

Marlene Buchebner

**Identifizierung und Charakterisierung neuer  
Lipasen/Esterasen im Genom der Maus**

**Diplomarbeit**

zur Erlangung des akademischen Grades

einer Magistra

an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Karl-Franzens-Universität Graz

Betreut von: O. Univ.-Prof. Dr. Gerhard M. Kostner

Institut für Molekularbiologie und Biochemie

Zentrum für Molekulare Medizin

Medizinische Universität Graz

2005

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der medizinischen Universität Graz, in der Zeit von September 2004 bis September 2005, unter der Leitung von Herrn Univ. Prof. Dr. Gerhard Kostner durchgeführt, bei dem ich mich herzlich für die Betreuung bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Ass. Mag. Dr. Dagmar Kratky für die außerordentlich gute Betreuung und kritische Korrektur dieser Arbeit. Weiters möchte ich besonders Dipl.-Biol. Tatjana Becker für wertvolle Hinweise bei der praktischen Arbeit, und allen meinen anderen Kolleginnen und Kollegen unserer Arbeitsgruppe für die fachliche und moralische Unterstützung, danken.

Herrn Dr. Achim Lass möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung der Aktivitätsassays danken und bei Frau Dr. Ruth Birner –Grüneberger bedanke ich mich für die Durchführung der Experimente mit den Inhibitoren.

Bei meinen Studienkollegen bedanke ich mich für die wunderschöne gemeinsame Studienzeit und die zahlreichen kritischen Diskussionen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meinen Freundinnen und Verwandten für die moralische Unterstützung während dieser Arbeit bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt Manfred.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung während des ganzen Studiums, besonders aber in der Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit, bedanken.

## Abkürzungen

Apo-Lp	Apolipoprotein
BAT	braunes Fettgewebe
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	copy DNA
CE	Cholesterinester
CM	Herzmuskel
cpm	Counts pro Minute
DC	Dünnschichtchromatografie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s minimal essential medium
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
FC	Freies Cholesterin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDL	High density lipoprotein
HSL	Hormon-sensitive Lipase
LDL	Low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
mRNA	Messenger RNA
PCR	Polymerasekettenreaktion
SM	Skelettmuskel
SR	Scavenger Rezeptor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
WAT	weißes Fettgewebe

# INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Atherosklerose	1
1.2 Cholesterin	2
1.2.1 Cholesterin-Transport	2
1.2.2 Rezeptorvermittelte Endozytose von Cholesterin	6
1.2.3 Regulation der Biosynthese des Cholesterins	8
1.3 Die Rolle der Makrophagen und der Schaumzellbildung bei Atherosklerose	9
1.4 Die Hormon sensitive Lipase (HSL)	10
1.4.1 Regulation	11
1.4.2 HSL im Fettgewebe	11
1.4.3 HSL in Makrophagen	12
1.4.4 HSL in anderen Geweben	13
1.5 Ziel dieser Arbeit	14
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Material	15
2.1.1 Lösungen und Puffer	15
2.1.2 Vektoren	17
2.1.2.1 pSTBlue-1	17
2.1.2.2 pcDNA4/HisMax A	18
2.1.2.3 pcDNA3.1/Zeo(+)	19
2.1.3 Oligonukleotidprimer für die PCR	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Gesamt RNA-Isolierung mittels TriReagent <sup>®</sup> aus Mausegewebe	21
2.2.2 RNA Agarosegel	21
2.2.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken	22
2.2.3.1 Reverse Transkription	22
2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.2.3.3 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	24
2.2.3.4 Agarosegelelektrophorese	24
2.2.3.5 DNA Isolierung aus Agarosegelstücken	25
2.2.3.6 Ligation	25
2.2.3.7 Herstellung elektrokompetenter Zellen	26

2.2.3.8	Transformation von elektrokompetenten E.Coli Zellen	26
2.2.3.9	Kolonie-PCR	27
2.2.3.10	Plasmidminipräparation	27
2.2.3.11	Pure Yield™ Plasmid Midiprep System von Promega	28
2.2.3.12	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.4	Sequenzierung	29
2.2.5	Bestimmung der Proteinexpression und Enzymaktivitäten	30
2.2.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.2.5.2	Westernblot Analyse	31
2.2.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.2.5.4	HSL-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität	33
2.2.5.5	Qualitative Bestimmung der Enzymaktivität mit spezifischen Inhibitoren	34
2.2.6	Zellkultur	35
2.2.6.1	Auftauen und Splitten von cos 7 Zellen	35
2.2.6.2	Transfektion von cos 7 Zellen mit Metafectene™(Biontex)	35
2.2.6.3	Ernten der Proben für die SDS-PAGE und den HSL-Assay	36
2.2.6.4	Lac Z-Färbung	37
2.2.7	Statistik	37
3.	RESULTATE	38
3.1	In <i>silico</i> Suche nach $\alpha/\beta$ Hydrolasen im Genom der Maus	38
3.2	Temperaturgradienten-PCR zur Bestimmung der Annealing-Temperatur $T_A$	39
3.3	Untersuchung der Genexpression der Kandidatengene in den verschiedenen Gewebe mittels PCR	39
3.3.1	pCEH-1	40
3.3.2	pCEH-2	40
3.3.3	pCEH-3	41
3.3.4	pCEH-4	42
3.3.5	pCEH-5	42
3.3.6	pCEH-6	43
3.3.7	pCEH-7	43
3.3.8	pCEH-8	44
3.3.9	pCEH-9	44

3.3.10 Zusammenfassung der Expressionsdaten	45
3.4 Vergleich der Expression der Kandidatengen in Makrophagen und Schaumzelle mit dem house keeping gene Porphobilinogendeaminase (PBGD)	46
3.5 Amplifizierung der cDNA und Klonierung in den TA-Vektor pSTBlue-1	48
3.6 Bestimmung der Proteinexpression mittels Westernblot	49
3.7 Enzymaktivitätsbestimmung mittels HSL-Assay	50
3.8 Klonierung der Kandidatengene in den Säugetiervektor pcDNA3.1/Zeo	53
3.9 Qualitative Bestimmung der Enzymaktivität mit spezifischen Inhibitoren	54
3.10 Überprüfung der Expressionen der Gene pCEH-3 und pCEH-6 in Fettgewebe, Makrophage und Schaumzelle von Wildtyp- und Knock out Mäusen	57
4. DISKUSSION	59
5. LITERATUR	64

# 1. Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

Das Wort Atherosklerose kommt aus dem Griechischen und bedeutet frei übersetzt „verhärtete Schleimsuppe“. Atherosklerose ist der häufigste Grund für Herzinfarkt und Schlaganfall in der westlichen Welt. Laut Jahrbuch der Statistik Österreich aus dem Jahr 2003 sind 34914 Menschen in Folge von Herz-Kreislaufkrankungen verstorben, das sind mehr als die Hälfte aller Todesfälle in diesem Jahr. Atherosklerose ist keine Alterserscheinung, sondern sie kann schon im Kindesalter beginnen und mit höherem Alter fortschreiten.

Diese Krankheit ist charakterisiert durch die Ablagerung von Lipiden und fibrinogenen Elementen in den großen Arterien. Im Frühstadium der Atherosklerose treten Schädigungen des Endothels, Lipoproteinaggregation und -oxidation sowie intrazelluläre Lipidablagerungen in Makrophagen und den glatten Muskelzellen auf, wodurch es zu einer Veränderung der Intima kommt und erste Läsionen sichtbar werden. Über das auslösende Ereignis der Atherosklerose besteht immer noch Uneinigkeit. Nach der „response to injury“ Theorie ist eine Verletzung des Kapillarendothels das Schlüsselereignis [1]. Die „response to retention“ Theorie nimmt an, dass die Einwanderung kleiner atherogener Lipoproteinpartikel in die Endothelzellschicht der erste und entscheidende Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose ist [2]. Unabhängig vom auslösenden Ereignis bewirken die folgende Einwanderung von Makrophagen in die Endothelzellschicht, die Lipidablagerungen und die Umwandlung der Makrophagen in Schaumzellen das Fortschreiten der Atherosklerose.

Epidemiologische Studien haben ergeben, dass Atherosklerose eine multifaktorielle Erkrankung ist und auch Umwelteinflüsse und genetische Risikofaktoren mit ihrer Entwicklung zusammenhängen. Zu den negativen Umweltfaktoren, die das Risiko an Atherosklerose zu erkranken erhöhen, gehören z.B. zu wenig Bewegung, zu fettes Essen, Rauchen, Infektionen und inflammatorisches Geschehen. Genetische Risikofaktoren sind erhöhter Blutdruck, Diabetes, Fettleibigkeit, systemische Entzündungen (Arthritis), Depressionen, ein zu niedriger HDL-Spiegel für den reversen Cholesterintransport oder ein angeborener Defekt. Ein Zusammenspiel dieser Faktoren bewirkt nun ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose in zunehmendem Alter.

Es ist für die medizinische Forschung sehr schwer, das Fortschreiten dieser Krankheit einzudämmen und deshalb ist die Forschung auf diesem Gebiet unentbehrlich.

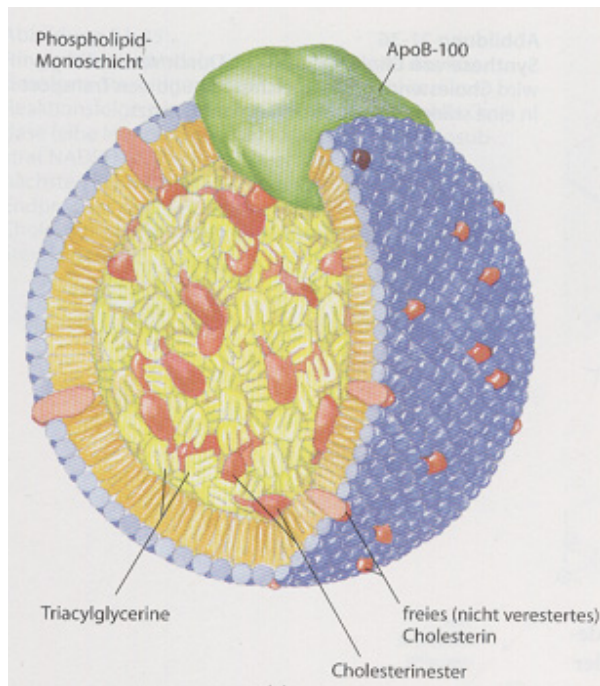
## **1.2 Cholesterin**

Als hydrophobes Lipid benötigt Cholesterin einen spezialisierten Transport im Cytosol über vesikuläre oder nicht vesikuläre Mechanismen [3]. Alle wachsenden tierischen Gewebe benötigen Cholesterin für die Membransynthese, und einige Organe (z.B. Nebennieren und Keimdrüsen) nutzen es als Vorstufe von Steroidhormonen. Cholesterin ist auch eine Vorstufe von Vitamin D. Die richtige Aufteilung von Cholesterin in den zellulären Membranen ist wiederum wichtig für viele biologische Funktionen in den Zellen, wie z.B. Signaltransduktion und Transport zwischen den Membranen [4].

### *1.2.1 Cholesterin-Transport*

Cholesterin und andere hydrophobe Lipide können aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit im Blut nicht transportiert werden. Deshalb müssen sie in Lipoproteine verpackt werden, um über den Blutkreislauf zu den Zellen, wo sie gespeichert oder verbraucht werden, zu gelangen. Lipoproteine sind sehr wichtig für die Homöostase des Cholesterins und den Transport von Triglyzeriden (TG) und Phospholipiden. Die einzelnen Lipoproteinklassen besitzen zwar alle eine gemeinsame Grundstruktur, unterscheiden sich aber in ihrer Zusammensetzung, Größe und Dichte und werden nach steigender Dichte klassifiziert: Chylomikronen (CYM), Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL), Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL), Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und Lipoproteine hoher Dichte (HDL). Alle Lipoproteine besitzen Cholesterinester (CE) und TG im inneren Core-Bereich und die polaren Gruppen der Phospholipide, die OH-Gruppen des Cholesterins und die Apolipoproteine (Apo-Lp) an der Außenseite (Abb.1). Diese Apo-Lp haben eine wichtige Rolle bei der Sezernierung und Entstehung der Lipoproteine. Durch ihre spezifische Wechselwirkung mit Lipoproteinrezeptoren sind sie für die Aufnahme der Lipoproteine in bestimmten Geweben verantwortlich. In den Lipoproteinen des menschlichen Blutplasmas kommen mindestens neun verschiedene Apo-Lp vor, die sich anhand ihrer Größe sowie ihrer Reaktionen mit spezifischen Antikörpern und ihrer charakteristischen Verteilung auf die Lipoproteinklassen unterscheiden.



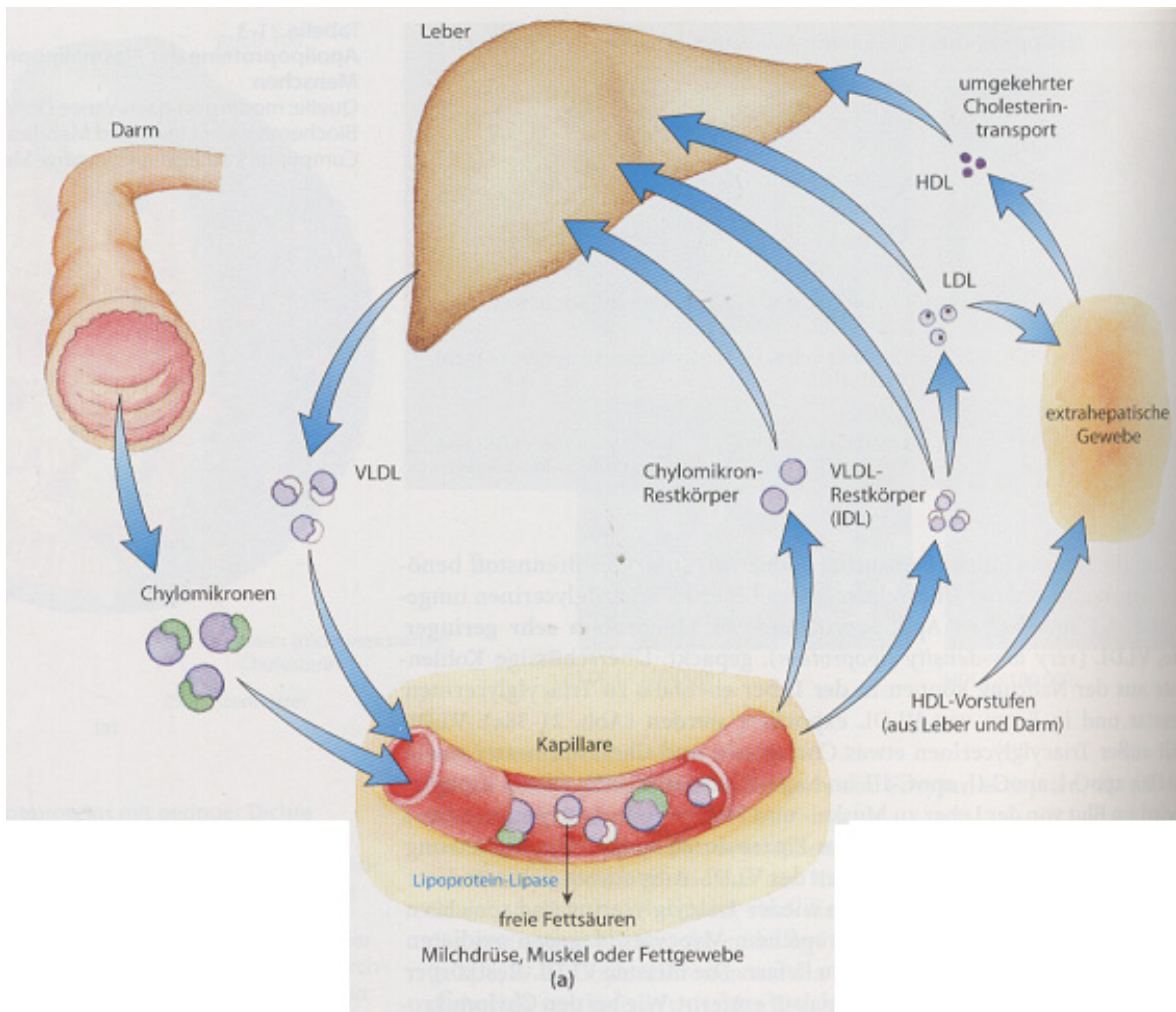


**Abbildung 1:** Struktur eines Lipoproteins mit geringer Dichte (LDL). An der Außenseite befinden sich die Apo-Lp, freie OH-Gruppen des Cholesterins und die polaren Gruppen der Phospholipide. Im inneren Core-Bereich befinden sich TG und CE. Das LDL besitzt im Unterschied zu allen anderen Lipoproteinen nur das Apolipoprotein B-100, welches eine der größten Polypeptidketten, die man kennt, enthält. Sie besitzt 4636 Aminosäuren.

Abb. 2 zeigt ein Modell für den Transport von Lipiden mittels Lipoproteinen im Plasma. CYM werden im Golgi-Apparat der Darmmukosazellen aus absorbierten Lipiden, ApoB-48, Apo A-I, A-II, A-IV sowie ApoC und gebildet und als unreife CYM in das mesenterische Lymphsystem sekretiert. Über die linke *Arteria subclavia* gelangen sie in den Blutkreislauf, wo sie sich durch Aufnahme von ApoE und ApoC-II zu reifen CYM entwickeln [5]. Diese transportieren die Nahrungsfette zu den Geweben, wo sie verbraucht oder als Brennstoff gespeichert werden. ApoC-II aktiviert die Lipoprotein-Lipase (LPL) am Kapillar-Endothel von Fettgewebe, Herz und Skelettmuskel sowie laktierenden Milchdrüsen. Die LDL hydrolysiert die TG im Inneren der CYM und ermöglicht so die Freisetzung von Fettsäuren, die entweder an Albumin gebunden weiter in der Blutbahn transportiert werden oder direkt vom darunterliegenden Gewebe aufgenommen werden. Die CYM schrumpfen mit zunehmendem Abbau der TG zu CYM-Resten (*remnants*), welche meist nur noch Cholesterin, ApoE und ApoB-100 enthalten und über Remnant-Rezeptoren von der Leber aufgenommen werden.

Wenn die Nahrung mehr Fettsäuren enthält als unmittelbar als Brennstoff benötigt werden, dann wird der Überschuss in der Leber zu TG umgesetzt und mit spezifischen Apo-Lp zu VLDL verpackt. Nach der Sekretion werden die VLDL durch die Aufnahme von ApoE, ApoC-II, ApoC-III und CE komplettiert und gelangen über den Blutkreislauf zu Fett- und Muskelgewebe. Dort bewirkt die Aktivierung der LPL durch ApoC-II die Freisetzung von Fettsäuren aus den TG der VLDL. Adipozyten im Fettgewebe nehmen diese Fettsäuren auf, synthetisieren aus ihnen wieder TG und speichern diese in intrazellulären Lipidtröpfchen.

Myocyten hingegen oxidieren hauptsächlich Fettsäuren um Energie zu liefern. Durch Verlust von TG wird ein Teil der VLDL zu VLDL-Resten, dem IDL, umgewandelt.



**Abbildung 2:** Modell für den Transport von Lipiden mittels Lipoproteinen im Plasma.

Die CYM-Restkörper und ein Teil der IDL werden durch die Wechselwirkung von ApoE oder ApoB-100 an der Partikeloberfläche von Rezeptoren erkannt und von vielen Geweben, vor allem von der Leber, aufgenommen. Der andere Teil des IDL wird durch die hepatische TG-Lipase in LDL umgewandelt, wobei alle Proteine bis auf ApoB-100 entfernt werden. Das LDL ist reich an Cholesterin und CE und transportiert diese zu extrahepatischen Geweben, wo es über den LDL-Rezeptor und teils auch durch das „LDL-receptor related protein“ (LRP) aufgenommen wird. Das LRP ist ein transmembranes Glykoprotein an der Zelloberfläche, das selektiv sowohl an ApoB-100 als auch an ApoE bindet. Wahrscheinlich sind noch weitere Faktoren im Aufnahmeprozess involviert, wobei auch Heparansulfat als möglicher Bindungspartner diskutiert wird [6]. Die LPL besitzt eine gewisse Affinität zu LRP [7],

wahrscheinlich durch ihre Domänen am COOH-Ende [8]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CYM in Gegenwart von LPL besser an Hepatomazellen binden [9].

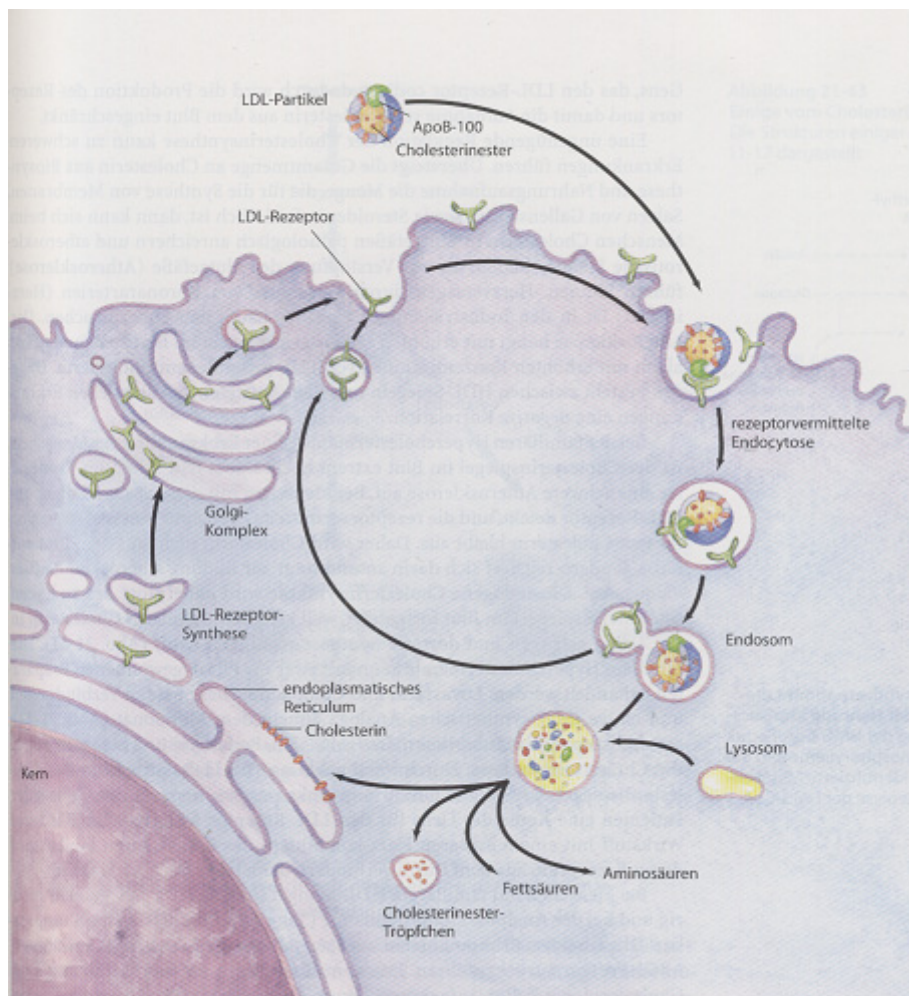
Die Bildung des HDL beginnt in der Leber und im Dünndarm in Form kleiner, proteinreicher Partikel, die relativ wenig Cholesterin und keine CE enthalten. HDL enthält ApoA-I, ApoA-II, ApoC-I, ApoC-II und andere Apo-Lp sowie das Enzym Lecithin-Cholesterin Acyltransferase [LCAT, 10,11], welches die Bildung von CE aus Lecithin (Phosphatidylcholin) und Cholesterin von CYM-Resten und IDL katalysiert. Die LCAT an der Oberfläche naszierender HDL-Partikel wird durch ApoA-I stimuliert und bildet CE, die in den Core-Bereich des HDLs gelangen. Durch weitere Aufnahme von TG wird aus dem scheibenförmigen naszierenden HDL ein reifes, kugelförmiges HDL-Partikel, welches von der Leber durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen wird. Ein Teil des Cholesterins im HDL wird jedoch durch einen anderen Mechanismus zu den Geweben transportiert. HDL kann in der Leber und in steroidogenen Geweben an Rezeptorproteine (SR-BI) binden. Der Scavenger Rezeptor- class B Type I (SR-BI) ist ein 82 kDa großes Glykoprotein an der Zelloberfläche, welcher hohe Affinität zum HDL aufweist und besonders stark in der Nebenniere und den Hoden exprimiert wird, wo es an der Synthese der Steroidhormone beteiligt ist [12,13]. Diese Rezeptoren vermitteln keine Endozytose, sondern eine partielle und selektive Aufnahme von Cholesterin und anderen Lipiden des HDL in die Zelle [14].

Entladenes HDL kann auch Cholesterin, das in extrahepatischen Geweben gespeichert ist, aufnehmen und es zur Leber befördern (reverser Cholesterintransport). Auf einem solchen umgekehrten Transportweg bewirkt die Interaktion naszierender HDL-Partikel mit SR-BI Rezeptoren in cholesterinreichen Zellen den Efflux von Cholesterin zum HDL, welches das Cholesterin zur Leber zurücktransportiert.

Auf einem zweiten Weg interagiert ApoA-I in entladener HDL mit einem aktiven Transporter, dem „ATP-binding cassette transporter A1“ (ABCA1), in einer cholesterinreichen Zelle. Das ApoA-I (und vermutlich auch das HDL) wird durch Endozytose aufgenommen, wieder mit einer Ladung Cholesterin reseziert und zur Leber transportiert. Das ABCA1 Protein gehört zu der Familie der ABC-Transporter, welche ATP bindende Bereiche haben. Diese Proteine transportieren verschiedene Ionen, Aminosäuren, Vitamine, Steroide und Salze von Gallensäuren aktiv durch Plasmamembranen [15].

