

TIP47, ein intrazelluläres Apolipoprotein

und/oder

ein Sortierungsfaktor für Mannose-6-Phosphat Rezeptoren?

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von
Anke Deggerich
aus Rheine

Köln 2009

Berichtersteller: Prof. Dr. Thomas Langer
(Gutachter)

Prof. Dr. Stefan Höning

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. TIP47: Ein Sortierungsfaktor für den retrograden Transport der Mannose-6- Phosphat Rezeptoren	2
1.1.1. Mannose-6-Phosphat Rezeptoren.....	2
1.1.2. Funktion und Transport von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren	2
1.1.3. MPR-bindende Sortierungsfaktoren	4
1.2. TIP47: Ein Lipid droplet bindendes Protein	9
1.2.1. Lipid droplets	10
1.2.2. Lipid droplet assoziierte Proteine.....	11
1.2.3. Die Bildung von Lipid droplets	17
1.2.4. Interaktion mit anderen Organellen	22
1.2.5. Lipid droplets und Erkrankungen	23
1.3. Fragestellung	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Materialien	26
2.1.1. Geräte	26
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.3. Chemikalien.....	29
2.1.4. Antikörper	31
2.1.5. Lipide.....	33
2.1.6. Radioaktive Substanzen	34
2.1.7. Molekularbiologische Materialien.....	34
2.1.8. Zellbiologische Materialien	37
2.1.9. Biochemische Materialien.....	39
2.1.10. EDV	40
2.1.11. Statistische Auswertung	40
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	41

2.2.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	41
2.2.2. Herstellung kompetenter Zellen.....	41
2.2.3. Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid DNA.....	43
2.2.4. Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	44
2.2.5. Anlegen einer Glycerinkultur	44
2.2.6. Konzentrationsbestimmung von DNA.....	44
2.2.7. Agarosegelelektrophorese.....	45
2.2.8. DNA Extraktion aus Agarosegelen	45
2.2.9. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen	46
2.2.10. Ligation von DNA-Fragmenten	46
2.2.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.2.12. Reinigung von DNA-Fragmenten.....	48
2.2.13. DNA Sequenzierung.....	48
2.3. Zellbiologische Methoden	48
2.3.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen	48
2.3.2. Kultivierung von Zellen	48
2.3.3. Bestimmung der Zellzahl	49
2.3.4. Transfektion mit Plasmid DNA.....	49
2.3.5. Transfektion mit RNA Oligonukleotiden.....	49
2.3.6. Immunfluoreszenz	50
2.3.7. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP).....	52
2.3.8. Fluoreszenzdurchflußzytometrie.....	53
2.4. Biochemische Methoden.....	54
2.4.1. Aufschluss von Zellen bzw. Gewebe	54
2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	56
2.4.3. Bestimmung lysosomaler Enzyme im Zellkulturüberstand	57
2.4.4. Metabolische Markierung	58
2.4.5. Immunpräzipitation	59
2.4.6. Fällung von Proteinen.....	61
2.4.7. SDS-PAGE	62
2.4.8. Coomassiefärbung von Proteinen	64
2.4.9. Silbernitrat Färbung von Proteinen	64

2.4.10. Blue native Gelelektrophorese.....	65
2.4.11. Western blot und Immundetektion.....	66
2.4.12. Ponceaufärbung von Proteinen.....	67
2.4.13. Expression und Reinigung von (Glutathion-S-Transferase) GST-Proteinen.....	67
2.4.14. Erhöhung der Konzentration von Proteinlösungen.....	69
2.4.15. Dialyse.....	69
2.4.16. <i>Crosslinking</i> von rekombinanten Proteinen mit Glutaraldehyd.....	70
2.4.17. <i>Pull down</i> Experimente.....	70
2.4.18. Massenspektrometrie.....	71
2.4.19. Aufreinigung von lipid droplets.....	71
2.4.20. Lipidextraktion nach der Wessel-Flügge-Fällung.....	72
2.4.21. Dünnschichtchromatographie (<i>thin layer chromatographie</i> : TLC).....	73
2.4.22. Liposomenpräparation.....	75
2.4.23. Der <i>disc assay</i>	76
2.4.24. Darstellung von Liposomen bzw. <i>discs</i> durch Negativkontrastierung in der Elektronenmikroskopie.....	76
2.4.25. Messung von Proteininteraktionen am Biacore Biosensor (SPR).....	77
3. Ergebnisse.....	80
3.1. Die Funktion von TIP47 im retrograden Transport der MPRs.....	80
3.1.1. Lokalisierung von MPRs und Sortierungsfaktoren in Zellen.....	80
3.1.2. <i>In vitro</i> Bindungsstudien mit TIP47 und den zytoplasmatischen Sequenzabschnitten der MPRs.....	84
3.1.3. Funktionsanalyse von MPRs nach <i>knock-down</i> von TIP47.....	85
3.2. Ist TIP47 ein Effektorprotein der GTPase Rab9?.....	90
3.2.1. Intrazelluläre Lokalisierung von Rab9 und TIP47.....	90
3.2.2. <i>In vitro</i> Interaktion zwischen Rab9 und TIP47.....	94
3.3. Die Funktion von TIP47 an Lipid droplets.....	97
3.3.1. Lokalisierung von TIP47 an Lipid droplets.....	97
3.3.2. Lipid droplet Morphologie und Lipidmetabolismus in TIP47 KD Zellen..	103
3.3.3. Das Proteinmuster gereinigter Lipid droplets.....	110
3.3.4. TIP47 ist nicht als Monomer in der Zelle nachzuweisen.....	112
3.3.5. Bindungspartner von TIP47.....	114

3.3.6. TIP47 hat apolipoprotein-ähnliche Eigenschaften	116
4. Diskussion	120
4.1. TIP47, ein Sortierungsfaktor der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren?.....	120
4.1.1. Problematik der Diskussion über die Funktion von TIP47	120
4.1.2. Bindet TIP47 an die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte der MPRs?	122
4.1.3. Welche Funktion besitzt die potenzielle <i>in vitro</i> Bindung von TIP47 an die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte der MPRs?.....	123
4.2. TIP47: Ein Schlüsseleffektor für die GTPase Rab9?.....	127
4.3. Die Funktion von TIP47 in der Lipid droplet Biogenese	130
4.3.1. Die Lokalisierung von TIP47 an Lipid droplets	131
4.3.2. Die Funktion von TIP47 an Lipid droplets?	133
5. Zusammenfassung.....	141
6. Summary	142
Literaturverzeichnis	143
Erklärung.....	154
Curriculum vitae	155
Danksagung	156

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidestillata
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Heterotetramerer Adaptorprotein-Komplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ApoE	ApolipoproteinE
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAR-Domäne	Bin-Amphiphysin-Rvs-Domäne
BSA	(<i>bovine serum albumin</i>) Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CCV	Clathrin-coated vesicle
CD-MPR	<i>Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CI-MPR	<i>Cation-independent mannose-6-phosphate receptor</i>
Da	Dalton
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EE	<i>Early endosome</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et. al.	(et altera) und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i>

g	(gravity) Erdbeschleunigung
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>GTP exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GGA	<i>Golgi-localized, -γ-ear-containing, -ARF-binding protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HeLa-Zellen	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KD	<i>knock-down</i>
K_D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
kDa	Kilo Dalton
LAMP	<i>Lysosomal associated membrane protein</i>
LB	Luria Bertani Bakterien-Medium
LE	<i>late endosome</i>
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
M	Molar (mol/l)
Min	Minute
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitril-Tri-Essigsäure
OD	Optische Dichte
PACS	<i>Phosphofurin acidic cluster sorting protein</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PM	Plasmamembran

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rab	<i>Ras-like protein from rat brain</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RU	Resonanzeinheiten
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOC-Medium	"Salt-optimized + carbon"-Medium
SPR	<i>surface plasmon resonanz</i>
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TGN46	Trans-Golgi-Netzwerk Protein 46
TIP47	<i>tail interacting protein of 47kD</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
U	Units
μ	mikro (10 ⁻⁶)
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VHS	Vps27p, Hrs und STAM Domäne
Vps	<i>vacuolar protein sorting</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
z.B.	zum Beispiel

Tabelle 1: Aminosäuren wurden im Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code angegeben:

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val
Grosse hydrophobe Aminosäure	Φ	
Irgendeine Aminosäure	X	

1. Einleitung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die intrazelluläre Lokalisierung und Funktion des Proteins TIP47 (*tail interacting protein of 47kDa*). Beides wird kontrovers diskutiert. Zum einen ist TIP47 als Sortierungsfaktor für den retrograden Transport der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren (MPRs) MPR46 und MPR300 von den Endosomen zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) beschrieben (Diaz and Pfeffer, 1998). Weiterhin publizierte dieselbe Arbeitsgruppe TIP47 als einen Schlüsseffektor für die an späten Endosomen lokalisierte GTPase Rab9 (Aivazian et al., 2006) und propagiert daher ein Modell, das die Bildung eines ternären Komplexes aus TIP47, MPRs und Rab9 vorsieht, der für den retrograden Transport verantwortlich ist.

Im Gegensatz dazu wurde TIP47 als ein Lipid droplet bindendes Protein mit noch unbekannter Funktion beschrieben (Wolins et al., 2001).

Diese Arbeit soll zu einer Klärung der oben beschriebenen Kontroverse beitragen und untersuchen, ob TIP47 möglicherweise ein bifunktionales Protein ist, welches einerseits für den retrograden Transport von MPRs zuständig ist und andererseits ein an Lipid droplet bindendes Protein mit noch unbekannter Funktion ist. Damit könnte TIP47 erste Hinweise auf eine Interaktion zwischen Lipid droplets und späten Endosomen liefern. Des Weiteren soll die Funktion von TIP47 an Lipid droplets näher charakterisiert werden.

In der Einleitung wird zum einen die Funktion und der Transport von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren erläutert, sowie die wichtigsten Sortierungsfaktoren, die deren zielgerichteten Transport gewährleisten. Zum anderen wird die Biogenese und Funktion von *Lipid droplets*¹ in Säugetieren vorgestellt.

¹ Da es noch keine wissenschaftlich einheitlich anerkannte Übersetzung des Begriffs „*Lipid droplets*“ im Deutschen gibt, werde ich in dieser Arbeit die englische Bezeichnung Lipid droplet verwenden.

1.1. TIP47: Ein Sortierungsfaktor für den retrograden Transport der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren

1.1.1. Mannose-6-Phosphat Rezeptoren

In Säugetierzellen gibt es zwei Mannose-6-Phosphat Rezeptoren (MPR), die aufgrund ihres apparenten Molekulargewichts als MPR46 und MPR300 bezeichnet werden. Beide MPRs binden Mannose-6-Phosphat, wobei sich die Bindungsaffinität von MPR46 zu seinem Liganden *in vitro* durch die Zugabe von divalenten Kationen steigern lässt. Daher wird er auch als kationenabhängiger MPR bezeichnet, während der MPR300 als kationenunabhängiger MPR beschrieben wird (Hoflack and Kornfeld, 1985). MPR300 ist zusätzlich in der Lage den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor II (IGF-II) an der Plasmamembran zu binden und wird aus diesem Grund auch als Mannose-6-Phosphat/IGF-II Rezeptor bezeichnet (Oshima et al., 1988). Beide Rezeptoren sind Typ-I Transmembranproteine, deren N-Termini die Liganden im luminalen Bereich binden, während die C-Termini im Zytoplasma positioniert sind und Signalstrukturen beinhalten, die für die subzelluläre Lokalisierung der MPRs notwendig sind.

1.1.2. Funktion und Transport von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren

MPRs vermitteln den Transport löslicher lysosomaler Hydrolasen aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu Endosomen, die im weiteren zu Lysosomen reifen. Lysosomen sind membranumgebene Organellen, in denen zelleigene und zellfremde Makromoleküle wie z.B. Proteine, Lipide und Polysaccharide abgebaut werden. Für diese Prozesse werden eine Vielzahl von sauren Hydrolasen benötigt. Deren Vorstufen werden am rauhen Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und mit Zuckerseitenketten versehen. Nach ihrem Transport zum Golgi Apparat werden dort einige der Mannose-Reste in C₆ Stellung phosphoryliert. Dies stellt ein hoch affines Erkennungssignal für die MPRs dar, welche daraufhin im TGN die Enzyme binden und sie als Ligand-Rezeptorkomplex zu den Endosomen transportieren (Abb.1.1). Ob die MPR-haltigen Transportvesikel mit frühen und/oder späten Endosomen fusionieren, wird kontrovers diskutiert (Braulke and Bonifacino, 2009).

Fest steht, dass die Enzyme aufgrund des niedrigeren pH-Wertes in den Endosomen von den MPRs dissoziieren. Während die Endosomen mit lysosomalen Hydrolasen zu Lysosomen reifen, werden die MPRs selektiv aus den endosomalen Kompartimenten in Transportvesikel zurück zum TGN geführt, wo sie dem Kreislauf erneut zur Verfügung stehen (Brown et al., 1986) (Abb. 1.1).

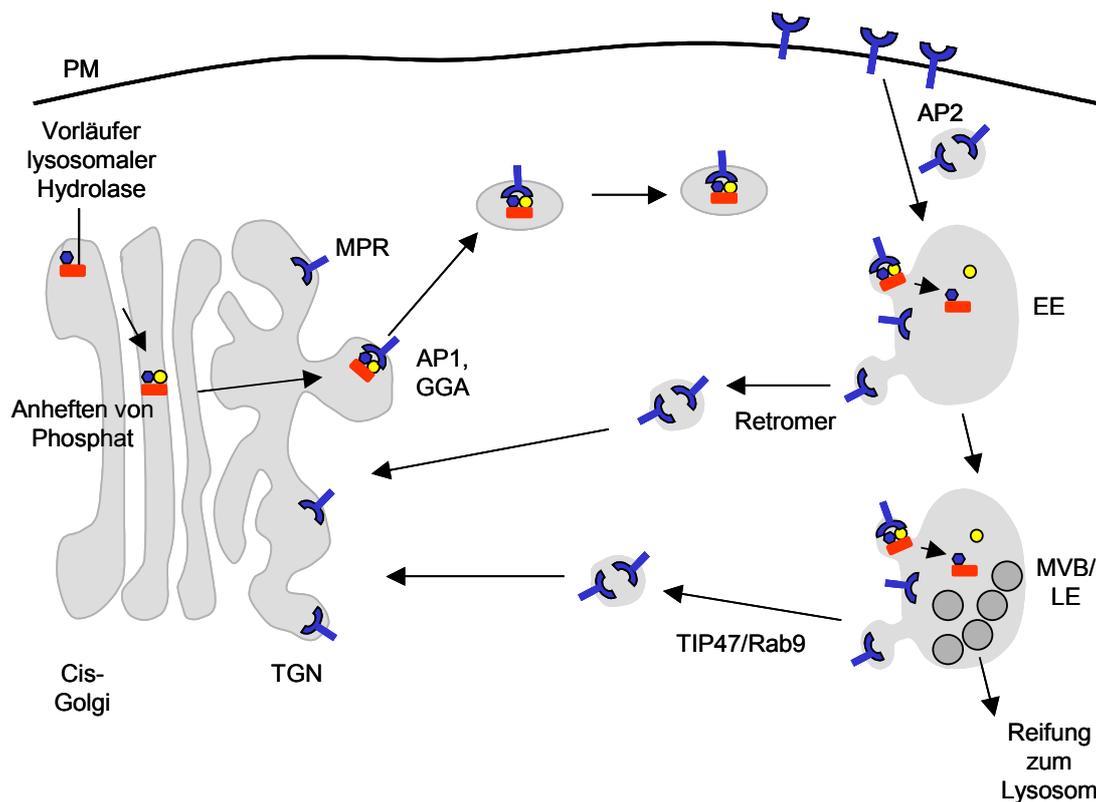


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des MPR Transportes. Vorläufer lysosomaler Hydrolasen erhalten im Cis-Golgi eine Phosphorylierung an terminalen Mannoseresten, welches vom MPR erkannt und gebunden wird. AP1 (*adaptor protein 1*) und GGAs (*Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins*) binden an die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte der MPRs und leiten so die Clathrin-abhängige Vesikelbildung und deren Abschnürung ein. MPR-enhaltende Vesikel fusionieren mit endosomalen Kompartimenten, wobei die Hydrolasen aufgrund des erniedrigten pH-Wertes vom Rezeptor dissoziieren. Während die Endosomen zu Lysosomen reifen, werden die MPRs mit Hilfe von Sortierungsfaktoren zum TGN zurück transportiert. Während die Arbeitsgruppe Pfeffer TIP47 als Sortierungsfaktor publiziert, favorisieren andere Arbeitsgruppen den Retromerkomplex (Bonifacino, Seaman), um nur zwei der diskutierten Sortierungsfaktoren an den Endosomen zu nennen. Die MPRs, die zur Plasmamembran gelangen, werden über AP2 (*adaptor protein 2*) endozytiert. PM: Plasmamembran, EE: frühes Endosom, MVB: multi-vesikuläres Endosom, LE: spätes Endosom

MPRs zirkulieren nicht nur zwischen dem TGN und endosomalen Kompartimenten, sondern gelangen auch zur Plasmamembran. Dort bindet und endozytiert nur der MPR300 Mannose-6-Phosphat-haltige Liganden und IGF-II. Eine Funktion von MPR46 an der Plasmamembran ist bis heute unbekannt (Stein et al., 1987). Beide MPRs weisen eine ähnliche intrazelluläre Verteilung auf, die in den Fällen, wo die Lokalisierung quantifiziert wurde, wie folgt aussieht: zu 40-60% in endosomalen Strukturen, zu 20-40% im TGN und zu 10% an der Plasmamembran (Brown et al., 1986; Griffiths et al., 1988).

Die physiologische Bedeutung der MPRs wird durch *knock out* Mäuse deutlich, die eine Defizienz für beide MPRs aufweisen. Diese Mäuse zeigen eine erhöhte prä-, perinatale und juvenale Sterblichkeit. Der Phänotyp der überlebenden Mäuse ähnelt dem der I-Zellkrankheit (*inclusion cell disease*), mit schweren neurologischen Störungen, Zwergenwuchs und einer erhöhten Aktivität lysosomaler Enzyme im Serum (Dittmer et al., 1999). Analysen von MPR *-/-* Mäusen, denen entweder der MPR46 oder der MPR300 fehlt, zeigen, dass beide Rezeptoren alle Hydrolasen transportieren, sich jedoch in ihren Affinitäten unterscheiden. So hat z.B. MPR300 eine höhere Affinität zu Cathepsin D als MPR46 (Qian et al., 2008).

1.1.3. MPR-bindende Sortierungsfaktoren

Um einen geregelten und zielgerichteten Transport der MPRs zwischen Kompartimenten sicher zu stellen, besitzen die Rezeptoren Sortierungssignale in ihren zytoplasmatischen Sequenzabschnitten (Abb. 1.2). Diese Sortierungssignale werden von spezifischen, zytosolischen Proteinen, den Sortierungsfaktoren, erkannt und gebunden. Sortierungsfaktoren binden einerseits MPRs, andererseits besitzen sie aufgrund von Protein-Protein- und/oder Protein-Lipid-Interaktionen eine definierte Membranlokalisierung. Diese sorgt für die Bildung eines Transportvesikels an einer definierten intrazellulären Membran. Außerdem rekrutieren viele Sortierungsfaktoren zusätzlich die Hüllproteine (z.B. Clathrin) an den Ort der Vesikelgenese (weitere Einzelheiten siehe (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003)).

In der hier vorliegenden Arbeit wird der retrograde MPR Transport untersucht, weswegen ich für nähere Informationen über den anterograden Transport bzw. der

Sortierung von MPRs an der Plasmamembran auf folgende Reviews verweise: (Braulke and Bonifacino, 2009; Ghosh et al., 2003a).

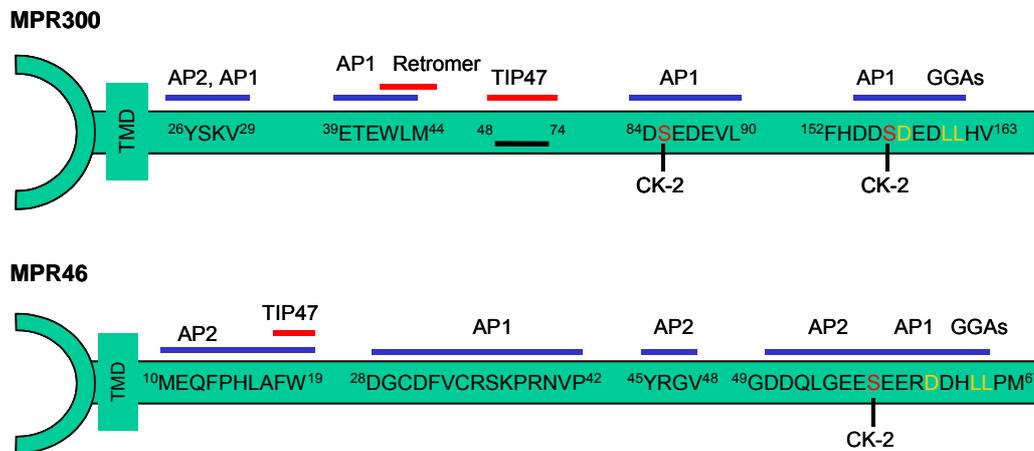


Abb. 1.2: Sortierungssignale in den zytoplasmatischen Domänen der MPRs. Die schematische Darstellung zeigt die Aminosäuresequenzen in den zytoplasmatischen Sequenzabschnitten der MPRs, die für die Bindung der Sortierungsfaktoren beschrieben sind. GGA Proteine binden an ein DXXLL Motiv, während AP1 und AP2 verschiedene Sortierungssignale erkennen. Für die Bindung von Retromer ist ein WLM Motiv im MPR300 notwendig. TIP47 soll im MPR300 eine prolinreiche Region (AS 48-74) und im MPR46 ein FW Motiv erkennen. TMD: Transmembrandomäne. CK-2: Casein-Kinase 2 Phosphorylierungsstelle (Abb. abgewandelt nach Gosh P. *et al.*, 2003.).

1.1.3.1. Sortierung an Endosomen

Brown *et al.* konnten zeigen, dass die MPRs von den Endosomen zum TGN zurücktransportiert, also recycelt werden (Brown et al., 1986). In diesem Prozess sind bisher vier Sortierungsfaktoren beschrieben (Braulke and Bonifacino, 2009). Die in dieser Arbeit diskutierten Sortierungsfaktoren werden im nachfolgenden vorgestellt.

TIP47/Rab9

Der retrograde Transport von MPRs an Endosomen ist insbesondere von der Arbeitsgruppe Pfeffer (Stanford, USA) analysiert worden. Mit Hilfe eines speziellen *in vitro* assays (Goda and Pfeffer, 1988) zeigen die Arbeiten eine Abhängigkeit von der GTPase Rab9 (Lombardi et al., 1993), während Clathrin, welches bei der Sortierung

der MPRs am TGN und an der Plasmamembran eine Rolle spielt, nicht involviert sein soll (Draper et al., 1990). Einzelheiten zu den über 60 humanen Rab GTPasen, deren Lokalisierung und Funktion als molekulare Schalter, finden sich in diversen Übersichtsartikeln wie z. B. (Schwartz et al., 2007; Stenmark, 2009).

TIP47 (*tail interacting protein of 47kDa*) wurde zum erstenmal 1998 als ein Sortierungsfaktor für den retrograden Transport beider MPRs beschrieben (Diaz and Pfeffer, 1998). In dieser Arbeit wurde TIP47 in einem *yeast-two-hybrid screen* als Bindungspartner für die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte beider MPRs gefunden. Um diese Interaktion zu bestätigen, wurden Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. Mit Hilfe des oben erwähnten *in vitro assays* zeigten die Autoren, dass der retrograde Transport der MPRs von TIP47 abhängig ist, da anti-TIP47 Antikörper den Transport inhibierten. In COS7 und EBTr Zellen zeigten Immunfluoreszenzen eine Kolo-kalisierung zwischen MPR300 und TIP47; eine Supprimierung von TIP47 mit Oligonukleotiden verringerte die Halbwertszeit (HWZ) vom MPR300 in COS Zellen von ~35h auf ~14h. Die Verringerung der HWZ soll auf einen Defekt im retrograden Transport hinweisen, da - so die Autoren - nun die MPRs zu Lysosomen weitergeleitet und dort abgebaut werden. Damit konnte die Funktion von TIP47 als Sortierungsfaktor auch in Zellen bestätigt werden. Nicht geklärt war, warum TIP47 als zytosolisches Protein die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte der MPRs nur an späten Endosomen bindet und nicht z.B. am TGN oder der Plasmamembran. Es musste noch eine andere Komponente geben, die TIP47 spezifisch an späte Endosomen rekrutiert. Da die GTPase Rab9 spezifisch an späten Endosomen lokalisiert und ebenfalls einen Einfluss auf den retrograden Transport von MPRs hat, lag es nahe, die Interaktion zwischen Rab9 und TIP47 zu testen. *In vitro* Bindungsstudien zeigten, dass die rekombinanten Proteine miteinander interagieren, wobei TIP47 eine etwas höhere Präferenz zu GTP-gebundenem Rab9 ($K_D = 96\text{nM}$) als zu GDP-gebundenem Rab9 ($K_D = 159\text{nM}$) aufwies (Carroll et al., 2001; Ganley et al., 2004). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass Rab9 die Bindung von TIP47 an MPRs *in vitro* verstärkt und TIP47 an Membranen rekrutiert (Carroll et al., 2001). Die Autoren konnten aber nicht nur zeigen, dass die Rekrutierung von TIP47 an Membranen in Abhängigkeit von Rab9 erfolgt. In einer Folgearbeit war die stabile Membranassoziation von Rab9 selbst abhängig von TIP47. Die Supprimierung von TIP47 durch RNAi verändert den

zytosolischen Anteil von Rab9 von 10% auf 20% im Western blot (Ganley et al., 2004).

Mutationsstudien zeigten, dass die Aminosäuren 152-187 von TIP47 für die Bindung an Rab9 notwendig sind, wohingegen die Aminosäuren 188-434 für die Bindung an MPRs erforderlich sind. Weitergehende Analysen konnten zeigen, dass die Aminosäurereste 167-169 (Ser-Val-Val) in TIP47 besonders wichtig für die Bindung an Rab9 sind (Hanna et al., 2002), da die in *vitro* Bindung der TIP47 Mutante (Ala-Ala-Ala) an Rab9 auf 1/5 reduziert war (Carroll et al., 2001). Wurde diese Mutante in Zellen exprimiert, so inhibierte deren Zytosol den retrograden MPR Transport in dem oben genannten *in vitro assay* (Carroll et al., 2001).

In einer weiteren Arbeit verwendete die Arbeitsgruppe Pfeffer eine Rab9 Variante, deren GTPase Domäne durch die von Rab5 ersetzt war. In Zellen exprimiert lokalisiert die Chimäre an frühen Endosomen, bei gleichzeitiger Überexpression von TIP47 allerdings an späten Endosomen (Aivazian et al., 2006). Daraus folgern die Autoren, dass TIP47 Rab9 an späten Endosomen stabilisiert.

Aufgrund der früheren Befunde der Arbeitsgruppe, nach denen TIP47 nicht nur Rab9-GTP ($K_D = 96\text{nM}$), sondern auch Rab9-GDP ($K_D = 159\text{nM}$) bindet und der Fähigkeit von TIP47 Rab9 an Membranen zu stabilisieren, folgern die Autoren, dass TIP47 ein Schlüsseleffektor von Rab9 ist.

Das momentane Modell der Arbeitsgruppe Pfeffer beinhaltet, dass TIP47 an die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte von MPRs bindet, und diese Bindung sich verstärkt, wenn Rab9 anwesend ist. Zusätzlich kann TIP47 Rab9-GDP an späten Endosomen binden und dort stabilisieren, bis ein Rab9 GEF (*Guanine exchange factor*) GDP zu GTP austauscht. Dadurch erhöht sich die Bindung von TIP47 zu Rab9 und ebenfalls zu den MPRs. Dieser ternäre Komplex aus TIP47, Rab9-GTP und MPRs leitet dann die Vesikelformation ein. Bis jetzt ist noch nicht geklärt, wie es genau zu dieser Vesikelformation kommt (Aivazian et al., 2006).

In der jüngsten Publikation der Arbeitsgruppe Pfeffer zeigen die Autoren, dass die am Golgi lokalisierte Rho GTPase BTB3 mit Rab9-GTP interagiert. Die Anreicherung von Membranen in einem Saccharosegradienten mit anschließender *Blue-Native*-Gelelektrophorese und Western blot detektierte RhoBTB3 und TIP47 bei ca. 475 kDa. Dies deutet für die Autoren darauf hin, dass TIP47 und RhoBTB3 in dem gleichen Komplex lokalisieren. Weitere Experimente konnten zeigen, dass die Inkubation von angereicherten Membranen mit rekombinantem Rab9 oder ATP zu

einer Reduktion der TIP47 Membranassoziation führte. Die Inkubation mit γ ATP konnte TIP47 nicht reduzieren, was zeigt, dass die Hydrolyse von ATP eine Rolle bei der Freisetzung von TIP47 aus diesen angereicherten Membranen spielt. Interessant dabei ist, dass die Autoren zeigen konnten, dass die Rho GTPase keine GTPase Aktivität besitzt, sondern ATP hydrolysiert (Espinosa et al., 2009). Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse gehen die Autoren nun davon aus, dass TIP47 zusammen mit Rab9 und MPRs in Vesikeln von späten Endosomen zum TGN transportiert werden. Am TGN bindet Rab9 RhoBTB3 und diese Bindung führt zur Hydrolyse von ATP, was wiederum die Freisetzung von TIP47 zur Folge hat. Wie genau die ATP Hydrolyse das Andocken der Vesikel an den TGN steuert, müssen weitere Experimente klären (Espinosa et al., 2009).

Retromerkomplex

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* besitzt keine MPRs, hier erfolgt der Transport vakuolärer Hydrolasen vom TGN durch das Typ-I Transmembranprotein Vps10p (*vacuolar protein sorting*) (Marcusson et al., 1994). Genetische Analysen in *S. cerevisiae* identifizierten einen Komplex aus 5 Proteinen, der für den retrograden Vps10p Transport von Endosomen zum Golgi verantwortlich ist. Dieser Komplex wurde „Retromer“ genannt und besteht aus Vps35p, Vps29p, Vps26p, Vps17p und Vps5p (Seaman et al., 1997), wobei Vps35p die zytosolische Domäne von Vps10p erkennt und einen stabilen Komplex mit Vps29p bildet (Nothwehr et al., 1999). Vps5p und Vps17p gehören zur *sorting nexin* Familie. Aufgrund der intrinsischen Aktivität von Vps5p zur Selbstassemblierung geht man davon aus, dass der Vps5p-Vps17p Komplex die Vesikelbildung vorantreibt (Seaman et al., 1998). Vps26 soll eine regulatorische Rolle bei den Interaktion von Vps35p spielen und den Retromerkomplex stabilisieren (Reddy and Seaman, 2001).

Da Säugetiere einen homologen Komplex aufweisen, wurde untersucht, ob Retromer in Säugetieren eine Rolle im retrograden Transport spielt und wenn ja, welche Fracht er transportiert. Zwei unabhängige Arbeitsgruppen konnten in Lokalisierungs- und Funktionsstudien eine Bedeutung des Retromerkomplexes im MPR Transport aufzeigen (Arighi et al., 2004; Seaman, 2004; Seaman, 2007).

Neben TIP47/Rab9 und dem Retromerkomplex werden auch PACS1 (*Phosphofurin acidic cluster sorting protein*) (Scott et al., 2006) und der AP1 Komplex (Medigeshi

and Schu, 2003) im Zusammenhang mit dem retrograden MPR Transport diskutiert. Bislang bleibt aber völlig unklar, ob es sich um redundante Systeme handelt, ob die Funktion zelltypabhängig ist, oder wie die Funktion von vier Sortierungsfaktoren zeit- und ortsabhängig reguliert sein könnte.

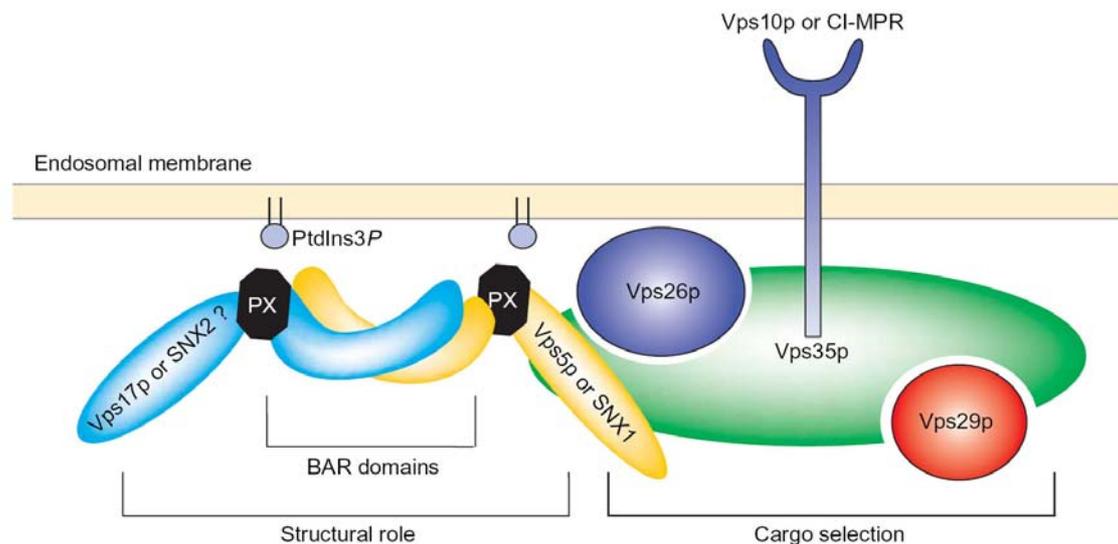


Abb.1.3: Schematische Abbildung des Retromerkomplexes von M. Seaman (Seaman, 2005). Vps35p bindet an die zytoplasmatische Domäne von Vps10p (Hefe) oder MPR300 (mammalian) und interagiert mit Vps26p über seinen N-Terminus sowie mit Vps29p mit seiner C-terminalen Domäne. Vps5p (oder SNX1 in Säugetieren) interagiert über seinen N-Terminus mit dem Subkomplex Vps35p, Vps26p und Vps29p. Vps5p und Vps17b dimerisieren über ihre BAR Domänen und binden über ihre PX Domäne an Phosphatidylinositol-3-Phosphat.

1.2. TIP47: Ein Lipid droplet bindendes Protein

TIP47 wurde nicht nur, wie im ersten Teil der Einleitung beschrieben, als Sortierungsfaktor für MPRs publiziert, sondern auch als ein Lipid droplet bindendes Protein (Wolins et al., 2001). Lipid droplets findet man in Prokaryoten, sowie in allen Eukaryoten (Murphy and Vance, 1999). Da TIP47 nur in Säugetieren exprimiert wird, werde ich mich in dieser Arbeit hauptsächlich auf die Bildung und Funktion von Lipid droplets in Säugetieren konzentrieren. Hinweise zu Proteinen analoger Funktionen in *Drosophila melanogaster* oder der Hefe finden sich an anderer Stelle (Bickel et al., 2009).

1.2.1. Lipid droplets

Lipid droplets sind schon lange als Speicherplatz für apolare Lipide in Adipozyten bekannt, wurden aber ansonsten wenig beachtet. Mittlerweile weiß man, dass Lipid droplets in allen bisher analysierten Zellen als Antwort auf ein erhöhtes Fettsäureangebot gebildet werden. Im Gegensatz zu anderen Organellen sind Lipid droplets nicht von einer Doppelmembran, sondern von einer Hemimembran aus Phospholipiden und Cholesterin umgeben. Diese Hemimembran umschließt das Neutrallipid, welches hauptsächlich aus Triacylglycerin und Cholesterinester besteht (Tauchi-Sato et al., 2002). Die wesentliche Funktion von Lipid droplets besteht nicht nur in der Speicherung von Neutrallipid, sondern auch in der kontrollierten Freisetzung von Fettsäuren bzw. Cholesterin. Die freigesetzten Fettsäuren werden z.B. für β -Oxidation, Membranlipidsynthese, Proteinmodifizierung oder für die Generierung von Signalmolekülen verwendet. Je nach Gewebe speichern Lipid droplets unterschiedliche Lipide und erfüllen damit gewebsspezifische Funktionen (Gibbons et al., 2000). So wird in Adipozyten fast nur Triacylglycerin als Energiereserve für den gesamten Organismus gespeichert, wohingegen in steroidogenen Zellen hauptsächlich Cholesterinester für die Steroidbiosynthese gespeichert wird (Bartz et al., 2007). Des Weiteren ist die Speicherung von freien Fettsäuren als Neutrallipid in Lipid droplets für jede Zelle überlebensnotwendig, da ein Überschuss an freien Fettsäuren toxisch ist und somit zu Dysfunktionen oder zur Apoptose führen kann (Schaffer, 2003).

Für die regulierte Speicherung und Freisetzung von Lipiden aus Lipid droplets sind zahlreiche Proteine verantwortlich, die an die Hemimembran binden. Dabei findet man nicht nur Proteine aus dem Lipidstoffwechsel, sondern auch aus dem Protein- und Vesikeltransport. Dies legt nahe, dass es sich bei Lipid droplets um dynamische Organellen handelt, die im Austausch mit anderen Organellen wie Endosomen und dem Endoplasmatischen Retikulum stehen.

Auch wenn Lipid droplets mittlerweile mit den verschiedensten Erkrankungen wie Übergewicht, Diabetes und Arteriosklerose in Verbindung gebracht werden, so sind fundamentale Fragen noch immer ungeklärt: Wie und wo werden Lipid droplets gebildet? Wie werden Proteine und Lipide an die Lipid droplets rekrutiert? Wie wird die Größe, Anzahl und Verteilung von Lipid droplets reguliert? Wie und warum interagieren Lipid droplets mit anderen Organellen.

1.2.2. Lipid droplet assoziierte Proteine

Verschiedene Klassen von Proteinen sind an der Lipid droplet Hemimembran nachgewiesen worden. Dazu zählen Proteine der PAT-Familie (**P**erilipin, **A**DRP, **T**IP47), Enzyme aus dem Lipidstoffwechsel, sowie Membran- und Transportproteine wie z.B. Rab18 und SNAREs. Für die meisten der nachgewiesenen Proteine steht ein funktioneller Nachweis noch aus. Siehe hierzu auch die Anmerkung zur Problematik falsch positiver Nachweise von Proteomanalysen in Abschnitt 1.2.5.

1.2.2.1. Proteine der PAT-Familie

Zu den ersten Proteinen, die man an Lipid droplets identifizierte, gehören die Proteine der PAT-Familie. Diese Familie ist definiert durch Sequenzhomologie und Bindung an Lipid droplets. In Säugetieren gibt es mittlerweile fünf Mitglieder: **P**erilipin, **A**DRP, **T**IP47, S3-12 und OXPAT (*PAT protein in highly oxidative tissues*), wovon die ersten drei Mitglieder der Familie ihren Namen gaben. Es wurden auch PAT-Proteine in *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Dictyostelium* und in einigen *Fungi* wie *Metharizium anisopliae* (Miura et al., 2002) (Wang and St Leger, 2007) gefunden, allerdings nicht in *Saccharomyces cerevisiae* (Athenstaedt et al., 1999; Lu et al., 2001).

Bis auf S3-12 besitzen alle PAT-Proteine in ihrer N-terminalen Region (~100 Aminosäuren) eine konservierte Region, die als PAT-Domäne bezeichnet wird und deren Aminosäuresequenzidentität besonders hoch ist. So ist z.B. die Aminosäuresequenz von TIP47 und ADRP in diesem Bereich zu 60% identisch, während die gesamte Sequenz zu 42% übereinstimmt (Miura et al., 2002). Die Funktion der PAT-Domäne ist bisher unbekannt (Lu et al., 2001). S3-12 besteht zu 70% aus 11-*mer repeats*, die ebenfalls in den anderen PAT Proteinen vorkommen (Scherer et al., 1998). 11-*mer repeats* besitzen eine Aminosäuresequenz, von der vorausgesagt wird, dass sie amphiphatische Helices ausbilden (Bussell and Eliezer, 2003). Eine ähnliche Sequenz von sieben 11-*mer repeats* hat man in α -Synuclein identifiziert, einem Protein das mit Parkinson und Alzheimer in Verbindung gebracht wird. Die 11-*mer repeat* Sequenz von α -Synuclein ist erforderlich für die Bindung an Lipidvesikel (Bussell et al., 2005) und an Lipid droplets (Bussell et al., 2005). Aus diesem Grunde nimmt man an, dass auch S3-12 über 11-*mer repeats* an Lipid droplets bindet. Auch für TIP47 (Bulankina et al., 2009), OXPAT (Yamaguchi et al.,

2006) und ADRP (McManaman et al., 2003) konnte man zeigen, dass die *11-mer repeat* Region eine Bindung an Lipid droplets vermittelt.

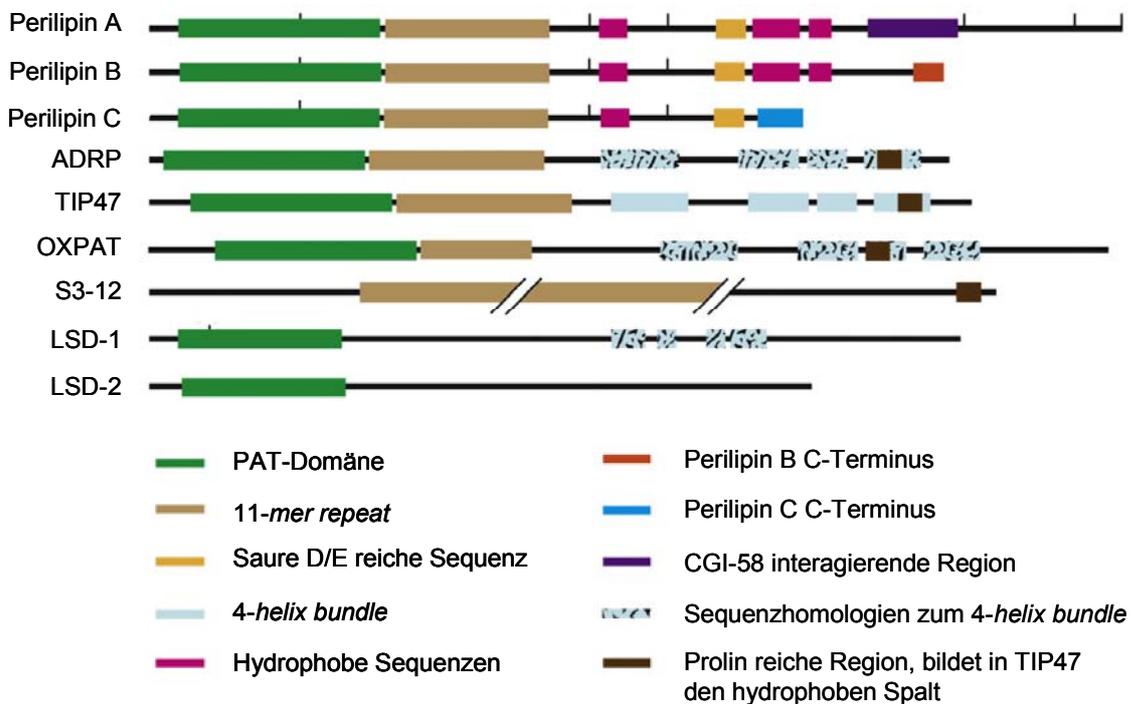


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Proteine der PAT-Familie. Die ersten sieben Proteine sind PAT-Proteine in Säugetieren; LSD-1 und LSD-2 (*lipid storage droplet*) sind die bisher bekannten PAT-Proteine in *Drosophila melanogaster*. Mit Ausnahme von S3-12 besitzen alle PAT-Proteine am N-Terminus eine ~100 Aminosäure große Region mit hoher Sequenzhomologie, die als PAT Domäne bezeichnet wird, deren Funktion aber bis heute unbekannt ist. S3-12 zählt zu den PAT Proteinen, da es zum einen an Lipid droplets bindet und zum anderen 11-mer repeats besitzt, die ebenfalls in den *mammalian* PAT-Proteinen beschrieben wurde (Scherer et al., 1998). Die Röntgenstrukturanalyse des C-Terminus von TIP47 zeigt eine 4-helix bundle Domäne, die aufgrund der hohen Sequenzhomologie von TIP47, ADRP und OXPAT auch für diese Proteine angenommen wird. Für Perilipin ist die Domäne aufgrund der geringeren Konservierung der Aminosäuresequenz nicht beschrieben worden (AS sind zwischen Perilipin und TIP zu 29% identisch). Allerdings reicht oft die Konservierung der für die Faltung wichtigen AS aus, damit Proteine eine nahezu identische Struktur besitzen (Abb. abgewandelt nach Bickel P.E. et al.; 2009.).

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Proteinen erfolgt die Lipid droplet Bindung von Perilipin über hydrophobe Sequenzen im C-terminalen Bereich (Abb. 1.4) (Subramanian et al., 2004).

Der C-Terminus von Perilipin unterscheidet sich in der Aminosäuresequenz von den C-Termini von TIP47, ADRP und OXPAT (Abb. 4). Die Struktur des C-terminalen Teils von TIP47 konnte 2004 durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden

(Hickenbottom et al., 2004). TIP47 besitzt 4 amphipatische α -Helices, die miteinander interagieren und eine Art *bundle* ausbilden. Dieses *4-helix-bundle* ist von anderen Lipid-bindenden Proteinen, den Apolipoproteinen bekannt und interagiert mit den Acylketten von Lipiden (Hatters et al., 2006). Aufgrund der homologen Sequenzen von TIP47, ADRP und OXPAT geht man davon aus, dass auch ADRP und OXPAT dieses *4-helix-bundle* besitzen (Abb. 1.4) (Dalen et al., 2007). Damit weisen TIP47, ADRP und OXPAT zwei potentielle Domänen für eine Lipidbindung auf, deren genaue Funktion durch weitere Experimente geklärt werden muss.

Konzeptionell gesehen kann man die Mitglieder der PAT-Familie in 2 Gruppen einteilen: Es gibt sowohl ubiquitär exprimierte PAT-Proteine (ADRP und TIP47), als auch gewebsspezifisch exprimierte PAT-Proteine (Perilipin, S3-12 und OXPAT). Eine weitere Einteilung charakterisiert die Bindung der Proteine an Lipid droplets. PAT Proteine, die nur an Lipid droplets gebunden vorkommen (ADRP, Perilipin), gehören zu den CPATs (*constitutively bound to lipid droplets*) und stehen den EPATs (*exchangeable PAT proteins*) (TIP47, S3-12, OXPAT) gegenüber. Mit *exchangeable* ist gemeint, dass die Proteine sowohl zytosolisch als auch an Lipid droplets gebunden vorkommen.

Auch wenn die PAT-Proteine in ihrer Aminosäuresequenz homolog sind, so unterscheiden sie sich doch in Größe, ihrer Gewebeexpression, ihrer Affinität zu und Stabilität an Lipid droplets, sowie in ihrer transkriptionellen Regulation. Diese Unterschiede weisen auf verschiedene Funktionen hin, die zum größten Teil für ADRP, TIP47, OXPAT und S3-12 noch unbekannt sind. Die Funktion von Perilipin in der Lipolyse wird in diversen Reviews (Bickel et al., 2009; Zimmermann et al., 2009) (Watt and Steinberg, 2008) erläutert und in Abb. 1.5 auf Seite 17 kurz dargestellt.

Im folgenden werden die Ergebnisse bisheriger Arbeiten über die für diese Arbeit relevanten PAT-Proteine, ADRP und TIP47, vorgestellt:

ADRP

Adipocyte differentiation-related protein (ADRP) ist in humanen Zellen ein 52kDa Protein und wurde zuerst in differenzierenden Adipozyten entdeckt. Während der Differenzierung steigt der ADRP mRNA Level kontinuierlich auf das 50-100-fache an

(Jiang et al., 1992). ADRP kann an Lipid droplets detektiert werden, wird aber in ausgereiften Adipozyten von Perilipin verdrängt (Jiang et al., 1992). Später entdeckte man, dass ADRP ubiquitär exprimiert wird (Brasaemle et al., 1997). Die Transkription von ADRP wird über den Transkriptionsfaktor *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* PPAR α in der Leber (Dalen et al., 2006) und über PPAR β/δ in Keratinozyten (Schmuth et al., 2004) gesteuert. In verschiedenen Zelllinien wurde nachgewiesen, dass ADRP konstitutiv exprimiert und unmittelbar proteasomal abgebaut wird, wenn keine Lipid droplets in der Zelle vorhanden sind (Masuda et al., 2006; Xu et al., 2005).

In der Perilipin *knock out* Maus ersetzt ADRP zwar Perilipin auf der Oberfläche von Lipid droplets, kann aber dessen Funktion, die Regulation der Lipolyse, nicht kompensieren (Tansey et al., 2001) (Martinez-Botas et al., 2000). Für die funktionelle Analyse von ADRP wurde von der Arbeitsgruppe Chang eine „ADRP *knock out* Maus“ generiert (Chang et al., 2006). Die daraus resultierten Ergebnisse müssen allerdings unter Vorbehalt betrachtet werden, da die Arbeitsgruppe von McManaman festgestellt hat, dass die ADRP *knock out* Maus, zumindest in den Milchdrüsen, weiterhin eine N-terminal trunke Version von ADRP exprimiert (Russell et al., 2008). Dieser trunke Version von ADRP fehlt die PAT-Domäne (AS 1-89 in Maus), ist aber ebenfalls in der Lage an Lipid droplets zu binden. Ob diese trunke Version auch in anderen Geweben exprimiert wird, wurde bis heute nicht publiziert.

