

Raimund Holly

Die Rolle des *ancient ubiquitous protein 1* und des *pancreatic lipase-related protein 2/colipase* in der Lipid-Homöostase

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades  
Master of Science



**Begutachter**

Assoz. Univ.-Prof. Dr. Achim Lass  
Institut für Molekulare Biowissenschaften  
Karl-Franzens-Universität Graz  
2014

## EIDESSTÄTTLICHE 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.

Graz, am .....

.....  
(Unterschrift)

# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, die mir in den letzten Monaten zur Seite gestanden sind und mich tatkräftig unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Achim Lass danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und seine Geduld und dafür, dass er mir einen wertvollen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht hat.

Großen Dank schulde ich Ulrike Taschler, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mir vor allem bei den Aktivitätsassays, die im Rahmen dieser Arbeit anfielen, stets unterstützend zur Seite stand und für die zahlreichen freundschaftlichen Gespräche, die sie mit mir geführt hat.

Weiters danke ich Christoph Heier, Matthias Romauch, Thomas Eichmann und Sabrina Hütter, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und mich besonders bei der praktischen Arbeit im Labor unterstützt haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Biowissenschaften danke ich für die herzliche Aufnahme in ihr Team für den kurzen Zeitraum dieser Arbeit und für die vielen Vorschläge und konstruktiven Diskussionen, die für das Gelingen von meinen Experimenten von großer Bedeutung waren.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre langjährige finanzielle Unterstützung.

# KURZFASSUNG

Vitamin A ist für die Zelldifferenzierung, den Sehvorgang und das Immunsystem in Säugetieren essentiell. Es wird in Form von Retinylester in Lipidtropfen (LD) von hepatischen Sternzellen (HSC) gespeichert. Das ubiquitär vorkommende Protein AUP1 (*ancient ubiquitous protein 1*) wurde in voneinander unabhängigen Proteomstudien mehrfach an LD von HSC gefunden. Studien haben bislang gezeigt, dass die Menge an AUP1 in der Zelle mit der abgespeicherten TAG-Menge in LD korreliert. Retinylester-Hydrolasen (REH) sind für die Mobilisierung der gespeicherten Retinylester verantwortlich. Im Pankreassekret finden sich zahlreiche Lipasen, unter anderem das Pankreatische Lipase-verwandte Protein 2 (PLRP2), das sowohl Triacylglyceride (TAG) als auch Retinylester (RE) hydrolysieren kann. 2011 wurde berichtet, dass das murine PLRP2 und seine Colipase (CLPS) eine Rolle in der Hydrolyse von Retinylester in der Mausleber spielen. Weiters wurde gezeigt, dass die Expression von PLRP2 und CLPS in hepatischen Sternzellen durch Dunkelheit und Vitamin A-Mangel induziert wird. Bislang ist unbekannt, ob PLRP2 als eine intrazelluläre REH fungieren kann. Das Ziel dieser Arbeit war, die Rolle von AUP1 und PLRP2/CLPS in der zellulären TAG- und RE- Hydrolyse zu untersuchen.

Experimente ergaben, dass AUP1 eine ubiquitäre Expression in allen Mausgeweben aufweist. Diese Expression wurde nicht durch den Fütterungszustand der Maus beeinflusst. Weiters zeigte AUP1 in *in vivo* und *in vitro* Experimenten keinen Einfluss auf die TAG-Hydrolyse und TAG-Akkumulation. PLRP2 zeigte in Hydrolase-Assays Aktivitäten gegenüber TAG, Monoacylglyceride, RE und Phospholipiden als Substrat. Die Aktivitäten konnten im Falle von TAG und RE durch Zugabe von CLPS gesteigert werden. Im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen konnte die Expression von PLRP2 in der Leber von Vitamin A-defizienten Mäusen und in kultivierten hepatischen Sternzellen (HSC-T6) nicht nachgewiesen werden. In einem Zellfraktionierungsexperiment wurde PLRP2 im Membrananteil detektiert. Eine Sekretion von PLRP2 in COS-7 Zellen konnte nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend spielt AUP1 in der Lipolyse vermutlich keine Rolle. Die physiologische Rolle von PLRP2 beschränkt sich vermutlich aufgrund seiner hohen TAG-Hydrolyseaktivität und Aktivierbarkeit durch Gallensalze und Colipase auf die Hydrolyse von Nahrungsfetten im Intestinum.

# ABSTRACT

In mammals, vitamin A is essential for the development and the maintenance of a healthy organism. Vitamin A is stored as retinyl ester (RE) in large quantities in specialized cells of the liver, the hepatic stellate cells. Accessibility and distribution of dietary REs as well as the mobilization of intracellular RE stores requires enzymatic activities, so called RE hydrolases (REHs). Like the classical secretory protein pancreatic triglyceride lipase (PTL), the pancreatic lipase-related protein 2 (PLRP2), also cleaves triglycerides and REs. In 2011 PLRP2 and its colipase (CLPS) has been reported to be involved in the hydrolysis of REs in the mouse liver. Interestingly, PLRP2 and CLPS expression in hepatic stellate cells was found to be induced by constant darkness and vitamin A-free diet. However, it is unknown whether murine PLRP2 is intracellularly active and responsible for RE hydrolysis in hepatic stellate cells. Furthermore, in a proteomic approach we found ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) as a hepatic stellate cell lipid droplet protein. Yet, its function in neutral lipid catabolism is unclear. The aim of the current work was to study the role of PLRP2/CLPS and AUP1 in cellular triglyceride (TAG) and RE hydrolysis.

Murine AUP1, PLRP2 and CLPS were cloned and overexpressed in COS-7 cells and cell lysates prepared for activity assays. The effect of AUP1 on TAG hydrolysis was studied *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, gene expression of AUP1 was studied by northern blot analysis. PLRP2 protein expression was determined by western blotting. Cell lysates of PLRP2 and CLPS were subjected to TAG and retinyl palmitate (RP) hydrolase activity assays using TAG and RE micelles as substrate and in the presence or absence of cholate.

AUP1 was found to be ubiquitously expressed in mice and its expression not to be regulated by feeding/fasting. AUP1 neither showed regulatory impact on TAG hydrolysis in *in vitro* assay nor on cellular TAG content. In contrast to reports in the literature, PLRP2 was found to be expressed in various tissues. PLRP2 hydrolyzed TAG and RE as substrates in a CLPS-dependent manner and its activity was stimulated by the addition of cholate.

In summary, data indicate that AUP1 does not affect cellular TAG catabolism. Furthermore, PLRP2 exhibits TAG and RP hydrolytic activity but a role of PLRP2 in intracellular retinol mobilization is unlikely.

# INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung .....	1
1.1.	Verdauung, Mobilisierung und Transport von Lipiden.....	1
1.2.	Triacylglycerid-Stoffwechsel.....	2
1.2.1.	Fettgewebe-Speicherung.....	2
1.2.2.	Lipolyse und lipolytische Lipasen .....	3
1.2.2.1.	<i>Adipose Triglyceride Lipase – ATGL</i> .....	4
1.2.2.2.	<i>Hormonsensitive Lipase – HSL</i> .....	4
1.2.2.3.	<i>Monoglycerid Lipase – MGL</i> .....	4
1.2.3.	Regulation der Lipolyse.....	5
1.2.3.1.	<i>Regulation der ATGL: Koaktivierung durch CGI-58</i> .....	5
1.2.3.2.	<i>Regulation der ATGL: Inhibition durch G0S2</i> .....	5
1.2.3.3.	<i>HSL Regulation durch Phosphorylierung</i> .....	5
1.2.3.4.	<i>HSL Regulation durch Protein-Protein Interaktion</i> .....	6
1.2.3.5.	<i>MGL Regulation</i> .....	6
1.2.4.	<i>Ancient Ubiquitous Protein 1 - AUP1</i> .....	6
1.3.	Vitamin A – Stoffwechsel.....	7
1.3.1.	Retinoid-Aufnahme und Prozessierung in Enterocyten.....	7
1.3.2.	Speicherung von Retinol in der Leber .....	8
1.3.3.	Vitamin A – Mobilisierung und Bildung von Retinsäure .....	8
1.3.4.	Regulation.....	9
1.3.5.	<i>Pancreatic Lipase-related Protein 2 - PLRP2</i> .....	10
1.4.	Ziel der Masterarbeit .....	10
2.	Materialien und Methoden .....	11
2.1.	Materialien .....	11
2.1.1.	Chemikalien.....	11
2.1.2.	Puffer und Lösungen.....	11
2.1.3.	Medien.....	12
2.1.4.	Primer – AUP1 .....	13
1.1.1.	Primer – PLRP2/CLPS.....	13
1.1.2.	Plasmide .....	14
1.1.3.	Antikörper .....	15
2.2.	Methoden .....	16

2.2.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	16
2.2.2.	Agarosegelelektrophorese .....	17
2.2.3.	Elution von DNA aus Agarosegelen .....	17
2.2.4.	Restriktionsverdau von DNA .....	17
2.2.5.	Ligation .....	18
2.2.6.	Transformation prokaryontischer Zellen .....	18
2.2.6.1.	<i>Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen</i> .....	18
2.2.6.2.	<i>Transformation chemisch-kompetenter Zellen</i> .....	19
2.2.6.3.	<i>Erstellung von elektro-kompetente Zellen</i> .....	19
2.2.6.4.	<i>Transformation elektro-kompetenter Zellen</i> .....	19
2.2.7.	Präparation von Plasmid-DNA .....	20
2.2.7.1.	<i>Plasmidpräparation im Kleinstmaßstab - Miniprep</i> .....	20
2.2.7.2.	<i>Plasmidpräparation im Großmaßstab - Maxiprep</i> .....	20
2.2.8.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	21
2.2.9.	Western Blot .....	22
2.2.10.	Proteinbestimmung .....	22
2.2.10.1.	<i>Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)</i> .....	23
2.2.10.2.	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i> .....	23
2.2.11.	Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Mausgeweben .....	23
2.2.12.	cDNA Synthese .....	24
2.2.13.	Northern Blot .....	25
2.2.14.	Verwendete Zelllinien .....	25
2.2.15.	Passagieren von COS-7 Zellen .....	26
2.2.16.	Aussäen von COS-7 .....	26
2.2.17.	Transfektion von COS-7 Zellen .....	27
2.2.18.	Komplexierung von Ölsäure mit BSA .....	27
2.2.19.	Einbau von Triacylglyceriden in COS-7 Zellen .....	27
2.2.20.	Bestimmung des Triacylglyceridgehalts von COS-7 Zellen .....	27
2.2.21.	Präparation eines Zelllysates .....	28
2.2.22.	Fraktionierung und Isolierung von LD aus Zelllysaten von COS-7 Zellen .....	28
2.2.23.	Triacylglycerid-Hydrolase-Assay .....	29
2.2.24.	Retinylester-Hydrolase-Assay .....	30
2.2.25.	Phospholipid-Hydrolase Assay .....	31
2.2.26.	Monoacylglycerid-Hydrolase Assay .....	31
2.2.27.	Statistische Auswertung .....	32
3.	Resultate – AUP1 .....	33

3.1.	Klonierung von AUP1 in pcDNA/HisMax <sup>®</sup> und Expression in COS-7 Zellen .....	33
3.1.1.	PCR zur Amplifizierung von AUP1 .....	33
3.1.2.	Klonierung und Restriktionsanalyse .....	34
3.1.3.	Expression von AUP1 in COS-7 Zellen .....	35
3.2.	Untersuchung der Expression von AUP1 in verschiedenen Mausgeweben .....	35
3.3.	Effekt von AUP1 auf den zellulären TAG-Gehalt von COS-7 Zellen .....	37
3.4.	Effekt von AUP1 auf die enzymatische Aktivität von Lipasen .....	38
4.	Resultate – PLRP2 .....	40
4.1.	Klonierung von PLRP2 in pFLAG-CMV-5.1 und Expression in COS-7 Zellen.....	40
4.1.1.	PCR zur Klonierung von PLRP2 und CLPS .....	40
4.1.2.	Klonierung und Restriktionsanalyse .....	41
4.2.	Experimente zur Substratspezifität, Aktivierung durch CLPS und Effekt von Gallensäure auf die Aktivität von PLRP2 .....	42
4.2.1.	Bestimmung der Triacylglycerid (TAG)-Hydrolase-Aktivität .....	43
4.2.2.	Bestimmung der Retinylester (RE)-Hydrolase-Aktivität .....	44
4.2.3.	Bestimmung der Monoacylglycerid (MAG)-Hydrolase-Aktivität.....	45
4.2.4.	Bestimmung der Phospholipid (PL)-Hydrolase-Aktivität .....	45
4.2.5.	Bestimmung der Bis(monoacylglycerophosphat(BMP)-Hydrolase-Aktivität .....	47
4.3.	Expressionsmuster von PLRP2 in Mausgeweben .....	48
4.3.1.	Expression von PLRP2 in verschiedenen Mausgeweben.....	48
4.3.2.	Überprüfung des Expressionsnachweises mittels Aktivitätstests.....	49
4.3.3.	Expression von PLRP2 in HSC-T6 Zellen .....	50
4.4.	Intrazelluläre Lokalisation und Sekretion von PLRP2 .....	51
4.4.1.	Untersuchung der Sekretion von PLRP2.....	51
4.4.2.	Intrazelluläre Lokalisation von PLRP2.....	52
5.	Diskussion .....	53
5.1.	AUP1 – Regulator der Lipolyse? .....	53
5.2.	PLRP2 – eine intrazelluläre REH?.....	54
5.3.	Zusammenfassung.....	56
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	57
7.	Literaturverzeichnis .....	60

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Verdauung, Mobilisierung und Transport von Lipiden

Lipide besitzen in Wirbeltiere wichtige Funktionen in der Bildung von Membranen, Energiespeicherung und Signalübertragung. Fettsäuren (FA) können über die Nahrung aufgenommen, oder durch Umwandlung von überschüssigen Kohlenhydraten synthetisiert werden. Der Anteil an FA, der nicht zur Energiegewinnung oder zum Aufbau von Membranen benötigt wird, wird in Lipidtröpfchen („lipid droplets“, Lipidkörper, LD) im Cytosol in Form von Triacylglyceride (TAG) gespeichert.<sup>1</sup> Die TAG-Speicherung ist ein essentieller Prozess und erfolgt in allen Zellen. Fettzellen (Adipocyten) unterscheiden sich von anderen dadurch, dass diese FA sekretieren, welche somit dem gesamten Organismus zur Verfügung stehen.<sup>2</sup> Einige Organe, wie zum Beispiel Leber, Herz und Skelettmuskeln beziehen im Ruhezustand mehr als die Hälfte ihrer Energie aus TAG.<sup>1</sup>

In Wirbeltieren müssen die Nahrungsfette im Dünndarm resorbiert werden. Diese bestehen aus verschiedenen Lipidklassen, die sich in ihrer Hydrophobizität stark unterscheiden. TAG und Retinylester (RE) sind hydrophob und können nicht durch die Zellmembran transportiert werden und müssen vor ihrer Aufnahme durch Lipasen in weniger hydrophobe Verbindungen gespalten werden.<sup>3</sup> Gallensalze wirken dabei als Detergenzien und helfen die Lipide zu solubilisieren. Dieser Prozess ermöglicht die Spaltung von Lipidspezies durch Lipasen im Dünndarm. Unter anderem entstehen als Spaltprodukte Mono- und Diacylglyceride, FA, Retinol (Vitamin A) und Glycerol. Diese Produkte können von Epithelzellen der Darmwand (Enterocyten) aufgenommen werden. In den Enterocyten werden die Spaltprodukte wieder zu TAG und RE verestert und mit Cholesterin aus der Nahrung, Apolipoproteinen und Phospholipiden (PL) zu Chylomikronen verpackt und in die Lymphe sezerniert.<sup>4</sup> Über den Blutkreislauf werden die Chylomikronen zu den Muskel- und Fettgeweben transportiert.<sup>1</sup> Chylomikronen sind zu groß, um aus Kapillaren ins umliegende Gewebe übertreten zu können. Somit müssen die TAG intravaskulär gespalten werden.<sup>5</sup> Diese Aufgabe wird von der Lipoprotein-Lipase (LPL) durchgeführt, die von Myocyten und Adipocyten sezerniert wird. Für den Transport von LPL in das Lumen der Kapillaren ist vermutlich das erst kürzlich entdeckte *glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoproteinbinding protein 1* (GPIHBP1) verantwortlich.<sup>6</sup> Der Prozess des Abbaus von TAGs wird als Lipolyse bezeichnet.<sup>7</sup> Die Spaltprodukte (Fettsäuren und Glycerol) können von den

Zielzellen aufgenommen werden. Muskelzellen oxidieren zur Energiegewinnung die FA, Zellen des Fettgewebes bauen erneut TAG auf und speichern dieses, bis es benötigt wird. Die Chylomikronen werden in den Kapillaren durch diese Prozesse zu Chylomikronen-Remnants reduziert, die nun einen höheren relativen Anteil an Cholesterinester besitzen. Die RE sind noch Teil dieser Chylomikronen-Remnants, die zur Leber transportiert und aufgenommen werden.<sup>8</sup> Die Leber ist ein wichtiges Organ für den TAG Metabolismus sowie das Hauptspeicherorgan für Vitamin A.<sup>9</sup>

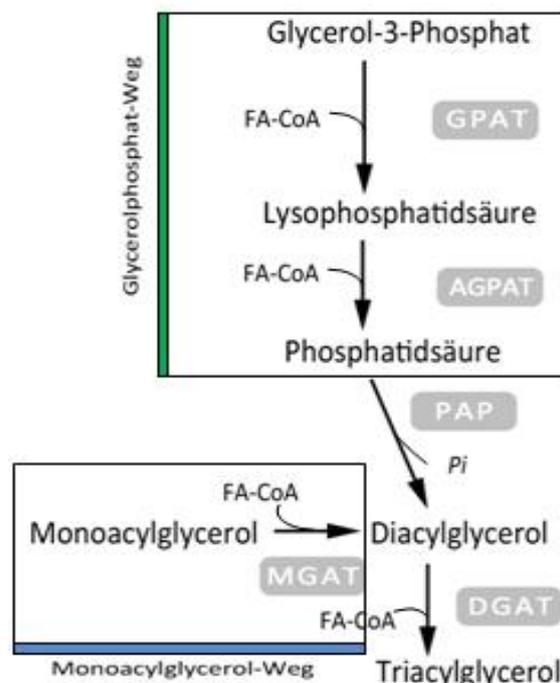
## 1.2. Triacylglycerid-Stoffwechsel

Im folgenden Abschnitt wird genauer auf die Besonderheiten des Triacylglycerid-Stoffwechsels eingegangen.

### 1.2.1. Fettgewebe-Speicherung

TAG sind Neutrallipide, bestehend aus einem Glycerolrückgrat und drei veresterten FA. Damit bilden die TAG den Hauptspeicher für FA, die für die Energiegewinnung oder die Bildung von PL herangezogen werden können. Vorteile der Speicherung von TAG ist die höhere Energieausbeute bei der Oxidation von FA und die Hydrophobizität der TAG. Da Triacylglyceride hydrophob sind und nicht hydratisiert sind, fällt das zusätzliche Gewicht durch Hydratwasser weg.<sup>1</sup>

Im Folgenden werden die zwei wesentlichen Stoffwechselwege zur Entstehung von TAG beschrieben. Dabei handelt es sich um den Glycerolphosphat-Weg und den Monoacylglycerid- (MAG-) Weg.<sup>10</sup> Abbildung 1 zeigt den Verlauf beider Synthesewege.

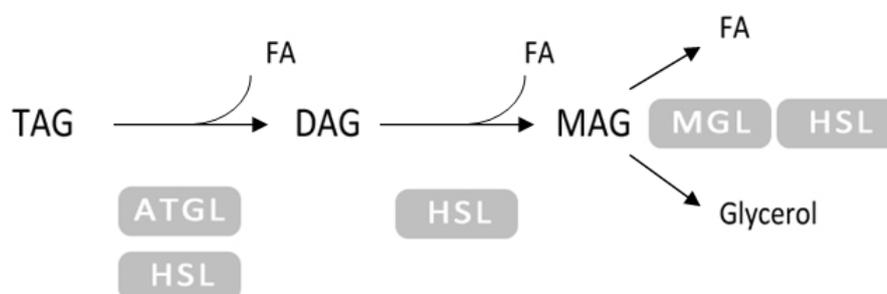


**Abbildung 1 Synthese von Triacylglyceride** Die Bildung von Triacylglyceride ist ein mehrstufiger Syntheseweg. Abkürzungen: GPAT = Glycerolphosphat-Acyltransferase; AGPAT= Acylglycerolphosphate-Acyltransferase; PAP=Phosphatidsäure-Phosphohydrolase; MGAT=Acyl-CoA:Monoacylglycerid-Acyltransferase; DGAT=Diacylglycerid-Acyltransferase; FA-CoA=Fettsäure-Coenzym A

Beide Wege verwenden aktivierte FA in Form von Acyl-Coenzym A (CoA) für den Transfer der Fettsäuren auf Glycerol beziehungsweise Monoacylglycerid.<sup>11</sup> Im Gegensatz zum Glycerolphosphat-Pathway findet man den MAG-Pathway lediglich in spezifischen Zelltypen, wie Enterocyten, Hepatocyten und Adipocyten, wo TAG aus Komponenten hydrolysiertes Nahrungsfette synthetisiert werden.<sup>12,13</sup> Glycerol-3-Phosphat, das aus der Glykolyse entstammt, wird in den ersten beiden Schritten durch Acyltransferasen an den beiden freien Hydroxylgruppen acyliert. Die dafür benötigten FA-CoA Moleküle werden durch die Acyl-CoA-Synthetase aus Fettsäuren und CoA gebildet. Als Produkt entsteht Diacylglycerid-3-phosphat (Phosphatidsäure). Im nächsten Schritt wird Diacylglycerid-3-phosphat durch die Phosphatidsäure-Phosphatase dephosphoriliert. Es entsteht 1,2-Diacylglycerid. Der letzte Schritt beider Stoffwechselwege wird vom gleichen Enzym katalysiert, der Acyl-CoA:Diacylglycerid Acyltransferase (DGAT). DGAT katalysiert den Transfer einer FA von Acyl-CoA auf ein Diacylglycerid (DAG).<sup>14</sup> Die Bildung von TAG findet am Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Anschließend werden die TAG in LD abgespeichert. LD bilden den Lipid-Hauptspeicher in eukaryontischen Zellen. In Säugetierzellen sind LD aus einem Kern an Neutrallipiden, hauptsächlich TAG und Cholesterinester (CE), aufgebaut, der von einer einschichtigen Phospholipidmembran mit eingelagerten Proteinen umhüllt ist.<sup>15</sup>

### 1.2.2. Lipolyse und lipolytische Lipasen

Während Nahrungsmangel oder Stress wird der Prozess der Lipolyse in Adipocyten angeschaltet. Es werden FA und Glycerol in den Blutkreislauf sekretiert und dienen als Energiequelle für Muskelgewebe oder werden von der Leber aufgenommen und oxidiert, verestert oder in Ketonkörper umgewandelt. Die Lipolyse wird von mindestens drei Enzymen



**Abbildung 2 Schematische Darstellung der Lipolyse** Die Enzyme der Lipolyse spalten jeweils eine Fettsäure (FA) ab. Aus einem Triacylglycerid (TAG) entstehen somit 3 FA und ein Glycerol. Akürzungen: ATGL=Adipose Triacylglycerid Lipase; DAG=Diacylglycerol; HSL=Hormonsensitive Lipase; MAG=Monoacylglycerol; MGL=Monoglycerid Lipase

durchgeführt (Abbildung 2): Die Adipose Triacylglycerid Lipase (ATGL) katalysiert die Spaltung der ersten Esterbindung. Die Hormonsensitive Lipase (HSL) spaltet DAG zu MAG und FA. HSL besitzt weiters eine Hydrolyseaktivität gegenüber TAG, die aber ein 10-faches niedriger ist im Vergleich zu DAG. Die Monoglycerid Lipase (MGL) katalysiert den Abbau von MAG zu Glycerol und FA.<sup>2,16</sup> Im Weiteren werden die einzelnen Enzyme der Lipolyse im Detail beschrieben.