### 1.2.2 Rezeptorvermittelte Endozytose von Cholesterin

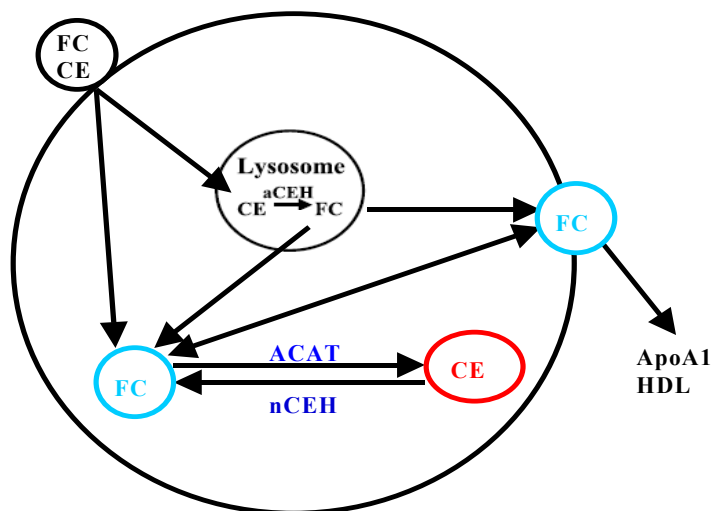
Abb. 3 stellt ein Modell der rezeptorvermittelten Endozytose des Cholesterins in einer Zelle dar. Jedes LDL-Partikel im Blutkreislauf enthält ApoB-100, welches an den Zellen von LDL-Rezeptoren erkannt wird. Die Bindung von LDL an einen LDL-Rezeptor initiiert die Endozytose und somit gelangen das LDL und sein Rezeptor in einem Endosom in die Zelle. Dieses Endosom verschmilzt mit einem Lysosom, das eine saure Cholesterinesterhydrolase (aCEH) enthält, die die CE hydrolysieren kann, wobei Cholesterin und Fettsäuren in das Zytosol freigesetzt werden. Das ApoB-100 des LDL wird zu Aminosäuren abgebaut, die ebenfalls ins Zytosol abgegeben werden, doch der LDL-Rezeptor entgeht dem Abbau und kehrt zur Zelloberfläche zurück, wo er erneut LDL-Partikel binden kann. Das freigesetzte Cholesterin gelangt in das endoplasmatische Retikulum (ER), welches das wichtigste regulatorische Kompartiment in der Cholesterin Homöostase darstellt.



**Abbildung 3:** Aufnahme von Cholesterin in die Zelle durch rezeptorvermittelte Endozytose.

Das ER ist der erste Ort für die Cholesterinbiosynthese und Veresterung und neue Daten zeigen, dass der Überschuss an freiem Cholesterin (FC) seine toxischen Effekte zuerst im ER ausübt [5]. Ein Überschuss an Cholesterin hemmt die Cholesterinbiosynthese durch allosterische Aktivierung des ER- lokalisierten Enzyms Acyl-Coenzym A:Cholesterin Acyltransferase [ACAT, 16]. Die ACAT verestert FC, welches dadurch als CE in Lipidregionen in der Zelle, zusammen mit TG, gespeichert wird. Diese Veresterung durch die ACAT ist ein Schutzmechanismus der Zelle, da CE weniger toxisch sind als FC. Diese CE können jedoch durch die Aktivität einer neutralen CEH (nCEH) wieder in FC umgewandelt und an der Plasmamembran durch den ABCA1 Transporter an den extrazellulären Akzeptor HDL abgegeben werden (Abb. 4).

Die Synthese und Hydrolyse von CE durch die ACAT und eine nCEH spielen eine große Rolle bei der Schaumzellbildung und somit in der Entwicklung von Atherosklerose.



**Abbildung 4:** Zellulärer Cholesterinmetabolismus. CE werden in die Zelle aufgenommen und in den Lysosomen durch eine aCEH in FC hydrolysiert. Dieses FC wird entweder an der Plasmamembran an extrazelluläre Akzeptoren weitergegeben oder an den Membranen des ER durch die ACAT verestert und gespeichert. Das gespeicherte CE kann wiederum durch eine nCEH in FC hydrolysiert und an der Plasmamembran abgegeben werden.

Die Oberflächenregionen der Plasmamembran und des ERs sind in vielen Zellen sehr ähnlich, jedoch befindet sich viel mehr Cholesterin in der Plasmamembran (65-80%). Das ER enthält lediglich 0.1-2 % des Gesamtcholesterins einer Zelle [17]. Es herrscht jedoch ein dynamischer Transport zwischen den beiden Kompartimenten, denn es wurde bewiesen, dass ein Großteil des Cholesterins aus der Plasmamembran innerhalb von 40 Minuten zum ER und wieder zurück transportiert werden kann [18].

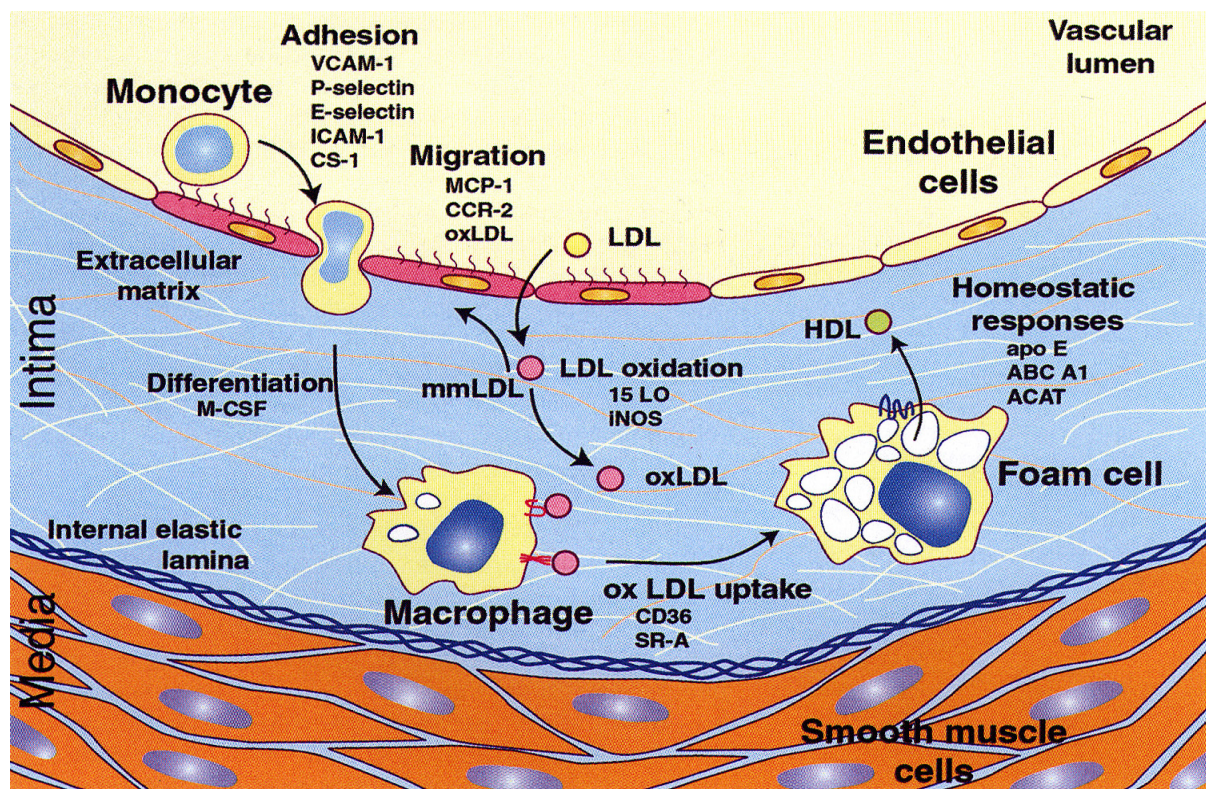
### *1.2.3 Regulation der Biosynthese des Cholesterins*

Die Cholesterinbiosynthese erfordert viel Energie und daher ist es für einen Organismus vorteilhaft, wenn er die Synthese von Cholesterin so regulieren kann, dass körpereigenes Cholesterin durch Nahrungscholesterin ergänzt wird. Bei Säugetieren wird die Produktion von Cholesterin durch dessen Konzentration in den Zellen und unter anderem durch die Hormone Insulin und Glukagon reguliert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Cholesterinbiosynthese ist die Umsetzung von  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) zu Mevalonat. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, die HMG-CoA Reduktase, ist ein komplexes regulatorisches Enzym, dessen Aktivität um bis zu einem Faktor 100 variieren kann. Die HMG-CoA Reduktase wird unter anderem hormonell reguliert und kann in phosphorylierter (aktiver) Form und nicht phosphorylierter (inaktiver) Form vorliegen. Während Glukagon die Phosphorylierung (Inaktivierung) stimuliert; fördert Insulin hingegen die Dephosphorylierung, aktiviert das Enzym und begünstigt die Cholesterinbiosynthese.

Weiters gibt es „Sterol regulatory binding proteins“ (SREBPs), das sind Transkriptionsfaktoren, die die Cholesterinsynthese beeinflussen [19]. Es gibt 3 SREBP Proteine: SREBP-2 aktiviert in erster Linie Gene, die für die Cholesterinsynthese wichtig sind. SREBP-1a und SREBP-1b aktivieren Gene für die Fettsäuresynthese. SREBPs liegen als inaktive Proteine in der ER-Membran vor, die bei Mangel an Cholesterin in der Zelle in das ER abgegeben werden, und dann mit Hilfe des „SREBP cleavage-activating protein“ (SCAP) in den Golgi-Apparat gelangen. Dort treten nun die beiden Proteasen „Site-1 protease“ (S1P) und „Site-2 protease“ (S2P) in Erscheinung. Die Membran gebundene Serinprotease S1P schneidet die SREBPs in 2 Hälften. Die  $\text{NH}_2$ -terminale Domäne wird durch einen weiteren Schnitt der Membran gebundenen Zink-Metalloprotease S2P von der Membran in den Kern abgegeben. Diese  $\text{NH}_2$ -Domäne stellt jetzt das nukleare SREBP dar, das durch Binden an nicht palindromische „sterol response elements“ in Promotor- und Enhancer-Regionen von Zielgenen als Transkriptionsaktivator fungiert [20]. Sind nun genug Sterole in der Zelle, schalten sich die ER Membranproteine Insig-1 und Insig-2 ein, die eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Lipidsynthese spielen. Sie binden einerseits an die HMG CoA Reduktase, wo sie zum Abbau des Enzyms führen [21]. Andererseits binden sie an SCAP, das nun die SREBPs nicht mehr aus dem ER geleiten kann und somit wird die Transkription der Zielgene verhindert [22].

### 1.3 Die Rolle der Makrophagen und der Schaumzellbildung bei Atherosklerose

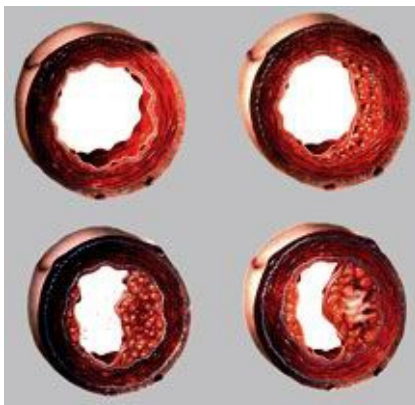
Abb. 5 zeigt die Transformierung von Makrophagen zu Schaumzellen. Cholesterin wird neben anderen Lipiden im Blutplasma mittels LDL transportiert. Sind nun zuviel Cholesterin und Lipide vorhanden, lagert sich der Überschuss an LDL-Partikeln in der Intima der Arterienwand ab. Die LDL-Partikel durchlaufen Modifikationen wie Oxidation oder Lipolyse und stimulieren dann die Endothelzellen, die nun Adhäsionsmoleküle produzieren, wie z.B. das E- und P-Selektin. Nach einigen Tagen werden Monocyten, körpereigene Immunzellen, aktiviert. Auch die Produktion von chemotaktischen Molekülen, wie dem „monocyte chemotactic protein 1“ (MCP-1) und Wachstumsfaktoren stimulieren die Anlagerung der Monocyten an der Endotheloberfläche der Arterienwand und lösen einen Entzündungszustand aus.



**Abbildung 5:** Transformierung von Makrophagen zu Schaumzellen. Makrophagen nehmen den Überschuss an oxidiertem LDL-Cholesterin mittels SR unkontrolliert auf und differenzieren so zu Schaumzellen. Der Efflux an Cholesterin zu extrazellulären Akzeptoren wie HDL ist nie so groß wie die Aufnahme und so wird das Cholesterin in Fetttropfchen gespeichert.

Diese Monocyten können dann durch das Endothel in die Intima transmigrieren, wo sie proliferieren und durch Stimulation des „macrophage colony-stimulating factor“ (M-CSF) in Makrophagen differenzieren. Diese Makrophagen nehmen den Überschuss an modifiziertem LDL mittels scavenger Rezeptoren (SR, z.B. CD36) auf und transformieren zu Schaumzellen.

Diese Schaumzellen speichern die Fette und das Cholesterin in riesigen Lipidtröpfchen. Da es über SR zu einer unkontrollierten Aufnahme des modifizierten LDL-Cholesterins kommt, wird durch den Efflux zwar ein Teil des Cholesterins durch den ABCA1 Transporter an das extrazelluläre HDL abgegeben, aber nie soviel wie aufgenommen wird (Abb. 5). Nach einiger Zeit sterben die Schaumzellen ab und der lipidreiche Inhalt der Zellen bildet nekrotische Läsionen. Dadurch werden glatte Muskelzellen angezogen, die fibrinogene Elemente abgeben und es entstehen atherosklerotische Plaques, die enorm an Größe zunehmen können. Es kommt mit der Zeit zur Beeinflussung des Blutstroms der Arterien, da deren Durchmesser erheblich verkleinert wird (Abb. 6). Weiters kommt es zu Thrombosen und schließlich zum Herzinfarkt durch Verschluss der Koronararterien. Die Schaumzellbildung ist somit ein wichtiges Kennzeichen der Entwicklung von Atherosklerose. Eine erhöhte nCEH-Aktivität in Makrophagen könnte der Schaumzellbildung entgegenwirken, das hauptverantwortliche Enzym konnte aber bislang noch nicht gefunden werden. Es wurde lange Zeit die Hormon-sensitive Lipase (HSL) für die einzig wichtige nCEH in Makrophagen gehalten. Versuche mit HSL Knock-out (ko) Mäusen konnten diese Annahme jedoch widerlegen [23].



**Abbildung 6:** Querschnitte einer Arterie. Man sieht die zunehmende Verstopfung der Arterie durch atherosklerotische Plaques. Durch Verkleinerung des Querschnitts kommt es erheblich zur Beeinflussung des Blutstroms.

#### **1.4 Die Hormon-sensitive Lipase (HSL)**

Die HSL ist ein Enzym, das als Homodimer [24] aktiv ist. Sie hat ein breites Substratspektrum, denn sie kann TG, Diglyzeride (DG), Monoglyzeride, CE und Retinolester hydrolysieren [25-27] und wahrscheinlich auch noch andere Substrate, die noch nicht identifiziert wurden. Die HSL ist hauptsächlich verantwortlich für die Hydrolyse von DG und die Produktion von freien Fettsäuren im Fettgewebe [28], sie wird aber auch in anderen Geweben exprimiert, wie zum Beispiel den Hoden, den Nebennieren, den Ovarien, dem Skelettmuskel, dem Herzmuskel und den Makrophagen [29-34].



Das HSL-Protein in der Maus ist 83 kDa (759 Aminosäuren) groß und wird von einer 10.4 kb großen mRNA kodiert. Das humane Homolog dazu weist eine Sequenzhomologie von 85% auf [35]. Das humane HSL-Protein ist 88 kDa groß (775 Aminosäuren) und wird von einer 11 kb großen mRNA kodiert, die von einem autosomalen Gen, lokalisiert am Chromosom 19q13.3, transkribiert wird [36].

#### *1.4.1 Regulation der HSL*

Die Aktivität der HSL wird durch verschiedene Hormone reguliert. Katecholamine und Glukagon aktivieren die Lipolyse, Insulin und Adenosin sind die Gegenspieler dazu und inhibieren die Lipolyse [37]. In Adipozyten induzieren Katecholamine die Phosphorylierung, der HSL und des Perilipins und führen so zu einer Aktivierung der Lipolyse [38]. Perilipin ist das häufigste Protein an der Oberfläche von Lipidpartikeln in Adipozyten und spielt eine wichtige Rolle bei der TG-Speicherung und Hydrolyse. Die Stimulation der Lipolyse durch Hormone führt zur Phosphorylierung des Perilipins und der HSL und dadurch wird die HSL an die Oberfläche der Lipidpartikel transportiert und beginnt mit der Fragmentierung der Partikel [39]. Insulin wirkt antilipolytisch: Durch Aktivierung der Phosphodiesterase 3B kommt es zu einem niedrigeren cAMP Spiegel und somit wird die Lipolyse hinunterreguliert [37]. Lipotransin ist ebenfalls ein Protein an der Oberfläche von Lipidpartikeln in Adipozyten und kann mit der HSL interagieren. Die Interaktion ist abhängig von der Phosphorylierung der HSL durch die Proteinkinase A und kann durch ATP-Hydrolyse gespalten werden. Insulin stabilisiert diesen Komplex, bis es zur Modifizierung des Lipotransin kommt und der Komplex durch die ATPase Aktivität des Lipotransin gespalten wird. Lipotransin führt direkt zur Umlagerung der HSL durch hormonelle Regulation [40].

#### *1.4.2 HSL im Fettgewebe*

Die Hydrolyse von TG-Speichern im Fettgewebe und die anschließende Abgabe von freien Fettsäuren in die Zirkulation sind essentiell für den Energiehaushalt des Körpers. Die freien Fettsäuren werden mit Hilfe der Lipoproteine zu den Zielgeweben transportiert, aufgenommen und danach entweder in den Mitochondrien für die Energiegewinnung verwendet oder verestert und in Lipidtröpfchen gespeichert.

Die HSL wird sowohl im weißen (WAT) als auch im braunen (BAT) Fettgewebe exprimiert. Lange Zeit wurde angenommen, dass die HSL für die Hydrolyse von TG im WAT und BAT verantwortlich ist [41]. Diese These wurde unter anderem auch dadurch unterstützt, dass die Überexpression der HSL in Adipozyten die Akkumulation von TG verhindert [42]. Durch Versuche in HSL ko Mäusen wurde jedoch gezeigt, dass die HSL das limitierende Enzym für

die Hydrolyse von DG sein muss [43]. Den initiierenden Schritt in der Hydrolyse von TG im Fettgewebe katalysiert jedoch die „adipose triglyceride lipase“ (ATGL) [44]. In Abwesenheit der HSL kommt es zu einer 21x höheren Akkumulation von DG in der Zelle, was beweist, dass die ATGL nur TG spalten kann. Die HSL kann neben DG und TG auch CE und Retinolester spalten, hat aber eine 10x höhere Spezifität zu DG [45]. Man glaubt also, dass ATGL und HSL gemeinsam für die Hydrolyse von TG im Fettgewebe zuständig sind.

Ein gestörter Stoffwechsel im Fettgewebe, wie in HSL ko Mäusen beobachtet wurde, hat großen Einfluß auf den Energiehaushalt und die Synthese von Plasmalipoproteinen, da es zur Akkumulation von DG kommt und weniger freie Fettsäuren in die Zirkulation abgegeben werden [43].

Fettgewebe beinhaltet einen der größten Cholesterin-pools des gesamten Körpers mit dem höchsten Gehalt an mg pro Zellprotein aller Gewebe [46]. Der größte Teil des Cholesterins ist im Gegensatz zu anderen Geweben aber nicht verestert. In HSL ko Mäusen findet man im Fettgewebe keine CEH-Aktivität mehr und sehr hohe Mengen an CE, also kann man davon ausgehen, dass die HSL für die Hydrolyse von CE im Fettgewebe verantwortlich ist [47].

Das Fettgewebe spielt auch eine große Rolle in der Speicherung und im Metabolismus von Retinol, Vitamin A und dessen Analoga [48]. 60 % des Retinols ist in Adipozyten in Form von Retinolestern gespeichert [49]. Es konnte gezeigt werden, dass die HSL Retinolester hydrolysieren kann und bestätigt somit das breite Substratspektrum der HSL [50].

### *1.4.3 HSL in Makrophagen*

Die Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen spielt eine große Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose. Makrophagen nehmen große Mengen an CE auf, speichern diese in CE-Tröpfchen und formieren zu Schaumzellen. Diese CE können aber durch eine nCEH in FC hydrolysiert werden, welches durch Transporter an extrazelluläre Akzeptoren (HDL) abgegeben werden kann.

Bereits vor 20 Jahren wurde die Existenz einer cytosolischen CEH, die für die Hydrolyse von CE in Makrophagen verantwortlich ist, bewiesen [51]. Dieser Mechanismus war der Hydrolyse und Veresterung von TG im WAT sehr ähnlich und deshalb wurde angenommen, da die HSL auch im Makrophagen exprimiert wird [52] und CEH-aktivität besitzt [53], dass sie die Aufgabe der CEH im Makrophagen und anderen Geweben übernimmt. Jedoch ergaben Versuche in HSL ko Mäusen eine unveränderte CEH-Aktivität [23] und somit den Beweis, dass die HSL nicht die entscheidende Rolle in der Hydrolyse von CE in den Makrophagen spielt.

#### *1.4.4 HSL in anderen Geweben*

##### *1) Nebenniere*

Im Gegensatz zu den Makrophagen gibt es in der Nebenniere die Vermutung, dass die HSL die wichtige, wenn nicht die einzige, CEH ist, da es bei Versuchen an HSL ko Mäusen zum Verlust der CEH-Aktivität in der Nebenniere kam und sich große Lipidanlagerungen in der „zona fasciculata“ und „glomerulosa“ bildeten [54, 55].

##### *2) Hoden*

Die HSL spielt auch eine große Rolle in den Hoden. Homozygote männliche HSL ko Mäuse sind steril, da es zu Abnormalitäten in der Morphologie der Hoden und in der Entwicklung der Spermien kommt [23]. Die HSL wird jedoch nur in den Sertolizellen und nicht in den Leydigzellen exprimiert, was bedeutet, dass sie eine Rolle im Metabolismus der Lipidpartikel in den Sertolizellen spielt, aber nicht in der Biosynthese von Steroidhormonen in den Leydigzellen [56]. Der Grund für die Infertilität der Männchen könnte das große Substratspektrum der HSL sein. Der Verlust der CEH-Aktivität reduziert wahrscheinlich die Verfügbarkeit von freiem Cholesterin, welches für die Entwicklung der Spermien notwendig ist [57]. Der Verlust der Retinolesterhydrolaseaktivität führt zu geringeren Mengen an Retinolsäure, welche ebenfalls für die Spermatogenese erforderlich ist [58], und der Verlust der HSL im Katabolismus der DG führt zur Akkumulation von DG in den Hoden [43].

##### *3) Dünndarm*

Im Dünndarm ist die HSL für die gesamte CEH-Aktivität in Enterozyten zuständig [59]. Es ist vorstellbar, dass die intestinale HSL an der Regulation der Cholesterinabsorption und dem vaskulären Cholesterintransport beteiligt ist.

##### *4) Muskelgewebe*

Im Muskelgewebe hat die HSL wahrscheinlich TG-Lipaseaktivität, um den Mitochondrien freie Fettsäuren für die Oxidation bereitzustellen [60].

### **1.5 Ziel dieser Arbeit**

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, lipolytische Enzyme mit einer  $\alpha/\beta$  Hydrolasedomäne zu identifizieren und deren Substratspezifität zu bestimmen. Die Expressionsmuster der Gene wurden in verschiedenen Geweben der Maus untersucht und dann mit einem house keeping gene verglichen. Weiters wurden die Enzymaktivitäten der Kandidatenproteine für Triglyzerid-, Cholesterinester-, und Retinolesterhydrolase bestimmt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Lösungen und Puffer

Alle Arbeiten wurden mit deionisiertem H<sub>2</sub>O oder H<sub>2</sub>O bidest. durchgeführt. Für Arbeiten mit RNA wurden RNasen inaktiviert, indem 0.1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugesetzt, die Flasche über Nacht in den Abzug gestellt und am nächsten Tag autoklaviert wurde. Die Nährmedien wurden gleich nach der Herstellung autoklaviert, sowie auch die meisten Puffer und Lösungen. Die in der Tabelle angeführten Mengen an Chemikalien beziehen sich – wenn nicht extra darauf verwiesen – auf 1 Liter fertige Lösung.