Zellkulturexperimente konnten zeigen, dass eine Überexpression von GFP-ADRP in verschiedenen Zelllinien zu vergrößerten Lipid droplets und einer Zunahme des Triacylglyceringehaltes führt (Imamura et al., 2002) (Listenberger et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von ADRP die Lipase ATGL (*adipose triglyceride lipase*) von den Lipid droplets verdrängt. Dies deutet daraufhin, dass ADRP die Interaktion von Lipasen mit der Lipid droplet Oberfläche minimiert und es so zu einer Triacylglycerin-Akkumulation kommt. Bis jetzt gibt es noch keine Studien darüber, wie ADRP die Interaktion der Lipase mit der Lipid droplet Oberfläche behindert. Diese Daten stehen auch im Widerspruch zu dem Phänotyp der Perilipin *knock out* Maus. Würde ADRP in der *knock out* Maus die Interaktion von Lipasen mit der Lipid droplet Oberfläche verhindern, käme es wahrscheinlich nicht zu einer erhöhten basalen Lipolyse. Diese unterschiedlichen und zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse zeigen, wie komplex die Regulation der Speicherung und Freisetzung von Lipiden ist. Die Regulation ist wahrscheinlich von

einem Zusammenspiel vieler Proteine abhängig und wird zusätzlich in unterschiedlichen Geweben differentiell reguliert.

Durch einen *yeast-two-hybrid screen* und in *in vitro* Experimenten konnte eine Bindung von ADRP an ARF1 nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass ADRP eine höhere Affinität zu ARF1-GDP als zu ARF1-GTP besitzt (Nakamura et al., 2004). Brefeldin A, ein Inhibitor von ARF1 GEF (*guanine-nucleotide-exchange factors*), verhindert interessanterweise die Rekrutierung von ADRP an Lipid droplets, nicht aber deren Biosynthese oder die Rekrutierung von TIP47 (Soni et al., 2009). Wie ARF1 allerdings mechanistisch auf die Rekrutierung von Proteinen an Lipid droplets einwirkt, bleibt derzeit unklar.

TIP47

TIP47 wurde 1998 entdeckt: Zum einen als das Plazentaprotein pp17b, dessen Aminosäuresequenz zu 42% mit der Sequenz von ADRP identisch ist (Than et al., 1998), und zum anderen als *tail interacting protein of 47kD* (s. erster Teil der Einleitung) (Diaz and Pfeffer, 1998). 2001 konnten Wolins *et al.* zeigen, dass endogenes TIP47 an Lipid droplets lokalisiert (Wolins et al., 2001). Damit war TIP47 Mitbegründer der PAT-Familie (Lu et al., 2001). TIP47 wird ubiquitär exprimiert und gehört zu den EPATs. Im Gegensatz zu den anderen PAT-Proteinen ist TIP47 das einzige Protein, dessen Expression nicht über PPARs reguliert wird. Die Supprimierung von TIP47 in der Leberzelllinie AML12 führte zu kleineren aber mehr Lipid droplets, wohingegen der Verlust von ADRP zu keiner Veränderung in der Anzahl und Größe von Lipid droplets im Vergleich zu Kontrollzellen führte. Der *knock-down* von beiden Proteinen führte zu weniger aber vergrößerten Lipid droplets (Bell et al., 2008). Die Autoren schlagen vor, dass dieser Phänotyp aufgrund einer vermehrten Fusion zustande kommt. In den TIP47/ADRP RNAi Zellen konnte die Lipase ATGL (*adipose triglyceride lipase*) vermehrt an Lipid droplets detektiert werden und die Zellen wiesen eine erhöhte Lipolyse auf. Interessanterweise zeigten die Doppel *knock-down* Zellen eine reduzierte Sensitivität gegenüber Insulin, was aber durch den zusätzlichen *knock-down* von ATGL aufgehoben werden konnte. Diese Experimente zeigen, dass die relative Expression der PAT-Proteine einen Einfluss auf den Lipid Metabolismus hat, indem sie den Zugang von Lipasen an Lipid droplets kontrollieren und dadurch sekundär den Insulin Signalweg beeinflussen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von TIP47 die Hydrolyse von Retinylester durch die GS-2 Lipase und HSL in Keratinozyten inhibiert. Da die Autoren keine direkte Interaktion zwischen TIP47 und den Lipasen nachweisen konnten, gehen sie davon aus, dass die Inhibition indirekt ist (Gao and Simon, 2006).

TIP47 ist das erste PAT-Protein, von dem eine Röntgenstrukturanalyse gelang: Hickenbottom *et al.* konnten zeigen, dass die C-terminale Hälfte von TIP47 aus einem *4-helix-bundle*, dessen Struktur der des Apolipoproteins ApoE ähnelt, und einer bislang unbekanntem α/β Domäne besteht (Hickenbottom *et al.*, 2004). Zwischen diesen Domänen konnten die Autoren eine hydrophobe Spalte ausmachen, die von Aminosäuren des *4-helix-bundle* und der α/β Domäne gebildet wird. Diese Aminosäuren sind in ADRP konserviert und die Autoren spekulieren, dass diese Spalte eine Art Bindungstasche für kleine Moleküle darstellen könnte.

1.2.2.2. Caveoline

Drei voneinander unabhängige Gruppen konnten Caveoline an Lipid droplets lokalisieren, wenn die Zellen zuvor mit einem Überschuss an Fettsäuren oder Cholesterin inkubiert wurden (Le Lay *et al.*, 2009). In der Caveolin-1 *knock out* Maus ist freies Cholesterin in der Hemimembran von Lipid droplets reduziert, weshalb die Autoren einen Caveolin-abhängigen Cholesterin Transport von der Plasmamembran zu den Lipid droplets vorschlagen (Le Lay *et al.*, 2006).

1.2.2.3. Proteine aus dem Lipidstoffwechsel

Die erste Lipase, die an Lipid droplets identifiziert wurde, war die Hormon sensitive Lipase (HSL) (Londos *et al.*, 1999). Aber erst die Entdeckung von ATGL (*adipose triglyceride lipase*) und CGI-58 (*comparative gene identification-58*) führte zu einem besseren Verständnis des Katabolismus von Triacylglycerin in Adipozyten (Zimmermann *et al.*, 2004). Einzelheiten hierzu finden sich in der Abb. 1.5 und in diversen Reviews (Zimmermann *et al.*, 2009) (Watt and Steinberg, 2008). In anderen Geweben sind sowohl der genaue Mechanismus, als auch die beteiligten Lipasen größtenteils noch unbekannt.

Des Weiteren konnte DGAT2 (Diacylglycerinacyltransferase-2) in der Immunfluoreszenz und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen an Lipid droplets identifiziert werden (Kuerschner et al., 2008; Stone et al., 2009), während die Phospholipase A₂ (Yu et al., 1998), die *long chain fatty acid CoA ligase 3* (Liu et al., 2004) und die Lanosterol Synthase (Brasaemle et al., 2004) in Proteomanalysen identifiziert wurden. Allerdings fehlt für diese Proteine noch ein funktioneller Nachweis.

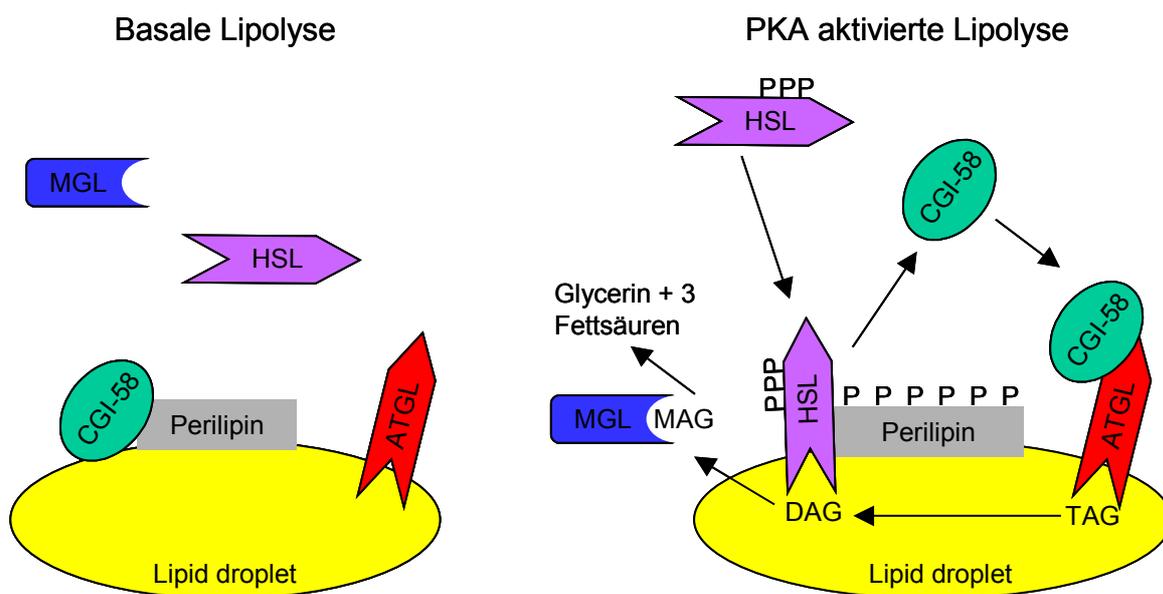


Abb. 1.5: Modell zur regulierten Lipolyse in Adipozyten. Im basalen Zustand bindet CGI-58 an Perilipin, die HSL liegt hauptsächlich zytosolisch vor. ATGL zeigt eine geringe lipolytische Aktivität. Im aktivierten Zustand werden Perilipin und HSL von PKA phosphoryliert. Daraufhin entlässt Perilipin CGI-58 und rekrutiert die phosphorylierte HSL an Lipid droplets. CGI-58 ist nun in der Lage an ATGL zu binden und dessen Aktivität zu erhöhen. Aktivierte ATGL produziert Diacylglycerin, das bevorzugte Substrat der HSL. MGL: Monoacylglycerinlipase; PKA: Proteinkinase A (Abb. abgewandelt nach Zimmermann *et al.*, 2009.).

1.2.3. Die Bildung von Lipid droplets

Die Speicherung von Neutrallipiden wie Triacylglycerin und Cholesterinester ist eine der wesentlichen Funktionen von Lipid droplets und erst die vermehrte Bildung von Neutrallipid in der Zelle induziert die Lipid droplet Biogenese. Demzufolge werde ich kurz erläutern, wie und wo Triacylglycerin gebildet wird.

1.2.3.1. Synthese von Triacylglycerin

Triacylglycerin wird synthetisiert, wenn vermehrt Fettsäuren gebildet oder aus dem Extrazellularraum in die Zelle aufgenommen werden. Lange Zeit nahm man an, dass Fettsäuren durch freie Diffusion in die Zelle gelangen, entdeckte dann aber Fettsäuretransportproteine in der Zellmembran; deren Funktionsweise noch nicht verstanden ist (Mashek and Coleman, 2006). Für die Bildung von Triacylglycerin gibt es zwei bekannte Stoffwechselwege: den ubiquitär vorkommenden Glycerin-3-Phosphat Weg (Kennedy, 1957), und den Monoacylglycerin Stoffwechselweg, der nur in spezifischen Zelltypen wie z.B. Enterozyten, Hepatozyten und Adipozyten stattfindet (Lehner and Kuksis, 1996). Die beiden Stoffwechselwege unterscheiden sich nur in ihrer Synthese von Diacylglycerin, die finale Reaktion zu Triacylglycerin verläuft gleich. Beide Reaktionswege werden in der Abb. 6 dargestellt.

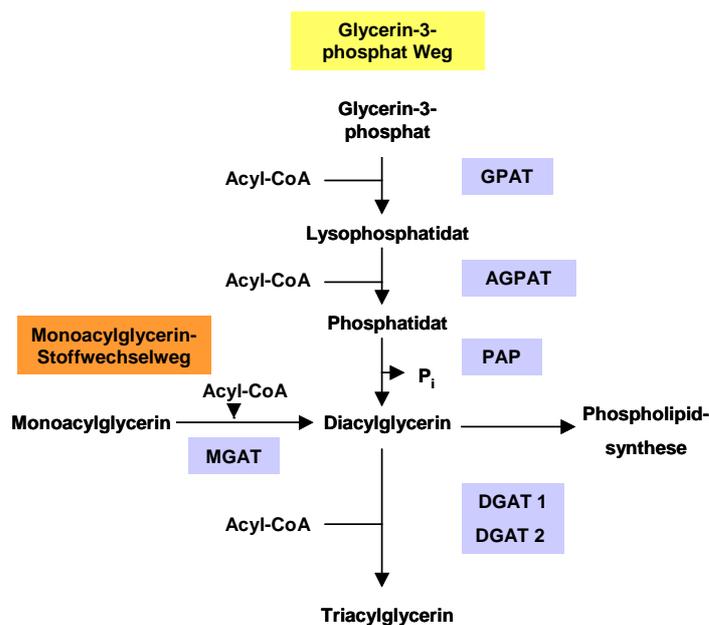


Abb. 1.6: Triacylglycerinsynthesewege: In Säugerzellen kann Lysophosphatid und Phosphatid sowohl an der äußeren Mitochondrienmembran als auch am ER entstehen. Da aber DGAT1 und 2 Transmembranproteine des ERs sind, geht man davon aus, dass die Triacylglycerinsynthese nur am ER stattfindet. GPAT: Glycerin-Phosphat-Acyltransferase; AGPAT: Acylglycerinphosphat-Phosphat-Acyltransferase; PAP: Phosphatid Phosphohydrolase; MGAT: Monoacylglycerin-Acyltransferase. (Abb. abgewandelt nach Yen C-L. *et al.*, 2008.)

1.2.3.2. Bildung von Lipid droplets

Die molekularen Mechanismen der Lipid droplet Bildung sind nach wie vor unbekannt. Bisher gibt es nur Modelle, von denen die wichtigsten vorgestellt werden sollen. Das „*budding*“ und das „*hatching*“ Modell gehen davon aus, dass die Bildung von Lipid droplets am ER stattfindet, da die Enzyme für die Triacylglycerin- und

Cholesterinestersynthese als Transmembranproteine am ER lokalisieren. Als weitere Annahme dieser Modelle akkumuliert das Neutrallipid aufgrund seiner Hydrophobizität zwischen den Membranblättern des ERs. Diese Annahme erklärt auch den Phospholipidmonolayer von Lipid droplets.

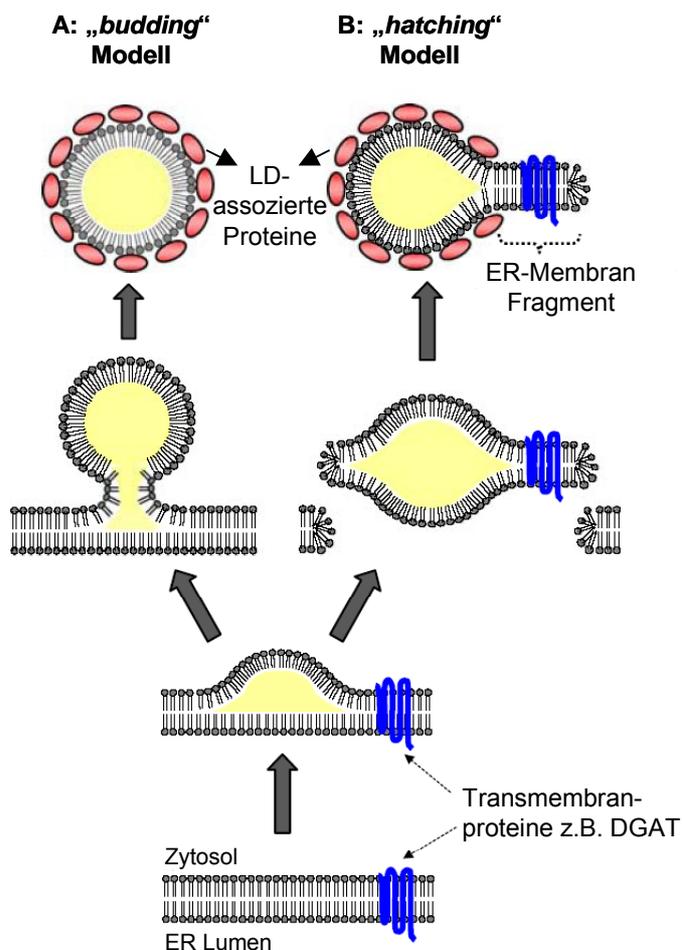


Abb. 1.7: Mögliche Mechanismen der Lipid droplet Bildung. Die Enzyme für die Neutrallipidsynthese sind als Transmembranproteine in der ER Membran lokalisiert. Das neugebildete Neutrallipid wird aufgrund seiner Hydrophobizität zwischen die Membranblätter des ERs eingelagert. Das „budding“ Modell geht davon aus, dass sich das zytosolische Membranblatt mit dem Neutrallipid in Richtung Zytosol wölbt und sich ab einer bestimmten Größe vom ER abschnürt. Im „hatching“ Modell wird das naszierende Lipid droplet über einen unbekannten Mechanismus aus der Membran ausgeschnitten. (Abb. abgeändert nach Fujimoto T. et al., 2009).

Nach dem „budding“ Modell stülpt sich das zytosolische Membranblatt aufgrund der Akkumulation von Neutrallipid zwischen den Membranblättern Richtung Zytosol (Abb. 1.7A). Ab einer gewissen Größe schnüren sich dann die Lipid droplets vom ER ab oder bleiben mit der Membran des ERs verbunden (Murphy and Vance, 1999). Über die Beteiligung von Proteinen an dem Ausstülpungs- und Abschnürungsprozess kann bisher nur spekuliert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten bisher Lipid droplets mit einem Durchmesser von 50nm detektieren (Fujimoto et al., 2008), aber Strukturen die einem naszierenden Lipid droplet nahe kämen, wurden noch nicht identifiziert.

Ein alternatives, ebenfalls hypothetisches Modell, wurde von Hidde Ploegh vorgestellt (Ploegh, 2007). In diesem „*hatching*“ Modell akkumuliert Neutrallipid ebenfalls zwischen den ER Membranblättern, wird aber mit beiden Membranblättern aus der Membran „herausgeschnitten“ und so vom ER abgetrennt. Damit wäre die Anwesenheit von ER Proteinen, speziell von Transmembranproteinen an Lipid droplets, erklärt (Abb. 1.7B). Allerdings geht beim „*hatching*“ die Integrität des ERs verloren, da vorübergehend ein Loch in der ER-Membran entstünde. Außerdem erklärt das Modell nicht, warum die ausgeschnittenen Lipid droplets im Zytosol und nicht im ER Lumen akkumulieren.

1.2.3.3. Wachstum von Lipid droplets

Lipid droplets variieren ihre Größe, allerdings ist derzeit noch unklar, wie sie diese Größenveränderung bewerkstelligen. Hierfür bieten sich zwei Möglichkeiten an: Entweder werden vermehrt Neutral- und Phospholipide von außen aufgenommen und/oder Fusionsvorgänge sind beteiligt.

Nimmt man an, dass Lipid droplets nach ihrer „Geburt“ mit dem ER in Verbindung bleiben, so könnten die neu synthetisierten Lipide durch laterale Diffusion in die Lipid droplets gelangen. Geht man aber davon aus, dass sich „junge“ Lipid droplets nach der Bildung vom ER lösen, so müssen die Neutral- und Phospholipide entweder zu den Lipid droplets transportiert oder an diesen synthetisiert werden. Bei einem Transport gäbe es mehrere Möglichkeiten. Es wäre eine Art Vesikeltransport ähnlich dem für Caveolin denkbar (Le Lay et al., 2006), oder der Transport könnte über Transportproteine für Lipide stattfinden. Zwar kennt man Lipidtransporter für Ceramide und Phospholipide, aber ein Transporter für Neutrallipid ist unbekannt, wenn man von dem mikrosomalen Triacylglycerin Transfer Protein im ER Lumen absieht (Brown and Mattjus, 2007; Schulz and Prinz, 2007). Eine weitere Möglichkeit wäre der Austausch von Lipiden über Membrankontaktstellen zwischen dem ER und Lipid droplets. Der Austausch von Lipiden über Membrankontaktstellen ist u.a. für das ER mit Mitochondrien beschrieben (Levine, 2004). Lipid droplets, die in enger Verbindung zum ER stehen, könnten so nach ihrer Bildung weitere Lipide aufnehmen.

Neben der Möglichkeit des Transportes, könnte die Synthese von Neutral- und Phospholipiden auch direkt am Lipid droplet stattfinden. Dazu müssten die Enzyme

der Neutral- und Phospholipidsynthese an Lipid droplets lokalisieren. Tatsächlich konnten Christoph Thiele *et al.* zeigen, dass überexprimiertes humanes DGAT2 nach Ölsäureinkubation von COS7 Zellen an Lipid droplets lokalisiert (Fei *et al.*, 2008). Ähnliches wurde in der Hefe gefunden. Hier konnte man sowohl das DGAT2 Ortholog Dga1 an Lipid droplets detektieren (Sorger and Daum, 2002), als auch andere Enzyme, die für die Synthese von Triacylglycerin notwendig sind (Guo *et al.*, 2008).

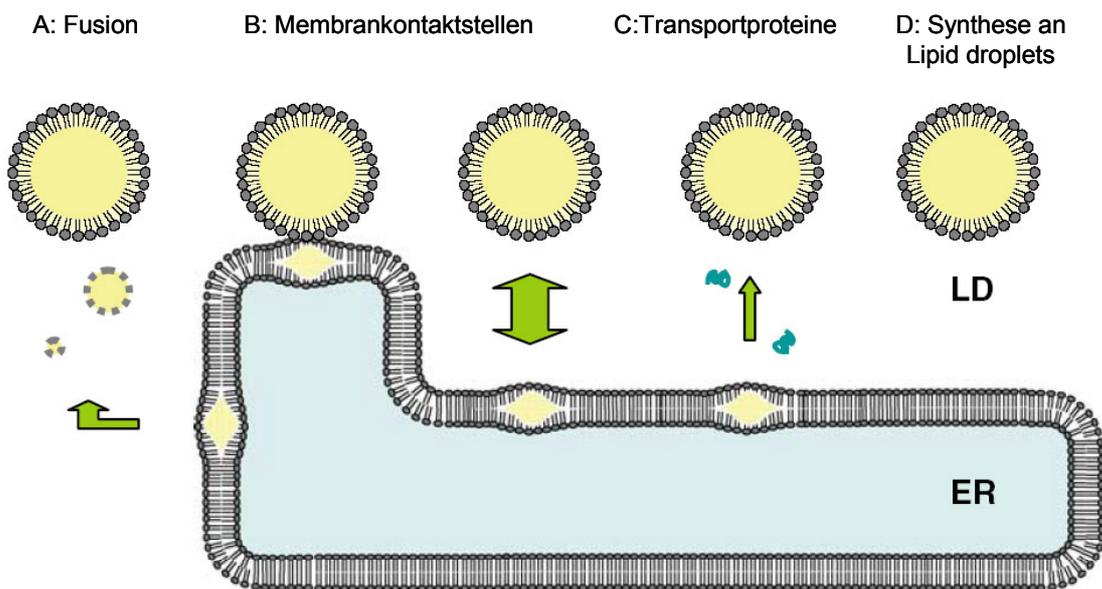


Abb. 1.8: Mögliche Mechanismen für das Wachsen von Lipid droplets. Lipid droplets könnten in ihrer Größe zunehmen, indem sie eine oder mehrere mögliche Mechanismen verwenden. (A) Fusion von Lipid droplets. (B) Interaktion von Lipid droplets mit dem ER über Membrankontaktstellen. Hierbei gibt es die Möglichkeit, dass sie kontinuierlich oder nur transient Kontakt zum ER haben. (C) Eine andere Möglichkeit ist der Transport von Lipiden über Transportproteine. (D) Die Synthese von Neutral- und Phospholipid findet direkt am Lipid droplet statt. (Abb. abgewandelt nach Fujimoto T. *et al.*, 2008.)

Bostrom *et al.* konnten zeigen, dass Lipid droplets ihre Größe verändern, indem sie miteinander fusionieren (Bostrom *et al.*, 2005). Die Autoren zeigen, dass die Fusion abhängig von Mikrotubuli, dem Motorprotein Dynein und von SNARE (*soluble NSF attachment receptor*) Proteinen ist. Zusätzlich zeigen die Autoren, dass NSF (*N-ethylmaleimide-sensitiv factor*), α -SNAP (*α -soluble NSF attachment protein*), SNAP23 (*synaptosomal-associated protein of 23 kDa*), syntaxin-5 und VAMP4 (*vesicle associated membrane protein*) an Lipid droplets lokalisieren und deren *knock-down* die Fusion von Lipid droplets beeinträchtigt (Bostrom *et al.*, 2007).

Bei einer Fusion von Lipid droplets reduziert sich das Oberflächen/Volumen-Verhältnis. Hierzu kalkulierten Fujimoto *et al.*, dass man für das Neutrallipid eines 1µm großen Lipid droplets 125 Lipid droplets mit einem Durchmesser von 200nm braucht, aber nur 25 Lipid droplets der gleichen Größe für die Phospholipidmembran. Wenn also Lipid droplets fusionieren entsteht ein riesiger Überschuss an Phospholipiden, die entweder abtransportiert oder degradiert werden müssen (Marchesan *et al.*, 2003). Interessanterweise führte im Zusammenhang dazu ein *knock-down* des Proteins Cct1 (eine Phosphatidylcholin Cytidyltransferase) zu einer erhöhten Fusion von Lipid droplets in *Drosophila melanogaster* (Guo *et al.*, 2008). Die Autoren folgern, dass der Mangel an Phosphatidylcholin zu einer verstärkten Fusion führt, um das Oberflächen/Volumen-Verhältnis zu reduzieren. In *S. cerevisiae* konnte eine Mutante identifiziert werden, die eine verstärkte Fusion und dadurch weniger, aber größere Lipid droplets aufwies. Die *fld1Δ* Mutante, ein Ortholog zum humanen Seipin, zeigte Veränderungen in der Acylketten Komposition von Phospholipiden (Fei *et al.*, 2008). Insgesamt mehren sich also die Belege dafür, dass der Phospholipidmetabolismus die Lipid droplet Morphologie beeinflusst.

1.2.4. Interaktion mit anderen Organellen

Mittlerweile setzt sich die Vorstellung durch, dass Lipid droplets dynamische Organellen sind, die mit anderen Organellen in der Zelle interagieren. Grund zu dieser Annahme kam zum einen aus der Proteomanalyse von Lipid droplets und zum anderen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die Lipid droplets im engen Kontakt zum ER (Ozeki *et al.*, 2005), den Mitochondrien (Cushman, 1970; Sturmey *et al.*, 2006), Peroxisomen (Binns *et al.*, 2006) und Endosomen (Liu *et al.*, 2007) zeigten. Da bisher direkte Evidenzen für funktionelle Wechselwirkungen fehlen, sollte man die räumliche Nähe von Lipid droplets zu anderen Organellen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen kritisch hinterfragen. Ebenso sollte man die Assoziation von Proteinen an Lipid droplets nach einer Aufreinigung hinterfragen, wenn darüber hinaus keine weiteren Indizien für diese Bindung vorliegen. Die Proteomanalyse von aufgereinigten Lipid droplets kann falsch-positive Ergebnisse liefern, da es sich bei den identifizierten Proteinen auch um Kontaminationen im Zuge der Aufreinigung handeln kann. So wurden z.B. in acht unterschiedlichen Proteomanalysen 18 verschiedene Rab Proteine identifiziert, die an Lipid droplets

binden. Von diesen 18 Proteinen wurden nur Rab1, Rab5, Rab7 und Rab18 in vier oder mehr *screens* gefunden. Von diesen vier Rab Proteinen konnten bisher nur Rab5 (Liu et al., 2007) und Rab18 (Ozeki et al., 2005) durch andere Studien mit Lipid droplets in Verbindung gebracht werden.

1.2.5. Lipid droplets und Erkrankungen

Es besteht Grund zu der Annahme, dass Lipid droplets eine Rolle bei metabolischen Erkrankungen wie Adipositas, Typ 2 Diabetes und Arteriosklerose spielen. Zwei Arbeitsgruppen konnten mögliche Mechanismen aufzeigen. Bostrom *et al.* konnten zeigen, dass SNAP23 sowohl für die Fusion von Lipid droplets verantwortlich ist, als auch für die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran, die GLUT4 (ein Glucosetransporter) enthalten. Werden vermehrt Lipid droplets gebildet, so erniedrigt sich der Pool von SNAP23 an der Plasmamembran. Dadurch können GLUT4 Vesikel nicht mehr mit der Plasmamembran verschmelzen und es wird weniger Glucose in die Zelle aufgenommen (Bostrom et al., 2007). Die Autoren schlussfolgern, dass die Fusion von Lipid droplets die Insulinsensitivität der Zellen reduziert.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte zum erstenmal zeigen, dass die Supprimierung von PAT-Proteinen in einer Leberzelllinie zur Reduzierung der Insulinsensitivität führt (Bell et al., 2008). Die Supprimierung von ADRP und TIP47 führte zu einer vermehrten Fusion von Lipid droplets und zusätzlich zu einer Anreicherung der ATGL Lipase an Lipid droplets. Allerdings konnte der zusätzliche *knock-down* von ATGL die Insulinsensitivität wieder erhöhen. Deswegen gehen die Autoren davon aus, dass die vermehrten freien Fettsäuren zur reduzierten Insulinsensitivität führten.

Ein weiterer Grund, warum Lipid droplets mit Typ 2 Diabetes in Verbindung gebracht werden ist das Protein Perilipin, da dessen *knock out* Maus eine erhöhte Insulinresistenz aufweist. Des Weiteren konnte der humane Genlocus für Perilipin (Chromosom 15q26) mit Diabetes, Hypertriglyzeridämie und Übergewicht in Verbindung gebracht werden (Nakamura and Fujimoto, 2003).

Zu den Erkrankungen die direkt mit Lipid droplets in Verbindung gebracht werden, gehören z.B. das Chanarin-Dorfman Syndrom und die Lipodystrophie. Das Chanarin-Dorfman Syndrom zeigt sich in Ichthyosis und Ablagerungen von Neutrallipid in verschiedenen Geweben, aber nicht im Fettgewebe. Die Ursache dieser Erkrankung liegt in einer *loss of function* Mutation des CGI-58, welches für die Aktivierung der

ATGL Lipase notwendig ist. Dies führt zur Anreicherung von Triacylglycerin in nicht-adipozytärem Gewebe (Lass et al., 2006).

Die Lipodystrophie ist charakterisiert durch den totalen oder teilweisen Verlust von Fettgewebe. Bisher konnten vier Gen Loci mit dieser Erkrankung in Verbindung gebracht werden, wovon zwei mit Lipid droplets assoziiert sind. Das *Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2* (BSCL2) Gen kodiert das Protein Seipin, welches eine Rolle in der Biogenese von Lipid droplets spielt (Fei et al., 2008). *Nonsense* Mutationen von Caveolin-1 führten ebenfalls zur Lipodystrophie (Kim et al., 2008).

Lipid droplets konnten außerdem mit verschiedenen Pathogenen in Verbindung gebracht werden. So sind Lipid droplets für die Assemblierung des Hepatitis C Virus notwendig (Miyanari et al., 2007) und das intrazellulär lebende Bakterium *Chlamydia trachomatis* soll Lipid droplets um seine Vakuole rekrutieren. Als Grund für die Rekrutierung wird die Energiegewinnung aus den gespeicherten Lipiden angenommen (Kumar et al., 2006).

1.3. Fragestellung

Gegenstand dieser Arbeit ist die intrazelluläre Lokalisierung und Funktion von TIP47, welche kontrovers diskutiert wird. Zum einen wurde TIP47 in mehr als 14 Publikationen einer Arbeitsgruppe als Sortierungsfaktor für den retrograden Transport der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren und als ein Schlüsseffektor für die GTPase Rab9 beschrieben (Aivazian et al., 2006) (Diaz and Pfeffer, 1998). In einem ganz anderen Funktionszusammenhang wurde TIP47 als Mitbegründer der PAT-Familie charakterisiert. Deren Mitglieder zeichnen sich durch hohe Sequenzhomologie und Bindung an Lipid droplets aus, wobei die Funktion von TIP47 an Lipid droplets noch unbekannt ist (Wolins et al., 2001).

Ziel dieser Arbeit ist es, die oben beschriebene Kontroverse aufzuklären und zu untersuchen, ob TIP47 möglicherweise ein bifunktionales Protein ist.

Hierzu soll im ersten Teil der Arbeit die intrazelluläre Lokalisierung von TIP47, den Mannose-6-Phosphat Rezeptoren und Rab9 in verschiedenen Zelllinien untersucht und unter anderem die Kolo-kalisierung von TIP47 und Mannose-6-Phosphat Rezeptoren in COS7 Zellen verifiziert werden. Zusätzlich sollen die beschriebenen *in vitro* Interaktionen der Proteine überprüft werden. Des Weiteren soll die Funktion von TIP47 im retrograden Transport von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren in TIP47 supprimierten Zellen untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll die Lokalisierung und Funktion von TIP47 an Lipid droplets charakterisiert werden. Hierfür soll zuerst geklärt werden, wann und wie TIP47 als zytosolisches Protein an Lipid droplets bindet und welche Verweildauer es dort aufweist. Da Bindungspartner einen Aufschluss über die Funktion von Proteinen liefern, soll nach diesen durch geeignete Methoden gesucht werden. Eine weitere wichtige Methode zur Funktionsanalyse ist die Supprimierung von Proteinen mittels RNAi. Von daher soll die Funktion von TIP47 an Lipid droplets in TIP47 supprimierten Zellen charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Autoklav	Varioklav [®]	H+P Labortechnik
Chemilumineszenz-Detektionssystem	FluorChem TM	Alpha Innotech
Chromatographie Systeme	ÄKTAexplorer TM	GE Healthcare
DNA-Sequenzierer	373	Applied Biosystem Inc.
Drehrad für Reaktionsgefäße	Eigenbau	Werkstatt des Instituts
Eismaschine		Ziegra
Elektroporationsgerät	GenePulser [®] II	Biorad
Extruder	LiposoFast TM	Avestin
Feinwaage	CP225D	Satorius
Gelapparatur für Agarosegele	Eigenbau	Werkstatt des Instituts
Gelapparatur für Polyacrylamid-Gele	Mini-Gele	Biorad
Geldokumentation	2UV Transilluminator	Alpha Innotech
Geltrockner	Model 583	Biorad
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf
Inkubator	Incubator C60	Labotect
Kühlschrank	Profi Line	Liebherr
Magnetrührgerät	MR 3001	Heidolph
Mikroliterspritzen		Hamilton
Mikroskope		
Lichtmikroskop	Modell 80i	Nikon
Konfokalmikroskop	SP5	Leica
Konfokalmikroskop	IX81	Olympus
Multikanal Photometer	Sunrise	Tecan
Neubauer Zählkammer		Brand Gläser, Wertheim
PCR Gerät	Mastercycler	Eppendorf
Phosphoimager	Fujix Bas1000	Fuji
pH-Meter		InoLab

Pipetten	Pipetman	Gilson
Plattenheizer		Camag
Reinstwasseranlage	Optilab®	MembraPure
Sicherheits-Werkbank	HeraGuard	Heraeus
SPR basiertes Biosensorsystem	Biacore®3000	Biacore
Rotoren		
Kühlzentrifuge	JA-10	Beckman
	JA-20	Beckman
Ultrazentrifuge	TLA-100.3	Beckman
	TLA-45	Beckman
	SW41	Beckman
Schüttelinkubator	Innova™4230	NewBrunswickScientific
Schüttelplattform	KS 260 basic	IKA
Spannungsgerät		Biorad
Spektralphotometer	SmartSpec™3000	Biorad
Stickstofftank für Zelllagerung	Locator4Plus	LabTrader™
Thermoschüttler	Thermomixer5436	Eppendorf
Transilluminator	Model TFM-20	UVP
Tube slicer		Beckman
Ultraschallgeräte	Sonifier 450	Branson
	Transsonic 570	Elma
	UP200S	Dr.Hielscher GmbH
Vortex	Genie2	Bender&Hobein AG
Waage	BP610	Sartorius
Wasserbad	MP	Julabo
Wipptisch	PlatformRockerStr6	Stuart
Zentrifugen		
Kühlzentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus
	Megafuge 1.0 R	Heraeus
	RC5Cplus	Sorvall
Tischzentrifuge	5415D	Eppendorf
Ultrazentrifugen	Optima™L-70K	Beckman
	Optima™TLX	Beckman

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

4-,6- und 24- Well-Zellkulturschalen		Nunc
3-cm Kulturschalen mit Deckglasboden		Ibidi
Auftragskapillare 1µl, 2µl und 5µl		Camag
Cellophanfolie		Pütz Folien
Dialyseschläuche	Spectra/Por®	Labomatic AG
Einfrierröhrchen	CryoTube™ Vials	Nunc
Einmalspritzen	Discardit™ II	Beckton Dickinson
Einwegkanülen	Sterican	Braun
Elektroporationsküvette		Molecular BioProducts
ELISA-Platten, 96 Loch	PS Microplatte	Greiner Bio-one
Extruder-Membranen, 100 nm	PC Membrane	Avestin
Gewebekulturschalen	15cm	Nunc
Gewebekulturflaschen	75cm ³	Nunc
Glasröhrchen	klein, 1ml	Fisherbrand
	Groß, 10ml	Corning
Konzentratoren	Amicon® Ultra	Millipore
Küvetten	PS 1,5 ml halbmikro	Plastibrand®
Nitrozellulose-Membran (0,1 µm Protran)		Schleicher & Schuell
Objektträger und Deckgläschen		Thermo Scientific
Parafilm®		AmericanNationalCan™
Pasteur-Pipetten		Roth
Petrischalen		Sarstedt
Pipettenspitzen 10+1000 µl	Diamond D10+1000	Gilson
Pipettenspitzen 200 µl		Sarstedt
Pipettierhilfen-Filtereinsatz, 0,45 µm		Integra Biosciences
Reaktionsgefäße 0,5+1,5+2 ml		Sarstedt
Sensorchips		
für das Biacore®3000:	CM5, <i>research grade</i>	Biacore
Skalpelle, steril		Braun
Sterilfilter:		
<i>Bottle-top</i> -Filter, 0,2 µm		Sarstedt
Pufferfilter, 0,2 µm		Millipore

Spritzenaufsatz, 0,2 µm	Minisart®	Sartorius
Sterile Plastikröhrchen 10+50 ml		Sarstedt
TLC Platten	Kieselgel 60 W F ²⁵⁴	Merck
UV-Küvetten	trUView™	Biorad
Whatmanpapier GB 003		Schleicher&Schüll
Zentrifugengefäße	Polyallomer	Beckman

2.1.3. Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen:

Acetonitril	Roth
Agar	Roth
Agarose	Roth
Albumin aus Rinderserum	Roth
Albumin aus Rinderserum, Fettsäurefrei	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Bromphenolblau	Biorad
Butanol	Roth
Calciumchlorid	Roth
CHAPS	Roth
Chloroform	Roth
Cycloheximid	Calbiochem
Coomassie Blau R 250	Serva
Diethylether	Roth
Dimethylformamid	Roth
Dimethylsulfoxid	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
DTT	Roth
EDC	Biacore
EDTA	Roth

Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Glutaraldehyd	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefe-Extrakt	Roth
HEPES	Roth
HPLC-Wasser	J.T.Baker
Imidazol	Roth
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydroxid	Roth
Kupfer-II-sulfat-Pentahydrat	Roth
L-Cystein	Roth
Lysozym	Merck
Magnesiumchlorid	Roth
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumborat	Roth
Natriumcacodylat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumformiat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumsulfat	Roth
NHS	Biacore
N-Hexan	Roth
Ortho-Phosphorsäure	Roth

Osmiumtetroxid	Roth
Paraformaldehyd	Merck
PMSF	Sigma
Rubidiumchlorid	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Stickstoff, flüssig	Messer Griesheim
Stickstoff, gasförmig	Linde Gas
Sulforhodamin B	Sigma
TEMED	Serva
Triacsin C	Biomol
Trichloressigsäure	Roth
Trifluoressigsäure	Fluka
Tris	Roth
Trypton	Roth
Uranylacetat	Dr. D. Wenzel

2.1.4. Antikörper

Tabelle 2: Liste der verwendeten Primärantikörper (Western blot: WB, Immunfluoreszenz: IF und Immunpräzipitation: IP)

Name	Antigen	Verdünnung			Immunisierte Species	Herkunft
		WB	IF	IP (µl)		
à-ADRP	Aminosäuresequenz 5-27 von ADRP, human	1:200	1:25	-	Maus Monoklonal	Progen
à-BIP,	Aminosäuresequenz 525-628 von BIP, human	1:1.000	-	-	Maus Monoklonal	Transduction
à-α-Catenin,	Aminosäuresequenz 729-906 von α-Catenin, human	1:250	-	-	Maus Monoklonal	Transduction

à- GAPDH,	aufgereinigtes GAPDH aus Muskulatur, Kaninchen	1:25.000	-	-	Maus Monoklonal	Chemicon
à-GGA1	Aminosäuresequenz 286-500 von GGA1, human	-	1:50	-	Kaninchen Polyklonal	Santa Cruz
à- Lamp1 (H4A3)	Lysosomaler Extrakt	1:500		-	Maus Monoklonal	Hybridoma Bank
à- MPR46 (10C6)	MPR46 aus humaner Placenta	-	50µg/ml	5µl	Maus Monoklonal	Dr. A. Hille- Rehfeld
à- MPR46 (KII-5)	MPR46 aus humaner Placenta	-	1:400	-	Kaninchen Polyklonal	Dr. A. Hille- Rehfeld
à- MPR46 (MSCI)	Zytoplasmatisches Peptid (67AS) vom MPR46	-	20µg/ml	-	Maus Monoklonal	Dr. A. Hille- Rehfeld
à- MPR300 (300HP- GVII)	MPR300 aus humaner Placenta	1:2.000	1:100	5µl	Kaninchen Polyklonal	Dr. A. Hille- Rehfeld
à- MPR300 (2C2)	luminale Domäne, human	-	1:100	-	Maus Monoklonal	T. Braulke
à-Rab9	Rekombinantes Rab9, Hund	1:2.000	1:250	-	Maus Monoklonal	Alexis
à-TIP47	Rekombinantes His- TIP47, human	1:5.000	1:1000	10µl	Kaninchen Polyklonal	AG Höning
à-TIP47	Aminosäuresequenz 1-16 von TIP47, human	1:2.000		-	Meerschweinchen Polyklonal	Progen
à-	Rekombinantes	-	1:50	-	Schaf	Serotec

TGN46	TGN46, human				Polyklonal	
à- VPS35	—	1:200	1:100	-	Kaninchen Polyklonal	M. Seaman
à- VPS26	—	1:200	1:100	-	Kaninchen Polyklonal	M. Seaman

Tabelle 3: Sekundärantikörper Immunfluoreszenz

Name	Verwendung in IF (Verdünnung)	Herkunft
Ziege- à –Maus-Alexa488	1:400	Molecular Probes
Ziege- à –Maus-Alexa546	1:400	Molecular Probes
Ziege- à –Kaninchen-Alexa488	1:400	Molecular Probes
Ziege- à –Kaninchen-Alexa546	1:400	Molecular Probes
Ziege- à –Maus-Alexa633	1:400	Molecular Probes
Ziege- à –Kaninchen-Alexa633	1:400	Molecular Probes
Ziege- à –Schaf-Alexa488	1:400	Molecular Probes

Tabelle 4: Sekundärantikörper Western-Blot

Name	Verwendung auf WB (Verdünnung)	Herkunft
Ziege- à -Maus- HRP	1:2.000	Dianova
Ziege- à -Kaninchen- HRP	1:2.000	Dianova

2.1.5. Lipide

Dimyristoylphosphatidylcholin	Avanti
Triacylglycerin	Sigma
Ölsäure	Sigma
Lipidmarker, TLC Mix34,40	Larodan

2.1.6. Radioaktive Substanzen

[1- ¹⁴ C] Ölsäure (100µCi/ml; 1,75mM)	Amersham
[³⁵ S]-L-Methionin/ Cystein	Hartmann Analytik

2.1.7. Molekularbiologische Materialien

2.1.7.1. Reagenzien und Fertiglösungen

DNA-Größenstandard	Invitrogen, Fermentas
--------------------	-----------------------

2.1.7.2. Antibiotika

Kanamycin	Sigma
Ampicillin	Serva

2.1.7.3. Bakterien

Als Bakterienstämme wurden die *E. coli* Stämme *DH5α* und *BL21 DH3* kultiviert.

2.1.7.4. Enzyme

Bei den enzymatischen Reaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

Restriktionsendonukleasen (Erkennungssequenz)

BamHI (G_GATCC)	NEB
EcoRI (G_AATTC)	NEB
XhoI (C_TCGAG)	NEB
Sall (G_TCGAC)	NEB
T4-DNA-Ligase	NEB
Proof start DNA Polymerase	Qiagen

2.1.7.5. Kits

ProofStart™ DNA Polymerase Kit	Qiagen
QIA-Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIA-Plasmid Mini Kit	Qiagen

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

2.1.7.6. Nukleotide/ Oligonukleotide

dNTPs	Promega
siRNAs	Ambion
Primer	Metabion

Tabelle 5: Sequenzierprimer

Name	Plasmid	Sequenz (5'-3')
SH404	5' Primer für pTagRFP	CTACGTCGAGCAGCACGAGG
SH405	5' Primer für pTagGFP	TCCTGGAGTCCTTCAGCGCC
SH403	3' Primer für pTagGFP/RFP	CCTCTACAAATGTGGTATGGC

Tabelle 6: Primer

Name	Protein und Schnittstelle	Sequenz (5'-3')
SH333	5'-XhoI-Rab9	TAGATCTCGAGCCATGGCAGGAAAATCTTC
SH307	3'-BamHI-Rab9	GAGGATCCTCAACAGCAAGATGAGCTAGGCTTG
SH334	5'-XhoI-TIP47	ATCACCTCGAGCCATGTCTGCCGACGGGGCAG
SH194	3'-BamHI-TIP47	TCCGCGGATCCCCTACTTCTTCTCCTC

Tabelle 7: siRNAs

Name	Protein	Bindungsstelle	sense Sequenz (5'-3')
TIP47	TIP47	3'-UTR	CCCUAUCAGUCAGUAGAGAtt
TIP47-1	TIP47	Translationsregion	CAGAGCUACUUCGUACGUctt
VPS35-3	VPS35	Translationsregion	AUUUGGUGCGCCUCAGUCAtt
VPS26-4	VPS26	Translationsregion	UGAUGGGGAAACCAGGAAAat
Rab9	Rab9	Translationsregion	CGGCGACUAUCCUUAUUUUtt
Rab9-1	Rab9	Translationsregion	GUUUGAUACCCAGCUCUUCtt

2.1.7.7. Plasmide

Folgende Plasmide mit enthaltender cDNA wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

pET3d-Rab9	Prof. Dr. S. Pfeffer
pETM-30-TIP47	Dr. M. Rudolph
pETM-30-TIP26	Dr. M. Rudolph
pEGFP-GPI	Dr. M. Plomann
pEGFP-Rab5	Dr. P. van der Sluijs
pEGFP-Rab7	Dr. C. Bucci
GFP-lamp1	Dr. Dell'Angelica
pGEX4T1-MPR300CD	Dr. V. Hauke
pGEX4T3-MPR46CD	Prof. Dr. Höning
pGEX4T3-GGA1-VHS	Prof. Dr. Höning
pMPSV-EH-His-TIP47	Prof. Dr. Höning

Für die Klonierungen von TIP47 und Rab9 zu einem GFP- bzw. RFP-Fusionskonstrukt wurden die pTagGFP-C bzw. pTagRFP-C Vektoren von Evrogen verwendet. Diese Vektoren unterscheiden sich nur in der Sequenz des jeweiligen fluoreszierenden Proteins, weswegen nur die Vektorkarte von pTagRFP-C abgebildet wurde.

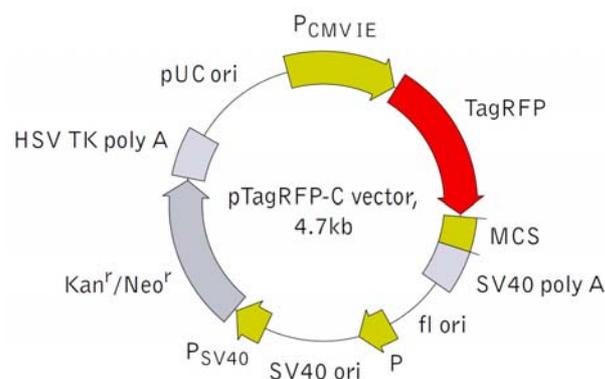


Abb. 2.1: Vektorkarte von pTagRFP-C

2.1.8. Zellbiologische Materialien

2.1.8.1. Reagenzien und Fertiglösungen

Effectene Transfektions Reagenz Kit	Qiagen
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Fluoreszenz Mounting Medium, Prolong Gold	Invitrogen

Tabelle 8: Farbstoffe für die Neutrallipidfärbung

Name	Verdünnung	Herkunft
Bodipy493/503, Stocklösung 5mM in DMSO	1:10.000 (Endk. 500nM)	Molecular Probes
Lipid Tox red	1:1.000	Molecular Probes
Lipid Tox deep red	1:1.000	Molecular Probes

2.1.8.2. Medien und Zusätze

DMEM (<i>Dulbecco modified eagle medium, high Glucose</i>)	Gibco
DMEM ohne Phenolrot	Gibco
DMEM ohne Met/Cys	Gibco
PBS	Gibco
Optimem	PAA
FCS	PAA
Trypsin/EDTA 1x	Gibco
Penicillin/Streptomycin (100x = 10.000U/ml)	Gibco

Standardmedium

DMEM + 10% FCS + Pen (100U/ml)/Strep (100U/ml)

Hungermedium

DMEM + 1% FCS + Pen (100U/ml)/Strep (100U/ml)

Ölsäure komplexiert an BSA

Für die Induktion der Lipid droplet Bildung wird dem Medium 400µM Ölsäure zugegeben, die zuvor an fettfreies BSA komplexiert wurde. Die Komplexierung dient dem Transport der hydrophoben Fettsäure im Medium und verhindert detergenzienartige Effekte ungebundener Fettsäuren. 1mol Albumin bindet bis zu 7mol Fettsäuren (Petitpas et al., 2001). Daher wird für die Komplexierung ein Verhältnis von 1:6 eingesetzt, um sicherzustellen, dass auch alle Fettsäuren gebunden vorliegen. Für die Stocklösung wird zunächst 2mM (5,36g/40ml) fettfreies BSA in warmen PBS gelöst und anschließend 12mM (163,3µl/40ml) Ölsäure tröpfchenweise dazugegeben. Dies wird solange auf dem Magnetrührer inkubiert, bis die trübe Lösung klar erscheint. Erst dann sind alle Fettsäuren gebunden. Die Lösung wird anschließend steril filtriert (0,2µm Filter), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Triacsin C

Stocklösung 5mM in DMSO, Endkonzentration 6µM in DMEM ohne FCS (Brasaemle et al., 2000).