#### 1.2.2.1. *Adipose Triglyceride Lipase – ATGL*

ATGL katalysiert den ersten Schritt der Lipolyse und zwar die Umsetzung von TAG in DAG und einer FA. Gleichzeitig ist dieser Schritt auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Abbau von TAG. Die stärkste Expression weist die ATGL im weißen (*white adipose tissue*, WAT) und braunen Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT) auf.<sup>17</sup> Die ATGL besitzt eine Patatin-Domäne, die ansonsten überwiegend in pflanzlichen Acyl-Hydrolasen zu finden ist, und gehört somit zur Superfamilie der *patatin-like phospholipases*.<sup>17</sup> Im Gegensatz zur HSL besitzt die ATGL eine hohe Substratspezifität und hat somit kaum hydrolytische Aktivität gegenüber Lipiden, wie DAG, MAG, CE und RE.<sup>18</sup>

Das Fehlen der ATGL-Aktivität in WAT führt zu einem Verlust an FA-Freisetzung von 75%. ATGL-knock out Mäuse akkumulieren somit TAG in allen Geweben. Dies führt im Allgemeinen zu einem Defekt in der Energiehomöostase und zu einer schweren Myopathie im Herzmuskel und in Folge zum verfrühten Tod der Tiere.

#### 1.2.2.2. *Hormonsensitive Lipase – HSL*

Es ist bereits ein halbes Jahrhundert lang bekannt, dass die Lipolyse in Fettzellen sensitiv auf katabolische Stimuli wie Adrenalin, Noradrenalin, Corticotropin and Glucagon ist.<sup>19</sup> HSL hydrolysiert ein breites Spektrum an Lipiden, wie TAG, DAG, MAG, CE und RE. Die höchste Expression wird, gleich wie bei ATGL, in WAT und BAT beobachtet.<sup>2</sup> Für die Lipolyse ist die Aktivität der HSL unerlässlich. Sie kann die ersten beiden Schritte katalysieren, weist aber eine höhere Aktivität gegenüber DAG auf.<sup>16</sup>

#### 1.2.2.3. *Monoglycerid Lipase – MGL*

Die Monoglyceridlipase beeinflusst den Energiemetabolismus durch die Hydrolyse von MAG. Dabei entstehen FA und Glycerol für die Energiegewinnung.<sup>2</sup>

### 1.2.3. Regulation der Lipolyse

Die Fähigkeit Energie in Form von energiereichen TAG in Zellen zu konzentrieren und die Speicher schnell während Kohlenhydratmangels oder während erhöhten Bedarfs an Energie wieder zu mobilisieren, ist ein hoch konservierter Prozess und lebensnotwendig. In Zeiten des Nahrungsüberschusses und der sitzenden Lebensweise ist die Regulation dieser Signalwege als potentiell therapeutisches Target immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses zahlreicher Forschungseinrichtungen gerückt.<sup>19</sup>

#### 1.2.3.1. Regulation der ATGL: Koaktivierung durch CGI-58

Triglycerid-Hydrolasen der Säugetiere, die an Grenzflächen zwischen Wasser und Lipiden arbeiten, benötigen für eine vollständige Enzymaktivität häufig Co-Faktoren.<sup>18</sup> Bei der ATGL handelt es dabei um CGI-58, beziehungsweise ABHD5. Mutagenesestudien haben gezeigt, dass die Bindung von CGI-58 an den LD und an ATGL notwendig sind, um die Enzymaktivität effizient zu steigern.<sup>20</sup>  $\beta$ -Adrenerge Stimulation führt zur Phosphorylierung von Perilipin-1 durch Proteinkinase A (PKA) und zur Dissoziation von CGI-58, was damit eine Bindung an ATGL ermöglicht.<sup>21</sup> In Anwesenheit von CGI-58 erfährt ATGL eine 20-fache Aktivitätssteigerung.<sup>22</sup>

#### 1.2.3.2. Regulation der ATGL: Inhibition durch G0S2

G0S2 (*G0/G1 switch gene 2*) wurde das erste Mal vor über 20 Jahren in Zellzyklusstudien entdeckt.<sup>23</sup> Es wird ubiquitär exprimiert, mit der höchsten Expression im Fettgewebe. G0S2 interagiert direkt mit der N-terminalen Patatin-Domäne der ATGL und inhibiert dadurch die katalytische Aktivität.<sup>24</sup>

#### 1.2.3.3. HSL Regulation durch Phosphorylierung

Bereits seit Jahren ist bekannt, dass PKA die HSL-Aktivität durch Phosphorylierung erhöht.<sup>25</sup> Neben der Erhöhung der Aktivität bewirkt die Phosphorylierung auch die Translokation der HSL zum LD.<sup>26</sup>

Die Inhibierung der HSL-Aktivität wird durch Nahrungsaufnahme und als Folge gesteigerter Insulin-Konzentration reguliert. Insulin-Stimulation bewirkt den Abbau von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Phosphodiesterase 3B (PDE3B) und somit die Inaktivierung der PKA und die Dephosphorylierung von HSL durch Protein-Phosphatasen.<sup>27</sup>

Die Phosphorylierung durch AMPK (*AMP-activated protein kinase*)<sup>28</sup>,  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II<sup>28</sup> und Glycogen Synthase Kinase IV<sup>29</sup> führt zu einer Verminderung der Aktivität der HSL.

#### 1.2.3.4. HSL Regulation durch Protein-Protein Interaktion

Phosphorylierung der HSL alleine reicht nicht aus, um die Enzymaktivität auf ein 100-faches zu steigern. LD-Proteine mit PAT Domänen spielen bei der Regulation der Lipolyse eine wichtige Rolle.<sup>19</sup> Von diesen Proteinen scheint Perilipin 1 (PLIN1) das wichtigste Protein in der Regulation der HSL zu sein, da HSL am LD an PLIN1 bindet. PKA phosphoryliert neben HSL auch PLIN1. Die Phosphorylierung von PLIN1 ist essentiell für die Translokation von HSL vom Cytosol an den LD.<sup>30</sup>

#### 1.2.3.5. MGL Regulation

Derzeit gibt es kein Indiz dafür, dass die Expression oder die Aktivität der MGL durch Hormone oder den Energiestatus der Zelle reguliert wird. MGL ist in vielen Geweben stark exprimiert. Bislang ist auch noch nicht vollständig geklärt, ob MGL die einzige relevante MAG-Hydrolase in der Lipolyse ist.<sup>2</sup>

### 1.2.4. Ancient Ubiquitous Protein 1 - AUP1

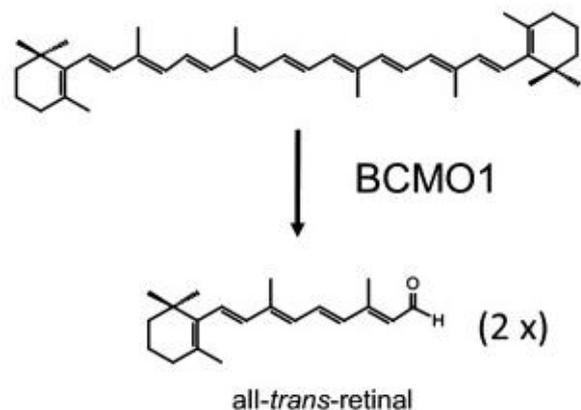
AUP1 ist ein hoch konserviertes Protein und ubiquitär im Mausorganismus exprimiert. Dennoch weiß man nur wenig über die Funktion dieses Proteins. Analysen des Proteoms identifizierten AUP1 als Komponente des ER und des LD.<sup>9,31,32</sup> AUP1 enthält zwei konservierte Domänen: eine Acyltransferase-Domäne und eine CUE (*coupling of ubiquitin to endoplasmic-associated degradation*) Domäne. Die Acyltransferase-Domäne ermöglicht den Transfer von FA auf PL. Eine CUE-Domäne ist eine Domäne, die Ubiquitin binden kann.<sup>33</sup> Spandl et al beschreibt weiters eine Domäne, die für die Rekrutierung der E2 Konjugase (UBE2G2) benötigt wird.<sup>34</sup> Aus diesem Grund wird AUP1 eine Rolle im Abbau von fehlgefalteten Proteinen zugeschrieben. Welchen Einfluss AUP1 genau auf die Kontrolle der Proteinfaltung hat, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Drei Klassen an AUP1-interagierenden Proteinen konnten bislang identifiziert werden: (1) ER-Proteine der Proteinqualitätskontrolle (2) Lipid-modifizierende Proteine (3) Untereinheiten des Oligosaccharid-Transferase Komplexes.<sup>33</sup> Ein weiterer Versuch von Klemm und Mitarbeitern zeigte, dass Zellen, deren AUP1 Expression um 80% gesilencet ist, eine signifikant verminderte TAG-Akkumulation aufweisen.<sup>33</sup> Folglich könnte AUP1 eine Rolle in der Speicherung von TAG spielen.

## 1.3. Vitamin A – Stoffwechsel

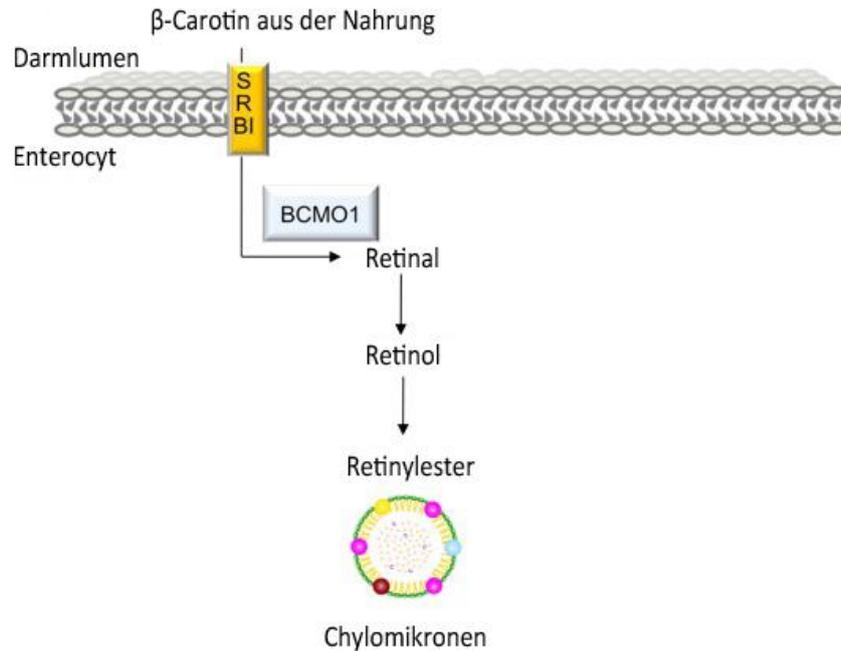
Im folgenden Abschnitt wird genauer auf die Besonderheiten des Vitamin A-Stoffwechsels eingegangen.

### 1.3.1. Retinoid-Aufnahme und Prozessierung in Enterocyten

Vitamin A ist ein essentielles, fettlösliches Vitamin, das über die Nahrung aufgenommen wird. Vitamin A findet sich in Obst und Gemüse in Form von Provitamin A (hauptsächlich  $\beta$ -Carotin) und in tierischen Organen, die als Vitamin A-Speicher fungieren, wie zum Beispiel die Leber, in Form von RE. Retinol (ROL) ist essentiell für ein normales Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, immunologische Prozesse und den Sehvorgang.<sup>36</sup> Im Organismus wird ROL in die biologisch aktive Form Retinsäure (RA) umgewandelt, ein Signalmolekül, das durch die Bindung an spezifische nukleäre Rezeptoren die Genexpression beeinflusst.<sup>37</sup> Die Absorption von  $\beta$ -Carotin im Darm erfolgt über Scavenger Rezeptor der Klasse B Typ 1 (SR-B1) (Abbildung 4).<sup>38,39</sup> Die  $\beta,\beta$ -Carotin-15,15'-Monooxygenase (BCMO1) katalysiert die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin zu *all-trans*-Retinal (RAL) in den Enterocyten (Abbildung 3).<sup>40-43</sup> Das primäre Spaltprodukt wird anschließend zu *all-trans*-ROL reduziert und an das *cellular retinol binding protein II* (CRBP-II) gebunden.<sup>44</sup> Es gibt zwei weitere CRBPs: CRBP-I und CRBP-III. CRBP gehören zu der Familie der *fatty acid binding proteins* (FABP). Die Bildung von RE wird von den Enzymen Lecithin:Retinol Acyltransferase (LRAT) und AcylCoA:Retinol Acyltransferase (ARAT) katalysiert.<sup>45,46</sup> Chylomikronen transportieren ROL und RE zur Leber.<sup>47</sup> Die Leber nimmt 66-75% der RE auf und speichert die RE in den hepatischen Sternzellen (auch Ito-Zellen genannt). Die LD von hepatischen Sternzellen (*hepatic stellate cells*, HSC) dienen speziell der Speicherung von großen Mengen an ROL und RE in der Leber.<sup>4</sup> Der restliche Anteil an RE wird von verschiedenen Geweben und Organen aufgenommen, wie Fettgewebe, Herz, Muskel, Lunge, Fortpflanzungsorgane und Knochenmark. Der Abbau der Chylomikronen erfolgt durch das Enzym LDL.<sup>48</sup>



**Abbildung 3** Enzymatische Reaktion der  $\beta,\beta$ -Carotin-15,15'-Monooxygenase (BCMO1) BCMO1 spaltet  $\beta$ -Carotin zu *all-trans*-Retinal (RAL) Quelle: <sup>35</sup>



**Abbildung 4  $\beta$ -Carotin-Aufnahme und Prozessierung in Enterocyten**  $\beta$ -Carotin aus dem Darmlumen kann direkt von Enterocyten absorbiert werden und in der Zelle prozessiert werden. Die in den Enterocyten gebildete Retinylester werden anschließend in Chylomikronen verpackt und zur Leber transportiert. Quelle:<sup>35</sup>

Abkürzungen: SR-B1= Scavenger Rezeptor der Klasse B Typ 1 ; BCMO1=  $\beta$ , $\beta$ -Carotin-15,15'-Monooxygenase

### 1.3.2. Speicherung von Retinol in der Leber

In der Leber werden die in den Chylomikronen-Remnants gespeicherten RE hydrolysiert und an das *retinol binding protein* (RBP) gebunden.<sup>49</sup> RBP wird hauptsächlich in der Leber produziert und wird bei der Speicherung und Mobilisierung von ROH benötigt. Der größte Anteil an ROH wird in den HSC in Form von RE gespeichert.<sup>4</sup> HSC besitzen hohe Expressionslevels an CRBP-I und LRAT, welche Schlüsselenzyme in der Speicherung von RE darstellen.<sup>50,51</sup> Weitere Speicherorgane für RE sind Fettgewebe, Niere und Darm.<sup>4</sup>

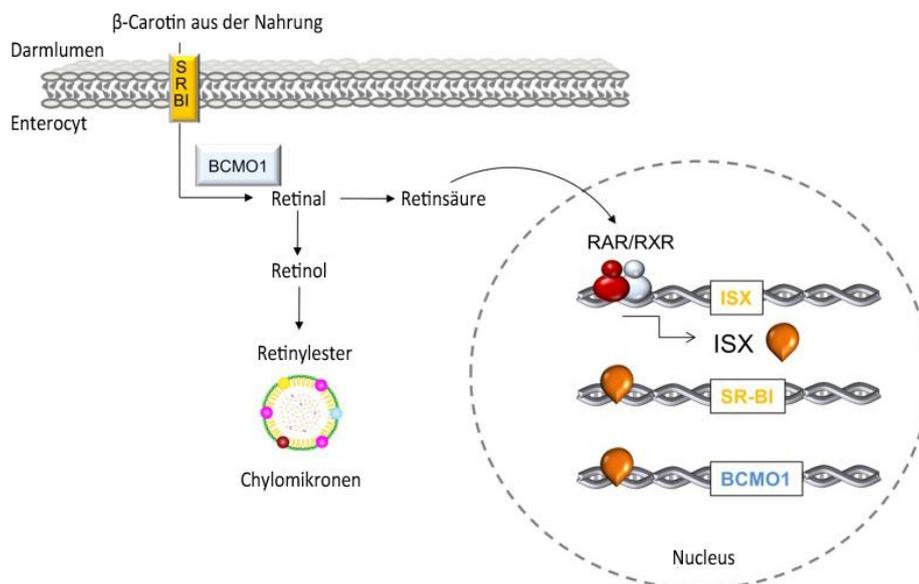
### 1.3.3. Vitamin A – Mobilisierung und Bildung von Retinsäure

Aus dem Speicher der Leber werden RE durch Retinylester Hydrolasen (REH) wieder zu ROL hydrolysiert, in Form von ROL:RBP sekretiert und über die Blutzirkulation im Körper verteilt.<sup>4,52,53</sup> 2007 wurde ein Zelloberflächenrezeptor identifiziert, der spezifisch an RBP bindet und die Aufnahme von ROH vermittelt. Dabei handelt es sich um den *stimulated by retinoic acid gene 6* (STRA6) Rezeptor.<sup>54</sup> In den Zielzellen wird ROH erneut an CRBP gebunden und von Retinol-Dehydrogenasen, wie Alkoholdehydrogenasen 1 (ADH1), ADH3 oder ADH4, wieder zu RAL oxidiert.<sup>55,56</sup> Der nächste Schritt umfasst die irreversible Oxidation

von RAL zu RA. Diese Reaktion wird von der Retinal-Dehydrogenase (RALDH) katalysiert.<sup>53</sup> RA bindet an zelluläre RA-Bindeproteine des Typs I und II (CRABP-I und CRABP-II), die RA in den Nukleus transportieren können.<sup>57</sup> Dort induziert RA die Expression von über 500 Gene durch die Bindung und Aktivierung von *retinoic acid receptors* (RAR) und *retinoid X receptors* (RXR), beide aus der Familie der nukleären Rezeptoren (siehe auch Abbildung 5).<sup>58,59</sup>

### 1.3.4. Regulation

Im Gegensatz zur Aufnahme von Retinol durch Enterozyten ist die Absorption von Carotinoiden aus dem Intestinum sättigbar.<sup>48</sup> Als Regulator des intestinalen Carotenoid-Metabolismus gilt der *intestine-specific homeobox transcription factor* (ISX)<sup>60</sup>. Der Crosstalk erfolgt über ein *retinoic acid-responsive element* im *ISX*-Promoter, an das RAR binden kann.<sup>61</sup> Expression von ISX führt zu einer Inhibierung der Transkription der Gene für *SR-B1* und *BCMO1* (siehe Abbildung 5). Der Wirkung von RA in der Zelle wird über den Auf- und Abbau von RA reguliert.



**Abbildung 5 Regulation des intestinalen Carotenoid-Metabolismus** Die aus dem aufgenommenen  $\beta$ -Carotin entstandene Retinsäure führt zu einer negativen Feedbackregulation der  $\beta$ -Carotin-Aufnahme. Retinsäure bindet an die *retinoic acid receptors* (RAR) und *retinoid X receptors* (RXR) und aktiviert die Transkription des *intestine-specific homeobox transcription factor* (ISX). ISX selbst verhindert die Transkription der Gene für *SR-B1* und *BCMO1*. Quelle:<sup>35</sup> Abkürzungen: SR-B1= Scavenger Rezeptor der Klasse B Typ 1 ; BCMO1=  $\beta$ , $\beta$ -Carotin-15,15'-Monooxygenase

### 1.3.5. *Pancreatic Lipase-related Protein 2 - PLRP2*

Der exokrine Anteil der Pankreas sekretiert verschiedene Lipasen, die für die Spaltung von Nahrungsfetten im Duodenum verantwortlich sind. Eines dieser Enzyme ist das Pankreatische Lipase-verwandte Protein 2 (PLRP2), das eine hohe Sequenzhomologie zur Pankreatischen Triacylglycerid Lipase (PTL) und ebenfalls eine vergleichbare TG-Hydrolase Aktivität *in vitro* besitzt.<sup>62</sup> PLRP2 zeigt aber auch Hydrolyse-Aktivität gegenüber RE, PL und Galactolipiden und besitzt damit eine breitere Substratspezifität als PTL.<sup>63–65</sup> Effiziente Verdauung von Nahrungsfetten benötigt zusätzlich das Vorhandensein von Gallensalzen und dem Co-Faktor Colipase (CLPS).<sup>66</sup>

In Jungtieren der Maus scheint PLRP2 die vorrangige Lipase in der Fettverdauung im Darm zu sein. In adulten Tieren hingegen ist die Rolle von PLRP2 unklar.<sup>67,68</sup>

Das Pankreatische Lipase-verwandte Protein 2 gilt als potentieller Kandidat für eine intrazelluläre REH, verantwortlich für die Mobilisierung von gespeichertem ROL in LDs von HSC. Pang et al berichtete 2011, dass Vitamin A-defiziente Mäuse eine verstärkte Expression der *Plrp2*- und *Clps*-Gene in der Leber besitzen. Weiters konnten sie eine Expression der beiden Gene in aktivierten Zellen einer HSC-Zelllinie aus der Ratte (HSC-T6) beobachten.<sup>69</sup> Folglich könnte PLRP2 auch intrazellulär in HSC eine Rolle in der RE-beziehungsweise TAG-Mobilisierung spielen.

## 1.4. Ziel der Masterarbeit

Das Ziel der Masterarbeit war die Rolle von AUP1 und PLRP2/CLPS in der Lipolyse beziehungsweise RE-Mobilisierung zu untersuchen. Dazu sollte eine Expression von AUP1 und PLRP2/CLPS in COS-7 Zellen durchgeführt und in Folge der Effekt von AUP1 und PLRP2/CLPS auf den zellulären TAG-Gehalt untersucht werden. Zudem soll in *in vitro* Aktivitätstests der Einfluss von AUP2 auf die TAG-Hydrolyse beziehungsweise die Aktivität von PLRP2/CLPS ermittelt werden.

## 2. MATERIALEN UND METHODEN

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

Die in den Experimenten verwendeten Chemikalien wurden zum größten Teil von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma Aldrich (St. Louis, USA) und Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Bei Ausnahmen wird im Text darauf hingewiesen.

#### 2.1.2. Puffer und Lösungen

Folgende Lösungen und Puffer wurden verwendet:

<i>1,5% Agarose-Gel</i>	1,5% Agarose in 1xTAE
<i>4x Lower-Buffer</i>	1,5M Tris; pH 8,8
<i>4x Upper-Buffer</i>	0,5M Tris; pH 6,8
<i>10x Tris-Glycin</i>	200mM Tris; 1,6M Glycin; 0,8% Natriumdodecylsulfat (SDS)
<i>10x TST</i>	500mM Tris(HCl); 1,5M NaCl; 1% Tween20
<i>CAPS-Puffer</i>	10mM CAPS; 10% Methanol; pH 11,0
<i>Competency buffer 1</i>	100mM KCl; 30mM KAc; 60mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glycerol
<i>Competency buffer 2</i>	10mM MOPS; 10mM KCl; 75mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glycerol
<i>Entfärbelösung</i>	30% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Eisessig
<i>Extraction Solution I</i>	Methanol/Chloroform/n-Heptan im Verhältnis 10/9/7 (v/v/v)
<i>Extraction Solution II</i>	0,1M Kaliumcarbonat, 0,1M Borsäure, pH 10,5 (mit Borsäure)

<i>DEPC-Wasser</i>	0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)
<i>HSL</i>	250mM Sucrose; 1mM EDTA; 1mM DTT; 1xPi
<i>Hybridisierungslösung</i>	250mM Natriumphosphatpuffer; 7% SDS; 1 mM EDTA; 1% BSA; pH 7,2
<i>Lysispuffer I</i>	50mM Glukose; 25mM Tris(HCl); 10mM EDTA; pH 7,5
<i>Lysispuffer II</i>	0,2mM NaOH; 1% SDS
<i>PBS</i>	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 4,3mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
<i>SDS-Probenpuffer (4x)</i>	0,2M Tris(HCl) pH 6,8; 10% β-Mercaptoethanol; 8% SDS; 40% Glycerol; Bromphenolblau
<i>SSC-Puffer (10x)</i>	1,5M NaCl; 150 mM Natriumcitrat-2 H <sub>2</sub> O; pH 7,0
<i>TAE (50x)</i>	200mM Tris(HCl) pH 7,2; 50mM EDTA; 6% Essigsäure; pH 8,5

### 2.1.3. Medien

Folgende Medien wurden für die Kultivierung verwendet:

#### 2.1.3.1. Bakterielle Medien

Für die Kultivierung von Bakterien wurden folgende Medien verwendet.