**Tabelle 1:** Lösungen und Stocks

<b>Lösungen/Stocks</b>		<b>Firma</b>	<b>Lagerung</b>
Acrylamid-Lösung	300 g Acrylamid 8 g Bis-Acrylamid	Sigma	4°C
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O steril filtrieren	Roche	-20°C im Dunkeln
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 ml DEPC	Sigma	RT
dNTP-Mix	jeweils 10mM Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) H <sub>2</sub> O ad 100 µl	Roth	-20°C
0.5M EDTA	186 g EDTA-Dinatriumsalz pH 8.0	Roth	RT
Ethidiumbromid	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Sigma	4°C im Dunkeln
IPTG	28 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Appli Chem Biochemica	-20°C
lacZ-Färbelösung (pro 6-well)	250 µl 20mM K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 250 µl 20mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 1 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> 50 µl 2%iges X-Gal 449 µl PBS	Merck Merck Merck Roth	4°C
5 M NaCl	292.2 g NaCl	Merck	RT
3 M NaAc	408 g NaAc · 3H <sub>2</sub> O (pH 5.2 mit Eisessig)	Roth	RT
RNase	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Qiagen	-20°C
Sevac	96 ml Chloroform 4 ml Isoamylalkohol mit H <sub>2</sub> O überschütten	Fluka Biochemica Fluka Biochemica	RT

Lösungen/Stocks		Firma	Lagerung
20% SDS	200 g SDS bei 65°C lösen nicht autoklavieren!	Merck	RT
1M Tris HCl	121.1 g Tris autoklavieren (pH 7.5 mit HCl)	Invitrogen	RT
4%iges X-Gal	40 mg/ml in DMF lösen	Roth	- 20°C

**Tabelle 2:** Puffer und Medien

Puffer/Medien	Zusammensetzung	Firma	Lagerung
10x Blotpuffer	12.1 g Tris 30 g Glycin + 1 mg/ml EDTA und NaN <sub>3</sub>	Invitrogen Merck Roth	RT
10x Blotwaschpuffer	5 g Tween 90 g NaCl 100 ml 1M Tris pH 7.4	Merck Merck Invitrogen	RT
DNA- Ladepuffer	5 ml Glycerin 250 µl 40x TAE H <sub>2</sub> O ad 10 ml + eine Spatelspitze Bromphenolblau	Merck  Merck	-20°C
LB (Luria-Bertani)-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7.4 autoklavieren	Sigma	RT
LB Platten	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7.4 15 g Agar autoklavieren	Sigma	4°C
Lysis Puffer (Assay)	8.56 g Saccharose 174.2 mg PMSF 2 Tabletten Complete in 2 ml H <sub>2</sub> O 37.2 mg EDTA 15.42 mg DTT ad 100 ml Phosphatpuffer (pH 7.0)	Merck Sigma Roche Roth Merck	4°C
Lysis Puffer I	5 ml 1M Glucose 2.5 ml 1M Tris pH 7.5 2 ml 0.5M EDTA 90.5 ml H <sub>2</sub> O	Merck Invitrogen Roth	4°C
Lysis Puffer II	0.2 ml 10M NaOH 0.5 ml 20% SDS 9.3 ml H <sub>2</sub> O	Merck Merck	4°C
Lysis Puffer III	147.2 g Kac 143 ml CH <sub>3</sub> COOH H <sub>2</sub> O ad 500 ml	Merck Merck	4°C

<b>Puffer/Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Firma</b>	<b>Lagerung</b>
10x MOPS	10.5 g MOPS 1.7 g NaAc 5 ml 0.5M EDTA pH 7.0 ad 250 ml mit DEPC-H <sub>2</sub> O	Roth Roth Roth  Sigma	RT im Dunkeln
10x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 21.65 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4 mit HCl	Merck Merck Merck Merck	4°C
Phosphatpuffer (Assay)	6.8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.0)	Merck	4°C
RNA- Ladepuffer	1.44 deionisiertes Formamid 0.28 ml 10x MOPS 0.52 ml 37% Formaldehyd 0.4 ml DEPC-H <sub>2</sub> O 0.2 ml Ethidiumbromid (10mg/ml) Bromphenolblau	Merck Roth Sigma Sigma Sigma Merck	-20°C
SDS-Ladepuffer	2.3g SDS 0.76 g Tris 10 ml Glycerin H <sub>2</sub> O ad 45 ml (pH 6.8 mit HCl) Ein Tropfen Bromphenolblau β- mercaptoethanol (3%)	Merck Invitrogen Merck  Merck Merck	RT
SDS-Puffer	30.3 g Tris 150.1 g Glycerin 10 g SDS	Invitrogen Merck Merck	RT
SDS- Sammelgelpuffer	60 g Tris pH 6.8 mit HCl	Invitrogen	4°C
SDS- Trenngelpuffer	182 g Tris 4 g SDS	Invitrogen Merck	4°C
40x TAE	193.6 g Tris 108.9 g NaAc 15.2 g EDTA	Invitrogen Roth Roth	RT
1x TE	1 ml 1M Tris-HCl pH 7.5 0.2 ml 0.5M EDTA ad 100ml mit H <sub>2</sub> O	Invitrogen Roth	RT

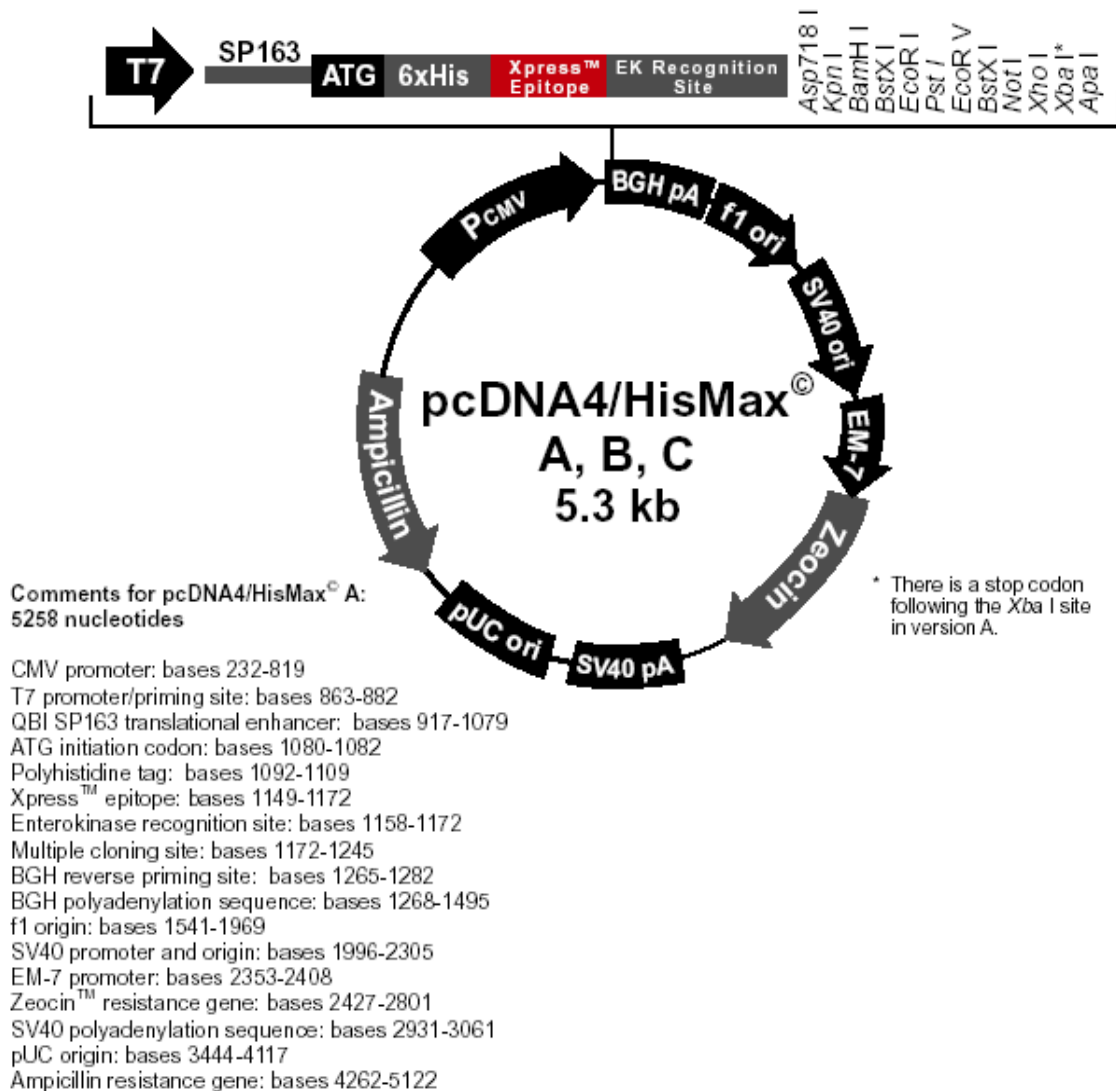
## **2.1.2 Vektoren**

### **2.1.2.1 pSTBlue-1**

Alle Konstrukte wurden zuerst in den "TA Vektor" pSTBlue-1 (3851 kb, Novagen) kloniert. Dieser Vektor hat einen 3'T-Überhang, an den ein 3'A, das durch die Taq Polymerase während der PCR angehängt wird, ligiert werden kann.

### 2.1.2.2 pcDNA4/HisMax A

Der Vektor pcDNA4/HisMaxA (5.3kb, Invitrogen) ist ein Expressionsvektor für Säugerzellen. Er besitzt die Resistenzgene Ampicillin und Zeocin für die Selektion und das Xpress™ Epitop und den 6x His Tag als Erkennungssequenzen für Antikörper, die sich am c-terminalen Ende befinden (Abb. 8).

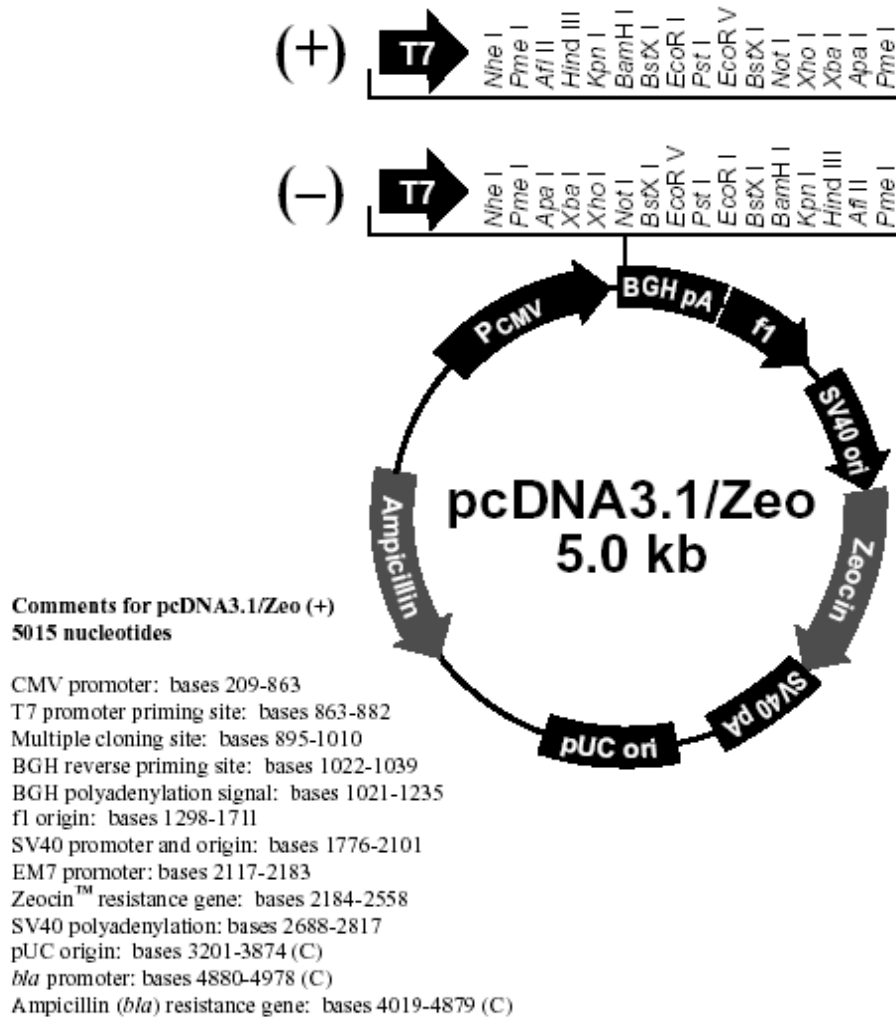


**Abbildung 8:** Vektorkarte des Expressionsvektors pcDNA4/HisMax A. Die Restriktionsenzyme der multiplen Klonierungsstelle, sowie die Größe und Platzierung des Zeocin- und Ampicillin Resistenzgens, des CMV-Promotors, des Xpress™ Epitops, des 6x His Tags, des Startcodons und der Enterokinase Erkennungsstelle.



### 2.1.2.3 pcDNA3.1/Zeo(+)

Der Vektor pcDNA3.1/Zeo(+) (5.0kb, Invitrogen) ist ein Expressionsvektor für Säugerzellen. Er besitzt die Resistenzgene Ampicillin und Zeocin für die Selektion, besitzt aber keine Erkennungssequenzen für Antikörper (Abb. 9). Dieser Vektor wurde für Versuche mit spezifischen Inhibitoren verwendet um auszuschließen, dass die Erkennungssequenzen (HisTag, Xpress<sup>TM</sup> Epitop) die Aktivität des Proteins beeinflussen.



**Abbildung 9:** Vektorkarte des Expressionsvektors pcDNA3.1/Zeo. Die Restriktionsenzyme der multiplen Klonierungsstelle, sowie die Größe und Platzierung des Zeocin- und Ampicillin Resistenzgens und des CMV-Promotors.

### 2.1.3 Oligonukleotidprimer für die PCR

Die kurzen Primer (Tab. 3) wurden für Polymerasekettenreaktionen mit der Hotfire-Polymerase verwendet, um die Expression der einzelnen Gene in den verschiedenen Geweben der Maus zu bestimmen.

Sämtliche Primer wurden bei Invitrogen bestellt:

Genname	Primer-bezeichnung	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>A</sub> (°C)
pCEH-1	ET-AK037for	67	53
	ET-AK037rev	66	53
pCEH-2	ET-NM023for	71	56
	ET-NM023rev	73	56
pCEH-3	ET-NM144for	63	53
	ET-NM144rev	64	53
pCEH-4	ET-NM172for	72	55
	ET-NM172rev	69	55
pCEH-5	ET-NM183for	76	54
	ET-NM183rev	70	54
pCEH-6	ET-NM197for	72	55
	ET-NM197rev	67	55
pCEH-7	Neu-XM146for	73	56
	Neu-XM146rev	71	56
pCEH-8	ET-AK052for	65	56
	ET-AK052rev	69	56
pCEH-9	XM357 fwd	77	56
	XM357 rev	77	56

**Tabelle 3:** Primer (20-24 bp) für RT-PCR, pCEH...putative Cholesteryl ester hydrolase, T<sub>m</sub>... Schmelztemperatur, T<sub>A</sub>... Annealing-Temperatur

Die langen Primer (Tab. 4) wurden für die Amplifizierung der gesamten cDNA der verschiedenen Gene verwendet, die man für die weiteren Versuche dieser Arbeit benötigte.

Genname	Primer-bezeichnung	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>A</sub> (°C)
pCEH-1	AK37for	68	52
	AK37rev	66	52
pCEH-2	NM023Neufor	74	56
	NM023Neurev	69	56
pCEH-3	NM144for	64	53
	NM144rev	69	53
pCEH-4	NM172Neufor	68	52
	NM172Neurev	67	52
pCEH-5	NM183Neufor	73	54
	NM183Neurev	62	54
pCEH-6	NM197for	76	54
	NM197rev	70	54
pCEH-7	XM146gnfor	69	56
	XM146gnrev	74	56
pCEH-8	XM193Neufor	67	53
	XM193Neurev	79	53
pCEH-9	XM357for	68	54
	XM357rev	70	54

**Tabelle 4:** Primer (30-33 bp) für RT-PCR, pCEH...putative Cholesteryl ester hydrolase, T<sub>m</sub>... Schmelztemperatur, T<sub>A</sub>... Annealing-Temperatur

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gesamt RNA- Isolierung mittels TriReagent<sup>®</sup> aus Mausgewebe:**

C57 Bl/6 Mäuse (Wildtyp) wurden mittels Genickbruch getötet, die Gewebe mit sterilem Sezierbesteck isoliert und danach sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebe wurden bis zur RNA-Isolierung bei -70°C gelagert.

Für die RNA-Isolierung wurden die Gewebe in gefrorenem Zustand abgewogen und in 15 ml Sarstedt-Röhrchen (Greiner) mit TriReagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Deutschland) vermengt. Pro 50 mg Gewebe (Ausnahme: 100 mg von Gehirn und weißem Fettgewebe) wurde 1ml TriReagent<sup>®</sup> verwendet. Die Gewebe wurden mit einem Ultra Turrax homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde pro ml TriReagent<sup>®</sup> 0.1 ml 1-Brom-3-chlorpropan (BCP) dazupipettiert, gründlich gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugieren bei 8,500 rpm und 4°C für 15 min (Inula RC5 Superspeed Zentrifuge) erfolgte die Phasentrennung in eine untere organische und eine obere wässrige Phase. Die wässrige Phase wurde abgehoben und die RNA durch Zugabe von 0.5 ml Isopropanol pro ml TriReagent<sup>®</sup> ausgefällt und 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation (8,500 rpm, 4°C, 10 min) wurde der Überstand vorsichtig abgeschüttet und das RNA-Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol pro 1 ml TriReagent<sup>®</sup> gewaschen (8,500 rpm, 4°C, 5 min). Das Pellet wurde luftgetrocknet und je nach Größe in 100 – 200 µl DEPC- H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei -70°C gelagert.

### **2.2.2 RNA Agarosegel**

Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wurde ein 1%iges RNA Agarosegel gefahren. Für 110 ml Agarosegel wurden 1.1 g Agarose in 12 ml 10x MOPS und 88.8 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 54°C mit 18.7 ml Formaldehydlösung (37%) unter dem Abzug versetzt. Das Gel wurde in einer zuvor mit Ethanol gereinigten Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach 1 h konnte man den Kamm entfernen und die Proben sowie den Standard auftragen und das Gel 50 min bei 80V laufen lassen.

## **2.2.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken**

### **2.2.3.1 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription dient der Umschreibung von RNA in DNA. Dazu wurde ein Enzym aus dem Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus (MMLV) eingesetzt. Für die Initiation der Reaktion wurden sogenannte „random“- Primer ( Oligo dT-Primer, Sigma) verwendet. Als Endprodukt der Reaktion entstanden RNA-DNA Hybriddoppelstränge, die zur Amplifikation in einer PCR-Reaktion eingesetzt werden konnten.

*Pro Ansatz wurde eingesetzt:*

1 µl Oligo dT Primer

1 µl dNTP-Mix

3 µg RNA

mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 12µl aufgefüllt.

Nachdem man den Ansatz auf Eis zusammenpipettiert hat, wurde er 5 min bei 65°C inkubiert und danach wieder auf Eis gelagert. Danach wurden 4 µl 5x Puffer (Invitrogen), 2 µl DTT (Invitrogen) und 1 µl RNasin (Promega) dazupipettiert und nach gutem Mischen 2 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben und 50 min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde danach noch die Reverse Transkriptase 15 min bei 70°C inaktiviert. Die cDNA wurde bei -70°C eingefroren.

### **2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der PCR-Methode kann man einen spezifischen Abschnitt einer eingesetzten DNA amplifizieren. Spezifische „forward“ und „revers“ Primer ermöglichen in Gegenwart von einer hitzestabilen Polymerase und den vier Deoxynukleosidtriphosphaten die Synthese eines neuen DNA-Stranges, der komplementär zu jeweils einem Strang der eingesetzten DNA ist.

Insgesamt besteht die PCR aus drei Schritten: Denaturierung der DNA, „Annealing“ bzw. Binden der Primer an die Einzelstränge und Extension bzw. Verlängerung der Primer durch die Taq-Polymerase. Nach 25-40 Zyklen werden wenige Kopien einer DNA-Sequenz sehr stark vermehrt und können dann mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Die Reaktionsbedingungen der PCR müssen auf jedes Primerpaar und jede Matrize abgestimmt werden.

### 1) PCR mit der Hotfire Polymerase

Die Hotfire-Polymerase (Solis Biodyne) besitzt keine „proofreading“-Aktivität und wurde für die Bestätigung der Kandidatengene in den verschiedenen Geweben und für die Kolonie-PCR (siehe 2.2.3.9) verwendet. Die dafür eingesetzten Primer sind in Tabelle 3 ersichtlich sowie auch die dazugehörige „Annealing“-Temperatur  $T_A$ . Pro PCR-Reaktion wurde ein Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  angesetzt.

*Pro PCR-Ansatz wurde eingesetzt:*

1  $\mu\text{l}$  cDNA  
5  $\mu\text{l}$  10x Puffer  
4  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$   
1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix  
1  $\mu\text{l}$  „forward“-Primer  
1  $\mu\text{l}$  „revers“-Primer  
0.3  $\mu\text{l}$  Hotfire Polymerase  
36.7  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

*PCR-Programm:*

Lid: 105°C  
Denaturierung: 15 min bei 96°C  
  
Denaturierung: 1 min bei 95°C  
„Annealing“: 1 min bei  $T_A$   
Extension: 1 min 72°C  
40 Zyklen  
  
Abschließende Extension zum  
Anhängen des 3'A:  
10 min bei 72°C

### 2) PCR mit der Advantage Polymerase

Die Advantage Polymerase (BD Biosciences Clontech) besitzt „proofreading“-Aktivität und ist somit für die Amplifizierung von PCR-Produkten, die danach ligiert und kloniert werden, geeignet.

Die verwendeten Primer und deren „Annealing“-Temperatur  $T_A$  sind in Tabelle 4 angegeben. Pro PCR-Reaktion wurde ein Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  angesetzt.

*Pro PCR-Ansatz wurde eingesetzt:*

1 µl cDNA  
5 µl 10x Puffer  
1 µl dNTP-Mix  
1 µl „forward“-Primer  
1 µl „revers“-Primer  
1 µl Advantage Polymerase  
40 µl H<sub>2</sub>O

*PCR-Programm:*

Lid: 105°C  
Denaturierung: 5 min bei 94°C

Denaturierung: 30 s bei 94°C  
„Annealing“: 1 min bei T<sub>A</sub>  
Extension: 2 min 68°C  
40 Zyklen

Abschließende Extension zum  
Anhängen des 3`A:  
3 min bei 68°C

### **2.2.3.3 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml (RNA) und 50 µg/ml (doppelsträngige DNA). Als Reinheitsmaß wurde das Verhältnis der Extinktionen von 260 zu 280 nm herangezogen, welches zwischen 1.7 und 1.9 liegen sollte. Es wurden hauptsächlich 1:100 Verdünnungen der Proben für die Vermessung verwendet.

$$c[\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50_{(\text{für DNA})} \times f_{(\text{Verdünnungsfaktor})}$$

### **2.2.3.4 Agarosegelelektrophorese**

Die PCR-Produkte und geschnittenen Plasmidfragmente wurden auf 1.5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die eingewogene Agarose wurde in 0.5x TAE aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 56°C mit einer Ethidiumbromidlösung auf eine Endkonzentration von 0.5%o versetzt. Die Gele wurden in Gelkammern mit Kämmen gegossen. Nach ca. 30 min bei RT waren die Gele erstarrt, die Kämmen wurden entfernt und die Gele mit 0.5x TAE/ 0.5 mg/l Ethidiumbromid überschichtet. Die Proben wurden mit einem Tropfen DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Auf jedes Gel wurde zusätzlich ein

Basenpaarstandard (100 bp Leiter, New England Biolabs) aufgetragen, um die Größe der PCR-Produkte zu ermitteln. Die Gele wurden zwischen 30 min und 1 h bei 80V gefahren. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und somit kann dieser fluoreszierende Komplex unter UV- Licht sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden mit einem Geldokumentationssystem von Herolab fotografiert, mit Hilfe des Programms EasyWin 32 bearbeitet und abgespeichert. Bei quantitativen Agarosegelen wurden die gewünschten Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

### **2.2.3.5 DNA Isolierung aus Agarosegelstücken**

Nachdem die Agarosegelstücke mit einem sterilen Skalpell isoliert wurden, wurden sie in ein Ultrafree MC-tube (Millipore) überführt und 20 min bei 7,000 rpm zentrifugiert. Danach konnte man die DNA, durch Zugabe des doppelten Volumens an Ethanol (absolut) und 1/10 Volumen 4 M NaAc des erhaltenen Flüssigkeitsvolumens, über Nacht bei – 20°C fällen. Anschließend wurde die DNA 30 min lang bei 14,000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nun konnte man den Überstand vorsichtig abgießen und das Pellet einmal mit 500 µl 85%igem, eiskaltem Ethanol waschen (14,000 rpm, 4°C, 5 min). Danach wurde der Überstand abermals verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 20 µl 10mM Tris-HCl aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### **2.2.3.6 Ligation**

Bei der Ligation verknüpft man ein spezielles DNA-Fragment mit einem Vektor. Es wird jeweils ein freies 3`Hydroxylende mit einem 5`Phosphatende von zwei DNA-Molekülen über eine Phosphodiesesterbindung verknüpft. Für die Ligation von DNA-Molekülen wurde eine Ligase aus dem Bakteriophagen T4 verwendet, der sowohl überhängende komplementäre als auch glatte Enden von DNA- Molekülen miteinander verbindet.

Die einzusetzende Menge des Inserts wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Länge}_{\text{Insert}}(\text{bp})}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}(\text{bp})} \times \text{eingesetzte Menge}_{\text{Vektor}}(\text{ng}) = \text{eingesetzte Menge}_{\text{Insert}}(\text{ng}) \times 10$$

Das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert sollte 1:10 sein, deshalb wurde die eingesetzte Menge des Inserts noch mit dem Faktor 10 multipliziert.

Vom Vektor pSTBlue-1 wurden jeweils 50 ng Plasmid-DNA verwendet und von den Vektoren pcDNA4/HisMaxA und pcDNA3.1/Zeo wurden jeweils 75 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Dazu wurden noch 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl T4-Ligase (New England Biolabs) pipettiert und auf 10 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Danach wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 16°C inkubiert und am nächsten Tag wurden jeweils 1 und 2 µl für die Transformation eingesetzt.

### **2.2.3.7 Herstellung elektrokompenter Zellen**

Es wurden 5 ml LB-Medium mit einer einzelnen E.Coli XL-1 Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in einen sterilen 2 l Erlenmeyerkolben mit 400 ml LB-Medium überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0.5-0.6 weiterinkubiert. Die Zellen wurden danach im Eiswasserbad 20 min lang abgekühlt, in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen transferiert und für 20 min bei 4,200 rpm und 2°C zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurde das Pellet in 200 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und wieder 20 min bei 4,200 rpm und 2°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde das Pellet in 10 ml 10%igem Glycerin aufgenommen und 15 min bei 4,200 rpm und 4°C in kleineren Zentrifugengefäßen zentrifugiert. Abermals wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 1 ml eiskaltem 10%igen Glycerin aufgenommen und dann wurden Aliquots zu 48 µl in 1.5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Zellen bei -70°C aufbewahrt.