Cycloheximid

Stocklösung 40µg/ml in Ethanol, Endkonzentration 40µg/µl in Standardmedium.

2.1.8.3. Zelllinien

Hela Zellen (ATTC: CCL 2) sind menschliche epithelartige Zellen. Sie wurden aus einem Zervix-Karzinom, später als Adenokarzinom diagnostiziert, isoliert. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, zurück.

COS7 (ATTC: CRL-1651) ist eine Fibroblasten Zelllinie, die aus Nierengewebe von grünen Meerkatzen gewonnen wurde. Die Zellen wurden stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert und produzieren das so genannte *large* T-Antigen.

HUH-7 (JCRB0403), diese Zelllinie wurde aus einem differenzierten Hepatozyten Karzinom eines 57-jährigen Mannes gewonnen.

HepG2 (ATTC: HB-8065) ist eine Zelllinie, die aus einem differenzierten Hepatozyten Karzinom eines 15-jährigen kaukasischen Jungen gewonnen wurde.

Humane Fibroblasten wurden als primäre Zellen aus einer Hautstanze gewonnen und mit einem wöchentlichen Teilungsrhythmus weiter kultiviert.

Mono-Mac-6 (DSMZ) ist eine menschliche Monozyten Zelllinie, die aus dem Blut eines 64-jährigen Mannes isoliert wurde, der an einer akuten monozytären Leukämie erkrankt war.

2.1.9. Biochemische Materialien

2.1.9.1. Reagenzien und Fertiglösungen

Acrylamid-Lösung, Rotiphorese®Gel30 (30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid)	Roth
Bradford-Reagenz	Biorad
Glutathion Sepharose	GE Healthcare
Lipidmarker, TLC Mix34,40	Larodan
Ni-NTA-Agarose	Quiagen
Protein-A-Agarose	Sigma
Proteinase Inhibitor Cocktail (für Bakterien und Säugerzellen)	Sigma
Pansorbin	Calbiochem
Protein-Größenstandard (Precision Plus Protein™ Standard)	Biorad

2.1.9.2. Proteine

ApoE (human, rekombinant)	Calbiochem
AP-2 Core	Dr. D. Owen

2.1.9.3. Säulen

GSTrap FF 1ml

GE Healthcare

2.1.10. EDV

Adobe Photoshop

Adobe Systems Inc.

Adobe Reader 7.0

Adobe Systems Inc.

AIDA Image Analyzer

Raytest

ÄKTA-Unicorn

GE Healthcare

AlphaEase FC

Alpha Innotech

Endnote

Thomson

FV10-ASW

Olympus

LAS AF Lite

Leica

Magellan2

Tecan

Sigma Plot 11

Systat Software

Vector NTI

Invitrogen

winCATS

Camag

Windows XP

Microsoft

2.1.11. Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Statistische Vergleiche wurden unter Verwendung des Student's T-Test (sigma stat) durchgeführt, wenn eine Normalverteilung der Daten vorlag. Ansonsten wurde der Man-Whitney-Test angewandt. Ein Unterschied wurde als signifikant eingestuft, wenn der p-Value bei $< 0,05$ lag.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung von *E. coli*

Kanamycin (Kan)-Lösung:	25 mg/ml Kanamycin in A. bidest steril filtrieren, bei -20°C lagern
Ampicillin (Amp)-Lösung:	25 mg/ml Ampicillin in A. bidest steril filtrieren, bei -20°C lagern
Luria Bertani Bakterien-Medium: (LB Medium)	5 g NaCl 2,5 g Hefe-Extrakt 5 g Trypton add 500 ml A. bidest autoklavieren und abkühlen lassen
LB-Agarplatten:	2,5 g NaCl 2,5 g Hefe-Extrakt 5 g Trypton 7,5 g Agar add 500 ml A. bidest direkt in eine 500 ml-Flasche einwiegen autoklavieren und abkühlen lassen

Bakterien wurden in einem geeigneten Volumen an Flüssigmedium (LB-Medium) auf dem Schüttler bei 220rpm oder auf Festmedium (LB-Agarplatten) bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Selektionierung transformierter Bakterien erfolgte durch das Antibiotikum Ampicillin ($100\mu\text{g/ml}$) oder Kanamycin ($30\mu\text{g/ml}$).

2.2.2. Herstellung kompetenter Zellen

Bakterien werden in den Zustand der Kompetenz versetzt, um doppelsträngige Plasmid-DNA mittels Transformation aufnehmen zu können.

Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurden 10 ml LB-Medium mit *E. coli* Zellen des Stammes *BL21 DH3* aus einer Glycerinkultur angeimpft. Diese Startkultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend in 1l LB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,35 weiter kultiviert. Danach wurden die Zellen für 15-30 min auf Eis abgekühlt und anschließend durch mehrfaches pelletieren und resuspendieren gewaschen und ankonzentriert. Das Pelletieren erfolgte jeweils durch Zentrifugation der Suspension für 15 min bei 4°C mit 4.400g. Resuspendiert wurde jeweils einmal mit 1. 1l kaltem, sterilen A. bidest; 2. 0,5l kaltem, sterilen A. bidest; 3. 20ml kaltem, sterilen 10 %igen Glycerin und 4. mit 2ml kaltem, sterilen 10 %igen Glycerin.

Die elektrokompetenten Zellen wurden in 40µl Aliquots in sterile Eppendorf-Gefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen (CaCl₂-Methode)

Puffer I:

- 100 mM RbCl
- 50 mM KCl
- 30 mM KAc
- 15 % (v/v) Glycerin
- pH 5,8 mit Essigsäure einstellen

Puffer II:

- 10 mM MOPS; pH 7
- 10 mM RbCl
- 75 mM CaCl₂
- 15 % (v/v) Glycerin

Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch sterilfiltriert.

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen wurden 6ml LB-Medium mit *E. coli* Zellen des Stammes *DH5α* aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2ml dieser Startkultur wurden in 100ml LB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Abkühlung der Kultur unter Schwenken für 10min auf Eis und die Sedimentation der

Bakterien für 5min bei 1.000xg und 4°C. Das Pellet wurde in 2ml Puffer aufgenommen, kurz gevortext und 90min bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte erneut eine Pelletierung der Bakterien für 5min bei 1.000xg und 4°C. Das Bakterienpellet wurde in 2ml Puffer II aufgenommen. Die chemokompetenten Zellen wurden in 100µl Aliquots in sterile Eppendorf-Gefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

2.2.3. Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA

SOC-Medium:	2 g Trypton
	0,5 g Hefe Extrakt
	60 µg NaCl
	19 mg KCl
	0,2 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	add 100 ml A. bidest
	autoklavieren

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde diese durch Elektroporation oder mittels Hitze-Puls in kompetente Bakterienzellen transformiert.

Transformation in elektrokompetente *E. coli* Zellen: Elektroporation

40µl elektrokompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-10ng der zu transformierenden Plasmid-DNA wurde die Suspension in eine kalte, sterile Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem GenePulser® II (Biorad) bei 5µFd; 200Ω und 2,5kV. Anschließend wurde die Bakteriensuspension sofort mit 500µl SOC-Medium versetzt und 40min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte mit Hilfe von Kanamycin bzw. Ampicillin. Dazu wurden 100µl der Bakteriensuspension auf einer LB-Amp- bzw. LB-Kan-Agarplatte ausplattiert, die restlichen 400µl auf einer weiteren Selektionsplatte. Die Platten wurden zur Koloniebildung über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation in chemokompetente *E. coli* Zellen

100µl chemokompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 5µl des Ligationsansatzes oder 1-10ng der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden dazugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Suspension für 15min auf Eis, dann für 1,5min bei 42°C im Wasserbad (Hitzeimpuls) und weitere 2min auf Eis. Die Bakterien wurden mit 1ml LB-Medium versetzt und für 40min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte wie bei der Transformation durch Elektroporation beschrieben.

2.2.4. Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des QIA-Plasmid Mini Kits sowie des QIA-Plasmid Midi Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.5. Anlegen einer Glycerinkultur

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden 750µl der Bakteriensuspension mit 250µl sterilem, 80 %igem Glycerin versetzt und in Einfrierröhrchen pipettiert. Die Glycerinkultur wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.6. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung 1:100 mit A. bidest verdünnt und die Extinktion bei 260nm gegen den Leerwert (A. bidest) gemessen. Für die Messung wurde eine Quarzküvette verwendet. Eine Absorptionsänderung um eine Einheit bei einer Wellenlänge von 260nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA. DNA ohne Proteinverunreinigung hat einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 (Lottspeich, 2006).

2.2.7. Agarosegelelektrophorese

TAE:	40 mM Tris 2 mM EDTA pH 8,0 mit Eisessig einstellen
DNA-Probenpuffer 5x:	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (w/v) Saccharose in 1x TAE
Agarose-Gel	0,8-1,5% (w/v) Agarose in 1x TAE aufkochen und abkühlen lassen 0,1µg/ml Ethidiumbromid

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel kann präparativ oder analytisch erfolgen. Die analytische Auftrennung dient zur Größen- und Mengenabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente anhand eines ebenfalls im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards. Durch die präparative Auftrennung kann man DNA-Fragmente reinigen. Dazu erfolgt nach der elektrophoretischen Auftrennung die Extraktion der entsprechenden DNA-Bande aus dem Agarosegel. Die DNA wurde mit 5-fach DNA-Probenpuffer versetzt und je nach zu erwartender Größe auf ein 0,8-1,5%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung lief bei 4V/cm in TAE-Puffer. Der im Gel enthaltene, fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und markiert dadurch die DNA-Banden im Gel. Diese wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

2.2.8. DNA Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.9. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen

Die endonukleolytische Spaltung von Nukleinsäuren kann einerseits präparativ zur Isolierung von DNA-Fragmenten und andererseits analytisch genutzt werden. Dazu verwendet man Restriktionsendonukleasen vom Typ II, die spezifisch, meist 4-8 Nukleotid lange, oft palindromische DNA-Sequenzen erkennen und innerhalb dieser Restriktionsschnittstellen die Hydrolyse der Esterbindung zwischen Ribose und Phosphatgruppe katalysieren. Dieser Schritt erfolgt an beiden Einzelsträngen, oft um wenige Basenpaare versetzt, so dass überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen. Andere Enzyme erzeugen glatte Enden (*blunt ends*).

Eine geeignete DNA Menge (ca. 200-500ng für die analytische und bis zu 5µg für die präparative Spaltung) wurde mit dem Restriktionsenzym (1-10 Units/µg DNA) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer 1 Stunde oder ü.N. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Spaltung durch elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem Agarosegel überprüft.

2.2.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation ermöglicht die Verknüpfung ursprünglich getrennter, linearer DNA-Fragmente durch das Enzym DNA-Ligase. DNA-Ligasen wie die T₄-DNA-Ligase des Bakteriophagen T₄ von *E. coli* katalysieren die Veresterung von 5'-Phosphat-Enden und 3'-Hydroxyl-Enden der DNA in Anwesenheit von ATP als Kofaktor. Dabei benötigt die Ligation von glatten DNA-Enden eine höhere Enzymkonzentration als die Ligation überhängender DNA-Enden.

Zur Herstellung der Expressionsvektoren enthielt der Reaktionsansatz geschnittenen Vektor und Insert im molaren Verhältnis von 1:5 und T₄-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers mit dem entsprechenden Puffer. Ligiert wurde der Ansatz für eine Stunde bei RT.

2.2.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR kann man spezifische DNA-Fragmente *in vitro* amplifizieren. Die Methode basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe von thermostabilen DNA-

Polymerasen z.B. der *Taq*-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus*. Für eine exponentielle Vermehrung der DNA-Matrize müssen folgende Schritte wiederholt durchgeführt werden:

1. Denaturierung: Trennung der Ausgangs-DNA in die zwei Einzelstränge durch Erhitzen
2. *Annealing*: Anlagerung der spezifischen Oligonukleotid-Primer bei einer für die Primer spezifischen *Annealing*-Temperatur
3. Elongation: Synthese komplementärer DNA-Sequenzen ausgehend von den 3'OH-Enden der Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase

Die optimale *Annealing*-Temperatur ist abhängig von Länge, potentiellen Sekundärstrukturen und Cystein- und Guanin-Gehalt der Primer. Sie liegt theoretisch 2°C unter der Schmelztemperatur der Primer, die nach folgender Formel berechnet wird: Schmelztemperatur = 4 x (Anzahl G+C) + 2 x (Anzahl A+T).

Die PCR Reaktion erfolgte mit Hilfe des ProofStart™DNA Polymerase Kits von Qiagen.

Ein PCR-Ansatz enthielt:	5 µl 10x PCR-Puffer
	1 µl PCR-dNTP-Mix (je 200 µM)
	10 pmol Primer 1
	10 pmol Primer 2
	1-10 ng Ausgangs-DNA
	1 µl ProofStart™DNA Polymerase

und wurde mit sterilem A. bidest auf 50 µl aufgefüllt.

Bsp. eines PCR-Programms für Rab9:

95°C 5min Aktivierung der Polymerase	
95°C 30 sek (Denaturierung)	<div style="display: inline-block; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; width: 60px; height: 60px; margin-right: 10px;"></div> } 30 x
58°C 30 sek (Annealing)	
72°C 1min (Elongation)	
72°C 10 min (Termination)	
4°C Pause	

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.7) analysiert. Die Reinigung der relevanten Fragmente erfolgte durch Extraktion aus dem Agarose-Gel (2.2.8) oder mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen (2.2.12).

2.2.12. Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA nach einer PCR (2.2.11) bzw. Ligation (2.2.10) erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.2.13. DNA Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden vom ZMMK-Service-Labor durchgeführt. Dazu wurden 500ng DNA mit 1µl Sequenzierprimer (10pmol) versetzt und das Gesamtvolumen auf 6µl aufgefüllt.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Lagerung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden nach dem Trypsinieren abzentrifugiert, in Einfriermedium (DMEM + 20% FCS + 10% DMSO) aufgenommen und dann in 1ml Kryoröhrchen eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit einer größeren Menge Medium in Kultur gebracht, um toxische Effekte des DMSO zu vermeiden.

2.3.2. Kultivierung von Zellen

Die adhärennten Zellen wurden im Brutschrank auf 75 cm² Plastikkulturflaschen oder speziell beschichtete Schalen (3 bis 15cm Durchmesser) in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre und 5%CO₂ bei 37°C kultiviert. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet, dem 10% fetales Kälberserum (FCS) und 100U/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Das Kulturmedium wurde alle 2 bis 3 Tage erneuert. Konfluente Zellen wurden geteilt.

Hierbei wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 3 bis 5min bei 37°C mit Trypsin/EDTA inkubiert. Das Trypsin löst die Zellen durch den hydrolytischen Abbau verankerter Zelloberflächenproteine und der extrazellulären Matrix. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen mit serumhaltigen Medium gewaschen.

Zellen, die stabil mit einem Neomycin Resistenzgen enthaltenden Plasmid transfiziert waren, wurden in DMEM + 500µg/ml Geneticin (G418) kultiviert.

2.3.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Dabei wurden 10µl der homogenen Zellsuspension in die Kammer pipettiert und die Zellen in 4 Quadranten gezählt. Die Bestimmung der Zellzahl pro ml ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen pro ml} = n \times 10^4$$

mit

n = Mittelwert der Zellen aus den 4 ausgezählten Quadranten

2.3.4. Transfektion mit Plasmid DNA

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellkulturzellen. Dabei kann man zwischen dem zeitweiligen Einbringen eines Plasmid in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und der Integration des Plasmids in das Genom der Wirtszelle (stabile Transfektion) unterscheiden. Es gibt verschiedene Verfahren um Zellen zu transfizieren. Hier erfolgte die Transfektion mit Hilfe des Qiagen Effectene® Transfection Reagent Kits nach Angaben des Herstellers.

2.3.5. Transfektion mit RNA Oligonukleotiden

Die Transfektion der Zellen mit doppelsträngiger RNA diente der Supprimierung von Proteinen über RNA Interferenz (RNAi). RNAi ist ein Prozess, der die Genexpression in Eukaryoten auf dem prä- und posttranskriptionalen Level moduliert (Hannon, 2002). Dazu wird doppelsträngige RNA, die eine ca. 19bp lange Sequenz besitzt und

an deren 3`-Enden jeweils 2 ungepaarte Nukleotide sind, in die Zelle transfiziert. In der Zelle wird die RNA von RISC, einem Ribonukleoprotein-Komplex mit Nuklease-Aktivität gebunden. Dieser entwindet den Doppelstrang und assoziiert den Strang, der am 5`-Ende weniger GC bp enthält. Dieser Strang ist komplementär zur Ziel mRNA und bewirkt, dass eine Endonuklease des RISC diese schneidet, so dass keine Translation mehr stattfinden kann. Für die Supprimierung der Proteine wurden zwei siRNAs mit je 30nM verwendet. Je nach Anzahl der benötigten Zellen wurde diese am Vortag auf 3, 6 oder 10cm Schalen ausplattiert. Für eine 3cm Schale wurden $2 * 10^5$ Hela-Zellen am Vortag ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden pro Ansatz 2 Eppis vorbereitet, eines mit 250µl Optimem und mit der gewünschten Menge siRNA versetzt und das andere mit 250µl Optimem plus 2,5µl Lipofektamin. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die Lösungen vereint und weitere 15min bei RT inkubiert. Bevor die RNA-haltige Lösung auf die Zellen getropft wurde, wurden diese mit PBS gewaschen und in DMEM ohne Penicillin/Streptomycin inkubiert. Eine Wiederholung der Behandlung mit siRNA am Folgetag verstärkte den *knock-down*-Effekt. 48h nach der letzten RNAi Behandlung wurden die Zellen für die jeweiligen Versuche verwendet. Die Effizienz der RNAi wurde nach SDS-PAGE mittels Western blot nachgewiesen.

2.3.6. Immunfluoreszenz

Zur Analyse von Zellen wurden diese auf Deckgläschen ausplattiert, evtl. nach 24h transfiziert und für weitere 24h inkubiert. Danach folgte nachstehendes Protokoll.

Fixierung der Zellen

Die Fixierung der Zellen ist erforderlich um die Morphologie und die subzelluläre Verteilung und die Konformation der Proteine zu konservieren. Dazu wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS für 20min bei RT mit 3%-igem Paraformaldehyd in PBS inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, dann zum Absättigen freier Aldehydgruppen 10min bei RT mit 50mM Ammoniumchlorid inkubiert, dann wieder zweimal mit PBS gewaschen.

Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung kann die subzelluläre Lokalisierung von Zielmolekülen in Zellen sichtbar gemacht werden. Dabei binden die spezifischen Antikörper an ihre jeweiligen Antigene. Ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper können durch mehrmaliges Waschen entfernt werden. Die spezifisch gebundenen Antikörper können durch verschiedene Verfahren sichtbar gemacht werden. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der Antikörper mit einem Farbstoffmolekül konjugiert. Häufig wird jedoch die indirekte Immunfluoreszenz angewendet, bei der ein sekundärer, fluoreszierender Antikörper spezifisch den für das Zielprotein spezifischen primären Antikörper bindet. Die Farbmoleküle werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und so sichtbar. Selektive Filter im Fluoreszenzmikroskop ermöglichen eine Trennung von verschiedenen Farbstoffen, so dass mehrerer Zielmoleküle gleichzeitig und/oder Strukturen in der Zelle mit unterschiedlichen Fluoreszenzen sichtbar gemacht werden können.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

Nach Fixierung wurden die Zellen zur Permeabilisierung 10min mit 0,5%-igem Saponin in PBS, dann zweimal mit 0,1%-igem Saponin in PBS gewaschen. Dann wurden die primären Antikörper in PBS+0,1% Saponin zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS+Saponin folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für die Sekundäantikörper durch eine 15-minütige Inkubation mit 200µl Ziegenserum (10% in PBS). Das Serum wurde durch zwei erneute Waschschrritte mit PBS+Saponin entfernt, dann der sekundäre Antikörper zugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert.

Es folgten je zwei Waschschrritte mit PBS und H₂O.

Färbung der DNA mit dem Hoechst-Farbstoff

Die fixierten Zellen wurden 30min mit Hoechst-Farbstoff (Bis-Benzimid, Hoechst Nr. 33258, 25µg/ml) in Waschpuffer bei RT inkubiert, dreimal in Waschpuffer und zweimal mit PBS und H₂O gewaschen.

Einbetten der Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden in ca. 10µl Fluoreszenz Mounting Medium (Pro long Gold, Invitrogen) eingebettet, welches Antibleichmittel, Stabilisatoren (Natriumazid) und

Signalverstärker enthält und über Nacht im Dunkeln getrocknet, um sie anschließend mit klarem Nagellack zu versiegeln.

Dokumentation am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM)

Die Dokumentation erfolgte am konfokalen LSM, da untersucht werden sollte, ob zwei unterschiedliche Proteine in der Zelle in derselben Fokusebene lokalisieren. Die Detektion von emittiertem Licht aus einer Fokusebene ist nur am konfokalen Mikroskop möglich. Hierzu wird das emittierte Licht von der Probe auf eine variable Lochblende (*pinhole*) fokussiert und von einem hinter dem *pinhole* liegendem Detektor (ein Photomultiplier) erfasst. Liegen Fokuspunkt und *pinhole* in konjugierten Ebenen, also konfokal, kann nur Licht aus dem Fokuspunkt das *pinhole* passieren während Streulicht, das ober- oder unterhalb der Fokusebene emittiert, wirksam unterdrückt wird.

Die Untersuchung der Proben erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop IX81 von Olympus oder an einem Leica TCS SP5.

2.3.7. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

Mit FRAP kann die molekulare Dynamik wie z.B. Transport- oder Diffusionsprozesse von fluoreszenzmarkierten Proteinen in lebenden Zellen untersucht werden. Hierbei werden die fluoreszierenden Proteine durch einen kurzen intensiven Laserpuls in einem definierten Bereich gebleicht. Anschließend wird die Regeneration der Fluoreszenz über die Zeit gemessen. Die Zunahme spiegelt direkt die Geschwindigkeit wider, mit der ungebleichte fluoreszenzmarkierte Proteine in die gebleichte Region eindringen. Durch vergleichende Messungen sind Aussagen über Proteindynamiken und Bindungsverhalten möglich. Mit dieser Methode sollte das Bindungsverhalten von GFP-TIP47 an Lipid droplets analysiert werden.

Für die FRAP-Analyse wurden 1×10^5 stabil transfizierte GFP-TIP47 Zellen 2 Tage vor der Analyse auf 3cm Schalen mit Deckglasboden ausplattiert und 16h vorher mit Ölsäure inkubiert. Die Kontrollzellen wurden am Vortag mit GFP-GPI transfiziert. Während der FRAP-Experimente waren die Zellen in einer auf 37°C beheizbaren Kammer mit 40% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ untergebracht. Das *bleaching* erfolgte

mit 100% Laserintensität für 200ms und die anschließende Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte alle 3sec bei GFP-GPI und alle 5sec bei GFP-TIP47. Die FRAP Experimente erfolgten am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop IX81 von Olympus

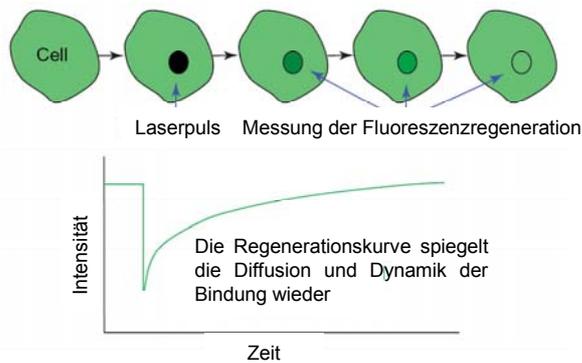


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines FRAP Experiments. Durch einen kurzen intensiven Laserpuls wird das GFP markierte Protein in einem definierten Bereich gebleicht, ohne das biologische Gleichgewicht zu stören. Anschließend wird die Regeneration der Fluoreszenz über die Zeit gemessen und in einer Intensitätskurve dargestellt. (Abb. abgewandelt aus Sprague and McNally, 2005).

2.3.8. Fluoreszenzdurchflußzytometrie

Bei der Durchflußzytometrie werden mit Hilfe einer Vibrationskammer aus einer Zellsuspension feinste Tröpfchen generiert, in denen höchstens eine Zelle Platz findet und so der Einzelzellanalyse zugänglich wird. Mit einem Laserstrahl von 488nm kann die Vorwärtsstreuung die Größe und die Seitwärtsstreuung die Granularität der Zellen feststellen. Zusätzlich regt der Laser die Fluoreszenz an, die mit einem Photomultiplier detektiert wird. In dieser Arbeit sollte die Fluoreszenzintensität des Neutrallipidfarbstoffes Bodipy493/503 pro Zelle gemessen werden. Hierfür wurden die Zellen für 16h +/- 400µM Ölsäure inkubiert und anschließend für weitere 2h mit Bodipy493/503. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, bei 500xg für 5min sedimentiert und in 1ml kaltem PBS resuspendiert. Mindestens 30.000 lebende Zellen wurden am FACS Canto (BD Bioscience) analysiert. Dabei wurde die Vorwärtsstreuung gemessen, um lebende Zellen von Zelltrümmern zu trennen.

2.4. Biochemische Methoden

2.4.1. Aufschluss von Zellen bzw. Gewebe

Bei der Trypsinierung von Zellen, wurden diese zuerst 2x mit PBS gewaschen und anschließend für 3-5min mit Trypsin inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit serumhaltigen Medium abgestoppt und die Zellen bei 500xg für 5min und 4°C sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen noch 2x mit kaltem PBS gewaschen. Alle Schritte danach erfolgten auf Eis oder bei 4°C.

Herstellung eines Zellhomogenats

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, trypsinert oder abgeschabt und bei 500xg 5min sedimentiert. Das Sediment wurde noch 2x mit PBS gewaschen, sedimentiert und anschließend in einer der gewünschten Proteinkonzentration entsprechenden Menge A. bidest + Proteaseinhibitor (1:500) aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Zellsuspension 3x 10sec mit Ultraschall beschallt.

Herstellung eines *post-nuclear supernatant* (PNS)

Hypotoner Puffer	20mM Tris, pH 7,4
	1mM EDTA

Hierfür wurden die Zellen gewaschen, sedimentiert (s. oben) und in einem entsprechenden Volumen hypotonem Puffer resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit einer Kanüle (24G) aufgeschlossen und bei 500xg 5min zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und die Kernfraktion zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und als PNS weiterverwendet. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch mit Hilfe von Trypan blau analysiert.

Herstellung von zytosolischen Extrakten und Membranfraktionen

Die Zellen auf den Zellkulturplatten wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in PBS + Proteaseinhibitoren (1:500) abgeschabt und bei 500xg für 5min sedimentiert. Die Zellen konnten nun in einer der gewünschten Proteinkonzentration

entsprechenden Menge PBS + Proteaseinhibitoren (PI)(1:500) aufgenommen und mit einer Kanüle (27G) homogenisiert werden. Zur Generierung eines PNS wurde das Homogenat ebenfalls bei 500xg 5min zentrifugiert. Die Trennung der zytosolischen Zellanteile von den Membranen erfolgte anschließend durch eine Zentrifugation bei 100.000xg für 30min. Das Zytosol befand sich nun im Überstand, während das Sediment die Zellorganellen und die Plasmamembran enthielt.

Zell-Lyse durch Detergenzien

Bei der Lyse mit Detergenzien kam Triton X-100 (0,5%) zum Einsatz. Entweder wurde es dem PBS nach dem ersten Zentrifugationsschritt zugegeben, um Membranproteine zu extrahieren, in diesem Fall entfiel der Zellaufschluss mit Hilfe einer Spritze, oder das Detergenz wurde dem Sediment der Ultrazentrifugation zugegeben. In beiden Fällen diente es der Zerstörung der zellulären Membranen, um Membranproteine zusammen mit dem Zytosol oder diese extra auf ihre Zusammensetzung zu analysieren.

Zellaufschluß zur Isolierung der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Aufschlusspuffer	0,1 M NaAc pH 6,0 0,2 M NaCl 1mM Jodacetamid, 1mM PMSF, 10µl PI (frisch)
TIN Puffer	0,5% Tx-100 50mM Imidazol pH7.0 150mM NaCl 1mM Jodacetamid, 1mM PMSF, 10µl PI (frisch)

Das Zellpellet wurde in 1ml Aufschlusspuffer resuspendiert, 3x 20sec mit Ultraschall behandelt und dann bei 16.000xg 30min zentrifugiert. Der zytosolische Überstand wurde verworfen und das membranhaltige Sediment wurde in 400µl TIN-Puffer aufgenommen, wieder 3x 20sec mit Ultraschall behandelt und für 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat 30min bei 16.000xg zentrifugiert und der Überstand für die Immunpräzipitation eingesetzt.

Herstellung von Schweinehirnzytosol

Das von den Hirnhäuten befreite Schweinehirn wurde in 500g Portionen eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Tiefgefrorenes Schweinehirn wurde ü.N. bei 4°C aufgetaut. Anschließend wurde das Gehirn gewogen und mit dem 5x Vol Puffer (50mM Tris, 150mM NaCl, pH7,5), der auf eine Endkonzentration von 1mM PMSF und 5mM Jodacetamid eingestellt wurde, dreimal für 10sec im Mixer homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat bei $15.000\times g$ für 30min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bei $100.000\times g$ für 1h sedimentiert. Das Zytosol befand sich nun im Überstand und wurde für *pull down* Experimente verwendet.

2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten ohne Detergenzien wurde mit dem RotiQuant®-Bradford Reagenz durchgeführt. Mit diesem Kit können Konzentrationen zwischen $1\mu\text{g}$ und $16\mu\text{g}$ Protein pro ml Lösung quantifiziert werden. Für jede Bestimmung wurde eine Eichgerade mit BSA erstellt (2, 4, 8, 12, $16\mu\text{g/ml}$). Für die Probenvorbereitung wurde $800\mu\text{l}$ H_2O mit der Probe oder dem Standard (BSA) sowie $200\mu\text{l}$ des Bradford-Reagenz vermischt und für 10min bei RT inkubiert. Je nach Konzentration der Proben wurden 1 – $8\mu\text{l}$ für die Bestimmung eingesetzt. Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 bindet an kationische und hydrophobe Seitenketten von Proteinen und durch diese Komplexbildung wird eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von λ 465 nm zu λ 595 nm bewirkt. Zusammen mit einem Leerwert (H_2O und Bradford-Reagenz) wurden $200\mu\text{l}$ aller Standards und Proteinproben in eine Mikrotiterplatte pipettiert und diese in einem ELISA-Reader bei $\lambda = 595\text{nm}$ gemessen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch lineare Regression.

Proteinbestimmung mittels DC-Assay bei Einsatz von Detergenzien

Der Bio-Rad DC Protein Assay ermöglicht die Proteinbestimmung in Detergenzhaltigen Lösungen. 1ml Reagenz A und $20\mu\text{l}$ Reagenz S wurden gemischt um Reagenz A' zu erhalten. In einer Mikrotiterplatte wurde anschließend zur Erstellung einer Eichgerade BSA (2, 4, 8, 12, $16\mu\text{g}$) vorgelegt. Außerdem wurden 1 – $8\mu\text{l}$ der

zu bestimmenden Proben auf die Platte gegeben. Nun folgte die Zugabe von 25µl Reagenz A' und 200µl Reagenz B zu allen Proben. Außerdem wurde ein Leerwert für die Standardreihe benötigt, der nur aus der Mischung der Reagenzien A' und B bestand. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte im ELISA-Reader bei $\lambda = 750\text{nm}$. Dem gemessenen Farbumschlag liegt eine Kupfer-Protein-Reaktion in basischen Medium und einer Reaktion des Kupfer-vorbehandelten Proteins mit Folin-Reagenz zugrunde. Die Farbentwicklung entsteht durch die Reduktion von Aminosäuren durch das Folin-Reagenz, hauptsächlich von Tryptophan und Tyrosin.

2.4.3. Bestimmung lysosomaler Enzyme im Zellkulturüberstand

Enzymaktivitätsmessung der β -Hexosaminidase

Substrat	10mM Para-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid 0,1 M Na-Citrat pH 4,6 0,1% TritonX-100
Reaktionspuffer	0,1 M Na-Citrat pH 4,6 0,5% TritonX-100
Stoppuffer	0,4M Glycin in NaOH, pH 10,4

Um die Sekretion lysosomaler Enzyme nach der Supprimierung von Proteinen in Zellen zu bestimmen, wurde die Aktivität der β -Hexosaminidase im Zellkulturüberstand und in den Zellen bestimmt.

Hierfür wurden nach der RNAi 5×10^5 Zellen auf 3cm Schalen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 24h in 1ml Medium + 10mM Mannose-6-Phosphat inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und bei 500xg 5min zentrifugiert, um Zellen zu sedimentieren. Der Überstand wurde für den Enzymassay verwendet. Die Zellen selbst wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert und 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200µl A. bidest + 0,05% TritonX-100

resuspendiert und 3x für 10sec mit Ultraschall behandelt. Sowohl vom Zellhomogenat, als auch vom Kulturüberstand wurden jeweils 20µl entnommen und zusammen mit 5µl Reaktionspuffer und 100µl Substrat für 15min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 500µl Stopppuffer beendet, gevortext und bei 16.000xg 10min zentrifugiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 405nm im ELISA-Reader.

$$\text{Aktivität (mU/ml)} = \frac{E_{405} \cdot \text{Messvolumen (ml)} \cdot 1000}{\varepsilon \cdot \text{mol} \cdot \text{Enzymvolumen(ml)} \cdot \text{Inkubationszeit(min)}}$$

Der molare Exktinktionskoeffizient ε für Hexosaminidase beträgt 18,5cm²/mol bei 405nm.

Nachweis von Cathepsin D im Zellkulturüberstand

Hierfür wurden 6 x 10⁵ Zellen auf 3cm Schalen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann für 6h mit DMEM ohne FCS inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und bei 500g 5min zentrifugiert, um eventuelle Zellkontaminationen zu sedimentieren. Die Proteine im Medium wurden ü.N. mit 10% TCA gefällt (s.2.4.6) und in 75µl 2x Probenpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden trypsiniert und ein Zellhomogenat erstellt. Von den Zellen wurden 30µg Protein mittels SDS-PAGE (10%) aufgetrennt. Entsprechend der Proteinmenge wurde von dem Medium die 4x Volumenmenge aufgetrennt. Der Cathepsin D Nachweis erfolgte im Western blot.

2.4.4. Metabolische Markierung

Mangelmedium	DMEM ohne Met/Cys + 5% hitzeinaktiviertes FCS + 2mM Glutamin
Markierungsmedium	Mangelmedium + 100 µCi / ml [³⁵ S]-Met/ Cys

<i>Chase-Medium</i>	DMEM
	+ 10% FCS
	+ 10x Met/Cys (0,3mg/ml Endkonzentration)

Unter metabolischer Markierung versteht man den Einbau radioaktiver Aminosäuren in Proteine. Durch eine autoradiographische Analyse nach der Probenaufbereitung lassen sich Rückschlüsse über Biosynthesewege, die Halbwertszeit und/ oder assoziierte Proteine gewinnen. Die Zellen (5×10^5) wurden einen Tag vor der Markierung auf 6cm Zellkulturschalen ausplattiert. Am Tag der Markierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 1h in Met/Cys-freiem Mangelmedium bei 37°C gehungert. Daraufhin wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und für 6h mit Markierungsmedium inkubiert. Dann wurden die Zellen auf Eis 3x mit PBS + 10x Met/Cys gewaschen und im *Chase-Medium* weiter inkubiert. Nach den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, 2x mit PBS gewaschen und das Zellpellet eingefroren. Die weitere Aufarbeitung geschah nach dem Protokoll für die Immunpräzipitation (s. 2.4.5).

2.4.5. Immunpräzipitation

Neufeld Puffer:	10mM Tris-HCl, pH 8,5
	0,6M KCl
	0,1% SDS
	0,05% Nonidet P-40

Immunomix (IMM):	1% Triton X-100
	0,5% Natriumdeoxycholat
	in PBS

IMM/ 2M KCl:	2M KCl in IMM
--------------	---------------

Präzipitations-IMM:	10% BSA
	0,2% SDS
	in IMM

Pansorbin

Pansorbin ist eine Suspension aus abgetöteten Bakterien (*Staphylococcus aureus*), das aufgrund des membranständigen Protein A eine hohe Bindungskapazität für die Fc-Region verschiedener Klasse-G-Immunglobuline besitzt. Aus Kostengründen wurde Pansorbin zur Vorfällung eingesetzt. Es wurde immer gewaschenes Pansorbin verwendet, welches wie folgt hergestellt wurde:

2ml Pansorbin wird bei 16.000xg für 1min sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Pansorbin in 2ml PBS resuspendiert. Dies wird fünf Mal wiederholt.

Protein-A-Agarose

Dass in der Protein-A-Agarose vorhandene Formaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen mit 750µl PBS entfernt. Dafür wurde die Protein-A-Agarose bei 2.300xg für 2min sedimentiert. Üblicherweise wurden 50µl Protein-A-Agarose pro Probe (Zellextrakt aus einer 6cm Schale) eingesetzt. Das Pipettieren wurde mit einer abgeschnittenen 200µl Spitze vorgenommen.

Die Immunpräzipitation ist ein Standardverfahren zur Aufreinigung von Proteinen aus Zellextrakten. Alle Versuchsschritte finden auf Eis oder bei 4°C statt, die Inkubationen auf einem Drehrad. In dieser Arbeit wurde die Immunpräzipitation zum einen für die Bestimmung von Halbwertszeiten und zum anderen für die Analyse von Bindungspartnern eingesetzt. Hierbei unterschieden sich die Vorfällungen und im Falle der Halbwertszeitbestimmung wurde stringenter gewaschen als bei der Analyse von Bindungspartnern.

Vorfällung bei der Analyse von Bindungspartnern

Nach Zellaufschluss (s. 2.4.1) werden die Proben mit Maus oder Kaninchen IgG und Protein-A-Agarose für 2h inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Das Präzipitat wird durch eine Zentrifugation bei 2.300xg für 5 min pelletiert und der Überstand weiter verwendet.

Vorfällung für die Halbwertszeitbestimmung

Die Proben wurden zuerst für 2h mit Kaninchen IgG oder Maus IgG im Präzipitations-IMM inkubiert, dann wurde für weitere 30min Pansorbin zugegeben, um unspezifisch

bindende Proteine über den Kaninchen Antikörper und das Pansorbin zu koppeln. Das Präzipitat wird durch eine Zentrifugation bei 16.000xg für 15 min pelletiert und der Überstand weiter verwendet.

Immunpräzipitation

Dem Überstand wird für mind. 2h ein Primärantikörper zugegeben. Abhängig von der Konzentration der Antikörper wird dieser (bei geringen Konzentrationen) entweder vor dem Versuch an Protein-A-Agarose oder nach der 2-stündigen Inkubation für weitere 2h mit Protein-A-Agarose inkubiert und so gekoppelt. Es werden pro Immunpräzipitation ca. 2-5 μ g Antikörper eingesetzt. Durch Zentrifugieren bei 2.300xg für 5 min wird die Agarose mit dem gebundenen Immunpräzipitat anschließend pelletiert. Der Überstand kann daraufhin verworfen und das Sediment mit verschiedenen Kombinationen von Waschpuffer gewaschen werden, um Verunreinigungen zu entfernen. Für die Bestimmung von Halbwertszeiten wurde das Immunpräzipitat 1x mit Neufeld, 1x mit IMM, 1x mit IMM+ KCl und 1x mit 1/10 PBS gewaschen. Für die Analyse von Bindungspartnern wurde 3x mit PBS und 1x mit 1/10 PBS gewaschen. Abschließend wurde Proteinprobenpuffer zugegeben, die Probe aufgekocht und abzentrifugiert. Die Probe kann dann per SDS-Page und Western-Blot analysiert werden. Im Falle einer Halbwertszeitbestimmung wurde das radioaktive Gel nach der SDS-PAGE für 15min in Entfärber-Lösung (s. 2.4.8) und dann für die gleiche Zeit in A. bidest geschwenkt. Anschließend wurde das Gel zwischen zwei Cellophan-Folien getrocknet. Die Markerbanden wurden mit Labelmedium markiert und das getrocknete Gel mittels Autoradiographie über Nacht exponiert. Bei schwachen Signalen erfolgte eine längere Exponierung bis zu 3 Tagen.

2.4.6. Fällung von Proteinen

Um ein Protein aus einem großen Puffervolumen in eine geringe Menge Probenpuffer aufnehmen zu können, bedient man sich der Fällung mit Trichloressigsäure (TCA). Dabei wurde der zu fällenden Lösung 10% (v/v) TCA zugesetzt, diese Mischung anschließend für 2h oder ü.N. auf Eis inkubiert und dann 10min bei 16.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und

verworfen, das Sediment mit Natriumacetat (2% NaAc in EtOH) versetzt, welches sofort wieder abgesaugt wurde. Dadurch wurde das TCA vollständig entfernt. Nach dem Trocknen des Sediments an der Luft wurden die Proteine in 10-80µl 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen.

2.4.7. SDS-PAGE

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS in A. bidest
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS in A. bidest
APS:	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in A. bidest
10x SDS-Lauf-Puffer:	1 % SDS 250 mM Tris/HCl pH 8,6 190 mM Glycin in A. bidest
Protein-Probenpuffer 6x:	24 ml 2 M Tris/HCl, pH 6,8 12 g SDS 45 ml 100 % Glycerin 60 mg Bromphenolblau 12 ml 2-Mercaptoethanol 88ml A. bidest

Trenngel+Sammelgel:

für 2 Minigele:	Trenngel				Sammelgel
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	4,5 %
Acrylamidlösung (Roth)	2 ml	2,67 ml	3,33 ml	4 ml	0,45 ml
1,5 M Tris 0,4 % SDS	2 ml				-
0,5 M Tris 0,4 % SDS	-				0,45 ml
H ₂ O	3,9 ml	3,3 ml	2,62 ml	1,95 ml	2 ml
TEMED	8 µl				4 µl
10 % APS	80 µl				40 µl

Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-PAGE nach Laemmli dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). SDS (Sodiumdodecylsulfat) ist ein anionisches denaturierendes Detergenz, das an hydrophobe Bereiche der Proteinmoleküle bindet (alle 2-3 Aminosäuren) und den Proteinen so eine negative Ladung proportional zum Molekulargewicht verleiht, die auch die Eigenladung des Proteins überlagert. Die meisten Proteine binden etwa 1,4g SDS pro Gramm Protein. Auf der Oberfläche der gebildeten SDS-Protein-Komplexe findet man die negativ geladenen Sulfatgruppen des SDS. Dadurch werden alle Proteine über ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis vergleichbar. Im elektrischen Feld kommt es zur Auftrennung des Proteingemisches. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht (MG) auf. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol werden zusätzlich eventuell vorhandene Disulfidbrücken reduziert.

Es wurde ein diskontinuierliches System verwendet, in dem Proben zuerst in ein nicht-restriktives Sammelgel einlaufen und dann in einem Trenngel aufgetrennt werden. Je nach Größe des nachzuweisenden Proteins wurden Trenngele mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen verwendet. So wurden 12,5%-ige Trenngele für Proteine mit einem MG zwischen 20 und 60 kDa, 10%-ige Trenngele für Proteine mit einem MG zwischen 30 und 120kDa und für Proteine mit einem MG über 100kDa wurden 7,5%-ige Trenngele verwendet.

Es wurden zwischen 10 und 45µg Protein mit Probenpuffer 5min bei 95°C inkubiert, 3min abzentrifugiert und der Überstand auf ein Acrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 15min bei 50mA, dann bei 100mA bis die Laufmittelfront das Ende des Gels erreicht hatte.

2.4.8. Coomassiefärbung von Proteinen

Coomassie-Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassie Blau R 250
 45 % (v/v) Ethanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 45 % (v/v) A. bidest

Coomassie-Entfärbelösung: 50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 40 % (v/v) A. bidest

Nach einer Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch Färben des Polyacrylamidgels mit *Coomassie Brilliant Blue R250* Protein-Färbelösung für mindestens 45min bei RT unter leichtem Schütteln sichtbar gemacht. Zum Entfärben und Fixieren der Proteine wurde das Gel mehrmals für etwa 10min in der Entfärbelösung geschwenkt, wobei diese jeweils gewechselt wurde.

2.4.9. Silbernitrat Färbung von Proteinen

Fixierlösung: 500ml Ethanol
 100ml Essigsäure
 400ml A. bidest
 0,5ml Formalin (37% Formaldehydlösung)

Waschlösung: 500ml Ethanol
 500ml H₂O

Sensitivierlösung 0,2g Na₂S₂O₃ x 5 H₂O
 in 1l A. bidest

Färbelösung	2g AgNO ₃ in 1l A. bidest (im Dunkeln aufbewahren, ca. 14 Tage haltbar) 600µl Formalin, frisch dazugeben
Entwicklerlösung	4mg Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O 40g Na ₂ CO ₃ in 1l A. bidest 500µl Formalin, frisch dazugeben
Stopplösung	60ml Essigsäure 220ml Ethanol 220ml A. bidest

Das Polyacrylamidgel wurde 1h fixiert und anschließend 2x für 25min gewaschen. Danach wurde das Gel für 1min in Sensitivierlösung geschwenkt und 3x mit A. bidest gewaschen. Die Färbung erfolgte für 20min. Nach intensivem, dreifachem Waschen mit A. bidest erfolgte die Entwicklung je nach gewünschter Stärke des Signals für bis zu 5min. Nach Erreichen der gewünschten Signalstärke wird die Färbung gestoppt. Das gefärbte Gel kann in 1% Essigsäure bei 4°C aufbewahrt werden.

2.4.10. Blue native Gelelektrophorese

2x BNG-Puffer	20mM Bis-Tris 500mM Aminocaprinsäure 20mM NaCl 2mM EDTA 10% Glycerin
---------------	--

Die blue native Gelelektrophorese ist eine Form der Elektrophorese, bei der native Proteine im elektrischen Feld durch das Molekularsieb eines Polyacrylamid-Gels aufgetrennt werden. Hierbei werden die physiologischen Eigenschaften der aufzutrennenden Proteine erhalten und man kann z.B. erkennen, ob Proteine in Komplexen mit anderen Proteinen vorliegen. Der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue*

G250 bindet dabei an hydrophobe Bereiche von Proteinen und verleiht ihnen eine negative Nettoladung, so dass der Protein-Farbstoff-Komplex im elektrischen Feld zur Anode wandert.

Um die Komplexbildung von TIP47 zu untersuchen, wurden sowohl rekombinantes TIP47 (25µg) als auch aus HeLa Zellen generiertes PNS oder HeLa Zytosol (100µg) mit dem BNG-Puffer versetzt und auf ein 10-20% *blue-native-Gel* aufgetragen.

Die Blue native Gelelektrophorese wurde freundlicherweise vom ZMMK-ServiceLabor durchgeführt.

2.4.11. Western blot und Immundetektion

Nach SDS-PAGE konnten die im Gel enthaltenen Proteine durch Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden, um diese mit Antikörpern zu identifizieren. Die Membran bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die Proteinbindungsstellen der negativ geladenen Nitrozellulosemembran werden aktiviert, indem dem Transferpuffer 10 - 20% Methanol zugesetzt wird. Die Membran besitzt eine hohe Proteinbindekapazität und eignet sich für Proteinfärbung und Immunfärbung. Der Proteintransfer erfolgte für 1h bei einer Stromspannung von 150V in Transferpuffer (25mM Tris, 20mM Glycin, 20% MeOH). Danach wurde der Erfolg des Transfers durch Färben der Membran mit Ponceaurot überprüft (s. u.). Es folgte eine Inkubation ü.N. bei 4°C in Blockierungslösung (5% Milchpulver in PBS +0,02% Tween), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Membran wurde am Folgetag 3x mit PBS + 0,02% Tween gewaschen und dann 1h bei RT mit dem primären Antikörper in PBS + 0,02% Tween inkubiert. Durch 2x 5min Waschen mit PBS + 0,02% Tween wurden nicht-gebundene Antikörper entfernt. Die Detektion des gebundenen primären Antikörpers auf der Membran erfolgte mit einem in PBS + 0,02% Tween 1:2000 verdünnten Meerrettichperoxidase-konjugiertem sekundären Antikörper, der für 1h bei RT inkubiert wurde. Ungebundener Zweitantikörper wurde nach 2x Waschen mit PBS entfernt. Mit einem Chemilumineszenz-Reagenz wurde der Zweitantikörper sichtbar gemacht und die Membran mit dem FluorChem™SP-System von Alpha Innotech entwickelt.

2.4.12. Ponceaufärbung von Proteinen

Die Ponceaufärbung dient der Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen, sofern die Proteinmenge >50 ng/Bande beträgt. Die Membran wurde für 1-2min in Ponceaurot (2% in 3%-iger Trichloressigsäure) inkubiert, die überschüssige Farbe dann mit A. bidest abgewaschen. Proteine waren als rote Banden zu erkennen. Mit Hilfe der Ponceaufärbung wurde eine gleichmäßige Übertragung der Proteine auf die Membran nachgewiesen.