<i>LB-Medium</i>	10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl
<i>LB-Agar</i>	LB-Medium + 15g/l Agar

#### 2.1.3.2. Zellkulturmedien

Für die Kultivierung der Zelllinien COS-7, HEK293 und HSC-T6 wurden folgende Medien verwendet:

<i>DMEM (-/-)</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i> (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 1g/l Glukose
-------------------	---

*DMEM (+/+)*

*Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 1g/l beziehungsweise 4,5g/l Glukose  
 + 10% fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS, Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA)  
 + Antibiotika (Penicillin und Streptomycin, je 100µg/ml, Gibco-Invitrogen)

#### 2.1.4. Primer – AUP1

Für die Klonierung von AUP1 in den Vektor **pcDNA4/HisMax<sup>®</sup> C** wurden folgende Primer verwendet:

*AUP1\_fw\_EcoRI* 5'-GTGGAATTC<sup>1</sup>CCCAAAGACTCCGCCTTCCC-3'

*AUP1\_rv\_XbaI* 5'-CCCTCTAGA<sup>1</sup>**TCA**<sup>2</sup>TTCAGCCTCCTGGGCCT-3'

<sup>1</sup>unterstrichen... Erkennungssequenz Restriktionsenzym

<sup>2</sup>fett... Stopcodon

#### 1.1.1. Primer – PLRP2/CLPS

Für die Klonierung von PLRP2 und CLPS in den Vektor **pFLAG-CMV-5.1** wurden folgende Primer verwendet:

*PLRP2\_fw\_EcoRI* 5'-GTGGAATTC<sup>1</sup>ACCAT<sup>2</sup>GGATGCCTATGGATGTCCGTGGATG-3'

*PLRP2\_rv\_XbaI* 5'-CCGTCTAGA<sup>1</sup>ACAAGGGTACAGAGACTGCAGAA-3'

*CLPS\_fw\_EcoRI* 5'-GTGGAATTC<sup>1</sup>ACCAT<sup>2</sup>GGATGGAGAAGGTCCTTGTTCTTCTG-3'

*CLPS\_rv\_XbaI* 5'-CCGTCTAGA<sup>1</sup>CTGCTTGGAGCGCCTGGAG-3'

<sup>1</sup>unterstrichen... Erkennungssequenz Restriktionsenzym

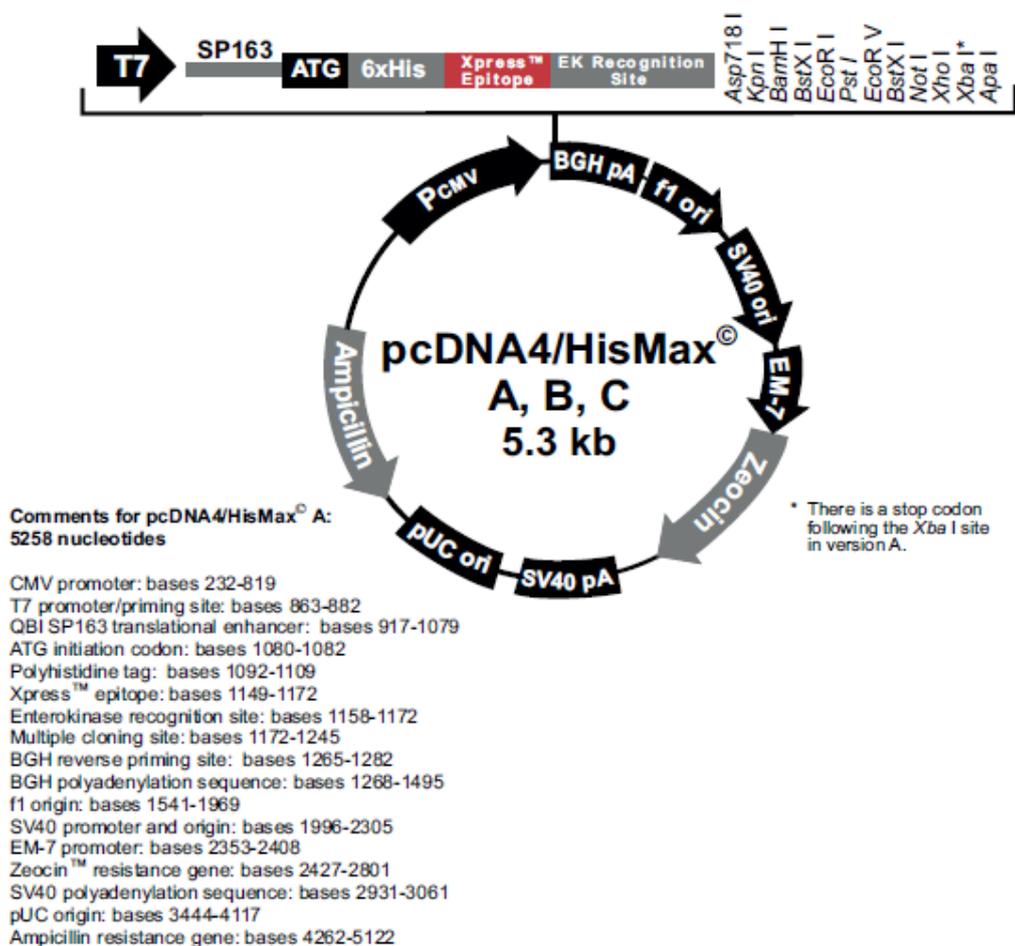
<sup>2</sup>kursiv... Kozak-Sequenz

### 1.1.2. Plasmide

Folgende Vektoren wurden für die Klonierung von AUP1, PLRP2 und CLPS verwendet.

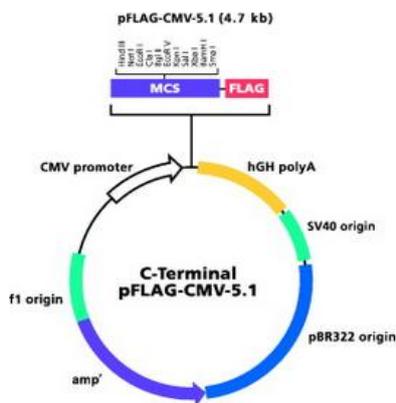
#### 1.1.2.1. *pcDNA4/HisMax*<sup>®</sup> C

Für die Klonierung von AUP1 wurde der *pcDNA4/HisMax* C Vektor von Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA) verwendet. Die Vektorkarte ist in Abbildung 6 dargestellt. Die verwendeten Schnittstellen zur Klonierung von AUP1 waren *EcoR*I und *Xba*I. Bei der Expression in Säugetierzellen entsteht ein Fusionsprotein aus AUP1 mit einem Histidin-Tag am N-terminalen Ende, der zur Detektion des Proteins am Western Blot herangezogen werden kann. Ein Histidin-Tag ist ein Aminosäuremotiv, das aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinmoleküle besteht.



**Abbildung 6 Vektorkarte von *pcDNA/HisMax*<sup>™</sup> A,B,C** Für die Klonierung wurde die Version C des Vektors verwendet. Im linken unteren Eck der Abbildung sind die Eigenschaften des Vektors aufgelistet. Hersteller: Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

### 1.1.2.2. pFLAG-CMV-5.1



**Abbildung 7 Vektorkarte von pFLAG-CMV-5.1** Für die Klonierung von PLRP2 und CLPS wurde der pFLAG-CMV-5.1 Vektor verwendet. Die Eigenschaften des Vektors sind in der Abbildung farblich dargestellt. Hersteller: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Für die Klonierung von PLRP2 und CLPS wurde der pFLAG-CMV-5.1 verwendet. In Abbildung 7 ist die Vektorkarte graphisch dargestellt. Durch die Klonierung eines Gens in den pFLAG-CMV-5.1 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) erhält das Protein bei der Expression in Säugetierzellen einen C-terminalen FLAG-Tag, der zur Identifizierung des Proteins am Western Blot, oder für die Immunpräzipitation verwendet werden kann. Beim FLAG-Tag handelt es sich, wie beim His-Tag, um ein Polypeptid. Die Proteinsequenz des FLAG-Tags ist: DYKDDDDK. Für die Klonierung von PLRP2 und CLPS in den pFLAG-CMV-5.1-Vektor wurden EcoR1 und Xba1 als Restriktionsschnittstellen gewählt.

### 1.1.3. Antikörper

Folgende primäre und sekundäre Antikörper wurden für die Detektion der Proteine am Western Blot verwendet.

#### 1.1.3.1. Primäre Antikörper

<i>Anti-His Antikörper</i>	GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK
<i>Anti-FLAG</i>	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
<i>Anti-PLRP2</i>	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

#### 1.1.3.2. Sekundäre Antikörper

<i>anti-Maus IgG Antikörper</i>	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
<i>anti-Kaninchen IgG Antikörper</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist wohl das bedeutendste Werkzeug in der Molekularbiologie und hat vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Mit ihr ist es möglich, zum Beispiel DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Für die Vervielfältigung von Nukleotidabschnitten werden flankierende Primer (sequenzspezifische DNA-Stücke mit einer Länge von 20-30 Nukleotiden) benötigt, die Restriktionsschnittstellen tragen können. Als Vorlage (*template*) kann DNA in jeder Form verwendet werden (genomische DNA, cDNA, Plasmid-DNA).

Das typische PCR-Programm ist aus drei Phasen aufgebaut: Denaturierung, Annealing und Elongation. Für eine PCR wurden 50-250ng cDNA (komplementäre DNA), je 10pmol Primer fw/rev (*forward* und *reverse*), 5nmol dNTP-Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0,5µl Phusion® DNA Polymerase 2 U/µl (Finnzymes, Espoo, Finnland), 5µl Phusion® HF Reaktionspuffer (Finnzymes) verwendet und mit ddH<sub>2</sub>O (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) auf ein Endvolumen von 25µl gebracht. Die PCR wurde in einem C1000 Thermocycler der Firma Bio-Rad (Hercules, USA) durchgeführt. In Tabelle 1 ist das verwendete Temperaturprogramm angegeben

**Tabelle 1 Allgemeines PCR-Programm** In tabellarischer Form sind die Temperatur und die Dauer der einzelnen PCR-Phasen dargestellt. Temperatur der Primer-Hybridisierung und Dauer der Annealing- und Elongationsphase sind abhängig von den jeweils verwendeten Primerpaaren und sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

Schritte		Temperatur	Zeit
<i>Initiale Denaturierung</i>		98°C	120sec
38 Zyklen	<i>Denaturierung</i>	98°C	30sec
	<i>Annealing</i>	abhängig von Primer	30-40sec
	<i>Elongation</i>	72°C	30-40sec
<i>Finale Extension</i>		72°C	
<i>Kühlung</i>		8°C	∞

### 2.2.2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, DNA-Fragmente voneinander zu trennen. Die DNA-Fragmente werden mittels Zugabe von Ethidiumbromid ins Gel und dem Laufpuffer, das sich zwischen den Basenpaaren doppelsträngiger DNA interkaliert, sichtbar gemacht.

Für die Auftrennung wurde ein 1,5%-iges (w/v) Agarosegel verwendet. Somit wurden 6g Agarose für 400ml Gel in 1xTAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und mit 0,25 mg/l Ethidiumbromid versetzt. Das Agarosegel wurde bis zur Verwendung bei 60°C im Hitzeschrank gelagert. Die Agaroselösung wurde in Geleinsätze gegossen. Nach der Aushärtung wurden die Proben mit DNA-Ladepuffer (siehe Puffer und Lösungen) vermischten Proben aufgetragen. Als Größenstandard wurden 4µl einer *1kb DNA Ladder* (GeneRuler™ 1 kb, Fermentas Life Science, St. Leon Rot, Deutschland) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 90V für 15-30min.

### 2.2.3. Elution von DNA aus Agarosegelen

Für den Restriktionsverdau muss die DNA wieder aus dem Gel eluiert werden. Dafür wurde der MicroElute Gel Extraction Kit verwendet (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA). Die Elution der DNA-Banden wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.4. Restriktionsverdau von DNA

Für die gerichtete Klonierung des PCR-Produktes (*insert*) in einen Vektor oder für Restriktionsanalysen werden Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese Enzyme schneiden nur an der für das jeweilige Enzym spezifischen Nukleotidsequenzen (*restriction site*).

Für die Klonierung wurde jeweils das gesamte PCR-Produkt (Eluiert aus dem Gel) und 6µg Vektor-DNA geschnitten. Für Restriktionsanalysen wurde 1µg DNA verwendet. Für die Restriktion wurden 0,5-1U Enzym und 2,5µl enzyspezifischer 10xPuffer in einem 25µl Ansatz verwendet und für 2h bei 37°C inkubiert. Je nach verwendetem Restriktionsenzym oder Kombination an verwendeten Enzymen für einen Doppelverdau wurde zur Erhöhung der Aktivität 2,5µl BSA (10µg/µl) zugegeben und der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet.

### 2.2.5. Ligation

Zur Abschätzung der Konzentrationen von Insert und Vektor wurden jeweils 1µl auf ein Agarosegel aufgetragen und die Intensitäten der Banden verglichen. Optimal für die Ligation ist ein dreifacher Überschuss an Insert- DNA.

Weiters wurde eine Religationskontrolle durchgeführt, in der nur der Vektor im Ligationsansatz vorhanden war, um eine Religation des Vektors durch einen unvollständigen Verdau durch die Restriktionsenzyme zu überprüfen.

Folgendes Protokoll wurde für die Ligation verwendet: 1µl T4-Ligase (0,4U/µl) (Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Deutschland), 2µl Ligase-Puffer (10x), Volumina von Insert und Vektor und ddH<sub>2</sub>O, um ein Endvolumen von 20µl zu erreichen. Die Ligation erfolgte für 1h bei 20°C.

### 2.2.6. Transformation prokaryontischer Zellen

Zur Vervielfältigung des Plasmid-Konstrukts wurde dieses in *E.coli* Zellen transformiert. Sogenannte Hybridvektoren besitzen einen Replikationsursprung für die effiziente Replikation des Plasmids in *E.coli* und einen Promoter zur Transkription des rekombinanten Proteins in Säugetierzellen (siehe Kapitel 1.1.2). Die Transformation kann mit chemisch- oder elektro-kompetenten Zellen durchgeführt werden. Die beiden Methoden unterscheiden sich in der Transformationseffizienz, welche bei elektro-kompetenten Zellen wesentlich höher liegt.

#### 2.2.6.1. Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen

Zur Erstellung von chemisch-kompetenten Zellen wurden 100ml Medium mit 100µg/ml Antibiotikum mit 1ml einer *E.coli* DH5α Übernachtskultur (*over night culture*, ONC) beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,25-0,5 bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach Erreichen der OD wurden die Zellen auf Eis gestellt und anschließend bei 5.000rpm bei 4°C für 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30ml *Competency Buffer* 1 (siehe Kapitel 2.1.2) resuspendiert und für 1h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 5.000rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 4ml *Competency Buffer* 2 (siehe Kapitel 2.1.2) resuspendiert und erneut auf Eis inkubiert. 100µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.6.2. Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Für die Transformation wurden je 5µl der Ligation und 25µl der erworbenen chemisch-kompetenten Zellen (*NEB 5-alpha Competent E. coli High Efficiency*, New England Biolabs, Ipswich, UK) oder 50µl der selbst hergestellten chemisch-kompetenten Zellen vermischt und für 15min auf Eis inkubiert. Durch einen 30sec Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad wurden die Zellen transformiert. Nach 2-3 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 200µl vorgewärmtem LB-Medium (37°C) für 1h bei 37°C im Schüttelinkubator (180rpm) inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit Antibiotikum (100µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Von jeweils drei Kolonien wurden dann am Abend des darauffolgenden Tages jeweils eine ONC für eine Miniprep angesetzt.

#### 2.2.6.3. Erstellung von elektro-kompetente Zellen

Die Herstellung von elektro-kompetenten Zellen erfolgte, ähnlich zu den chemisch-kompetenten Zellen, aus wenigen Zentrifugationsschritten. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden, wie bereits oben angeführt, angezchtet. Die Kultur ( $OD_{600} \approx 0,5$ ) wurde für 15min auf Eis inkubiert und anschließend bei 5.000rpm und 4°C für 10min pelletiert. Das Pellet wurde im selben Volumen sterilem, destilliertem Wasser resuspendiert und der Zentrifugationsschritt mit denselben Bedingungen wiederholt. Das resultierende Pellet wurde anschließend im halben Volumen destilliertem Wasser zum Ausgangsvolumen resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in ein 1/50 des Ausgangsvolumens sterilem, 10%igen Glycerol resuspendiert und bei 10.000rpm bei 4°C für 15min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/250 des Ausgangsvolumens sterilem, 10%igen Glycerol resuspendiert. Jeweils 100µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff gefrohren und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.6.4. Transformation elektro-kompetenter Zellen

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. 50µl Zellsuspension wurden mit 5µl der Plasmid-DNA für die Transformation vermischt und für 5min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend in Elektroporations-Küvetten überführt und transformiert. Nach dem Elektroschock (2,5kV) im *E.coli Pulser* (BIORAD Laboratories, Wien, Österreich) wurden die Zellen in 200µl LB-Medium (37°C) aufgenommen und für 1h bei 37°C im Schüttelinkubator regeneriert und anschließend auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

## 2.2.7. Präparation von Plasmid-DNA

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen mit dem jeweiligen Plasmid transformiert, kultiviert und die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert.

### 2.2.7.1. Plasmidpräparation im Kleinstmaßstab - Miniprep

Für die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde ein klassisches Protokoll mit alkalischer Lyse der Bakterienzellen verwendet.

Für die ONC wurden 3ml Medium mit einem Antibiotikum (100  $\mu$ g/ml für *high-copy* Plasmide und 50 $\mu$ g/ml für *low-copy* Plasmide), abhängig von der Resistenzkassette auf dem Plasmid, mit einer Einzelkolonie der Transformanten beimpft und über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen pelletiert (10min, 4°C, 3.500rpm) und in 200 $\mu$ l Lysispuffer I (siehe Puffer und Lösungen) resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 $\mu$ l Lysispuffer II zur Suspension wurde das Gemisch für 5min bei RT inkubiert und danach mit 150 $\mu$ l 3M Kaliumacetat /5M Essigsäure neutralisiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde der weiße Niederschlag pelletiert (10min, 4°C, 13.000rpm). Der Überstand wurde abdekantiert und die Plasmid-DNA mit eiskaltem Ethanol (100%) für 5min bei 4°C gefällt und durch Zentrifugation pelletiert (30min, 4°C, 13.000rpm). Das DNA-Pellet wurde mit 400 $\mu$ l 70%igem Ethanol überschichtet (nicht resuspendiert) und erneut zentrifugiert (5min, 4°C, 13.000rpm). Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Ethanol abgehoben und das Pellet für 10-15min luftgetrocknet. Das Lösen des Pellets erfolgte in 30 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O mit 100 $\mu$ g/ml RNase (New England Biolabs, Ipswich, UK) bei Raumtemperatur für 20min. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 2.2.7.2. Plasmidpräparation im Großmaßstab - Maxiprep

Für größere Mengen und höhere Reinheit an Plasmid-DNA wurde für die Plasmidpräparation der *Nucleobond® Xtra Plasmid-DNA Purification Kit* (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet.

Das Kultivieren der Zellen und die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.8. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine nach dem Molekulargewicht zu trennen, wurden diese elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in Form einer diskontinuierlichen SDS-PAGE durchgeführt.

Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurden als Trenngel ein 7,4, 10 oder 12,5%ige Gel verwendet. Beim Sammelgel handelte es sich um ein 4,5%iges Gel. Das Pipettierschema ist in Tabelle 2 dargestellt.

Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben (20µg Protein in 20µl 1x SDS-Ladepuffer) für 5min bei 99°C erhitzt. Als Standard wurden 7µl *Precision Plus Protein All Blue* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 25mA pro Gel in Tris-Glycin-Puffer (siehe Kapitel 2.1.2).

**Tabelle 2 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel** Die Mengen sind jeweils für 30ml Trenngel, das für die Herstellung von drei Gele ausreicht, und für 3ml Sammelgel aufgelistet. Die Angaben zur Herstellung von *Lower Buffer* und *Upper Buffer* finden sich in Kapitel 2.1.2.

Abkürzungen: SDS: Natriumdodecylsulfat; TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin; APS: Ammoniumperoxodisulfat

Komponenten	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
	7,4%	10%	12,5%	4,5%
ddH <sub>2</sub> O	14,7ml	12,3ml	9,6ml	1,77ml
<i>Lower Buffer</i>	7,5ml	7,5ml	7,5ml	-
<i>Upper Buffer</i>	-	-	-	0,75ml
30% Acrylamid	7,5ml	9,9ml	12,6ml	0,45ml
10% SDS	300µl	300µl	300µl	30µl
TEMED	27µl	27µl	27µl	3,9µl
APS	81µl	81µl	81µl	12µl
0,5% Bromphenolblau	-	-	-	4,5µl
	30ml	30ml	30ml	3ml

### 2.2.9. Western Blot

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zu detektieren, müssen diese zuerst auf eine Membran transferiert werden. Die Detektion erfolgt durch indirekte Immundetektion mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Sekundärantikörper. Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung eines Substrates, die durch Chemilumineszenz und Auflegen eines lichtempfindlichen Films sichtbar gemacht werden kann. Die Intensität der dabei detektierten Banden ist proportional zur Proteinmenge.

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran, Roth GmbH) erfolgte in einer Transferkammer (Hoefer TE22, Amersham Biosciences) bei konstanten 200mA für 1 ¼ h in CAPS-Puffer. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu vermeiden, wurde diese für 1h in 10% delipidierter Trockenmilch (Bio-Rad Laboratories) in 1xTST bei RT oder über Nacht bei 4°C geblockt. Die Membranen wurden mit dem primären Antikörper für 1h inkubiert und anschließend drei Mal für 10 Minuten in 1xTST geschwenkt und sodann abgeschüttelt („Waschschritt“). Die Inkubationszeit für den sekundären Antikörper betrug ebenfalls 1h bei RT. Die Antikörper wurden jeweils in 2%iger (w/v) Trockenmilchlösung in 1xTST verdünnt. Nach dem sekundären Antikörper wurde die Membran erneut drei Mal mit 1xTST für jeweils 10min gewaschen. Als Substrat für die HRP wurde das *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien) verwendet. Die Membran wurde im Dunkeln mit dem Reagenz überschichtet und anschließend für 3min inkubiert. Anschließend wurde die Chemilumineszenz in einer Filmkassette durch Auflegen eines Films (Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare Europe GmbH) detektiert. Die Filme wurde je nach Intensität der erhaltenen Banden zwischen 1sec und 10min aufgelegt. Entwicklung und Fixierung des Films erfolgte mit Entwickler- und Fixierlösung von Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, Deutschland. Danach wurde die Membran mit *Coomassie-Blue* gefärbt und anschließend in Entfärbelösung solange geschwenkt, bis nur mehr die Proteinbanden sichtbar waren.

### 2.2.10. Proteinbestimmung

Für die kolorimetrische Detektion und Quantifizierung von Proteinen in den Proben wurde je nach Zusammensetzung des verwendeten Puffers, entweder Bicinchoninsäure oder das Bradford-Reagenz verwendet. Für die beiden Bestimmungen wurden in 96-well Platten jeweils 20µl Probe (verdünnt oder unverdünnt) mit 200µl Reagenz pipettiert und nach der

Inkubationsphase im *Biotrak II Visible Plate Reader* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien) vermessen.

#### 2.2.10.1. Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA wurde das *BCA Protein Assay Reagent* (Pierce Biotechnologies, Rockford, USA) verwendet. Diese Methode kombiniert die Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret Reaktion) mit der hoch sensitiven und selektiven kolorimetrischen Detektion von Kupferionen (Cu(I)) durch das BCA-Reagenz mit Bicinchoninsäure. Der violette Farbumschlag des Reagenz, verursacht durch die Chelatbildung von zwei BCA-Molekülen mit einem Kupferion, kann bei 562nm vermessen werden. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Stocklösung von BSA (2mg/ml, Pierce Biotechnologies, Rockford, USA) im Bereich von 0µg/ml bis 2.000µg/ml erstellt.

