

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Ingenieurin im Fach medizinische Biotechnologie

Lena Maria Pawella

aus Berlin

Tag der mündlichen Prüfung:

Perilipin-Induktion und Dynamik der Expression
Lipidtropfen-assoziiierter Proteine in menschlicher
Leberparenchymverfettung und in Steatose-
Zellkulturmodellen

Gutachter:

Prof. Dr. Ralf Bartenschlager

Prof. Dr. Peter Schirmacher

Für meine Familie

Veröffentlichungen dieser Arbeit

Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Renner M, Bartenschlager R, Schirmacher P, Straub BK

“Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis”

Journal of Hepatology 2013 under review

Straub BK, Gyoengyoesi B, Koenig M, Hashani M, Pawella LM, Herpel E, Mueller W, Macher-Goeppinger S, Heid H, Schirmacher P.

„Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation“

Histopathology. 2013 Online

Pawella LM, Hashani M, Schirmacher P, Straub BK

„Lipid droplet-associated proteins in steatosis. Effects of induction and siRNA-mediated downregulation of PAT proteins in cell culture models of hepatocyte steatosis”

Pathologe. 2010 Oct; 31 Suppl 2:126-31

Präsentationen und veröffentlichte Zusammenfassungen von Teilergebnissen dieser Arbeit

Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Bartenschlager R, Schirmacher P, Straub BK

“Perilipin-1 differentiates chronic from acute hepatocyte steatosis”

GASL 2013, Hannover (Posterpräsentation)

Pawella LM, Schirmacher P, Straub BK

“Lipid droplets and associated proteins in chronic liver disease, hepatocellular carcinoma and derived cell culture models”

Liver Cancer 2012, Heidelberg (Vortrag)

Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Schirmacher P, Straub BK

“Induction of lipid droplet-associated proteins in cell culture models of hepatocellular/hepatoma steatosis”

Liver Cancer 2012, Heidelberg (Posterpräsentation)

Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Specht E, Schirmacher P, Straub BK

“Towards unravelling the molecular mechanisms of human hepatocyte steatosis *in situ*”

GASL 2012, Hamburg (Posterpräsentation)

Pawella LM, Hashani M, Schirmacher P, Straub BK

“Induction and siRNA-mediated downregulation of the lipid droplet-associated PAT-proteins adipophilin and TIP47 in cell culture models of hepatocyte steatosis”

GASL 2011, Regensburg (Posterpräsentation)

Pawella LM, Hashani M, Zimbelmann R, Heid H, Schirmacher P, Straub BK

“Effects of induction and siRNA-mediated downregulation of lipid droplet-associated proteins in cell culture models of hepatocyte steatosis”

FASEB 2010, „Lipid Droplets“, Steamboat Springs, Colorado, USA, (Posterpräsentation)

Pawella LM, Hashani M, Zimbelmann R, Heid H, Schirmacher P, Straub BK
“Effects of induction and siRNA-mediated downregulation of lipid droplet-associated proteins in cell culture models of hepatocyte steatosis”
DGP 2010, Berlin (Posterpräsentation 2. Preis)

Pawella LM, Fraschka S, Hashani M, Heid H, Zimbelmann R, Schirmacher P, Straub BK
“Characterization of lipid droplet-associated proteins in cell culture models of steatosis and in chronic steatotic liver disease”
GASL 2010, Bonn (Posterpräsentation)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	i
Tabellenverzeichnis.....	ii
Abkürzungsverzeichnis.....	iii
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1. Einleitung	5
1.1 Intrazelluläre Lipidtropfen.....	5
1.1.1 Funktion von Lipidtropfen	5
1.1.2 Morphologie und Zusammensetzung von Lipidtropfen	5
1.1.3 Biogenese und Reifung von Lipidtropfen	6
1.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine.....	7
1.2.1 PAT-Proteine.....	7
1.2.1.1 Perilipin (Perilipin-1)	9
1.2.2.2 Adipophilin (Perilipin-2).....	10
1.2.2.3 TIP47 (Perilipin-3).....	11
1.2.2.4 S3-12 (Perilipin-4)	12
1.2.2.5 MLDP/OXPAT (Perilipin-5)	12
1.2.2.6 PAT-Proteine außerhalb der Säugetierklasse.....	14
1.2.3 Weitere Lipidtropfen-assoziierte Proteine.....	15
1.3 Regulation des Lipidtropfenauf- und -abbaus	15
1.4 Lipidtropfen-assoziierte Erkrankungen der Leber.....	17
1.4.1 Steatose.....	17
1.4.2 Steatohepatitis	18
1.4.3 Hepatozelluläres Karzinom	19
1.5 Zielsetzung.....	20
2. Material	21
2.1 Geräte.....	21
2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	22
2.3 Chemikalien, Lösungen und Enzyme	22
2.4 Puffer und Medien	23
2.4.1 Allgemein	23