2.4.13. Expression und Reinigung von (Glutathion-S-Transferase) GST-Proteinen

Laufpuffer	50mM Tris pH 7,5 150mM NaCl
Lysispuffer	20ml Laufpuffer + 50µl Bakterien PI, 1mM Jodacetamid, 1mM PMSF + 1Spatelspitze Lysoszym
Hochsalzpuffer	50mM Tris pH 7,5 1M NaCl 0,5% Chaps
TEV-Puffer	50mM Tris, pH 7,5 0,5mM EDTA
Elutionspuffer	20mM Glutathion in Laufpuffer Auf pH 8,0 einstellen
Dialysepuffer	25mM Tris pH 7,5 150mM NaCl

Die Expression und Reinigung der rekombinanten GST-Proteine erfolgte nach folgendem Standardprotokoll:

Je 10ml LB Medium mit Selektionsantibiotikum wurden mit dem Expressionsvektor-tragenden Bakterienklon aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur diente zum Animpfen eines größeren Mediumvolumens von 400ml. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6. Durch Zugabe von 0,5mM IPTG wurde die Expression der Proteine induziert und die Bakterien wurden für weitere 4h bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Anschließend wurden die Bakterien 15min bei 4°C und 5.000xg sedimentiert. Das Pellet wurde in 20ml Lysispuffer resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit Ultraschall für zweimal 30sec (Stufe 4-5, Stabultraschall, UP200S, Dr. Hielscher GmbH). Nachfolgend diente ein Zentrifugationsschritt für 15min bei 4°C und 15.000xg zur Trennung der gelösten Proteine von Zellresten. Der Überstand wurde abgenommen und die weitere Aufreinigung erfolgte über Glutathion (GSH)- Säulen (GE Healthcare) mit Hilfe des Chromatographiesystems ÄKTAexplorer™ (GE Healthcare). Für die gleichzeitige Aufreinigung mehrerer GST-Proteine, wie z.B. für *pull down* Experimente, wurde die Glutathion (GSH)-Sephrose (GE Healthcare, 4 Fast Flow) und Leersäulen (MobiTec) verwendet.

Aufreinigung von GST-TIP47 mit dem Chromatographiesystems ÄKTAexplorer™

Die Aufreinigung erfolgte bei einer Flussrate von 1ml/min. Zunächst wurde die GSH-Säule mit fünf Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert und dann die Probe aufgetragen. Anschließend wurde mit 20 Säulenvolumen Laufpuffer, dann mit 10 Säulenvolumen Hochsalzpuffer und 5 Säulenvolumen TEV-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit der TEV-Protease ü.N (siehe unten).

Aufreinigung der GST-Proteine für pull down Experimente

Zum zytosolischen Bakterienlysat wurden 500µl gewaschene Glutathion (GSH)-Sephrose (GE Healthcare, 4 Fast Flow) gegeben und für 45min bei RT auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit der GSH-Sephrose in eine 2,5ml Leersäule (MobiTec) gegeben und mit 10ml Laufpuffer, 10ml Hochsalzpuffer und noch mal 5ml Laufpuffer gewaschen. Danach wurde die GSH-Sephrose in 1ml

Elutionspuffer resuspendiert und vorsichtig in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Bei 500xg wurde die GSH-Sepharose für 5min sedimentiert und der Überstand abgenommen. Es folgten noch zwei weitere Elutionsschritte. Die Eluate wurden vereinigt und gegen den Dialysepuffer dialysiert (s. 2.4.15). Je nach Proteinkonzentration wurden die Proteine noch weiter eingengt (s. 2.4.14) und bei 4°C gelagert.

TEV-Verdau von GST-TIP47

Für den TEV-(*tobacco etch virus*)-Verdau wurde die GSH-Säule vom Chromatographiesystem abgenommen. 2000U der TEV-Protease wurden in 500µl TEV-Puffer (+1mM DTT) auf die Säule getropft und dies ü.N. bei RT inkubiert. Am nächsten morgen wurde TIP47 mit 3x 500µl TEV-Puffer eluiert. Die Eluate wurden anschließend mit GSH-Sepharose und Ni-NTA-Agarose (je 50µl) für 2h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, um unerwünschtes His-GST und die His-TEV-Protease an die Sepharose zu binden. Danach wurden die Eluate bei 2.700xg 5min zentrifugiert und die Überstände abgenommen. In einem SDS-Gel mit anschließender Coomassie Färbung wurde die Reinheit des TIP47 Proteins überprüft.

2.4.14. Erhöhung der Konzentration von Proteinlösungen

Um die Konzentration von Proteinlösungen zu erhöhen, wurden Amicon® Ultra Zentrifugenfilter-Gefäße verwendet. Die Ausschlussgröße des Filters betrug 10kDa, so dass beim Zentrifugieren das Protein zurückgehalten und das Probenvolumen eingengt wurde. Vor Gebrauch wurden die Filter dreimal mit Puffer gewaschen, um noch enthaltenes Triethylenglycol zu entfernen. Die zu konzentrierende Proteinlösung wurde bei 4.000xg und 4°C solange zentrifugiert, bis das gewünschte Probenvolumen erreicht war.

2.4.15. Dialyse

Die Dialyse dient zur Veränderung der Pufferzusammensetzung einer Proteinlösung. Dabei passieren Pufferbestandteile frei die Dialysemembran, wohingegen das Protein im Dialyseschlauch verbleibt (Ausschlussgröße: 12-14 kDa). Der

Proteine mit evtl. Bindungspartnern abtropfen konnten. Das Eluat wurde mit TCA gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und auf ein großes SDS-Gel aufgetragen.

2.4.18. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode mit der Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse m/q von Teilchen genau bestimmt werden können. Sie basiert auf dem Prinzip, dass ionisierte Teilchen im Vakuum auf einer bestimmten Strecke beschleunigt und anschließend in einem Magnetfeld entsprechend ihrer Masse abgelenkt werden. Hierzu benötigt ein Massenspektrometer eine Ionenquelle, in der der Analyt ionisiert wird, einen Massenanalysator, der die Ionen hinsichtlich des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses auftrennt und einen Detektor, der den Ionenstrom misst.

In dieser Arbeit wurde die Massenspektrometrie eingesetzt, um unbekannte Proteine zu identifizieren. Die Massenspektrometrie wurde freundlicherweise vom ZMMK Servicelabor durchgeführt. Dabei wurde das Gerät HCT Ultra (Bruker) verwendet. Die Proben wurden vorher tryptisch verdaut und die Peptide über eine Nano-HPLC weiter aufgetrennt und online im Massenspektrometer analysiert. Die Ionisierung der Peptide erfolgte durch eine Elektrosprayionisation und die Analyse der Masse in einer Ionenfalle. Die Rohdaten wurden mit der *Software Data Analysis* (Bruker) zu Peaklisten prozessiert mit denen anschließend die Datenbanksuche in der Proteinsequenzdatenbank Swissprot 56.9 durchgeführt wurde. Als Suchmaschine wurde Mascot 2.2 verwendet.

2.4.19. Aufreinigung von Lipid droplets

Hypotoner Puffer (HLM)	20mM Tris, pH 7,4 1mM EDTA
HLM + 60% Saccharose (w/w)	38.6g Saccharose 25.73g HLM
HLM + 5% Saccharose (w/w)	2.54g Saccharose 48.34g HLM

Aufgrund ihrer geringen Dichte ($< 1\text{g/cm}^3$) flotieren Lipid droplets nach Zentrifugation durch einen Saccharosegradienten auf dem Puffer, während sich andere Organellen und zytosolische Proteine im Saccharosegradienten verteilen. In dieser Arbeit wurde ein diskontinuierlicher Saccharosegradient (20%, 5% und 0% Saccharose) wie in Brasaemle *et al.* (Brasaemle and Wolins, 2006) beschrieben, verwendet.

Zwei Tage vor der Isolierung wurden 6×10^6 Zellen auf eine 15cm Platte ausplattiert und in DMEM + 1% FCS inkubiert, um vorhandene Lipid droplets zu depletieren. Am nächsten Tag wurde die Bildung von Lipid droplets induziert, indem die Zellen für 16h mit Ölsäure inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen trypsiniert, bei 500xg 5min sedimentiert und 2x mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1ml HLM-Puffer resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch eine Kanüle (24G) aufgeschlossen und bei 500xg 5min wurden die Zellkernfraktion und die nicht aufgeschlossenen Zellen sedimentiert. Vom PNS wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt und 2,5mg Protein wurden in das Zentrifugenröhrchen überführt und auf 2ml mit HLM-Puffer aufgefüllt. Dies wurde mit 1ml des 60% Saccharose HLM-Puffers vermengt, so dass eine 20%-ige Saccharose Lösung entstand. Diese wurde vorsichtig mit 4ml 5% Saccharose HLM-Puffer überschichtet, danach folgten 4ml HLM-Puffer. Der Saccharosegradient wurde anschließend bei 28.000xg für 3h zentrifugiert, wodurch die Lipid droplets aufgrund ihrer geringen Dichte nach der Zentrifugation auf dem HLM Puffer flotierten. Das Zentrifugenröhrchen wurde in einen *tube slicer* eingespannt, so dass der obere ml mit den Lipid droplets vom restlichen Gradienten abgeschnitten wurde. Danach wurden die Lipid droplets resuspendiert und in ein Glasröhrchen überführt. Zusätzlich wurde das abgetrennte Zentrifugenröhrchen 4x mit 1ml Methanol gespült, um sicher zu gehen, dass alle Proteine und Lipide überführt wurden. Um die Lipide der Lipid droplets von den Proteinen zu trennen, wurde anschließend eine Wessel-Flügge-Fällung durchgeführt (s. 2.4.20).

2.4.20. Lipidextraktion nach der Wessel-Flügge-Fällung

Lipidextraktion aus PNS oder Lipid droplets erfolgte nach Wessel-Flügge (Wessel and Flugge, 1984). Hierzu wurde die Probe in ein Glasröhrchen überführt und mit vier Probenvolumen Methanol versetzt. Danach wurde die Probe gevortext und für 1min bei 2.300xg zentrifugiert. Daraufhin wurde ein Probenvolumen Chloroform

dazugegeben, wiederum gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurden drei Probenvolumen HPLC H₂O dazugegeben, wiederum gevortext und für 15min bei 2.300xg zentrifugiert. Die untere Phase enthielt die Lipide, die mit einer Hamiltonspritze in ein sauberes Glasröhrchen überführt wurden. Die Lipide wurden unter Stickstoff eingedampft und bei -20°C gelagert.

Die Interphase enthielt die denaturierten Proteine. Diese wurden nochmals bei 2.300xg 15min zentrifugiert und befanden sich daraufhin im Pellet. Der Überstand wurde abgenommen, das Proteinpellet getrocknet und in einem adäquaten Volumen 2x Probenpuffer aufgenommen.

2.4.21. Dünnschichtchromatographie (*thin layer chromatographie*: TLC)

Laufmittel 1	266ml Essigsäuremethylester 266ml 1-Propanol 266ml Chloroform 106ml Methanol 96ml 0,25% KCl-Lösung
Laufmittel 2	750ml n-Hexan 230ml Diethylether 20ml Essigsäure
Laufmittel 3	n-hexan
Färbelösung	75g CuSO ₄ x 5H ₂ O 900ml HPLC H ₂ O 100ml 85% ortho-Phosphorsäure

Die Dünnschichtchromatographie ist ein Trennverfahren, bei der eine gelöste Substanzmischung auf eine stationäre Phase aufgebracht und dann mit Hilfe eines Flüssigkeitsstromes über die stationäre Phase geleitet wird, wobei sich die einzelnen Bestandteile der Mischung auftrennen. In dieser Arbeit sollten Lipidgemische voneinander getrennt und anhand von Markerlipiden identifiziert werden. Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung von Lipiden wird deren unterschiedliche Polarität ausgenutzt. Das Kieselgel besitzt auf der Oberfläche freie Hydroxylgruppen,

die mit den Lipiden in Wechselwirkung treten, je polarer die Lipide sind. Durch die unterschiedlich starken Wechselwirkungen des Kieselgels mit den Lipiden, sowie durch die unterschiedlich starke Rückresorption der Lipide in das Laufmittel legen die Lipide unterschiedlich lange Strecken auf der Trennschicht zurück. Dabei zeigen polare Lipide die geringste Mobilität.

Vor der eigentlichen Chromatographie werden die Kieselgelplatten einer Vorentwicklung unterzogen, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Dazu wird die Platte einmal vollständig mit dem Laufmittel Methanol entwickelt und anschließend für 10min bei 110°C aktiviert.

Die zu trennenden Lipide wurden in Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen und mit Hilfe von Auftragskapillaren als dünne Bande auf einen vorher markierten Bereich der Kieselgelplatte aufgetragen. Nachdem das Lösungsmittel vollständig verdampft war, wurde die Platte in eine mit Laufmittel 1 gefüllte Kammer gestellt. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Atmosphäre mit dem Dampf des Laufmittels gesättigt ist, da es sonst zur Verdunstung des Laufmittels während der Bewegung durch die stationäre Phase kommen kann. Dies könnte die Laufstrecke verändern und zu Trennproblemen führen. Um eine gesättigte Atmosphäre zu erreichen, wurden die Laufmittel 20min vor der Chromatographie in eine mit Filterpapier ausgekleidete Kammer gefüllt. Nachdem die Kieselgelplatte in die Kammer gestellt wurde, beginnt das Laufmittel infolge der Kapillarkräfte in der Kieselgelschicht nach oben zu wandern. Trifft das Laufmittel auf die aufgetragene Lipidlösung, so werden die Lipide entsprechend ihrer Affinitäten zur stationären Phase unterschiedlich stark vom Laufmittel mitgenommen. Um eine optimale Trennung von polaren und unpolaren Lipiden zu gewährleisten, wurde die Kieselgelplatte in drei unterschiedlichen Laufmitteln entwickelt. Dabei lief das Laufmittel 1 nur die ersten vier cm, während die Lösemittelfront der letzten beiden Laufmittel bis zum oberen Rand der TLC Platten lief. Eine Trennung der Lipide wird schon in dem ersten relativ polaren Laufmittel erreicht. Die Folgeentwicklungen dienen der Bandenfokussierung sowie der besseren Trennung der unpolaren Lipidklassen. Zwischen den Laufmitteln wurden die Platten trocken gefönt, um eine komplette Verdampfung des Laufmittels zu gewährleisten. Zur Visualisierung und Quantifizierung des Chromatogramms wurden die Platten anschließend in die Färbelösung getaucht und bei 170°C auf einem Plattenheizer derivatisiert. Anschließend wurden die Banden densitometrisch ausgewertet, wobei über die Fläche integriert wurde (Camag Reprostar 3).

2.4.22. Liposomenpräparation

Saccharose-Lösung:	0,3 M Saccharose In A. bidest Steril filtrieren
HEPES-Puffer:	20 mM HEPES; pH 7,4 In A. bidest Steril filtrieren

Liposomen wurden aus Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) präpariert. 1mg DMPC-Lipid, welches in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst war, wurde mit Hilfe einer Hamiltonspritze in ein Reagenzglas überführt. Die Lipide mussten unter leichter Stickstoffbegasung als dünner, gleichmässiger Film an der Glaswand des Reagenzgefässes getrocknet werden, dazu wurde das Reagenzglas langsam gedreht. Die Hydratisierung des Lipidfilms erfolgte ebenfalls unter langsamen Drehbewegungen in 150µl Saccharose-Lösung. Für die Liposomenbildung wurde die Lösung 1h bei Raumtemperatur inkubiert und währenddessen mehrmals schwach gevortext. Anschließend wurden 850µl HPLC-H₂O hinzugegeben und 1h in der Ultrazentrifuge mit 17.500xg bei 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Liposomen, sogenannte *large multilamellar vesicles* (MLV), wurden in 500µl HEPES-Puffer aufgenommen und 15x durch einen Extruder gepresst. Die verwendete Porengröße der Membran betrug 100nm. Dadurch erhielten die Liposomen einen einheitlichen Durchmesser und wurden in *large unilamellar vesicles* (LUV) umgewandelt (Abb. 11). Die Liposomenlösung hatte eine Konzentration von 2mg Lipid/ml.

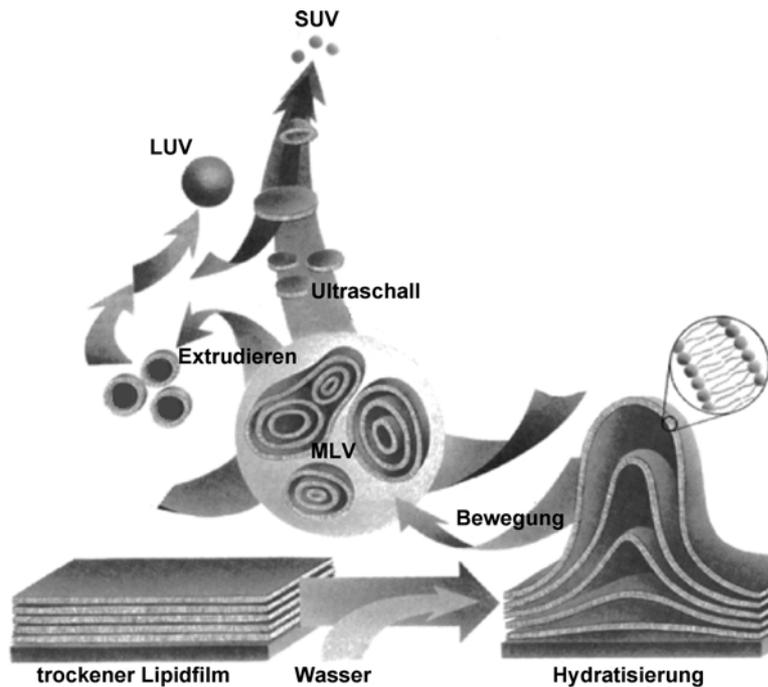


Abb. 2.3: Liposomenbildung durch Hydratisierung eines Lipidfilms. Liposomen vor dem Extrudieren haben oft mehrschichtige Membranen (MLV *large multilamellar vesicles*). Durch das Extrudieren mit einem 100nm Filter entstehen LUV *large unilamellar vesicles* mit einer durchschnittlichen Größe von 120-140nm. Wenn frisch präparierte Liposomen mit Ultraschall behandelt werden, entstehen kleinere Liposomen (30–100 nm) - SUV *small unilamellar vesicles*. (Verändert nach Lasic *et al.*, 1997)

2.4.23. Der *disc assay*

Der *disc assay* ermöglicht *in vitro* die Analyse von lipidorganisierenden Eigenschaften von Proteinen, insbesondere von Apolipoproteinen (Raussens *et al.*, 1998). Hierzu wurden 100nm DMPC-Liposomen mit rekombinantem TIP47, ApoE oder GST in einem Verhältnis von 1:3,75 (w/w) ü.N. bei 25°C inkubiert. Die Temperatur liegt über der Phasenübergangstemperatur von DMPC, so dass diese in der flüssig-kristallinen Phase vorlagen. Dadurch hatten die Proteine die Möglichkeit an die Acylketten der DMPCs zu binden und sie zu reorganisieren. Nach der ü.N. Inkubation wurden die Proben auf ein Kupfergrid aufgetropft, um die Strukturen der Lipide im Elektronenmikroskop zu untersuchen.

2.4.24. Darstellung von Liposomen bzw. *discs* durch Negativkontrastierung in der Elektronenmikroskopie

Das Prinzip der Negativkontrastierung beruht auf in Wasser lösliche Schwermetalle, die in amorpher Form um das abzubildende Objekt auf einer Trägerfolie eintrocknen. Dadurch bleibt das Objekt gut durchstrahlbar, während seine Umgebung im Elektronenmikroskop dunkel erscheint. Frisch präparierte Liposomen wurden über Nacht entweder mit Puffer oder mit Proteinen bei 25°C inkubiert. Am nächsten

morgen wurden sie für 5min auf ein mit Kohle bedampftes Kupfergrid aufgetragen, welches über eine „Glimmentladung“ für wässrige Proben benetzbar gemacht wurde. Die Fixierung erfolgte ebenfalls für 5min mit 0,1% Glutaraldehyd und die Nachkontrastierung für 15sec mit 1% Uranylacetat. Zwischen Fixierung und Nachkontrastierung wurde 2x mit PBS und 6x mit HPLC-H₂O gewaschen. Die Betrachtung der Liposomen am Transmissionselektronenmikroskop (Philips CM120) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Dirk Wenzel am MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen durchgeführt.

2.4.25. Messung von Proteininteraktionen am Biacore Biosensor (SPR)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen Proteinen mit Hilfe eines Biacore 3000 Biosensors gemessen. Mit dem Biosensor, der das Prinzip der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) nutzt, ist es möglich die Interaktion zwischen Molekülen nachzuweisen und die Bindungsparameter der Interaktion zu bestimmen. Dabei erfolgt die Messung in Echtzeit und ohne spezielle Markierung der Interaktionspartner.

Hierfür wird ein Interaktionspartner, der sogenannte Ligand, an die Oberfläche eines Sensorchips gekoppelt. Der Chip besteht aus Glas als Trägermaterial, welches mit einer Goldschicht überzogen ist. Darauf befindet sich in der Regel Dextran als Oberflächenmatrix. In dieser Arbeit wurden CM5 Chips verwendet, deren Dextranmatrix carboxymethyliert ist und an die der Ligand über eine Aminokopplung immobilisiert wird. Der Analyt ist der potentielle Bindungspartner für den Liganden. Er befindet sich in Lösung und wird in kontinuierlichem Fluss über den auf der Oberfläche immobilisierten Liganden geleitet. Erfolgt eine Bindung zwischen den Interaktionspartnern wird eine Veränderung des SPR-Signals gemessen.

Die Messung beruht auf dem optischen Phänomen der *Surface Plasmon Resonanz* (SPR). Hierbei trifft Licht einer Laserquelle in einem definierten Winkel durch ein Prisma auf die Grenzfläche zur Glasoberfläche. Während der Hauptanteil des Lichtes total reflektiert wird kann der elektromagnetische Anteil mit den freien Elektronen in der Goldschicht in Wechselwirkung treten. Unter geeigneten Resonanzbedingungen entsteht dann eine evaneszente Feldkomponente, die die Sensoroberfläche penetriert. Das Phänomen äußert sich bei der Messung des reflektierten Lichts in einer Abschwächung, die unter einem bestimmten Winkel detektiert werden kann.

Der Biosensor ist nun so aufgebaut, dass alle Parameter so eingestellt sind, dass die durch SPR hervorgerufene Winkeländerung nur noch durch die Veränderung der Grenzfläche beeinflusst wird. Binden oder dissoziieren hier Moleküle, so wird die Interaktion nun direkt messbar. Vereinfacht gesagt ist das SPR-Signal (eine Winkeländerung) nur noch abhängig von der Massenzu- oder abnahme auf der Chipoberfläche.

Die Änderung des Resonanzwinkels wird in einem Sensorgramm als Resonanzeinheitenveränderung angegeben und gegen die Zeit aufgetragen. Ein Zuwachs von 1000 Resonanzeinheiten (RU) entspricht im Durchschnitt einer Zunahme von 1ng Protein pro Quadratmillimeter Chipoberfläche.

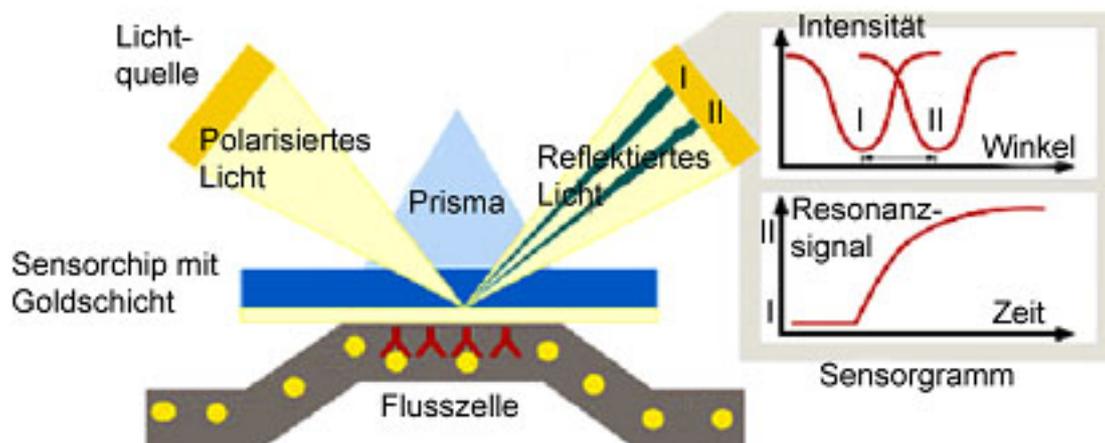


Abb. 2.4: Messprinzip des Biosensors. Durch die Oberflächen Plasmon Resonanz entsteht ein Intensitätsabfall im reflektierten Licht. Bindet ein Analyt an einen immobilisierten Liganden, ändert sich der Brechungsindex an der Chipoberfläche und der Schatten im reflektierten Licht verändert seine Position. Die Winkeländerung des Schattens wird im Sensorgramm als Resonanzsignal dargestellt (Abb. aus BIAcore Handbuch).

Durchführung

Um die Interaktion der Proteine zu messen, muss zunächst der Sensorchip aktiviert und mit dem Liganden beladen werden. Der CMP5-Chip wurde mit dem Amin-Kopplungsreagenz (Firma BIAcore) 0,4M 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid (EDC) und 0,1M N-Hydroxysuccinimid (NHS) (Verhältnis 1:1, Flussrate 10µl/min für 5min) aktiviert. Dadurch werden die Carboxylgruppen auf der Oberfläche mit einer Maleimidgruppe verestert, die im nächsten Schritt die Amin-Gruppen von Proteinen kovalent bindet. Hierfür wurden 20ng/µl GST-MPR300 bzw. GST-MPR46

mit einer Flussrate von 5µl/min für 5min in 10mM Na-acetat, pH 4 über die Chipoberfläche geleitet. Dabei ist es wichtig, dass der pH Wert der Lösung über dem pK-Wert der Carboxylgruppen und unterhalb des isoelektrischen Punkts der zu koppelnden Proteine liegt, damit elektrostatische Wechselwirkungen zu einer räumlichen Annäherung der Proteine an die Oberfläche und dadurch zu einer verbesserten Kopplungseffizienz führen. Die Deaktivierung von überschüssigen, freien Bindungsstellen erfolgte mit 90µl 1M Ethanolamin-HCL bei einer Flussrate von 30µl/min.

Nach der Immobilisierung wurde die Bindung von GST, GST-VHS, TIP47 und AP2 an GST-MPR300 bzw. GST-MPR46 bei einer Flussrate von 30µl/min für 1min gemessen. Die Proteine wurden in Konzentrationen von 200nM bis zu 5µM, über die Oberfläche geleitet. Die Regeneration der Oberfläche zwischen den einzelnen Messungen erfolgte mit 50mM NaOH für 5sec. Die Bindungsexperimente wurden in PBS und 25mM Tris, pH 7,5, 150mM NaCl durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Funktion von TIP47 im retrograden Transport der MPRs

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen TIP47 und den MPRs untersucht, um die Fragestellung zu beantworten: Ist TIP47 ein bifunktionales Protein, welches einerseits den retrograden Transport von MPRs vermittelt und andererseits ein Lipid droplet bindendes Protein mit noch unbekannter Funktion? Hierfür wurde erstens die Lokalisierung von TIP47 und den MPRs in verschiedenen Zelllinien untersucht, zweitens die direkte Proteininteraktion zwischen TIP47 und MPRs *in vitro* analysiert und drittens wurden Funktionsanalysen für MPRs in TIP47 *knock-down* (KD) Zellen durchgeführt.

3.1.1. Lokalisierung von MPRs und Sortierungsfaktoren in Zellen

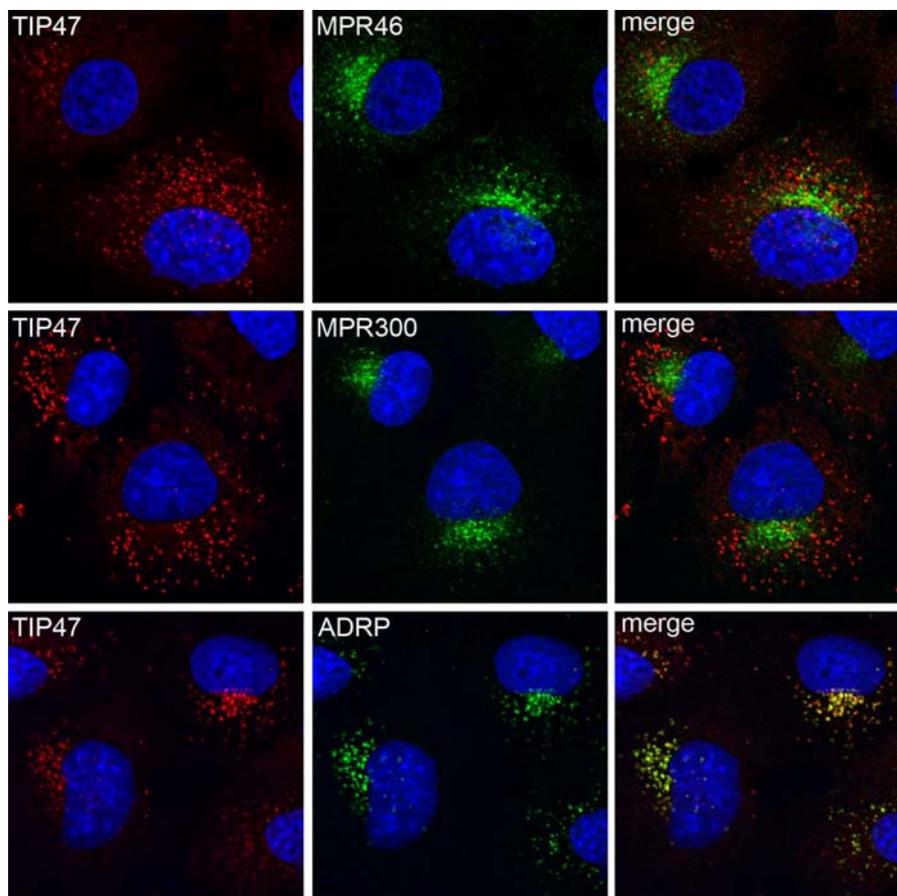


Abb. 3.1: TIP47 kolokalisiert mit ADRP aber nicht mit MPRs in COS7 Zellen. Die Zellen wurden für 24h auf Deckgläschen kultiviert, danach fixiert und permeabilisiert. Die angegebenen Proteine wurden mit für sie spezifischen Antikörpern detektiert. Die Färbung erfolgte durch Alexa 488 oder -546 markierte Zweitantikörper. Gelbe Färbung signalisiert Kolokalisierung. Maßstab: 10µm.

Wichtige intrazelluläre Sortierungsfaktoren für Membranproteine, wie z.B. AP1 (Ghosh et al., 2003b), GGA1 (Puertollano et al., 2001) und der Retromerkomplex (Arighi et al., 2004) zeigen in der Immunfluoreszenz zumindest eine partielle Kolokalisation mit ihrer membranständigen Fracht. TIP47 wurde als erster Sortierungsfaktor für den retrograden Transport von MPRs beschrieben (Diaz and Pfeffer, 1998). In der Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Pfeffer ist ebenfalls eine Kolokalisierung von TIP47 mit MPR300 in COS7 Zellen abgebildet. Gezeigt wurde eine perinukleäre, vesikuläre Färbung für TIP47, die mit der Färbung für den MPR300 überlappt (Abb. 4.1 S. 124 in der Diskussion). Diese Kolokalisierung von TIP47 mit den MPRs sollte verifiziert werden. Dazu wurden TIP47 und MPR300 bzw. MPR46 in COS7 Zellen angefärbt. In dieser Immunfluoreszenz bestätigte sich die perinukleäre und punktierte Färbung für TIP47, allerdings war keine Kolokalisierung mit den MPRs nachweisbar. Wurde hingegen ADRP, ein Lipid droplet bindendes Protein, oder Neutrallipid angefärbt (Daten nicht gezeigt), konnte eine Kolokalisation mit TIP47 detektiert werden (Abb. 3.1). Die gleiche Färbung wurde auch in HeLa Zellen durchgeführt, da HeLa Zellen aus einem Gewebe stammen, das für den systemischen Lipidstoffwechsel von untergeordneter Bedeutung ist. Deswegen lokalisiert TIP47 vielleicht eher an MPR-positiven Strukturen als an Lipid droplets.

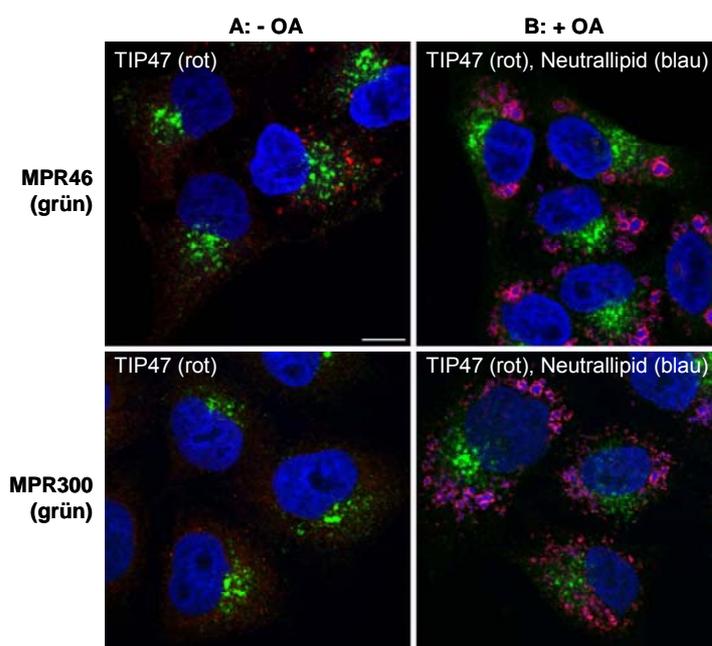


Abb. 3.2: TIP47 lokalisiert an Lipid Droplets, aber kolokalisiert nicht mit MPRs in HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden vor der Fixierung für 16h +/- 400µM Ölsäure (OA) in DMEM inkubiert. Nach der Permeabilisierung wurden die angegebenen Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Färbung erfolgte über Alexa 488 oder 546 markierte Zweitantikörper. Der Zellkern wurde mit Höchst und Neutrallipid mit „LipidTox deep red“ angefärbt. Maßstab: 10µm.

HeLa Zellen zeigten unter den Standard-Zellkulturbedingungen kaum eine vesikuläre Färbung für TIP47. Nur ~2% der Zellen besaßen TIP47-positive Strukturen, die nicht

mit dem MPR300 oder MPR46 kolokalisierten (Abb. 3.2A). Wurden die Zellen für 16h zusätzlich mit Ölsäure (400 μ M) im Standardmedium inkubiert, zeigten sie in der Immunfluoreszenz eine große Anzahl von TIP47 positiven Strukturen, deren Lumen durch Neutrallipid-sensitive Farbstoffe gefärbt war und somit als Lipid droplets identifiziert werden konnten (Abb. 3.2B).

Neben HeLa Zellen wurden die Färbungen zusätzlich in humanen Fibroblasten, in der humanen monozytären Zelllinie Monomac und in den humanen Leberzelllinien HepG2 und HUH7 mit den gleichen Ergebnissen durchgeführt: TIP47 lokalisierte immer an vesikulären Strukturen, die als Lipid droplets identifiziert wurden, während eine Kolokalisierung weder mit MPR300 noch mit MPR46 detektierbar war. Die intrazelluläre Lokalisierung von TIP47 ist demzufolge nicht zelltypspezifisch.

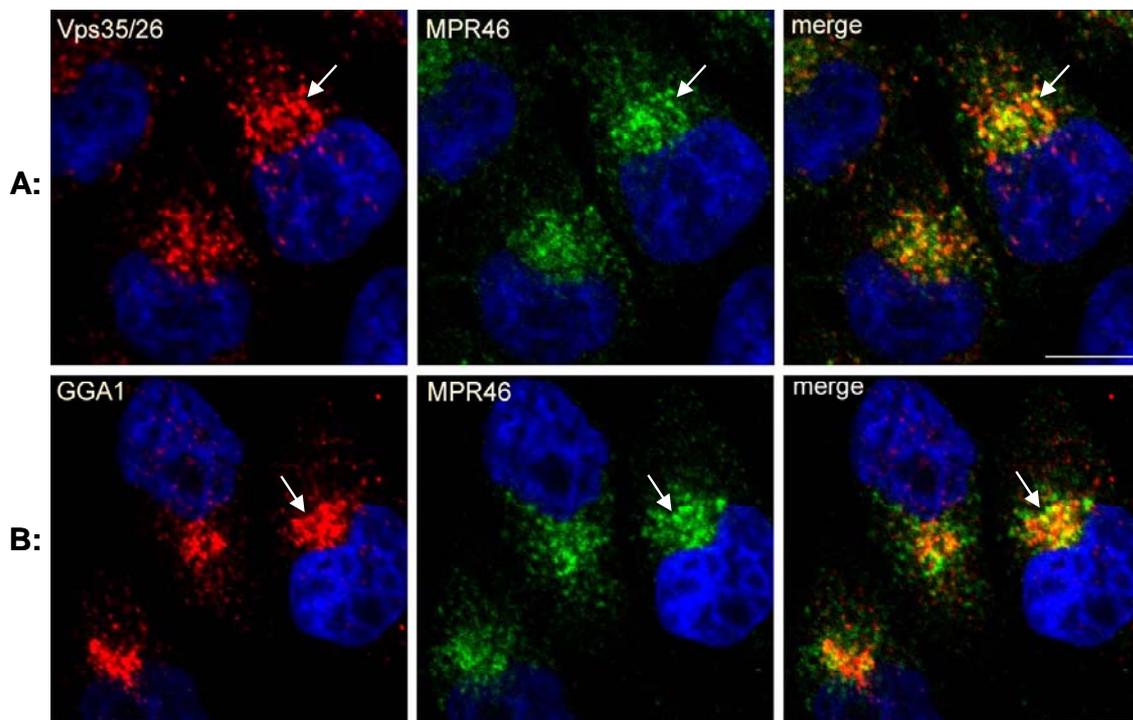


Abb. 3.3: MPR46 kolokalisiert mit den Sortierungsfaktoren Retromer (A) und GGA1 (B). HeLa Zellen wurden 24h vor der Fixation auf Deckgläschen ausplattiert. Nach der Permeabilisierung wurden die angegebenen Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Der Zellkern wurde mit Höchst-Farbstoff sichtbar gemacht. Gelbe Färbung zeigt die Kolokalisierung von MPR46 und Retromer bzw. von MPR46 und GGA1 (siehe Pfeile). Maßstab: 10 μ m

Dass andere Sortierungsfaktoren mit ihrer Fracht kolokalisieren zeigt die Abb. 3.3. Hier wurden Proteine des Retromerkomplexes (A) oder GGA1 (B) zusammen mit dem MPR46 angefärbt. Die Färbung dieser Sortierungsfaktoren überlappt teilweise

mit der Färbung für den MPR46, was sich in der gelben Färbung zeigt (Abb. 3.3). Da diese Sortierungsfaktoren mit dem MPR46 kolokalisieren, muss man sich fragen, ob TIP47 ein typischer Sortierungsfaktor ist, oder ob die Affinität von TIP47 an Membranen zu schwach ist, um das Protein in der Immunfluoreszenz an Organellen zu detektieren.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden GFP-TIP47 Fusionsproteine generiert und in HeLa Zellen exprimiert. GFP-TIP47 war unter Standard-Kulturbedingungen zytosolisch lokalisiert (Abb. 3.4A), aber nach Ölsäureinkubation an Lipid droplets nachweisbar, wo es mit ADRP kolokalisierte (Abb. 3.4B). GFP-TIP47 zeigte, wie endogenes TIP47, keine Kolokalisierung mit den MPRs. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl endogenes TIP47 (Doktorarbeit von A. Bulankina, unsere Arbeitsgruppe), als auch GFP-TIP47 nicht an Kompartimenten des Endozytose- oder Biosyntheseweges detektiert werden konnte (Bulankina et al., 2009).

Es bleibt an dieser Stelle festzuhalten, dass TIP47 im Gegensatz zu anderen Sortierungsfaktoren von Membranproteinen weder mit seiner Fracht (MPRs) noch an den entsprechenden Organellen nachweisbar war.

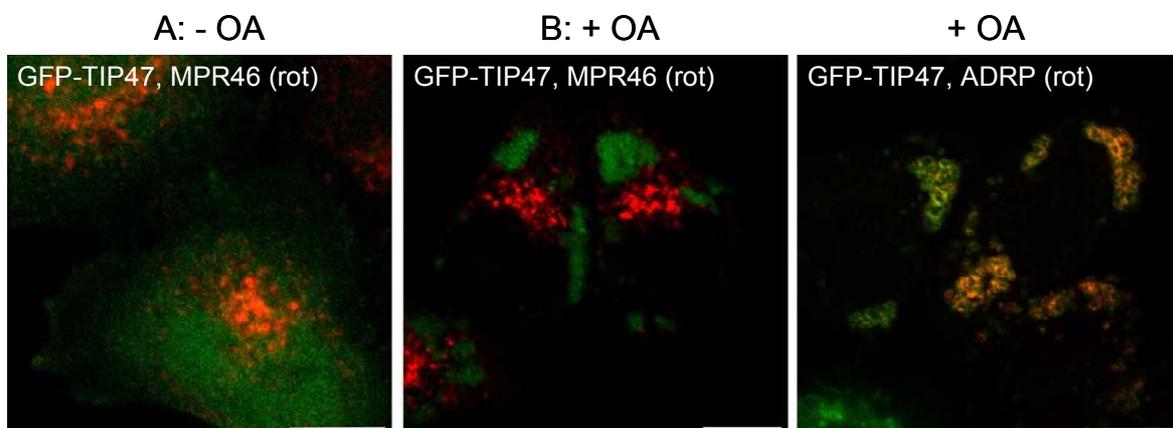


Abb. 3.4: GFP-TIP47 kolokalisiert nicht mit endogenem MPR46. HeLa Zellen wurden 8h nach der Transfektion mit GFP-TIP47 16h in DMEM +/- 400µM Ölsäure inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung erfolgte die Färbung von MPR46 und ADRP. Kolokalisierung von ADRP und GFP-TIP47 zeigt sich in der gelben Färbung. OA: Ölsäure. Maßstab: 10µm.

3.1.2. *In vitro* Bindungsstudien mit TIP47 und den zytoplasmatischen Sequenzabschnitten der MPRs

Mittels Immunfluoreszenz war keine Kolo­kalisierung zwischen MPRs und TIP47 detektierbar. Dies bedeutet, dass TIP47 entweder kein Sortierungsfaktor für MPRs ist, oder aber die Affinität von TIP47 an die zytoplasmatischen Sequenzen beider MPRs so schwach ist, dass die Membranbindung entsprechend labil und somit nicht in der Immunfluoreszenz detektierbar ist. Um schwache Bindungsaffinitäten von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* nachzuweisen, eignet sich unter anderem die Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR, *surface plasmon resonance*) Methode. Mit dieser Methode können selbst schwache Molekül-Interaktionen im μM bis mM Bereich in Echtzeit gemessen werden.

Zur Bestimmung der Interaktion zwischen TIP47 und den zytoplasmatischen Sequenzen beider MPRs wurden diese als GST-Fusionsproteine gereinigt und zusammen mit GST als negative Kontrolle auf einer CM5 Sensoroberfläche immobilisiert. Rekombinantes TIP47, sowie der Adaptorkomplex AP2 und die VHS-Domäne (Domäne, die auch in VPS27, Hrs und STAM vorkommt) von GGA1 (GGA1-VHS) als bekannte Bindungspartner wurden anschließend in verschiedenen Konzentrationen über die Sensoroberfläche geleitet. Weder für GST noch für TIP47 konnte eine Bindung nachgewiesen werden, während die Interaktion mit der GGA1-VHS Domäne und mit dem AP2 Komplex bei jeder injizierten Konzentration eindeutig detektierbar war (Abb. 3.5B).

Sowohl AP2 als auch GGA1 sind bekannte Sortierungsfaktoren für die MPRs und ihre Bindung war mit SPR eindeutig nachweisbar. Hier stellt sich die Frage, warum sich bei TIP47, als beschriebener Sortierungsfaktor, keine Bindung an die MPRs messen lässt? Ein Grund könnte sein, dass TIP47 nach der Aufreinigung nicht mehr funktionell ist. Ob rekombinantes TIP47 seine Bindungsaffinität zu den MPRs verliert, konnten wir nicht überprüfen, wir wissen aber, dass das rekombinante TIP47 in anderen *in vitro* Versuchen noch funktionell ist (Abb. 3.25).

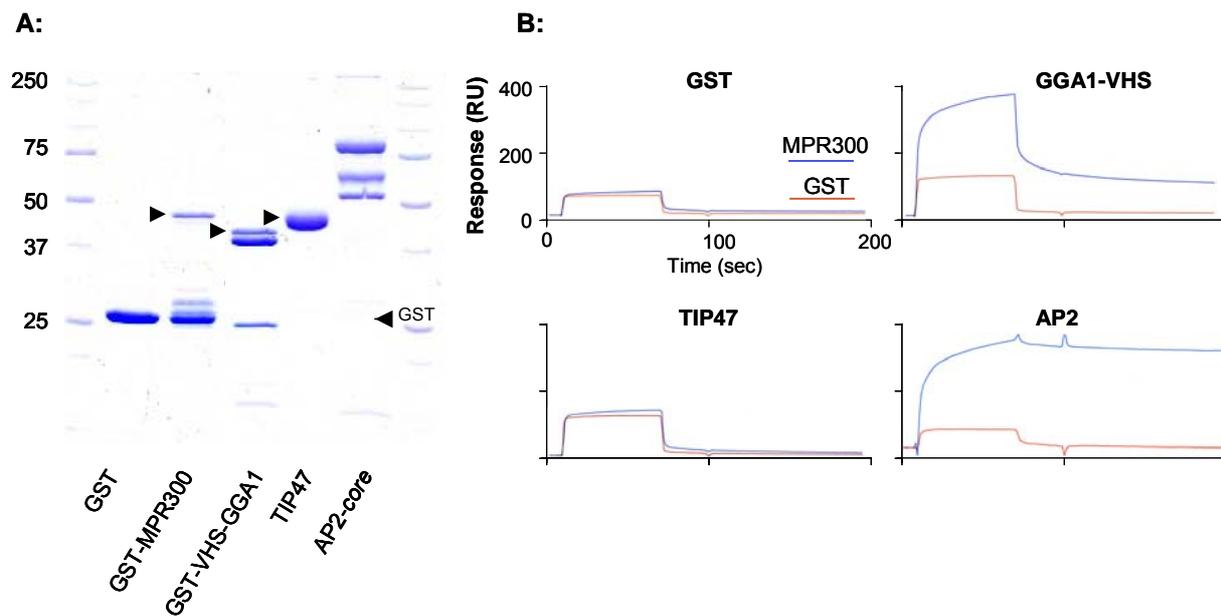


Abb. 3.5: *In vitro* Nachweis der Bindung von Sortierungsfaktoren an die zytoplasmatischen Sequenzen der MPRs. A: Coomassie Gel der aufgereinigten Proteine. Die Proteine wurden in Bakterien exprimiert, und über eine GSH Matrix affinitätsgereinigt. Die Elution von GST, GST-MPR300 und GST-GGA1-VHS erfolgte mit 20mM GSH. GST-TIP47 wurde mit TEV-Protease verdaut, um GST von TIP47 zu trennen (s. M+M). Der AP2 Core-Komplex wurde von David Owen (Cambridge) zur Verfügung gestellt. GST ~ 27kDa, GST-MPR300 ~ 48kDa, GST-GGA1-VHS~ 40kDa, TIP47~ 47kDa (s. Pfeile) und AP2 als Core-Komplex aus 4 Proteinen α ~ 70kDa, β_2 ~75kDa, μ ~50 kDa, σ ~ 19kDa. Die Proteine GST-MPR300 und GST-GGA1-VHS waren mit GST kontaminiert. GSH: Glutathion. **B: SPR Bindungsexperimente.** GST und der zytoplasmatische Sequenzanteil von MPR300 (GST-MPR300) wurden auf einer CM5 Oberfläche immobilisiert und die Interaktion mit den angegebenen Proteinen (5 μ M) gemessen. Es konnte keine Interaktion zwischen GST-MPR300 und TIP47 nachgewiesen werden. Als positive Kontrollen dienten die Interaktionen zwischen GST-MPR300 und der VHS Domäne von GGA1 bzw. AP2, die zweifelsfrei nachweisbar waren (In Zusammenarbeit mit Florian Heßner).

3.1.3. Funktionsanalyse von MPRs nach *knock-down* von TIP47

In den oben vorgestellten *in vitro* Experimenten war keine Bindung von TIP47 an die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte der MPRs detektierbar. Um dennoch die mögliche Bedeutung von TIP47 als Sortierungsfaktor für MPRs in Zellen zu untersuchen, wurde die Verteilung und Funktion beider MPRs nach Suppression von TIP47 mittels RNAi analysiert.

Als Kontrolle für diese Versuche dienten mock transfizierte HeLa Zellen und Zellen, in denen die zwei Retromer-Komponenten Vps35 und Vps26 durch RNAi supprimiert waren. RNAi für den Retromerkomplex wurde als Kontrolle ausgesucht, da zwei unabhängige Gruppen in der Vergangenheit zeigen konnten, dass RNAi für Retromer sowohl die Lokalisierung als auch die Funktion der MPRs in der Sortierung von lysosomalen Enzymen beeinträchtigt (Arighi et al., 2004; Seaman, 2004).