Zur Herstellung des BCA Protein Assay Reagens wurden Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50:1 gemischt. Die Inkubationszeit betrug bei dieser Methode 30min bei 37°C.

#### 2.2.10.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde das *Bio-Rad Protein Assay Reagent* (Bio-Rad Laboratories, Wien, Österreich) verwendet. Die Methode nach Bradford basiert auf der Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue G-250* an Proteine mit der Folge eines Shifts des Absorptionsmaximums von 465nm nach 595nm. Der Coomassie-Farbstoff bindet primär an basische und aromatische Aminosäuren, besonders Arginin.

Als Standardreihe wurden unterschiedliche Konzentrationen (0µg/ml bis 200µg/ml) an BSA verwendet. Das *Bio-Rad Protein Assay Reagent* wurde im Verhältnis 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 3min bei Raumtemperatur. Die Absorption wurde bei 595nm bestimmt.

### 2.2.11. Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Mausegeweben

Zur Erstellung von cDNA wurde zuerst die Gesamt-RNA aus einem Gewebe isoliert. Dazu wurden aus der Maus 50-100mg des gewünschten Gewebes entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder direkt mit 1ml TRI Reagent (Sigma-Aldrich) versetzt.

Das Gewebe wurde daraufhin homogenisiert und für 5min bei RT inkubiert. Um eine Phasentrennung herbeizuführen, wurden 0,1ml 1-Bromo-3-chloropropan (BCP)

hinzupipettiert und das Gemisch für 15sec gevortext. Es erfolgte eine 2-15 minütige Inkubationszeit bei RT. Anschließend wurde die Probe für 15min bei 12.000xg und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgehoben und in ein Gefäß überführt und mit 0,5ml Isopropanol vermischt. Nach 5-10 minütiger Inkubation bei RT wurde die Probe für 8min bei 12.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1ml 75%igen Ethanol überschichtet und zentrifugiert (5min, 7.500xg, 4°C). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet für 3-5min luftgetrocknet. Die RNA wurde anschließend in DEPC-Wasser gelöst. Dazu wurde das RNA-Pellet in geeignetem Volumen aufgenommen und für 10-15min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA zur Kontrolle auf ein DNA-Gel aufgetragen.

### 2.2.12. cDNA Synthese

Isolierte mRNA wurde in einem zweistufigen Protokoll in doppelsträngige cDNA umgeschrieben.

#### *First-Strand cDNA Synthesis*

Für die Synthese des ersten Stranges wurden 1µl Oligo(dT)s (500µg/ml; Invitrogen), 1-5ng Gesamt-RNA und 1µl 10mM dNTP-Mix mit sterilem, destilliertem Wasser auf ein Volumen von 12µl gebracht. Dieser Ansatz wurde für 5min bei 65°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurden 4µl First-Strand Buffer (5x; GibcoBRL, San Francisco, USA), 2µl DTT (0,1M; Invitrogen) und 2µl RiboLock RNase Inhibitor (20units/µl; Fermentas) hinzupipettiert und für 2min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1µl (=200 Units) *SuperScript Reverse Transcriptase* (Invitrogen) und eine Inkubation für 50min bei 37°C.

Falls kein zweiter Strang synthetisiert werden sollte, erfolgt die Inaktivierung der Reaktion bei 70°C für 15min.

#### *Second Strand Synthesis*

Der Ansatz der *First-Strand cDNA Synthesis* wurde auf Eis abgekühlt. Folgende Reagenzien wurden hinzupipettiert: 10µl *E.coli* Ligase Puffer (10x; Biolabs), 2,5µl *E.coli* Polymerase (10.000U/ml; Biolabs), 0,6µl RNaseH (5.000U/ml, Biolabs), 0,5µl *E.coli* Ligase (10.000U/ml; Biolabs), 2µl dNTPs. Mit sterilem, destilliertem Wasser wurde der Ansatz auf 100µl gebracht und für 3h bei 16°C inkubiert.

### 2.2.13. Northern Blot

Ziel des Northern Blots ist es, mRNA, die zuvor mittels denaturierender Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe getrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne RNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können. So kann auf die Expression eines Gens in einem bestimmten Gewebe geschlossen werden.

#### *Prähybridisierung*

Bevor die Sonde auf den Northern Blot aufgetragen wurde, musste die Membran für 4-6 Stunden bei 65°C prähybridisiert werden. Dazu wurden 6ml Prähybridisierungslösung (Hybridisierungslösung + 1% BSA) pro Blot in 50ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert.

#### *Markierung der Sonde*

Für einen Blot werden etwa 15ng DNA in einem Volumen von 15µl benötigt. Die Sonde wurde für 5min bei 99°C aufgeköcht und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Zu der Sonde wurden 5µl *Labeling Buffer* (5x), 1µl Nukleotidmix (ohne ATP), 1µl BSA (10x), 0,5µl Klenow Enzym und 2,5µl <sup>32</sup>P-dATP pipettiert und für 2-3h bei RT inkubiert. Die Sonde wurde über eine Sepharose-Säule gereinigt und nur die Fraktionen mit über 10.000cps wurden vereinigt und erneut für 5min bei 99°C erhitzt. Danach wurde die Sonde sofort auf Eis abgekühlt und in die Hybridisierungslösung pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht.

#### *Waschen des Blots*

Die radioaktive Hybridisierungslösung wurde gesammelt und bei -20°C gelagert. Der Blot wurde für 20min bei RT mit 2xSSC (siehe Kapitel 2.1.2) und 0,1% SDS geschwenkt und danach abgeschüttet. Danach wurde der Blot mit 1xSSC, 0,1% SDS bei 65°C für 20-30min gewaschen. Der letzte Waschschrift wurde mit 0,5xSSC, 0,1% SDS für 20-30min durchgeführt. Der Blot wurde kurz getrocknet und in Plastikfolie eingelegt. Die Auswertung erfolgt mittels Phosphorscreen.

### 2.2.14. Verwendete Zelllinien

Für die Versuche wurden, bis auf eine Ausnahme (HEK-293), ausschließlich COS-7 Zellen verwendet. Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3 näher beschrieben. Die Kultivierung erfolgte in Kulturflaschen mit einer Fläche von 175cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland), mit 18ml Vollmedium im Brutschrank bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

Tabelle 3 Datentabelle der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Gewebe	Morphologie
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Niere	Fibroblast
HEK-293	<i>Homo sapiens</i>	Niere, embryonal	Epithel
HSC-T6	<i>Rattus norvegicus</i>	Leber	Fibroblast

### 2.2.15. Passagieren von COS-7 Zellen

Bei 80-90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert, um weitere Zellteilungen zu ermöglichen.

Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (siehe Kapitel Puffer und Lösungen) gewaschen (~10ml). Nach erneutem Absaugen, wurden die Zellen mit 3ml Trypsin bei 37°C für 1-3min inkubiert um sie vom Flaschenboden zu lösen. Der Fortschritt der Trypsinierung kann unter dem Durchlichtmikroskop beobachtet werden. Um die gesamte Zellmenge herunterzulösen, kann durch behutsames Klopfen mechanisch nachgeholfen werden. Durch Zugabe von 7ml Vollmedium wurde das Trypsin inaktiviert. Mit den 10ml in der Flasche wurde der Boden mehrmals abgespült und danach die Zellsuspension in ein 50ml Sarstedt-Röhrchen für die Zentrifugation überführt (RT, 3min, 1.200rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in Medium wieder resuspendiert.

Passagieren von COS-7 Zellen erfolgte in der Regel alle 2 Tage im Verhältnis 1:4.

### 2.2.16. Aussäen von COS-7

Für die Transfektion von COS-7 Zellen wurden die Zellen am Vortag ausgesät. Dazu wurden sie, wie oben beschrieben, trypsinisiert, zentrifugiert und wieder in Vollmedium resuspendiert. Zum Aussäen wurde die Zellzahl im CASY-1-Zellzähler (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) bestimmt.

Die optimale Zellzahl für 6-well Platten beträgt 150.000 Zellen pro Well und für eine Zellkulturschale (Durchmesser: 10cm) 900.000 Zellen.

### 2.2.17. Transfektion von COS-7 Zellen

Für die Transfektion von Kulturschalen mit 10cm Durchmesser (oder 6-well Platte) wurde das DMEM (+/+) abgesaugt und durch 3ml (0,5ml pro 6-well Platte) DMEM (-/-) ersetzt. Für die Transfektion wurde ein Verhältnis DNA:Metafectene (Biontex GmbH, München, Deutschland) von 1:5 verwendet. Somit wurden 6µg (1µg pro 6-well) DNA mit 300µl (50µl pro 6-well) DMEM (-/-) und separat 30µl (5µl pro 6-well) Metafectene mit 300µl (50µl pro 6-well) DMEM (-/-) hergestellt und anschließend miteinander vermischt und für 20min bei RT inkubiert. 600µl (100µl pro 6-well) des Transfektionsgemisches wurden anschließend auf die Zellen pipettiert und das Kulturgefäß zum Mischen geschwenkt. Nach 4-6h Inkubation im Brutschrank wurde das DMEM (-/-) abgesaugt und durch 5ml (1,5ml pro 6-well) DMEM (+/+) ersetzt.

### 2.2.18. Komplexierung von Ölsäure mit BSA

Um die Löslichkeit von FA zu erhöhen, wurden diese mit *FA-free*- (FF-) BSA komplexiert. Die Stocklösung enthielt 4mM Ölsäure.

Es wurden Stocklösungen mit 8mM Ölsäure in 1xPBS und 2,7mM FF-BSA in 1xPBS hergestellt und anschließend unter leichtem vortexen vermischt. Dazu wurde die FF-BSA-Lösung tropfenweise zur Ölsäure hinzupipettiert.

### 2.2.19. Einbau von Triacylglyceriden in COS-7 Zellen

Um den Triacylglyceridgehalt der Zellen zu erhöhen und in Folge auch die Menge an Lipidtropfen, wurden die Zellen über Nacht mit 0,4mM Ölsäure in DMEM (+/+) beladen.

### 2.2.20. Bestimmung des Triacylglyceridgehalts von COS-7 Zellen

Um Lipide aus COS-7 Zellen zu extrahieren, wurde nach dem Waschen der Zellen mit 1xPBS, direkt Hexan:2-Propanol (3:2) in die Kulturschale pipettiert und für 10min bei RT geschwenkt. Das Volumen wurde in ein 15ml Sarstedt-Röhrchen überführt und die Extraktion wiederholt. Die vereinten Extrakte wurden anschließend in der Speed-Vac oder unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in 100µl Triton X-100 (0,1%) aufgenommen und bei 10min bei 37°C geschüttelt und anschließend gevortext. Die extrahierten Lipide wurden entweder bei -20°C aufbewahrt oder der TG-Bestimmung mit dem *Infinity<sup>TM</sup> Triglycerides*

*Liquid Stable Reagent* (Thermo Scientific, Middletown, VA) zugeführt. Dazu wurden 20µl Probe mit 200µl Reagenz vermischt und für 5min bei RT inkubiert und anschließend bei 492nm im Platerreader (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien) vermessen. Für die Eichgerade wurde eine Verdünnungsreihe mit Glycerol (*glycerol standard solution*, Sigma Aldrich) im Bereich 0-2,82nmol hergestellt. Die Ergebnisse wurden auf die Proteinmenge in dem jeweiligen Well bezogen. Dazu wurden die Kulturgefäße getrocknet und anschließend die Proteine mit 0,3M NaOH/0,1% SDS in Lösung gebracht. Nach 2h Schütteln bei RT konnten die Proteinkonzentrationen mit BCA bestimmt werden.

### **2.2.21. Präparation eines Zelllysates**

Die stärkste Expression wird 48 bis 72 Stunden nach der Transfektion erreicht. Für alle Versuche wurden die Zellen nach 48h geerntet.

Das Medium wurde entfernt und die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen anschließend in 3ml 1xPBS von der Kulturplatte geschabt. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Sarstedt-Röhrchen überführt und für 3min bei RT und 1.200rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets bei -20°C gelagert oder auf Eis gestellt und in Folge verwendet.

Der Aufschluss erfolgte in 200µl HSL-Puffer, welche 1xPi (Protease-Inhibitor) enthielt, mit dem Sonicator (Misonix Ultrasonic Liquid Processor, Misonix Inc., Farmingdale, NY) Folgendes Sonicator-Protokoll wurde verwendet: zwei Mal Amplitude 1 für 8sec mit 30sec Pause. Um die Zelltrümmer und die Kernfraktion zu entfernen, wurden die Zellen bei 1.000xg bei 4°C für 5min zentrifugiert. Die Konzentration des Zelllysats wurde anschließend auf 2mg/ml mit HSL-Puffer (+ 1xPi) eingestellt und die Lysate bei -20°C gelagert.

### **2.2.22. Fraktionierung und Isolierung von LD aus Zelllysaten von COS-7 Zellen**

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Lokalisation von Proteinen in der Zelle ist mittels Zellfraktionierung. Die Zellfraktionen werden dabei getrennt, auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mittels Western Blot wird die Verteilung bestimmter Proteine in den unterschiedlichen Fraktionen ermittelt.

Für die Isolierung von Lipidtropfen in einem Eppendorf-Gefäß (1,5ml) wurden zwei 10cm Zellkulturschalen mit COS-7 Zellen mit Ölsäure über Nacht beladenen, die Zellen am

darauffolgenden Tag geerntet und pelletiert und das Pellet in 500µl HSL-Puffer resuspendiert und, wie in Kapitel 2.2.21 beschrieben, aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden dann bei 1.000xg für 5min bei 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer und Kerne zu entfernen. Der Überstand wurde abgehoben und in ein frisches 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei 100.000xg für 30min bei 4°C zentrifugiert. Die LD-Fraktion ist als weiße, oberste Bande im Gefäß sichtbar. Darunter befindet sich die Cytosol-Fraktion und die Membranen befinden sich im Pellet. Die LD-Fraktion wurde mit einer blauen Pipettenspitze abgehoben (~100µl) und in ein frisches Eppi überführt, in 500µl HSL-Puffer verdünnt und erneut bei 100.000xg für 1h bei 4°C zentrifugiert. Die gereinigten LD wurden mit einer Kanüle abgehoben.

### 2.2.23. Triacylglycerid-Hydrolase-Assay

Für die Bestimmung der Triacylglycerid-Hydrolase-Aktivität von Enzymen wurde ein TGH-Assay durchgeführt. Bei dem Substrat handelte es sich um Tritium (<sup>3</sup>H) - markiertes Triolein (TO). Detergenzien wurden für die Präparation der Emulsion verwendet. Im Falle des TAG-Hydrolase Assays handelte es sich um Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylinositol (PI). BSA wurde zusätzlich als FA-Akzeptor hinzugefügt, da die Löslichkeit von freien Fettsäuren limitiert ist.

#### *Herstellung des Substrats*

Pro Ansatz wurden 100µl Substrat benötigt. Das Substrat setzte sich aus 0,32mM TO (Sigma-Aldrich), 10µCi <sup>3</sup>H-TO/ml (PerkinElmer, Brunn am Gebirge, Österreich) und 45µM PC/PI (Sigma-Aldrich) zusammen. Das organische Lösungsmittel wurde unter Stickstoff abgedampft und 2ml 0,1M Kaliumphosphatpuffer (KPB), pH 7,0 hinzupipettiert und für 30sec bei 20% Output mit dem Sonicator (Virtis, Gardiner, NJ) beschallt. Nach 30sec Pause wurde die Beschallung noch zwei Mal wiederholt. Die Substratlösung wurde trüb. Der restliche KPB wurde hinzugefügt und das Substrat für 15sec auf Eis inkubiert und anschließend FF-BSA mit einer Endkonzentration von 2% hinzupipettiert. Die spezifische Radioaktivität des Substrates wurde für die späteren Berechnungen ebenfalls vermessen.

#### *Durchführung des enzymatischen Tests*

100µl des Substrates wurden zu den Assay-Proben pipettiert und für 1h bei 37°C im Wasserbad unter konstantem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3,25ml Extraktionslösung I (siehe Kapitel 2.1.2) beendet. Weiters wurden 1,05ml Extraktionslösung II hinzugegeben und die Proben für 5sec gevortext. Die Proben wurden für 10min bei 1.000xg zentrifugiert und 200µl der oberen Phase in ein Scintillationsgefäß mit 2ml

Scintillations Cocktail (Roth) überführt und gut vermischt. Die Proben wurden anschließend in einem *Liquid Scintillation Counter* (Packard) gemessen.

Mit folgender Formel kann die Rate der Freisetzung an FA per Stunde und mg Protein berechnet werden:

$$\text{nmol FA/mg Protein/h} = \frac{(\text{cpm sample} - \text{cpm blank}) * (V_1/V_2)}{(\text{cpm substrat/nmol FA}) * \text{mg Protein} * 0,715 * t}$$

$V_1$ ... Gesamtvolumen der oberen Phase (2,45ml)

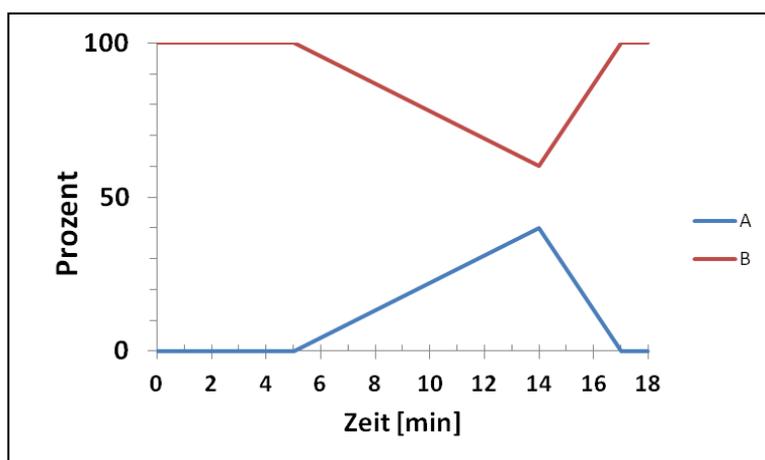
$V_2$ ... Volumen eingesetzt in Flüssigszintillation (0,2ml)

t... Inkubationszeit (1h)

nmol FA... 90nmol FA/100 $\mu$ l 0,3mM TAG-Substrat

#### 2.2.24. Retinylester-Hydrolase-Assay

Für die Messung der Retinylester-Hydrolase-Aktivität wurden zwei verschiedene Substrate verwendet, die zwei unterschiedliche physiologische Bedingungen für die Aktivität des Enzyms simulieren sollen.



**Abbildung 8 Auftrennung der Proben mit Hilfe eines binären Lösungsmittelgradienten** Die Probe wurde im gleichen Lösungsmittel injiziert, mit dem die HPLC-Säule äquilibriert wurde. Am Ende des Gradienten bestand ein Lösungsmittelverhältnis von 40% A zu 60% B. Anschließend wurde die Säule erneut mit 100% B äquilibriert. Die Flussrate betrug 1ml/min. Laufmittel: A: Toluol; B: Methanol

Für das erste Substrat wurden Retinylpalmitat (100 $\mu$ M) und PC (90 $\mu$ M) gemeinsam abgedampft und in einem 100mM KPB mit Hilfe eines Sonicators in Lösung gebracht. Abschließend wurde FF-BSA mit einer Endkonzentration von 4% hinzupipettiert und für 2sec gevortext. Substrat 2 setzte sich aus 100 $\mu$ M Retinylpalmitat, 40mM Natriumcholat und 100mM Tris (pH 8) zusammen.

Für den Assay wurden jeweils 100µg Protein in 100µl HSL-Puffer in 2ml Eppendorf-Gefäße vorgelegt und mit 100µl Substrat für 1h bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 200µl Methanol, dem ein interner Standard (0,5µM Retinylacetat) zugesetzt wurde. Anschließend wurde 1ml Hexan pipettiert und das Probengefäß für 5sec gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 3min bei 10.000rpm. 800µl der Hexanphase wurden abgehoben, in ein neues Eppendorf-Gefäß (1,5ml) überführt und eingedampft. Die Lipide wurden in 1ml Methanol in Lösung gebracht und die Proben für 5sec gevortext. 100µl wurden in Probenröhrchen überführt und 20µl davon in die HPLC injiziert. Die Auftrennung erfolgte mit einem Lösungsmittelgradienten aus Toluol (Laufmittel A) und Methanol (Laufmittel B) über 18min. Der Gradient ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Flussrate betrug 1ml/min. Die Retentionszeiten für Retinol, Retinolacetat und Retinolpalmitat betragen 5,4min, 7,1min beziehungsweise 12,0min.

#### **2.2.25. Phospholipid-Hydrolase Assay**

Für die Bestimmung der Phospholipid-Hydrolyse wurde ein Substrat aus 500µM PC, 50mM KPB (pH 7,4) und 2% FF-BSA hergestellt. Für den Assay wurden 60µg Protein in 100µl HSL-Puffer eingesetzt und mit 100µl Substrat für 1h bei 37°C inkubiert.

Eine Standardreihe wurde mit dem FA-Standard (0-500µM) erstellt. 80µl der Probe beziehungsweise des Standards wurden in 96-well Platten vorgelegt und zunächst mit 150µl NEFA-Lsg A (Wako Diagnostics, Richmond, USA) für 10min bei 37°C inkubiert und anschließend nach Zugabe von 75µl NEFA-Lsg B (Wako Diagnostics, Richmond, USA) erneut für 10min bei 37°C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 560nm im Platten-Lesegerät (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien).

#### **2.2.26. Monoacylglycerid-Hydrolase Assay**

Die Bestimmung der Monoacylglycerid-Hydrolase-Aktivität erfolgte durch die Messung des freigesetzten Glycerols in der Probe.

Das Substrat setzte sich aus folgende Bestandteile zusammen: 6,6% FF-BSA, 75mM KPB (pH 7.4), 1mM 1,3-rac-Oleoylglycerol (Sigma Aldrich).

Zu Beginn wurden 20µg Lysat in 10µl HSL-Puffer (ohne DTT) in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt und 100µl des Substrats hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter Schütteln (300rpm) für 30min. Die Reaktion wurde mit 100µl Chloroform gestoppt.

Nach gründlichem Vortexen (5sec) wurden die Proben für 5min bei 10.000rpm zentrifugiert. 50µl der wässrigen Phase wurden in eine 96-well Platte überführt und mit 200µl *Free glycerol reagent* (Sigma Aldrich) versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption im Platten-Lesegerät (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien) bei 492nm vermessen.

Als Standardreihe wurde zusätzlich 50µl Glycerol (*glycerol standard solution*, Sigma Aldrich) in verschiedenen Konzentrationen (0,56-0,07mM) vermessen.

### **2.2.27. Statistische Auswertung**

Alle Messwerte sind als Mittelwerte + oder - Standardabweichung aus Doppel- oder Dreifachbestimmungen dargestellt. Zur Berechnung eines statistischen Unterschiedes wurde ein ungepaarter, zweiseitiger *Student's t-test* verwendet. Die folgenden Signifikanzniveaus wurden verwendet:

p > 0.05 nicht signifikant

p < 0.05 \*

p < 0.01 \*\*

p < 0.001 \*\*\*

### 3. RESULTATE – AUP1

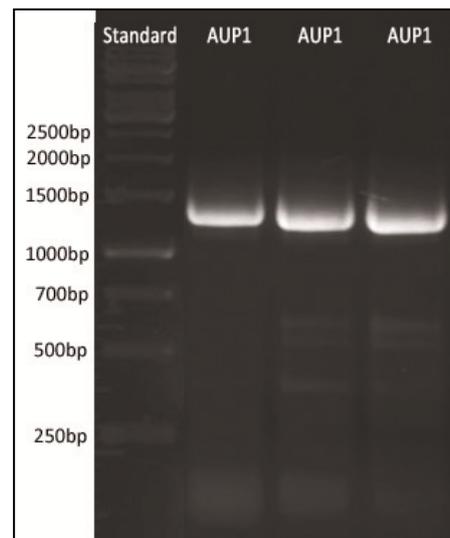
Im ersten Teil der Masterarbeit sollte die Rolle von AUP1 in der Lipolyse untersucht werden. Dazu wurde das AUP1-Gen in einen Vektor kloniert, in Säugetierzellen exprimiert und die Zelllysate für einen Triacylglycerid-Hydrolase-Assay verwendet. Weiters wurde ein Fragment des klonierten AUP1-Gens zur Erstellung einer radioaktiv-markierten Sonde für den Northern Blot verwendet, um die Expression von AUP1 in Mausgeweben zu untersuchen.