### **2.2.3.8 Transformation von elektrokompenten E.Coli XL-1 Zellen**

Um große Mengen an Plasmid-DNA gewinnen zu können, muss man diese in Bakterien einbringen und vermehren. Dazu wurde das Prinzip der Transformation in elektrokompente E.Coli XL-1 Zellen (2.2.3.7) verwendet. Die elektrokompenten Zellen (48 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 und 2 µl Ligationsansatz versetzt und in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch einen Puls von 2.5 V aufgebrochen, sofort mit 400 µl LB-Medium versetzt und bei 37°C 1 h lang im Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und im Brutschrank über Nacht bei 37°C bebrütet.

Die LB-Platten mit Ampicillin für die Transformationsansätze mit dem Vektor pSTBlue-1 wurden mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) und 4.7 µl IPTG (28 mg/ml) vorbehandelt. Am nächsten



Tag konnte man die weißen Bakterienkolonien, die das Insert trugen, mit einer sterilen Impföse in Nährmedien oder auf LB-Platten mit Ampicillin überführen.

### 2.2.3.9 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR konnte man relativ schnell die Transformanten auf die erwartete Insertgröße hin überprüfen. Dazu wurde eine Kolonie zuerst mit einer Pipettenspitze gepickt und mit 10 µl H<sub>2</sub>O in einem Eppendorfgefäß gemischt. Mit derselben Pipettenspitze wurde die Kolonie auf einer neuen Platte ausgestrichen. Nach 10 min Inkubation bei 95°C im Thermoblock wurde die Kolonie 2 min bei 13,000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Danach konnte man 5 µl des Überstandes für einen PCR-Ansatz verwenden.

*Pro PCR-Ansatz wurde eingesetzt:*

5 µl Kolonie-Überstand  
5 µl 10x Puffer  
4 µl MgCl<sub>2</sub>  
1 µl dNTP-Mix  
1 µl „forward“-Primer  
1 µl „revers“-Primer  
0.3 µl Hotfire Polymerase  
32.7 µl H<sub>2</sub>O

*PCR-Programm:*

Lid: 105°C  
Denaturierung: 15 min bei 96°C  
  
Denaturierung: 1 min bei 95°C  
„Annealing“: 1 min bei T<sub>A</sub>  
Extension: 1 min 72°C  
40 Zyklen  
  
Abschließende Extension zum  
Anhängen des 3' A:  
10 min bei 72°C

Es wurden die kurzen Primer aus Tabelle 3 verwendet.

### 2.2.3.10 Plasmidminipräparation

Die erhaltenen Bakterienklone wurden in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 180rpm kultiviert. Für eine spätere Anzucht wurden 850 µl der Kultur mit 150 µl 100%igem Glycerin gemischt und bei – 70°C eingefroren. Die restliche Übernachtskultur wurde 20 min bei 3,500 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Pellet in 200 µl Lysis Puffer I resuspendiert und in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden die Zellen durch alkalische Lyse mit 200 µl Lysis Puffer II aufgebrochen. Nach kurzer Inkubation wurde durch Zugabe von 150 µl Lysis Puffer

III die DNA und der Hauptanteil der Proteine ausgefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13,000 rpm und RT wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Phenol und 300 µl Sevac extrahiert. Für die Phasentrennung wurde 2 min lang bei RT zentrifugiert, die wässrige Phase abgehoben und die Plasmid-DNA mit 800 µl Ethanol (absolut) präzipitiert (über Nacht bei – 20°C). Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 14,000 rpm 20 min lang wurde das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 29 µl Tris-HCl aufgenommen. Um vorhandene RNA zu zerstören, wurde 1 µl RNase A (10mg/ml) zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde die DNA noch einmal mit 60 µl eiskaltem Ethanol (absolut) und 3 µl 4M NaAc über Nacht bei – 20°C gefällt und am nächsten Tag 30 min lang bei 14,000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin noch einmal mit 400 µl eiskaltem 85%igen Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 30 µl Tris-HCl aufgenommen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt.

#### **2.2.3.11 Pure Yield™ Plasmid Midiprep System von Promega**

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde der Endotoxin-freie Plasmid Midi Kit von Promega verwendet.

Die erhaltenen Bakterienklone wurden in 15 ml LB-Medium mit Ampicillin 8 h bei 37°C im Schüttelinkubator bei 180 rpm kultiviert. Danach wurden diese Vorkulturen in 250 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C gezüchtet. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, RT, 7,000rpm) geerntet und der Überstand verworfen. Daraufhin wurde das Zellpellet in 5 ml „Cell Resuspension Solution“ resuspendiert und durch Zugabe von 5 ml „Cell Lysis Solution“ und 3 minütiger Inkubation lysiert. Nun wurden 9 ml „Neutralization Solution“ zugegeben und nach 3 min Inkubationszeit wurde das Lysat 10 min bei RT und 13,000 rpm zentrifugiert. Die DNA-Aufreinigung erfolgte mittels Vakuum. Die beiden Säulen (Binding Column + Clearing Column) wurden auf die Vakuumstation gesteckt und das zentrifugierte Lysat wurde hineingekippt. Nach Anlegen des Vakuums wurde das Lysat durchgesaugt. Danach konnte man die blaue Säule verwerfen und mit dem Waschen der weißen Säule beginnen. Zuerst wurden 5 ml „Endotoxin Removal Wash Solution“ durchgesaugt. Durch diesen bestimmten Waschpuffer werden die bakteriellen Endotoxine entfernt, wodurch sich die eluierte Plasmid-DNA besonders gut für die Transfektion von Säugerzellen eignet. Danach wurden 20 ml „Column Wash Solution“ auf die Säule gekippt und das Vakuum erst 60 sec nach dem Durchsaugen abgestellt. Nun konnte man die Plasmid-DNA eluieren. Die weiße Säule wurde

von der Vakuumstation abgenommen, auf ein 50 ml Sarstedt-Röhrchen (Greiner) gesteckt und nach Zugabe von 600 µl heißem „Nuclease-Free Water“ und 5 minütiger Inkubation zentrifugiert (5 min, RT, 3,500 rpm). Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt.

#### **2.2.3.12 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

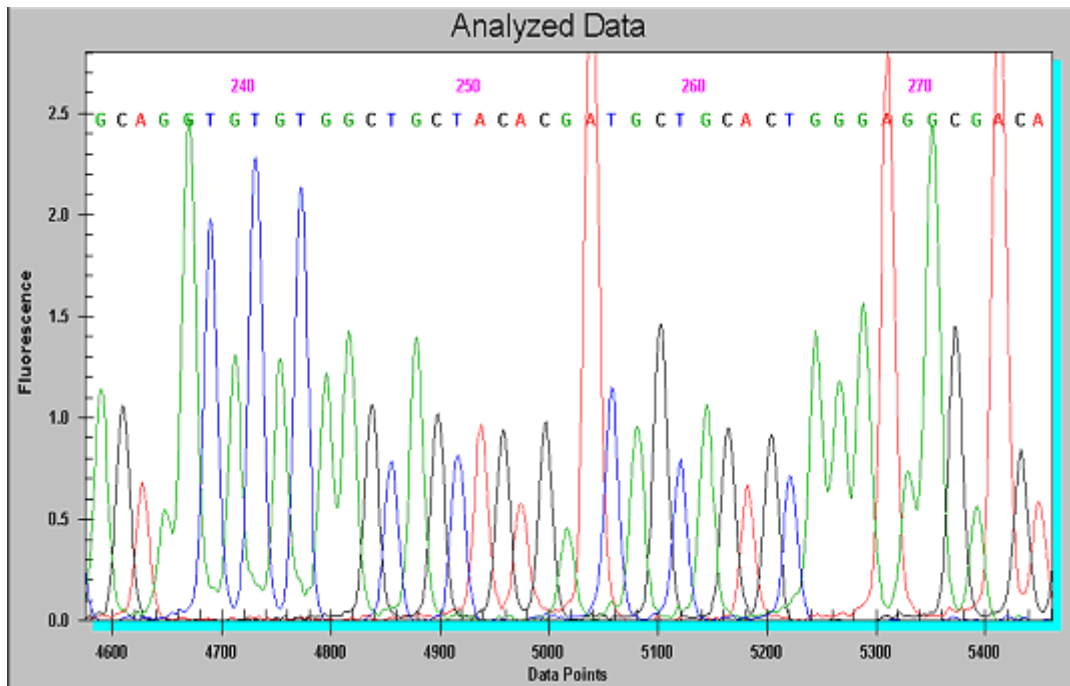
Um die Größe der Insert-DNA in einem Plasmid zu bestimmen, wurde ein Restriktionsverdau mit entsprechenden Endonukleasen durchgeführt. Die Restriktionsenzyme sowie die dazugehörigen Puffer stammten von New England Biolabs. Ein Restriktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

5 µg Plasmid-DNA  
5 µl 10x Puffer  
1 µl Restriktionsenzym 1  
1 µl Restriktionsenzym 2  
5 µl BSA (wenn vorgeschrieben)  
33 µl H<sub>2</sub>O

Die Restriktionsansätze wurden 4 h bei 37°C inkubiert und danach mittels Gelelektrophorese (2.2.3.4) überprüft.

#### **2.2.4 Sequenzierung**

Die DNA- Sequenzierung zur Überprüfung der richtigen Sequenz der klonierten Kandidatengene wurde mit einem Beckman-Coulter DNA-Analyzer (CEQ 2000 XL) durchgeführt. Als Sequenziermethode wurde die Kettenabbruchmethode nach Coulson und Sanger [61] mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten ddNTP Abbruchbasen herangezogen und für die Auswertung wurde das CEQ<sup>TM</sup>-8000 Genetic Analysis System Version 6.0 verwendet.



**Abbildung 10:** Elektropherogramm. Ein Teil der Sequenz des Kandidatengens pCEH-3. Die Sequenz besteht aus der unterschiedlichen Anordnung der vier Basen, wobei jeder Base ein Farbstoff zugeordnet ist.

## **2.2.5 Bestimmung der Proteinexpression und Enzymaktivitäten**

### **2.2.5.1 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE wurde zur Auftrennung von Proteinen für den nachfolgenden Westernblot verwendet. Zuerst musste ein 12.5%iges Trenngel gegossen werden. Für ein Gel wurden 3.6 ml Acrylamid-Lösung, 2.2 ml Trenngel-Puffer und 2.8 ml H<sub>2</sub>O gemischt und danach wurden 4.4 µl TEMED ( Tetramethylethyldiamin, Fluka Biochemica) und 76µl 10%iges APS (Ammoniumpersulfat, Bio-Rad) dazupipettiert. Nach gutem Mischen wurde die Lösung in die zuvor zusammengebaute, dichte (mit H<sub>2</sub>O überprüft) Gelapparatur gegossen und mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Nach 30 min Polymerisationszeit konnte man das Sammelgel gießen. Dazu wurden 326 µl Acrylamid-Lösung, 500 µl Sammelgel-Puffer und 1.65 ml 50%iges Glycerin vermischt und mit 21.5 µl 10%igem SDS, 1.25 µl TEMED und 19 µl 10%igem APS versetzt. Beim polymerisierten Trenngel wurde das H<sub>2</sub>O abgegossen, die Kammer mit einem Filter getrocknet, mit Sammelgel überschichtet und der Kamm hineingesteckt. Es war wichtig darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstanden und schnell gearbeitet wurde, da es nach Zugabe des TEMED und des APS (Quervernetzer) zur raschen Polymerisation kam. Nach 30 min Polymerisationszeit konnte man vorsichtig den Kamm entfernen, die Slots mit H<sub>2</sub>O auswaschen und das Gel in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Apparatur klemmen. Danach wurden die Proben aufgetragen. Die zuvor geernteten und bei -20°C eingefrorenen (siehe

2.2.6.3) Proben wurden auf Eis aufgetaut, 5 min bei 95°C inkubiert und danach 1 min bei RT und 13,000 rpm zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu präzipitieren. Schließlich wurden jeweils 50 µl des Überstandes der Proben mit einer Spritze aufgetragen. 2 µl des MagicMark™ Standards (Invitrogen) wurden mit 48 µl Probenpuffer versetzt und mittig auf das Gel aufgetragen. Danach wurde das Gel bei 150 V ca. 1.5 h laufen gelassen, bis die blaue Front nicht mehr sichtbar war. Nun konnte man das Gel für den Westernblot verwenden (2.2.5.2).

### **2.2.5.2 Westernblot Analyse**

Der Westernblot diente zur Detektion der überexprimierten Kandidatenproteine. Die zuvor mittels SDS-PAGE (2.2.5.1) aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose Membran transferiert, und konnten danach mit Antikörpern nachgewiesen werden.

#### *1) Blotten:*

Zuerst wurde die Blotting-Apparatur mit Blotpuffer gefüllt und die Blotutensilien vorbereitet. Eine Blotkassette wurde mit der schwarzen Seite nach unten in eine mit Blotpuffer gefüllte flache Schale gelegt und darauf kamen ein Eraser, ein Filterpapier, das SDS Gel (wurde bei Slot 1 markiert), eine Protran® Nitrocellulose Membran (Schleicher&Schuell), wieder ein Filterpapier und ein Eraser. Alle Bestandteile wurden zuerst in Blotpuffer eingelegt. Danach konnte die Blotkassette geschlossen und in die Blotapparatur eingespannt werden. Nun wurden die Proteine 2 h bei 150 mA auf die Membran transferiert.

#### *2) Fast Green Färbung:*

Um das Blotten zu überprüfen, wurde die Membran mit Fast Green Lösung (0.1 %iges Fast Green [Serva] und 1 %ige CH<sub>3</sub>COOH) überschichtet. Nach kurzer Zeit wurde die Lösung entfernt und man konnte sehr schön die grün gefärbten Proteinbanden auf der Membran erkennen. Mit H<sub>2</sub>O und einem Tropfen 1N NaOH wurde die Membran wieder entfärbt.

#### *3) Blocken:*

Es wurde eine 5%ige Milchpulverlösung (5 g Magermilchpulver in 100 ml Blotwaschpuffer) zum Blocken unspezifischer Bindungen hergestellt. Die Membran wurde 30 min lang am Shaker mit 15 ml Milchpulverlösung inkubiert.

#### *4) Primärer Antikörper:*

Die Kandidatenproteine wurden zuerst mit einem primären Antikörper detektiert. Die Membran wurde in 15 ml Milchpulverlösung eingelegt und dann wurden 3 µl des AntiXpress Antikörpers (Verdünnung 1:5000 [Invitrogen]) dazupipettiert. Nun wurde die Membran bei 4°C über Nacht am Shaker inkubiert und danach zwei Mal für 10 min mit Blotwaschpuffer gewaschen. Der AntiXpress Antikörper bindet an das Xpress<sup>TM</sup> Epitope des Vektors pcDNA4/HisMaxA, in den alle Kandidatengene zuvor kloniert wurden.

#### *5) Sekundärer Antikörper:*

Der sekundäre Antikörper diente zur Detektion des primären Antikörpers, der an die Kandidatenproteine gebunden war. Die Membran wurde erneut in 15 ml Milchpulverlösung eingelegt, diesmal aber mit 15 µl Polyclonal Rabbit Anti-mouse Immunglobuline HRP (Verdünnung 1:1000 [Dako Cytomatix]) versetzt. Nun wurde die Membran bei RT 2 h lang am Shaker inkubiert und danach drei Mal für 20 min mit Blotwaschpuffer gewaschen.

#### *6) Detektion durch Chemilumineszenz:*

Durch die Bindung des sekundären Antikörpers konnte man mit Hilfe der Chemilumineszenz die Kandidatenproteine sichtbar machen. Die Membran wurde ca. 1 min lang mit einem 1:1 Gemisch der zwei ECL<sup>TM</sup> Reaktionslösungen (je 750 µl, Amersham) inkubiert. Nach dem Entfernen der überschüssigen Lösung wurde die Membran in eine transparente Folie gewickelt und auf einem Röntgenfilm (Agfa) zwischen 1 und 30 min lang exponiert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte durch Eintauchen in Entwickler- und Fixierlösung für ca. 2 min.

Abschließend wurde der entwickelte Röntgenfilm in H<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet.

### **2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proben (2.2.4.3) wurden auf Eis aufgetaut, zwei Mal 10 sec ultrabeschallt (zum Lysieren der Zellen) und je 10 µl der Proben mit 500 µl H<sub>2</sub>O und 150 µl Proteinreagens (Bio-Rad) versetzt.

Als Standardreihe wurden verwendet:

- 150 µl Proteinreagens + 500 µl H<sub>2</sub>O
- 150 µl Proteinreagens + 500 µl H<sub>2</sub>O + 5 µg/µl BSA (Sigma)
- 150 µl Proteinreagens + 500 µl H<sub>2</sub>O + 10 µg/µl BSA
- 150 µl Proteinreagens + 500 µl H<sub>2</sub>O + 15 µg/µl BSA
- 150 µl Proteinreagens + 500 µl H<sub>2</sub>O + 20 µg/µl BSA

Die Standardreihe sowie die Proben wurden gut gemischt, bei 595 nm mit einem Photometer vermessen und danach wurde die Proteinkonzentration der Proben durch Vergleichen mit der Standardreihe bestimmt. Schließlich wurden die Proben mit Lysispuffer (Assay) auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt und für den weiteren Gebrauch bei – 20°C eingefroren.

#### **2.2.5.4 HSL-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität**

Der HSL-Assay diente der Bestimmung der Triglyceridlipase- und Cholesterylesteraseaktivität der isolierten, überexprimierten Kandidatenproteine (siehe 2.2.4.3). Dieser Assay ist mit Hilfe der Hormon-sensitiven Lipase (HSL, siehe Einleitung), die auch zugleich die Positivkontrolle darstellt, optimiert worden.

##### *1) Triglyceridlipase-Aktivitätsbestimmung*

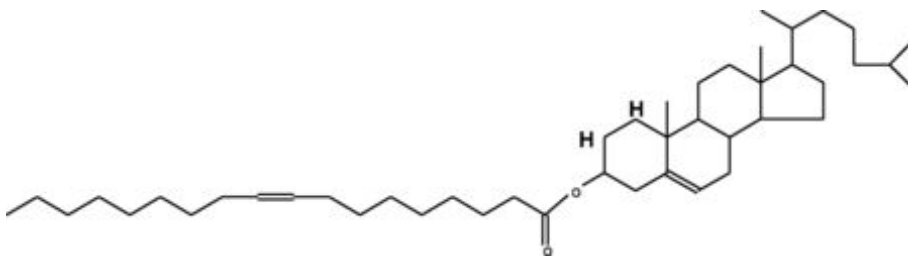
Für das Substrat wurden pro Probe 1 µCi radioaktives Glyceroltri[9,10(n)-<sup>3</sup>H]oleate (TO, Amersham Biosciences) mit 1.5 µl nichtradioaktivem TO (1:5 verdünnt in Toluol) und 0.75 µl einer Phosphatidylcholin/Phosphatidylinositol- Mischung (1:3, 20mg/ml) gemischt und unter Stickstoffatmosphäre abgedampft. Nach Zugabe von 50 µl Phosphatpuffer wurde das Substrat 2 Mal 1 min lang ultrabeschallt und dazwischen immer 1 min lang auf Eis gestellt. Danach wurden 25 µl 5%iges BSA (Fraktion V, fettsäurefrei, Sigma) zugegeben und wiederum 2 Mal 30 sec lang ultrabeschallt. Zum Schluss wurden 25 µl 20%iges BSA dazupipettiert und das Substrat auf Eis gelagert.

Für die Analyse wurden 100 µl Substrat mit 100 µl Zelllysat (2.2.5.3) versetzt und genau 1 h bei 37°C schüttelnd im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 3.25 ml einer Mischung von Methanol : Chloroform : Heptan (10:9:7, v/v/v) wurde die Reaktion gestoppt. Das Substrat TO besitzt 3 radioaktiv-markierte Fettsäuren, die durch Hydrolyse abgespalten werden können. Um die durch Hydrolyse entstandenen freien Fettsäuren in hydrophile Carboxylate überzuführen, wurde 1 ml 0.1 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (pH 10.5) zugegeben. Durch 2 Mal vortexen für 30 sec wurde extrahiert und danach die Phasen durch Zentrifugation (30 min, 3,200 rpm bei 4 °C) getrennt. Daraufhin wurde 1 ml der wässrigen Phase mit 8 ml Ultima Gold Cocktail (Perkin Elmer) gemischt und die Radioaktivität im β-Counter gemessen.

## 2) Cholesterinesterase-Aktivitätsbestimmung

Für das Substrat wurden pro Probe 0.2  $\mu\text{Ci}$  radioaktives  $[1\alpha,2\alpha(n)-^3\text{H}]$ Cholesterinoleat (CO, Amersham Biosciences) mit 2.5  $\mu\text{l}$  kaltem CO und 1.775  $\mu\text{l}$  einer Phosphatidylcholin/Phosphatidylinositol- Mischung (1:3, 20mg/ml) gemischt, unter Stickstoffatmosphäre abgedampft und wie bei der Triglyzeridlipase-Aktivitätsbestimmung weiterbehandelt.

Das Substrat CO ist am Cholesterin radioaktiv markiert (Abb. 11). Das Cholesterin kann durch Enzymaktivität abgespalten werden und befindet sich nach der Phasentrennung in der organischen Phase. 1 ml der organischen Phase wurde abgenommen, unter Stickstoffatmosphäre abgedampft und in 100  $\mu\text{l}$  Humanserum aufgenommen. 50  $\mu\text{l}$  dieses Gemisches wurden auf Dünnschichtchromatographie-Platten (Silicagel, Merck) aufgetragen und getrocknet. Nach der Auftrennung in Petrolether : Diethylether : Eisessig (70:29:1) wurden die Banden mit Joddampf eingefärbt und die Banden mit dem freien Cholesterin und dem Cholesterinester ausgeschnitten. Die Radioaktivität der ausgeschnittenen Banden wurden in 8 ml Ultima Gold Cocktail (Perkin Elmer) im  $\beta$ -Counter vermessen.



**Abbildung 11:**  $[1\alpha,2\alpha(n)-^3\text{H}]$ Cholesterinoleat (Amersham Biosciences). Das Cholesterin ist an zwei H- Molekülen radioaktiv markiert.

## 3) Retinolesterase-Aktivitätsbestimmung

Es wurde auch eine Enzymaktivitätsbestimmung mit  $^3\text{H}$  Retinylpalmitat (an der Fettsäure radioaktiv markiert) als Substrat von Dr. Achim Lass (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Karl-Franzens Universität Graz) durchgeführt.

### 2.2.5.5 Qualitative Bestimmung der Enzymaktivität mit spezifischen Inhibitoren

Weiters wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität der Kandidatenproteine ein Versuch mit spezifischen Inhibitoren von Dr. Ruth Birner-Grünberger (Institut für Biochemie, Technische Universität Graz) durchgeführt.



Für die qualitative Bestimmung der Aktivität von lipolytischen Enzymen wurden Alkylphosphonate mit unterschiedlicher Polarität entwickelt, die kovalent an das aktive Zentrum von Esterasen, Lipasen und Cholesterylesterasen binden und somit diese Enzyme irreversibel inaktivieren. Da an den spezifischen Inhibitoren eine Fluorescingruppe hängt, können die Proteine nach Auftrennung über SDS-PAGE mit Hilfe von NBD (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole) Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

## **2.2.6 Zellkultur**

### **2.2.6.1 Auftauen und Splitten von Cos 7 (kidney, green ape) Zellen**

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zu 5 ml Vollmedium (DMEM [Gibco] + 10% FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) pipettiert. Nach der Zentrifugation (1,000 rpm, 5 min bei RT) wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 5 ml frischem Vollmedium resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> Flasche überführt, in der 5 ml Vollmedium vorgelegt waren. Die Zellen wurden bei 37°C in CO<sub>2</sub>-hältiger Atmosphäre über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurde abermals das Medium gewechselt.

Nachdem die Zellen konfluent angewachsen waren, wurden sie gesplittet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml 37°C warmen PBS gewaschen. Danach wurden 2 ml Trypsin (10x + 2 % EDTA) darauf pipettiert und die Flasche für 2 min in den Inkubator gestellt. Daraufhin wurde im Mikroskop überprüft, ob sich die Zellen schon vom Boden der Flasche gelöst hatten. War das der Fall, wurden die Zellen in 2 ml Medium aufgenommen und in 50 ml Plastikröhrchen transferiert. Nach der Zentrifugation (5 min bei RT und 1,000 rpm) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 2 ml 37°C warmem PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 2 ml Vollmedium resuspendiert und auf die gewünschten Flaschen oder 6-wells verteilt. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt.

### **2.2.6.2 Transfektion von Cos 7 Zellen mit Metafectene<sup>TM</sup> (Biontex)**

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen gesplittet (2.2.6.1) und 80 µl der resuspendierten Zellen in ein 6-well, indem 2 ml Vollmedium vorgelegt waren, pipettiert.

Zwei Stunden vor der Transfektion wurden die 6-wells mit 37°C warmen PBS gewaschen und 2 ml DMEM- Medium (ohne FCS und Antibiotika) zugesetzt.

### *Transfektion:*

Zuerst wurden 1 µg und 3 µg an endotoxinfreier DNA (2.2.3.11) und 10 µl Metafectene™ in Eppendorfgefäßen vorgelegt. Das Metafectene™ sowie die DNA wurden mit 100 µl DMEM-Medium (ohne FCS und Antibiotika) versetzt, miteinander gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Inzwischen wurde das Medium in den 6-wells abgesaugt und 500 µl DMEM-Medium (ohne FCS und Antibiotika) vorgelegt.

Nach der Inkubationszeit wurde das Transfektionsreagenz mit der DNA tropfenweise in ein 6-well pipettiert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die 6-wells mit 37°C warmen PBS gewaschen, 2 ml Vollmedium (DMEM + 10% FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) zugesetzt und die Zellen bei 37°C bebrütet. Nach 48 h konnte man die Zellen ernten.

Bei jeder Transfektion wurden eine Positivkontrolle (lacZ-Plasmid) und eine Negativkontrolle (pcDNA4/HisMax A Vektor) mitgeführt.