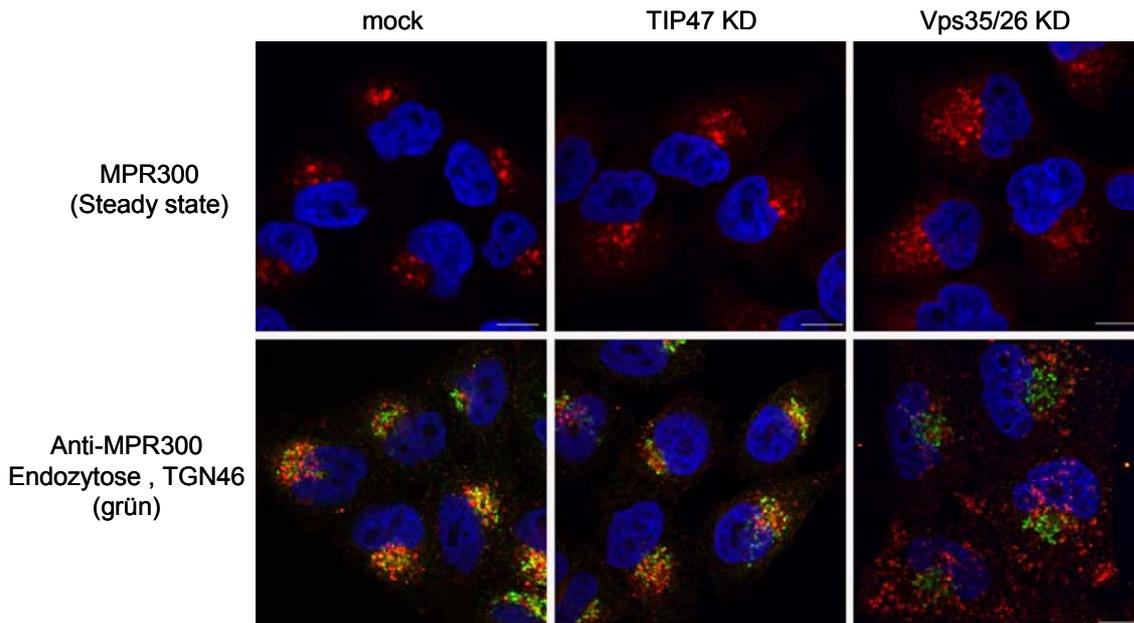


Abb. 3.6: Verteilung des MPR300 in TIP47 KD- und Kontrollzellen. Obere Reihe: Nach der transienten Transfektion mit siRNA wurden die Zellen auf Deckgläschen ausplattiert, 24h kultiviert, fixiert, permeabilisiert und der MPR300 wurde mittels $K \alpha$ MPR300 und $Z \alpha$ K Alexa 546 angefärbt (steady state). **Untere Reihe:** Für die Endozytose des AK wurden die Zellen zuerst 20min mit dem $K \alpha$ MPR300 AK und dann 20min ohne AK inkubiert, dann fixiert, permeabilisiert und die internalisierten AK mittels $Z \alpha$ K Alexa 546 nachgewiesen. In der steady state Verteilung und bei der Aufnahme von MPR300-spezifischen AK zeigt sich keinerlei Unterschied zwischen siTIP47 und Kontrollzellen, während die perinukleäre Verteilung vom MPR300 in den Vps35/26 KD Zellen weniger stark ausgeprägt ist. Dieser Phänotyp wird noch deutlicher nach Aufnahme von α MPR300 AK, die in den Vps35/26 KD Zellen in peripheren Endosomen akkumulieren. Maßstab: 10 μ m

Zuerst wurde die subzelluläre Verteilung beider MPRs in TIP47 *knock-down* (KD), Vps35/26 KD- und Kontrollzellen miteinander verglichen (Abb. 3.6 obere Reihe). Im Fließgleichgewicht (*steady state*) war die Verteilung der MPRs trotz *knock-down* von TIP47 normal. Wie in den mock transfizierten Zellen war eine perinukleäre Verteilung der Rezeptoren sichtbar. Im Gegensatz dazu war die Verteilung in Vps35/26 KD

Zellen deutlich diffuser, d.h. MPR-positive Strukturen sind im gesamten Bereich des Zytoplasmas auszumachen. Die Beeinträchtigung der Sortierung von MPRs in Vps35/26 KD Zellen wurde noch deutlicher, wenn Antikörper gegen die luminalen Domänen der MPRs internalisiert wurden (Abb. 3.6 untere Reihe). Die Antikörperhaltigen Vesikel waren in der gesamten Zelle verteilt, während in TIP47 KD- und Kontrollzellen eine weitestgehend perinukleäre Verteilung detektiert wurde. Dies zeigt, dass die internalisierten Antikörper in TIP47 KD- und Kontrollzellen effektiv zur Golgi Region transportiert wurden, was auch durch die räumliche Nähe zum TGN-Markerprotein TGN46 bestätigt wird. Demgegenüber führt der Verlust von Vps35/26 zu einem Defekt im retrograden Transport von MPR/Antikörperkomplexen aus Endosomen. Dieser Befund deckt sich mit den Daten anderer (Seaman, 2004), (Arighi et al., 2004), während der Verlust von TIP47 überraschenderweise ohne Bedeutung für die Lokalisierung und den Transport von MPRs ist.

Die Funktion von MPRs ist der Transport lysosomaler Enzyme vom TGN zu Endosomen. Hier dissoziieren die Enzym/Rezeptor Komplexe, die Enzyme gelangen weiter in die Lysosomen, während die MPRs zum TGN zurückkehren, um erneut für den Export von lysosomalen Hydrolasen zur Verfügung zu stehen. Ein Defekt im retrograden MPR Transport von Endosomen zum TGN führt zur Akkumulation der Rezeptoren in den Endosomen. Gleichzeitig stehen am TGN nicht mehr genügend Rezeptoren zur Verfügung, um den effizienten Export der lysosomalen Enzyme zu vermitteln. Dies zieht den Export der Enzyme aus der Zelle nach sich, so dass die Enzyme im Extrazellularraum nachweisbar werden.

Experimentell kann die Fehlsortierung lysosomaler Enzyme durch deren Detektion im Zellkulturüberstand mittels Western blot oder Enzymaktivitätsbestimmung nachgewiesen werden (s. M + M). Eine mögliche Fehlsortierung lysosomaler Enzyme wurde in TIP47 KD-, Vps35/26 KD- und Kontrollzellen untersucht.

Zum einen wurde die Sekretion des lysosomalen Enzyms Cathepsin D im Western blot analysiert, außerdem wurde die Aktivität von β -Hexosaminidase im Zellkulturüberstand bestimmt. Der *knock-down* von TIP47 blieb ohne Auswirkungen auf die Sortierung der lysosomalen Enzyme. Gegenüber den Kontrollen war weder eine erhöhte Sekretion von Cathepsin D *precursor* im Medium nachweisbar, noch zeigten Aktivitätsbestimmungen für β -Hexosaminidase auffällige Werte. Anders der Effekt von RNAi gegen Vps35/26: In diesen Zellen war die Menge an Cathepsin D im

Medium deutlich erhöht (Western blot Abb. 3.7A) und in gleicher Weise war die Aktivität von β -Hexosaminidase im Medium gesteigert (Daten nicht gezeigt).

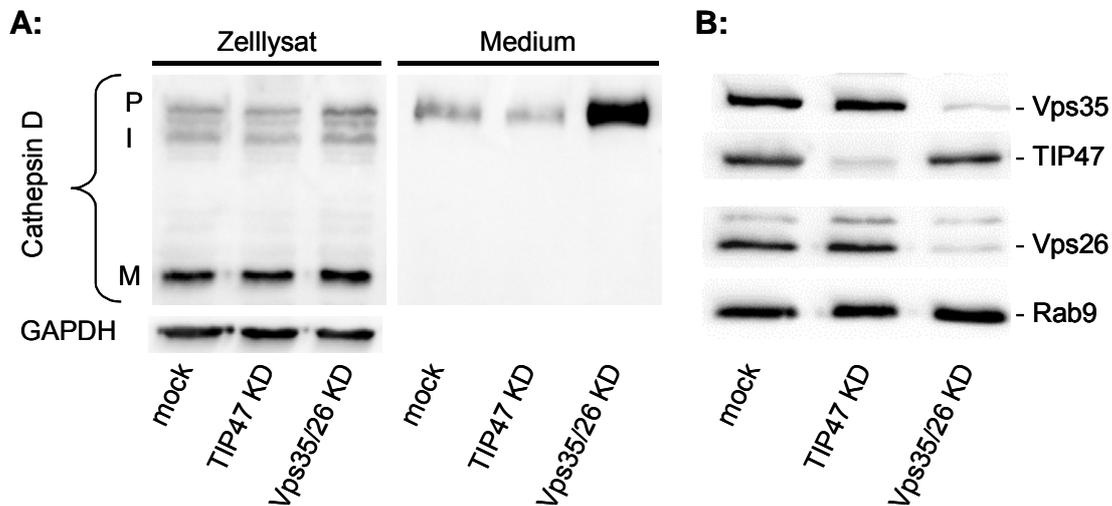


Abb. 3.7: Sortierung der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D. Nach RNAi wurden die Zellen für 24h kultiviert und dann für weitere 6h mit Medium ohne FCS. Aliquote Anteile der Zelllysate und Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um im Anschluß Cathepsin D im Western blot nachzuweisen. Nur in den Vps35/26 KD Zellen ist die Sekretion von nennenswerten Mengen des Cathepsin D in den Kulturüberstand nachweisbar, während in TIP47 KD Zellen die Cathepsin D Verteilung der Kontrolle entspricht, hier ist die Sekretion unbedeutend und die Hauptmenge Cathepsin D liegt als reife Form vor. P: *precursor*, I: *intermediate form*, M: *mature form* von Cathepsin D **B: Western blot Kontrolle der RNAi Effizienz.** 48h nach RNAi wurden Zellhomogenate gewonnen und die angegebenen Proteine nach SDS-PAGE mittels Western blot nachgewiesen. Rab9 diene als Ladungskontrolle.

Obwohl TIP47 in mehr als 10 Publikationen als Sortierungsfaktor für MPRs propagiert wird, zeigen unsere Experimente, dass der Verlust von TIP47 weder Auswirkungen auf die Verteilung und den Transport der Rezeptoren hat, noch auf die Sortierungseffizienz der getesteten lysosomalen Hydrolasen. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte eine verstärkte Expression von MPRs in TIP47 KD Zellen sein. Die Überexpression könnte Transportdefekte kompensieren, so dass keine Änderungen in der Sortierung lysosomaler Enzyme auffällig werden. Eine gesteigerte Expression von MPR300 in TIP47 KD Zellen war weder von uns (Abb. 3.8), noch von der Arbeitsgruppe Pfeffer nachzuweisen. Allerdings zeigte die Arbeitsgruppe Pfeffer durch *pulse/chase*-Experimente, dass die Halbwertszeit von MPR300 von über 35h (Kontrollen) auf ~14h in TIP47 KD Zellen sinkt (Diaz and

Pfeffer, 1998). Die Autoren erklären die verkürzte Halbwertszeit (schnellerer Abbau der MPRs in Lysosomen) durch einen gestörten Transport von Endosomen zum TGN. Die erhöhte Abbaurate von MPR300 sollte auch in dieser Arbeit verifiziert werden.

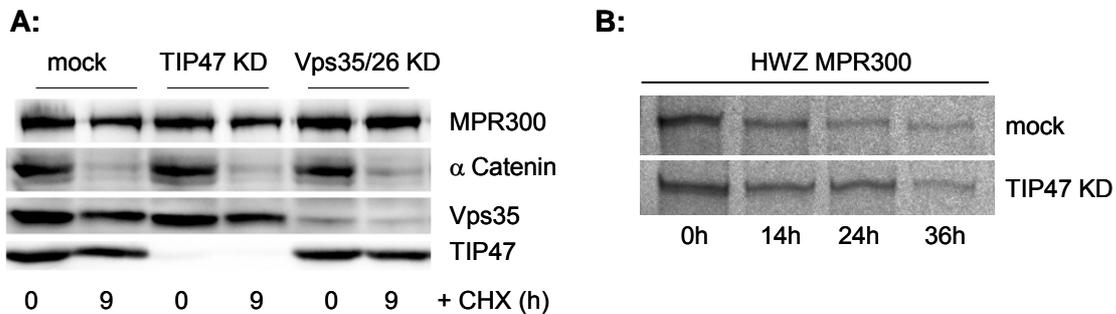


Abb. 3.8: Eine verringerte Halbwertszeit (HWZ) von MPR300 konnte in TIP47 KD Zellen nicht detektiert werden. A: Cycloheximid (CHX) Behandlung von Hela Zellen. Nach RNAi wurden die Zellen gezählt und in gleicher Anzahl auf 3cm Platten ausplattiert, 24h kultiviert und dann für 0h bzw. 9h mit CHX (40 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinert, aliquote Mengen der Zellhomogenate im SDS-Gel getrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die angegebenen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. α Catenin diente als Kontrollprotein für die Degradation in Gegenwart des Proteinbiosyntheseinhibitors CHX. Ein verstärkter Abbau von MPR300 in TIP47 KD Zellen war nicht nachweisbar. In Vps35/26 RNAi Zellen erkennt man einen verringerten Abbau des MPR300. **B: Pulse/Chase Experiment.** Nach metabolischer Markierung mit [³⁵S]-Met/ Cys für 6h wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten ohne Radioaktivität weiter inkubiert (*chase*). Im Anschluss erfolgte die Immunpräzipitation von MPR300, der nach SDS-PAGE im Autoradiogramm nachgewiesen wurde. Auch in diesem Ansatz konnte keine verringerte HWZ des MPR300 detektiert werden.

Hierzu wurden TIP47 KD- und Kontrollzellen mit Cycloheximid (CHX) behandelt, um die Neusynthese von Proteinen zu blockieren, und so einen erhöhten Abbau im Western blot sichtbar zu machen (Abb. 3.8A). Der Abbau von MPR300 war nach 9h in Gegenwart von CHX der gleiche wie in mock transfizierten Zellen. In den Vps35/26 KD Zellen war ein verringerter Abbau detektierbar. Dieser Befund stimmt aber mit Daten der Arbeitsgruppe Seaman überein (Seaman, 2004). Die zweite, klassische Methode zur Bestimmung von Proteinhalbwertszeiten ist die Immunpräzipitation nach metabolischer Markierung in *pulse/chase* Experimenten. Hierzu wurden die Zellen für 6h mit [³⁵S]-Met/Cys markiert (*pulse*), dann gewaschen und für 0-36h ohne Radioaktivität weiter inkubiert (*chase*). Danach erfolgte die Immunpräzipitation des

Rezeptors und der autoradiographische Nachweis. Auch in diesen Experimenten war keine erhöhte Abbaurrate vom MPR300 in TIP47 KD Zellen detektierbar. Weder der Nachweis vom MPR300 in CHX-behandelten Zellen, noch die *pulse/chase* Experimente liefern Anzeichen dafür, dass der Verlust von TIP47 den Abbau vom MPR300 fördert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Funktion von TIP47 als potenzieller Sortierungsfaktor für den retrograden Transport von MPRs untersucht, da TIP47 als möglicherweise bifunktionales Protein erste Hinweise auf eine Interaktion zwischen Lipid droplets und endosomalen Kompartimenten hätte liefern können. Alle oben genannten Experimente zur Lokalisierung, zum Transport und zur Funktion von MPRs zeigen aber übereinstimmend, dass TIP47 in diesem Zusammenhang keine bedeutende Rolle spielt. Diese Ergebnisse widersprechen damit zahlreichen publizierten Daten der Arbeitsgruppe Pfeffer. Diese Widersprüche und deren möglichen Erklärungen werden in der Diskussion (S. 122) aufgegriffen.

3.2. Ist TIP47 ein Effektorprotein der GTPase Rab9?

TIP47 wurde nicht nur als Sortierungsfaktor für MPRs beschrieben, sondern in Folgearbeiten auch als ein Effektorprotein für die an späten Endosomen lokalisierte GTPase Rab9 (Carroll et al., 2001). Darüber hinaus soll TIP47 der Schlüsseffektor von Rab9 sein, der die Lokalisierung von Rab9 an späten Endosomen determiniert (Aivazian et al., 2006). Auch in diesem Zusammenhang sollten Lokalisierungsexperimente in Zellen und *in vitro* Analysen zeigen, ob diese Daten bestätigt werden können.

3.2.1. Intrazelluläre Lokalisierung von Rab9 und TIP47

Einen ersten Anhaltspunkt sollte die intrazelluläre Lokalisierung von Rab9 und TIP47 bieten. Viele bekannte Rab-Effektoren können in der Immunfluoreszenz am selben Kompartiment lokalisiert werden, wie z.B. der Rab5 Effektor Rababin (Stenmark et al., 1995) oder der Rab7 Effektor RILP (Cantalupo et al., 2001).

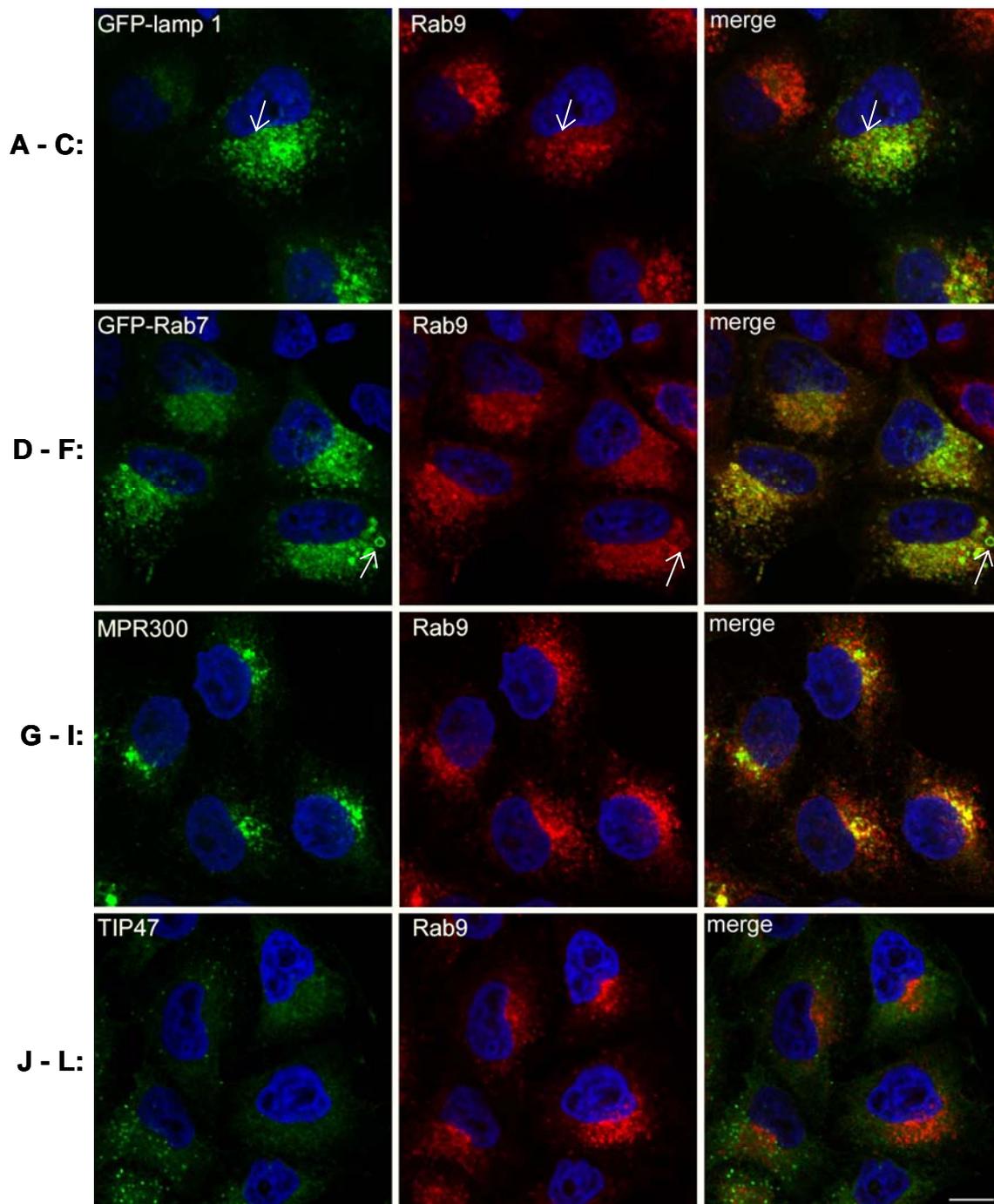


Abb. 3.9: Endogenes Rab9 lokalisiert an späten Endosomen, kolokalisiert aber nicht mit TIP47. 24h nach der Transfektion mit den jeweiligen GFP-Konstrukten (A-F) wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, um endogenes Rab9 anzufärben. In den nicht-transfizierten Zellen wurde neben Rab9 auch MPR300 (G-I) oder TIP47 (J-L) angefärbt. Kolokalisierung zeigt sich in der gelben Färbung (siehe Pfeile). Maßstab:10µm.

In HeLa Zellen kolokalisierte endogenes Rab9 mit GFP-Lamp1 (Abb. 3.9A-C) und GFP-Rab7 (Abb. 3.9D-F), aber nicht mit GFP-Rab5 (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse entsprechen der etablierten Vorstellung, dass Rab9 für späte

Endosomen spezifisch ist. Es konnte auch eine partielle Kolokalisierung zwischen MPR300 und Rab9 nachgewiesen werden (Abb. 3.9G-I), eine Überlappung zwischen TIP47 und Rab9 war allerdings nicht sichtbar (Abb. 3.9J-L). Die Färbung für TIP47 war hauptsächlich zytosolisch und in den wenigen Zellen, in denen TIP47-positive Strukturen nachweisbar waren, konnte Rab9 nicht an diesen detektiert werden. Somit deutet alles daraufhin, dass endogenes TIP47 nicht an Rab9-positiven Strukturen lokalisiert.

Vielfach ist der Nachweis von Rab-Proteinen bzw. deren Effektoren in der Immunfluoreszenz nicht einfach. Um derartige Probleme zu minimieren, wurde Rab9 als GFP-Fusionsprotein in HeLa Zellen exprimiert und die mögliche Kolokalisierung mit endogenem TIP47 in der Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 3.10A-F). Weder in diesen Zellen, noch in Zellen die Rab9 (GFP-Rab9) und TIP47 (RFP-TIP47) exprimieren war eine Kolokalisierung zwischen beiden Proteinen an späten Endosomen detektierbar (Abb. 3.10G-L). Nach Inkubation der Zellen mit Ölsäure konnte GFP-Rab9 in manchen Zellen nicht nur an späten Endosomen detektiert werden, sondern es zeigte sich auch eine schwache Färbung von Lipid droplets, wo GFP-Rab9 mit RFP-TIP47 kolokalisiert (Abb. 3.10J-L Ausschnitt). Diese Strukturen konnten eindeutig als Lipid droplets identifiziert werden, da Neutrallipid mit angefärbt wurde (Färbung nicht gezeigt). Ob Rab9 spezifisch an Lipid droplets bindet oder dies nur eine Folge der massiven Überexpression ist, bedarf einer weiteren Untersuchung. Momentan gehen wir davon aus, dass GFP-Rab9 aufgrund der Überexpression mit seinen Prenylierungsankern in der Lipid droplet Membran inseriert.

Der Arbeitsgruppe Pfeffer war es nach eigenen Angaben zufolge nicht möglich ein funktionell markiertes TIP47, wie z.B. RFP-TIP47, in Zellen zu exprimieren (Barbero et al., 2002). Ohne dass die Autoren näher darauf eingehen, könnte dies bedeuten, dass die 27kDa großen GFP- bzw. RFP-Proteine nach Fusion mit TIP47 dessen Lokalisierung entscheidend beeinträchtigen. Allerdings haben wir TIP47 sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus mit den kleineren 6xHis- bzw. HA-tags versehen. Alle Varianten lokalisierten wie GFP-TIP47 an Lipid droplets, während die Markierung anderer Kompartimente nicht nachweisbar war. Daher kann ein Funktionsverlust durch Fusion mit GFP zwar nicht ausgeschlossen werden, ist im Zusammenhang mit den anderen Ergebnissen aber wenig plausibel.

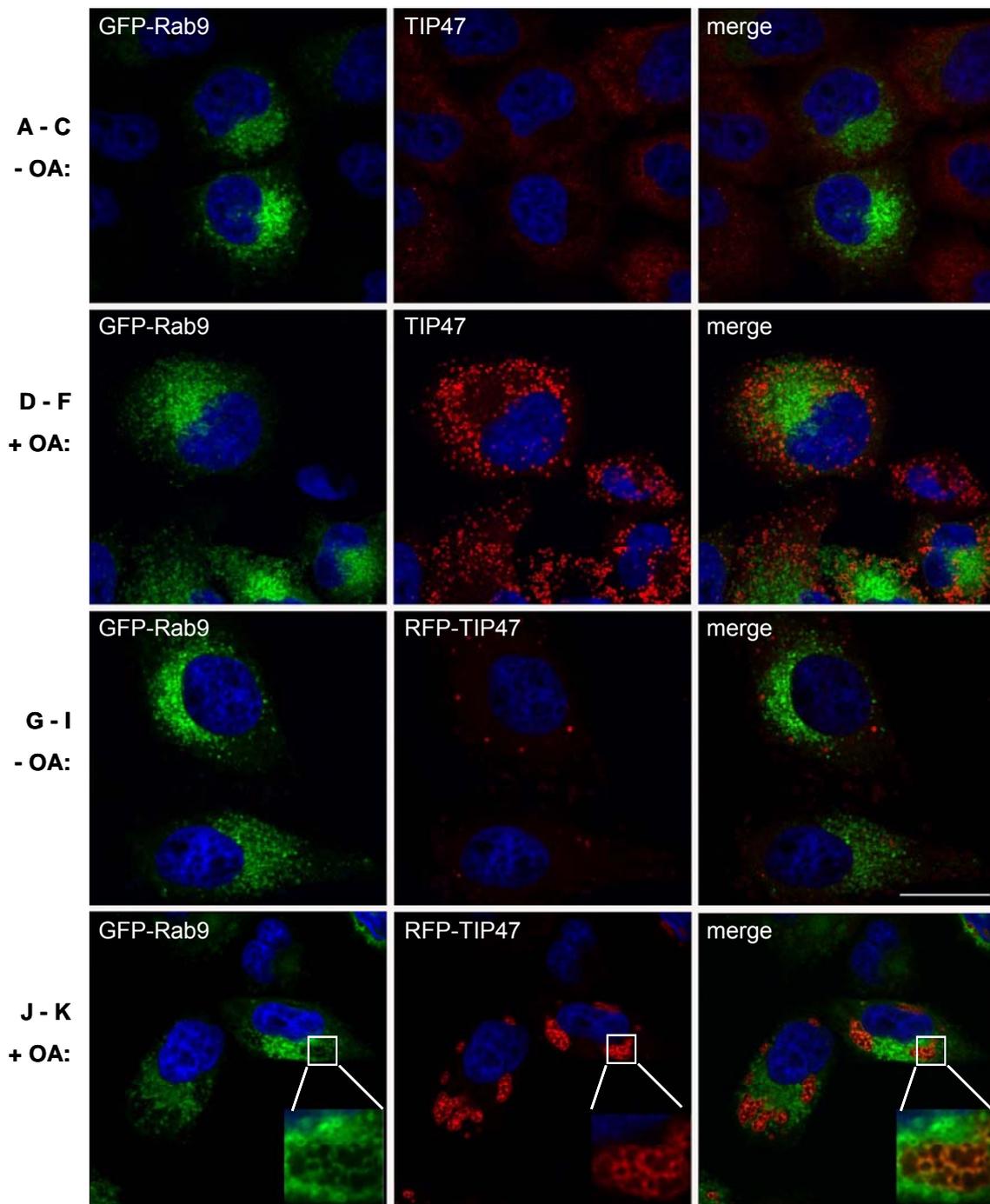


Abb. 3.10: GFP-Rab9 lokalisiert nicht mit endogenem TIP47 und RFP-TIP47. 8h nach der Transfektion mit GFP-Rab9 (**A-F**) oder mit GFP-Rab9/RFP-TIP47 (**G-K**) wurden die Zellen 16h mit +/- 400 μ M Ölsäure inkubiert, fixiert und permeabilisiert. (**A-F**) In den nur mit GFP-Rab9 transfizierten Zellen wurde zusätzlich endogenes TIP47 angefärbt. Kolokalisierung zeigt sich in der gelben Färbung. Wenige Zellen zeigten eine Kolokalisierung zwischen GFP-Rab9 und RFP-TIP47 an Lipid droplets (siehe Ausschnitt). Maßstab: 10 μ m.

Des Weiteren wurde publiziert, dass der *knock-down* von TIP47 zu einer Verschiebung des Verhältnisses von membrangebundenem Rab9 zugunsten des zytosolischen Rab9 führt, da - so die Argumentation der Autoren - TIP47 Rab9 an späten Endosomen stabilisiert (Ganley et al., 2004). Als weitere Konsequenz soll es in den TIP47 KD Zellen zu einer Verschiebung des Zytosol:Membran-Verhältnisses von TIP47 zugunsten der Membranfraktion kommen (Aivazian et al., 2006). Um diese Befunde zu überprüfen, wurde entweder TIP47 oder Rab9 in HeLa Zellen mittels RNAi supprimiert, gefolgt von der Detektion beider Proteine in der Zytosol- und Membranfraktion (Abb. 3.11). In keinem der Versuche hatte der KD von TIP47 einen Einfluss auf das Zytosol:Membran-Verhältnis von Rab9. In mock transfizierten Zellen liegt TIP47 hauptsächlich zytosolisch vor und nach TIP47 KD ist das Protein nicht mehr in der Membranfraktion detektierbar. Eine Verschiebung zugunsten der Membranfraktion war also nicht nachweisbar.

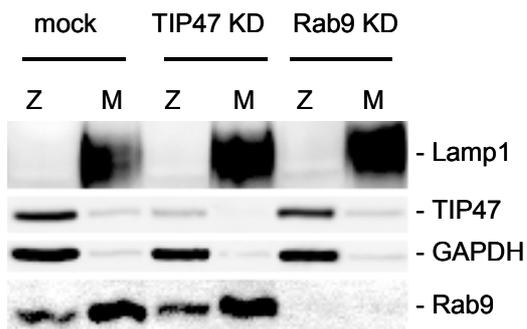


Abb. 3.11: Zytosol:Membran-Verhältnis von TIP47 in RNAi Zellen. Nach der Transfektion mit siRNA wurden die Zellen für 24h kultiviert, dann trypsiniert und mit der Nadel aufgeschlossen. Anschließend wurden die Homogenate erst niedertourig (500xg) und dann hochtourig (100.000xg) zentrifugiert, um die Zytosol- und Membranfraktionen zu gewinnen. Der Nachweis

der angegebenen Proteine erfolgte nach SDS-PAGE im Western blot. Das lysosomale Protein Lamp1 und GAPDH dienten als Markerprotein für die Membran- (M) bzw. die Zytosolfraction (Z).

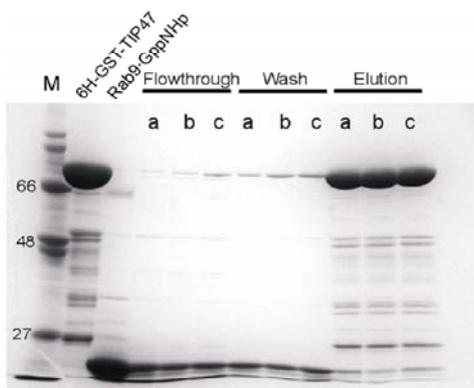
Die oben genannten Ergebnisse zur Lokalisierung von endogenem Rab9 und TIP47, die Lokalisierung nach deren Überexpression als GFP-Fusionsprotein, sowie die einfache Analyse der Proteine in Zytosol- und Membranfraktionen von Zellen nach transientem RNAi, lieferten keine Hinweise auf die Interaktion der beiden Proteine.

3.2.2. *In vitro* Interaktion zwischen Rab9 und TIP47

Die Bindung von TIP47 an Rab9 wurde *in vitro* charakterisiert und zeigte eine zweifach schwächere Bindung an Rab9-GDP als an Rab9-GTP (Carroll et al., 2001).

Wir haben aufgrund dieser Daten ebenfalls versucht eine Bindung von TIP47 an Rab9 *in vitro* nachzuweisen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Rudolph vom Institut für Strukturbioogie in Göttingen wurde daher die Nukleotid-abhängige Interaktion zwischen rekombinantem Rab9 und rekombinantem TIP47 untersucht. In *pull down* Versuchen wurde His-GST-TIP47 an eine Matrix gekoppelt und für 2h entweder mit Rab9-GDP, Rab9-GTP oder Rab9-GppNHp (ein nicht hydrolysierbares GTP-Analog) inkubiert. Alle Fraktionen (Durchfluss, Waschfraktion und Elution) wurden anschließend über ein SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt (Abb. 3.12A). Es konnte keine Nukleotid-abhängige Bindung von Rab9 an His-GST-TIP47 nachgewiesen werden. Mit einer unabhängigen Methode wurde versucht mögliche Komplexe von Rab9 und TIP47 von den Einzelproteinen mittels analytischer Gelfiltration zu trennen und nachzuweisen. Aber auch in diesem Experiment konnte neben den beiden Peaks der Einzelproteine kein zusätzlicher Peak, der auf einen Komplex schließen lassen würde, detektiert werden (Abb. 3.12B).

A:



B:

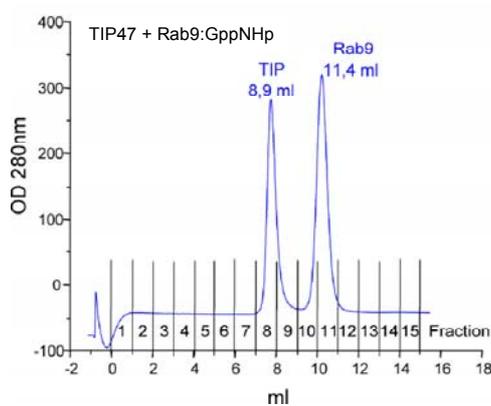


Abb. 11: TIP47 bindet *in vitro* nicht an Rab9.

A: *pull down* Versuch. His-GST-TIP47 wurde an eine Talon Matrix gekoppelt und für 2h mit äquimolaren Mengen von Rab9 entweder komplexiert mit GDP (a), GTP (b) oder GppNHp (c), inkubiert. Gleiche Volumina von Durchfluss, Waschfraktion und Eluat wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Rab9 befand sich hauptsächlich im Durchfluss und in der Waschfraktion. Kleine Mengen von Rab9 konnten auch im Eluat detektiert werden, allerdings war keine Nukleotid-abhängige Bindung von Rab9 an TIP47 erkennbar. **B: Analytische Gelfiltration.** Äquimolare Mengen von TIP47 und Rab9:GppNHp wurden für 2h inkubiert und auf eine Superdexsäule aufgetragen. Es wurden zwei Peaks dokumentiert, die dem Elutionsprodukt der Einzelproteine entsprachen. Ein zusätzlicher Peak, der einer Komplexbildung entsprochen hätte, war nicht detektierbar (Die Versuche wurden von M. Rudolph und J. Wittmann, Universität Göttingen, durchgeführt.).

tiert, die dem Elutionsprodukt der Einzelproteine entsprachen. Ein zusätzlicher Peak, der einer Komplexbildung entsprochen hätte, war nicht detektierbar (Die Versuche wurden von M. Rudolph und J. Wittmann, Universität Göttingen, durchgeführt.).

Eine alternative Möglichkeit zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen ist ein *yeast-two-hybrid screen*. In diesem *screen* wird ein Reporter-gen verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* (in der Hefe) nachzuweisen. Transkribiert wird das Reporter-gen nur, wenn ein entsprechender Transkriptionsfaktor an seine Promotorregion bindet. Dieser Transkriptionsfaktor besitzt zwei Domänen, wovon die eine als Fusionsgen mit dem „Köderprotein“ von einem Plasmid exprimiert wird und die andere auf einem anderen Plasmid mit den jeweiligen „Beuteproteinen“. Bindet nun das „Köderprotein“ ein „Beuteprotein“, so kommt es zur funktionellen Rekonstruktion des Transkriptionsfaktors und die Genexpression des Reporter-gens wird eingeschaltet. In diesem Fall verwendete Francis Barr (Universität, Liverpool) TIP47 als „Köder“ und testete die Interaktion mit 32 verschiedenen Rabs (inklusive Rab9) entweder in GTP- oder GDP gebundener Form. In keinem einzigen Fall war eine Interaktion nachzuweisen (unpublizierte Daten).

Weder die Arbeitsgruppe von M. Rudolph, noch die von F. Barr konnten in Ihren unabhängigen Experimenten Hinweise auf eine Bindung von TIP47 an Rab9 finden. Zusätzlich wurde die Lokalisierung von endogenem und GFP-Rab9 in der Zelle untersucht und auf Kollokalisierung mit endogenem TIP47 bzw. RFP-TIP47 analysiert. Es konnte bestätigt werden, dass Rab9 an späten Endosomen lokalisiert, allerdings konnte keine Kollokalisierung mit TIP47 gefunden werden. Es zeigte sich auch keine Kollokalisierung an späten Endosomen, wenn man GFP-Rab9 überexprimierte. Diese Überexpression von Rabs sollte Effektoren an Rab-gebundenen Kompartimenten sichtbar machen. Eine Überexpression von GFP-Rab9 und zusätzlicher Inkubation der Zellen mit Ölsäure zeigte in wenigen Fällen eine schwache Färbung von GFP-Rab9 an Lipid droplets. Ob diese Lokalisierung physiologisch relevant ist, muss näher untersucht werden. Unsere Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass TIP47 kein Schlüsseffektor von Rab9 sein kann.

3.3. Die Funktion von TIP47 an Lipid droplets

Wie auf Seite 15 bereits erwähnt, wurde TIP47 nicht nur als Sortierungsfaktor charakterisiert, sondern im gleichen Jahr (1998) als pp17b beschrieben, dessen Aminosäuresequenz zu 42% identisch ist mit der Sequenz von ADRP, ein an Lipid droplets lokalisierendes Protein. In der Folge konnten Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass sowohl endogenes TIP47 (Wolins et al., 2001), als auch GFP-TIP47 (Miura et al., 2002) an Lipid droplets lokalisieren. Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der Sequenzabschnitt, Aminosäuren (AS) 86-198, von TIP47 für die Rekrutierung an Lipid droplets ausreichend ist (Bulankina et al., 2009). Nach wie vor ist aber die Funktion von TIP47 an Lipid droplets unklar. Um dieser wichtigen Frage nachzugehen, wurde zunächst geklärt, wann TIP47 an Lipid droplets bindet. Des Weiteren wurden Funktionsanalysen in Zellen durchgeführt, in denen TIP47 mittels RNAi supprimiert war. Zusätzlich wurden *in vitro* Experimente mit rekombinantem TIP47 durchgeführt.

3.3.1. Lokalisierung von TIP47 an Lipid droplets

TIP47 und ADRP sind die einzigen bekannten PAT Proteine, die ubiquitär exprimiert werden (Brasaemle, 2007). Beide Proteine unterscheiden sich in einem wesentlichen Punkt: ADRP gehört zu den sogenannten „CPATs“, ist also nur gebunden an Lipid droplets stabil, während TIP47 zu den sogenannten „austauschbaren PAT Proteinen“, den EPATs, gehört. Damit ist gemeint, dass TIP47 in der Zelle sowohl zytosolisch als auch an Lipid droplets gebunden stabil ist. Hieraus ergibt sich die Frage, wann und warum TIP47 aus dem Zytosol an Lipid droplets rekrutiert wird. Zur Beantwortung dieser Frage wurden HeLa Zellen verwendet, da nur ~2% der Zellen unter „Standard“-Zellkulturbedingungen (s. M+M) Lipid droplets aufweisen. Lipid droplets können aber durch Inkubation der Zellen mit Ölsäure (400µM mit BSA komplexiert) induziert werden. Das erhöhte Angebot an freien Fettsäuren führt zur vermehrten Synthese von Triacylglycerin, das in Lipid droplets akkumuliert. Als erstes sollte analysiert werden, wann Lipid droplets in der Zelle sichtbar werden und ab wann TIP47 an diese rekrutiert wird. Hierzu wurde die Lipid droplet Biogenese mit Ölsäure induziert und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie die Bildung der Lipid droplets und die Rekrutierung von TIP47 an diese analysiert. Da die Rekrutierung

von endogenem TIP47 analysiert werden sollte, wurde keine Lebendbeobachtung von GFP-markiertem TIP47 angewandt.

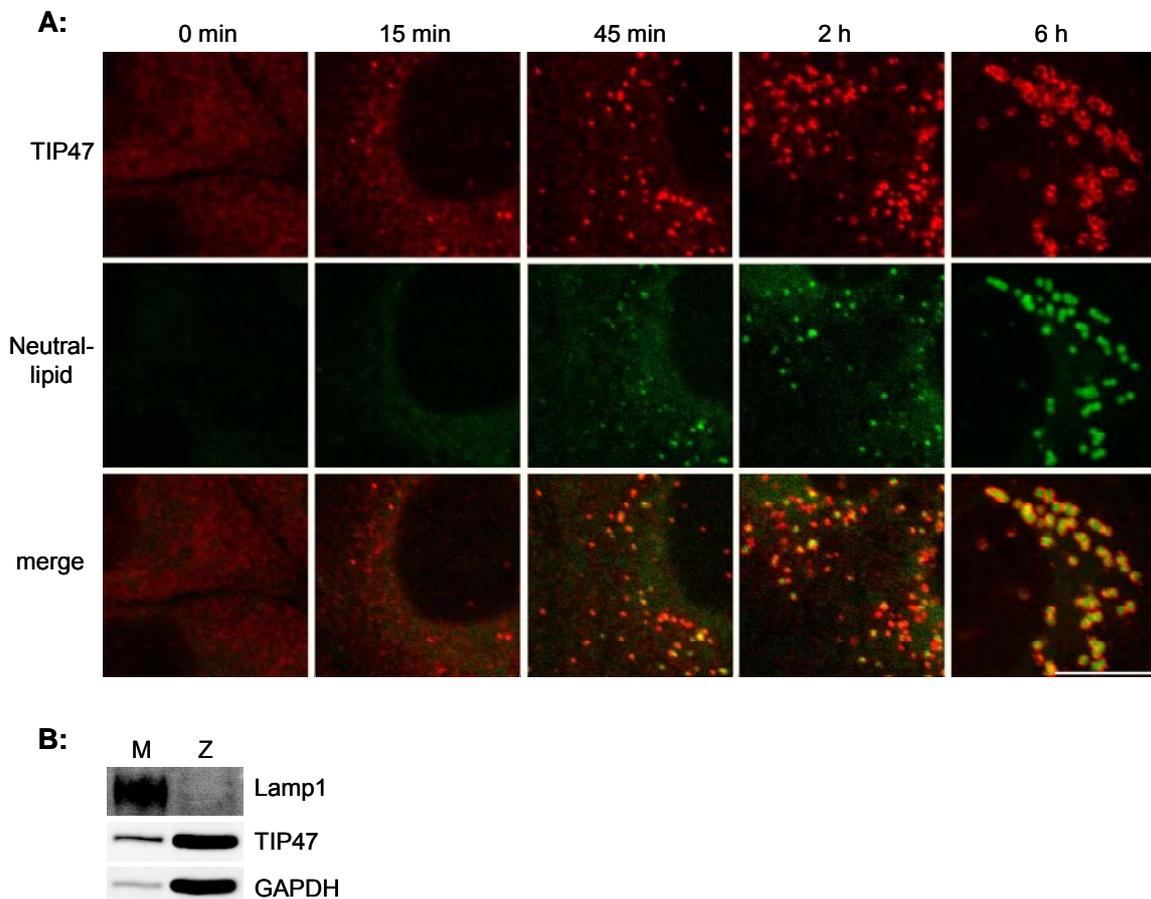


Abb. 3.13: TIP47 ist ein zytosolisches Protein, dass an naszierende Lipid droplets rekrutiert wird. A: Immunfluoreszenz von HeLa Zellen nach Zugabe von Ölsäure. HeLa Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit Ölsäure inkubiert, fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von TIP47 erfolgte durch Alexa546 markierte Zweitantikörper, die gegen den polyklonalen TIP47 Antikörper gerichtet waren. Neutrallipid wurde durch den Farbstoff Bodipy 493/503 angefärbt. Maßstab: 10µm. **B: Zytosol: Membran-Verhältnis von TIP47.** HeLa Zellen wurden mit einer 27G Nadel aufgeschlossen, einmal niedrigtourig und dann 30min bei 100.000xg zentrifugiert, um Zytosol (Z) von den zellulären Membranen (M) zu trennen. Aliquote Anteile wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western blot wurden die angegebenen Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. GAPDH diente als Kontrollprotein für die zytosolische Fraktion und das lysosomale Membranprotein Lamp1 als Marker für die Membranfraktion.

Für diese Analyse wurden die Zellen für verschiedene Zeiten mit Ölsäure inkubiert, danach fixiert, permeabilisiert und endogenes TIP47 und Neutrallipid angefärbt. In der Immunfluoreszenz ist TIP47 unter Standard-Kulturbedingungen als zytosolisches

Protein kaum nachzuweisen (Abb. 3.13A, 0min). Dass TIP47 unter diesen Bedingungen zytosolisch lokalisiert ist, wurde zusätzlich in einem Western blot nachgewiesen, der TIP47 in der Zytosol- und Membranfraktion zeigt. TIP47 wird zu ~90% in der Zytosolfraction detektiert und nur ~10% waren in der Membranfraktion nachweisbar (Abb. 3.13B). Bereits 15min nach Zugabe von Ölsäure ins Medium werden erste Punkte in der Zelle sichtbar. Diese Punkte werden mit der Zeit größer, bis man nach ca. 6h TIP47-positive Ringe erkennt. Diese Ringe umschließen angefärbtes Neutrallipid (Abb. 3.13A) und wurden so als Lipid droplets identifiziert. Der Befund, dass TIP47 zeitlich vor dem Nachweis von Neutrallipid detektiert werden kann, kann darauf hinweisen, dass TIP47 in der frühen Biogenese von Lipid droplets eine Rolle spielt. Die bisherigen Daten lassen allerdings keinen Schluss zu, ob die TIP47-positiven Punkte im Zytosol Aggregate darstellen, oder ob es sich um membran-assoziierte Anreicherungen handelt. Die Intensitätszunahme der TIP47 Färbung während der Ölsäureinkubation könnte auf eine erhöhte Expression von TIP47 hinweisen. Diese Möglichkeit konnte aber durch einen Western blot (Abb. 3.14) ausgeschlossen werden.

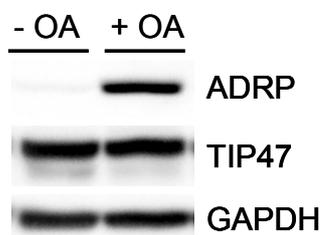


Abb. 3.14: Expression von TIP47 in Abhängigkeit von Ölsäure im Kulturmedium. Zellen wurden über Nacht +/- Ölsäure inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, homogenisiert und aliquote Mengen für den Immunoblot-Nachweis der angegebenen Proteine verwendet. Die Expression von TIP47 und GAPDH war durch Ölsäureinkubation nicht beeinflusst, während ADRP nur in Gegenwart von Ölsäure nachweisbar ist.

Somit erscheint wahrscheinlich, dass das vorhandene zytosolische TIP47 an die neugebildeten Lipid droplets, bzw. an die sich bildenden Lipid droplets rekrutiert wird. Hier verhält sich TIP47 anders als das nahe Verwandte Protein ADRP (42% Sequenzidentität, 67% Sequenzähnlichkeit), das nur detektierbar ist, wenn auch Lipid droplets in der Zelle vorhanden sind. Andere Gruppen konnten zeigen, dass ADRP zwar kontinuierlich exprimiert wird, aber unter normalen Zellkulturbedingungen proteasomal abgebaut wird (Masuda et al., 2006; Xu et al., 2005). Diese ersten Versuche weisen darauf hin, dass TIP47 unter normalen Kulturbedingungen ein zytosolisches Protein ist, das bei Neubildung von Lipid droplets an diese rekrutiert wird.

Als nächstes stellte sich die Frage, wie die Dynamik von TIP47 an Lipid droplets aussieht. Bindet es nur transient an Lipid droplets, oder verweilt TIP47 länger an Lipid droplets? Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden FRAP-(*fluorescence recovery after photobleaching*) Experimente mit GFP-TIP47 durchgeführt.

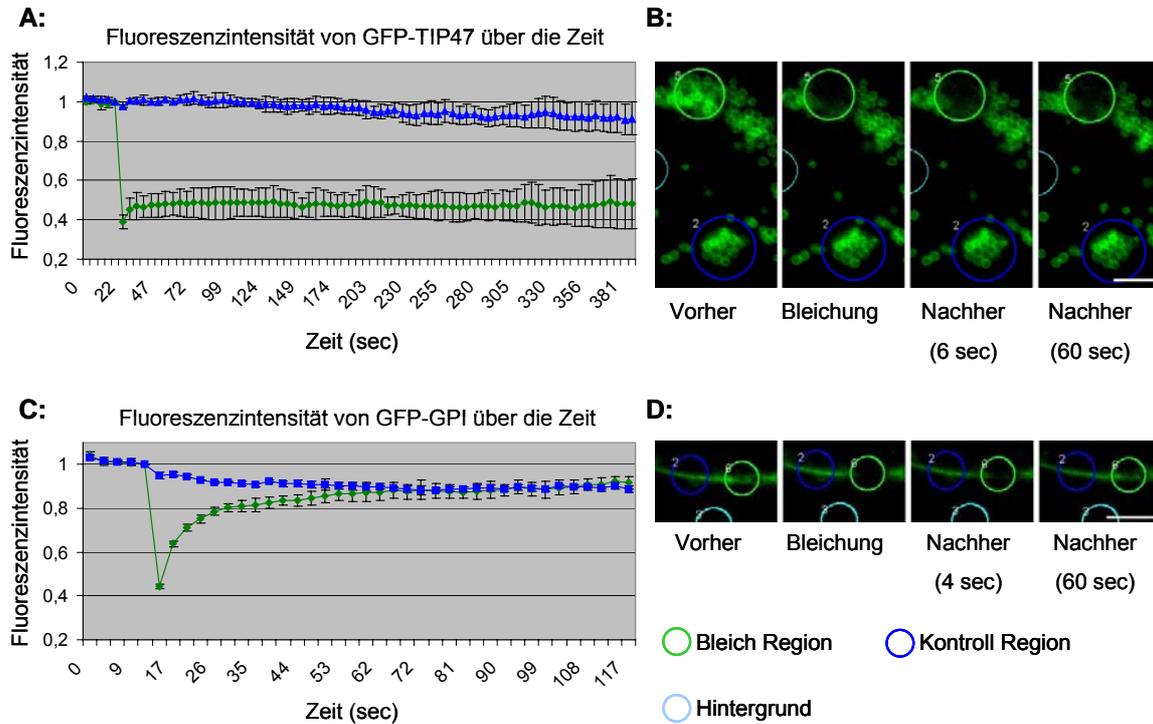


Abb. 3.15: FRAP-Analyse von GFP-TIP47 an Lipid droplets. A,C: Verlauf der Fluoreszenzintensität über die Zeit. B,D: Immunfluoreszenzaufnahmen vor, während und nach dem Bleichvorgang. HeLa Zellen, die GFP-TIP47 (A,B) oder GFP-GPI (Glykosylphosphatidylinositol-Anker) (C,D) exprimierten, wurden auf Schalen mit Deckglasboden ausplattiert und nach 36h über Nacht mit Ölsäure inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde bei GFP-TIP47 alle 5sec über einen Zeitraum von 6min und bei GFP-GPI alle 3sec über einen Zeitraum von 2min gemessen. GFP-GPI, das an der Plasmamembran lokalisiert, diente als Kontrollprotein für eine vollständige *recovery* der Fluoreszenzintensität innerhalb 1min (C,D). Im Gegensatz dazu kommt es bei GFP-TIP47 zu keiner vollständigen Erholung der Intensität. Die durch den Bleichpuls reduzierte Intensität auf den Wert 0,4 erholte sich auch nach 6min nur auf 0,5 (A,B). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen. Maßstab: 5 μ m.