#### 3.1. Klonierung von AUP1 in pcDNA/HisMax<sup>©</sup> und Expression in COS-7 Zellen

Das murine AUP1-Gen mit einer Gesamtgröße von 3.028bp befindet sich auf Chromosom 6 und besteht aus 12 Exons. Das Transkript (mRNA) besitzt eine Größe von 1.527nt. Ein DNA-Fragment mit der kodierenden Sequenz (*coding sequence*, CDS) von AUP1 wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pcDNA/HisMax<sup>™</sup> C kloniert.

##### 3.1.1. PCR zur Amplifizierung von AUP1

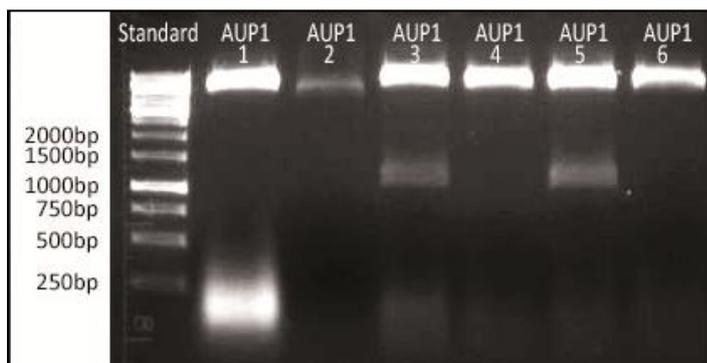
Zur Amplifizierung der CDS wurde cDNA (*complementary DNA*), die aus muriner Hoden-RNA hergestellt wurde, verwendet. Mit den in Kapitel 2.1.4 beschriebenen Primern *AUP1\_fw\_EcoRI* und *AUP1\_rv\_XbaI* und dem in Kapitel 2.2.1 verwendeten PCR-Programms mit einer *Annealing*-Temperatur von 58°C entstand ein 1.335nt großes Fragment mit Restriktionsschnittstellen für die Endonucleasen EcoRI und XbaI. Der gesamte PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 9). Die entsprechenden Banden (~1.300nt) wurden ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.



**Abbildung 9 Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte auf einem 1,5% Agarosegel** Mittels sequenzspezifischen Primern für AUP1 wurde aus der cDNA, hergestellt aus murinem Hoden, das Genfragment amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Lane1: 1kb Standard (GeneRuler<sup>™</sup> 1kb, Fermentas Life Sciences); Lane 2-4: PCR-Produkt murines AUP1

### 3.1.2. Klonierung und Restriktionsanalyse

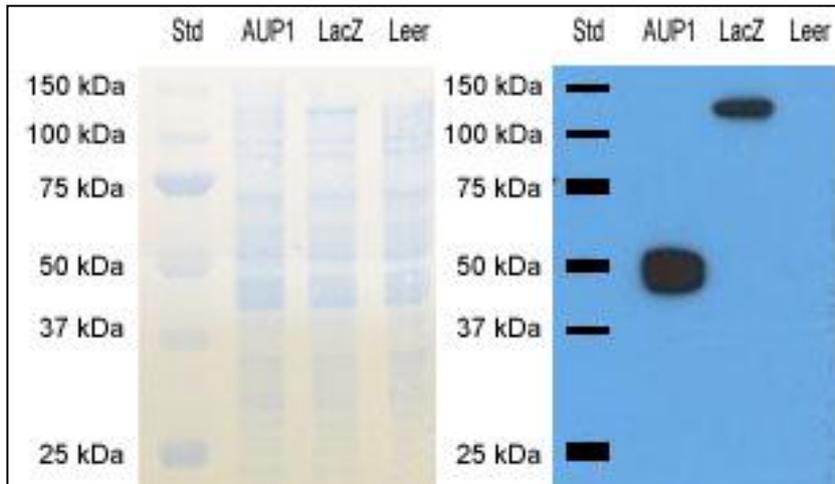
Die eluierten PCR-Produkte (Insert) und der Vektor wurden im nächsten Schritt mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI geschnitten. Das Insert wurde anschließend mittels T4 Ligase in den Vektor ligiert und in chemisch-kompetente *E.coli* Zellen transformiert. Von sechs Kolonien wurde am darauffolgenden Tag jeweils eine ONC für eine Miniprep angesetzt. Mit einer Restriktionsschnittkontrolle der Minipreps wurden die positiven Klone identifiziert. Als erste Restriktionsschnittkontrolle wurde das Plasmid mit EcoRI und XbaI fragmentiert. Da sich in diesem Fall aus dem Stopcodon und der Restriktionsschnittstelle für XbaI eine DAM-Methylierungsstelle ergibt und XbaI DAM-sensitiv ist, wurde direkt die zweite Restriktionsschnittkontrolle durchgeführt. Hierfür wurde das Konstrukt mit EcoRI und XhoI geschnitten. Als Ergebnis wurden zwei Banden mit 1.100nt und 5.450nt erwartet. Nach Auftrennung am Agarosegel konnten zwei Klone identifiziert werden, die das Insert enthielten (Abbildung 10). Die obere Bande bei den positiven Klonen kann aufgrund des hochprozentigen Agarosegels und der kurzen Laufzeit des Gels nicht eindeutig einem Standard zugewiesen werden. Aus den positiven Klonen wurde ein Klon für eine Maxiprep ausgewählt.



**Abbildung 10 Elektrophoretische Auftrennung der Schnittfragmente nach dem Restriktionsverdau** Nach der Transformation wurden sechs Kolonien für eine Restriktionskontrolle ausgewählt. Dazu wurde jeweils eine ONC der Kolonien angelegt und jeweils die Plasmid-DNA mittels Miniprep isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI geschnitten und die Schnittfragmente in einem 1,5% Agarosegel getrennt. Lane1: 1 kb Standard (GeneRuler™ 1kb, Fermentas Life Sciences); Lane 2-7: AUP1-Minipreps 1-6

Die Maxiprep wurde erneut einer Restriktionsschnittkontrolle unterzogen und anschließend sequenziert (Daten nicht gezeigt). Das *Alignment* des Sequenzierergebnisses mit der Sequenz von AUP1 betrug 100%. Der 6xHis-Tag, das Start- und Stopcodon konnten in der Sequenz identifiziert werden. Außerdem wurden kein *frame-shift* und keine Mutationen festgestellt. Die Maxiprep wurde für die Transfektion des Vektor-Konstruktes in COS-7 Zellen verwendet.

### 3.1.3. Expression von AUP1 in COS-7 Zellen



**Abbildung 11 Expressionskontrolle mittels Western Blot** Die Expressionsvektoren wurden in COS-7 Zellen transfektiert. Nach 48h wurden die Zellen in SDS-Puffer aufgenommen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mittels anti-N-terminalen His-Antikörper wurden die Proteine detektiert. rechts: Western Blot, links: die Coomassie-Färbung der Membran als Auftragungskontrolle

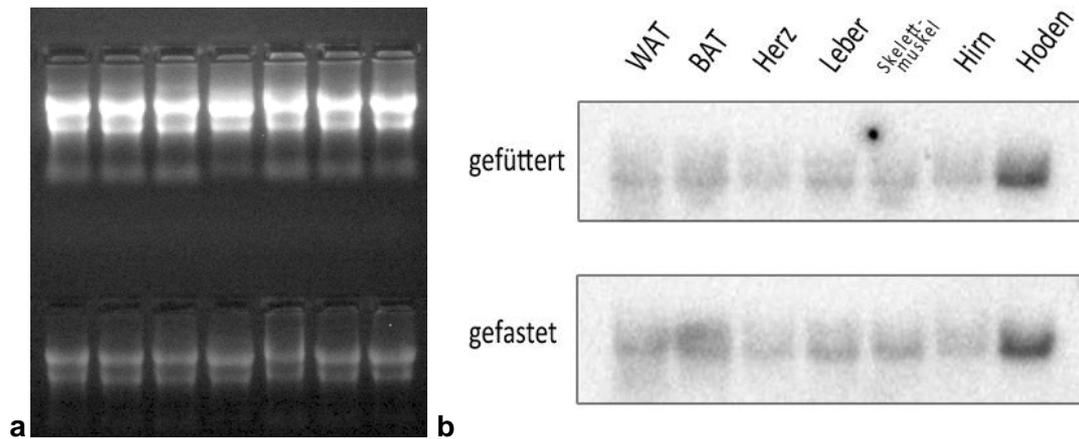
Für den Triacylglycerid-Hydrolase Assay wurden COS-7 Zellysate verwendet, die mit AUP1 transfektiert wurden. Dazu sollte die Expression bestmöglich funktionieren. Durch eine Testtransfektion und anschließende Analyse am Western Blot, wurden die optimalen Transfektionsverhältnisse ermittelt. Als Kontrolle wurde ein LacZ-

HisMax™ C-Konstrukt transfektiert. Die Zellen wurden nach 48h geerntet und eine entsprechende Proteinmenge am Western Blot aufgetragen. Bei AUP1 mit N-terminalen His-Tag zeigte sich eine Bande bei ungefähr 55kDa und für LacZ bei 120kDa. Die Intensität der Banden ließ auf eine gute Expression von AUP1 schließen. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen des Anti-N-terminalen-His Anti-körpers wurde in der letzten Reihe ein Zellysat von COS-7 Kontrollzellen (Leer) aufgetragen. Es zeigten sich keine un-spezifischen Banden.

Abbildung 11 zeigt die Western Blot Analyse und die Coomassie gefärbte Membran als Ladekontrolle.

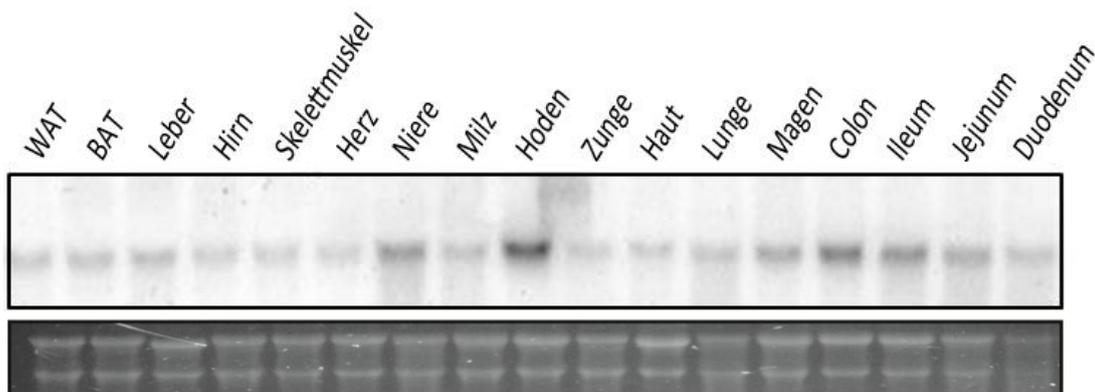
## 3.2. Untersuchung der Expression von AUP1 in verschiedenen Mausgeweben

Um die Expression von AUP1 in verschiedenen Mausgeweben zu untersuchen, wurde ein Northern Blot durchgeführt. Aus der Maxiprep wurde mit EcoRI und XhoI eine 1.080bp große Sonde isoliert. Diese wurde mit  $^{32}\text{P}$  markiert. Abbildung 12b zeigt einen Gewebebplot von



**Abbildung 12a: Ladekontrolle Gewebeblot – gefastet/gefüttert** Ethidiumbromid-Färbung der am Agarosegel aufgetragenen RNA als Ladekontrolle. **b: Gewebeblot – gefastet/gefüttert** RNA wurde aus den angeführten Geweben isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde diese Membran mit einer <sup>32</sup>P-AUP1-Sonde inkubiert und die Bindung durch Auflegen eines Phosphorscreens detektiert. Der Phosphorscreen wurde dazu über Nacht aufgelegt. In der oberen Reihe sind Gewebe von gefütterten Mäusen aufgetragen, in der unteren Reihe von gefasteten Mäusen. Abkürzungen: WAT= weißes Fettgewebe; BAT= braunes Fettgewebe

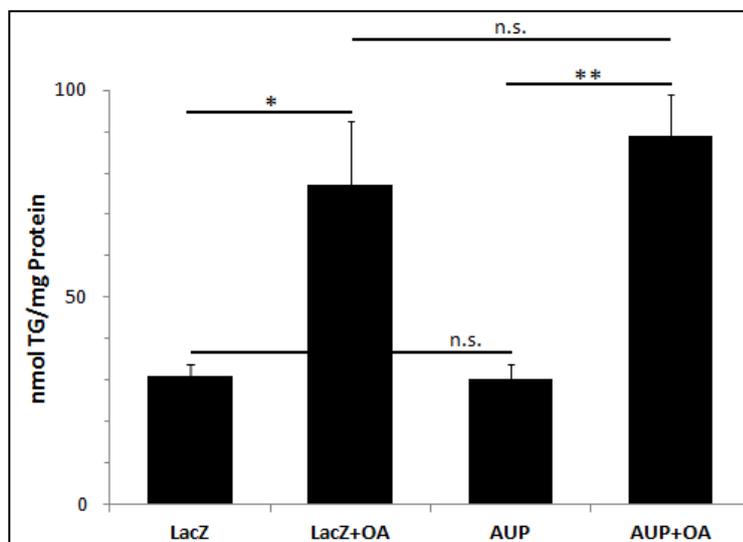
gefasteten und gefütterten Tieren. Die höchste Expression zeigte sich im Hoden, gefolgt von WAT, BAT, Leber und Skelettmuskel. Die AUP1-Expression war nur in den Geweben von gefasteten und gefütterten Tieren vergleichbar. Abbildung 12a zeigt die Ladekontrolle. Mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz der am Agarosegel aufgetragenen RNA wurde die eingesetzte Menge an RNA kontrolliert und zeigte eine gleichmäßige Beladung. Mit dem Gewebeblot in Abbildung 13 wurde die Expression in 17 verschiedenen Geweben untersucht. Die Expression von AUP1 war in allen Geweben sichtbar. Die stärkste Expression zeigt sich wieder im Hoden. Im Magen, Colon, Ileum und Niere war ebenfalls eine erhöhte Expression detektierbar.



**Abbildung 13 Gewebeblot – Expressionsmuster von AUP1 in verschiedenen Geweben** oben: RNA wurde aus den Geweben isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde diese Membran mit einer <sup>32</sup>P-AUP1-Sonde inkubiert und die Bindung durch Auflegen eines Phosphorscreens detektiert. Der Phosphorscreen wurde dazu über Nacht aufgelegt. unten: Ethidiumbromid-Färbung der am Agarosegel aufgetragenen RNA als Ladekontrolle. Abkürzungen: WAT= weißes Fettgewebe; BAT= braunes Fettgewebe

### 3.3. Effekt von AUP1 auf den zellulären TAG-Gehalt von COS-7 Zellen

Klemm et al<sup>33</sup> berichtete, dass die Expression von AUP1 zu einer erhöhten Speicherung von Triacylglyceriden und Bildung von Lipidtropfen führt. In jener Arbeit wurde dies mittels *Oil Red O* Färbungen von LD ermittelt. In Folge sollte ein Effekt von AUP1 auf den zellulären TAG-Gehalt untersucht werden. Dazu wurden COS-7 Zellen mit AUP1 transfektiert, die



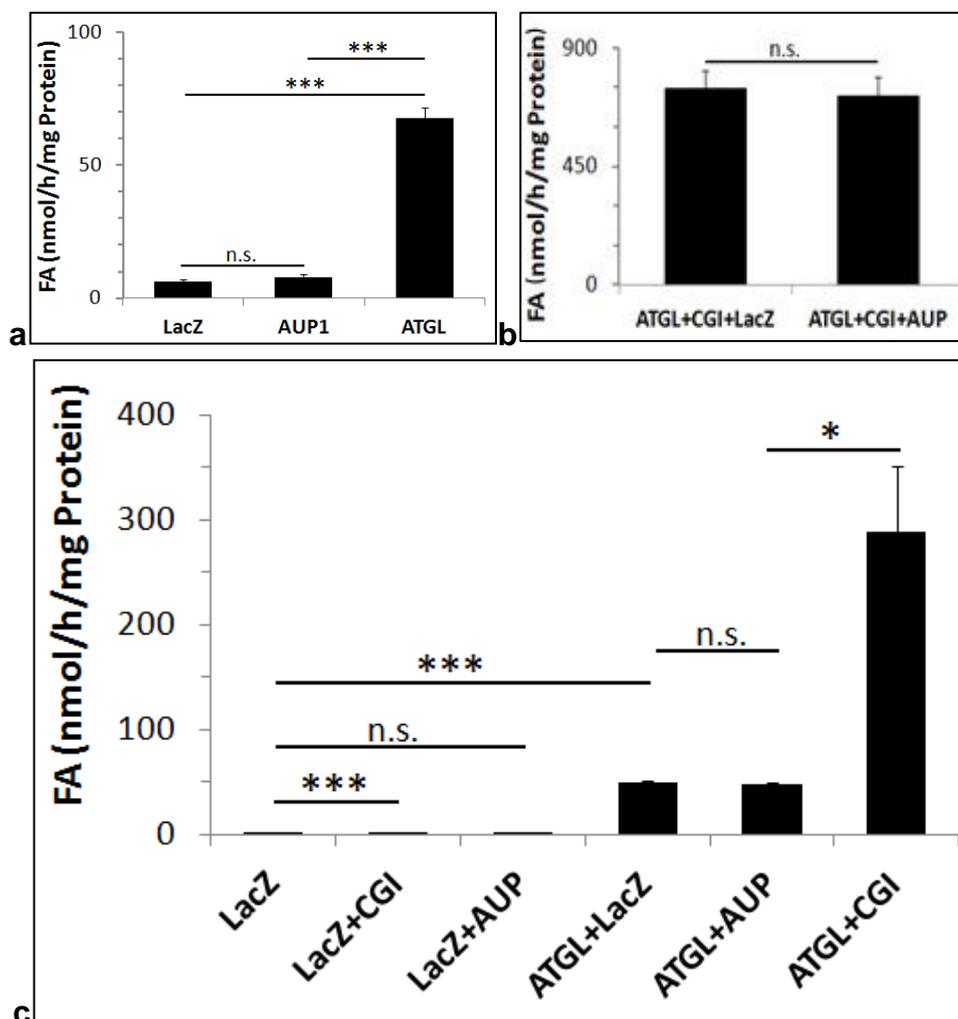
**Abbildung 14 Darstellung des Triacylglycerid-Gehalts von COS-7 bei LacZ und AUP1-Expression im beladenen und unbeladenen Zustand** AUP1 und LacZ wurden in COS-7 Zellen exprimiert und drei von sechs Wells für 16h mit 200 $\mu$ M Ölsäure (OA) beladen. Am darauffolgenden Tag wurden die Lipide extrahiert und der TAG-Gehalt bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem 2-seitigen, ungepaarten *Student's t-test* \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; n.s.=nicht signifikant,  $p > 0,05$

Zellen mit Ölsäure beladen und am nächsten Tag eine TAG-Bestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurde der Effekt einer Ölsäure-Beladung untersucht. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. LacZ diente als Negativkontrolle. Unbeladene Zellen mit LacZ- und AUP1-Expression wiesen eine vergleichbare Menge an TAG in den Zellen auf. Bei der Beladung mit Ölsäure war bei den Zellen mit LacZ- und AUP1-Expression eine Erhöhung des TAG-Gehaltes, im Vergleich zu unbeladenen

Zellen, zu beobachten. Der TAG-Gehalt war jedoch auch nach Ölsäurebeladung zwischen LacZ- und AUP1-transfektierten Zellen vergleichbar. In COS-7 (und HEK-293 Zellen, Daten nicht gezeigt) konnte keine signifikante Steigerung der Triacylglycerid-Menge in Zellen mit AUP1-Expression festgestellt werden.

### 3.4. Effekt von AUP1 auf die enzymatische Aktivität von Lipasen

Um den Effekt von AUP1 auf die enzymatische Aktivität lipolytischer Enzyme *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Triacylglycerid-Hydrolase Assay durchgeführt. Dazu wurden COS-7-Zelllysate aus LacZ-, AUP1-, ATGL- und CGI-58-transfektierten Zellen hergestellt. Als Substrat wurde  $^3\text{H}$ -Triolein, emulgiert in PC/PI, verwendet. In den Abbildungen 15a-c sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 15 a-c Einfluss von AUP1 auf die lipolytischen Enzyme im TAG-Hydrolase Assay** Für die TAG-Hydrolase-Aktivitätsbestimmung wurden COS-7-Zelllysate mit dem angegebenen exprimierten Protein verwendet. 20µg Lysatprotein wurden jeweils eingesetzt und 1h bei 37°C mit einem  $^3\text{H}$ -markiertem Triolein-Substrat inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion und der Extraktion der Fettsäuren wurde die Radioaktivität im  $\beta$ -Counter (Packard) vermessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem 2-seitigen, ungepaarten *Student's t-test* \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$  \*\*\*= $p < 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant,  $p > 0,05$

In Abbildung 15a ist die hydrolytische Aktivität von AUP1-Lysate im Vergleich zu der Negativkontrolle LacZ-Lysat und der Positivkontrolle ATGL-Lysat dargestellt. Wie erwartet zeigte ein AUP1-Lysat im Vergleich zur Kontrolle (LacZ) keine erhöhte Aktivität. Abbildung 15c zeigt den Effekt von AUP1 auf die ATGL-Aktivität im TAG-Hydrolase Assay. Als Negativkontrollen wurden ein CGI-58-Lysat und ein AUP1-Lysat jeweils mit gleichen Mengen LacZ-Lysat gemischt und inkubiert. Das LacZ+CGI-Lysat wies im Gegensatz zu LacZ+AUP eine zu der Negativkontrolle LacZ+LacZ signifikant höhere Aktivität auf. Die Zugabe des CGI-58-Lysats erhöhte die endogene Aktivität im COS-7-Lysat. Das ATGL+LacZ-Lysat wies eine 50-fach höhere Aktivität als die Negativkontrolle auf. Die gleichzeitige Inkubation von ATGL mit AUP1 führte aber zu keiner weiteren Erhöhung. Als Positivkontrolle wurde ein ATGL-Lysat mit einem Lysat, das seinen Aktivator CGI-58 enthielt, inkubiert. Abbildung 15b zeigt, ob AUP1, die in Abbildung 15c gezeigte Aktivierung der ATGL durch CGI-58, beeinflussen kann. Die Zugabe des AUP1-Lysats führte zu keiner Änderung der hydrolytischen Aktivität gegenüber Triacylglyceriden.

In Summe waren die Aktivitäten der Enzyme der Lipolyse durch Zugabe von AUP1 nicht verändert.

## 4. RESULTATE – PLRP2

Im zweiten Teil der Masterarbeit sollte die intrazelluläre Aktivität von PLRP2 untersucht werden. Dazu wurden das PLRP2- und CLPS-Gen in einen Vektor kloniert, in Säugetierzellen exprimiert, Zellysate hergestellt und für die Charakterisierung der Substratspezifität diese für Aktivitätsassays verwendet. Weiters wurde die Sekretion von PLRP2 in Säugetierzellen und die endogene Expression von PLRP2 in Mausgeweben untersucht.