### **2.2.6.3 Ernten der Proben für die SDS-PAGE und den HSL-Assay**

#### *1) SDS-PAGE*

48 h nach der Transfektion (2.2.6.2) wurden die Zellen für die SDS-PAGE geerntet. In jedes 6-well wurden 250 µl SDS-Ladepuffer pipettiert, die Zellen somit lysiert, vom 6-well gekratzt und durch ein Säulchen in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert. Danach wurden die Zelllysate bei – 20 °C bis zur Verwendung für die SDS-PAGE (2.2.5.1) eingefroren.

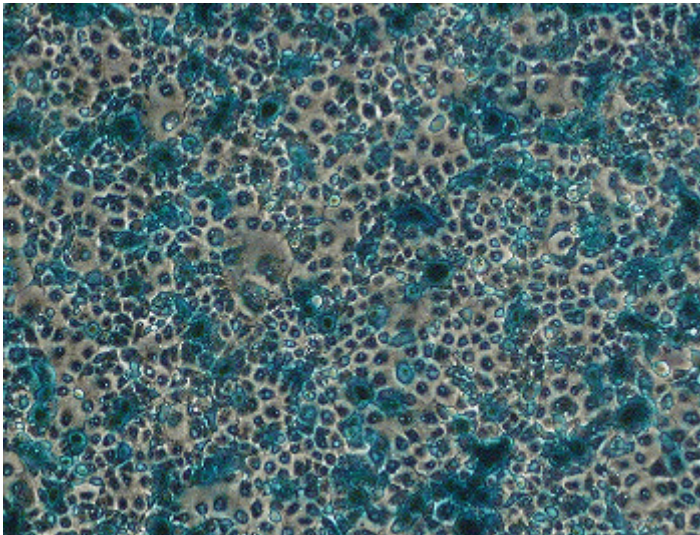
#### *2) HSL-Assay*

48 h nach der Transfektion (siehe 2.2.6.2) wurden die Proben für den HSL-Assay geerntet. Dazu wurden die Zellen zuerst mit 2 ml warmen PBS gewaschen. Danach wurden in jedes 6-well 3 Tropfen Trypsin (10x + 2% EDTA) pipettiert, 3 min bei 37°C inkubiert, dann wurden die Zellen mit 0.5 ml Vollmedium (DMEM + 10% FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) heruntergewaschen und in ein 15 ml Sarstedtröhrchen überführt. Nach einer 3- minütigen Zentrifugation bei 1,000 rpm und RT wurden die Zellen 2 Mal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Schließlich wurde das Zelllysate in 200 µl Lysispuffer (Assay) resuspendiert und bei -20°C für weitere Versuche eingefroren.

#### **2.2.6.4 LacZ- Färbung**

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde eine lacZ- Färbung durchgeführt. Die 6 – wells mit den 1 µg und 3 µg lac-Z Plasmid transfizierten Zellen wurden nach 48 h 2 Mal mit 37°C warmen PBS gewaschen und danach durch Zugabe von 2 ml 0.5%igem Glutaraldehyd (Merck) 10-20 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen 3 Mal mit 37°C warmen PBS mit 1mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen, mit der Färbelösung überschichtet und bei 37°C inkubiert.

Gleichzeitig wurde auch immer ein nicht transfiziertes 6-well mitgefärbt, um eine Hintergrundfärbung auszuschließen. Nach 1 h konnte man die gefärbten Zellen im Mikroskop anschauen und die Transfektionsrate abschätzen.



**Abbildung 12:** zeigt eine 10x40 Vergrößerung von gefärbten cos 7 Zellen. Die blau gefärbten Zellen zeigen eine erfolgreiche Transfektion mit dem lacZ-Plasmid. Auf diesem Bild kann man eine Transfektionsrate von 70% abschätzen.

#### **2.2.7 Statistik**

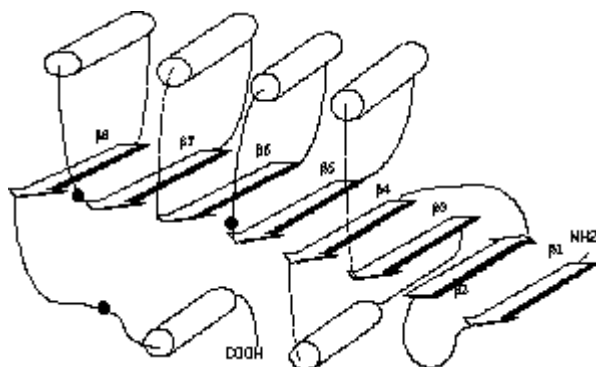
Die Proben für die Assays wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Messwerte als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) angegeben.

### 3. Resultate

#### 3.1 In silico Suche nach $\alpha/\beta$ Hydrolasen im Genom der Maus

Dr. Dagmar Kratky (Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Zentrum für Molekulare Medizin, Medizinische Universität Graz) suchte in verschiedenen Datenbanken nach Enzymen mit einer  $\alpha/\beta$  Hydrolase Domäne (Abb.13), da viele lipolytischen Enzyme zur Familie der  $\alpha/\beta$  Hydrolasen mit dem aktiven Zentrum, bestehend aus einem Serin, Histidin und Aspartat, gehören.

Folgende Datenbanken wurden für die Suche herangezogen: die ESTHER Datenbank, die LED (Lipase engineering database) und NCBI conserved Domain Search.



**Abbildung 13:**  $\alpha/\beta$  Hydrolase Domäne. Die  $\alpha/\beta$  Hydrolase Domäne ist Bestandteil vieler lipolytischen Enzyme und besteht aus 5-11 parallelen  $\beta$ -Faltblättern, die an beiden Seiten mit  $\alpha$ -Helices flankiert sind.

Mit Hilfe der Datenbanksuche wurden mehr als 30 Kandidatengene mit unbekannter Funktion gefunden, von denen mir 9 für die weitere Identifizierung zugeteilt wurden (Tab.5)

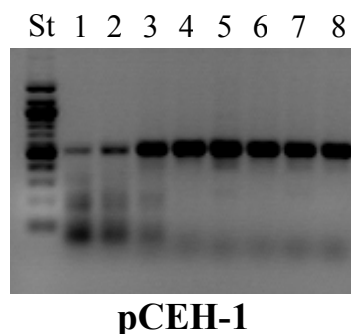
**Tabelle 5:** Kandidatengene. Liste der 9 Kandidatengene mit der Größe der codierenden Sequenzen (Cds) und Proteingrößen sowie ihren ähnlichen Domänen.

Gene	Cds(bp)	Protein (kDa)	Ähnliche Domänen
pCEH-1	1197	45	Triacylglycerol Lipase
pCEH-2	935	35	Serinhydrolase
pCEH-3	1685	62	Carboxylesterase Typ B
pCEH-4	980	37	Hypothetische Esterase/Lipase/Thioesterase
pCEH-5	1424	53	Hypothetisches Protein
pCEH-6	1683	63	Carboxylesterase 2 (Lipidstoffwechsel)
pCEH-7	1788	49	Carboxylesterase 2 (Lipidstoffwechsel)
pCEH8	1317	50	Hypothetische $\alpha/\beta$ -Hydrolase
pCEH-9	1248	47	Carboxylesterase 2 (Leber)

Die Sequenz der Kandidatengene wurde aus der NCBI Homepage ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)) herausgesucht und mittels Primer Software wurden geeignete Primer konstruiert. Bei der Primersuche wurde auf die Größe der Amplifikate, die theoretische Annealing-Temperatur ( $T_A$ ) und den GC-Gehalt (ca. 50-60%) Rücksicht genommen. Danach wurden die Primer mit der gesamten NCBI Nukleotid-Sequenz ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) geblastet.

### **3.2 Temperaturgradienten-PCR zur Bestimmung der Annealing-Temperatur $T_A$**

Um die passende  $T_A$  der Primer für die nachfolgenden PCRs zu bestimmen, wurde eine Temperaturgradienten-PCR mit allen Kandidatengenenen durchgeführt (Abb. 14). Die theoretische  $T_A$  (Tab. 3) war bekannt und so wurde für den Gradienten eine Temperaturspanne von  $\pm 10^\circ\text{C}$  um die theoretischen  $T_A$  gewählt.



**Abbildung 14:** inverses Gelfoto der Temperaturgradienten-PCR des Gens pCEH-1. Es wurden die Primer aus Tab. 3 und VaginalcDNA verwendet. St: 100 bp Leiter NEB. 1... 45°C, 2... 46.9°C, 3...50°C, 4...53.3°C, 5...56.7°C, 6...60°C, 7...63.1°C, 8...65°C

Die Optimierung der  $T_A$  über Gradienten-PCR wurde für alle Kandidatengene (Abb. nicht gezeigt) durchgeführt und die tatsächlichen  $T_A$ , die weitgehend mit den theoretischen  $T_A$  übereinstimmten, bestimmt. Diese  $T_A$  wurden für die weiteren PCRs verwendet.

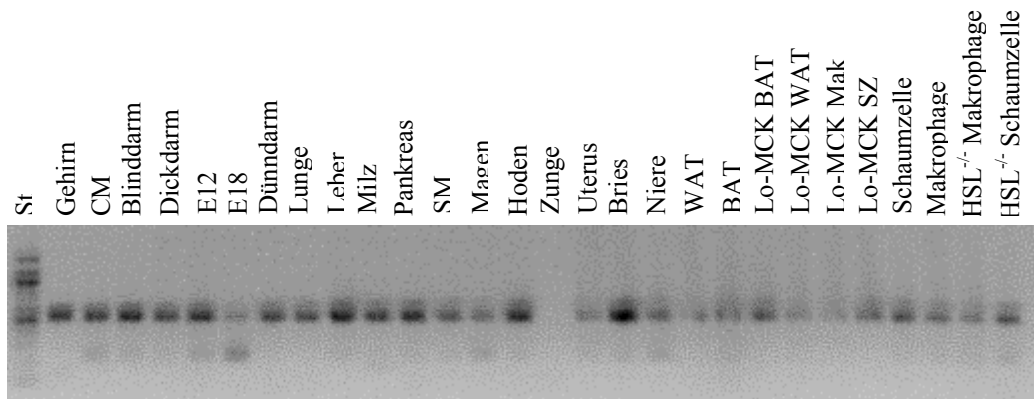
### **3.3 Untersuchung der Genexpression der Kandidatengene in den verschiedenen Geweben mittels PCR**

Um zu untersuchen, in welchen Mausgeweben die Kandidatengene vorkommen, wurden PCRs in verschiedenen Geweben durchgeführt. Es wurden verschiedene Gewebe von Wildtyp-Mäusen, sowie Makrophagen, Schaumzellen, weißes (WAT) und braunes (BAT) Fettgewebe von Hormon-sensitiven Lipase (HSL) knock out (ko) Mäusen und Mäusen ohne

Lipoproteinlipase im Fettgewebe (L<sub>0</sub>-MCK) untersucht. Diese L<sub>0</sub>-MCK Mäuse exprimieren nur das humane Transgen und kein funktionelles Allel der endogenen Maus-Lipoproteinlipase, wodurch nur im Muskelgewebe Lipoproteinlipaseaktivität auftritt und sie im Fettgewebe gänzlich fehlt [62].

### 3.3.1 pCEH-1

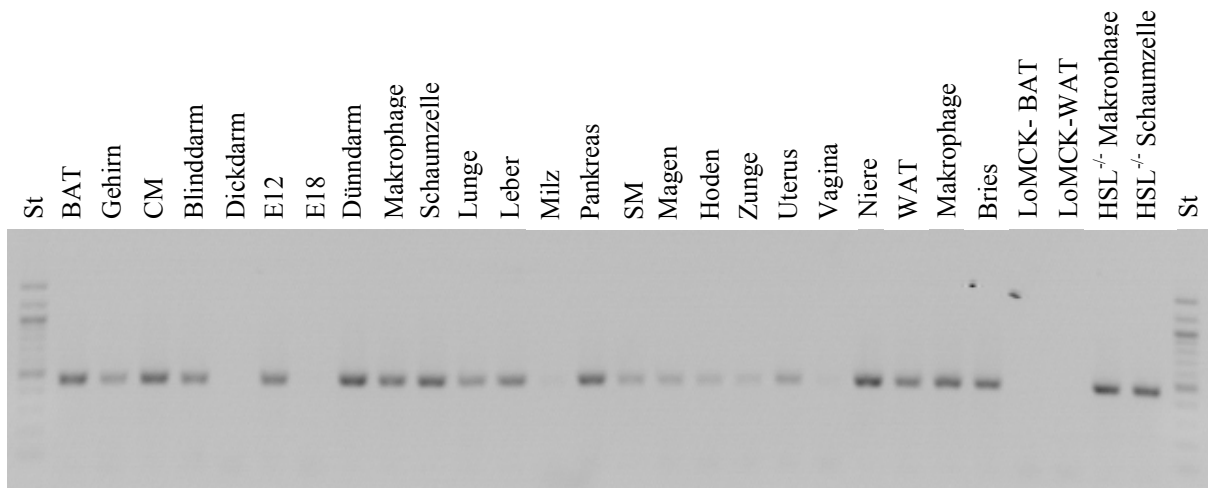
Wie aus Abb. 15 ersichtlich, wird pCEH-1 sehr stark in der Leber, den Hoden und dem Gehirn exprimiert, sowie in Makrophage und Schaumzelle. Auch in den Makrophagen und Schaumzellen der L<sub>0</sub>-MCK- und HSL ko Mäuse ist das Gen vorhanden. Eine schwache Expression ist auch in beiden Fettgewebstypen festgestellt worden.



**Abbildung 15:** inverses Gelfoto von pCEH-1. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben (3.3) verwendet. Das gewünschte Produkt ist 545 bp groß. St...100bp Leiter NEB, E12... Embryo Tag 12, E18...Embryo, Tag 18, Mak...Makrophage, SZ...Schaumzelle, CM...Herzmuskel, SM...Skelettmuskel.

### 3.3.2 pCEH-2

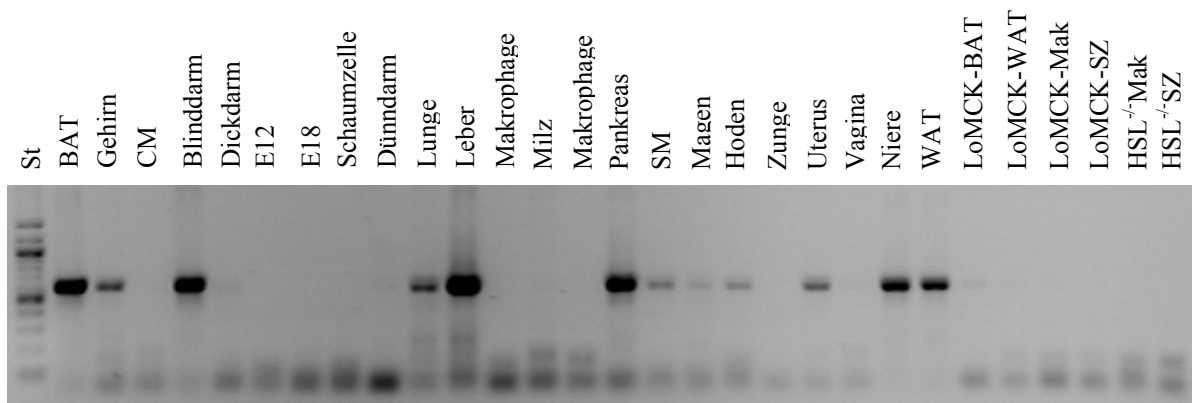
Die Expression von pCEH-2 (Abb. 16) ist sehr stark in der Niere, im Dünndarm und in beiden Fettgewebsarten vorhanden. In den Makrophagen und Schaumzellen der Wildtyp Mäuse wird das Gen ebenso exprimiert, wie in den Makrophagen und Schaumzellen der HSL ko Mäuse. In den Fettgeweben der L<sub>0</sub>-MCK Mäuse wird das Gen nicht exprimiert.



**Abbildung 16:** inverses Gelfoto von pCEH-2. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben (3.3) verwendet. Das gewünschte Produkt ist 476 bp groß. St...100bp Leiter NEB, E12... Embryo Tag 12, E18...Embryo Tag 18, CM...Herzmuskel, SM...Skelettmuskel.

### 3.3.3 pCEH-3

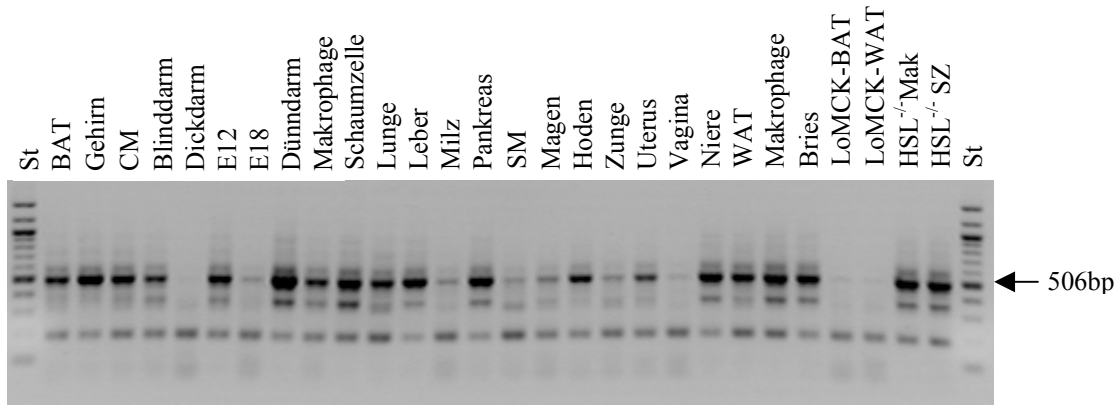
PCEH-3 (Abb.17) wird in wenigen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Eine besonders starke Expression kann man in der Leber, dem Gehirn, dem Blinddarm, dem Pankreas und dem BAT sehen, aber auch die Niere und das WAT zeigen eine relativ starke Expression. Dieses Gen wird nicht in Makrophage und Schaumzelle der Wildtyp-, HSL ko- und L<sub>0</sub>-MCK-Mäuse exprimiert.



**Abbildung 17:** inverses Gelfoto von pCEH-3. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben (3.3) verwendet. Das Produkt ist 601 bp groß. St...100bp Leiter NEB, E12... Embryo Tag 12, E18...Embryo Tag 18, Mak...Makrophage, SZ...Schaumzelle, CM...Herzmuskel, SM...Skelettmuskel

### 3.3.4 pCEH-4

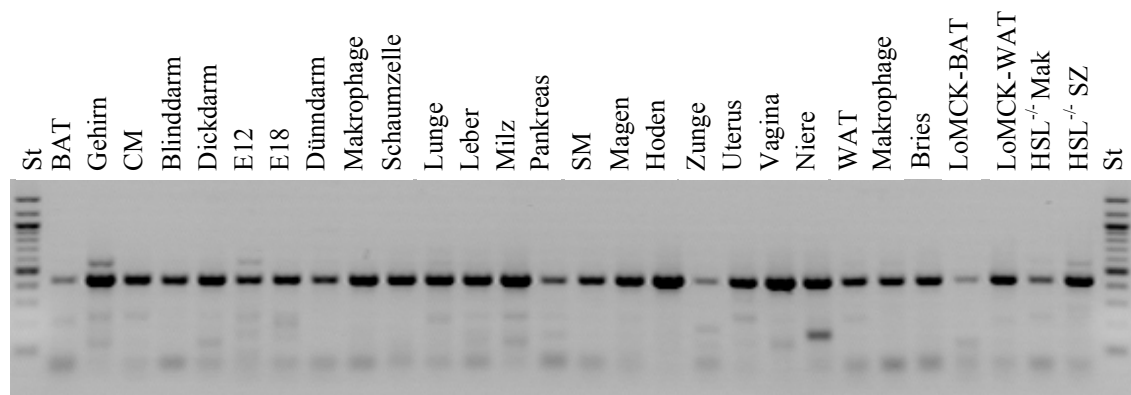
Wie aus Abb. 18 ersichtlich, wird pCEH-4 in vielen Geweben exprimiert. Ein spezifisches Produkt ist bei 506 bp sichtbar. Sehr stark wird dieses Gen im Dünndarm, dem Gehirn, der Leber, der Schaumzelle und in der Niere exprimiert. Auch in den Makrophagen und Schaumzellen der HSL ko Mäuse, sowie in beiden Fettgewebstypen der Wildtyp-Mäuse ist eine starke Expression sichtbar.



**Abbildung 18:** inverses Gelfoto von pCEH-4. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben (3.3) verwendet. Das Produkt ist 506 bp groß. St...100bp Leiter NEB, E12... Embryo Tag 12, E18...Embryo Tag 18, Mak...Makrophage, SZ...Schaumzelle, CM..Herzmuskel, SM...Skelettmuskel.

### 3.3.5 pCEH-5

PCEH-5 ist in allen untersuchten Geweben der Wildtyp- und ko Mäuse vorhanden (Abb. 19). Ein sehr starkes Signal sieht man im Gehirn, den Hoden und den Makrophagen. Eine schwache Expression, im Gegensatz zum WAT, ist im BAT zu erkennen.

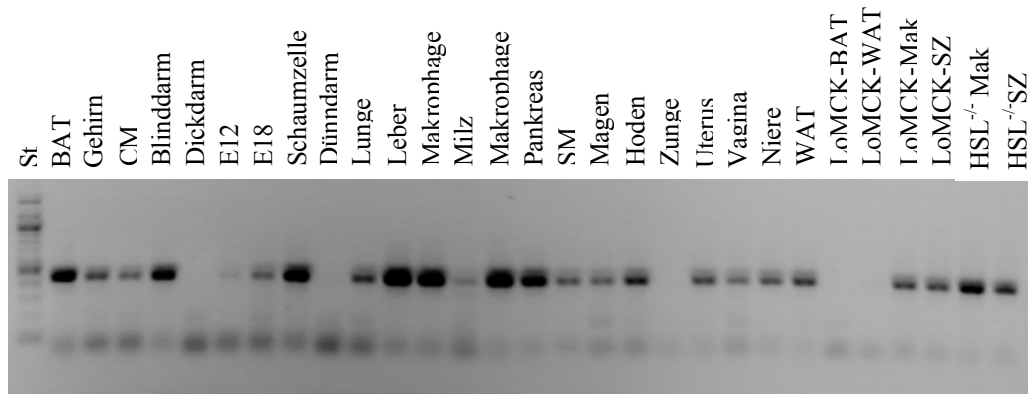


**Abbildung 19:** inverses Gelfoto von pCEH-5. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben (3.3) verwendet. Das Produkt ist 433 bp groß. St...100bp Leiter NEB, E12... Embryo Tag 12, E18...Embryo Tag 18, Mak...Makrophage, SZ...Schaumzelle, CM..Herzmuskel, SM...Skelettmuskel.



### 3.3.6 pCEH-6

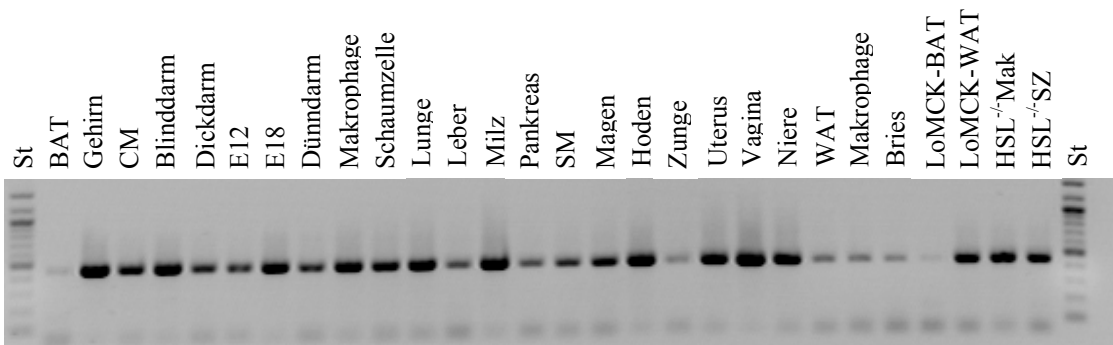
Die Expression von pCEH-6 (Abb. 20) ist besonders stark in der Leber, dem Makrophagen und der Schaumzelle. Im Gegensatz zum BAT wird das Gen nur schwach im WAT exprimiert. Auch in den Makrophagen und Schaumzellen der L<sub>0</sub>-MCK- und HSL ko Mäuse kommt das Gen vor.



**Abbildung 20:** inverses Gelfoto von pCEH-6. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben (3.3) verwendet. Das Produkt ist 448 bp groß. St...100bp Leiter NEB, E12... Embryo Tag 12, E18...Embryo Tag 18,Mak...Makrophage, SZ...Schaumzelle, CM..Herzmuskel, SM...Skelettmuskel.

### 3.3.7 pCEH-7

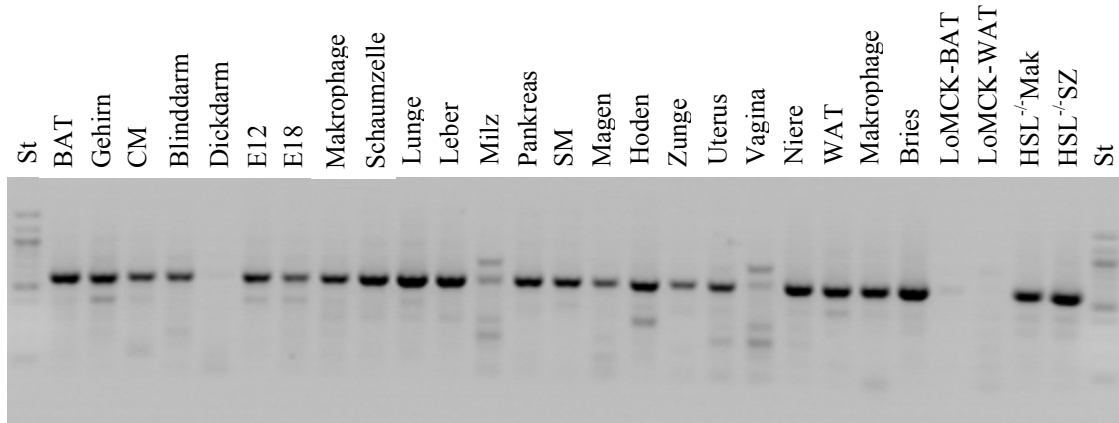
Wie in Abb. 21 ersichtlich, wird pCEH-7 in allen Geweben der Wildtyp-, L<sub>0</sub>-MCK- und HSL ko Mäuse exprimiert. Ein sehr starkes Signal sieht man in den Makrophagen und Schaumzellen, sowie im Gehirn, den Hoden und der Vagina. In beiden Fettgewebsarten der Wildtyp Mäuse wird das Gen sehr schwach exprimiert.