Mittels FRAP kann die Mobilität von Proteinen und ihre Interaktion mit zellulären Kompartimenten analysiert werden. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Proteine in einem definierten Bereich kurzfristig mit sehr hoher Laserintensität bestrahlt und so irreversibel gebleicht. Der FRAP-Effekt entsteht dadurch, dass anschließend

ungebleichte fluoreszenzmarkierte Proteine aus der Umgebung in die gebleichte Region einwandern und die Zunahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit gemessen wird. Die Zunahme der Intensität spiegelt die Geschwindigkeit wieder, mit der ungebleichte Proteine in die gebleichte Region wandern.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie schnell GFP-TIP47 von Lipid droplets dissoziiert und neues GFP-TIP47 bindet. Hierfür wurden stabil mit GFP-TIP47 transfizierte HeLa Zellen über Nacht mit Ölsäure inkubiert und unter dem Mikroskop analysiert (s. M+M). Für den Bleichvorgang wurde eine Region in der Zelle definiert, die mehrere Lipid droplets enthielt (Abb. 3.15B, grüne Region). Nach dem Bleichpuls reduzierte sich die auf 1 normierte Fluoreszenzintensität auf ca. 0,4. Auch nach 6min konnte nur ein Anstieg der Intensität auf 0,5 vom Ausgangswert gemessen werden (Abb. 3.15A). Dieser Anstieg kann u.a. daran liegen, dass während der Messung ungebleichte Lipid droplets in die gebleichte Region „wandern“. Ansonsten zeigt die sehr geringe Regenerierung der Fluoreszenz in der Bleichregion, dass kaum GFP-TIP47 Proteine aus dem Zytosol in die gebleichte Region rekrutiert wurden bzw. die gebleichten GFP-TIP47 Proteine an den Lipid droplets blieben und so keine Bindungsstelle für ungebleichtes GFP-TIP47 zur Verfügung stand. Vergleicht man dies z.B. mit der „Erholung“ der Fluoreszenz von ArfGAP1 am Golgi, die sich innerhalb von unter 1min vollständig regeneriert (Liu et al., 2005), lässt unser Versuch vermuten, dass GFP-TIP47 an Lipid droplets rekrutiert wird und dort eine lange Verweildauer aufweist. Ob allerdings TIP47, einmal an Lipid droplets rekrutiert, dort verbleibt und nicht mehr abdissoziiert, kann nicht sicher beantwortet werden. Außerdem konnte bei diesem Versuchsaufbau nicht geklärt werden, wie die laterale Mobilität von GFP-TIP47 an der Lipid droplet Hemimembran aussieht. Dazu muss ein Teilbereich der Lipid droplet Hemimembran gebleicht werden und nicht die gesamte Membran eines Lipid droplets. Das Bleichen eines Teilbereichs war zwar möglich, nur konnte die Diffusion von GFP-TIP47 in den gebleichten Bereich nicht gemessen werden, da man nicht zwischen einer Bewegung des Lipid droplets und einer Wanderung von TIP47 auf der Membran unterscheiden konnte. Die Messung der lateralen Mobilität von GFP-GPI (**G**lykosylphosphatidylinositol-Anker) in der Plasmamembran diente als Kontrolle, um zu zeigen, dass eine vollständige „Erholung“ der Fluoreszenz messbar ist (Abb. 3.15C,D).

Alle zuvor genannten Experimente betrafen das Verhalten von TIP47 nach Zugabe von Ölsäure. Innerhalb weniger Minuten erfolgte die Rekrutierung von TIP47 an sich

bildende Lipid droplets. Unter diesen Bedingungen speichert die Zelle die überschüssigen Fettsäuren als Triacylglycerin in Lipid droplets. Was passiert aber mit TIP47 bei Depletion von Lipiden im Medium? Lokalisiert TIP47 auch an Lipid droplets, wenn die Zellen in einem Hungermedium gehalten werden und Fettsäuren zur Energiegewinnung aus den Lipid droplets freigesetzt werden müssen? In den entsprechenden Experimenten wurden HeLa Zellen für 16h mit Ölsäure und danach für verschiedene Intervalle in DMEM ohne FCS, aber mit Fettsäure-freiem BSA als Akzeptor für Fettsäuren, inkubiert. Alle HeLa Zellen, die für 16h mit Ölsäure inkubiert wurden, zeigten TIP47-positive Lipid droplets. Wurden die Zellen anschließend für 6h in DMEM ohne FCS kultiviert, so waren die Lipid droplets zwar kleiner, aber immer noch TIP47-positiv. Nach 24-stündiger Inkubation in DMEM ohne FCS waren keine Lipid droplets mehr detektierbar und TIP47 war wieder zytosolisch lokalisiert.

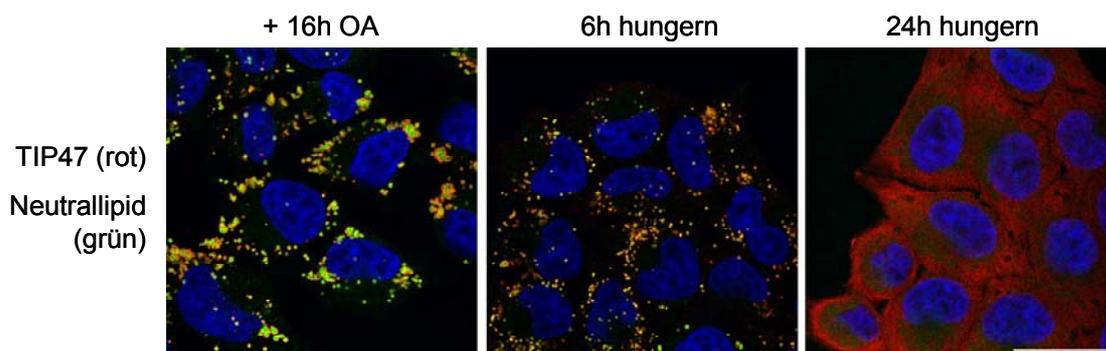


Abb. 3.16: TIP47 lokalisiert auch während der Lipolyse an Lipid droplets. HeLa Zellen wurden für 16h in Ölsäure-haltigem Medium inkubiert, kurz mit PBS gewaschen und dann für weitere 6-24h in Medium ohne FCS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für die IF fixiert, permeabilisiert und Neutral lipid und TIP47 angefärbt. Nach sechsständiger Inkubation in Hungermedium war TIP47 weiterhin an Lipid droplets nachweisbar. Erst als keine Lipid droplets mehr sichtbar waren, konnten auch keine TIP47-positive Punkte mehr detektiert werden. Maßstab: 25µM.

Dies deutet daraufhin, dass TIP47 nicht nur während der Biogenese, sondern auch während der Lipolyse von Triacylglycerin und dem daraus folgenden Abbau von Lipid droplets an diese gebunden bleibt. Ob aber TIP47 mit dem *turnover* der Lipid droplets abgebaut wird, oder aber wieder ins Zytosol regeneriert, kann dieser Versuch nicht beantworten. Dieser Versuch zeigt auch nicht, dass tatsächlich Lipolyse stattfindet und Fettsäuren aus den Lipid droplets freigesetzt werden, wenn sie im Hungermedium kultiviert werden. Um diese Lipolyse nachzuweisen, wurden Zellen für 16h mit radioaktiv markierter Ölsäure (^{14}C) inkubiert. Am nächsten Morgen

wurden die Zellen in Hungermedium mit Triacsin C überführt, welches die langkettigen Acyl CoA Synthetasen inhibiert (Fujimoto et al., 2006). Dies führt dazu, dass langkettige Fettsäuren nicht mehr in Triacylglycerin eingebaut werden können. Nach 6h war keine Radioaktivität mehr in den Zellen nachweisbar, dafür stieg aber die Radioaktivität im Medium kontinuierlich an. Zusätzlich wurden aliquote Mengen des Mediums und der Zellen auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen, um die Reduktion von Triacylglycerin in den Zellen zeigen zu können und den Nachweis von radioaktiver Ölsäure im Medium zu bringen (Daten nicht gezeigt). Dieser Versuch zeigt, dass die Verkleinerung der Lipid droplets während der Inkubation im Hungermedium tatsächlich auf Lipolyse, also einer Freisetzung von Fettsäuren aus den Lipid droplets, beruht.

Zusammenfassend zeigen diese Versuche, dass TIP47 unter normalen Kulturbedingungen ein zytosolisches Protein ist, welches direkt nach Induktion der Lipid droplet Biogenese an diese bindet und auch während der Lipolyse von Triacylglycerin an Lipid droplets verbleibt. Hieraus ergibt sich die Frage, wie die Biogenese von Lipid droplets verläuft, wenn TIP47 in HeLa Zellen durch RNAi herunterreguliert wird.

3.3.2. Lipid droplet Morphologie und Lipidmetabolismus in TIP47 KD Zellen

Die Supprimierung zellulärer Proteine durch RNAi ist ein geeignetes Werkzeug, um die Funktion von Proteinen bzw. die Auswirkung des Proteinverlustes zu analysieren. Im Western blot konnte eine Supprimierung von TIP47 auf ~20% detektiert werden. Des Weiteren fiel im Western blot von TIP47 supprimierten HeLa Zellen auf, dass ADRP bei Inkubation der Zellen mit Ölsäure stärker detektierbar ist (Abb. 3.17A). Die verstärkte Detektion ist entweder auf eine erhöhte Expression oder aber auf einen verringerten Abbau von ADRP zurückzuführen und könnte somit auf eine Kompensation hindeuten, d.h. ADRP könnte überlappende oder ähnliche Funktionen wie TIP47 besitzen. In weiterführenden Versuchen wurden die Zellen einer subzellulären Fraktionierung zugeführt, bei der die Lipid droplets in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten flotieren. Diese, wie auch die anderen Fraktionen des Gradienten wurden auf Proteinkomposition und Lipidgehalt hin untersucht.

Während in Kontrollzellen 25-35% des gesamten TIP47 in der Lipid droplet Fraktion nachweisbar sind, erhöht sich diese Menge stark bei den KD-Zellen. Hier liegen 70-80% des nicht supprimierten TIP47 in der Lipid droplet Fraktion vor. Eine naheliegende Schlussfolgerung ist, dass der verbleibende TIP47 Pool in RNAi Zellen an den für die Funktion entscheidenden Ort rekrutiert wird: die Lipid droplets. Berücksichtigt man den zeitlichen Verlauf der Rekrutierung von TIP47 an sich bildende Lipid droplets, so steht beides im Einklang mit einer Funktion bei der Lipid droplet Biogenese.

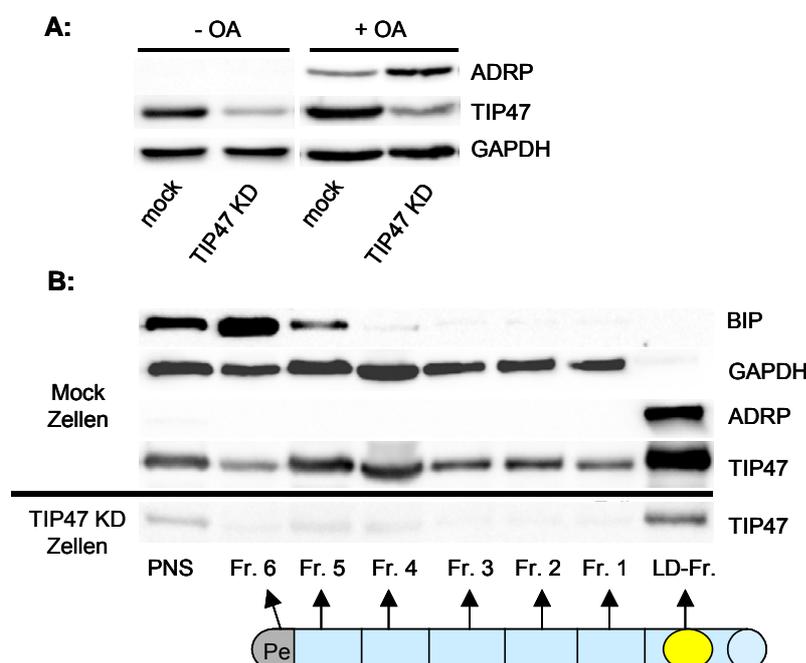


Abb. 3.17: ADRP und TIP47 Expression in TIP47 RNAi Zellen. A: Western blot von Zellhomogenaten. Mock und TIP47 KD Zellen wurden über Nacht +/- Ölsäure inkubiert. Danach wurden Zellhomogenate präpariert, im SDS-PAGE aufgetrennt und die angegebenen Proteine im Western blot nachgewiesen. ADRP ist nur nachweisbar, wenn die Zellen zuvor mit Ölsäure inkubiert wurden. In den TIP47 KD Zellen wird 2x mehr ADRP detektiert als in den mock transfizierten Zellen. **B: Subzelluläre Fraktionierung von mock und TIP47 KD Zellen.** Nach Ölsäureinkubation für 16h wurden die Zellen aufgeschlossen und die Kernfraktion abzentrifugiert. Für die subzelluläre Fraktionierung wurden gleiche Proteinmengen in einem Saccharosegradienten für 3h bei 28.000xg zentrifugiert. Anschließend wurden die Fraktionen von oben abgenommen, mit TCA gefällt, und gleiche Volumina über SDS-Gel aufgetrennt, um die angegebenen Proteine nach einem Western blot mit Antikörpern zu detektieren. In den mock transfizierten Zellen ist TIP47 hauptsächlich in der Lipid droplet (LD)-Fraktion, aber auch in allen anderen Fraktionen detektierbar, wohingegen es in TIP47 KD Zellen fast nur noch in der LD-Fraktion zu finden ist. PNS: *post nuclear supernatant*; Fr.: Fraktion; Pe: Pellet.

Demzufolge sollte man erwarten, dass in TIP47 RNAi Zellen die Lipid droplet Morphologie verändert ist. Dies wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Zellen wurden für 16h mit Ölsäure inkubiert und Lipid droplets mit dem Neutrallipidfarbstoff Bodipy 494/503 angefärbt (Abb. 3.18A). Für die Quantifizierung der LD-Morphologie war die Nutzung von Software zur Partikelanalyse wie z.B. von ImageG ungeeignet. Die Software verlangt die Eingabe eines Schwellenwertes, der angibt, ab welcher Fluoreszenzintensität eine Struktur erkannt und in die Zählung mit einbezogen werden soll. Hebt man diesen Schwellenwert an, damit kleinere Lipid droplets erkannt werden, werden zwei eng benachbarte Lipid droplets als ein Lipid droplet gezählt. Reduziert man hingegen den Schwellenwert, um eng aneinander liegende Lipid droplets zu trennen, verliert man kleinere Lipid droplets, da diese nun nicht mehr von der Software erkannt werden können. Daher wurde die Größe und Anzahl der Lipid droplets manuell ausgewertet. Auch diese Daten sind mit einiger Vorsicht zu bewerten, da das grundsätzliche Problem der Erfassung/Bewertung einzelner/benachbarter Lipid droplets nicht lösbar war. Dennoch sind folgende Phänotypen deutlich geworden: Kontrollzellen können bis zu 100 Lipid droplets pro Zelle besitzen, der Mittelwert liegt bei etwa 60. Dabei besitzen die Zellen viele einzelne Lipid droplets, die eine Größe von 0,5 bis zu 2,5µm aufweisen. Zusätzlich gibt es in den Zellen Bereiche, in denen die Lipid droplets eng aneinander liegen. Hier konnte man nicht entscheiden, ob dies ein Lipid droplet mit einer Größe von bis zu ~5µm ist, oder ob es sich dabei um viele kleinere Lipid droplets handelt.

In den TIP47 RNAi Zellen war eine große Heterogenität der Lipid droplets auffällig, die sich grob in 3 Phänotypen einteilen lässt: Je nach Experiment waren in 5-20% der Zellen kaum Lipid droplets nachweisbar (≤ 5), während in anderen Zellen (30-50%) die Zahl der Lipid droplets stark vermindert (≤ 30) und kleiner waren (0,5-1,5µm). Bei der dritten Population (30-50%) war eine Anhäufung (*clustering*) von Lipid droplets auffällig. Bei diesen Ballungen konnte man, wie auch bei den Kontrollzellen, die genaue Anzahl und Größe der Lipid droplets nicht bestimmen.

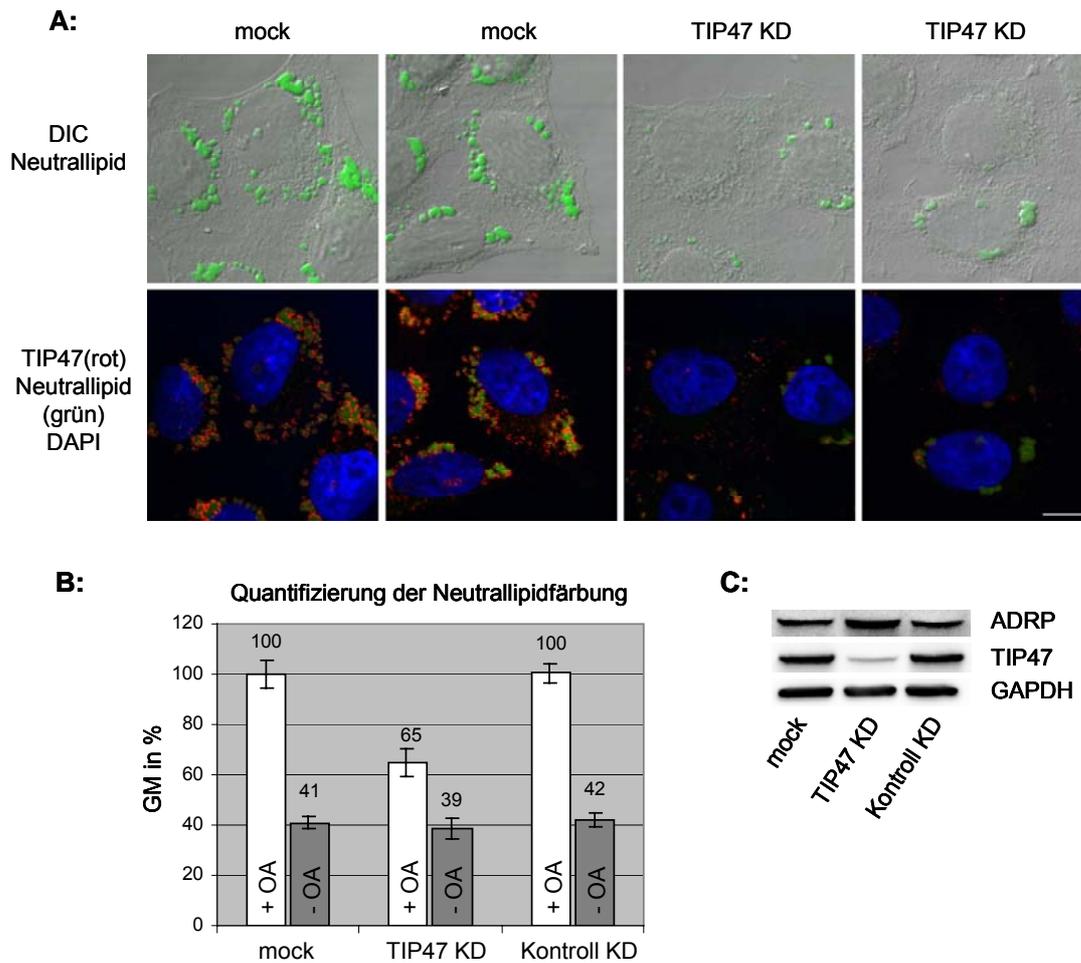


Abb. 3.18: RNAi von TIP47 beeinträchtigt die Lipid droplet Biogenese. A: Immunfluoreszenzfärbung. Die Abbildung zeigt je zwei Ausschnitte für mock und TIP47 KD Zellen, um die unterschiedlichen Phänotypen in TIP47 KD Zellen darzustellen. TIP47 RNAi und Kontrollzellen wurden für 16h mit Ölsäure inkubiert, um die Lipid droplet Biogenese zu induzieren. Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und Neutrallipid mit Bodipy 494/503 sichtbar gemacht (obere/untere Reihe). Die untere Reihe zeigt zusätzlich die Färbung von TIP47 in denselben Zellen. In TIP47 KD Zellen sieht man eine reduzierte Färbung für Neutrallipid und TIP47. DIC = *differential interface contrast*. Maßstab: 10µm. **B: Quantifizierung der Neutrallipidfärbung in lebenden Zellen.** Nach 16-stündiger Inkubation +/- Ölsäure wurden die Zellen zusätzlich für 2h mit Bodipy 494/503 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und die Intensität des inkorporierten Bodipy 494/503 mittels Fluoreszenzdurchflußzytometrie analysiert. Die Intensität der Neutrallipidfärbung nach Ölsäureinkubation ist in TIP47 KD Zellen um 35% reduziert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zwischen 3 unabhängigen Versuchen, die als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. GM: geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität **C: Western blot Kontrolle der RNAi Effizienz.** Die densitometrische Auswertung ergab eine Suppression von 80%, die Menge an ADRP in den TIP47 RNAi Zellen war um 100% erhöht.

Neben der Färbung von Neutrallipid wurde in der Immunfluoreszenz auch TIP47 angefärbt (Abb. 3.18A untere Reihe). In den Kontrollzellen markiert TIP47 ringförmige Strukturen, die alle das Neutrallipid umschließen.

Verglichen mit den Kontrollzellen sieht die Färbung für TIP47 in den KD Zellen eher punktförmig aus und erinnert an die Färbung von Kontrollzellen nach kurzzeitiger Inkubation mit Ölsäure für 15-45 min (siehe Abb. 3.13). Wir vermuten, dass die Zellen auf die Ölsäureinkubation reagieren, indem das verbliebende TIP47 zu den subzellulären Strukturen rekrutiert wird, an denen die Lipid droplet Biogenese beginnt. Darüber hinaus sind die Zellen nicht in der Lage genauso viele und große Lipid droplets zu bilden wie die Kontrollzellen. Demnach ist die normale Lipid droplet Biogenese in den RNAi Zellen stark beeinträchtigt. Um trotz der oben beschriebenen Problematik diesen Phänotyp zu quantifizieren, erfolgte zusätzlich eine Analyse der Neutrallipidfärbung mittels Fluoreszenzdurchflußzytometrie (Abb. 3.18B). Hierzu wurden die Zellen für 16h mit oder ohne Ölsäure und in den letzten beiden Stunden der Inkubation zusätzlich mit Bodipy 494/503 inkubiert. Danach wurden die Zellen trypsiniert, gewaschen und am Fluoreszenzdurchflußzytometer die Intensität von Bodipy 494/503 pro Zelle gemessen. Beim Vergleich des geometrischen Mittelwertes der Fluoreszenzintensität von 30.000 Zellen zeigte sich eine Reduktion von 35% in den TIP47 RNAi Zellen gegenüber den Kontrollzellen. Diese verminderte Fluoreszenzintensität kann auf einen geringeren Neutrallipideinbau in Lipid droplets in TIP47 KD Zellen hinweisen.

Ein Überangebot an Fettsäuren im Zellkulturmedium führt zu deren Speicherung in Lipid droplets in Form von Triacylglycerin. Die Immunfluoreszenzen und die Ergebnisse der Fluoreszenzdurchflußzytometrie zeigen, dass die normale Bildung reifer Lipid droplets in TIP47 RNAi Zellen gestört ist. Hieraus ergibt sich die Frage, ob in TIP47 KD Zellen die Bildung von Triacylglycerin vermindert ist, und/oder ob die Speicherung von Triacylglycerin in Lipid droplets beeinträchtigt ist. Vorarbeiten von Anna Bulankina (aus unserer Arbeitsgruppe) zeigen, dass die Aufnahme von Fettsäuren in TIP47 RNAi Zellen nicht verändert ist. Daher konzentrierte sich meine Analyse auf die Bestimmung des Triacylglycerin Gehaltes in Kontroll- und TIP47 KD Zellen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

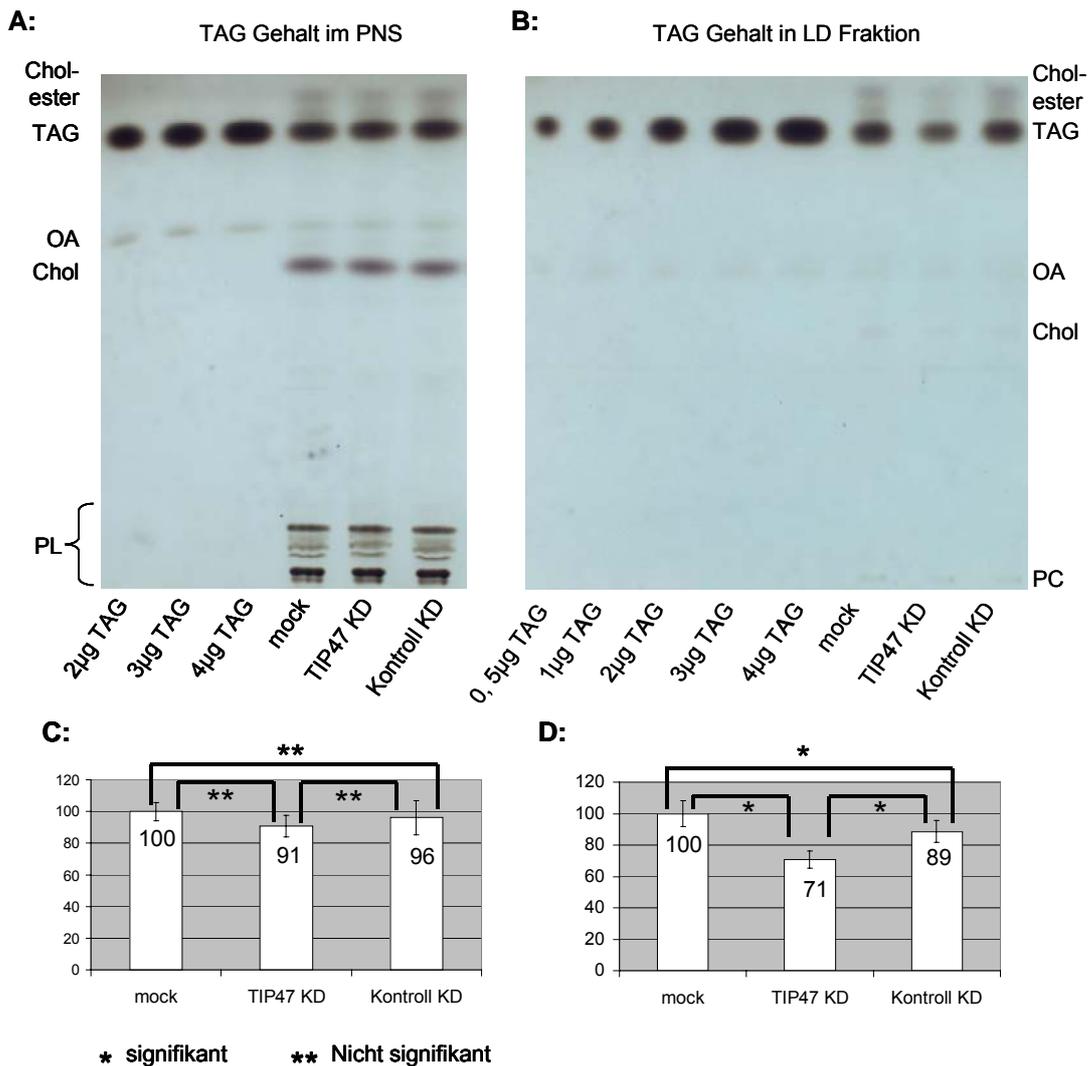


Abb. 3.19: Der Triacylglycerin (TAG)-Gehalt in Lipid droplets aus TIP47 KD Zellen ist vermindert. Kontroll- und TIP47 RNAi Zellen wurden nach 16-stündiger Inkubation mit Ölsäure geerntet, um ein PNS zu generieren. 100µg des PNS wurden aufbewahrt und 2,5mg des PNS wurden in einem Saccharosegradienten zentrifugiert, um die flotierenden Lipid droplets zu gewinnen. Nach Extraktion der Lipide wurden aliquote Mengen vom PNS (**A**) und den Lipid droplets (**B**) in der TLC aufgetrennt und das Lipidmuster mit Phosphorsäure sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte densitometrisch am Camag Reprostar 3. (**C**) Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied im TAG-Gehalt zwischen PNS von TIP47 KD- und Kontrollzellen (TIP47 KD versus mock: $p = 0,086$; TIP47 KD versus Kontroll KD: $p = 0,098$; mock versus Kontroll KD: $p = 0,539$; $\alpha = 0,050$, t-Test, Sigma stat). (**D**) Im Gegensatz dazu war die TAG Menge aus Lipid droplets in TIP47 KD Zellen signifikant um 30% reduziert. (TIP47 KD versus mock: $p < 0,001$; TIP47 KD versus Kontroll KD: $p = 0,002$ und mock versus Kontroll KD: $p = 0,043$; $\alpha = 0,050$, t-Test, Sigma stat). Die Fehlerbalken definieren die Standardabweichung von fünf unabhängigen Versuchen. Chol-ester: Cholesterinester; OA: Ölsäure; PL: Phospholipide; PC: Phosphatidylcholin.

Nach 16-stündiger Inkubation der Zellen mit Ölsäure wurden diese homogenisiert und durch Zentrifugation (500xg, 5min) ein PNS gewonnen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden aliquote Mengen zur Extraktion der Lipide und der anschließenden dünnenschichtchromatographischen Auftrennung eingesetzt. Hierzu wurden in Vorversuchen mit einer Triacylglycerineichgeraden die Auftragsmengen bestimmt, die eine densitometrische Auswertung ermöglichten. Der Triacylglycerin Gehalt war gegenüber dem in Kontrollzellen nicht signifikant verändert (Abb. 3.19A,C). Die Signifikanz wurde mit dem t-Test und einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ bestimmt. Dies bedeutet, dass es mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% keine Unterschiede im Triacylglycerin Gehalt von TIP47 KD, Kontroll KD und mock transfizierten Zellen gibt. Auch wenn die TLC-Analysen in sich schlüssig sind, sollen die Ergebnisse in Zukunft zusätzlich durch die Analysen radioaktiv markierter Lipide bzw. mittels Enzymassays verifiziert werden. Als nächstes wurden die Lipid droplets aus dem PNS durch subzelluläre Fraktionierung isoliert und deren Triacylglycerin Gehalt bestimmt (s.o.). In fünf Versuchen war übereinstimmend eine 30%-ige Reduktion von Triacylglycerin in der Lipid droplet Fraktion von TIP47 KD Zellen gegenüber mock transfizierten Zellen erkennbar. Dies ist ein signifikanter Unterschied des Triacylglycerin Gehaltes in den TIP47 RNAi Zellen (t-Test, sigma stat). Allerdings zeigt auch der Kontroll KD einen signifikanten Unterschied im Triacylglycerin Gehalt zu den mock transfizierten Zellen, was bedeutet, dass die RNAi alleine einen unspezifischen Effekt auf den Triacylglycerin Gehalt in Lipid droplets hatte. Auch wenn der p-Wert von 0,043 bei einem α -Wert von 0,050 vergleichsweise hoch ist, steht dieses Ergebnis doch im Widerspruch zu der Fluoreszenzdurchflußzytometrie. Hier hatte die Kontroll-RNAi keinen Einfluss auf die Intensität der Neutrallipidfärbung (siehe Abb. 3.18B). Der Vergleich von Kontrollzellen und TIP47 RNAi Zellen in der Immunfluoreszenz und der Fluoreszenzdurchflußzytometrie ließen vermuten, dass der Triacylglycerin Gehalt stärker reduziert ist als es die Quantifizierung der TLC nachweisen konnte. Verschiedene Einflüsse mögen hier eine Rolle gespielt haben, so z.B. die Art des Zellaufschlusses. Sobald man eine Zelle aufschließt, entstehen aus dem ER Netzwerk unweigerlich „mikrosomale Partikel“ (Radhakrishnan et al., 2008). Geht man nun davon aus, dass Lipid droplets durch Akkumulation von Neutrallipid zwischen den „Blättern“ der ER-Doppelmembran entstehen, so könnte der Zellaufschluss auch zur Bildung von Lipid droplet-artigen Strukturen führen, die sich

ebenfalls aufgrund ihrer geringen Dichte im nachfolgenden Zentrifugationsschritt in der Lipid droplet Fraktion anreichern. Dies würde das Ergebnis negativ beeinflussen. Dennoch zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass im Gegensatz zum PNS, in der Lipid droplet Fraktion von TIP47 KD Zellen weniger Triacylglycerin akkumuliert. Dies legt den Schluss nahe, dass nicht die Synthese, sondern die Speicherung von Triacylglycerin in Lipid droplets beeinflusst ist. Wenn aber das Triacylglycerin nicht in die Lipid droplets gelangt, stellt sich die Frage, wo in der Zelle das Triacylglycerin akkumuliert. Um diese Frage zu beantworten, muss im Rahmen von ultrastrukturellen Analysen, z.B. nach Aussackungen der ER Membran gesucht werden, um nur einen möglichen Ort einer alternativen Triacylglycerin Speicherung zu nennen. Zusammengefasst zeigen die Experimente eine Störung der Triacylglycerin Speicherung in TIP47 supprimierten Zellen. Warum es zu dieser Störung kommt, ist weiterhin unklar. TIP47 könnte andere Proteine an Lipid droplets rekrutieren, die z.B. für die Synthese von Triacylglycerin notwendig sind, oder die als „Gerüst“ für die Ausbildung von Lipid droplets notwendig sind. Aus diesem Grund habe ich im nächsten Schritt das Proteinmuster von gereinigten Lipid droplets analysiert und nach möglichen Bindungspartnern von TIP47 gesucht.

3.3.3. Das Proteinmuster gereinigter Lipid droplets

Um zu untersuchen, ob TIP47 andere Proteine an Lipid droplets rekrutiert, oder unter Umständen die Bindung anderer Proteine an Lipid droplets verhindert, wurde das Proteinmuster von Lipid droplets aus TIP47 KD- und Kontrollzellen verglichen. Vorarbeiten von A. Bulankina aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Menge von TIP47 an Lipid droplets durch RNAi stark vermindert wird. Aliquote Mengen PNS aus Kontroll- und TIP47 RNAi Zellen wurden zur Reinigung von Lipid droplets eingesetzt, die assoziierten Proteine gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 3.20A). Die prominenten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert. Zunächst ist zu erwähnen, dass sich das Proteinmuster der Lipid droplets aus TIP47 RNAi Zellen nicht wesentlich von den Kontrollen unterscheidet, auch wenn TIP47 deutlich reduziert ist (Abb. 3.20 Vergleiche Pfeilspitzen). Die meisten Banden aus den Kontrollzellen können auch in den TIP47 RNAi Zellen gesichtet werden. TIP47 ist also kein „Masterprotein“, welches für die Rekrutierung zahlreicher anderer

Proteine an Lipid droplets notwendig ist. Auffällig war hingegen die stärkere Färbung einzelner Proteinbanden in den TIP47 RNAi Zellen (Abb. 3.20A). Die identifizierten Proteine waren zytosolische Phospholipase A2 (1), *long-chain fatty acid CoA ligase 3* (3), ADRP (5) und *sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase* (10). Im Western blot konnte bereits bestätigt werden, dass ADRP im Vergleich zu Kontrollzellen in der Lipid droplet Fraktion von TIP47 KD Zellen angereichert ist. Die Anreicherung der anderen Proteine konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr verifiziert werden.

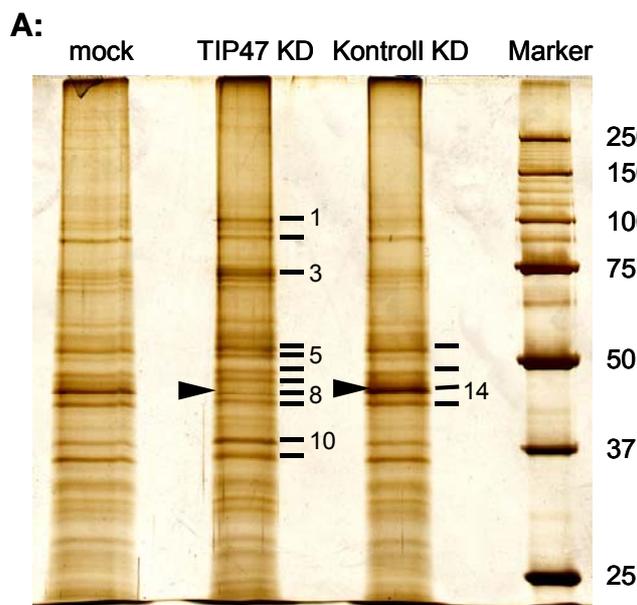
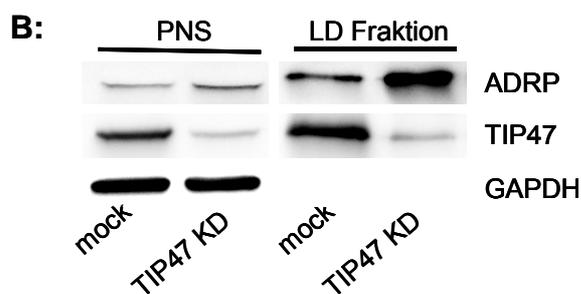


Abb. 3.20: A: Proteinmuster von Lipid droplets aus TIP47 KD- und Kontrollzellen. Aus jeweils 2,5 mg PNS wurden Lipid droplets aufgereinigt, die Proteine gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Einzelne Proteinbanden wurden ausgeschnitten und massenspektroskopisch identifiziert. In TIP47 KD Zellen ist TIP47 reduziert (die Pfeilspitzen zeigen die jeweilige Bande). Stärker gefärbt sind die Banden 1: zytosolische Phospholipase A2; 3: long-chain fatty acid CoA ligase 3; 5: ADRP und 10: sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase. **B: In TIP47 KD Zellen bindet mehr ADRP an Lipid droplets als in mock transfizierten Zellen.** 50µg PNS und 1/10 der Lipid droplet Fraktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western blot wurden ADRP, TIP47 und GAPDH detektiert.



Welche Bedeutung hat der höhere ADRP Gehalt an den Lipid droplets aus TIP47 RNAi Zellen? Eine Möglichkeit ist die Konkurrenz um die Bindung an Lipid droplets, die in TIP47 RNAi Zellen dazu führt, dass ADRP in Abwesenheit von TIP47 freie Bindungsstellen besetzt. Alternativ dazu könnte ADRP an Lipid droplets die Funktion von TIP47 teilweise übernehmen und so den Verlust von TIP47 kompensieren. Beide Proteine müssen aber spezifische Funktionen erfüllen, da sich sonst kein Phänotyp in den TIP47 RNAi Zellen manifestieren würde. In der Konsequenz dessen sollte der

Verlust von ADRP einen anderen Phänotyp zur Folge haben. Die entsprechenden Versuche dazu sind bereits angelaufen.

3.3.4. TIP47 ist nicht als Monomer in der Zelle nachzuweisen

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellen, insbesondere von Zellen, in denen TIP47 durch RNAi supprimiert war, konnte zeigen, dass TIP47 eine wichtige Funktion in der Reifung von Lipid droplets besitzt. Neben der zellbiologischen Analyse sollte TIP47 auch als Protein biochemisch analysiert werden, um seine Funktion in der Zelle besser zu verstehen. Daher wurde TIP47 als rekombinantes GST-Fusionsprotein in Bakterien hergestellt, aufgereinigt und mit Hilfe der TEV-Protease von His-GST getrennt. Anschließend wurde TIP47 in der blue native Gelelektrophorese analysiert. Dieses Verfahren dient unter anderem dazu, Komplexbildung von Proteinen nachzuweisen.

Für His-GST konnten zwei Banden detektiert werden. Eine Bande unter 66 kDa, die das Monomer repräsentiert und eine bei 66 kDa, die eine Dimerisierung von GST anzeigt. Rekombinantes TIP47 konnte in einer einzelnen starken Bande unter 140kDa und in einer schwächeren Bande bei 232kDa detektiert werden (Abb. 3.21A). Unter den gewählten Versuchsbedingungen kommt rekombinantes TIP47 also nicht als Monomer vor, womit sich die Frage stellt, ob für TIP47 in der Zelle gleiches gilt. Daher wurde ein HeLa Zytosol durch eine blue native Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und TIP47 nachgewiesen. Der Antikörper erkannte ein Protein, das ebenfalls unter 140kDa migrierte (Abb. 3.21B). Um zu zeigen, dass der Antikörper auch tatsächlich TIP47 erkannte, wurde in einem Parallelansatz zuerst eine Blue native Gelelektrophorese durchgeführt und in der 2. Dimension der Gelstreifen unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt. Im darauffolgenden Western blot gelang der Nachweis von TIP47, welches in einer einzelnen Bande entsprechend dem Molekulargewicht bei 47kDa detektiert wurde (Abb. 3.21C). TIP47 aus Hela Zellen und das rekombinante Protein verhalten sich also in der Elektrophorese unter nativen Bedingungen gleich, so dass davon auszugehen ist, dass TIP47 in der Zelle nicht als Monomer vorliegt.

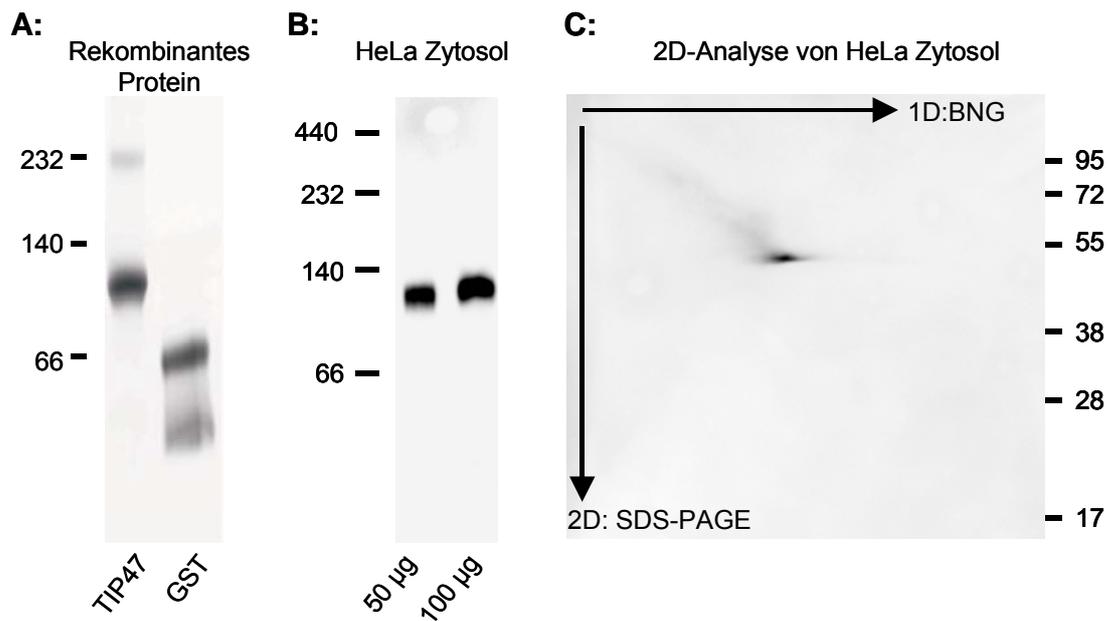


Abb. 3.21: TIP47 ist nicht als Monomer detektierbar. Die rekombinanten Proteine GST und TIP47 (**A**), bzw. Zytosol aus HeLa Zellen (**B**) wurden in der blue native Gelelektrophorese (BNG) aufgetrennt. Ein weiteres Aliquot von HeLa Zytosol wurde erst mittels BNG getrennt und dann in einer zweiten Dimension unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE getrennt (**C**). Der Nachweis von TIP47 in (**B**) und (**C**) erfolgte im Western blot. GST ist als Monomer und Dimer nachweisbar, während TIP47 nicht als Monomer bei 47kDa detektierbar ist. Es hat unter nativen Bedingungen ein Laufverhalten, dass eher für die Ausbildung eines Dimers oder Trimers spricht.

Da das Laufverhalten von Proteinen in der nativen Elektrophorese zusätzlich von Faktoren wie Faltung (Form des Proteins) oder posttranslationalen Modifizierungen beeinflusst wird, ist die blue native Gelelektrophorese keine Methode, um zwischen Dimerisierung oder Trimerbildung von TIP47 zu unterscheiden. Daher wurden *Crosslinking* Experimente mit Glutaraldehyd, sowie analytische Gelfiltration von TIP47 über Sephadex S200 durchgeführt. Die Ergebnisse der Gelfiltration deuten eher auf eine Trimerisierung hin, während die Ergebnisse des *Crosslinkings* auf eine Dimerisierung hindeuten. Zur Zeit etablieren wir *Crosslinking* Experimente in Zellen, die uns u.a. einen weiteren Aufschluss darüber geben sollen, ob TIP47 als Dimer oder Trimer in der Zelle vorkommt.

3.3.5. Bindungspartner von TIP47

Die Bindungspartner eines Proteins können wichtige Anhaltspunkte über die Funktion liefern. Außer der von uns bezweifelten Bindungspartner Rab9 und MPRs, sind von TIP47 bislang keine weiteren Bindungspartner bekannt, auch nicht im Zusammenhang mit seiner Lokalisation an Lipid droplets. Um mögliche neue Bindungspartner zu finden wurden *pull down* Experimente mit rekombinantem TIP47 durchgeführt. Zusätzlich wurde TIP47 aus verschiedenen Zelllinien immunpräzipitiert.

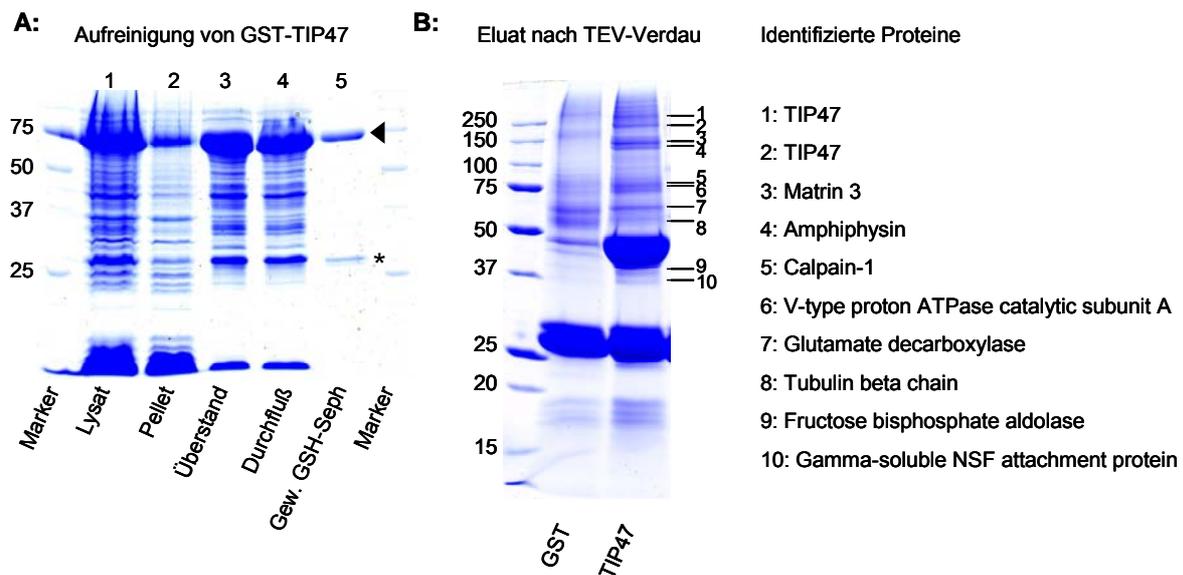


Abb. 3.22: Pull down mit rekombinantem TIP47. A: Aufreinigung von GST-TIP47 aus Bakterien. Das Bakterienlysat (Spur 1) wurde zentrifugiert, wobei der überwiegende Teil von TIP47 im resultierenden Überstand verbleibt (Spur 3). Nur ein kleiner Teil davon wurde an die Glutathion (GSH)-Sepharose gekoppelt, da nach der Inkubation noch große Mengen GST-TIP47 im Durchfluss verbleiben (Spur 4). Nach dem Waschen der GSH-Sepharose (Spur 5) ist GST-TIP47 (s. Pfeilspitze) das vorherrschende Protein, nur geringe Mengen GST (s. Sternchen) sind noch vorhanden. Das so gereinigte TIP47 wurde für den *pull down* eingesetzt. **B: Eluat nach TEV-Verdau.** Das an die GSH-Sepharose gekoppelte GST-TIP47 wurde für 1h bei RT mit Schweinehirnzytosol (ca. 17mg) inkubiert, dann gewaschen und anschließend für 2,5h mit der TEV-Protease verdaut. Das Eluat des TEV-Verdaus wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Proteinbanden, die nicht im Kontrolleluat sichtbar waren, wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert.