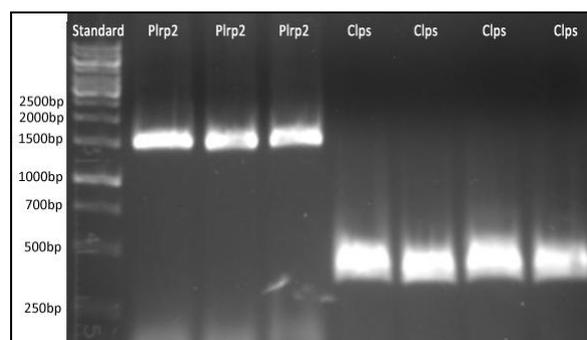
### 4.1. Klonierung von PLRP2 in pFLAG-CMV-5.1 und Expression in COS-7 Zellen

Die murinen Gene für PLRP2 und CLPS, mit jeweils einer Gesamtgröße von 23.156bp und 3.251bp, befinden sich auf Chromosom 19 beziehungsweise Chromosom 17 und bestehen aus 12 beziehungsweise 3 Exons. Die mRNA von PLRP2 besitzt eine Größe von 1.593nt und von CLPS 494nt. DNA-Fragmente mit der kodierenden Sequenz von PLRP2 und CLPS wurden mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pFLAG-CMV-5.1 kloniert. Die Proteine wurden in COS-7 Zellen exprimiert und Lysate für Enzymaktivitätsassays verwendet.

#### 4.1.1. PCR zur Klonierung von PLRP2 und CLPS

Für die Amplifizierung der CDS wurde für PLRP2 cDNA aus dem Magen der Maus und für CLPS aus dem Hoden verwendet. Für die PCR wurden folgende Primer verwendet: *PLRP2\_fw\_EcoR1*, *PLRP2\_rv\_XbaI*, *CLPS\_fw\_EcoR1*, *CLPS\_rv\_XbaI* (siehe Kapitel 2.1.4). In Kapitel 2.2.1 findet sich das verwendete PCR-Programm. Die *Annealing*-Temperatur für PLRP2 betrug 52°C und

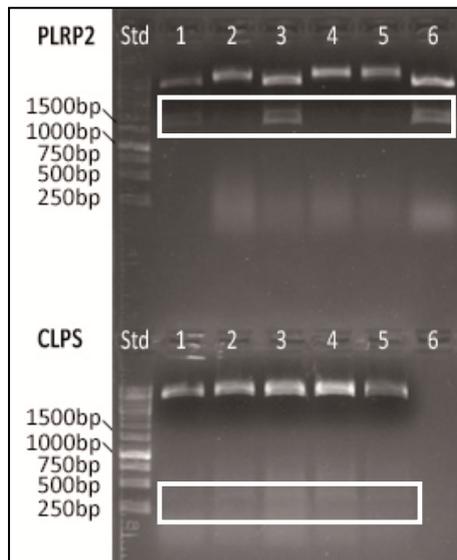
für CLPS 58°C. Für PLRP2 und CLPS entstanden 1.464nt und 357nt große Fragmente. Der



**Abbildung 16 Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte auf einem 1,5% Agarosegel** Mittels sequenzspezifischen Primern für PLRP2 und CLPS wurde aus der cDNA, hergestellt aus murinem Magen für PLRP2 und murinem Hoden für CLPS, das Genfragment amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend mit einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Lane 1: 1 kb Standard; Lane 2-4: PCR-Produkt murines PLRP2; Lane 5-8: PCR-Produkt murines CLPS

gesamte PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 16). Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.

#### 4.1.2. Klonierung und Restriktionsanalyse



**Abbildung 17 Elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsanalyse**

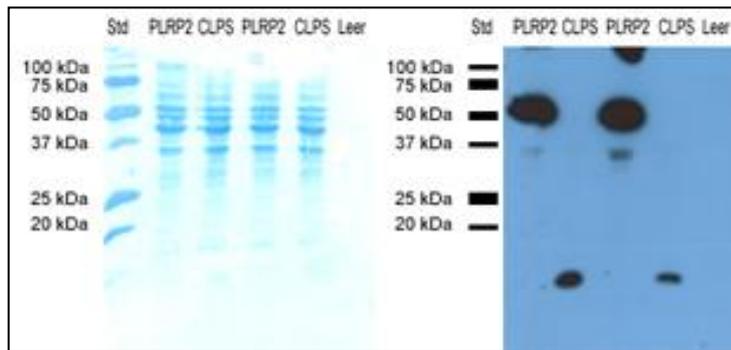
Dazu wurde jeweils eine ONC zur Selektion von positiven Klonen angesetzt und die Plasmid-DNA mittels Miniprep isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI geschnitten und die Schnittfragmente mittels 1,5%igen Agarosgel getrennt. Lane1: 1 kb Standard (GeneRuler™ 1kb, Fermentas Life Sciences); oben: Lane 2-7: PLRP2-Minipreps 1-6; unten: Lane 2-7: CLPS-Minipreps 1-6

Die eluierten Inserts und der Vektor wurden im nächsten Schritt mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI geschnitten, in den Vektor ligiert und in chemisch-kompetente Zellen transformiert. Von jeweils sechs Kolonien wurden am darauffolgenden Tag Minipreps hergestellt. Zur Restriktionsanalyse wurden die Plasmide mit EcoRI und XbaI fragmentiert. Bei einem „positiven“ Klon sollte für PLRP2 ein DNA-Fragment mit einer Größe von ~1.400nt und für CLPS mit ~350nt und je ein Fragment (~4.700nt) für den Vektor sichtbar sein. Nach Auftrennung am Agarosegel konnten drei „positive“ Klone für PLRP2 und fünf für CLPS identifiziert werden (Abbildung 17). Aus den „positiven“ Klonen wurde jeweils ein Klon für eine Plasmid-Maxiprep ausgewählt. Die Maxiprep wurde erneut einer Restriktionsanalyse unterzogen und anschließend sequenziert (Daten nicht gezeigt). Das *Alignment* des Sequenzierergebnisses mit der Nukleotidsequenz von PLRP2 und CLPS betrug 100%. Der C-terminale FLAG-Tag und das Startcodon konnten in der Sequenz identifiziert werden. Außerdem wurden kein *frame-shift* und keine Mutationen festgestellt.

#### 4.1.3. Expression von PLRP2 und CLPS in COS-7 Zellen

Um die Rolle von PLRP2 in diversen *in vivo* und *in vitro* Experimenten zu untersuchen, wurde zunächst die Expression der Proteine überprüft. Dies wird durch eine Testtransfektion und anschließender Analyse am Western Blot durchgeführt. Als Kontrolle für unspezifische

Bindungen des Anti-FLAG Antikörpers wurde in der letzten Gelspur ein Zellysate von COS-7 Zellen aufgetragen. Es zeigten sich keine unspezifischen Banden. Bei PLRP2 und CLPS mit



C-terminalen FLAG-Tag wurden Banden bei ungefähr 55kDa und 13kDa detektiert. Weiters wurden Banden bei 130 und 37kDa detektiert. In Abbildung 18 sind der Western Blot und als Ladekontrolle die Coomassie-gefärbte Membran dargestellt.

**Abbildung 18 Expressionskontrolle mittels Western Blot** Die Plasmidkonstrukte wurden in COS-7 Zellen transfektiert und nach 48h geerntet. Die Zellen wurden jeweils direkt in 200µl 1xSDS aufgenommen und davon 10µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mittels anti-FLAG-Antikörper wurden die Proteine detektiert.

rechts: Western Blot, links: die Coomassie-Färbung der Membran als Auftragskontrolle

## 4.2. Experimente zur Substratspezifität, Aktivierung durch CLPS und Effekt von Gallensäure auf die Aktivität von PLRP2

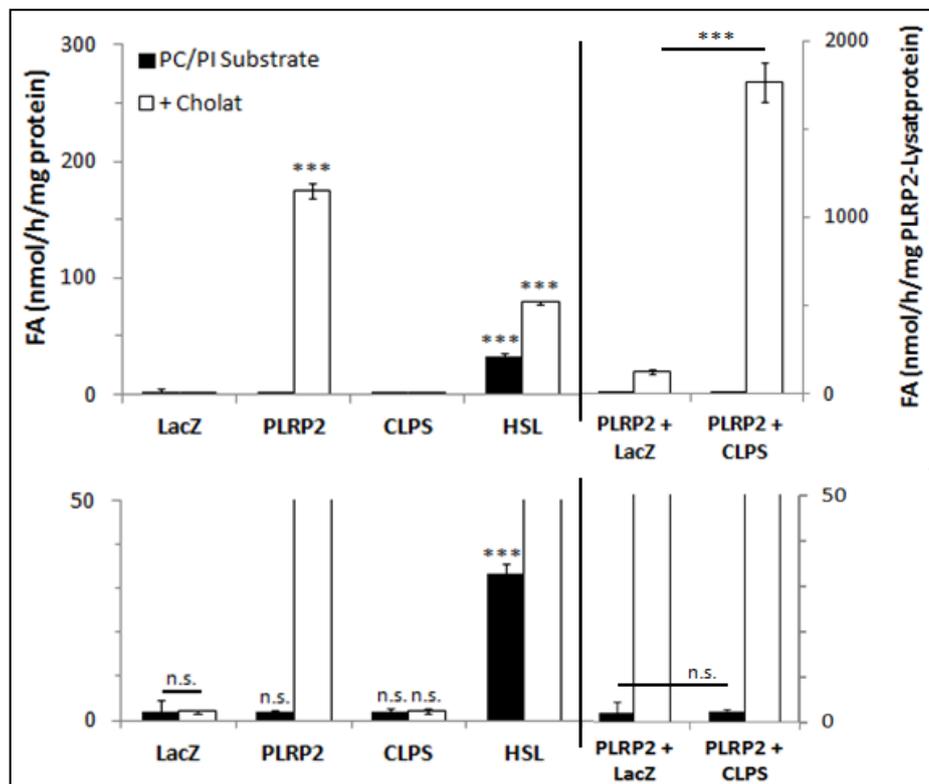
Im Gegensatz zur PTL besitzt PLRP2 ein breites Substratspektrum<sup>63</sup>. In den Arbeiten wurde mit Enzyme gearbeitet, die aus unterschiedlichen Organismen aufgereinigt wurden. Weiters scheint die Aktivitätssteigerung durch Gallensäuren und die Notwendigkeit von CLPS für die Hydrolyse bestimmter Substrate zwischen verschiedenen PLRP2 Homologen zu variieren. So besitzt die humane PLRP2 keine Aktivität in Gegenwart von Gallensäuren und kann auch nicht durch Zugabe von CLPS aktiviert werden.<sup>70</sup> PLRP2 aus dem Pferd hingegen wird auch ohne CLPS von Gallensäuren aktiviert.<sup>71</sup> Diese Unterschiede in den Homologen der Lipase machen es deshalb schwierig, PLRP2 eine allgemeine physiologische Funktion zuzuordnen.

Aus diesem Grund wurde zum Beginn der Arbeit eine Charakterisierung der Enzymaktivität der murinen PLRP2 durchgeführt.

#### 4.2.1. Bestimmung der Triacylglycerid (TAG)-Hydrolase-Aktivität

Als erster Aktivitätstest wurde ein TAG-Hydrolase Assay durchgeführt. Es wurden zwei unterschiedliche Substrate verwendet. Als erstes Substrat wurde  $^3\text{H}$ -Triolein emulgiert in PC/PI verwendet. Für das zweite Substrat wurden zusätzlich 5mM Natriumcholat zupipettiert.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse für die *in vitro* TAG-Hydrolase-Aktivitätsbestimmungen. Die gefüllten Balken zeigen jeweils die TAG-Hydrolase-Aktivität in Abwesenheit von Cholat, während die leeren Balken die Aktivität in Anwesenheit von Cholat darstellen. Als Negativkontrolle wurde ein LacZ-Lysat eingesetzt, das die endogene TAG-Hydrolase Aktivität zeigte. Als Positivkontrolle wurde ein HSL-Lysat eingesetzt. Das HSL-Lysat zeigte im PC/PI Substrat eine 17-fach und im Cholat-Substrat eine 40-fach höhere Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle. Das PLRP2-Lysat zeigte lediglich in der Anwesenheit von Cholat eine hydrolytische Aktivität, welche doppelt so hoch war, wie die Positivkontrolle. Das



**Abbildung 19 Messung der hydrolytischen Aktivität von PLRP2 gegenüber Triacylglyceriden** Für die TAG-Hydrolase-Aktivitätsbestimmung wurden COS-7-Zelllysate mit dem angegebenen exprimierten Protein verwendet. 20µg Lysatprotein wurden für 1h bei 37°C mit dem  $^3\text{H}$ -markiertem Triolein-Substrat inkubiert. Nach der Extraktion der freigesetzten Fettsäuren wurde die Radioaktivität im  $\beta$ -Counter (Packard) vermessen. oben: Gesamtansicht des Diagramms; unten: Diagrammbereich 0-50nmol/h/mg Protein herausgehoben. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Bestimmungen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem 2-seitigen, ungepaarten *Student's t-test*: \*\*\*= $p < 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant,  $p > 0,05$ . Es wurde jeweils gegen die Werte der Negativkontrolle LacZ getestet.

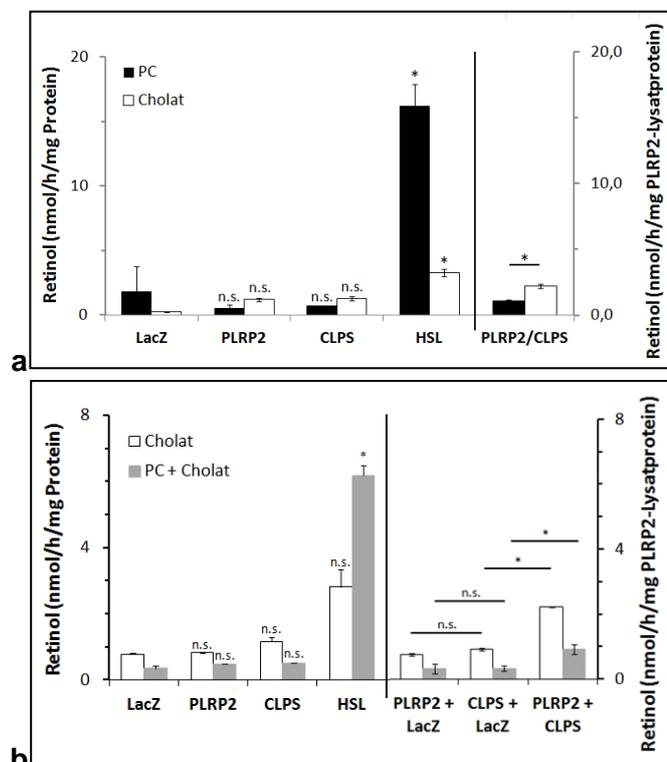
CLPS-Lysat zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine erhöhte Aktivität. Die Zugabe eines CLPS-Lysats zum PLRP2-Lysat führte nur beim Cholat-Substrat zu einer verstärkten hydrolytischen Aktivität. Beim PC/PI-Substrat konnte die hydrolytische Aktivität des PLRP2-Lysats durch das CLPS-Lysat nicht erhöht werden. Als Positivkontrolle für Ansätze mit doppelter Proteinmenge, wurde das PLRP2-Lysat mit gleicher Menge LacZ-Lysat inkubiert.

#### 4.2.2. Bestimmung der Retinylester (RE)-Hydrolase-Aktivität

In diesem Assay wurde die hydrolytische Aktivität von PLRP2 gegenüber Retinylpalmitat (RP) bestimmt. Weiters wurde eine Änderung der Aktivität durch Zugabe von Gallensalzen und CLPS untersucht. Für die Bestimmung wurden drei unterschiedliche Substrate verwendet: (1) RP emulgiert in PC/PI, (2) RP emulgiert in Natriumcholat, (3) RP emulgiert in PC/PI mit 5mM Cholat.

Abbildung 20a und Abbildung 20b zeigen die Ergebnisse für die *in vitro* Retinylester-Aktivitätsbestimmungen.

Die schwarzen Balken zeigen die Hydrolyse von RE im PC-Substrat, die weißen Balken im Cholat-Substrat und die grauen Balken im PC+Cholat-Substrat. Als Negativkontrolle wurde wiederum ein LacZ-Lysat und als Positivkontrolle ein HSL-Lysat verwendet. Das PLRP2- und CLPS-Lysat zeigten in keinem der Substrate eine erhöhte Aktivität im Vergleich zum Kontrolllysat LacZ. Eine verstärkte RP-Hydrolyse durch das PLRP2-Lysat wurde durch Zugabe des CLPS-Lysats bei beiden Substraten erreicht. Im reinen Cholat-Substrat zeigte das HSL-Lysat keine Aktivität, im PC+Cholat wurde eine stark verminderte Aktivität beobachtet.

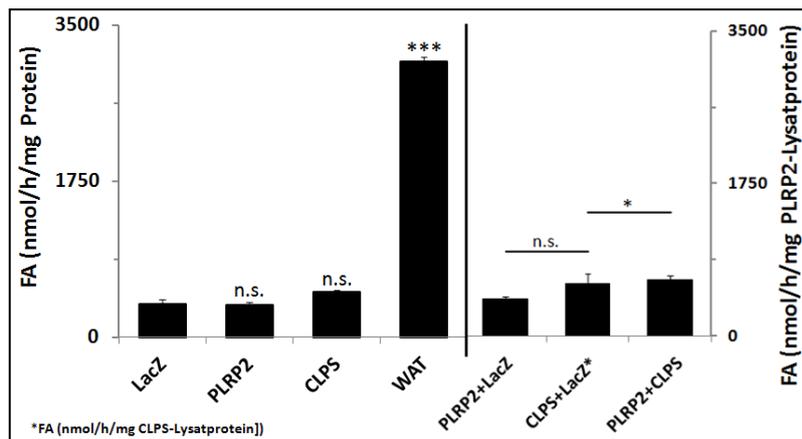


**Abbildung 20a-b Bestimmung der RE-Hydrolase-Aktivität von PLRP2** Für die RE-Hydrolase-Aktivitätsmessung wurden COS-7-Zelllysate mit dem in der Abbildung angegebenen exprimierten Protein verwendet. Die Proben wurden für 1h bei 37°C mit Retinylpalmitat, das mit PC, Cholat oder PC + 5mM Cholat emulgiert worden war, inkubiert. Die Bestimmung der RE-Hydrolase-Aktivitäten erfolgte durch Extraktion des Retinols und Bestimmung der Konzentration mittels HPLC. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung einer Zweifachbestimmung; signifikante Aktivitäten wurden in einem weiteren Experiment verifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem 2-seitigen, ungepaarten *Student's t-test*. \*= $p<0,05$ ; n.s.=nicht-signifikant,  $p>0,05$ . Die Signifikanzen direkt über den Balken beziehen sich auf die jeweilige Negativkontrolle, das LacZ-Lysat.

Als Kontrolle für Ansätze mit doppelter Proteinmenge, wurden PLRP2- und CLPS-Lysate mit gleicher Proteinmenge an LacZ inkubiert.

Eine Hydrolyse von Retinylpalmitat durch das PLRP2-Lysat konnte nur nach Zugabe des CLPS-Lysats beobachtet werden.

#### 4.2.3. Bestimmung der Monoacylglycerid (MAG)-Hydrolase-Aktivität



In diesem Assay wurde die hydrolytische Aktivität von PLRP2 gegenüber MAG als Substrat untersucht. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Ein LacZ-Lysat diente erneut als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde ein Gewebslysat des weißen Fettgewebes (WAT) verwendet. Die gleichzeitige Inkubation des PLRP2- und CLPS-Lysats zeigte als einzige

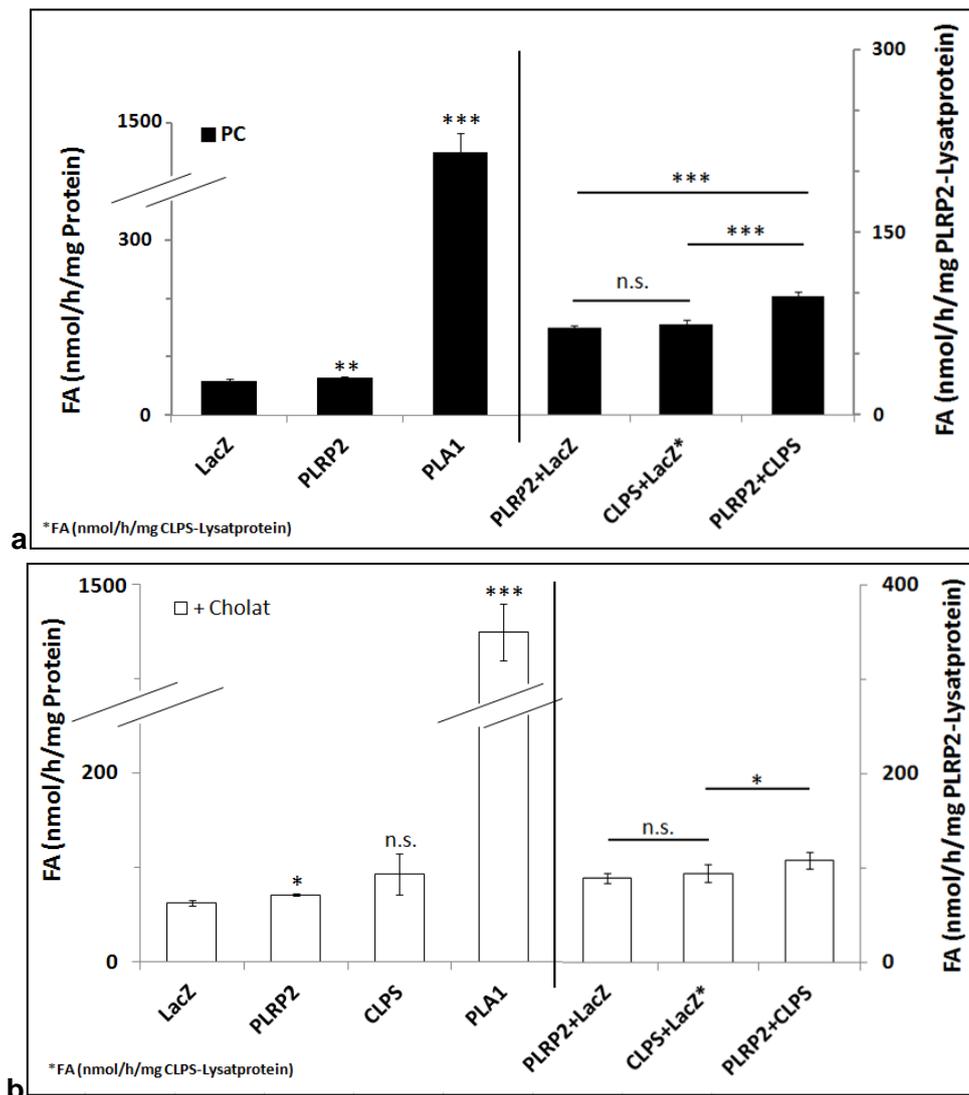
**Abbildung 21 Bestimmung der MAG-Hydrolase-Aktivität von PLRP2**  
 Für den MAG-Hydrolase-Assay wurden COS-7-Zelllysate mit dem in der Abbildung angegebenen exprimierten Protein verwendet. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 37°C mit 1,3-rac-Oleoylglycerol inkubiert. Die Bestimmung der MAG-Hydrolase-Aktivität erfolgte durch die Messung des freien Glycerols in der Probe. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung einer Dreifachbestimmung; signifikante Aktivitäten wurden in einem weiteren Experiment verifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem 2-seitigen, ungepaarten *Student's t-test*. \*= $p < 0,05$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant,  $p > 0,05$ . Die Signifikanzen direkt über den Balken beziehen sich auf die Negativkontrolle LacZ.

Probe eine erhöhte hydrolytische Aktivität gegenüber dem MAG-Substrat. Kontrolle für Ansätze mit doppelter Proteinmenge, wurden PLRP2- und CLPS-Lysate mit gleicher Proteinmenge an LacZ-Lysat inkubiert.

#### 4.2.4. Bestimmung der Phospholipid (PL)-Hydrolase-Aktivität

Weiters wurde zur Charakterisierung der Substratspezifität von PLRP2 die hydrolytische Aktivität gegenüber PL untersucht. Dazu wurde ein PL-Hydrolase-Assay durchgeführt. Als erstes Substrat wurden Micellen, bestehend aus PC, eingesetzt. Beim zweiten Substrat wurden zu den PC-Micellen zusätzlich 50µM Cholat hinzupipettiert. Abbildung 22a und b zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse.