**Abbildung 21:** inverses Gelfoto von pCEH-7. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben (3.3) verwendet. Das Produkt ist 457 bp groß. St...100bp Leiter NEB, E12... Embryo Tag 12, E18...Embryo Tag 18,Mak...Makrophage, SZ...Schaumzelle, CM..Herzmuskel, SM...Skelettmuskel

### 3.3.8 pCEH-8

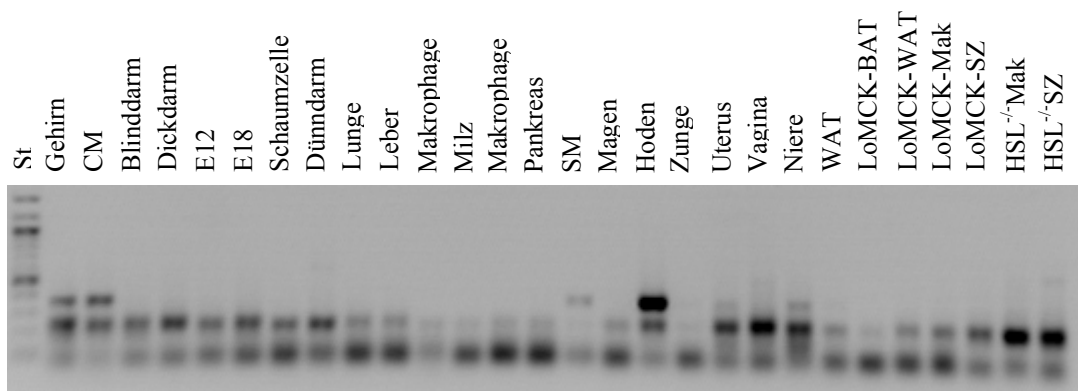
PCEH-8 wird im Großteil aller untersuchten Gewebe exprimiert (Abb. 22). Ein spezifisches Produkt ist bei 601 bp sichtbar. In der Leber, der Lunge und den Makrophagen und Schaumzellen der HSL ko Mäuse wird das Gen stark exprimiert.



**Abbildung 22:** inverses Gelfoto von pCEH-8. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben (3.3) verwendet. Das Produkt ist 601 bp groß. St...100bp Leiter NEB, E12... Embryo Tag 12, E18...Embryo Tag 18, Mak...Makrophage, SZ...Schaumzelle, CM...Herzmuskel, SM...Skelettmuskel.

### 3.3.9 pCEH-9

Wie in Abb. 23 ersichtlich, ist pCEH-9 nur im Hoden stark exprimiert. In allen anderen untersuchten Geweben ist kein spezifisches Signal bei 363 bp ersichtlich.



**Abbildung 23:** inverses Gelfoto von pCEH-9. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben (3.3) verwendet und das Produkt ist 363 bp groß. St...100bp Leiter NEB, E12... Embryo Tag 12, E18...Embryo Tag 18, Mak...Makrophage, SZ...Schaumzelle, CM...Herzmuskel, SM...Skelettmuskel.

### 3.3.10 Zusammenfassung der Expressionsdaten

In den Tabellen 6-9 sind die Expressionsmuster aller Kandidatengene zusammengefasst. Alle Gene, bis auf pCEH-3 und pCEH-9, werden in Makrophagen und Schaumzellen von Wildtyp- und den HSL ko Mäusen exprimiert. Auch in beiden Fettgewebsarten kommt der Großteil aller Gene vor. PCEH-9 wird nur im Hoden exprimiert und ist somit nicht so interessant für diese Arbeit. Mit den Genen, die in Makrophagen und Schaumzelle exprimiert wurden, wurde eine weitere RT-PCR durchgeführt und die Expression mit dem house-keeping gene Porphobilinogendeaminase (PBGD) verglichen.

**Tabelle 6:** Expression der Kandidatengene in den untersuchten Geweben. xxx... sehr starke Expression im Gewebe; xx...starke Expression im Gewebe; x... schwache Expression im Gewebe; ----- ... Gewebe wurde nicht getestet

Gen	Makro- phage	Schaum- zelle	BAT	WAT	Hoden	Leber	Gehirn	Dünn- darm
pCEH-1	x	x	x	x	xx	xxx	xx	x
pCEH-2	xx	xxx	xxx	xx	x	xx	x	xxx
pCEH-3			xxx	xx	x	xxx	x	
pCEH-4	xx	xxx	xx	xx	xx	xxx	xxx	xxx
pCEH-5	xx	xx	x	xx	xxx	xx	xxx	x
pCEH-6	xxx	xx	xx	x	xx	xxx	x	
pCEH-7	xxx	xxx		x	xxx	x	xxx	xx
pCEH-8	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	-----
pCEH-9					xxx			

**Tabelle 7:** Expression der Kandidatengene in verschiedenen Geweben. xxx... sehr starke Expression im Gewebe; xx...starke Expression im Gewebe; x... schwache Expression im Gewebe; ----- ... Gewebe wurde nicht getestet

Gen	Blind- darm	Dick- darm	Magen	Pankreas	Niere	Lunge	Milz
pCEH-1	xxx	xx	x	xx	x	xx	xx
pCEH-2	x		x	xxx	xxx	x	
pCEH-3	xxx		x	xxx	xx	xx	
pCEH-4	xx		x	xx	xx	xx	x
pCEH-5	xx	xx	xx	x	xxx	xx	xxx
pCEH-6	xx		x	xxx	x	xxx	x
pCEH-7	xxx	xx	xx	x	xxx	xxx	xxx
pCEH-8	xx		x	xx	xx	xx	
pCEH-9							

**Tabelle 8:** Expression der Kandidatengene in verschiedenen Geweben. xxx... sehr starke Expression im Gewebe; xx...starke Expression im Gewebe; x... schwache Expression im Gewebe; ----- ... Gewebe wurde nicht getestet, SM...Skelettmuskel, HM...Herzmuskel

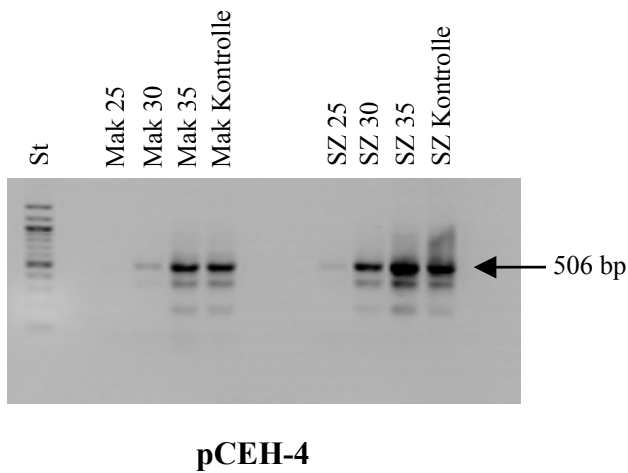
Gen	Vagina	Uterus	Zunge	HM	Bries	Embryo Tag 12	Embryo Tag 18	SM
pCEH-1	-----	X		XX	XXX	XX	XX	X
pCEH-2		X	X	XXX	XX			X
pCEH-3		X						X
pCEH-4	X	XX	X	XX	XX			X
pCEH-5	XXX	XX	X	XX	XX			XX
pCEH-6	X	X		X	----		X	X
pCEH-7	XXX	XXX	X	XX	X			X
pCEH-8		XX	X	X	XXX			XX
pCEH-9					----			

**Tabelle 9:** Expression der Kandidatengene in verschiedenen Geweben. xxx... sehr starke Expression im Gewebe; xx...starke Expression im Gewebe; x... schwache Expression im Gewebe; ----- ... Gewebe wurde nicht getestet

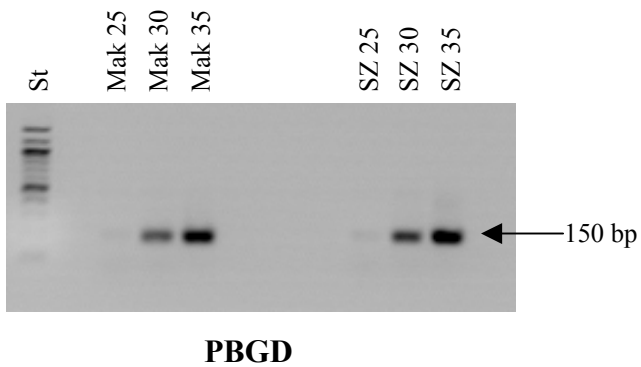
Gen	L <sub>0</sub> -MCK BAT	L <sub>0</sub> -MCK WAT	L <sub>0</sub> -MCK Makrophage	L <sub>0</sub> -MCK Schaumzelle	HSL <sup>-/-</sup> Makrophage	HSL <sup>-/-</sup> Schaumzelle
pCEH-1	XX	X	X	XX	X	XX
pCEH-2			-----	-----	XX	XX
pCEH-3	XXX	XXX				
pCEH-4			-----	-----	XXX	XXX
pCEH-5	X	XX	-----	-----	X	XX
pCEH-6	XXX	XX	X	X	XX	X
pCEH-7	X	XX	-----	-----	XX	XX
pCEH-8			-----	-----	XX	XXX
pCEH-9						

### **3.4 Vergleich der Expression der Kandidatengene in Makrophagen und Schaumzelle mit dem house-keeping gene Porphobilinogendeaminase (PBGD)**

Die Gene, die in Makrophagen und Schaumzelle exprimiert sind, wurden in einer weiteren RT-PCR untersucht. Es war von Interesse zu sehen, ob die Kandidatengene das gleiche Expressionsmuster im Makrophagen und der Schaumzelle aufweisen. Um die Stärke der Expression abschätzen zu können, wurden die Expressionen in einer halbquantitativen RT-PCR mit dem house-keeping gene Porphobilinogendeaminase (PBGD) verglichen. Dabei wurden Proben nach 25, 30 und 35 Zyklen entnommen, die dann mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht wurden. Die Stärke der Expressionen wurden mit Hilfe des EasyWIN 32 Systems ausgewertet. Zum Vergleich wurde jeweils eine RT-PCR mit dem house-keeping gene PBGD unter denselben Bedingungen durchgeführt.

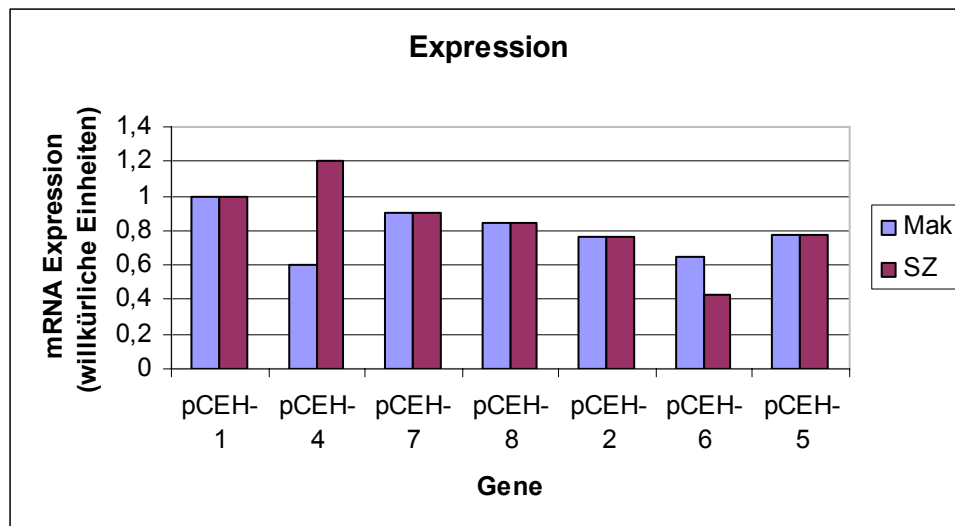


**Abbildung 24:** inverses Agarosegel des Gens pCEH-4. St...100bp Leiter NEB, Mak...Makrophage; SZ ... Schaumzelle; Die Proben wurden nach 25, 30 und 35 Zyklen entnommen und aufgetragen. Die Bande bei 506 bp entspricht dem gewünschten Produkt.



**Abbildung 25:** inverses Agarosegel des Gens PBGD. St...100bp Leiter NEB, Mak...Makrophage; SZ... Schaumzelle; Die Proben wurden nach 25, 30 und 35 Zyklen entnommen und aufgetragen. Die Bande bei 150 bp entspricht dem gewünschten Produkt.

Bei pCEH-4 sieht man eindeutig bei allen Proben eine stärkere Expression in der Schaumzelle (Abb. 24), als im Makrophagen. Die Expression des house-keeping gene PBGD ist in beiden Zelltypen gleich (Abb. 25). Diese PCR wurde mit allen Kandidatengen durchgeführt (Abb. nicht gezeigt). Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abb.26 graphisch dargestellt.

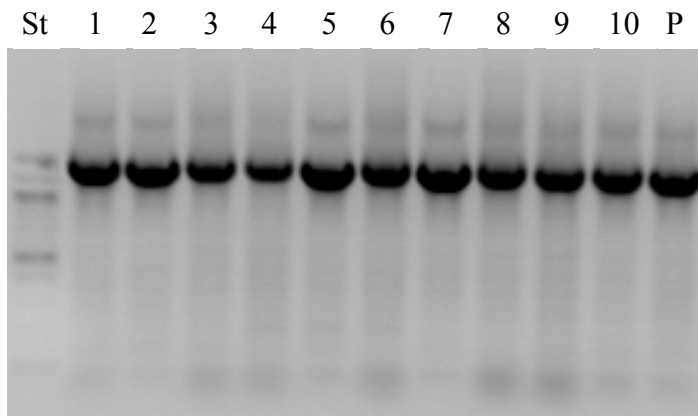


**Abbildung 26:** Diagramm der mRNA Expressionen aller Kandidatengene. Es wurden jeweils RT-PCRs durchgeführt und Proben nach 25, 30 und 35 Zyklen entnommen. Bei jedem Kandidatengen wurde eine RT-PCR mit dem house-keeping gene PBGD unter gleichen Bedingungen mitgeführt und die Stärke der Expressionen mit Easy Win 32 ausgewertet. Im Diagramm sind diese abgestimmten Expressionen aller Kandidatengene graphisch dargestellt. Die Werte sind dargestellt als Expression der Kandidatengene durch die Expression des PBGD. Der Wert von pCEH-1 wurde gleich 1 gesetzt. Mak...Makrophage, SZ...Schaumzelle

Der Großteil der Gene weist dasselbe Expressionsmuster in Makrophage und Schaumzelle auf (Abb.26). PCEH-4 hat eine doppelt so starke Expression in der Schaumzelle als im Makrophagen. PCEH-6 weist eine niedrigere Expression in der Schaumzelle auf.

### **3.5 Amplifizierung der cDNA und Klonierung in den TA-Vektor pSTBlue-1**

Nachdem die Expressionsmuster der Kandidatengene untersucht wurden, wurden neue Primer (Tab.4) konstruiert, um die gesamte cDNA zu amplifizieren. Die cDNAs der Kandidatengene wurden zuerst in einen TA-Vektor kloniert, da dies das weitere Klonieren in einen Säugtiervektor erleichtert. Es wurden PCRs mit der Advantage-Polymerase durchgeführt, da diese Polymerase „proofreading“ Aktivität besitzt und so die amplifizierten cDNAs für die weitere Klonierung verwendet werden können. Die cDNAs der Kandidatengene (Abb. nicht gezeigt) wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese sichtbar gemacht und die Größen überprüft. Danach konnten die cDNAs mit dem TA-Vektor pSTBlue-1 über Nacht bei 16°C ligiert werden. Am nächsten Tag wurden 1 und 2 µl des Ligationsansatzes in E.Coli Zellen transformiert, auf LB-Platten mit IPTG und X-Gal für die Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Weiße Kolonien wurden mittels Kolonie PCR auf das Insert hin überprüft.



**Abbildung 27:** inverses Gelfoto der Kolonie- PCR des Gens pCEH-4.

Die erhaltenen weissen Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR überprüft.

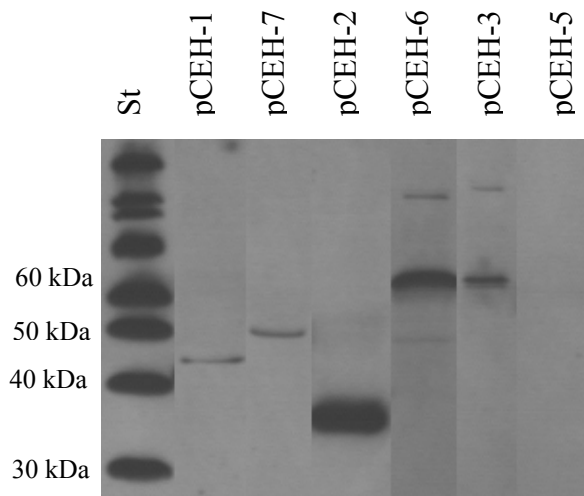
Es wurden die Primer aus Tab. 4 und als Positivkontrolle die zuvor erhaltene cDNA verwendet. St...100bp Leiter NEB, 1-10... Kolonien, P... Positivkontrolle

Alle Kandidatengene bis auf pCEH-9 konnten erfolgreich in den Vektor pSTBlue-1 kloniert werden. Bei dem Gen pCEH-9 war es nicht möglich eine passende cDNA zu amplifizieren. Auch nach mehreren Versuchen mit anderen Polymerasen gelang es nicht die richtige cDNA zu isolieren. Mit diesem Gen wurde nicht weitergearbeitet, da es in Makrophage, Schaumzelle, BAT, WAT und der Leber auch mit den kurzen Primern keine Expression zeigte und deshalb für diese Arbeit nicht so interessant war.

### **3.6 Bestimmung der Proteinexpression mittels Westernblot**

Um eine Proteinexpression detektieren zu können, musste zuerst die gesamte codierende Sequenz der Kandidatengene in den Säugetier-Expressionsvektor pcDNA4/HisMax A kloniert werden. Durch Sequenzierung wurde die richtige Sequenz der Plasmid-DNAs schließlich überprüft und bestätigt. Anschließend wurden die Plasmid-DNAs in Cos 7 Zellen eingebracht. Der Säugetier-Expressionsvektor pcDNA4/HisMax A besitzt zwei Erkennungssequenzen für Antikörper (Xpress<sup>TM</sup> Epitop und den 6x His Tag) und somit können die eingebrachten Inserts mit Hilfe der Westernblotanalyse nachgewiesen werden.

Die Transfektionsrate in Cos 7 Zellen wurde mittels lacZ-Färbung überprüft und betrug immer zwischen 60-80 %.



**Abbildung 28:** Westernblots von 6 Kandidatengenen. Die Proteine wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen. Als Standard wurde der Magic Mark<sup>TM</sup> XP Standard von Invitrogen verwendet. Die Größen der Proteine: pCEH-1...45 kDa, pCEH-7...49 kDa, pCEH-2...35 kDa, pCEH-6...63 kDa, pCEH-3...62 kDa, pCEH-5...53 kDa (kein Protein sichtbar)

Durch Chemilumineszenz wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Als Standard wurde der Magic Mark<sup>TM</sup> XP von Invitrogen verwendet. Dieser Standard wird durch den sekundären Antikörper detektiert und kann so ebenfalls durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der Westernblot-Analyse konnten 5 der 8 Kandidatengene nachgewiesen werden (Abb.28). Es wurden aber noch weitere Westernblots durchgeführt, um die anderen Proteine nachzuweisen (Abb. nicht gezeigt). Bei diesen Westernblots wurden immer die Proteine von pCEH-2 und pCEH-1 als Positivkontrollen mitgeführt. Es wurde versucht die Zellen nach der Transfektion mit Ultraschall aufzuschließen und statt 2 h wurde über Nacht 6 h lang geblottet. Ebenfalls wurde die Inkubationszeit des primären Antikörpers auf 72 h erhöht. Trotz all dieser Änderungen an den Versuchsbedingungen konnten 3 der Kandidatenproteine nicht nachgewiesen werden.

Mit allen Kandidatenproteinen wurden Enzymaktivitätsversuche durchgeführt, da die Proteine ja trotzdem vorhanden sein könnten, obwohl sie mittels Westernblotanalyse nicht nachgewiesen werden konnten.

### **3.7 Enzymaktivitätsbestimmung mittels HSL-Assay**

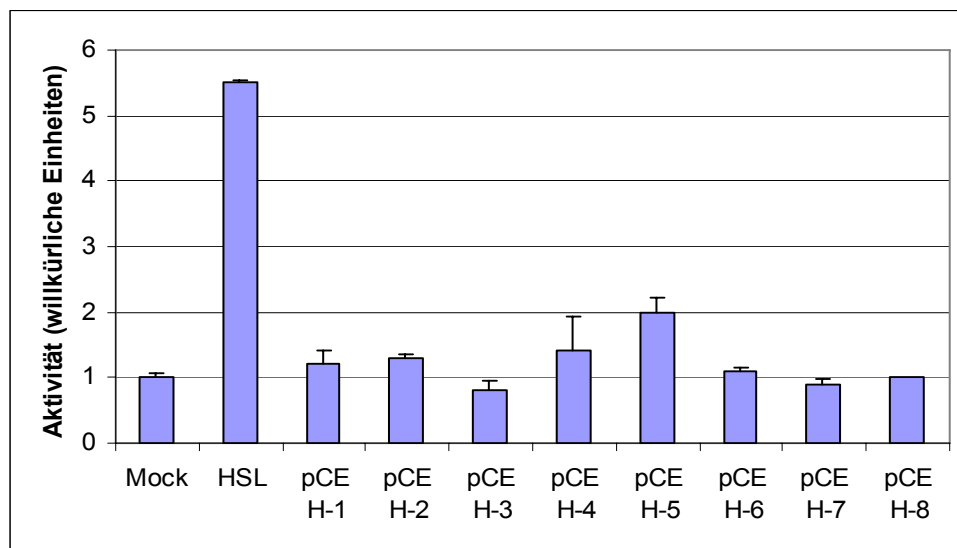
Um die Enzymaktivität der Kandidatenproteine zu bestimmen, wurde ein Assay mit verschiedenen Substraten durchgeführt. Abgestimmt ist dieser Assay auf die HSL, die sich durch ihre vielfältige Substratspezifität sehr gut als Positivkontrolle für einen



Enzymaktivitätsassay eignet. Es wurden drei Substrate verwendet, um die Triglyzeridlipase-, Cholesterinester- und Retinolesterhydrolase-Aktivität zu bestimmen.

### 1) Triglyzeridlipase- Aktivitätsbestimmung

Für den Assay wurden 100 µg der Proteinextrakte mit radioaktiv markiertem Trioleatsubstrat inkubiert, die Lipide extrahiert und nach Identifikation und Ausschneiden der Freien Fettsäure-spezifischen Bande wurde die Radioaktivität im β-Counter bestimmt (Abb. 29).

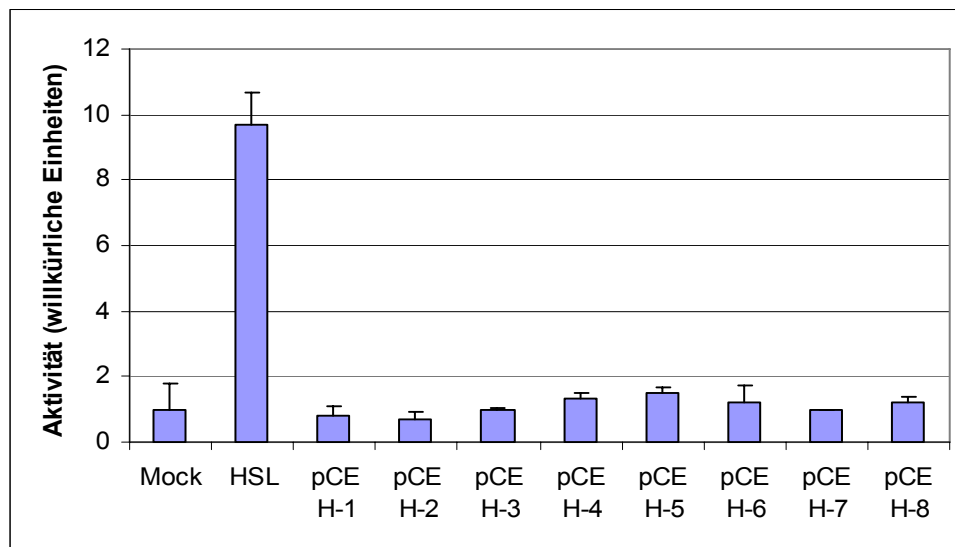


**Abbildung 29:** Triglyzeridlipaseaktivität der Kandidatengene. Cos 7 Zellen wurden mit endotoxinfreier Plasmid-DNA der Kandidatengene transfektiert, geerntet und wie in den Methoden beschrieben mit radioaktivem Trioleat inkubiert. Nach Extraktion der Lipide wurde die spezifische Bande für freie Fettsäuren ausgeschnitten und die Radioaktivität im β-Counter vermessen. Als Negativkontrolle (Mock) diente der leere Vektor pcDNA4/His Max A und als Positivkontrolle die HSL.

Die Triglyzeridlipaseaktivität war bei der HSL, wie erwartet, positiv. Sie betrug mehr als das Fünffache des leeren Säugetiervektors. Die Kandidatenproteine zeigten alle keine signifikante Aktivität. Es ist davon auszugehen, dass diese Proteine unter den verwendeten Bedingungen keine Triglyzeridlipaseaktivität aufweisen.