Für die *pull down* Experimente wurde His-GST-TIP47 und GST als Kontrolle an Glutathion-Sepharose (GSH-Sepharose) immobilisiert und für 1h mit HeLa Zytosol, HepG2 Zytosol (eine Leberzelllinie) oder Schweinehirnzytosol inkubiert. Danach

wurde die GSH-Sepharose unter milden Bedingungen gewaschen und anschließend für 2h mit TEV-Protease inkubiert, um TIP47 mit möglichen Bindungspartnern spezifisch zu eluieren. Das Eluat sollte nur TIP47 und potenzielle Bindungspartner enthalten, während alle unspezifisch gebundenen Proteine an der Sepharose verbleiben sollten. Die Versuche mit HeLa- bzw. HepG2 Zytosol verliefen negativ, d.h. unter den gewählten Bedingungen konnte kein spezifisches mit TIP47 eluiertes Protein nachgewiesen werden. Das Ergebnis nach Inkubation mit Zytosol vom Schweinehirn findet sich in der Abbildung 3.22. Leider konnten auch in diesem Fall keine Proteine gefunden werden, die als Lipid droplet Proteine bekannt sind. Ob die hier nachgewiesenen Proteine wirklich mit TIP47 interagieren, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Eine alternative Möglichkeit, Bindungspartner zu identifizieren, ist deren gemeinsame Immunpräzipitation mit TIP47 aus Zellen. Daher wurde TIP47 aus HeLa oder HepG2 Zellen immunpräzipitiert, mit PBS gewaschen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western blot wurde versucht, potenzielle Bindungspartner wie z.B. ADRP oder Rab9 mit spezifischen Antikörpern zu detektieren. Auch mit Hilfe dieses methodischen Ansatzes konnten bis jetzt keine Bindungspartner von TIP47 identifiziert werden (Abb. 3.23). An dieser Stelle muss daher festgehalten werden, dass unsere Bemühungen neue Bindungspartner von TIP47 zu finden, bislang erfolglos waren. Abgesehen von einer Bindung an andere Proteine muss auch eine direkte Interaktion mit Membranlipiden in Betracht gezogen werden. Dieser Möglichkeit wurde im nächsten Abschnitt nachgegangen.

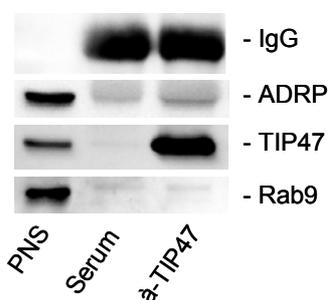


Abb. 3.23: Immunpräzipitation von TIP47 aus HepG Zellen, die über Nacht mit Ölsäure inkubiert wurden. Das Zellpellet wurde in PBS + 0,5% Triton X-100 aufgeschlossen, 15min auf Eis inkubiert und dann 10min bei 16.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde für 1h mit dem jeweiligem Antikörper und Protein A Agarose inkubiert. Anschließend wurde die Agarose abzentrifugiert und sanft gewaschen. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Ein Aliquot (1%) des PNS diente als Kontrolle für die Detektion der Proteine.

3.3.6. TIP47 hat apolipoprotein-ähnliche Eigenschaften

In 2004 konnte die Struktur der C-terminalen Hälfte von TIP47 (AS 191-437 der Maus) aufgeklärt werden. Die Region besteht aus zwei Domänen: Eine Domäne nimmt die Konformation eines 4-helix *bundle* ein, welches als typisches Strukturmerkmal des N-terminalen Anteils des Apolipoprotein ApoE bereits bekannt ist (Abb.3.24).

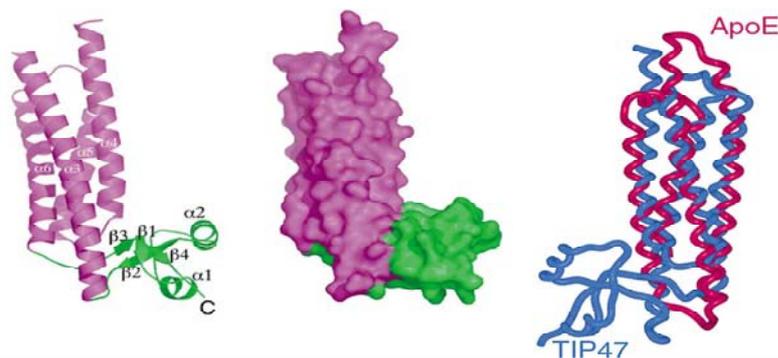


Abb. 3.24: Schematische Darstellung der C-terminalen Hälfte von TIP47 im Vergleich zur N-terminalen Domäne von ApoE. Die neue α/β -Domäne ist in grün dargestellt, das 4-helix *bundle* in pink. (Abbildung stammt aus Hickenbottom *et al.*, 2004)

Die andere, noch nicht bekannte Domäne, wurde von Hickenbottom *et al.* als α/β -Domäne bezeichnet und besteht aus 2 α - Helices und 2 β -Faltblättern, die beide aus je zwei Strängen bestehen. Ein Faltblatt liegt parallel, das andere antiparallel vor. Zwischen den beiden Domänen konnte eine hydrophobe Spalte identifiziert werden (Abb. 3.24).

Die Sequenzanalyse der N-terminalen Hälfte von TIP47 lässt die Ausbildung von amphiphatischen Helices vermuten. Solche amphiphatischen Helices wurden von anderen als *11-mer repeats* bezeichnet (Dunne *et al.*, 1996). Interessanterweise konnten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der Sequenzabschnitt AS 86-198 von TIP47, der diese *11-mer repeats* enthält, für die Rekrutierung von GFP an Lipid droplets hinreichend ist (Bulankina *et al.*, 2009). Andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass die *11-mer repeats* von α -Synuclein (Bussell and Eliezer, 2003) direkt an Lipide binden und nicht über Proteine an Membranen rekrutiert werden (Rhoades *et al.*, 2006). Ob die vorhergesagten *11-mer repeats* von TIP47 auch direkt mit Lipiden interagieren, muss noch geklärt werden. In diesem Zusammenhang ist auch unklar, warum TIP47 nur an die Hemimembran von Lipid droplets bindet und nicht an die Membranen anderer Organellen oder die Plasmamembran. Auch war die Funktion des *4-helix-bundle* in TIP47 bisher unklar.

Das *4-helix-bundle* von ApoE besteht aus 4 amphiphatischen α -Helices, die über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander interagieren (Wilson et al., 1991) und spielt eine wichtige Rolle bei der Reorganisation von Lipoproteinpartikeln. Die α -Helices können nicht nur miteinander interagieren (*closed position*), sondern das *4-helix-bundle* kann sich öffnen und über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Acylketten von Lipiden interagieren (Abb. 3.25B). Um dieses Reorganisieren von Lipiden *in vitro* nachzuweisen wurde der „*disc assay*“ entwickelt (Raussens et al., 1998). Dabei werden Liposomen aus Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) generiert und anschließend mit Apolipoproteinen inkubiert. Die Zugabe von Apolipoproteinen führt zur Fragmentierung der Liposomen in kleine „*discs*“, die so organisiert sind, dass sich die amphiphatischen α -Helices an die hydrophoben Acylketten der Phospholipide anlagern und sie so von der hydrophilen Umgebung abschirmen. Diese Anlagerung ist allerdings nur möglich, wenn die Phospholipide der Liposomen eine laterale Mobilität innerhalb der Membran aufweisen, und so die α -Helices einen Zugang zu den Acylketten bekommen. Um die laterale Mobilität der Phospholipide zu gewährleisten, muss der „*disc assay*“ bei einer Temperatur stattfinden, die über der Temperatur des Phasenübergangs (vom Gel-artigen Zustand zum „flüssig-kristallinen Zustand“) der Phospholipide liegt. Ist die Temperatur niedriger, lagern sich die Phospholipide gelartig aneinander und die polaren Kopfgruppen verhindern den Zugang zu den Acylketten. Bei den hier verwendeten DMPCs liegt die Phasenübergangstemperatur bei 23°C, so dass der *assay* bei 25°C durchgeführt wurde. Die Reorganisation der Liposomen in kleine „*discs*“ kann anschließend im Elektronenmikroskop oder über Gelfiltration nachgewiesen werden.

Aufgrund der Ähnlichkeit des *4-helix-bundle* von TIP47 und ApoE wurde der „*disc assay*“ mit rekombinantem TIP47 durchgeführt und im Elektronenmikroskop analysiert. Die Versuche zeigten, dass auch TIP47 in der Lage ist Liposomen in ~23nm kleine „*discs*“ umzuwandeln (Abb. 3.25A). Zusätzlich wurde nur der C-terminale Teil (As 176-434) von humanem TIP47 aufgereinigt und mit Liposomen inkubiert. Auch die trunkeierte Version von TIP47 war in der Lage Liposomen in „*discs*“ umzuwandeln. Somit ist das *4-helix-bundle* von TIP47 in der Lage Membranlipide zu reorganisieren und liefert damit vielleicht einen ersten Hinweis auf die Funktion von TIP47.

Lipid droplets sind dynamische Organellen, die, je nach Energiezustand der Zelle, entweder Triacylglycerin aufnehmen und speichern, oder Triacylglycerin abbauen und Fettsäuren freisetzen und somit ständig ihre Größe verändern. TIP47 könnte bei dieser Umorganisation von Lipiden eine Rolle spielen, indem es über die vorhergesagten *11-mer repeats* an Lipid droplets bindet und mit seinem *4-helix-bundle* die hydrophoben Bereiche der Lipide von der hydrophilen Umgebung abschirmt und damit stabilisierend auf die Lipid droplets wirkt.

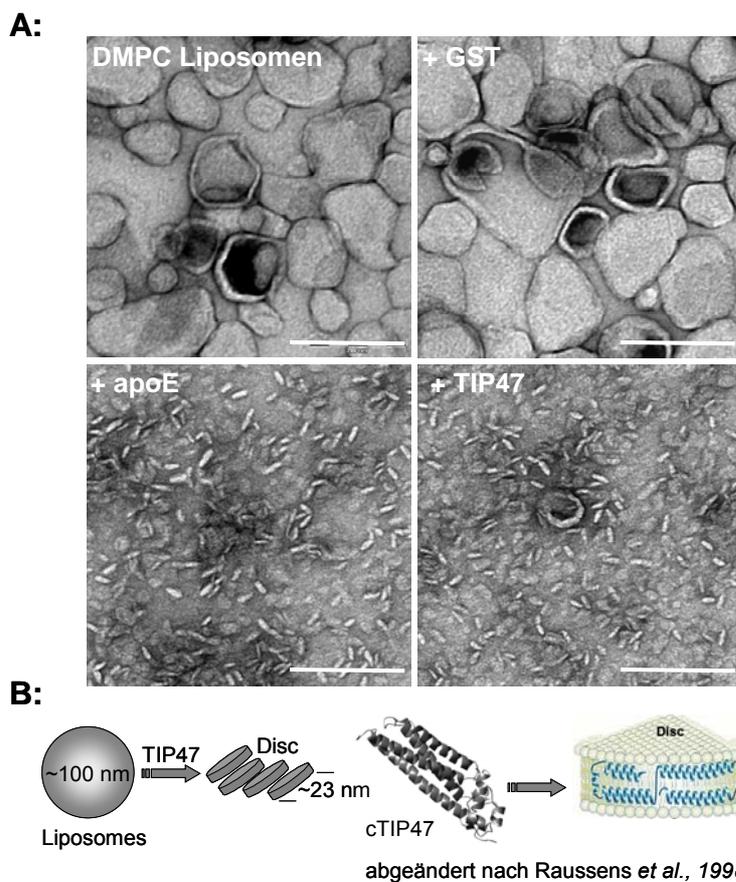


Abb. 3.25: TIP47 hat apolipoprotein-ähnliche Eigenschaften. A: Elektronenmikroskopische Analyse eines Disc assays. DMPC Liposomen wurden für 12h bei 25°C mit Puffer, GST, TIP47 oder ApoE inkubiert. Jeweils ein Aliquot wurde auf ein Kohle bedampftes Kupfergrid getropft, mit 0,1% Glutaraldehyd fixiert und mit 1% Uranylacetate negativ gefärbt. TIP47 und ApoE rearrangieren die 100nm Liposomen in ca. 23 nm große discs. Maßstab: 200nm. **B: Schematische Darstellung der Fragmentierung von Liposomen ($\varnothing \sim 100$ nm) in kleine Lipid discs ($\varnothing \sim 23$ nm).**

Geht man davon aus, dass die Lipid droplet Biogenese durch Speicherung von Neutrallipid zwischen den Membranblättern am ER stattfindet, so könnte die Akkumulation von Triacylglycerin zu Störungen in der Phospholipidschicht führen. Dies könnte ein Signal für TIP47 sein, an diese Region mit den *11-mer repeats* zu binden. In unbekannter Weise würde das *4-helix-bundle* seine Konformation so verändern, dass die einzelnen Helices Regionen der Acylketten abschirmen. Dadurch wirkt TIP47 stabilisierend auf die Reifung von Lipid droplets und gewährleistet letztendlich auch einen geregelten Einbau von Triacylglycerin in Lipid droplets. Dies würde auch den Phänotyp der gestörten Lipid droplet Biogenese und

den verringerten Einbau von Triacylglycerin in Lipid droplets in TIP47 supprimierten Zellen erklären.

Analog zur Bildung von Lipoproteinpartikeln könnte TIP47 als intrazelluläres Apolipoprotein funktionieren, dass die geordnete Bildung intrazellulärer Lipid droplets im Zytosol vermittelt. Ob diese Arbeitshypothese zutrifft, werden die kommenden Forschungsanstrengungen zeigen müssen.

4. Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die kontrovers diskutierte Funktion von TIP47. Ist TIP47 ein bifunktionales Protein, das den retrograden Transport der MPRs vermittelt und/oder ein Lipid droplet bindendes Protein mit noch unbekannter Funktion? Meine Ergebnisse zeigen, dass sowohl endogenes TIP47 als auch GFP-TIP47 an Lipid droplets binden und, dass TIP47 eine Rolle in der Biogenese von Lipid droplets spielt. Eine Funktion von TIP47 als Sortierungsfaktor für MPRs ließ sich nicht bestätigen, womit die Hypothese, TIP47 als bifunktionales Protein zu sehen, hinfällig wurde.

4.1. TIP47, ein Sortierungsfaktor der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren?

4.1.1. Problematik der Diskussion über die Funktion von TIP47

TIP47 wurde 1998 nicht nur als ein Sortierungsfaktor für MPRs beschrieben (Diaz and Pfeffer, 1998), sondern auch als pp17b mit hoher Sequenzhomologie zu ADRP (Than et al., 1998). In der Folge konnte die Arbeitsgruppe von Dawn Brasaemle zeigen, dass die Aminosäuresequenz von TIP47 nicht nur zu 42% identisch und zu 67% ähnlich zu ADRP ist, sondern auch, dass TIP47 an Lipid droplets bindet (Wolins et al., 2001). Für Ihre Analyse verwendeten sie den von der Arbeitsgruppe Pfeffer generierten TIP47 Antikörper und konnten in Immunpräzipitationen und Western blots zeigen, dass der Antikörper nur TIP47 nicht aber ADRP erkennt. Genau diese Spezifität wurde in einer Antwortpublikation von der Arbeitsgruppe Pfeffer bestritten (Barbero et al., 2001), die in mittlerweile 13 publizierten Arbeiten darlegt, dass TIP47 ein Sortierungsfaktor von MPRs und ein Schlüsseffektor von Rab9 ist. In der direkten Konfrontation von 2001 versuchte die Arbeitsgruppe Pfeffer nachzuweisen, dass ihr eigenes Serum gegen TIP47 angeblich mit ADRP kreuzreagiert. Demzufolge hätten die Autoren von Wolins *et al.* 2001 nicht TIP47, sondern ADRP analysiert und damit auch dessen Lokalisation an Lipid droplets, nicht aber die von TIP47. In diesem Zusammenhang präsentiert die Arbeitsgruppe Pfeffer in Abb. 2 ihrer Publikation einen Western blot mit ihrem TIP47 Serum und zeigen die Kreuzreaktion mit ADRP (Barbero et al., 2001). Als Material nutzten die Autoren Extrakte von HeLa

Zellen, die ohne/mit Ölsäure inkubiert wurden. In beiden Fällen ist eine deutliche Kreuzreaktion mit ADRP sichtbar. Dieser Nachweis ist höchst verwunderlich, da mehrere Arbeitsgruppen, wie auch unsere ADRP Nachweise in Hela Zellen zeigen konnten, dass ADRP in Zellen ohne Vorinkubation mit Ölsäure kaum oder gar nicht nachweisbar ist.

Unabhängig davon konnten wir außerdem zeigen, dass das TIP47 Serum der Arbeitsgruppe Pfeffer, welches uns freundlicherweise überlassen wurde, keine Proteinbande bei 52kDa erkennt (Bulankina et al., 2009). Des Weiteren haben wir nachgewiesen, dass weder das kommerziell erhältliche Meerschweinchenserum gegen TIP47 (Progen, Heidelberg) noch das Kaninchenserum einer ungarischen Arbeitsgruppe (G. Than) eine Kreuzreaktion mit ADRP zeigt.

Wenn die Arbeitsgruppe Pfeffer davon ausgeht, dass ihr TIP47 Antikörper mit ADRP kreuzreagiert, so ist es verwunderlich, dass sie ihn trotzdem weiterhin verwenden. In einer späteren Publikation wurde der Antikörper für eine Immunfluoreszenz verwendet, um die Effektivität ihrer RNAi gegenüber TIP47 zu zeigen. In den Hela Kontrollzellen sieht man eine zytosolische Färbung von TIP47, wohingegen in den TIP47 supprimierten Zellen keine zytosolische Färbung mehr auszumachen ist, dafür aber kleinere „Punkte“ (Abb. 7B in Ganley et al. 2004). Hier verweist die Arbeitsgruppe Pfeffer darauf, dass der Antikörper zusätzlich mit „Lipid droplets“ kreuzreagiert und man in der Abbildung nun Lipid droplets sieht, nicht aber TIP47 (Ganley et al., 2004).

Es erstaunt ebenfalls, wenn die Arbeitsgruppe Pfeffer veröffentlicht, dass sie nicht in der Lage sind funktionelles, GFP-TIP47 zu generieren (Barbero et al., 2002). Andere Arbeitsgruppen (Miura et al., 2002), wie auch meine Arbeitsgruppe, konnten GFP-TIP47 erfolgreich exprimieren. Das Protein ist im Western blot mit einem anti-TIP47 oder anti-GFP Antikörper nachweisbar, es kann in der Immunfluoreszenz an Lipid droplets nachgewiesen werden und eignet sich hervorragend für Lebendzellanalysen.

Die Ausschließlichkeit, mit der die Arbeitsgruppe Pfeffer die Lokalisation von TIP47 an Lipid droplets bestreitet, erscheint daher unglaubwürdig.

4.1.2. Bindet TIP47 an die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte der MPRs?

Die Bindung von TIP47 an die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte der MPRs war ursprünglich das Ergebnis einer *yeast-two-hybrid* Analyse (Diaz and Pfeffer, 1998). Erstaunlicherweise verwenden die Autoren der in *Cell* publizierten Arbeit als negative Kontrolle für diese Analyse dominant-negatives Rab9 (S21N). Das bedeutet, dass die Autoren im *yeast-two-hybrid* System keine Bindung zwischen Rab9 und TIP47 nachweisen können, während sie später zeigen, dass in *pull down* Experimenten Rab9-GDP mit einer Affinität von 150nM an TIP47 bindet. Da erscheint es wenig einleuchtend, dass eine Bindung im *yeast-two-hybrid* System an beide MPRs nachweisbar war, wenn die später in *pull down* Experimenten ermittelte Affinität der Bindung von MPR46 bzw. MPR300 an TIP47 bei 3µM bzw. 1µM liegt (Krise et al., 2000), also 6-20mal schwächer sein soll, als die zwischen Rab9-GDP und TIP47.

Um diese schwache Bindungsaffinität von TIP47 an die MPRs genauer zu bestimmen, verwendeten wir die Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR). Mit dieser Methode können selbst sehr schwache Molekülinteraktionen im µM bis mM Bereich in Echtzeit gemessen werden, aber eine Bindung zwischen TIP47 und den MPRs war dennoch nicht nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war die Bindung der bekannten Bindungspartner GGA1 und AP2 sehr wohl nachweisbar (Abb. 3.5). Da das aufgereinigte TIP47 in anderen Versuchen funktionell ist, gehen wir davon aus, dass es auch für die *in vitro* Bindung an die MPRs funktionell sein müsste. Es bleibt denkbar, dass der Verlust von Sekundärstrukturen in den zytoplasmatischen Sequenzabschnitten der MPRs in unseren Experimenten die Bindung von TIP47 verhindert. Dies erscheint aber wenig wahrscheinlich, da die bislang benannten Strukturdaten der Bindung von Sortierungssignalen an Sortierungsfaktoren zeigen, dass die Signale als nicht strukturierte und lineare Sequenzen gebunden werden (Kelly et al., 2008; Shiba et al., 2002).

Der wesentliche Unterschied zu den *in vitro* Bindungsstudien der Arbeitsgruppe Pfeffer und der hier vorgestellten ist die Methodik. Sie verwendeten *pull down* Experimente, wir die direkte Analyse in Echtzeit mittels SPR-Biosensor. Diese Unterschiede können die gegensätzlichen Ergebnisse keinesfalls erklären, denn eine robuste Protein-Protein Wechselwirkung sollte auch *in vitro* mit unterschiedlichen Methoden nachzuweisen sein.

4.1.3. Welche Funktion besitzt die potenzielle *in vitro* Bindung von TIP47 an die zytoplasmatischen Sequenzabschnitte der MPRs?

Neben der direkten Analyse von Proteinbindung *in vitro*, hat die Arbeitsgruppe Pfeffer einen *in vitro* assay etabliert, in dem der effiziente Rücktransport von MPRs zum TGN messbar ist (Goda and Pfeffer, 1988). In diesem assay inhibiert die Anwesenheit von Antikörpern gegen TIP47 oder dessen Immundepletion den Transport zu 75% bzw. 100%. Derselbe assay wurde von der Arbeitsgruppe Schu in Göttingen benutzt, um den retrograden MPR Transport in Abwesenheit von AP1 zu analysieren. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Verwendung von TIP47 supprimiertem HeLa Zytosol (bereitgestellt von A. Bulankina aus unserer Arbeitsgruppe) keinen negativen Effekt auf den retrograden Transport besitzt (Medigeshi and Schu, 2003).

4.1.3.1. Lokalisation von TIP47 in Zellen

In der Abb. 4.1 auf der folgenden Seite ist die erste publizierte Immunfluoreszenz von TIP47 und die Kofärbung vom MPR300 bzw. vom Golgi-Protein p115 in zwei Zelllinien dargestellt (Diaz and Pfeffer, 1998). Die Autoren schreiben, dass TIP47 mit MPR300 in beiden Zellen kolokalisiert, nicht aber mit dem Golgi-Marker. Die MPR300 Färbung, verglichen mit anderen publizierten Aufnahmen (Perez-Victoria et al., 2008), erscheint hier ungewöhnlich diffus. Weiter fällt auf, dass die Färbung von TIP47 zwischen den verwendeten EBTr und COS7 Zellen unterschiedlich erscheint, ja nicht einmal die drei gezeigten Aufnahmen in EBTr Zellen sind einheitlich.

In meinen eigenen Färbungen konnte ich eine perinukleäre Färbung von TIP47 in COS7 Zellen nachweisen, allerdings keine Kolokalisierung mit MPR300, wohl aber mit dem Lipid droplet Protein ADRP. Dieses Färbemuster (keine Kolokalisation zwischen TIP47 und MPRs) war in allen getesteten Zelllinien verschiedener Spezies und mit allen zur Verfügung stehenden Antikörpern gegen TIP47 immer gleich. Es erscheint uns daher wenig plausibel, dass endogene MPRs mit endogenem TIP47 kolokalisieren.

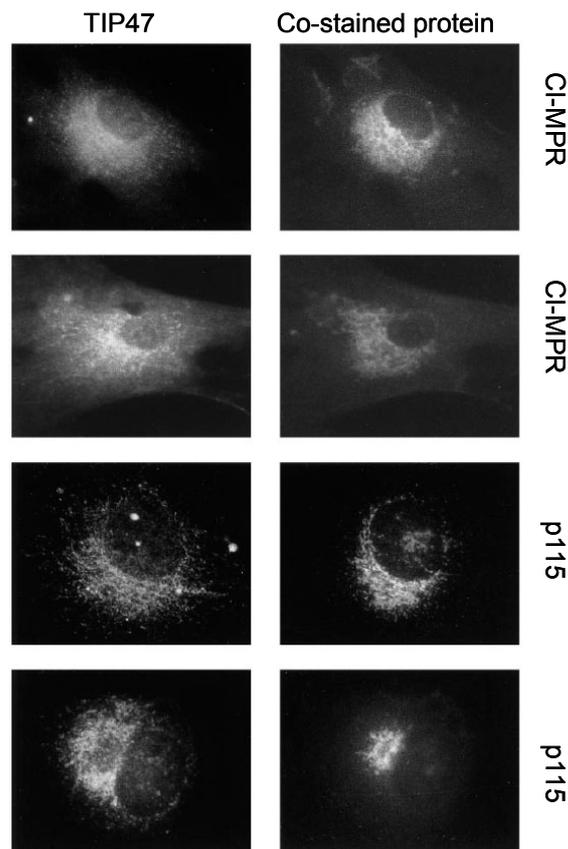


Abb. 4.1: Immunfluoreszenzaufnahmen zur Lokalisierung von TIP47 aus (Diaz and Pfeffer, 1998). Immunfluorescence analysis of EBTr (upper three panels) or COS (bottom panel) cells costained with rabbit anti-TIP47 antibodies (left panels, 1:2000) and either mouse anti-CI-MPR300 antibodies (right, upper two panels; Dintzis et al., 1994) or anti-p115 antibodies (right, bottom two panels; 1:1000).

Eine weitere Möglichkeit, die Lokalisierung von Proteinen in Zellen zu analysieren, ist deren Expression als GFP-Fusionsprotein.

Aber auch GFP-TIP47 lokalisierte weder an MPR-positiven Membranen, noch an anderen Membranen des Bio- und Endozytoseweges. GFP-TIP47 lokalisierte entweder zytosolisch oder an Lipid droplets, womit unsere Ergebnisse im Einklang mit Daten anderer Arbeitsgruppen stehen (Miura et al., 2002). Es bleibt daher unverständlich, warum die Arbeitsgruppe Pfeffer die Funktionalität von GFP-TIP47 anzweifelt und ausschließt, dass endogenes TIP47 an Lipid droplets bindet (Barbero et al., 2002; Barbero et al., 2001).

4.1.3.2. TIP47 als möglicher Sortierungsfaktor in Zellen

Die Analyse von Zellen, in denen ein Protein durch RNAi ausgeschaltet wird, ist heute eine der wichtigsten Möglichkeiten der Funktionsanalyse.

Eine Supprimierung von TIP47 um 60% mit Oligonukleotiden verringerte die Halbwertszeit vom MPR300 von 35h auf 14h (Diaz and Pfeffer, 1998). Die Autoren erklären die verkürzte Halbwertszeit mit einem schnelleren Abbau der MPRs in den

Lysosomen, da der retrograde MPR Transport gestört ist und werten dies als wichtigen Hinweis, dass TIP47 „*in vivo*“ eine Funktion im retrograden Transport der MPRs spielt. In meinen Experimenten gelang mit Hilfe von RNAi eine Suppression von TIP47 $\geq 80\%$. In diesen Zellen wurde der *turnover* vom MPR300 mit zwei Methoden analysiert. Zum einen wurde die Proteinbiosynthese mit Cycloheximid inhibiert, um so einen erhöhten Abbau im Western blot sichtbar zu machen. Zum anderen wurde der Abbau in *pulse/chase* Experimenten mit anschließender Immunpräzipitation vom MPR300 bestimmt. Mit beiden Methoden war kein erhöhter Abbau des MPR300 zu detektieren. Ein Grund für diesen Unterschied könnte sein, dass die Arbeitsgruppe Pfeffer die Halbwertszeit in COS7 Zellen und wir in HeLa Zellen bestimmt haben. Allerdings sollte die Funktion von TIP47 nicht zelltypspezifisch sein.

Somit können eigentlich die drei wichtigsten Versuche, mit denen die Arbeitsgruppe Pfeffer die Funktion von TIP47 belegt, von uns und anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden:

1. TIP47 war in dem *in vitro* Transport assay für den retrograden Transport des MPR46 nicht notwendig (Medigeshi and Schu, 2003).
2. Die Kolokalisierung zwischen TIP47 und dem MPR300 konnte in COS7 Zellen, und allen anderen getesteten Zellen, nicht bestätigt werden (Bulankina et al., 2009)
3. Die Supprimierung von TIP47 hatte keine Reduktion der Halbwertszeit des MPR300 zur Folge (Bulankina et al., 2009)

Von daher wollten wir die Funktion von TIP47 im retrograden Transport zusätzlich mit anderen Methoden untersuchen. Im *in vitro* assay der Arbeitsgruppe Pfeffer führte eine Immundepletion von TIP47 zu einer 100% Inhibition des retrograden Transportes von MPR46. Dies, und die drastische Reduktion der Halbwertszeit vom MPR300 nach 60% Supprimierung von TIP47, führte mich zu der Annahme, dass ich die Funktion von TIP47 auch in Zellen nachweisen könnte. Daher untersuchte ich die Lokalisierung und Funktion der MPRs in TIP47 supprimierten und entsprechenden Kontrollzellen. In den Kontrollzellen wurden die Untereinheiten Vps35 und Vps26 des Retromerkomplexes supprimiert. Die Wahl fiel auf Retromer, da zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zeigen konnten, dass der Retromerkomplex eine wichtige

Bedeutung im retrograden Transport der MPRs besitzt. Dies konnte ich bestätigen, denn schon die einfache Lokalisierung von MPR46 und MPR300 war in den Retromer siRNA Zellen in der Weise gestört, dass die perinukleäre Konzentrierung der Rezeptoren weniger ausgeprägt war, als in den Kontrollen. Noch deutlicher war der Phänotyp in Zellen, denen anti-MPR Antikörper zur Internalisierung angeboten wurden. Die Antikörper binden im Normalfall an der Plasmamembran an die MPRs und gelangen innerhalb von einer halben Stunde in die perinukleäre Region und somit in enge Nachbarschaft zum TGN-Markerprotein TGN46. Genau dies war in den Retromer KD Zellen nicht der Fall. Stattdessen verbleiben die Antikörper in großer Zahl in endosomalen Strukturen, die im gesamten Zytoplasma verteilt waren, da ein effizienter Rücktransport zum TGN gestört ist. Genau denselben Phänotyp hätten wir aufgrund der publizierten Daten der Arbeitsgruppe Pfeffer auch für TIP47 KD Zellen erwartet. Stattdessen war in den Lokalisierungs- und anti-MPR Endozytoseexperimenten kein Unterschied zu mock transfizierten Zellen festzustellen. Eine Bedeutung von TIP47 für die Sortierung bzw. den Transport von MPRs in Zellen erschien daher fraglich.

Des Weiteren haben wir die Funktion der MPRs untersucht. Die Funktion der MPRs ist der Transfer lysosomaler Hydrolasen vom TGN zu Endosomen. Unterbleibt dieser, so sekretieren die betroffenen Zellen große Mengen lysosomaler Enzyme in die Extrazellulärflüssigkeit. Wenn also - wie von der Arbeitsgruppe Pfeffer publiziert - der Verlust von TIP47 den Transport von MPRs zwischen Endosomen und TGN zu 100% blockiert, bzw. in Zellen zu einem dramatisch erhöhten Abbau der Rezeptoren führt, so sollte dies zu einem signifikanten Anstieg der Sekretion lysosomaler Enzyme führen. Aber auch in der direkten Analyse der Sekretion von Cathepsin D und β -Hexosaminidase waren die TIP47 KD Zellen völlig unauffällig, während in Retromer supprimierten Zellen eine stark erhöhte Sekretion der beiden Hydrolasen offensichtlich war (Abb. 3.7 S. 88).

Es kann also an dieser Stelle festgehalten werden, dass weder die Lokalisierung noch die Funktion von MPRs in TIP47 KD Zellen gestört war, so dass wir schlussfolgern, dass TIP47 kein nennenswerter Sortierungsfaktor für MPRs ist.

Natürlich spielt die Effektivität des RNAi bei solchen Experimenten immer eine Rolle. Für unsere Argumentation spricht aber, dass die Arbeitsgruppe Pfeffer angeblich schon bei einer Supprimierung von 60% einen Effekt sieht, wir aber bei einer

Supprimierung von 80% keinen Effekt auf die Verteilung und Funktion der MPRs feststellen können, wohl aber auf die Bildung von Lipid droplets. Um diese Kontroverse letztendlich zu klären, bleibt nur noch die Analyse einer TIP47 *knock out* Maus. Diese wird zur Zeit in der Arbeitsgruppe von Dean Londos (NIH, USA) generiert und wir werden in Kooperation die Lokalisierung und Funktion der MPRs in Zellen dieser Maus analysieren.

4.2. TIP47: Ein Schlüsseffektor für die GTPase Rab9?

In den letzten Publikationen hat die Arbeitsgruppe Pfeffer TIP47 als Effektor bzw. Schlüsseffektor von Rab9 beschrieben. Grundlage dieser Hypothese sind unter anderem *pull down* Experimente, in denen TIP47 eine leicht erhöhte Präferenz für Rab9-GTP (K_D 96nM) gegenüber Rab9-GDP (K_D 150nM) zeigte (Carroll et al., 2001; Ganley et al., 2004). Ähnliche Experimente wurden von M. Rudolph (Universität Göttingen) durchgeführt, da er sich zum Ziel gesetzt hatte, die GTPase mit Bindungspartnern zu kristallisieren. Zwar konnte M. Rudolph die Struktur von Rab9 mittlerweile aufklären (Wittmann and Rudolph, 2004a; Wittmann and Rudolph, 2004b), der Nachweis einer direkten *in vitro* Interaktion zwischen TIP47 und Rab9 war aber nicht möglich.

Auch Francis Barr (Universität Liverpool), der humane Rab Proteine im Hinblick auf entsprechende GEF (*guanine exchange factor*) und GAP (GTPase activation protein) Bindungspartner untersucht, konnte in einem *yeast-two-hybrid* System mit den dominant-aktiven bzw. den dominant-negativen Formen von 32 humanen Rabs, inklusive Rab9, keine Bindung an TIP47 nachweisen. Auf Anfrage konstatierte S. Pfeffer allerdings, dass auch sie TIP47 nicht in einem *yeast-two-hybrid* System als Bindungspartner von Rab9 finden konnten. Wie oben erwähnt verwendete sie sogar die dominant-negative Form von Rab9 als negative Kontrolle für die Bindung von TIP47 an die MPRs im ursprünglichen *yeast-two-hybrid screen* (Diaz and Pfeffer, 1998).

Ein wichtiger Befund der Arbeitsgruppe Pfeffer war, dass Rab9 die Bindung von TIP47 an MPR300 *in vitro* verstärkt (von K_D 1 μ M auf 0,3 μ M) (Carroll et al., 2001). In ihrem Modell geht die Arbeitsgruppe Pfeffer davon aus, dass TIP47 im Zytosol in einer Konzentration von 300nM vorliegt, so dass bei einer K_D von 300nM bis zu 50%

membrangebunden vorliegt. Und dies - so die Autoren - würden sie auch in etwa detektieren (Carroll et al., 2001). Diese Angaben stehen allerdings im Widerspruch zu einer älteren Arbeit der Autoren, in der sie zeigen, dass TIP47 zu 80% zytosolisch vorliegt (Diaz and Pfeffer, 1998). In den zahlreichen Membran/Zytosol Fraktionierungen von HeLa Zellen haben wir reproduzierbar immer ein Zytosol:Membran-Verhältnis von 90:10 +/-6% gefunden. Dieses Ergebnis deckt sich im übrigen hervorragend mit den Immunfluoreszenzen, die zeigen, dass unter *steady state* Bedingungen TIP47 in HeLa Zellen kaum nachweisbar ist.

Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe Pfeffer in einem *in vitro* assay zeigen, dass Rab9 TIP47 an angereicherten Membranen stabilisiert (Carroll et al., 2001). Wenn Rab9 TIP47 an Membranen stabilisiert, so müsste man in Rab9 KD Zellen einen Verlust von TIP47 in der Membranfraktion detektieren. Dies konnten wir nicht bestätigen (Abb.3.11). Der Verlust von Rab9 hatte keinen Einfluss auf das Zytosol:Membran-Verhältnis von TIP47 in HeLa Zellen.

Nach Angaben der Arbeitsgruppe Pfeffer soll nicht nur Rab9 TIP47 an Membranen rekrutieren, sondern TIP47 stabilisiert seinerseits auch Rab9 an Membranen. Die Supprimierung von TIP47 durch RNAi verändert das Zytosol:Membran-Verhältnis von Rab9 zugunsten des zytosolischen Pools, der von 10% auf 20% im Western blot ansteigt (Ganley et al., 2004). Zusätzlich soll es in den TIP47 KD Zellen zu einer Verschiebung des Zytosol:Membran Verhältnisses von TIP47 zugunsten der Membranfraktion kommen (Aivazian et al., 2006). Wir hingegen kommen zu einem gegenteiligen Ergebnis! Nach Suppression von TIP47 war das Protein in der Membranfraktion nicht mehr detektierbar. Auch eine Zunahme des zytosolischen Rab9 war in den TIP47 *knock-down* Zellen nicht nachweisbar.

Die Arbeitsgruppe Pfeffer verwendete Mutationsstudien, um zu zeigen, dass die Aminosäuren 152-187 von TIP47 für eine Rab9 Bindung notwendig sind. Die Mutation von Ser¹⁶⁷ValVal in Ala¹⁶⁷AlaAla inhibierte die Bindung von TIP47 an Rab9 *in vitro* um 80% (Hanna et al., 2002). Zusätzlich inhibierte die Mutante den Transport von MPR46 in einem *in vitro* assay (Carroll et al., 2001). Dies ist erstaunlich, da gerade dieser Bereich in humanem ADRP (SVEKTKS¹⁵⁴VV) konserviert ist. Dies hat auch die Arbeitsgruppe Pfeffer erkannt und daher die Bindung von ADRP an Rab9 überprüft. Da keine Bindung von ADRP detektierbar war, argumentieren die Autoren, dass es in der TIP47 Mutante zu einer minimalen Konformationsänderung kommt,

die die Bindung inhibiert. An dieser Stelle fragt man sich, wie Maus TIP47 an Rab9 binden soll, da hier die entsprechende Sequenz kaum konserviert ist (SVDKTKS¹⁶⁷AM).

TIP47 soll ein Schlüsseffektor von Rab9 sein, da TIP47 Rab9 sowohl in der GTP- als auch in der GDP-Form bindet und zusätzlich für die Lokalisierung von Rab9 an späten Endosomen zuständig ist. Die neueste Variante des Modells der Arbeitsgruppe Pfeffer besagt, dass TIP47 zusammen mit Rab9 und MPRs in Vesikeln von späten Endosomen zum TGN transportiert wird. Erst dort kommt es zu einer Freisetzung von TIP47 aus diesem Komplex (Espinosa et al., 2009).

So können die Autoren angeblich Membranen über Saccharosegradienten aufreinigen, an denen TIP47 und Bindungspartner präsent sind; sie messen eine Affinität gegenüber Rab9 von 96nM, zeigen aber keine Kolo-kalisation der beiden Proteine in der Immunfluoreszenz. Dies, erstaunlicherweise, obwohl sie doch auch zeigen, dass TIP47 und MPR300 kolo-kalisieren sollen (Diaz and Pfeffer, 1998).

Aus diesem Grunde haben wir endogenes Rab9 angefärbt und auf eine Kolo-kalisation mit TIP47 hin überprüft. In diesen Analysen kolo-kalisiert endogenes Rab9 in HeLa Zellen mit GFP-Lamp1, mit GFP-Rab7 und zu einem geringen Teil mit endogenem MPR300, - aber nie mit TIP47! Andere Rab Effektoren wie z.B. Rapaptin für Rab5, zeigen wie TIP47 hauptsächlich eine zytosolische Verteilung, können aber durch eine erhöhte Expression an den jeweiligen Membranen in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden (Stenmark et al., 1995). Daher haben auch wir TIP47 und Rab9 als RFP- bzw. GFP-Fusionsproteine überexprimiert und deren Lokalisierung analysiert. Auch als RFP-TIP47 ist TIP47 selbst bei einer Koexpression von GFP-Rab9 zytosolisch lokalisiert, nicht aber an GFP-Rab9 positiven Membranen nachweisbar. Dies änderte sich nach Inkubation der Zellen mit Ölsäure. Dann lokalisiert TIP47 an Lipid droplets. In wenigen Zellen, die GFP-Rab9 überexprimieren, war eine schwache Färbung von GFP-Rab9 an Lipid droplets detektierbar. Wir vermuten, dass dies nicht physiologisch relevant ist, da man bisher mit keiner anderen komplementären Methode Rab9 an Lipid droplets detektiert hat. Es erscheint wahrscheinlich, dass GFP-Rab9 aufgrund der Überexpression mit seinen Prenylierungsankern unspezifisch an Lipid droplets bindet.

Die Arbeitsgruppe Pfeffer verwendet in ihrem *in vitro* assay Rab9, dessen C-Terminales Ende die artifizielle Sequenz CLLL aufweist (CC wäre die physiologisch relevante Form) (Carroll et al., 2001). Dieses mutierte Rab9 wird nur

monogeranyliert, unterstützt aber laut Arbeitsgruppe Pfeffer den *in vitro* Transport vom MPR300. Wenn wir dieses mutierte Rab9 in HeLa Zellen transfizieren, zeigt es im Gegensatz zum physiologisch relevanten Rab9 kaum Membranassoziation, sondern liegt weitgehend zytosolisch vor (Daten nicht gezeigt). Rab5 und Rab27 besitzen ebenfalls zwei Cysteine, die beide geranyliert werden. Mutiert man davon ein Cystein zu Serin, so lokalisieren diese Mutanten nicht mehr spezifisch an ihrem Zielkompartiment, sondern werden in die ER-Membran inseriert (Gomes et al., 2003). Aufgrund dieser und unserer Daten gehen wir davon aus, dass beide Cysteine für eine spezifische Lokalisierung von Rab9 an späte Endosomen notwendig sind. Wenn dies der Fall ist, so ist die Aussage der Arbeitsgruppe Pfeffer, dass Rab9 CLLL den *in vitro* Transport der MPR300 unterstützt, höchst zweifelhaft, da es gar nicht an späten Endosomen lokalisiert und so seine Funktion nicht erfüllen kann.

Zum Konzept von TIP47 als Schlüsseffektor von Rab9 bleibt an dieser Stelle zu resümieren, dass weder die *in vitro* Bindung von TIP47 an Rab9 in *pull down* Experimenten, noch die Interaktion beider in einem *yeast-two-hybrid* System nachweisbar war.

Die publizierten Daten zur TIP47 Sequenz, die für die Bindung von Rab9 essentiell ist, erscheint zweifelhaft, wenn die Sequenz nicht einmal zwischen Mensch und Maus konserviert ist.

In Zellen war eine Kolo-kalisierung zwischen endogenem TIP47 und Rab9 nicht nachweisbar, auch dann nicht, wenn beide Proteine als GFP-Variante überexprimiert wurden.

Des Weiteren hatte die Supprimierung von TIP47 oder Rab9 keinen Effekt auf das Zytosol:Membran-Verhältnis des jeweils anderen Proteins.

In der Summe dieser Ergebnisse bezweifeln wir, dass TIP47 ein physiologisch relevanter Bindungspartner bzw. Schlüsseffektor von Rab9 ist.

4.3. Die Funktion von TIP47 in der Lipid droplet Biogenese

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie ist TIP47 ein Mitglied der PAT-Familie, die in Säugetieren derzeit aus fünf Mitgliedern besteht. Ihre Funktion ist weitestgehend unklar, nur die Bedeutung von Perilipin im Rahmen der Lipolyse ist gut untersucht.

Die funktionelle Charakterisierung der PAT-Proteine wird dadurch erschwert, dass immer mehrere Mitglieder in einer Zelle exprimiert werden und diese wahrscheinlich überlappende Funktionen aufweisen. Da, soweit bekannt, in Hela Zellen nur zwei, TIP47 und ADRP, exprimiert werden, haben wir uns für diese Zelllinie entschieden, um die Funktion von TIP47 näher zu untersuchen. Bisher konnte für TIP47 gezeigt werden, dass endogenes als auch GFP-TIP47 an Lipid droplets lokalisiert (Miura et al., 2002) und TIP47 in der „ADRP *knock out*“ Maus weitestgehend die unbekannt Funktionen von ADRP übernimmt (Sztalryd et al., 2006). In differenzierenden Adipozyten ist TIP47 an Lipid droplets nachweisbar, wird aber später von ADRP verdrängt (Wolins et al., 2005). Dass TIP47 ubiquitär exprimiert wird und an naszenten Lipid droplets vorkommt, veranlasste uns zu der Hypothese, dass TIP47 eine Rolle bei der Lipid droplet Biosynthese spielen könnte.

4.3.1. Die Lokalisierung von TIP47 an Lipid droplets

Nach Stimulierung der Neutrallipidsynthese durch Inkubation mit Ölsäure, ergab die zeitabhängige Analyse, dass zytosolisches TIP47 in bestimmten Regionen akkumuliert. Diese zuerst punktförmige Ansammlung von TIP47 war nach 15min deutlich sichtbar, wohingegen eine deutliche Ansammlung von Neutrallipid erst nach 45min detektiert werden konnte. (Hier ist anzumerken, dass die Nachweisgrenze von Neutrallipid über fluoreszierendes Bodipy493/503 unbekannt ist, bzw. Molecular Probes nach Anfrage keine genauen Daten liefern konnte.) Nach mehrstündiger Inkubation mit Ölsäure war die TIP47 Färbung nicht mehr punktförmig, sondern zeigte klare Ringstrukturen, die das angefärbte Neutrallipid umgaben und somit als Lipid droplets identifiziert werden konnten. Dieses Experiment zeigt, dass TIP47 an Orte in der Zelle rekrutiert wird, wo sich neue Lipid droplets bilden oder gebildet haben. Die Arbeitsgruppe Thiele konnte ebenfalls zeigen, dass die Lipid droplet Biogenese von punktförmigen Strukturen ausgeht. Hierzu haben sie COS7 Zellen mit einer fluoreszierender Fettsäure (eine Polyen-Fettsäure) inkubiert und deren Transport in lebenden Zellen analysiert (Kuerschner et al., 2008). Schon nach 3min waren erste Punkte in den Zellen erkennbar, die über die Zeit größer wurden. Hier stellt sich die Frage, was genau in diesen punktförmigen Strukturen akkumuliert und welcher möglicherweise bekannten intrazellulären Struktur diese Orte zuzuordnen sind? Wir gehen davon aus, dass die TIP47-positiven Punkte mit der punktförmigen

Verteilung der fluoreszierenden Fettsäure übereinstimmt. Um dies überprüfen zu können, hat uns Christoph Thiele freundlicherweise die Polyen-Fettsäure zur Verfügung gestellt. Die eigentlichen Experimente stehen aber noch aus, da die entsprechende *Set up* für die notwendige 2-Photonen Anregung und die Filterkombination für die Emission noch etabliert werden müssen. Wir haben ebenfalls versucht den Ort der TIP47 Akkumulation mittels Immunfluoreszenz näher zu charakterisieren, konnten aber keine Kollokalisierung z.B. mit ER Markern wie BIP oder PDI detektieren (nicht gezeigte Daten). Um hier genaueren Aufschluss zu bekommen, favorisieren wir für die Zukunft eine ultrastrukturelle Analyse, kombiniert mit der Immunogoldmarkierung von TIP47, die wir zur Zeit mit Koert Burger (Universität Utrecht) durchführen.

Als nächstes sollte die Verweildauer von TIP47 an Lipid droplets bestimmt werden. Da TIP47 sowohl zytosolisch als auch an Lipid droplets gebunden vorkommt, könnte man annehmen, dass TIP47 als Transportprotein funktioniert, das andere Proteine oder Lipide aus dem Zytosol zu den sich bildenden Lipid droplets bringt und wieder abdissoziiert. Die Verweildauer von GFP-TIP47 wurde mittels FRAP analysiert und zeigte eine stabile Bindung an Lipid droplets. Dies spricht, im Zusammenhang mit unseren anderen Daten, eher dafür, TIP47 als ein Strukturprotein von Lipid droplets zu betrachten. Ob TIP47 allerdings nach Lipid droplet Bindung dort verbleibt, oder aber ins Zytosol ausgetauscht wird, konnten wir mit den FRAP Experimenten nicht zeigen.

Da TIP47 in Adipozyten an naszierenden Lipid droplets, nicht aber an reifen Lipid droplets detektiert werden kann (Wolins et al., 2005), impliziert dies, dass TIP47 möglicherweise durch ein bestimmtes Signal von Lipid droplets dissoziiert.

Wir haben in HeLa Zellen untersucht, ob TIP47 nur während der Bildung von Lipid droplets an diese bindet, aber abdissoziiert, sobald die Lipid droplets durch Lipolyse verkleinert bzw. abgebaut werden. Hierfür wurden HeLa Zellen zuerst für 16h mit Ölsäure und anschließend in Hungermedium (Medium ohne FCS, aber mit fettfreiem Albumin als Fettsäureakzeptor) inkubiert. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten, dass nach 24-Stunden in Hungermedium weder Neutrallipid noch TIP47-positive Lipid droplets nachweisbar waren. In einem Zeitraum von 24h wurden die Lipid droplets zwar immer kleiner, waren aber über den gesamten Zeitraum TIP47-positiv. Diese Daten sprechen dafür, dass TIP47 zumindest in HeLa Zellen auch während der Lipolyse an Lipid droplets verbleibt. Hepatozytenzelllinien, wie Huh7 oder

HepG2, besitzen im Gegensatz zu HeLa Zellen auch unter Standard-Zellkulturbedingungen (Medium + 10%FCS) Lipid droplets. An diesen findet sich hauptsächlich ADRP, aber kaum TIP47 (nicht gezeigte Daten). Dies ändert sich, wenn die Zellen mit Ölsäure inkubiert werden. Die sich neu bildenden Lipid droplets sind hauptsächlich TIP47-positiv, während ADRP weiterhin die „reifen“ Lipid droplets dekoriert. Einen entsprechenden Wechsel von TIP47-positiven zu ADRP-positiven Lipid droplets konnten wir in HeLa Zellen nicht nachweisen. In diesem Zusammenhang mag die Regulation von Biosynthese und Abbau von ADRP eine Rolle spielen. Da ADRP in Abwesenheit von Lipid droplets proteasomal degradiert wird, daher auch in HeLa Zellen unter Standard-Kulturbedingungen nicht bzw. kaum nachweisbar ist, mag der Wechsel von TIP47 zu ADRP an Lipid droplets von einem genügend großen Pool von ADRP abhängen. Wurden die Lokalisierungsexperimente zu früh durchgeführt, ist die Expression von ADRP noch zu gering, um TIP47 an Lipid droplets zu verdrängen.