Als Positivkontrolle wurde das in Schlangengift vorkommende Enzym Phospholipase A1 (PLA1) und als Negativkontrolle ein LacZ-Lysat eingesetzt. Bei PLA1 handelte es sich um ein aufgereinigtes Enzym. Das PLRP2-Lysat zeigte bei beiden Substraten eine hydrolytische Aktivität gegenüber PL, die durch Zugabe des CLPS-Lysats gesteigert werden konnte. Das CLPS-Lysat zeigte nur im PC-Substrat eine hydrolytische Aktivität, die die endogene Hintergrundaktivität der Negativkontrolle überstieg. Als Kontrolle für Ansätze mit doppelter Proteinmenge, wurden PRLP2- und CLPS-Lysate mit gleicher Menge an LacZ-Lysat inkubiert.



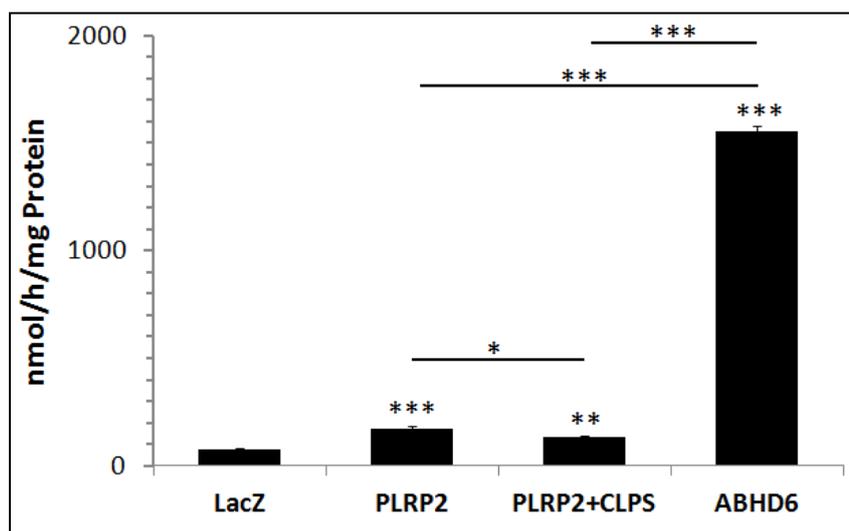
**Abbildung 22a-b Bestimmung der PL-Hydrolase-Aktivität von PLRP2** Für den PL-Hydrolase-Assay wurden COS-7-Zelllysate mit dem in der Abbildung angegebenen exprimierten Protein verwendet. Die Proben wurden für 1h bei 37°C mit dem Substrat inkubiert. Die Bestimmung der PL-Hydrolase-Aktivität erfolgte durch die Messung der freien Fettsäuren in der Probe. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung einer Dreifachbestimmung; signifikante Aktivitäten wurden in einem weiteren Experiment verifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem 2-seitigen, ungepaarten *Student's t-test*: \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; n.s.=nicht-signifikant,  $p > 0,05$ . Die Signifikanzen direkt über den Balken beziehen sich auf die Negativkontrolle LacZ.

PLRP2 konnte in beiden Fällen Phosphatidylcholin hydrolysieren. Diese Hydrolyse konnte durch Zugabe des CLPS-Lysats gesteigert werden.

#### 4.2.5. Bestimmung der Bis(monoacylglycero)phosphat(BMP)-Hydrolase-Aktivität

Aufgrund von Ähnlichkeiten in Sequenzmotiven mit Enzymen, die BMP spalten können, wurde weiters ein BMP-Hydrolase-Assay durchgeführt. In Abbildung 23 ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Als Substrat wurde ein sn-1/sn-3-verestertes BMP verwendet. Als Negativkontrolle diente ein LacZ-Lysat, als Positivkontrolle ein  $\alpha/\beta$ -hydrolase domain 6 (ABHD6)-Lysat. Das PLRP2- und PLRP2+CLPS-Lysat zeigten hydrolytische Aktivität gegenüber dem BMP-Substrat. Für das PLRP2-Lysat ergab sich eine Verdoppelung der Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle LacZ. Das ABHD6-Lysat zeigte eine 9-fach höhere Hydrolyse-Aktivität gegenüber BMP, als die PLRP2- beziehungsweise PLRP2+CLPS-Lysate.

Das PLRP2-Lysat kann das sn-1/sn-3-veresterte BMP-Substrat hydrolysieren. Der Assay wurde ebenfalls mit einem sn-2-veresterten BMP-Substrat durchgeführt. Die Aktivitätswerte waren vergleichbar (Daten nicht gezeigt).



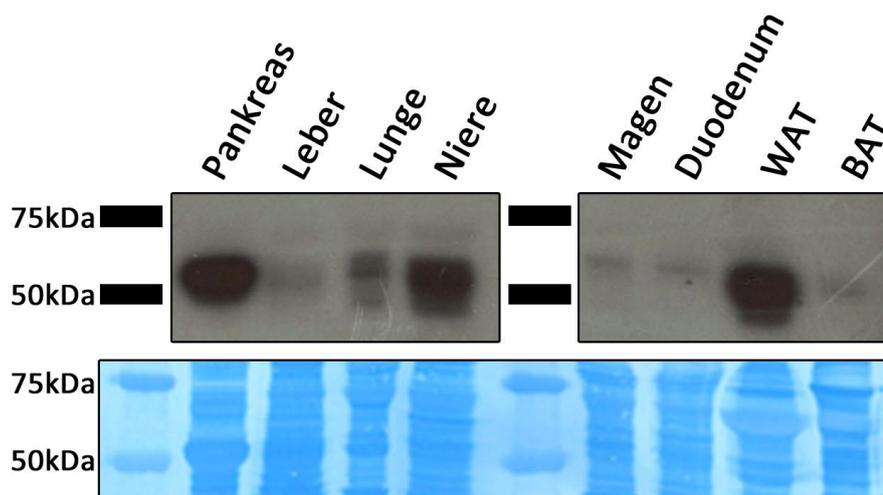
**Abbildung 23 Bestimmung der BMP-Hydrolase-Aktivität von PLRP2** Für den BMP-Hydrolase-Assay wurden COS-7-Zelllysate mit dem in der Abbildung angegebenen exprimierten Protein verwendet. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 37°C mit einem sn-1/sn-3-veresterten BMP-Substrat inkubiert. Die Bestimmung der PL-Hydrolase-Aktivität erfolgte durch die Messung der freien Fettsäuren in der Probe. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung einer Dreifachbestimmung; signifikante Aktivitäten wurden in einem weiteren Experiment verifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem 2-seitigen, ungepaarten *Student's t-test*. \*= $p < 0,05$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; n.s.=nicht-signifikant,  $p > 0,05$ . Die Signifikanzen direkt über den Balken beziehen sich auf die Negativkontrolle LacZ.

## 4.3. Expressionsmuster von PLRP2 in Mausgeweben

Zur Untersuchung der Expression von PLRP2 in der Maus wurden Gewebelysate verschiedener Mausgewebe und ein HSC-T6 Zelllysate hergestellt, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von PLRP2 erfolgte anschließend mit einem endogenen anti-PLRP2-Antikörper.

### 4.3.1. Expression von PLRP2 in verschiedenen Mausgeweben

Im folgenden Experiment wurde ein Nachweis der Expression von PLRP2 in verschiedenen Mausgeweben untersucht. Dazu wurde ein anti-PLRP2 Antikörper für die Detektion am Western Blot verwendet. Auf das SDS-Gel wurden jeweils 20µg des 10.000xg-Zwischenstandes aufgetragen. Abbildung 24 zeigt ein WB-Resultat. Banden auf der Höhe von PLRP2 (~55kDa) zeigten sich bei den Geweben Pankreas, Niere und weißes Fettgewebe (WAT). In der unteren Bildhälfte ist als Auftragungskontrolle der Abschnitt der gefärbten Membran gezeigt. Bei einem kürzer aufgelegten Film konnte beobachtet werden, dass es sich lediglich bei der Pankreasprobe um eine Einzelbande handelte. Bei Lunge, Niere und WAT handelte sich jeweils um eine Doppelbande. Die Ursache dafür ist



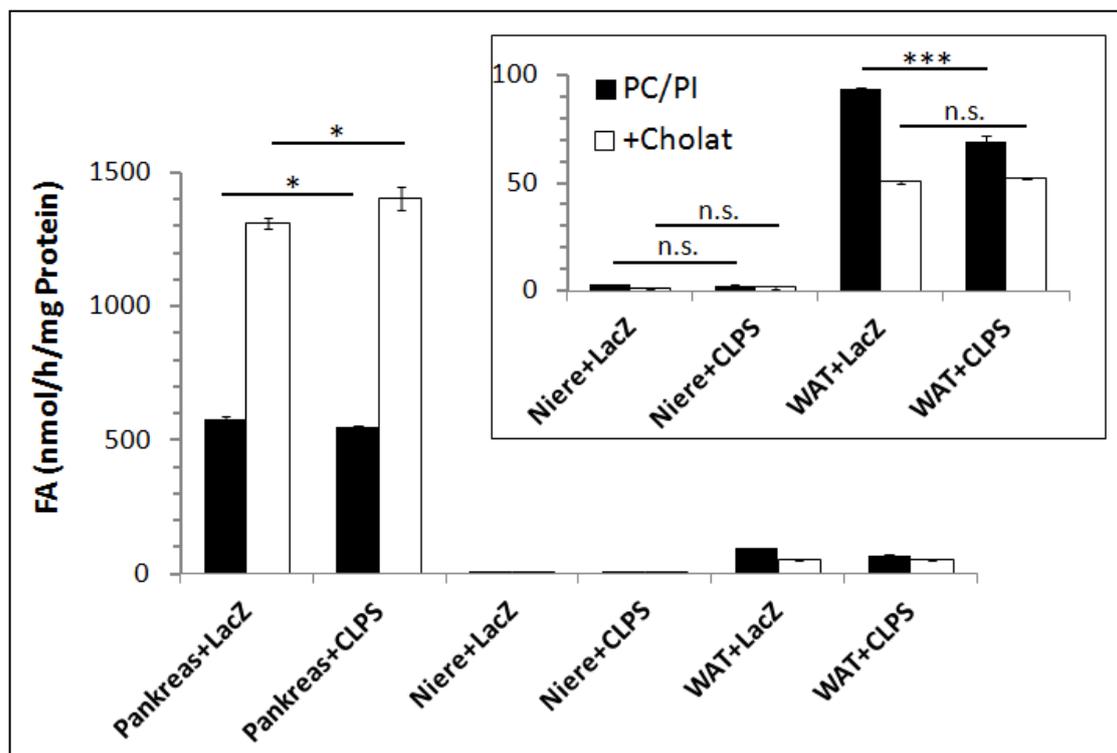
**Abbildung 24 Expression von PLRP2 in der Maus** Zur Untersuchung der Expression von PLRP2 in der Maus wurden Gewebelysate verschiedener Mausgewebe hergestellt, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von PLRP2 erfolgte anschließend mit einem endogenen anti-PLRP2-Antikörper. oben: Western Blot; unten: die Coomassie-Färbung der Membran als Auftragungskontrolle

unbekannt. Bei Leber, Magen, Duodenum und BAT konnten ebenfalls schwache Doppelbanden detektiert werden.

Das Ergebnis des WB weist darauf hin, dass PLRP2 besonders stark in Pankreas, Niere und WAT exprimiert ist.

### 4.3.2. Überprüfung des Expressionsnachweises mittels Aktivitätstests

Um zu untersuchen, ob es sich bei den Banden in Abbildung 24 möglicherweise um unspezifische Banden handelt, wurde die Expression von PLRP2 mittels TAG-Hydrolase Assay überprüft. Handelt es sich bei dem detektierten Protein um PLRP2, sollte sich dessen Aktivität durch die Zugabe von CLPS und Cholat in einem TAG-Hydrolase-Assay um ein vielfaches steigern lassen. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse des Assays graphisch dargestellt. Eine endogene hydrolytische Aktivität gegenüber Triacylglyceride zeigte das Pankreaslysate und das WAT (*white adipose tissue*). Die Niere zeigte keine



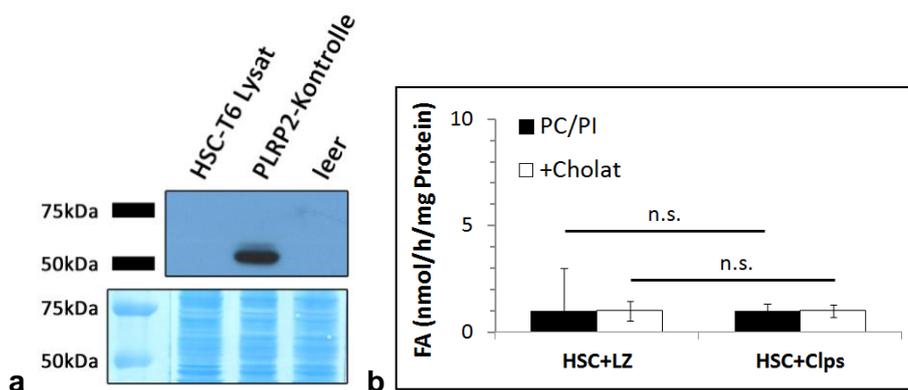
**Abbildung 25** Kann die TAG-Hydrolase-Aktivität des endogenen PLRP2 in verschiedenen Mausegeweben durch Zugabe von CLPS und/oder Cholat stimuliert werden? Für die TAG-Hydrolase-Aktivitätsbestimmung wurden COS-7-Zellysate mit dem angegebenen exprimierten Protein verwendet. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von einem  $^3\text{H}$ -markiertem Triolein-Substrat. Nach 1h wurde die Reaktion abgestoppt, die Fettsäuren extrahiert und die Radioaktivität im  $\beta$ -Counter (Packard) vermessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem 2-seitigen, ungepaarten *Student's t-test*: \*\*\*= $p < 0,001$ ; n.s.=nicht signifikant,  $p > 0,05$

Hintergrundaktivität. Von den Gewebelysate mit PLRP2-Bande konnte nur beim Pankreaslysat eine Stimulation der Aktivität durch Zugabe von Cholat und eine geringfügige weitere Steigerung der Aktivität durch Hinzupipettieren eines CLPS-Lysats beobachtet werden. Die Anwesenheit von Cholat führte beim WAT-Lysat zu einer Verminderung der TAG-Hydrolyse Aktivität. Weiters wurde durch Zugabe des CLPS-Lysats ein Absinken der hydrolytischen Aktivität des WAT-Lysats im PC/PI-Substrat erreicht. Im Cholat-Substrat hatte das CLPS-Lysat keine weitere Auswirkung. Die Hydrolyse von TAG im Nierenlysat konnte weder durch Cholat, noch durch Zugabe des CLPS-Lysats aktiviert werden. Folglich stellt sich die Frage, ob PLRP2 in diesen Geweben inaktiv ist, oder ob es sich bei den am Western Blot detektierten Banden um ein anderes Protein handelt, das der Antikörper ebenfalls erkennt.

### 4.3.3. Expression von PLRP2 in HSC-T6 Zellen

Die Expression von PLRP2 wurde auch in HSC-T6-Lysate untersucht. Abbildung 26a zeigt den WB. PLRP2 konnte auf Proteinebene in HSC-T6 Zellen nicht detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde ein COS-7-Lysat mit PLRP2-Expression verwendet. Es wurde eine Bande bei 55kDa detektiert. Als Negativkontrolle wurde ein COS-7-Lysat (leer) aufgetragen. Hier zeigten sich keine unspezifischen Banden.

Weiters wurde ein TAG-Hydrolase-Assay mit dem HSC-T6-Zellysat durchgeführt (Abbildung



**Abbildung 26a-b Überprüfung der endogenen Expression von PLRP2 in HSC-T6 Zellen mittels Western Blot und TAG-Hydrolase-Aktivitätsbestimmung** a) Zur Untersuchung der Expression von PLRP2 in HSC-T6 Zellen wurde ein Zellysat hergestellt, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von PLRP2 erfolgte anschließend mit einem endogenen anti-PLRP2-Antikörper b) Für die TAG-Hydrolase-Aktivitätsbestimmung wurden ebenfalls HSC-T6-Zellysate verwendet. 40µg Lysatprotein wurden jeweils eingesetzt und 1h bei 37°C mit einem <sup>3</sup>H-markiertem Triolein-Substrat inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion und der Extraktion der Fettsäuren wurde die Radioaktivität im β-Counter (Packard) vermessen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung von 3 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem 2-seitigen, ungepaarten *Student's t-test*: n.s.=nicht signifikant, p>0,05

26b). Das HSC-Lysat zeigte geringe TAG-Hydrolyse. Durch Zugabe eines CLPS-Lysat beziehungsweise von Natriumcholat fand keine Aktivierung der TAG-Hydrolyse statt.

Das HSC-Zellysate zeigte bei keinem Substrat eine aktivierbare TAG-Hydrolyse-Aktivität.

## 4.4. Intrazelluläre Lokalisation und Sekretion von PLRP2

PLRP2 und CLPS werden in den Acinuszellen der Pankreas synthetisiert und bei hormoneller Stimulation sekretiert. Beide Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz, die im Laufe der Prozessierung abgespalten wird. Im Folgenden wurde die Sekretion und Lokalisation von PLRP2 in COS-7-Zellen untersucht.

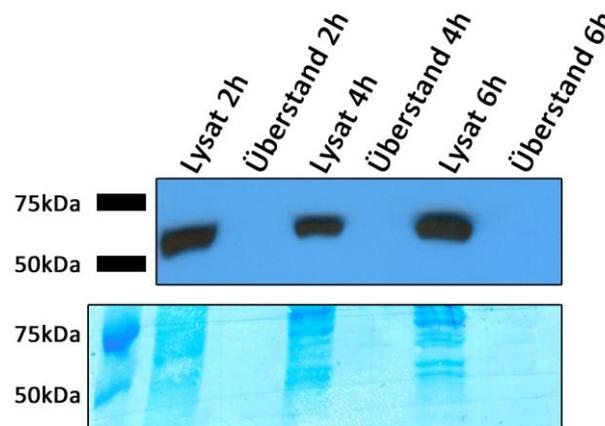
### 4.4.1. Untersuchung der Sekretion von PLRP2

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob PLRP2 aufgrund seiner N-terminalen Signalsequenz auch in COS-7 Zellen sekretiert wird. Dafür wurden COS-7 Zellen in 6-well Platten ausgesät, das PLRP2-Konstrukt transfektiert und am übernächsten Tag für 2, 4 und 6h mit DMEM (-/-) Medium inkubiert. Sowohl das Medium, als auch die Zellen wurden gesammelt.

Mittels WB wurde untersucht, ob PLRP2 im Zellysate und Überstand detektierbar ist. Abbildung 27 zeigt den WB.

In den Zellysate-Proben zeigte sich zu jedem Zeitpunkt eine starke Expression von

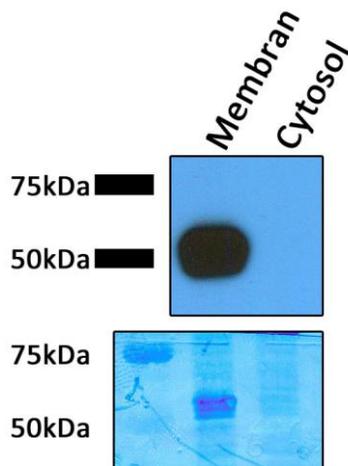
PLRP2. Zu keinem der drei Zeitpunkte (2, 4 und 6h) konnte PLRP2 im Zellüberstand



**Abbildung 27 Untersuchung der Sekretion von PLRP2 in COS-7 Zellen** Zur Untersuchung der Sekretion wurden COS-7 Zellen mit PLRP2 transfektiert und nach 48h für 2, 4 und 6h mit DMEM(-/-) – Medium inkubiert, das Medium abgehoben, 100µl mittels Aceton über Nacht bei -20°C gefällt und in 1xSDS aufgenommen. Als Transfektionskontrolle wurden die Zellen direkt in 1xSDS aufgenommen. Die Proben wurden auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mittels anti-FLAG-Antikörper wurden die Proteine detektiert. oben: Western Blot; unten: die Coomassie-Färbung der Membran als Auftragungskontrolle

detektiert werden. Die Sekretion von PLRP2 scheint in COS-7 Zellen nicht zu erfolgen und ist möglicherweise spezifisch für Acinuszellen beziehungsweise Drüsenzellen.

#### 4.4.2. Intrazelluläre Lokalisation von PLRP2



**Abbildung 28 Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von PLRP2 mittels Zellfraktionierung**  
 PLRP2 wurde in COS-7 Zellen transfektiert und nach 48h geerntet. Der Aufschluss erfolgte mittels Sonicator. Anschließend wurden die Proben bei 40.000rpm zentrifugiert. Von den dadurch erhaltenen Zellfraktionen wurden 20µg auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mittels anti-FLAG-Antikörper wurden die Proteine detektiert. oben: Western Blot; unten: die Coomassie-Färbung der Membran als Auftragskontrolle

Weiters wurde auch die intrazelluläre Lokalisation von PLRP2 untersucht. Dazu wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt. Durch Zentrifugation bei 40.000rpm konnte ein COS-7-Lysat mit PLRP2-Expression in den cytosolischen und Membran-Anteil getrennt werden. Das Cytosol (Überstand) wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß (1,5ml) überführt. Der pelletierte Membran-Anteil wurde zwei Mal mit *Disruption Buffer* gewaschen und anschließend in HSL-Puffer resuspendiert. Mittels WB wurde die intrazelluläre Lokalisation von PLRP2 untersucht. In Abbildung 28 ist der WB dargestellt.

Die Lokalisation von PLRP2 begrenzt sich auf den Membrananteil. Es wurde kein PLRP2 im Cytosol detektiert.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. AUP1 – Regulator der Lipolyse?

Nur wenig ist bislang über die physiologische Rolle des Proteins AUP1 bekannt. AUP1 ist hoch konserviert und ubiquitär im Mausorganismus exprimiert. Interaktionsstudien lassen eine Rolle von AUP1 in der Lipid-Homöostase vermuten. Klemm et al konnte drei Klassen an AUP1-interagierenden Proteinen identifiziert: (1) ER-Proteine der Proteinqualitätskontrolle (2) Lipid-modifizierende Enzyme (3) Untereinheiten des Oligosaccharid-Transferase Komplexes. Weiters wurde gezeigt, dass die Expression von AUP1 die Menge an LD in der Zelle beeinflusst.<sup>33</sup> Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob AUP1 die LD-Bildung durch eine regulatorische Funktion in der Lipolyse beeinflusst.

Mittels Northern Blot Analyse konnte die ubiquitäre Expression von AUP1-mRNA in allen untersuchten Geweben der Maus gezeigt werden. Eine besonders starke Expression zeigte sich im Hoden. Die Expressionsstärke variierte zwar von Gewebe zu Gewebe geringfügig, aber sie war stets deutlich sichtbar. Die Proteine, gefunden am LD, variieren von Zelltyp zu Zelltyp und können sich auch zwischen einzelnen LD derselben Zelle unterscheiden.<sup>72</sup> Die unterschiedlichen Expressionslevel widersprechen somit nicht der Annahme, dass AUP1 ein LD-spezifisches Protein sein könnte. Das ubiquitäre Vorkommen von AUP1 in allen untersuchten Geweben korreliert mit der Vermutung von Reue et al, dass alle Zellen LD bilden können.<sup>73</sup> Der Fütterungszustand des Versuchstieres kann oft ebenfalls Einfluss auf die Expression von Proteinen haben, besonders bei Proteinen des Energiestoffwechsels. Mittels eines weiteren Northern Blots mit Gewebeproben von gefütterten und gefasteten Mäusen konnte gezeigt werden, dass es sich bei AUP1 um kein durch feeding/fasting-reguliertes Protein handelt. Um die Rolle von AUP1 in der Lipolyse zu untersuchen, wurde die TAG-Hydrolyse *in vitro* und in einem TAG-Hydrolase-Assay untersucht.

Im Zellexperiment wurden Zellen mit AUP1-Expression mit Ölsäure beladen und mit einer Expression von LacZ als Kontrolle verglichen. Die TG-Akkumulationen unterschieden sich in den unbeladenen Zellen nicht von der LacZ Kontrolle. Bei Beladung zeigte sich ein Trend in Richtung erhöhter TG-Akkumulation bei Zellen mit AUP1-Expression. Aus der Literatur ist bekannt, dass Zellen, deren AUP1 Expression um 80% gesilencet ist, eine signifikant verminderte TAG-Akkumulation aufweisen.<sup>33</sup> In COS-7 Zellen mit AUP1-Expression konnte keine signifikante Änderung in der Menge an gespeicherten TAG entdeckt werden.