### 2) Cholesterinesterase-Aktivitätsbestimmung

Für den Assay wurden 100 µg der Proteinextrakte mit radioaktiv markiertem Cholesterinoleat-Substrat inkubiert, die Lipide extrahiert und über DC aufgetrennt. Nach Identifikation und Ausschneiden der spezifischen Banden für Cholesterinester und freies Cholesterin wurde die Radioaktivität im β-Counter bestimmt (Abb.30).

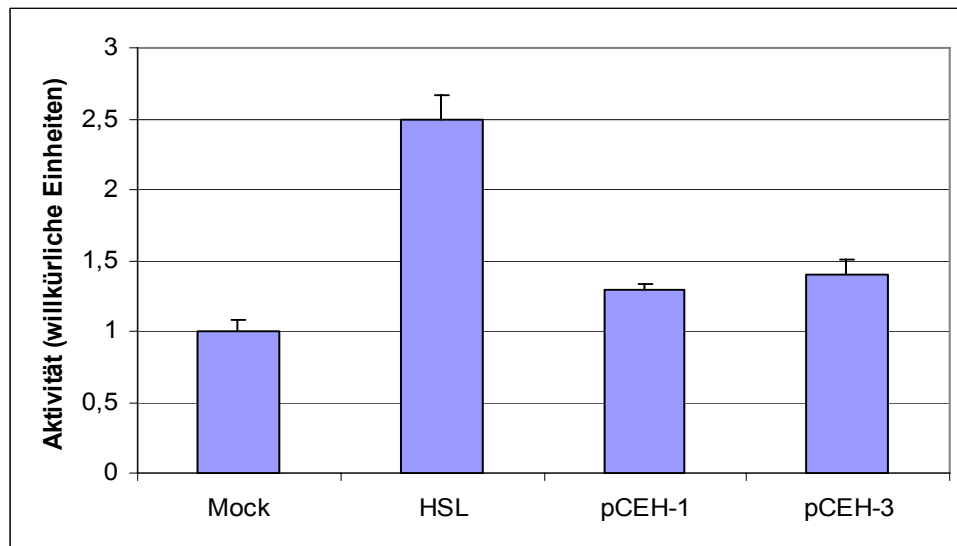


**Abbildung 30:** Cholesterinesteraseaktivität der Kandidatengene. Cos 7 Zellen wurden mit endotoxinfreier Plasmid-DNA der Kandidatengene transfektiert, geerntet und wie in den Methoden beschrieben mit radioaktivem Cholesterinoleat inkubiert. Nach Extraktion der Lipide und Auftrennung über DC wurden die spezifischen Banden für Cholesterinester und freies Cholesterin ausgeschnitten und die Radioaktivität im  $\beta$ -Counter vermessen. Als Negativkontrolle (Mock) diente der leere Vektor pcDNA4/His Max A und als Positivkontrolle die HSL.

Die HSL zeigte in diesem Assay eine sehr hohe Cholesterinesteraseaktivität, die Kandidatenproteine zeigten jedoch keine signifikante Aktivität. Da dieser Assay auf die HSL abgestimmt wurde, könnten die verwendeten Bedingungen für die Kandidatenproteine ungünstig gewesen sein, was die Aktivität einer möglicherweise vorhandenen Cholesterinesterase erklären könnte.

### 3) Retinolesterase- Aktivitätsbestimmung

Für die Bestimmung der Retinolesteraseaktivität wurden 100  $\mu$ g Protein mit radioaktiv markiertem Retinolpalmitat-Substrat inkubiert, die Lipide extrahiert und nach Identifikation und Ausschneiden der spezifischen Bande für freie Fettsäuren wurde die Radioaktivität im  $\beta$ -Counter bestimmt. Dieser Versuch wurde nur mit den Kandidatengenen pCEH-1 und pCEH-3 von Dr. Achim Lass (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Karl-Franzens Universität Graz) durchgeführt (Abb.31).



**Abbildung 31:** Retinolesteraseaktivität der Kandidatengene. Cos 7 Zellen wurden mit endotoxinfreier Plasmid-DNA der Kandidatengene transfektiert, geerntet und wie in den Methoden beschrieben mit radioaktivem Retinopalmitat inkubiert. Nach Extraktion der Lipide wurde die spezifische Bande der freien Fettsäuren ausgeschnitten und die Radioaktivität im  $\beta$ -Counter vermessen. Als Negativkontrolle (Mock) diente der leere Vektor pcDNA4/His Max A und als Positivkontrolle die HSL.

PCEH-1 und pCEH-3 zeigten eine 1.3- bzw. 1.4-fach erhöhte Enzymaktivität in diesem Assay. Da die HSL selbst nur geringe Retinolesteraseaktivität aufweist (2.5-fach) im Gegensatz zur Negativkontrolle, sind die Ergebnisse der untersuchten Kandidatenproteine nicht signifikant.

### **3.8 Klonierung der Kandidatengene in den Säugetiervektor pcDNA3.1/Zeo**

Da alle Kandidatenproteine unter den verwendeten Bedingungen keine Enzymaktivität in den Assays zeigten, wurde versucht, die cDNAs in den Säugetiervektor pcDNA3.1/Zeo zu klonieren. Dieser Vektor enthält keine Erkennungssequenzen für Antikörper und soll ausschließen, dass diese Sequenzen die Proteinfaltung stören könnten und dadurch keine Enzymaktivität vorhanden ist. Man kann die Proteinexpression in diesem Vektor zwar nicht mittels Westernblot nachweisen, aber man kann eine vorhandene Aktivität entweder mit den vorhin beschriebenen Aktivitätsassays oder mit spezifischen Inhibitoren (3.9) detektieren.

Von allen Kandidatengenen konnte nur pCEH-1 erfolgreich in diesen Vektor kloniert werden. Bei allen anderen Genen wurde die Sequenz des klonierten Inserts durch Vektorsequenzen unterbrochen. Es schien so, als würde die multiple Klonierungsstelle, wie von Invitrogen angegeben, nicht stimmen. Auch nach mehrmaligen Klonierungsversuchen konnten keine positiven Kolonien der anderen Kandidatengene durch Sequenzierung bestätigt werden.

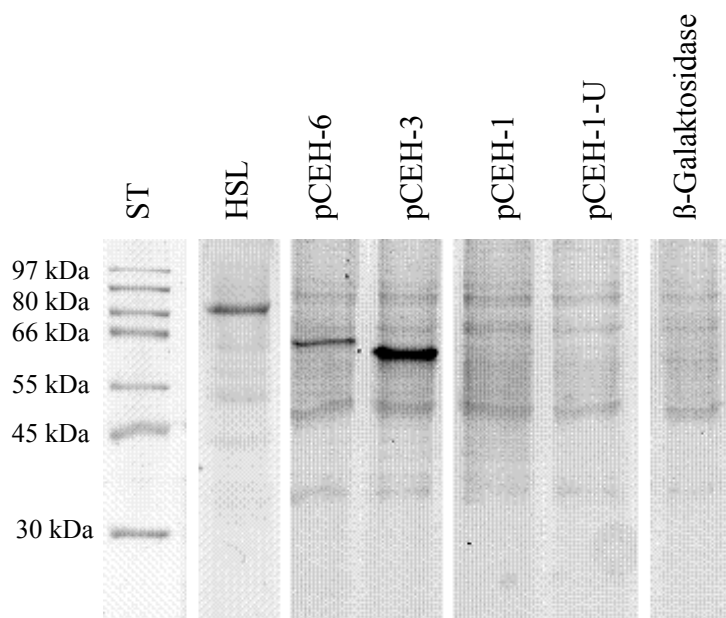
### 3.9 Qualitative Bestimmung der Enzymaktivität mit spezifischen Inhibitoren

Weiters wurde die Enzymaktivität der Kandidatenproteine (in beiden Expressionsvektoren) mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren überprüft. Dieser Versuch wurde von Dr. Ruth Birner-Grünberger am Institut für Biochemie, Technische Universität Graz, durchgeführt.

Cos 7 Zellen wurden mit den Endotoxin-freien Plasmid-DNAs der Kandidatenproteine transfektiert, die Proteine geerntet und 50-100 µg mit spezifischen Inhibitoren inkubiert. Diese Inhibitoren sind Alkylphosphonate mit unterschiedlicher Polarität, die kovalent an das aktive Zentrum von lipolytischen Enzymen, im speziellen von Lipasen und Cholesterinesterasen, binden und somit diese Enzyme irreversibel inaktivieren. Da an den spezifischen Inhibitoren eine Fluorescingruppe hängt, können die Proteine nach Auftrennung über SDS-PAGE mit Hilfe von 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD)- Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

#### *1) Überprüfung unspezifischer lipolytischer Aktivität*

Der unspezifische Inhibitor NBD-single chain phosphonate (NBD-HE-HP) bindet irreversibel an das aktive Zentrum vieler Lipasen und Esterasen. Als Positivkontrolle diente die HSL und als Negativkontrolle die β-Galaktosidase.



**Abbildung 32:** SDS- Gele nach Sichtbarmachung mittels NBD-Fluoreszenz. Cos 7 Zellen wurden mit Plasmid-DNAs der Kandidatengene transfektiert, die Proteine geerntet, mit dem Inhibitor NBD-HE-HP inkubiert, mittels SDS-Gel aufgetrennt und mit NBD-Fluoreszenz sichtbar gemacht. St... Standard, pCEH-1-U... Vektor pcDNA3.1/Zeo, der als Insert die cDNA des Gens pCEH-1 trägt.

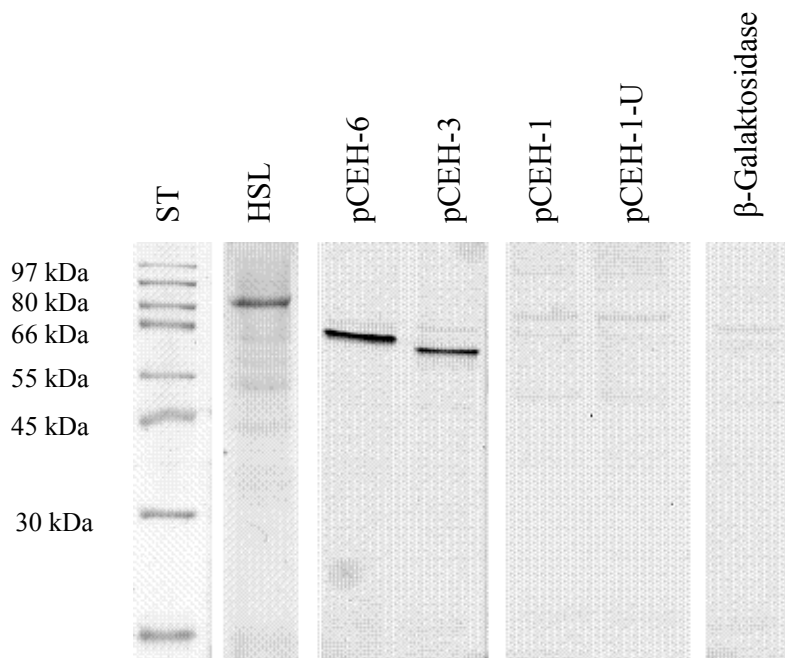
Die HSL war, wie erwartet, positiv und zeigte bei 83 kDa eine fluoreszierende Bande, also musste der spezifische Inhibitor daran gebunden haben (Abb. 32). Auch die beiden Kandidatenproteine pCEH-6 und pCEH-3 zeigten bei den richtigen Proteingrößen (63 bzw.

62 kDa) eine fluoreszierende Bande. Somit sollten diese Proteine also eine lipolytische Aktivität besitzen. Das Protein von pCEH-1 zeigte in beiden Vektoren keine Aktivität. Das war auch bei allen anderen Kandidatenproteinen (Abb. nicht gezeigt) der Fall.

Da nicht dieselbe Proteinmenge von der HSL und den Kandidatenproteinen eingesetzt wurde, können die Enzymaktivitäten nicht quantitativ miteinander verglichen werden.

## 2) Überprüfung der Lipaseaktivität

Um die lipolytische Aktivität genauer zu untersuchen, wurde von allen Kandidatenproteinen die Lipaseaktivität überprüft. Der Inhibitor NBD-*sn1*-triglyceride phosphonate (NBD-*sn1*-TG) bindet irreversibel an aktive Lipasen.

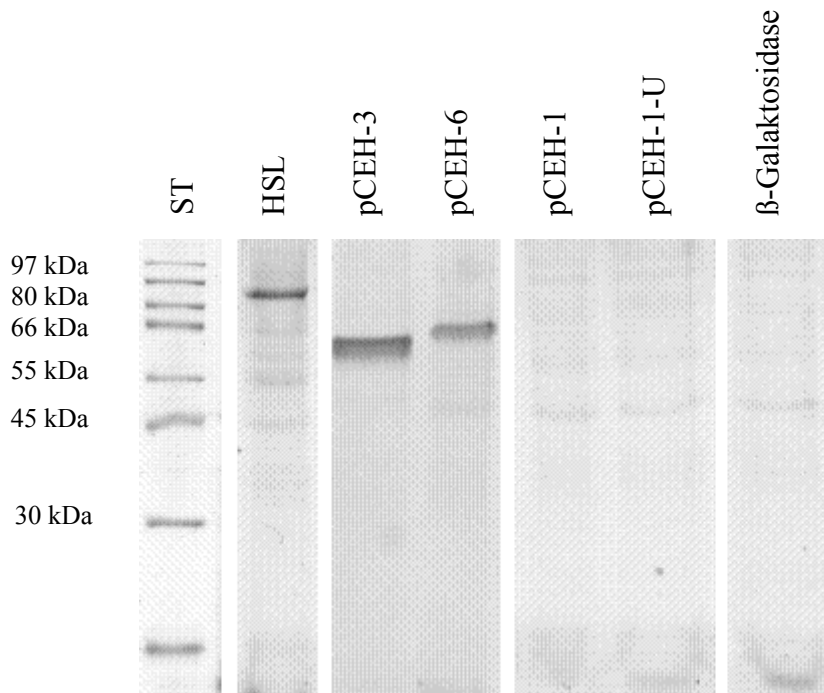


**Abbildung 33:** SDS-Gele nach Sichtbarmachung mittels NBD-Fluoreszenz. Cos 7 Zellen wurden mit Plasmid-DNAs der Kandidatengene transfiziert, die Proteine geerntet, mit dem Inhibitor NBD-*sn1*-TG inkubiert, mittels SDS-Gel aufgetrennt und mit NBD-Fluoreszenz sichtbar gemacht. St... Standard, pCEH-1-U...Vektor pcDNA3.1/Zeo, der als Insert die cDNA des Gens pCEH-1 trägt.

Auch bei der Überprüfung der spezifischen Lipaseaktivität zeigte die HSL ein positives Ergebnis (Abb. 33). Erfreulicherweise war auch bei den Kandidatenproteinen pCEH-6 und pCEH-3 eine deutliche Lipaseaktivität ersichtlich. Alle anderen Kandidatenproteine (Abb. nicht gezeigt) zeigten keine Enzymaktivität in diesem Versuch. Da wiederum unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt wurden, kann man die Stärke der Enzymaktivitäten nicht miteinander vergleichen.

### 3) Überprüfung der Cholesterinesterhydrolaseaktivität

Von allen Kandidatenproteinen wurde auch die Cholesterinesterhydrolase (CEH)-aktivität überprüft. Der Inhibitor NBD-cholesterylphosphonate (NBD-CP) bindet spezifisch und irreversibel an das aktive Zentrum von CEH. Auch hier wurde als Positivkontrolle die HSL und als Negativkontrolle die  $\beta$ -Galaktosidase verwendet.

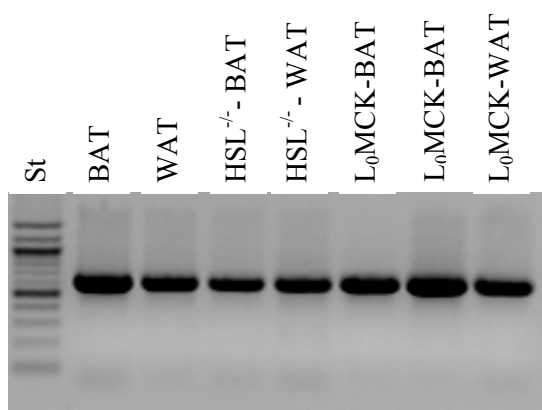


**Abbildung 34:** SDS-Gele nach Sichtbarmachung mittels NBD-Fluoreszenz. Cos 7 Zellen wurden mit Plasmid-DNAs der Kandidatengen transfiziert, die Proteine geerntet, mit dem Inhibitor NBD-CP inkubiert, mittels SDS-Gel aufgetrennt und mit NBD-Fluoreszenz sichtbar gemacht. St... Standard. pCEH-1-U...Vektor pcDNA3.1/Zeo, der als Insert die cDNA des Gens pCEH-1 trägt.

Wie schon mit den beiden Inhibitoren für unspezifische lipolytische und spezifische TG-Hydrolase Aktivität zeigte die HSL auch mit dem NBD-CP Inhibitor bei 83 kDa eine fluoreszierende Bande. Zu bemerken ist, dass auch die beiden Kandidatenproteine pCEH-6 und pCEH-3 bei den richtigen Proteingrößen (63 bzw. 62 kDa) eine fluoreszierende Bande zeigten. Somit müssen diese Proteine neben einer TG-Hydrolase Aktivität auch eine CEH-Aktivität besitzen. Das Protein von pCEH-1 zeigte in beiden Vektoren keine Aktivität.

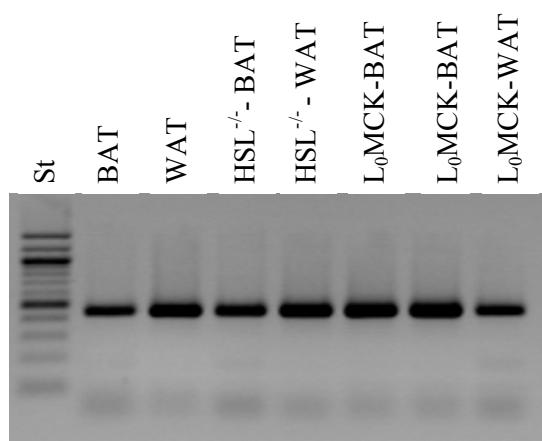
### 3.10 Überprüfung der Expressionen der Gene pCEH-3 und pCEH-6 in Fettgewebe, Makrophage und Schaumzelle von Wildtyp- und Knock out Mäusen

Da über die Inhibitorbindung eine Enzymaktivitäten von pCEH-3 und pCEH-6 bestätigt werden konnten, wurde noch einmal die Expression in den für diese Arbeit interessanten Geweben, dem weißen und braunen Fettgewebe, sowie in Makrophage und Schaumzelle von Wildtyp-, HSL ko-, und L<sub>0</sub>MCK Mäusen, untersucht.



**pCEH-3**

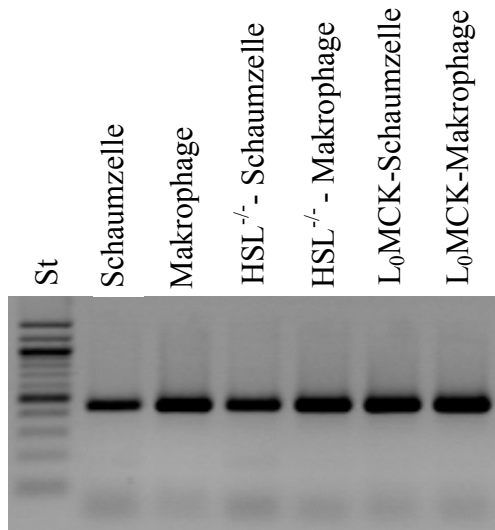
**Abbildung 35:** inverses Gelfoto von pCEH-3. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben verwendet. Das Produkt ist 601 bp groß. St...100 bp Leiter NEB



**pCEH-6**

**Abbildung 36:** inverses Gelfoto von pCEH-6. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben verwendet. Das Produkt ist 448 bp groß. St...100 bp Leiter NEB

Beide Kandidatengene werden in beiden Fettgewebsarten von Wildtyp- und Knock out Mäusen exprimiert (Abb. 35, 36), was bedeutet, dass sie unabhängig von der HSL und der LPL in diesen Geweben vorkommen.



**Abbildung 37:** inverses Gelfoto von pCEH-6. Es wurden die kurzen Primer (Tab.3) und die Hotfire Polymerase für die PCR verwendet. Es wurden die cDNAs von verschiedenen Geweben verwendet. Das Produkt ist 448 bp groß. St...100 bp Leiter NEB

### pCEH-6

Das Gen pCEH-6 wird in Makrophagen und Schaumzellen aller getesteten Maustypen exprimiert (Abb.37) und könnte die gesuchte neutrale CEH im Makrophagen sein.

Hingegen wird pCEH-3 nicht in Makrophagen und Schaumzellen der Wildtyp-, HSL ko-, und L<sub>0</sub>MCK- Mäuse exprimiert und kann somit keine Rolle bei der Schaumzellbildung bzw. ihrer Vermeidung spielen (Abb. nicht gezeigt).



## **4. Diskussion**

In Tieren, einigen Saatpflanzen und Pilzen werden der Großteil der Lipide in intrazellulären Triglyzerid (TG) und Sterolesterdepots gespeichert. Säugetiere speichern TG im Fettgewebe als Energiereserve. Das Gleichgewicht der Speicherung und Mobilisierung der Lipide ist für den Energiehaushalt des Körpers wichtig. Cholesterin wird in Form von CE in der Zelle gespeichert und ist Bestandteil von Membranen und wichtig für die Produktion von Gallensäure und Steroidhormonen. Um die gespeicherten Lipide verwerten zu können sind lipolytische Enzyme erforderlich. Diese Enzyme können die gespeicherten TG und CE hydrolysieren und freie Fettsäuren in die Zirkulation abgeben.

Die TG Lipasen und die CEH sind wichtige Schlüsselenzyme im Lipidmetabolismus und ihre lipolytischen Aktivitäten sind in verschiedenen Geweben bestätigt worden. Die TG Lipasen spielen eine wichtige Rolle im Fettgewebe [44], der Leber [63] und im Muskelgewebe [60]. Eine CEH-Aktivität wurde unter anderem im Makrophagen [51], im Dünndarm [47] und in den Steroidgeweben [57,54] bestätigt.

Auf molekularer Ebene konnten nur wenige Lipasen identifiziert werden. Viele charakterisierte Lipasen sind sekretorische Proteine [64-67], während die HSL [28], die Monoglyceridlipase [MGL, 68] und die Triglyzeridhydrolase [TGH, 69] intrazelluläre Enzyme sind. Die TGH ist involviert in der TG- Mobilisierung der Leber [63] und sie wird auch im Fettgewebe exprimiert, wo ihre Rolle noch nicht geklärt ist [70]. Die HSL hat ein breites Substratspektrum und kann unter anderem auch TG und CE hydrolysieren. Die HSL spielt zwar eine Rolle bei der Hydrolyse von TG in Adipozyten und der Hydrolyse von CE in Makrophagen, aber nach Versuchen mit HSL ko Mäusen kam man zu der Erkenntnis, dass sie in beiden Zelltypen nicht essentiell ist. Den initiierenden Schritt in der Hydrolyse von TG im Fettgewebe katalysiert die ATGL [44], die HSL hydrolysiert hauptsächlich DG im Fettgewebe [43].

Im Makrophagen existiert eine unveränderte CEH-Aktivität in HSL ko Mäusen im Vergleich zum Wildtyp und die essentielle CEH konnte bislang noch nicht identifiziert werden [42]. Die HSL hat auch Retinolesteraseaktivität und wird in vielen Geweben exprimiert, wie zum Beispiel den Hoden, den Nebennieren, den Ovarien, dem Skelettmuskel und dem Herzmuskel [29-34].

Atherosklerose ist eine der häufigsten Krankheiten unserer Gesellschaft. Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Atherosklerose spielen dabei Makrophagen und im weiteren Sinn die Schaumzellbildung. Makrophagen nehmen sehr viel überschüssiges Cholesterin auf und differenzieren zu Schaumzellen, die sich wiederum an der Intima und der Arterienwand anlagern und nekrotische Plaques bilden [71]. Diese Plaques vergrößern sich und können zu Thrombosen führen [72]. Eine neutrale CEH kann das gespeicherte Cholesterin in FC umwandeln, welches abtransportiert werden kann. Ziel dieser Arbeit in erster Linie war, eine CEH im Makrophagen und der Schaumzelle zu identifizieren.

Um unbekannte lipolytische Enzyme zu identifizieren, wurde zu Beginn dieser Arbeit in verschiedenen Datenbanken nach Enzymen mit einer  $\alpha/\beta$  Hydrolasedomäne gesucht. Eine spezifische Domäne für viele Lipasen/Esterasen ist die  $\alpha/\beta$  Hydrolasedomäne, welche aus ca. 11  $\beta$ -Faltblättern besteht, die an beiden Seiten mit  $\alpha$ -Helices flankiert sind [73]. Das aktive Zentrum von Lipasen und Esterasen beinhaltet eine katalytische Triade, bestehend aus einem Serin, Histidin und Aspartat [74]. Von den 30 Kandidatengen, die in unserer Arbeitsgruppe untersucht werden, wurden in dieser Arbeit 9 kloniert und teilweise charakterisiert.

PCEH-1 und pCEH-4 weisen eine Esterasedomäne, sowie die aktive Triade einer Serinhydrolase und eine  $\alpha/\beta$  Hydrolasedomäne auf.

PCEH-9 hat analoge Domänen zur Carboxylesterase Typ B, die wichtig ist für den Lipidmetabolismus, sowie zum retroviralen GAG p10 Protein. Das p10 Protein ist ein Matrixprotein und ist Bestandteil der Hülle von vielen Säugetierretroviren.

PCEH-2 und pCEH-5 besitzen eine Esterasedomäne und eine  $\alpha/\beta$  Hydrolasedomäne.