4.3.2. Die Funktion von TIP47 an Lipid droplets

Nachdem die Lokalisierung von TIP47 an Lipid droplets für uns eindeutig war, konnten wir zusätzlich zeigen, dass TIP47 schon sehr früh während der Bildung von Lipid droplets an bestimmten Orten in der Zelle akkumuliert und sobald Neutrallipid über Bodipy493/503 detektierbar war, mit diesem kolokalisierte. Dies impliziert, dass TIP47 eine Rolle bei der Bildung von Lipid droplets spielen könnte. Daher haben wir als nächstes die Bildung von Lipid droplets in TIP47 supprimierten Zellen untersucht. Hierfür wurden TIP47 KD- und Kontrollzellen für 16h mit Ölsäure inkubiert und anschließend deren Lipid droplet Morphologie analysiert. In den Immunfluoreszenzen war auffällig, dass nicht supprimiertes TIP47 an Lipid droplets lokalisierte. Dies bestätigte sich bei der Analyse von Saccharosegradienten nach subzellulärer Fraktionierung, da in diesen das verbliebene TIP47 hauptsächlich in der Lipid droplet Fraktion nachweisbar war. Die naheliegende Interpretation ist, dass TIP47 an den Lipid droplets eine Funktion ausübt.

In der Immunfluoreszenz von TIP47 KD Zellen waren drei Phänotypen auffällig: Zellen die nahezu Lipid droplet frei waren (≤ 5 Lipid droplets), solche, deren Lipid droplets deutlich kleiner und auch in der Anzahl reduziert waren, und die dritte Gruppe, die ebenfalls weniger Lipid droplets besaß, die aber in Clustern angeordnet

waren. In solchen Clustern war die Anzahl und Größe der Lipid droplets nicht zu bestimmen. In der Summe dieser Ergebnisse gehen wir davon aus, dass der weitgehende Verlust von TIP47 die normale Biogenese von Lipid droplets beeinträchtigt.

Hatte die Suppression von TIP47 einen Einfluss auf die Bildung bzw. Lokalisierung von Neutrallipid? Die Quantifizierung der Neutrallipidfärbung mittels Fluoreszenzdurchflußzytometrie ergab eine Reduktion von 35%, deutet also auf einen Defekt in der Neutrallipidbildung und/oder –speicherung hin. Da Vorarbeiten von Anna Bulankina zeigen konnten, dass sowohl die Aufnahme, als auch die Abgabe von freien Fettsäuren in TIP47 KD Zellen normal ist, wurde der Triacylglyceringehalt mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Im scheinbaren Widerspruch zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz und der Fluoreszenzdurchflußzytometrie war der Neutrallipidgehalt in postnukleären Überständen von TIP47 KD Zellen nicht signifikant reduziert. Wenn allerdings gereinigte Lipid droplets analysiert wurden, war der Triacylglyceringehalt um 30% reduziert. Wir interpretieren die Resultate so, dass der *knock-down* von TIP47 keinen Einfluss auf die Triacylglycerinbiosynthese hat, wohl aber auf dessen geordnete Speicherung in Lipid droplets.

Wenn aber in TIP47 KD Zellen die Triacylglycerinsynthese normal verläuft, in Lipid droplets aber deutlich weniger akkumuliert, so stellt sich die Frage, wo das restliche Triacylglycerin verbleibt? Man sollte erwarten, dass das restliche Triacylglycerin in einer anderen Fraktion des Saccharosegradienten nachweisbar wird. Erste preliminäre Experimente deuten in der Tat darauf hin.

Unsere Analysen zeigen, dass TIP47 früh an Bereiche der Lipid droplet Biogenese rekrutiert wird und der Verlust von TIP47 zu einer verminderten Speicherung von Triacylglycerin in Lipid droplets führt. Warum kommt es zu dieser Störung? TIP47 könnte andere Proteine an Lipid droplets rekrutieren, die z.B. für die Bildung von Triacylglycerin notwendig sind, oder selbst unterstützend auf die Bildung und Reifung von Lipid droplets einwirken.

4.3.2.1. Rekrutiert TIP47 andere Proteine an Lipid droplets?

Wenn TIP47 andere Proteine an Lipid droplets oder den Ort ihrer Bildung rekrutiert, so müsste sich das Proteinmuster aufgereinigter Lipid droplets aus TIP47 KD Zellen

von den Kontrollzellen unterscheiden. Dies war zumindest nicht offensichtlich. Der einfache Vergleich der Proteinbandenmuster von aufgereinigten Lipid droplets nach SDS-PAGE zeigte keine großen Veränderungen, abgesehen von einer deutlich schwächeren Bande knapp unter 50kDa (Verlust von TIP47).

TIP47 ist also kein „Masterprotein“, dass für die Rekrutierung zahlreicher anderer Proteine an Lipid droplets essentiell ist. Angesichts der deutlichen Unterschiede in der Immunfluoreszenz war es dennoch sehr überraschend, dass das Proteinmuster von Lipid droplets, für deren Reinigung aus TIP47 KD- und Kontrollzellen aliquote Proteinmengen eingesetzt wurden, kaum Änderungen zeigte. In den Immunfluoreszenzen der TIP47 KD-Zellen detektiert man deutlich weniger Lipid droplets als in den Kontrollzellen. Alleine schon deswegen würde man viel weniger Protein in den aufgereinigten Lipid droplets erwarten. Als Erklärung für diesen Widerspruch vermuten wir Artefaktbildung bei der Aufarbeitung von Zellen. Es erscheint uns wahrscheinlich, dass beim Aufschluss von Zellen Lipid droplet-artige Partikel generiert werden. Diese flotieren aufgrund ihrer geringen Dichte mit den „echten Lipid droplets“. Trifft diese Spekulation zu, so könnte dies einerseits bedeuten, dass an der Stelle, an denen die Lipid droplets generiert werden, nahezu alle beteiligten Proteine bereits zusammenkommen. Andererseits wäre die Bindung der Proteine an die Lipid droplet-artigen Strukturen während des Zellaufschlusses und der anschließenden Zentrifugation möglich. Nur so ist einleuchtend zu erklären, warum keine auffälligen Unterschiede im Lipid droplet Proteom von TIP47 RNAi Zellen nachweisbar waren.

Im „Proteom“ von Lipid droplets aus TIP47 KD Zellen waren vier Proteinbanden stärker gefärbt als in den Kontrollzellen. Als Proteine konnten zytosolische Phospholipase A2 IVA, *long chain fatty acid CoA ligase 3*, ADRP und *sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase* nachgewiesen werden. Die Anreicherung von ADRP konnte auch im Western blot eindeutig nachgewiesen werden, die Anreicherung der anderen Proteine muss noch überprüft werden.

In TIP47 KD Zellen ist die Expression von ADRP um 100% erhöht. Leider bleibt derzeit noch unklar warum. Denkbar ist eine verstärkte Biosynthese, aber auch ein verminderter proteasomaler Abbau. *Pulse/Chase* Experimente und *real time* PCR Analysen sollen dies in Zukunft klären. Wird die Expression von ADRP erhöht, so muss es einen *feedback* Mechanismus geben, der entweder die geringe Menge von

TIP47 oder deren Folgeerscheinung misst und daraufhin die Transkription von ADRP erhöht. Dass der TIP47 Gehalt alleine die Expression von ADRP beeinflusst, ist unwahrscheinlich, da unter Standard Zellkulturbedingungen auch in TIP47 KD Zellen kein ADRP detektiert werden kann. Die vermehrte Detektion von ADRP wird erst im Zusammenhang mit einer Ölsäureinkubation messbar.

Daher erscheint es mir wahrscheinlich, dass es der – oder einer der negativen Effekte des TIP47 KD ist, der in einem *feedback* die Expression oder den proteasomalen Abbau von ADRP reguliert. In Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass ADRP über PPAR β/δ hochreguliert wird. Dieser Transkriptionsfaktor kann über gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren aktiviert werden. Daher ist denkbar, dass Ölsäure als einfach ungesättigte Fettsäure PPAR β/δ aktiviert und so die Transkription von ADRP fördert. Allerdings wäre zu fordern, dass in diesen Zellen der Gehalt an freien Fettsäuren ansteigt, was wir aber bisher nicht nachweisen konnten.

Welche Bedeutung aber hat die vermehrte „Expression“ von ADRP in TIP47 KD Zellen. Denkbar ist eine Konkurrenz der beiden Proteine um die Bindung an Lipid droplets, die in TIP47 supprimierten Zellen dazu führt, dass ADRP mehr Bindungsstellen besetzen kann. Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass TIP47 eine höhere Affinität zu Lipid droplets besitzt als ADRP und folglich unter normalen Bedingungen ADRP von der Membran verdrängen müsste. Dies ist aber nicht der Fall. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eher ADRP TIP47 von der Lipid droplet Membran verdrängt (Orlicky et al., 2008).

Alternativ dazu könnte ADRP in Abwesenheit von TIP47 dessen Funktion übernehmen und den Verlust von TIP47 kompensieren. Diese Funktionsübernahme ist aber nicht komplett, da es sonst zu keinem Phänotyp in TIP47 siRNA Zellen kommen dürfte. Dies impliziert ebenfalls, dass TIP47 eine spezifische Funktion ausübt, die es von ADRP abgrenzt. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Überexpression von ADRP zu einer vermehrten Speicherung von Triacylglycerin führt (Imamura et al., 2002; Listenberger et al., 2007). In HEK293 Zellen führt die erhöhte Expression von ADRP zu einer Verdrängung der ATGL Lipase von Lipid droplets was die vermehrte Triacylglycerinspeicherung erklärt. Ob TIP47 ebenfalls die Interaktion von Lipasen an Lipid droplets inhibiert, ist noch nicht beschrieben worden. Wir konnten allerdings zeigen, dass die Abgabe von radioaktiver Ölsäure ins Medium nach Behandlung mit Triacsin C in TIP47 KD Zellen nicht erhöht war (Daten nicht gezeigt). Andererseits könnte die Anreicherung von *long chain fatty acid CoA*

ligase 3 an TIP47 KD Lipid droplets ein Zeichen dafür sein, dass vermehrt Fettsäuren freigesetzt werden, die mit Coenzym A zu Acyl-CoA ligiert werden. Da die Anreicherung von *long chain fatty acid CoA ligase 3* noch nicht bestätigt ist, bleibt diese Annahme vorerst spekulativ.

Soni *et al.* konnten vor kurzem zeigen, dass Brefeldin A, ein Inhibitor von ARF1 GEF, die Rekrutierung von ADRP an Lipid droplets inhibiert, während die Bildung von Lipid droplets und die Bindung von TIP47 an diese nicht beeinträchtigt war. Dies könnte auf unterschiedliche Rekrutierungsmechanismen hinweisen und ist vielleicht ebenfalls ein Grund, warum ADRP den Verlust von TIP47 nicht komplett kompensieren kann.

Für ein besseres Verständnis der Funktion von ADRP und TIP47 werden wir in Zukunft deren RNAi (einzeln und in Kombination) in ausgewählten Zellen analysieren im Hinblick auf Lipid droplet Morphologie, Triacylglyceringehalt und Fettsäuremobilisierung.

4.3.2.2. TIP47, ein intrazelluläres Apolipoprotein?

Wenn TIP47 kein Masterprotein für die Rekrutierung anderer Proteine an Lipid droplets ist, so muss es einen anderen Grund für die Störung der Triacylglycerinspeicherung in TIP47 KD Zellen geben. Beispielsweise könnte TIP47 selbst notwendig für die Bildung von Lipid droplets sein. In diesem Zusammenhang zeigt die Sequenz- bzw. Strukturanalyse von TIP47 zwei potenzielle Lipidbindungsdomänen: Die *11-mer repeats* und das *4-helix-bundle* (siehe Abb. 3.24 S.116). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass der Sequenzabschnitt 86-198 von TIP47, der die vorhergesagten *11-mer repeats* enthält, für die Rekrutierung von GFP an Lipid droplets hinreichend ist.

Das *4-helix-bundle* ist ein typisches Strukturmerkmal von Apolipoproteinen (Raussens *et al.*, 1998). Apolipoproteine sind Transportproteine, die Neutrallipide, Phospholipide und Fettsäuren als Lipoproteinpartikel in den Körperflüssigkeiten transportieren. Dabei solubilisieren sie die hydrophoben Lipide, indem sie sie von der hydrophilen Umgebung abschirmen. Hierbei spielt das *4-helix-bundle* eine wichtige Rolle. Es existiert in zwei Konformationen: In der *closed position* ist das austauschbare Apolipoprotein nicht an Lipoproteinpartikel gebunden und die 4 α -Helices interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander.

Demgegenüber interagieren die 4 α -Helices in der *open position* nicht miteinander, sondern mit den Acylketten hydrophober Lipide und schirmen sie so von der hydrophilen Umgebung ab (Abb. 4.2).

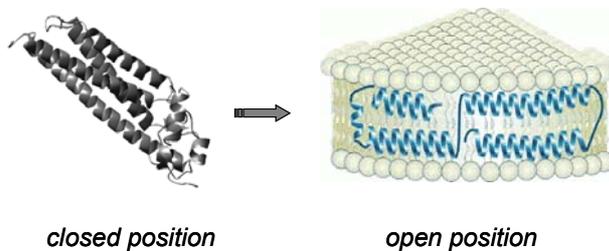


Abb. 4.2: Schematische Abbildung der closed und open conformation eines 4-helix bundles. In der *open position* interagieren die Helices mit den Acylketten von Lipiden, während sie in der *closed position* über hydrophobe Wechselwirkung miteinander interagieren (Abb. abgeändert nach Raussens V. *et al.*, 1998.).

Ebenso binden die Lipoproteinpartikel an die Zelloberfläche und interagieren dort mit vorhandenen Lipoprotein-Lipasen. Diese hydrolysieren das Triacylglycerin, wobei die entstehenden Fettsäuren dem Gewebe als Brennstoffe oder Vorstufen für die Lipidbiosynthese dienen. Bei der Hydrolyse kommt es zu Umorganisationen der Lipoproteinpartikel, wobei die Apolipoproteine die Reorganisation ermöglichen. Dieser Reorganisation entspricht der *in vitro disc assay* (Abb. 3.25 S. 118). Dieser assay zeigt, dass die Zugabe eines Apolipoproteins zu Liposomen deren Fragmentierung zur Folge hat. Es bilden sich kleine ungefähr 23nm große *discs*, mit den hydrophilen Phospholipidköpfen nach oben und unten orientiert und den Acylketten in der Mitte abgeschirmt vom wässrigen Milieu durch die amphipatischen Helices der Apolipoproteine. Die *in vitro* generierten *discs* entsprechen einem physiologischen Korrelat, den naszenten diskoidalen HDLs (*high density lipoproteins*), die aus Phospholipiden und Apolipoproteinen bestehen. Sie sind für den Rücktransport von überschüssigem Cholesterin aus dem Organismus zur Leber verantwortlich. Dabei speichern sie Cholesterinester im hydrophoben Inneren der diskoidalen-HDLs, die sich dadurch in sphärische (kugelförmige) HDLs umwandeln. In der vorliegenden Arbeit konnten wir mit Hilfe des *disc assays* zeigen, dass nicht nur Apolipoproteine, sondern auch TIP47 in der Lage ist, Liposomen zu diskoidalen Strukturen umzuwandeln. Hier stellt sich die Frage, ob es auch für die TIP47-generierten *discs* ein physiologisches Korrelat gibt?

Geht man davon aus, dass die Lipid droplet Biogenese am ER beginnt, so würde die Akkumulation von Neutrallipid zwischen den Membranblättern des ERs, die Anordnung der Phospholipide im entstehenden Phospholipidmonolayer verändern.

Dies könnte ein Signal für TIP47 sein, mit seinen 11-*mer repeats* an diesen Bereich zu binden. Im folgenden könnte TIP47 die weitere Akkumulation von Neutrallipid unterstützen, indem es in unbekannterweise mit seinem *4-helix bundle* dieses Reorganisieren der Lipide von der hydrophilen Umgebung abschirmt oder aber dadurch die Abschnürung kleiner Lipid droplets ins Zytoplasma ermöglicht. Die kleinen Lipid droplets könnten von der Struktur einem diskoidalen HDL Partikel entsprechen, wobei TIP47 als intrazelluläres Apolipoprotein die Acylketten der Phospholipide vom hydrophilen Zytosol abschirmt. Des Weiteren könnte TIP47 wie ein Apolipoprotein für den geordneten Einbau von Triacylglycerin und Cholesterinester in das hydrophobe Innere sorgen, so dass aus dem diskoidalen Vorläufer ein Lipid droplet entsteht, sowie aus dem diskoidalen HDL ein sphärisches HDL generiert wird.

In Analogie zu dem Apolipoprotein E könnte auch TIP47 nur mit anderen Proteinen interagieren, wenn das *4-helix bundle* in der *open conformation*, also an Lipiden gebunden, vorliegt (Saito et al., 2004). Dies kann mit ein Grund dafür sein, warum wir bisher keine Bindungspartner gefunden haben. Im nächsten Schritt werden wir diesen Ansatz weiter verfolgen.

TIP47 ist jedoch nicht das einzige PAT-Protein mit einem *4-helix-bundle*. Dies ist auch für ADRP und OXPAT anzunehmen und könnte mit ein Grund dafür sein, dass ADRP in TIP47 KD Zellen „hochreguliert“ ist. So gesehen könnten die PAT-Proteine den Transport und die Speicherung von Neutrallipid in Zellen übernehmen, wohingegen Apolipoproteine für den extrazellulären Transport verantwortlich sind. Bisher sind alle untersuchten Zellen in der Lage Lipid droplets zu bilden, aber nur wenige spezialisierte Zellen exprimieren Apolipoproteine und sekretieren Lipoproteine. Bei der Bildung von Lipoproteinen gelangt das Triacylglycerin mit Hilfe eines mikrosomalen Transferproteins in das ER-Lumen. In diesem Zusammenhang ist noch völlig ungeklärt, wie in Zellen, die sowohl Lipoproteine, als auch Lipid droplets bilden, die Sortierung von Triacylglycerin bewerkstelligt wird. Welche Faktoren spielen bei dieser Sortierung eine Rolle? Dies sind Fragen, die wir uns in nächster Zeit stellen müssen.

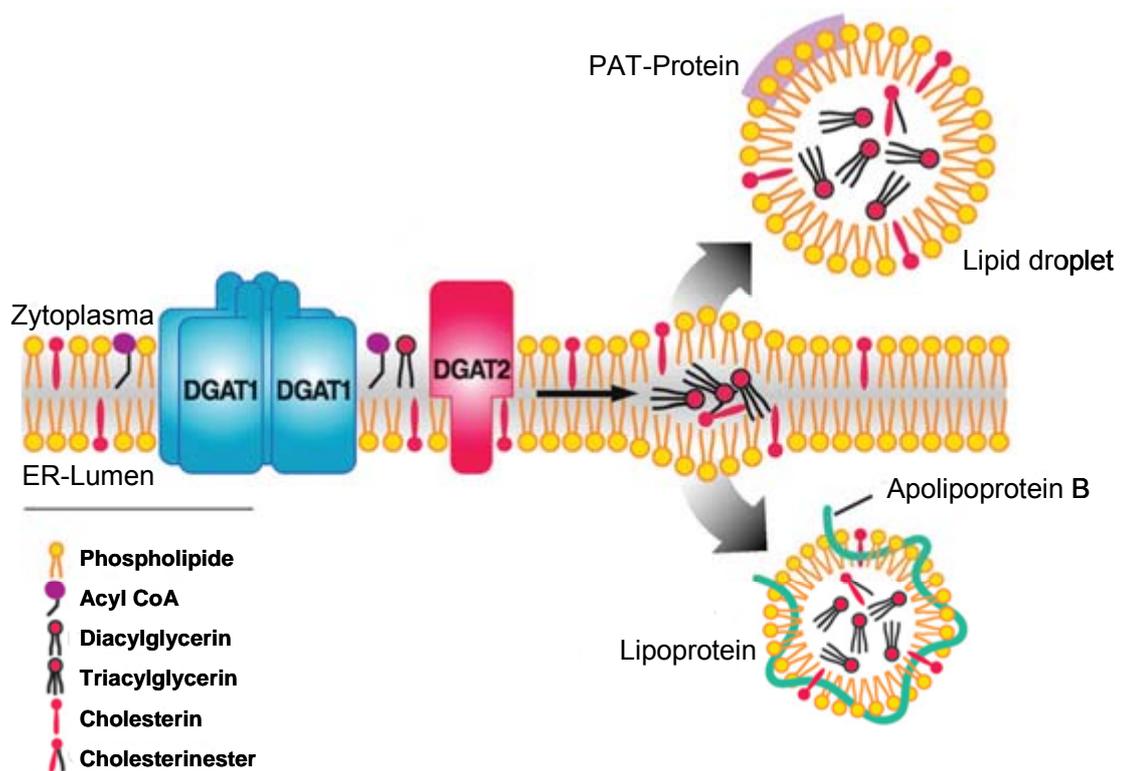


Abb. 4.3: Schematische Abbildung zur Triacylglycerinsynthese und dessen Einbau in Lipid droplets und Lipoproteinen in spezialisierten Zellen wie Hepatozyten. DGAT 1 und 2 synthetisieren Triacylglycerin, von dem man annimmt, dass es zwischen den Membranblättern des ERs lokalisiert, bevor es in Lipid droplets und Lipoproteine eingebaut wird. Spezialisierte Zellen wie Hepatozyten und Enterozyten des Darms sind in der Lage, sowohl Lipid droplets, als auch Lipoproteine zu synthetisieren. Bisher ist nicht bekannt, wie in diesen Zellen die Sortierung von Neutrallipid zum einen ins ER-Lumen für die Bildung von Lipoproteinen und zum anderen Richtung Zytosol für die Bildung von Lipid droplets reguliert wird. DGAT: Diacylglycerinacyltransferase (Abb. abgeändert nach Yen C-L. *et al.*, 2008).

5. Zusammenfassung

TIP47 (*tail interacting protein of 47kDa*) wurde als Sortierungsfaktor für den retrograden Transport der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren und als ein Schlüsseffektor für die GTPase Rab9 beschrieben (Aivazian et al., 2006; Diaz and Pfeffer, 1998). Diese Funktionen konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. TIP47 konnte nicht an Mannose-6-Phosphat Rezeptoren- und Rab9-positiven Membranen detektiert werden und interagiert weder mit den Rezeptoren noch mit Rab9 *in vitro*. Des Weiteren hatte die Supprimierung von TIP47 über RNAi weder einen Einfluss auf die Verteilung der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren, noch auf die Sortierung lysosomaler Enzyme durch die Rezeptoren. Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass andere Sortierungsfaktoren wie der Retromerkomplex (Seaman, 2004) sehr wohl einen Einfluss auf die Verteilung und Funktion der Mannose-6-Phosphat Rezeptoren hat. Daher sprechen unsere Daten gegen die Funktion von TIP47 als Sortierungsfaktor für Mannose-6-Phosphat Rezeptoren. TIP47 wurde nicht nur als Sortierungsfaktor beschrieben, sondern auch als ein an Lipid droplet bindendes Protein mit noch unbekannter Funktion (Wolins et al., 2001). Diese Lokalisierung konnten wir bestätigen und ferner zeigen, dass die Supprimierung von TIP47 die Lipid droplet Biogenese beeinträchtigt und den Einbau von Triacylglycerin in Lipid droplets reduziert. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass TIP47 eine apolipoprotein-ähnliche Funktion besitzt, indem es Liposomen *in vitro* reorganisieren kann. Damit liegen zum erstenmal Daten zur möglichen Funktion von TIP47 vor, die darauf hindeuten, dass die lipidorganisierenden Eigenschaften von TIP47 für die Biosynthese von Lipid droplets von Bedeutung sind.

6. Summary

TIP47 is thought to act as a sorting device for the retrograde transport of mannose-6-phosphate receptors (Diaz and Pfeffer, 1998) and was characterized as a key effector of the GTPase Rab9 (Aivazian et al., 2006).

However, our data do not support this view. In our analysis TIP47 is not recruited to organelles of the biosynthetic and endocytic pathways. Furthermore, we could not confirm any *in vitro* interaction, neither with mannose-6-phosphate receptors nor with Rab9. Whereas knock-down of TIP47 expression had no effect on MPR distribution or trafficking and did not affect lysosomal enzyme sorting, the knock-down of Retromer, another proposed sorting device, affected MPR distribution, trafficking and lysosomal enzyme sorting. Thus, our data argue against a function of TIP47 as a sorting device.

In contrast to this, TIP47 was characterized as a lipid droplet binding protein with unknown function (Wolins et al., 2001). We can confirm that TIP47 is recruited from the cytosol to nascent lipid droplets. Suppression of TIP47 expression blocks lipid droplet maturation and leads to decreased incorporation of triacylglycerol into lipid droplets. For the first time we demonstrate that recombinant TIP47 has apolipoprotein-like properties *in vitro* and reorganizes liposomes into small lipid discs. Thus, we conclude that TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets.

Literaturverzeichnis

Aivazian, D., Serrano, R.L. and Pfeffer, S. (2006) TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J Cell Biol*, **173**, 917-926.

Arighi, C.N., Hartnell, L.M., Aguilar, R.C., Haft, C.R. and Bonifacino, J.S. (2004) Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol*, **165**, 123-133.

Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S.D. and Daum, G. (1999) Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **181**, 6441-6448.

Barbero, P., Bittova, L. and Pfeffer, S.R. (2002) Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol*, **156**, 511-518.

Barbero, P., Buell, E., Zullely, S. and Pfeffer, S.R. (2001) TIP47 is not a component of lipid droplets. *J Biol Chem*, **276**, 24348-24351.

Bartz, R., Li, W.H., Venables, B., Zehmer, J.K., Roth, M.R., Welti, R., Anderson, R.G., Liu, P. and Chapman, K.D. (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res*, **48**, 837-847.

Bell, M., Wang, H., Chen, H., McLenithan, J.C., Gong, D.W., Yang, R.Z., Yu, D., Fried, S.K., Quon, M.J., Londos, C. and Sztalryd, C. (2008) Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes*, **57**, 2037-2045.

Bickel, P.E., Tansey, J.T. and Welte, M.A. (2009) PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 419-440.

Binns, D., Januszewski, T., Chen, Y., Hill, J., Markin, V.S., Zhao, Y., Gilpin, C., Chapman, K.D., Anderson, R.G. and Goodman, J.M. (2006) An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J Cell Biol*, **173**, 719-731.

Bonifacino, J.S. and Lippincott-Schwartz, J. (2003) Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 409-414.

Bostrom, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B.R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Boren, J. and Olofsson, S.O. (2007) SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol*, **9**, 1286-1293.

Bostrom, P., Rutberg, M., Ericsson, J., Holmdahl, P., Andersson, L., Frohman, M.A., Boren, J. and Olofsson, S.O. (2005) Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 1945-1951.

- Brasaemle, D.L. (2007) Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*, **48**, 2547-2559.
- Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E.J. and Londos, C. (1997) Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res*, **38**, 2249-2263.
- Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L. and Wang, R. (2004) Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **279**, 46835-46842.
- Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R. and Londos, C. (2000) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*, **275**, 38486-38493.
- Brasaemle, D.L. and Wolins, N.E. (2006) Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol*, **Chapter 3**, Unit 3 15.
- Braulke, T. and Bonifacino, J.S. (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 605-614.
- Brown, R.E. and Mattjus, P. (2007) Glycolipid transfer proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 746-760.
- Brown, W.J., Goodhouse, J. and Farquhar, M.G. (1986) Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J Cell Biol*, **103**, 1235-1247.
- Bulankina, A.V., Deggerich, A., Wenzel, D., Mutenda, K., Wittmann, J.G., Rudolph, M.G., Burger, K.N. and Honing, S. (2009) TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol*, **185**, 641-655.
- Bussell, R., Jr. and Eliezer, D. (2003) A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J Mol Biol*, **329**, 763-778.
- Bussell, R., Jr., Ramlall, T.F. and Eliezer, D. (2005) Helix periodicity, topology, and dynamics of membrane-associated alpha-synuclein. *Protein Sci*, **14**, 862-872.
- Cantalupo, G., Alifano, P., Roberti, V., Bruni, C.B. and Bucci, C. (2001) Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *Embo J*, **20**, 683-693.
- Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. and Pfeffer, S.R. (2001) Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science*, **292**, 1373-1376.
- Chang, B.H., Li, L., Paul, A., Taniguchi, S., Nannegari, V., Heird, W.C. and Chan, L. (2006) Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol Cell Biol*, **26**, 1063-1076.

- Cushman, S.W. (1970) Structure-function relationships in the adipose cell. I. Ultrastructure of the isolated adipose cell. *J Cell Biol*, **46**, 326-341.
- Dalen, K.T., Dahl, T., Holter, E., Arntsen, B., Londos, C., Sztalryd, C. and Nebb, H.I. (2007) LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 210-227.
- Dalen, K.T., Ulven, S.M., Arntsen, B.M., Solaas, K. and Nebb, H.I. (2006) PPARalpha activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver. *J Lipid Res*, **47**, 931-943.
- Diaz, E. and Pfeffer, S.R. (1998) TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell*, **93**, 433-443.
- Dittmer, F., Ulbrich, E.J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R. and von Figura, K. (1999) Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J Cell Sci*, **112** (Pt 10), 1591-1597.
- Draper, R.K., Goda, Y., Brodsky, F.M. and Pfeffer, S.R. (1990) Antibodies to clathrin inhibit endocytosis but not recycling to the trans Golgi network in vitro. *Science*, **248**, 1539-1541.
- Dunne, S.J., Cornell, R.B., Johnson, J.E., Glover, N.R. and Tracey, A.S. (1996) Structure of the membrane binding domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochemistry*, **35**, 11975-11984.
- Espinosa, E.J., Calero, M., Sridevi, K. and Pfeffer, S.R. (2009) RhoBTB3: a Rho GTPase-family ATPase required for endosome to Golgi transport. *Cell*, **137**, 938-948.
- Fei, W., Shui, G., Gaeta, B., Du, X., Kuerschner, L., Li, P., Brown, A.J., Wenk, M.R., Parton, R.G. and Yang, H. (2008) Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J Cell Biol*, **180**, 473-482.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M. and Shinohara, Y. (2008) Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol*, **130**, 263-279.
- Fujimoto, Y., Onoduka, J., Homma, K.J., Yamaguchi, S., Mori, M., Higashi, Y., Makita, M., Kinoshita, T., Noda, J., Itabe, H. and Takanoa, T. (2006) Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase. *Biol Pharm Bull*, **29**, 2174-2180.
- Ganley, I.G., Carroll, K., Bittova, L. and Pfeffer, S. (2004) Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. *Mol Biol Cell*, **15**, 5420-5430.
- Gao, J.G. and Simon, M. (2006) Molecular screening for GS2 lipase regulators: inhibition of keratinocyte retinylester hydrolysis by TIP47. *J Invest Dermatol*, **126**, 2087-2095.
- Ghosh, P., Dahms, N.M. and Kornfeld, S. (2003a) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 202-212.

- Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H.J. and Kornfeld, S. (2003b) Mammalian GGAs act together to sort mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol*, **163**, 755-766.
- Gibbons, G.F., Islam, K. and Pease, R.J. (2000) Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta*, **1483**, 37-57.
- Goda, Y. and Pfeffer, S.R. (1988) Selective recycling of the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor to the trans Golgi network in vitro. *Cell*, **55**, 309-320.
- Gomes, A.Q., Ali, B.R., Ramalho, J.S., Godfrey, R.F., Barral, D.C., Hume, A.N. and Seabra, M.C. (2003) Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Mol Biol Cell*, **14**, 1882-1899.
- Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I. and Kornfeld, S. (1988) The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell*, **52**, 329-341.
- Guo, Y., Walther, T.C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J.S., Vale, R.D., Walter, P. and Farese, R.V. (2008) Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature*, **453**, 657-661.
- Hanna, J., Carroll, K. and Pfeffer, S.R. (2002) Identification of residues in TIP47 essential for Rab9 binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7450-7454.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A. and Weisgraber, K.H. (2006) Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci*, **31**, 445-454.
- Hickenbottom, S.J., Kimmel, A.R., Londos, C. and Hurley, J.H. (2004) Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47. *Structure*, **12**, 1199-1207.
- Hoflack, B. and Kornfeld, S. (1985) Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *J Biol Chem*, **260**, 12008-12014.
- Imamura, M., Inoguchi, T., Ikuyama, S., Taniguchi, S., Kobayashi, K., Nakashima, N. and Nawata, H. (2002) ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **283**, E775-783.
- Jiang, H.P., Harris, S.E. and Serrero, G. (1992) Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246. *Cell Growth Differ*, **3**, 21-30.
- Kelly, B.T., McCoy, A.J., Spate, K., Miller, S.E., Evans, P.R., Honing, S. and Owen, D.J. (2008) A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature*, **456**, 976-979.
- Kennedy, E.P. (1957) Metabolism of lipides. *Annu Rev Biochem*, **26**, 119-148.
- Kim, C.A., Delepine, M., Boutet, E., El Mourabit, H., Le Lay, S., Meier, M., Nemani, M., Bridel, E., Leite, C.C., Bertola, D.R., Semple, R.K., O'Rahilly, S., Dugail, I., Capeau, J., Lathrop, M. and Magre, J. (2008) Association of a homozygous

- nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, **93**, 1129-1134.
- Krise, J.P., Sincock, P.M., Orsel, J.G. and Pfeffer, S.R. (2000) Quantitative analysis of TIP47-receptor cytoplasmic domain interactions: implications for endosome-to-trans Golgi network trafficking. *J Biol Chem*, **275**, 25188-25193.
- Kuerschner, L., Moessinger, C. and Thiele, C. (2008) Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*, **9**, 338-352.
- Kumar, Y., Cocchiaro, J. and Valdivia, R.H. (2006) The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets. *Curr Biol*, **16**, 1646-1651.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G. and Zechner, R. (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab*, **3**, 309-319.
- Le Lay, S., C, M.B., Hajduch, E. and Dugail, I. (2009) Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 514-518.
- Le Lay, S., Hajduch, E., Lindsay, M.R., Le Liepvre, X., Thiele, C., Ferre, P., Parton, R.G., Kurzchalia, T., Simons, K. and Dugail, I. (2006) Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic*, **7**, 549-561.
- Lehner, R. and Kuksis, A. (1996) Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog Lipid Res*, **35**, 169-201.
- Levine, T. (2004) Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junctions. *Trends Cell Biol*, **14**, 483-490.
- Listenberger, L.L., Ostermeyer-Fay, A.G., Goldberg, E.B., Brown, W.J. and Brown, D.A. (2007) Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res*, **48**, 2751-2761.
- Liu, P., Bartz, R., Zehmer, J.K., Ying, Y.S., Zhu, M., Serrero, G. and Anderson, R.G. (2007) Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 784-793.
- Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D.I., Zhu, M. and Anderson, R.G. (2004) Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem*, **279**, 3787-3792.
- Liu, W., Duden, R., Phair, R.D. and Lippincott-Schwartz, J. (2005) ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells. *J Cell Biol*, **168**, 1053-1063.

- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M.A., Goda, Y., Zerial, M. and Pfeffer, S.R. (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Embo J*, **12**, 677-682.
- Londos, C., Brasaemle, D.L., Schultz, C.J., Adler-Wailes, D.C., Levin, D.M., Kimmel, A.R. and Rondinone, C.M. (1999) On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann N Y Acad Sci*, **892**, 155-168.
- Lu, X., Gruia-Gray, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Londos, C. and Kimmel, A.R. (2001) The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome*, **12**, 741-749.
- Marchesan, D., Rutberg, M., Andersson, L., Asp, L., Larsson, T., Boren, J., Johansson, B.R. and Olofsson, S.O. (2003) A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. *J Biol Chem*, **278**, 27293-27300.
- Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E. and Emr, S.D. (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell*, **77**, 579-586.
- Martinez-Botas, J., Anderson, J.B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B.H., Quast, M.J., Gorenstein, D., Chen, K.H. and Chan, L. (2000) Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet*, **26**, 474-479.
- Mashek, D.G. and Coleman, R.A. (2006) Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. *Curr Opin Lipidol*, **17**, 274-278.
- Masuda, Y., Itabe, H., Odaki, M., Hama, K., Fujimoto, Y., Mori, M., Sasabe, N., Aoki, J., Arai, H. and Takano, T. (2006) ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J Lipid Res*, **47**, 87-98.
- McManaman, J.L., Zabaronick, W., Schaack, J. and Orlicky, D.J. (2003) Lipid droplet targeting domains of adipophilin. *J Lipid Res*, **44**, 668-673.
- Medigeshi, G.R. and Schu, P. (2003) Characterization of the in vitro retrograde transport of MPR46. *Traffic*, **4**, 802-811.
- Miura, S., Gan, J.W., Brzostowski, J., Parisi, M.J., Schultz, C.J., Londos, C., Oliver, B. and Kimmel, A.R. (2002) Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem*, **277**, 32253-32257.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. and Shimotohno, K. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*, **9**, 1089-1097.
- Murphy, D.J. and Vance, J. (1999) Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci*, **24**, 109-115.

- Nakamura, N., Akashi, T., Taneda, T., Kogo, H., Kikuchi, A. and Fujimoto, T. (2004) ADRP is dissociated from lipid droplets by ARF1-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 957-965.
- Nakamura, N. and Fujimoto, T. (2003) Adipose differentiation-related protein has two independent domains for targeting to lipid droplets. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 333-338.
- Nothwehr, S.F., Bruinsma, P. and Strawn, L.A. (1999) Distinct domains within Vps35p mediate the retrieval of two different cargo proteins from the yeast prevacuolar/endosomal compartment. *Mol Biol Cell*, **10**, 875-890.
- Orlicky, D.J., Degala, G., Greenwood, C., Bales, E.S., Russell, T.D. and McManaman, J.L. (2008) Multiple functions encoded by the N-terminal PAT domain of adipophilin. *J Cell Sci*, **121**, 2921-2929.
- Oshima, A., Nolan, C.M., Kyle, J.W., Grubb, J.H. and Sly, W.S. (1988) The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells. *J Biol Chem*, **263**, 2553-2562.
- Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H. and Fujimoto, T. (2005) Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci*, **118**, 2601-2611.
- Perez-Victoria, F.J., Mardones, G.A. and Bonifacino, J.S. (2008) Requirement of the human GARP complex for mannose 6-phosphate-receptor-dependent sorting of cathepsin D to lysosomes. *Mol Biol Cell*, **19**, 2350-2362.
- Petitpas, I., Grune, T., Bhattacharya, A.A. and Curry, S. (2001) Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J Mol Biol*, **314**, 955-960.
- Ploegh, H.L. (2007) A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature*, **448**, 435-438.
- Puertollano, R., Aguilar, R.C., Gorshkova, I., Crouch, R.J. and Bonifacino, J.S. (2001) Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science*, **292**, 1712-1716.
- Qian, M., Sleat, D.E., Zheng, H., Moore, D. and Lobel, P. (2008) Proteomics analysis of serum from mutant mice reveals lysosomal proteins selectively transported by each of the two mannose 6-phosphate receptors. *Mol Cell Proteomics*, **7**, 58-70.
- Radhakrishnan, A., Goldstein, J.L., McDonald, J.G. and Brown, M.S. (2008) Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab*, **8**, 512-521.
- Raussens, V., Fisher, C.A., Goormaghtigh, E., Ryan, R.O. and Ruyschaert, J.M. (1998) The low density lipoprotein receptor active conformation of apolipoprotein E. Helix organization in n-terminal domain-phospholipid disc particles. *J Biol Chem*, **273**, 25825-25830.

- Reddy, J.V. and Seaman, M.N. (2001) Vps26p, a component of retromer, directs the interactions of Vps35p in endosome-to-Golgi retrieval. *Mol Biol Cell*, **12**, 3242-3256.
- Rhoades, E., Ramlall, T.F., Webb, W.W. and Eliezer, D. (2006) Quantification of alpha-synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, **90**, 4692-4700.
- Russell, T.D., Palmer, C.A., Orlicky, D.J., Bales, E.S., Chang, B.H., Chan, L. and McManaman, J.L. (2008) Mammary glands of adipophilin-null mice produce an amino-terminally truncated form of adipophilin that mediates milk lipid droplet formation and secretion. *J Lipid Res*, **49**, 206-216.
- Saito, H., Lund-Katz, S. and Phillips, M.C. (2004) Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog Lipid Res*, **43**, 350-380.
- Schaffer, J.E. (2003) Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*, **14**, 281-287.
- Scherer, P.E., Bickel, P.E., Kotler, M. and Lodish, H.F. (1998) Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nat Biotechnol*, **16**, 581-586.
- Schmuth, M., Haqq, C.M., Cairns, W.J., Holder, J.C., Dorsam, S., Chang, S., Lau, P., Fowler, A.J., Chuang, G., Moser, A.H., Brown, B.E., Mao-Qiang, M., Uchida, Y., Schoonjans, K., Auwerx, J., Chambon, P., Willson, T.M., Elias, P.M. and Feingold, K.R. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **122**, 971-983.
- Schulz, T.A. and Prinz, W.A. (2007) Sterol transport in yeast and the oxysterol binding protein homologue (OSH) family. *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 769-780.
- Schwartz, S.L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A. and Wandinger-Ness, A. (2007) Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci*, **120**, 3905-3910.
- Scott, G.K., Fei, H., Thomas, L., Medigeshi, G.R. and Thomas, G. (2006) A PACS-1, GGA3 and CK2 complex regulates CI-MPR trafficking. *Embo J*, **25**, 4423-4435.
- Seaman, M.N. (2004) Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol*, **165**, 111-122.
- Seaman, M.N. (2005) Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol*, **15**, 68-75.
- Seaman, M.N. (2007) Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. *J Cell Sci*, **120**, 2378-2389.
- Seaman, M.N., Marcusson, E.G., Cereghino, J.L. and Emr, S.D. (1997) Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *J Cell Biol*, **137**, 79-92.

- Seaman, M.N., McCaffery, J.M. and Emr, S.D. (1998) A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol*, **142**, 665-681.
- Shiba, T., Takatsu, H., Nogi, T., Matsugaki, N., Kawasaki, M., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Earnest, T., Nakayama, K. and Wakatsuki, S. (2002) Structural basis for recognition of acidic-cluster dileucine sequence by GGA1. *Nature*, **415**, 937-941.
- Soni, K.G., Mardones, G.A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C.L. and Bonifacino, J.S. (2009) Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci*, **122**, 1834-1841.
- Sorger, D. and Daum, G. (2002) Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **184**, 519-524.
- Sprague, B.L. and McNally, J.G. (2005) FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol*, **15**, 84-91.
- Stein, M., Braulke, T., Krentler, C., Hasilik, A. and von Figura, K. (1987) 46-kDa mannose 6-phosphate-specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **368**, 937-947.
- Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 513-525.
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O. and Zerial, M. (1995) Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, **83**, 423-432.
- Stone, S.J., Levin, M.C., Zhou, P., Han, J., Walther, T.C. and Farese, R.V., Jr. (2009) The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. *J Biol Chem*, **284**, 5352-5361.
- Sturmey, R.G., O'Toole, P.J. and Leese, H.J. (2006) Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*, **132**, 829-837.
- Subramanian, V., Garcia, A., Sekowski, A. and Brasaemle, D.L. (2004) Hydrophobic sequences target and anchor perilipin A to lipid droplets. *J Lipid Res*, **45**, 1983-1991.
- Sztalryd, C., Bell, M., Lu, X., Mertz, P., Hickenbottom, S., Chang, B.H., Chan, L., Kimmel, A.R. and Londos, C. (2006) Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line. *J Biol Chem*, **281**, 34341-34348.
- Tansey, J.T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D.L., Zee, J.V., Gavrilova, O., Reitman, M.L., Deng, C.X., Li, C., Kimmel, A.R. and Londos, C. (2001) Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6494-6499.

- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. and Fujimoto, T. (2002) The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem*, **277**, 44507-44512.
- Than, N.G., Sumegi, B., Than, G.N., Kispal, G. and Bohn, H. (1998) Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding human placental tissue protein 17 (PP17) variants. *Eur J Biochem*, **258**, 752-757.
- Wang, C. and St Leger, R.J. (2007) The *Metarhizium anisopliae* Perilipin Homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, Appressorial Turgor Pressure, and Virulence. *J Biol Chem*, **282**, 21110-21115.
- Watt, M.J. and Steinberg, G.R. (2008) Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem J*, **414**, 313-325.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**, 141-143.
- Wilson, C., Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. and Agard, D.A. (1991) Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*, **252**, 1817-1822.
- Wittmann, J.G. and Rudolph, M.G. (2004a) Crystal structure of Rab9 complexed to GDP reveals a dimer with an active conformation of switch II. *FEBS Lett*, **568**, 23-29.
- Wittmann, J.G. and Rudolph, M.G. (2004b) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the GTP-binding protein Rab9 implicated in endosome-to-TGN vesicle trafficking. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 580-582.
- Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A. and Bickel, P.E. (2005) S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J Biol Chem*, **280**, 19146-19155.
- Wolins, N.E., Rubin, B. and Brasaemle, D.L. (2001) TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem*, **276**, 5101-5108.
- Xu, G., Sztalryd, C., Lu, X., Tansey, J.T., Gan, J., Dorward, H., Kimmel, A.R. and Londos, C. (2005) Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem*, **280**, 42841-42847.
- Yamaguchi, T., Matsushita, S., Motojima, K., Hirose, F. and Osumi, T. (2006) MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*, **281**, 14232-14240.
- Yu, W., Bozza, P.T., Tzizik, D.M., Gray, J.P., Cassara, J., Dvorak, A.M. and Weller, P.F. (1998) Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol*, **152**, 759-769.
- Zimmermann, R., Lass, A., Haemmerle, G. and Zechner, R. (2009) Fate of fat: The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 494-500.

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A. and Zechner, R. (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, **306**, 1383-1386.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Thomas Langer und Prof. Dr. Stefan Höning betreut worden.

Die wesentlichen Teile meiner Arbeit sind wie folgt publiziert:

Bulankina, A.V., Deggerich, A., Wenzel, D., Mutenda, K., Wittmann, J.G., Rudolph, M.G., Burger, K.N. and Höning, S. (2009) TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol*, **185**, 641-655.

Kongreßbeiträge

1. FASEB Summer Research Conference on lipid droplets. Boston/Vermont, USA, 2007: TIP47 is not a sorting device for MPRs, but associated with Lipid droplets

2. First joint congress of the Swiss and German Societies of Cell Biology, Konstanz, 2009: TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets.

Köln, im August 2009

Anke Deggerich

Curriculum vitae

Zur Person

Name	Anke Deggerich
Anschrift	Krefelder Wall 28-30 50670 Köln
Geburtsdatum	30.05.1976 in Rheine
Nationalität	Deutsch

Studium

02/06 – 10/09	Promotion bei Herrn Prof. Dr. Höning, Institut für Biochemie I der medizinischen Fakultät zu Köln, Thema: TIP47, ein intrazelluläres Apolipoprotein und/oder ein Sortierungsfaktor für Mannose-6-Phosphat Rezeptoren?
01/05 –01/06	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Krönke im Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene unter der Anleitung von Dr. Kashkar, Thema: RNAi vermittelter <i>knock down</i> des Proteins, <i>X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis</i> (XIAP), in Hodgkin Lymphoma
WS 00 – WS 04	Diplomstudiengang der Biologie an der Universität zu Köln mit den Schwerpunkten: Genetik, Biochemie und Pharmakologie

Berufserfahrung

10/99-09/00	Anstellung als Physiotherapeutin Praxis Frau Zita Feldmar, Köln
01/99-07/99	Anstellung als Physiotherapeutin Kinderheim St. Vincent, Jerusalem

Ausbildung

1995-1998	Schule für Physiotherapie an den Städtischen Kliniken Frankfurt am Main Abschluss: staatlich geprüfte Physiotherapeutin
-----------	---

Schulbildung

1986-1995	Gymnasium in Neuenkirchen, Abschluss: Abitur
1982-1986	Grundschule in Rheine

Danksagung

Herrn Prof. Dr. T. Langer und Herrn Prof. Dr. S. Höning danke ich für die offizielle Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation. Bei Herrn Prof. Dr. S. Roth möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und bei Dr. Plomann für die Übernahme des Beisitzes bedanken.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Höning für die hervorragende Betreuung und die freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Dr. Dirk Wenzel und Dr. Koert Burger danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit und den vielen elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Den Mitarbeitern vom ZMMK Servicelabor, insbesondere Ursula Cullmann und Dr. Stefan Müller danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und dafür, dass sie für mich auch mal eine Stunde länger geblieben sind.

Allen Mitgliedern des Traffic Seminars, insbesondere Markus Plomann, Gerrit Praefcke, Dagmar Moersdorf, Sven Schellmann, Sylvia Schael, Julia Hunn und Tanja Riyahi danke ich für die anregenden Diskussionen und wertvollen Tipps zum Laboralltag.

Ein riesengroßer Dank geht an Andrea Rüger, die mich in das „hönigsche“ Labor eingearbeitet und mir viele neue Methoden beigebracht hat. Ireen Schaffrath danke ich ganz besonders dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat beiseite gestanden hat. Bessere TAs kann man sich nicht wünschen. Den Jungs vom Biacore Florian, Dominic und Thomas danke ich für die Unterstützung und Einführung am Biacore, sowie für die aufmunternden Gespräche während und nach der Arbeit. Insbesondere Anika möchte ich dafür danken, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und sie mit klugen Ratschlägen beseitigen konnte. Kira und Maarten, den Ehemaligen, danke ich für die freundschaftliche Unterstützung auch über die Arbeitszeit hinaus. Ohne euch hätte es nur halb soviel Spaß gemacht.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen der Biochemie I und II für die tägliche Hilfsbereitschaft und die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für deren kompromisslose Unterstützung und aufmunternden Worte. Meinen Schwiegereltern danke ich für Ihre Anteilnahme und aufbauenden Telefonate. Meinem Freund Joachim danke ich dafür, dass er immer an mich geglaubt und mich in jeder Situation unterstützt hat.