Beim Triacylglycerid-Hydrolase-Assay kann man über die freigesetzten Fettsäuren die Hydrolyse von Triacylglyceride messen. AUP1 zeigte keine Hydrolase-Aktivität gegenüber dem TAG-Substrat. Auch die gleichzeitige Inkubation von AUP1 mit lipolytischen Enzymen (ATGL, HSL, MGL) und dem Aktivator der ATGL, CGI-58, zeigte keine Veränderung in der Hydrolase-Aktivität. Die gezeigten Ergebnisse sprechen gegen eine Rolle von AUP1 in der Lipolyse.

Die Frage, ob es sich bei der Lokalisation von AUP1 am LD, um eine spezifische Lokalisation handelt, oder ob AUP1 lediglich am LD zu finden ist, weil es ein ER Protein ist, bleibt offen. Überexpressions-Experimente mit Fluoreszenz-getagtem AUP1 könnten zur Klärung beitragen. Durch die Expression selbst, wie auch dem *Tag* kann die Lokalisation von Proteinen jedoch beeinflusst werden. Deshalb wurden Zellfraktionierungsstudien durchgeführt. In den Zellfraktionierungsexperimenten wurde gefunden, dass sich AUP1 in der Membranfraktion findet und es sich dabei um kein cytoplasmatisches Protein handelt.

Die Rolle von AUP1 in murinen Zellen ist bislang unklar. Silencing-Studien in Mäusen wurden bislang noch nicht durchgeführt. Derzeitige Forschungsergebnisse anderer Gruppen lassen auf eine Funktion von AUP1 im Abbau fehlgefalteter ER-Proteine schließen.<sup>33</sup>

Eine direkte Rolle von AUP1 in der Regulation der Lipolyse kann auf Basis der vorliegenden Ergebnisse ausgeschlossen werden.

## 5.2. PLRP2 – eine intrazelluläre REH?

Lipasen sind ubiquitär exprimierte Enzyme und finden sich in allen Geweben. Eine dieser Lipasen ist das pankreatische Lipase-verwandte Protein 2 (PLRP2). PLRP2 wird im Pankreas exprimiert<sup>74</sup> und wie kürzlich erst publiziert, auch in cytotoxischen T-Lymphozyten<sup>75</sup> und Leberzellen<sup>69</sup>.

Trotz der hohen Sequenzhomologie von PLRP2 zu der pankreatischen Triglycerid Lipase (PTL) unterscheiden sich beide Enzyme in ihrer Substratspezifität.<sup>76</sup> In unserer Arbeit konnten wir eine Hydrolase-Aktivität der murinen PLRP2 (mPLRP2) gegenüber Triacylglyceriden, Retinylester, Monoacylglyceride, Bis(monoacylglycero)-phosphat und Phospholipiden zeigen. Für hohe hydrolytische Aktivität benötigte mPLRP2 den Cofaktor Colipase (mCLPS), der mPLRP2 vermutlich eine Interaktion mit dem Substrat ermöglicht.

Weiters zählt mPLRP2 zur Klasse der Gallensalz-aktivierten Lipase (BAL), da eine deutliche Steigerung der Hydrolyse unter einer physiologischen Gallensäure-Konzentration erreicht wird. Als Gallensalz-aktivierte Lipase ist eine Rolle von mPLRP2 als intrazelluläre Retinylesterhydrolase (REH) unwahrscheinlich.

Seit Jahrzehnten ist die Expression von mPLRP2 in der Pankreas beschrieben.<sup>74</sup> In unseren Experimenten konnten wir diese Expression von mPLRP2 in der Pankreas bestätigen. Pang et al beschrieb 2011 die Expression von PLRP2 in Leberzellen von Vitamin A-defizienten Mäusen und in aktivierten HSC-T6 Zellen.<sup>69</sup> Die meisten Ergebnisse beruhen auf Daten, welche durch *real-time* PCR erhalten wurden. Trotz gezeigtem Western Blot (WB) und immunhistochemischer Färbung von Leberpräparaten von Pang et al konnten wir diese Ergebnisse nicht reproduzieren. Weiters konnten wir nicht die Expression von PLRP2 in HSC-T6 Zellen mittels WB-Analyse bestätigen.

Experimente zur Lokalisation zeigten, dass PLRP2 im Membrananteil der Zellen und nicht im Cytosol lokalisiert. PLRP2 wird vom Pankreas sekretiert und gelangt so in das Duodenum. Die Sekretion von PLRP2 konnte auch bei kultivierten Acinuszellen beobachtet werden.<sup>77,78</sup> Eine Sekretion durch COS-7 Zellen, die PLRP2 exprimieren, konnte nicht beobachtet werden.

1998 wurde eine PLRP2-defiziente Maus generiert. Sowohl junge, als auch alte Tiere zeigten keine phänotypischen Unterschiede in Fettversuchen zu Wildtyp- und heterozygoten Tieren. In Jungtieren trat eine vorübergehende Fettresorptionsstörung auf und folglich eine langsamere Gewichtszunahme, als beim Wildtyp. Bei adulten Tieren war diese verschwunden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass PLRP2 die Hauptlipase im Verdauungstrakt von Jungtieren sein könnte.<sup>61</sup>

Zusammenfassend unterstützen die Daten dieser Arbeit nicht die Vermutung, dass mPLRP2 an der Mobilisierung von Vitamin A in der Leber beteiligt sein könnte. Die Rolle von mCLPS in der Vitamin A Homöostase bleibt offen. Bereits 2011 konnte Pang et al zeigen, dass ein *knock-down* des Gens für CLPS zu einer Retention von Vitamin A um 80% in HSC-T6-Zellen führt.<sup>69</sup> Ein *Silencing*-Experiment mit PLRP2 wurde nicht gezeigt.

Anfangs wurden zwei Formen von CLPS isoliert.<sup>79</sup> Sie unterschieden sich um ein Pentapeptid, das den Namen Enterostatin erhielt.<sup>80</sup> Die Abspaltung von Enterostatin von der Procolipase erfolgt im Darm durch Trypsin. Enterostatin bewirkt eine verminderte Fettresorption in einer Vielzahl von Tieren.<sup>81</sup> Weiters findet sich CLPS auch im Hypothalamus, der als Funktion die Regulation der Nahrungsaufnahme besitzt.<sup>81</sup> Zudem ist eine weitere Splicevariante von CLPS mit 8kDa bekannt (siehe Eintrag in Ensemble Datenbank).

Clps knock-out Mäuse erscheinen normal bei Geburt, aber 60% sterben innerhalb der ersten zwei Wochen.<sup>82</sup> Vitamin A Supplementierung nach der Geburt führte zu keiner Verbesserung der Überlebensrate.<sup>82</sup> Die Ursache für das Sterben der Tiere kurz nach der Geburt konnte nicht geklärt werden. Überlebende Mäuse leiden als Junge und als adulte Tiere an Fettmalabsorption, die sich aber bei einer fettarmen Diät der Tiere nicht weiter auswirkt.<sup>82</sup> Adulte Tiere wiegen um 30% weniger als Wildtyp-Tiere, besitzen aber eine gleiche Gewichtszuwachs.<sup>82</sup> Das reduzierte Körpergewicht lässt sich auf einen verringerten Fettanteil im Körpergewicht zurückführen. Die Magermasse (lean body mass, LBM) ist gleich.<sup>82</sup>

Die Unterschiede in der hydrolytischen Aktivität von PLRP2-Homologe in verschiedenen Spezies und die unklare Expression von PLRP2 in unterschiedlichen Geweben, machen es schwierig, PLRP2 eine allgemeine physiologische Funktion zuzuordnen. Derzeit scheint eine Rolle von PLRP2 als intestinale Lipase, eventuell begrenzt auf die ersten Monate nach der Geburt, am wahrscheinlichsten.

### 5.3. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch unterschiedliche Methoden gezeigt, dass eine direkte Rolle von AUP1 in der Regulation der Lipolyse ausgeschlossen werden kann und dass die Funktion von PLRP2 als intestinale Lipase derzeit am wahrscheinlichsten erscheint. Allerdings sind noch einige Fragen offen, die durch weiterführende Experimente beantwortet werden müssten. Wie bereits in Kapitel 5.2 beschrieben, erscheint CLPS als interessanter Kandidat für weitere Experimente.

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$^3\text{H}$	Tritium
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
ATGL	<u>A</u> dipose <u>T</u> riglyceride <u>L</u> ipase
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
AUP1	<u>a</u> ncient <u>u</u> biquitous <u>p</u> rotein 1
BAT	<u>b</u> rown <u>a</u> dipose <u>t</u> issue, braunes Fettgewebe
BCA	<u>b</u> icin <u>ch</u> oninic <u>a</u> cid, Bicinchoninsäure
bp	<u>b</u> ase <u>p</u> airs, Basenpaare
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin, Rinderserumalbumin
cDNA	<u>c</u> omplementary DNA, komplementäre DNA
CDS	<u>c</u> oding <u>s</u> equence, kodierende Sequenz
CGI-58	<u>C</u> omparative <u>G</u> ene <u>I</u> dentification-58
CLPS	<u>c</u> olipase
ddH <sub>2</sub> O	<u>d</u> oppeld <u>e</u> stilliertes H <sub>2</sub> O
DAG	<u>D</u> iacylglycerid
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	<u>D</u> esoxynukleotid- <u>T</u> riphosphate
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetra <u>a</u> ccetat
et al.	<i>et alii</i> , und andere

FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
fw	<i>forward</i> , vorwärts
G0S2	<i>G0/G1 Switch Protein 2</i>
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSL	<u>H</u> ormonsensitive <u>L</u> ipase
HSC	<i>hepatic stellate cells</i> , hepatische Sternzellen, Ito-Zellen
IgG	<u>I</u> mmung <u>g</u> lobulin G
kb	<u>K</u> ilo <u>b</u> asenpaare
kDa	<u>K</u> ilo <u>d</u> alton
LD	<i>lipid droplet</i> , Lipidtropfen
MAG	<u>M</u> ono <u>a</u> cyl <u>g</u> lycerid
MCS	<u>m</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite
MGL	<u>M</u> onoglycerid- <u>L</u> ipase
OD <sub>600</sub>	optische <u>D</u> ichte bei 600nm
ODC	<i>over day culture</i> , Tagkultur
ONC	<i>over night culture</i> , Übernachtkultur
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PC:PI	<u>P</u> hosphatidyl <u>ch</u> olin: <u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
Pi	<u>P</u> rotease <u>i</u> nhibitor
PL	<u>P</u> hosphol <u>i</u> pid
PTL	<u>P</u> ankreatische <u>T</u> riglycerid <u>L</u> ipase
PLRP2	<i>pancreatic lipase-related protein 2</i>
PVDF	<u>P</u> olyvinyli <u>d</u> en <u>f</u> luorid

RE	<u>R</u> etiny <u>l</u> ester
RP	Retinylpalmitat
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
rv	<i>reverse</i> , rückwärts
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS-Polyacrylamidgel- elektrophorese
TAG	<u>T</u> ri <u>a</u> cylglycerid
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cet <u>a</u> t- <u>E</u> DTA-Puffer
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
TST	<i>Tris saline Tween-20</i>
U	<i>unit</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WAT	<i>white adipose tissue</i> , weißes Fettgewebe
WB	<u>W</u> estern <u>B</u> lot

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Nelson, D. L. *Lehninger biochemie* (Koch Neff & Volckmar Gmbh, [S.I.], 2009).
2. 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).
3. Young, S. G. & Zechner, R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes & Development* **27**, 459–484 (2013).
4. Blomhoff, R. & Blomhoff, H. K. Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* **66**, 606–630 (2006).
5. Havel, R. J. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Plasma Lipid Transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **30**, 9–19 (2009).
6. Beigneux, A. P. *et al.* Assessing the Role of the Glycosylphosphatidylinositol-anchored High Density Lipoprotein-binding Protein 1 (GPIHBP1) Three-finger Domain in Binding Lipoprotein Lipase. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 19735–19743 (2011).
7. Zechner, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Lass, A. & Zimmermann, R. Lipolysis: pathway under construction. *Curr. Opin. Lipidol.* **16**, 333–340 (2005).
8. Blomhoff, R., Green, M. H., Berg, T. & Norum, K. R. Transport and storage of vitamin A. *Science* **250**, 399–404 (1990).
9. Brasaemle, D. L. Proteomic Analysis of Proteins Associated with Lipid Droplets of Basal and Lipolytically Stimulated 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 46835–46842 (2004).
10. Lehner, R. & Kuksis, A. Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.* **35**, 169–201 (1996).
11. Coleman, R. A., Lewin, T. M., van Horn, C. G. & Gonzalez-Baró, M. R. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J. Nutr.* **132**, 2123–2126 (2002).
12. Kayden, H. J., Senior, J. R. & Mattson, F. H. The Monoglyceride Pathway of Fat Absorption in Man\*. *J. Clin. Invest.* **46**, 1695–1703 (1967).
13. Mansbach, C. M. & Gorelick, F. Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* **293**, G645 (2007).
14. Yen, C.-L. E., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C. & Farese, R. V. Thematic Review Series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *The Journal of Lipid Research* **49**, 2283–2301 (2008).
15. Tauchi-Sato, K. The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 44507–44512 (2002).
16. Lampidonis, A. D., Rogdakis, E., Voutsinas, G. E. & Stravopodis, D. J. The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis. *Gene* **477**, 1–11 (2011).
17. Zimmermann, R. Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science* **306**, 1383–1386 (2004).

18. Zechner, R., Kienesberger, P. C., Haemmerle, G., Zimmermann, R. & Lass, A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *The Journal of Lipid Research* **50**, 3–21 (2008).
19. Watt, M. J. & Steinberg, G. R. Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem. J.* **414**, 313 (2008).
20. Gruber, A. *et al.* The N-terminal Region of Comparative Gene Identification-58 (CGI-58) Is Important for Lipid Droplet Binding and Activation of Adipose Triglyceride Lipase. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 12289–12298 (2010).
21. Granneman, J. G., Moore, H.-P. H., Krishnamoorthy, R. & Rathod, M. Perilipin Controls Lipolysis by Regulating the Interactions of AB-hydrolase Containing 5 (Abhd5) and Adipose Triglyceride Lipase (Atgl). *Journal of Biological Chemistry* **284**, 34538–34544 (2009).
22. 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**, 309–319 (2006).
23. 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 Cell Biol.* **10**, 581–591 (1991).
24. Yang, X. *et al.* The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase. *Cell Metabolism* **11**, 194–205 (2010).
25. P Strålfors, P. Björgell & P. Belfrage. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1984).
26. Egan, J. J. *et al.* Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 8537–8541 (1992).
27. OLSSON, H. & BELFRAGE, P. The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone-sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-1, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. *Eur J Biochem* **168**, 399–405 (1987).
28. GARTON, A. J. & YEAMAN, S. J. Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase. *Eur J Biochem* **191**, 245–250 (1990).
29. Olsson, H., Strålfors, P. & BELFRAGE, P. Phosphorylation of the basal site of hormone-sensitive lipase by glycogen synthase kinase-4. *FEBS Letters* **209**, 175–180 (1986).
30. Miyoshi, H. Perilipin Promotes Hormone-sensitive Lipase-mediated Adipocyte Lipolysis via Phosphorylation-dependent and -independent Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 15837–15844 (2006).
31. Wan, H.-C., Melo, R. C. N., Jin, Z., Dvorak, A. M. & Weller, P. F. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *The FASEB Journal* **21**, 167–178 (2006).
32. Sato, S. Proteomic Profiling of Lipid Droplet Proteins in Hepatoma Cell Lines Expressing Hepatitis C Virus Core Protein. *Journal of Biochemistry* **139**, 921–930 (2006).
33. Klemm, E. J., Spooner, E. & Ploegh, H. L. Dual Role of Ancient Ubiquitous Protein 1 (AUP1) in Lipid Droplet Accumulation and Endoplasmic Reticulum (ER) Protein Quality Control. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 37602–37614 (2011).
34. Spandl, J., Lohmann, D., Kuerschner, L., Moessinger, C. & Thiele, C. Ancient Ubiquitous Protein 1 (AUP1) Localizes to Lipid Droplets and Binds the E2 Ubiquitin Conjugase G2 (Ube2g2) via Its G2 Binding Region. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 5599–5606 (2011).

35. Lintig, J. von. Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology. *American Journal of Clinical Nutrition* **96**, 1234S (2012).
36. Gerster, H. Vitamin A--functions, dietary requirements and safety in humans. *Int J Vitam Nutr Res* **67**, 71–90 (1997).
37. Morriss-Kay, G. M. & Ward, S. J. Retinoids and mammalian development. *Int. Rev. Cytol.* **188**, 73–131 (1999).
38. During, A. & Harrison, E. H. Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells. *The Journal of Lipid Research* **48**, 2283–2294 (2007).
39. van Bennekum, A. *et al.* Class B Scavenger Receptor-Mediated Intestinal Absorption of Dietary  $\beta$ -Carotene and Cholesterol †. *Biochemistry* **44**, 4517–4525 (2005).
40. Wyss, A. *et al.* Cloning and Expression of  $\beta,\beta$ -Carotene 15,15'-Dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**, 334–336 (2000).
41. Redmond, T. M. Identification, Expression, and Substrate Specificity of a Mammalian beta -Carotene 15,15'-Dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 6560–6565 (2000).
42. Paik, J. Expression and Characterization of a Murine Enzyme Able to Cleave beta -Carotene. THE FORMATION OF RETINOIDS. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 32160–32168 (2001).
43. Lintig, J. von & Vogt, K. Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J. Biol. Chem.* **275**, 11915–11920 (2000).
44. Theodosiou, M., Laudet, V. & Schubert, M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1423–1445 (2010).
45. Helgerud, P., Petersen, L. B. & Norum, K. R. Acyl CoA:retinol acyltransferase in rat small intestine: its activity and some properties of the enzymic reaction. *J. Lipid Res.* **23**, 609–618 (1982).
46. MacDonald, P. N. & Ong, D. E. Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J. Biol. Chem.* **263**, 12478–12482 (1988).
47. Paik, J. *et al.* Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J. Nutr.* **134**, 276S-280S (2004).
48. van Bennekum, A. M. *et al.* Lipoprotein lipase expression level influences tissue clearance of chylomicron retinyl ester. *J. Lipid Res.* **40**, 565–574 (1999).
49. Kanai, M., Raz, A. & Goodman, D. S. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J. Clin. Invest.* **47**, 2025–2044 (1968).
50. Ghyselinck, N. B. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *The EMBO Journal* **18**, 4903–4914 (1999).
51. Batten, M. L. Lecithin-retinol Acyltransferase Is Essential for Accumulation of All-trans-Retinyl Esters in the Eye and in the Liver. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 10422–10432 (2003).
52. Johnson, K. J. The retinoids: Biology, chemistry and medicine (second edition). *Biochemical Education* **22**, 56 (1994).
53. Duester, G. Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell* **134**, 921–931 (2008).
54. Kawaguchi, R. *et al.* A Membrane Receptor for Retinol Binding Protein Mediates Cellular Uptake of Vitamin A. *Science* **315**, 820–825 (2007).
55. Gottesman, M. E., Quadro, L. & Blaner, W. S. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* **23**, 409–419 (2001).

56. Parés, X., Farrés, J., Kedishvili, N. & Duester, G. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3936–3949 (2008).
57. Dong, D., Ruuska, S. E., Levinthal, D. J. & Noy, N. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **274**, 23695–23698 (1999).
58. Ziouzenkova, O. & Plutzky, J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR–RXR complex. *FEBS Letters* **582**, 32–38 (2008).
59. Balmer, J. E. & Blomhoff, R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res.* **43**, 1773–1808 (2002).
60. Seino, Y. *et al.* Isx Participates in the Maintenance of Vitamin A Metabolism by Regulation of  $\beta$ -Carotene 15,15'-Monooxygenase (Bcmo1) Expression. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 4905–4911 (2007).
61. Lobo, G. P. *et al.* ISX is a retinoic acid-sensitive gatekeeper that controls intestinal  $\beta$ -carotene absorption and vitamin A production. *The FASEB Journal* **24**, 1656–1666 (2010).
62. Lowe, M. E. Properties and function of pancreatic lipase related protein 2. *Biochimie* **82**, 997–1004 (2000).
63. Reboul, E. *et al.* Pancreatic lipase and pancreatic lipase-related protein 2, but not pancreatic lipase-related protein 1, hydrolyze retinyl palmitate in physiological conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1761**, 4–10 (2006).
64. Sias, B. *et al.* Human Pancreatic Lipase-Related Protein 2 Is a Galactolipase †. *Biochemistry* **43**, 10138–10148 (2004).
65. Andersson, L., Carrière, F., Lowe, M. E., Nilsson, A. & Verger, R. Pancreatic lipase-related protein 2 but not classical pancreatic lipase hydrolyzes galactolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1302**, 236–240 (1996).
66. Porter, H. P., Saunders, D. R., Tytgat, G., Brunser, O. & Rubin, C. E. Fat absorption in bile fistula man. A morphological and biochemical study. *Gastroenterology* **60**, 1008–1019 (1971).
67. D'Agostino, D. & Lowe, M. E. Pancreatic lipase-related protein 2 is the major colipase-dependent pancreatic lipase in suckling mice. *J. Nutr.* **134**, 132–134 (2004).
68. Xiao, X., Mukherjee, A., Ross, L. E. & Lowe, M. E. Pancreatic Lipase-related Protein-2 (PLRP2) Can Contribute to Dietary Fat Digestion in Human Newborns. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 26353–26363 (2011).
69. Pang, W. *et al.* The mPlrp2 and mClps genes are involved in the hydrolysis of retinyl esters in the mouse liver. *The Journal of Lipid Research* **52**, 934–941 (2011).
70. Eydoux, C. *et al.* Further biochemical characterization of human pancreatic lipase-related protein 2 expressed in yeast cells. *The Journal of Lipid Research* **48**, 1539–1549 (2007).
71. Jayne, S. *et al.* Activation of horse PLRP2 by bile salts does not require colipase. *Biochemistry* **41**, 8422–8428 (2002).
72. Ducharme, N. A. & Bickel, P. E. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* **149**, 942–949 (2008).
73. Reue, K. A thematic review series: lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man. *J. Lipid Res.* **52**, 1865–1868 (2011).

74. Giller, T., Buchwald, P., Blum-Kaelin, D. & Hunziker, W. Two novel human pancreatic lipase related proteins, hPLRP1 and hPLRP2. Differences in colipase dependence and in lipase activity. *J. Biol. Chem.* **267**, 16509–16516 (1992).
75. Alves, B. N. *et al.* Lipid-dependent cytotoxicity by the lipase PLRP2 and by PLRP2-positive cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Cell Biochem. Funct.* **27**, 296–308 (2009).
76. Lowe, M. E. The triglyceride lipases of the pancreas. *J. Lipid Res.* **43**, 2007–2016 (2002).
77. Lowe, M. E. New pancreatic lipases: gene expression, protein secretion, and the newborn. *Meth. Enzymol.* **284**, 285–297 (1997).
78. Wagner, A. C. *et al.* GP-3, a newly characterized glycoprotein on the inner surface of the zymogen granule membrane, undergoes regulated secretion. *J. Biol. Chem.* **269**, 9099–9104 (1994).
79. Sternby, B. & Borgström, B. One-step purification of procolipase from human pancreatic juice by immobilized antibodies against human colipase86. *Biochim. Biophys. Acta* **786**, 109–112 (1984).
80. Erlanson-Albertsson, C. Enterostatin: the pancreatic procolipase activation peptide--a signal for regulation of fat intake. *Nutr. Rev.* **50**, 307–310 (1992).
81. Rippe, C., Erlanson-Albertsson, C. & Lindqvist, A. Consequences of metabolic challenges on hypothalamic colipase and PLRP2 mRNA in rats. *Brain Research* **1185**, 152–157 (2007).
82. D'Agostino, D. Decreased Postnatal Survival and Altered Body Weight Regulation in Procolipase-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 7170–7177 (2001).