PCEH-7 weist eine Carboxylesterase Typ B- Domäne und eine Inosine-5'-monophosphate (IMP) Dehydrogenase- /Guanosine 5'-monophosphate (GMP) Reduktasedomäne auf. Die IMP Dehydrogenase (IMPDH) katalysiert die Reaktion der *de novo* GTP Biosynthese, die NAD-abhängige Reduktion von IMP zu XMP (Xanthosin-5-Phosphat) [75]. Die IMPDH ist assoziiert mit der Zellproliferation und ein mögliches Ziel für die Chemotherapie. Säugetier- und bakterielle IMPDHs sind Tetramere mit identischen Seitenketten. Es gibt im Menschen zwei IMPDH Isozyme [76]. Die GMP Reduktase katalysiert die irreversible und NADPH-abhängige reduktive Desaminierung von GMP zu IMP. Es sorgt für das intrazelluläre Gleichgewicht von G und A Nukleotiden [77].

PCEH-8 besitzt neben einer  $\alpha/\beta$  Hydrolasedomäne eine Calreticulin/calnexin P- Domäne, eine IMP (Inosine-5'-monophosphate) Dehydrogenase- /GMP (Guanosine 5'-monophosphate)

Reduktasedomäne und ein ER- Signalpeptid. Das Typ 1 integrierte Membranprotein Calnexin (CNX) und das lösliche Paralog Calreticulin (CRT) gehören zur Familie der Chaperone, die im ER von eukaryotischen Zellen vorkommen. Diese Kalzium- bindenden Proteine sind Lektine, die an Glycoproteine binden und für die richtige Assemblierung und Faltung zuständig sind. Die P-Domäne ist ein Teil von CNX und CRT, besitzt eine Kalziumbindestelle und ist wahrscheinlich an der Substratbindung beteiligt [78].

PCEH-3 und pCEH-6 weisen eine Esterasedomäne, sowie eine homologe Sequenz zur Carboxylesterase Typ B und ein ER-Signalpeptid auf. Proteine, die ständig im Lumen des ERs sind, unterscheiden sich von neusynthetisierten Proteinen durch die Anwesenheit der C-terminalen Sequenz Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) [79]. Diese Domäne kommt in vielen Spezies wie Vertebraten, Drosophila und Pflanzen vor.

Zuerst wurden die Expressionsmuster der Kandidatengene in den verschiedenen Geweben der Maus bestimmt. PCEH-9 wird nur in den Hoden exprimiert und ist deshalb nicht so interessant für diese Arbeit. Da es nicht möglich war, eine passende cDNA zu isolieren, konnte auch kein Protein isoliert und damit weitergearbeitet werden. Alle anderen Gene werden in der Leber, dem Gehirn, dem weißen Fettgewebe, der Niere, dem Blinddarm und dem Skelettmuskel exprimiert. Eine Expression in Makrophagen und Schaumzelle der Wildtyp- und HSL ko Mäuse ist bei allen Kandidatengenen, außer pCEH-3, sichtbar.

Die Expressionsstärke in Makrophage und Schaumzelle wurde mit dem house keeping gene Porphobilinogendeaminase verglichen. PCEH-4 zeigt eine doppelt so starke Expression in der Schaumzelle wie im Makrophagen. Das könnte bedeuten, dass dieses Gen in der Schaumzelle erhöhte Hydrolasefunktion besitzt, um überschüssige Fette abzubauen. pCEH-6 weist eine deutlich höhere Expression im Makrophagen als in der Schaumzelle auf, was vielleicht auf eine bedeutende Rolle der CEH-Aktivität dieses Proteins in diesen Geweben hindeutet. Alle anderen Kandidatengene zeigen gleich starke Expressionen in beiden Zelltypen.

Nach der erfolgreichen Klonierung aller Kandidatengene (außer pCEH-9) in den Säugetiervektor pcDNA4/HisMax A konnten 5 Proteine mittels Westernblot nachgewiesen werden. Die anderen 3 Proteine konnten auch nach Änderung der Versuchsbedingungen (Blotten über Nacht, primärer Antikörper für 72h, andere Zellaufschlußmethode) mittels Westernblot nicht bestätigt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass diese Proteine in das Medium sezerniert werden und deshalb in den Zelllysaten nicht nachgewiesen werden können. Trotzdem wurden mit allen Kandidatenproteinen Enzymaktivitätsassays mit verschiedenen radioaktiv-markierten Substraten durchgeführt, um die TG-Lipase-,

Cholesterinester- und Retinolesterhydrolase-Aktivität zu bestimmen. Bei allen Kandidatenproteinen konnten mit Hilfe dieser Assays keine Enzymaktivitäten gemessen werden.

Daraufhin wurde versucht, alle Kandidatengene in den Säugetiervektor pcDNA3.1/Zeo zu klonieren. Dieser Vektor wurde unter anderem für Versuche mit spezifischen Inhibitoren verwendet um auszuschließen, dass die Erkennungssequenzen (HisTag, Xpress<sup>TM</sup> Epitop) die Aktivität der Proteine beeinflussen. Nur pCEH-1 konnte erfolgreich kloniert werden, bei allen anderen Genen wurde die Sequenz des klonierten Inserts durch Vektorsequenzen unterbrochen. Es schien so, als würde die multiple Klonierungsstelle, wie sie von Invitrogen angegeben ist, nicht stimmen.

Weiters wurde die Enzymaktivität aller Kandidatenproteine qualitativ mit unspezifischen Inhibitoren überprüft. Da pCEH-1 in beiden Säugetiervektoren keine Enzymaktivität aufwies, kann man nicht sagen, ob die Erkennungssequenzen des Antikörpers die Proteinfaltung stören und so ein inaktives Protein vorliegt. Interessanterweise konnte aber mit den unspezifischen Inhibitoren bei pCEH-6 und pCEH-3 eine Hydrolaseaktivität gemessen werden. Genauere Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren bestätigten TG-Lipase und CEH- Aktivität. Da diese Inhibitoren irreversibel an das katalytische Zentrum von Enzymen binden, ist dieses Experiment viel sensibler als der Assay.

Es scheint so, dass das Protein von pCEH-3 in wenigen Geweben CE und TG hydrolysieren kann. In der Leber wurde zum Beispiel die wichtigste Hydrolase zur Mobilisation der Triglyzeridtröpfchen noch nicht gefunden. Wichtig ist auch noch zu erwähnen, dass dieses Gen in beiden Fettgewebsarten aller Wildtyp- und ko Mäuse exprimiert wird und so auch eine Rolle bei der Hydrolyse von Fetten im Fettgewebe spielen könnte.

PCEH-6 wird in Makrophagen und Schaumzellen aller untersuchten Wildtyp- und ko Mäuse exprimiert und ist somit besonders interessant für diese Arbeit, da die CEH-Aktivität dieses Proteins in diesen Geweben eine wichtige Rolle spielen könnte.

Um die genaueren Funktionen dieser beiden Proteine herauszufinden, müssen noch weitere Experimente durchgeführt werden, die aber in dieser Arbeit nicht mehr inbegriffen sind, da sie das Ausmaß dieser Diplomarbeit sprengen würden.

Da ähnliche Proteine im Menschen von Bedeutung sein könnten, wurden im Internet ([www.Genomatix.com](http://www.Genomatix.com)) mögliche Homologe zum Menschen gesucht. Von pCEH-3 existiert tatsächlich ein Homolog im Menschen, das aber bislang noch nicht genauer charakterisiert ist.

PCEH-6 weist nur ein Homolog in der Ratte auf, im Menschen existiert kein von der Sequenz her ähnliches Protein.

Das mit den radioaktiven Substraten keine Enzymaktivität der beiden positiven Kandidatenproteine messbar war, kann mehrere Gründe haben. Diese Aktivitätsbestimmungsassays wurden mit Hilfe der HSL optimiert und könnten daher für die beiden Proteine so ungünstige Bedingungen darstellen, dass kein aktives Protein vorliegt. Da wir in erster Linie eine neutrale CEH gesucht haben, wurden die Aktivitätsbestimmungsassays bei pH 7 durchgeführt. Da es sich natürlich auch um eine saure CEH handeln könnte, sollte man den Assay bei höheren pH-Werten durchführen, um eine Enzymaktivität zu bestätigen. Andererseits könnte natürlich auch ein Aktivator nötig sein, um ein aktives Protein zu erhalten. Alle Kandidatenproteine besitzen eine Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle. Man könnte im Enzymaktivitätsassay versuchen, diese Stelle mittels Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) zu phosphorylieren, um so eine Enzymaktivität zu erhalten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit von 9 möglichen Hydrolasen 2 identifiziert wurden, die sowohl eine TG-Hydrolase- als auch CEH-Aktivität aufweisen. Da diese Enzyme in Geweben vorkommen, die besonders wichtig für die Lipidhomöostase sind, könnten sie dort unterschiedliche Aufgaben erfüllen: Einerseits könnte ein Enzym (oder beide) in der Leber die noch unbekannte TG-Hydrolase sein. Andererseits könnten diese Enzyme auch im Fettgewebe für die Mobilisierung von Fettsäuren aus TG mitverantwortlich sein. PCEH-6 könnte möglicherweise die bis jetzt noch nicht gefundene CEH in Makrophagen und Schaumzellen darstellen. Zur genaueren Identifizierung dieser beiden Enzyme bedarf es allerdings weiterreichender Arbeiten.

## 5. Literatur

- [1] Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809
- [2] Williams K.J. and Tabas I. (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 551-561
- [3] Maxfield F.R., Wustner D. (2002) Intracellular Cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* **110**, 891- 898
- [4] Soccio R.E., Breslow (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1150-60. Review.
- [5] Erkelens D.W., Chen C., Mitchell C.D. and Glomset J.A. (1981) Studies of the interaction between apolipoproteins A and C and triacylglycerol-rich particles. *Biochem. Biophys. Acta* **665**, 221-233
- [6] Ji Z.S., Brecht W.J., Miranda R.D., Hussain M.M, Innerarity T.L., Mahley R.W. (1993) Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 10160-10167
- [7] Chappell D.A., Fry G.L., Waknitz M.A., Iverius P.H., Williams S.E., Strickland D.K (1992) The low density lipoprotein receptor-related protein/ alpha 2-makroglobulin receptor binds and mediates catabolism of bovine milk lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **267**, 25764-25767
- [8] Nykjaer A., Nielsen M., Lookene A., Meyer N., Roigaard H., Etzerodt M., Beisiegel U., Olivecrona G., Gliemann J. (1994) A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 31747-31755
- [9] Beisiegel U., Weber W., Bengtsson-Olivecrona G. (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomikrons to the low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8342-8346
- [10] Lane S.B., Tchede K.T., Nair M.P., Thigpen A.E., Lacko A.G. (2004) Characterization of lecithin: cholesterol acyltransferase expressed in a human lung cell line. *Protein Expr Purif.* **36(2)**,157-164.
- [11] Glomset J.A. (1968) The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.* **9**, 155-167
- [12] Stein O., Stein Y. (1999) Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis.* **144**, 285-301
- [13] Trigatti B., Rigotti A., Krieger M. (2000) The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 123-131
- [14] Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., Krieger M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high-density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518-520
- [15] Langmann T., Klucken J., Reil M., Liebisch G., Luciani M.F., Chimini G., Kaminski W.E., Schmid G. (1999) Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 29-33
- [16] Chang T.Y., Chang C.C., Cheng D. (1997) Acyl-coenzyme A: cholesterol acyl- transferase. *Annu Rev. Biochem.* **66**, 613-638
- [17] Maxfield F.R., Wustner D. (2002) Intracellular Cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* **110**, 891- 898
- [18] Feng B., Yao P.M., Li Y., Devlin C.M., Zhang D., Harding H.P., Sweeney M., Rong J.X., Kuriakose G., Fischer E.A., Marks A.R., Ron D., Tabas I. (2003) The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 781-792

- [19] Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* **109**, 1125-1131
- [20] Brown A.J., Sun L., Feramisco J.D., Brown M.S., Goldstein J.L. (2002) Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol. Cell.* **10**, 237-245
- [21] Sever N., Yang T., Brown M.S., Goldstein J.L., DeBose-Boyd R.A. (2003) Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol. Cell.* **11**, 25-33
- [22] Yang T., Espenshade P.J., Wright M.E., Yabe D., Gong Y., Albersold R., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* **110**, 489-500
- [23] Osuga J., Ishibashi S., Oka T., Yagya T., Tozawa R., Fujimoto A., Shionoiri F., Yahagi N., Kraemer F.B., Tsutsumi O., Yamada N. (2000) Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 787-792
- [24] Shen W.J., Patel S., Hong R., Kraemer F.B. (2000) Hormone-sensitive lipase functions as an oligomer. *Biochemistry* **39**, 2392-2398
- [25] Belfrage P., Jergil B., Stralfors P., Tornqvist H. (1977) Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue: identification and some properties of the enzyme protein. *FEBS Lett.* **75**, 259-264
- [26] Yeaman S.J. (1990) Hormone-sensitive lipase: a multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochem. Biophys. Acta.* **1052**, 128-132
- [27] Wei S., Lai K., Patel S., Piantedosi R., Shen H., Colantuoni V., Kraemer F.B., Blaner W.S. (1997) Retinyl ester hydrolysis and retinol efflux from BFC-1 beta adipocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 14159-14165
- [28] Kraemer F.B., Shen W.J. (2002) Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di) acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* **43**, 1585-1594
- [29] Holm C., Kirchgessner T.G., Svenson K.L., Lusic A.J., Belfrage P., Schotz M.C. (1988) Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science* **241**, 1503-1506
- [30] Kraemer F.B., Patel S., Singh Bist A., Gholami S.S., Saedi M.S., Sztalryd C. (1993) Detection of hormone-sensitive lipase in various tissues: Regulation in the rat testis by human chorionic gonadotropin. *J. Lipid Res.* **34**, 609-616
- [31] Langfort J., Ploug T., Ihlemann J., Enevoldsen L.H., Stallknecht B., Saldo M., Kjaer M., Holm C., Galbo H. (1998) Hormone-sensitive lipase (HSL) expression and regulation in skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* **441**, 219-228
- [32] Contreras J.A., Holm C., Martin A., Gaspar M.L., Lasuncion M.A. (1994) Presence of Hormone-sensitive lipase mRNA in J774 macrophages. *Isr. J. Med. Sci.* **30**, 778-781
- [33] Holm C., Belfrage P., Fredrikson G. (1987) Immunological evidence for the presence of Hormone-sensitive lipase in rat tissues other than adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 99-105
- [34] Khoo J.C., Reue K., Steinberg D., Schotz M.C. (1993) Expression of hormone-sensitive lipase mRNA in macrophages. *J. Lipid. Res.* **34**, 1969-1974
- [35] Li Z., Sumida M., Birchbauer A., Schotz M.C., Reue K. (1994) Isolation and characterization of the gene for mouse hormone-sensitive lipase. *Genomics.* **24**, 259-265
- [36] Langin D., Laurell H., Holst L.S., Belfrage P., Holm C. (1993) Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: possibly significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella TA144*, an Antarctic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4897-4901

- [37] Holm C., Osterlund T., Laurell H., Contreras J.A. (2000) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 365-393
- [38] Londos C., Brasaemle D.L., Schultz C.J., Adler-Wailes D.C., Levin D.M., Kimmel A.R., Rondinone C.M (1999) On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann. NY Acad. Sci.* **892**, 155-168
- [39] Dawn L., Brasaemle, Georgia D., Shapiro L., 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
- [40] Syu L.J., Saltiel A.R. (1999) Lipotransin: a novel docking protein for hormone-sensitive lipase. *Mol. Cell.* **4**, 109-115
- [41] Fredrikson G., Tornqvist H., Belfrage P. (1986) Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochem. Biophys. Acta.* **876**, 288-293
- [42] Sztalryd C., Komaromy M.C., Kraemer F.B.(1995) Overexpression of hormone-sensitive lipase prevents triglyceride accumulation in adipocytes. *J.Clin. Invest.* **95**, 2652-2661
- [43] Haemmerle G., Zimmermann R., Hayn M., Theussl C., Waeg G., Wagner E., Sattler W., Magin T.M., Wagner E.F., Zechner R. (2002) Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J.Biol. Chem* **277**, 4806-4815
- [44] Zimmermann R., Strauss J.G., Haemmerle G., Schoiswohl G., Birner-Gruenberger R., Riederer M., Lass A., Neuberger G., Eisenhaber F., Hermetter A., Zechner R. (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383-1386
- [45] Belfrage P., Fredrikson G., Olsson H., Stralfors P. (1985) Molecular mechanisms for hormonal control of adipose tissue lipolysis. *Int. J. Obes.* **9**, 129-135
- [46] Krause B.R., Hartman A.D. (1984) Adipose tissue and cholesterol metabolism. *J.Lipid Res.* **25**, 97-110
- [47] Wang S.P., Laurin N., Himms-Hagen J., Rudnicki M.A., Levy E., Robert M.F., Pan L. Oligny L. Mitchell G.A (2001) The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes. Res.* **9**, 119-128
- [48] Tsutsumi C., Okuno M., Tannous L., Piantedosi R., Allan M., Goodman D.S., Blaner W.S.(1992) Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **267(3)**, 1805-1810
- [49] Zovich D.C., Orolaga A., Okuno M., Kongl L.W., Talmage D.A., Piantedosi R., Goodman D.S., Blaner W.S. (1992) Differentiation-dependent expression of retinoid-binding proteins in BFC-1 beta adipocytes. *J. Biol. Chem.* **267(20)**, 13884-13889
- [50] Wei S., Lai K., Patel S., Piantedosi R., Shen H., Colantuoni V., Kraemer F.B., Blaner W.S. (1997) Retinyl Ester Hydrolysis and Retinol Efflux from BFC-1b Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 14159-14165
- [51] Brown M.S., Ho Y.K., Goldstein J.L. (1980) The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells: continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J. Biol. Chem.* **255**, 9344-9352
- [52] Spiegelman B.M., Flier J.S. (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* **104**, 531-543
- [53] Kelner K., Helmut L. (2003) Obesity: what is to be done? *Science* **299**, 845
- [54] Li H., Brochu M., Wang S.P., Rochdi L., Cote M., Mitchell G., Gallo-Payet N (2002) Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes lipid storage in the adrenal cortex and impaired corticosterone response to corticotropin stimulation. *Endocrinology* **143**, 3333-3340



- [55] Kraemer F.B., Shen W.J., Natu V., et al. (2002) Adrenal neutral cholesteryl ester hydrolase: identification, subcellular distribution, and sex differences. *Endocrinology* **143**, 801-806
- [56] Holst L.S., Hoffmann A.M., Mulder H., Sundler F., Holm C., Bergh A., Fredrikson G. (1994) Localization of hormone-sensitive lipase to rat Sertoli cells and its expression in developing and degenerating testes. *FEBS Lett.* **355** (2), 125-130
- [57] Gupta R.S., Dixit V.P. (1988) Effect of dietary cholesterol on spermatogenesis. *Z. Ernährungswiss.* **27**, 236-243
- [58] Livera G., Roullier F.V., Durand P., Habert R. (2000) Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biol. Reprod.* **62**, 1303-1314
- [56] Grober J., Lucas S., Soredhe-Winzell M., Zaghini I., Mairal A., Contreras J.A., Besnard P., Holm C., Langin D. (2003) Hormone-sensitive lipase is a cholesteryl esterase of the intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.* **278**, 6510-6515
- [60] Haemmerle G., Zimmermann R., Strauss J.G. (2002) Hormone-sensitive lipase deficiency in mice changes the plasma lipid profile by affecting the tissue-specific expression pattern of lipoprotein lipase in adipose tissue and muscle. *J. Biol. Chem.* **277**, 12846-12952
- [61] Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*. **24**, 104-108.
- [62] Levak Frank S., Weinstock P.H., Hayek T., Verdery R., Hoffmann W., Ramakrishnan R., Sattler W., Breslow J.L., Zechner R. (1997) Induced mutant mice expressing lipoprotein lipase exclusively in muscle have subnormal triglycerides yet reduced high density lipoprotein cholesterol levels in plasma. *J. Biol. Chem.* **272**, 17182-17180
- [63] Gilham D., Alam M., Gao W., Vance D.E., and Lehner R. (2005) Triacylglycerol Hydrolase Is Localized to the Endoplasmic Reticulum by an Unusual Retrieval Sequence where It Participates in VLDL Assembly without Utilizing VLDL Lipids as Substrates. *Mol. Biol. Cell* **16**, 984-996
- [64] Semeriva M., Desnuelle P. (1979) Pancreatic lipase and colipase. An example of heterogeneous biocatalysis. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol Biol.* **48**, 319-370
- [65] Preiss-Landl K., Zimmermann R., Hammerle G., and Zechner R. (2002) Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 471-481
- [66] Thuren T. (2000) Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 277-283
- [67] McCoy M.G., Sun G.S., Marchadier D., Maugeais C., Glick J.M., and Rader D.J. (2002) Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J. Lipid Res.* **43**, 921-929
- [68] Karlsson M., Contreras J.A., Hellman U., Tornqvist H., and Holm C. (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J. Biol. Chem.* **272**, 27218-27223
- [69] Dolinsky V.W., Sipione S., Lehner R., and Vance D.E. (2001) The cloning and expression of a murine triacylglycerol hydrolase cDNA and the structure of its corresponding gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1532**, 162-172
- [70] Dolinsky V.W., Gilham D., Alam M., Vance D.E., Lehner R. (2004) Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism. *Cell. Mol. Life. Sci.* **61**(13), 1633-1651.
- [71] Beisiegel U., St. Clair R.W. (1996) An emerging understanding of the interactions of plasma lipoproteins with the arterial wall that leads to the development of atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **7**, 265-268
- [72] Buja L.M., Kovanen P.T., Bilheimer D.W. (1979) Cellular pathology of homozygous familial hypercholesterolemia. *Am. J. Pathol.* **97**, 327-357

- [73] Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S.M., Harel M., Remington S.J., Silman I., and Schrag, J. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**, 197-211
- [74] Cygler M., Grochulski P., Kazlauskas R.J., Schrag J.D., Bouthillier F., Rubin B., Serreqi A.N., and Gupta A.K. (2004) A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3180-3186
- [75] Collart F.R., Huberman E. (1988) Cloning and sequence analysis of the human and Chinese hamster inosine-5'-monophosphate dehydrogenase cDNAs. *J. Biol. Chem.* **263**, 15769-15772
- [76] Natsumeda Y., Ohno S., Kawasaki H., Konno Y., Weber G., Suzuki K. (1990) Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **265**, 5292-5295
- [77] Andrews S.C., Guest J.R. (1988) Nucleotide sequence of the gene encoding the GMP reductase of *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* **255**, 35-43
- [78] Ellgaard L., Riek R., Herrmann T., Guntert P., Braun D., Helenius A., Wuthrich K. (2001) NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3133-3138
- [79] Munro S., Pelham H.R.B. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907

## ZUSAMMENFASSUNG

Atherosklerose ist eine der häufigsten Zivilisationserkrankungen unserer Gesellschaft. Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Atherosklerose spielen dabei Makrophagen. Makrophagen sind dazu programmiert, überschüssiges Cholesterin aufzunehmen und bei Überladung mutieren sie zu Schaumzellen welche der Apoptose und dem Zelltod unterliegen. Neutrale Cholesterinesterhydrolasen hingegen können die gespeicherten Cholesterinester hydrolysieren und in Folge mobilisieren, und wirken so der Schaumzellbildung entgegen. Alle bisher bekannten Cholesterinesterhydrolasen konnten nicht für die Hydrolyse aller Cholesterinester verantwortlich gemacht werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die bislang unbekannt(n) neutrale(n) Cholesterinesterhydrolase(n) im Maus-Makrophagen zu identifizieren. Das Substratspektrum wurde aber auch auf Triglyzeride und Retinolester ausgeweitet, da viele bekannte Cholesterinesterhydrolasen auch Triglyzeridhydrolase-, und Retinolesterase-Aktivität besitzen.

Zuerst wurde eine *in silico* Suche nach Proteinen mit  $\alpha/\beta$  Hydrolasendomänen im Genom der Maus durchgeführt, da viele lipolytischen Enzyme zur Familie der  $\alpha/\beta$  Hydrolasen, mit dem aus einem Serin, Histidin und Aspartat bestehenden aktiven Zentrum, gehören. Mit Hilfe der Datenbanksuche wurden mehr als 30 Kandidatengene gefunden, aus denen 9 für die weitere Identifizierung herausgegriffen wurden. Mittels RT-PCR wurden dann zunächst die Expressionsmuster der Kandidatengene in verschiedenen Geweben der Maus untersucht. Weiters wurde die Expression in Makrophagen, Schaumzellen und Fettgeweben von Hormon-sensitiven Lipase knock out Mäusen und Mäusen ohne Lipoproteinlipase im Fettgewebe untersucht. Die Stärke der Expressionen der Kandidatengene in Makrophage und Schaumzelle wurde mit Hilfe einer halbquantitativen RT-PCR im Vergleich zum house-keeping gene Porphobilinogendeaminase bestimmt. Danach wurden die codierenden Sequenzen der Kandidatengene in einen Säugetierexpressionsvektor kloniert, Cos 7 Zellen damit transfektiert und die Enzymaktivität der Kandidatenproteine mittels Enzymaktivitätsassays und spezifischen Inhibitoren untersucht. Mit der sensibleren Methode der spezifischen Inhibitoren zeigten 2 der 9 untersuchten Kandidatenproteine eine Cholesterinester- und Triglyzeridhydrolaseaktivität. Die beiden Enzyme werden in Geweben, die besonders wichtig für die Lipidhomöostase sind, exprimiert. In der Leber könnte ein Enzym (oder beide) die noch unbekannt(e) Triglyzeridhydrolase darstellen. Eine stärkere Expression im Makrophagen als in der Schaumzelle zeigt eines der beiden Gene, welches die bis jetzt noch nicht gefundene Cholesterinesterhydrolase in Makrophagen sein könnte. Da beide Gene auch in beiden Fettgewebsarten vorkommen, könnten sie auch für die Mobilisierung von Fettsäuren aus Triglyzeriden mitverantwortlich sein.