotein forms complexes with plasmid DNA and MLV retrovirus-like particles in cell-free conditions and enhances DNA transfection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **4**, 232–8 (2001).
51. Paar, M. M. Fat under control : The Role of 14-3-3 Proteins and Acyl-CoA in the Regulation of Lipolysis Dissertation For the Degree of Doctor of Natural Sciences. (Karl-Franzens Universität Graz, 2012).
52. Pagnon, J. *et al.* Identification and functional characterization of protein kinase A phosphorylation sites in the major lipolytic protein, adipose triglyceride lipase. *Endocrinology* **153**, 4278–89 (2012).
53. Panaretou, B. *et al.* ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *The EMBO journal* **17**, 4829–36 (1998).

54. Paul, A.-L., Denison, F. C., Schultz, E. R., Zupanska, A. K. & Ferl, R. J. 14-3-3 phosphoprotein interaction networks - does isoform diversity present functional interaction specification? *Frontiers in plant science* **3**, 190 (2012).
55. Pehmøller, C. *et al.* Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **297**, E665–75 (2009).
56. Péterfy, M., Harris, T. E., Fujita, N. & Reue, K. Insulin-stimulated interaction with 14-3-3 promotes cytoplasmic localization of lipin-1 in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 3857–3864 (2010).
57. Pozuelo-Rubio, M. Regulation of autophagic activity by 14-3-3 $\zeta$  proteins associated with class III phosphatidylinositol-3-kinase. *Cell death and differentiation* **18**, 479–92 (2011).
58. Radner, F. P. W. *et al.* Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and lethal skin barrier defect in mice lacking comparative gene identification-58 (CGI-58). *The Journal of biological chemistry* **285**, 7300–11 (2010).
59. Ramm, G., Larance, M., Guilhaus, M. & James, D. E. A role for 14-3-3 in insulin-stimulated GLUT4 translocation through its interaction with the RabGAP AS160. *The Journal of biological chemistry* **281**, 29174–80 (2006).
60. Rogue, A., Spire, C., Brun, M., Claude, N. & Guillouzo, A. Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver. *PPAR research* **2010**, 325183 (2010).
61. Russell, L. & Forsdyke, D. R. A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene containing a CpG-rich island encodes a small basic protein with the potential to be phosphorylated. *DNA and cell biology* **10**, 581–91 (1991).
62. Sahu-Osen, A. *et al.* CGI-58/ABHD5 is phosphorylated on Ser239 by protein kinase A: control of subcellular localization. *Journal of lipid research* **56**, 109–21 (2015).
63. Schulz, T. J. & Tseng, Y.-H. Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond. *The Biochemical journal* **453**, 167–78 (2013).
64. Schweiger, M., Lass, A., Zimmermann, R., Eichmann, T. O. & Zechner, R. Neutral lipid storage disease : genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase / PNPLA2 or CGI-58 / ABHD5. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E289–E296 (2009).
65. Slone, S. R., Lavalley, N., McFerrin, M., Wang, B. & Yacoubian, T. A. Increased 14-3-3 phosphorylation observed in Parkinson's disease reduces neuroprotective potential of 14-3-3 proteins. *Neurobiology of disease* **79**, 1–13 (2015).
66. Solit, D. B. & Chiosis, G. Development and application of Hsp90 inhibitors. *Drug Discovery Today* **13**, 38–43 (2008).

67. Sorrell, D. A. *et al.* The Arabidopsis 14-3-3 protein, GF14omega, binds to the *Schizosaccharomyces pombe* Cdc25 phosphatase and rescues checkpoint defects in the rad24- mutant. *Planta* **218**, 50–7 (2003).
68. Subramanian, V. *et al.* Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 42062–42071 (2004).
69. Taipale, M., Jarosz, D. F. & Lindquist, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 515–28 (2010).
70. Tang, Q. Q. & Lane, M. D. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annual Review of Biochemistry* **81**, 715–736 (2012).
71. Theodoraki, M. A. & Caplan, A. J. Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 683–8 (2012).
72. van Heusden, G. P. H., van der Zanden, A. L., Ferl, R. J. & Steensma, H. Y. Four Arabidopsis thaliana 14-3-3 protein isoforms can complement the lethal yeast bmh1 bmh2 double disruption. *FEBS Letters* **391**, 252–256 (1996).
73. Villena, J. A. *et al.* Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: Ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47066–47075 (2004).
74. Voss, a K., Thomas, T. & Gruss, P. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development (Cambridge, England)* **127**, 1–11 (2000).
75. Wu, L. E. *et al.* Identification of fatty acid binding protein 4 as an adipokine that regulates insulin secretion during obesity. *Molecular metabolism* **3**, 465–73 (2014).
76. Xie, M. & Roy, R. AMP-Activated Kinase Regulates Lipid Droplet Localization and Stability of Adipose Triglyceride Lipase in *C. elegans* Dauer Larvae. *Plos One* **10**, e0130480 (2015).
77. Yaffe, M. B. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS letters* **513**, 53–7 (2002).
78. Yaffe, M. B. *et al.* The Structural Basis for 14-3-3:Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* **91**, 961–971 (1997).
79. Yamaguchi, T., Omatsu, N., Matsushita, S. & Osumi, T. CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *The Journal of biological chemistry* **279**, 30490–7 (2004).

80. Yang, C. *et al.* Histone deacetylase inhibitors increase glucocerebrosidase activity in Gaucher disease by modulation of molecular chaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 966–71 (2013).
81. Ye, R. & Scherer, P. E. Fabp4, a new player in the adipo-pancreatic axis. *Molecular metabolism* **3**, 347–8 (2014).
82. Zannis-Hadjopoulos, M., Yahyaoui, W. & Callejo, M. 14-3-3 cruciform-binding proteins as regulators of eukaryotic DNA replication. *Trends in biochemical sciences* **33**, 44–50 (2008).
83. Zimmermann, R. *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science (New York, N.Y.)* **306**, 1383–6 (2004).
84. Zmugg, A. Charakterisierung potentieller ATGL-Interaktionspartner. (Karl-Franzens Universität Graz, 2015).