2.4.2 Bakterienkultur	24
2.4.3 Zellkultur	25
2.5 „Kits“	25
2.6 Antikörper	26
2.6.1 Primärantikörper	26
2.6.2 Sekundärantikörper	27
2.7 Oligonukleotid-Sequenzen	28
2.7.1 Primer-Sequenzen	28
2.7.2 siRNA- und shRNA-Sequenzen	29
2.8 Vektoren	31
2.9 Gewebe	31
2.10 Bakterienstämme	32
2.11 Zelllinien	33
3. Methoden.....	35
3.1 Mikroskopische Techniken.....	35
3.1.1 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	35
3.1.1.1 Herstellung und Fixierung	35
3.1.1.2 Immunfluoreszenzfärbung	35
3.1.2 Immunhistochemie	36
3.1.2.1 Herstellung und Fixierung von Paraffinschnitten	36
3.1.2.2 „Antigen-Retrieval“ und Immunhistochemische Färbung	36
3.1.3 „Live cell imaging“	37
3.2 Bakterienkultur	38
3.2.1 Transformation rekombinanter DNA in Bakterien	38
3.2.2 Übernachtskultur	38
3.2.3 Einfrieren von Bakterien	38
3.3 Zellkultur	39
3.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	39
3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
3.3.3 Zellzahlbestimmung	39
3.3.4 Kontaminationsüberprüfung	39
3.3.5 Steatose-Modelle	40
3.3.5.1 Ölsäure-Modell	40

3.3.5.2 Hypoxie	41
3.3.5.3 Präadipozyten-Differenzierungs-Modell	41
3.3.6 siRNA-Transfektion	43
3.3.7 Herstellung stabiler Zellen durch lentivirale Transfektion.....	44
3.3.8 Vitalitätstest (MTT).....	46
3.3.9 Proliferationstest (BrdU-Einbau)	46
3.4 Molekularbiologische Methoden	47
3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen	47
3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
3.4.3 Reverse Transkription / cDNA-Synthese	48
3.4.4 Amplifikation von cDNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
3.4.5 Semiquantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.4.6 Isolierung von Vektor-DNA.....	51
3.4.7 Restriktionsverdau und Ligation von Vektor-DNA	51
3.4.8 Kolonie-PCR	52
3.4.9 Sequenzierung	53
3.4.10 Agarose-Gelelektrophorese	53
3.5 Proteinbiochemische Methoden.....	53
3.5.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Kulturzellen und Gewebe.....	53
3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	54
3.5.3 Diskontinuierliche Proteingelelektrophorese nach Lämmli (SDS-PAGE)	54
3.5.4 Immunblot, Signaldetektion und densitometrische Auswertung	55
3.5.5 Entfernen gebundener Antikörper von PVDF-Membranen („Strippen“)	56
3.5.6 Immunpräzipitation aus Gewebslysaten.....	56
3.5.7 Nicht-destruktive Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen	58
3.5.8 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	59
3.5.8.1 Tryptischer Verdau und ESI-MS	59
3.5.8.2 Proteinidentifizierung.....	60
3.6 Triacylglycerid-Bestimmung	61
3.6.1 Vorbereitung der Proben	61
3.6.2 Lipidextraktion nach Bligh&Dyer.....	61
4. Ergebnisse	63
4.1 Analyse der Perilipin / PAT-Proteinexpression <i>in situ</i> und <i>in vitro</i>	63

4.1.1	Differentielle PAT-Proteinexpression in Lebern unterschiedlichen Steatosegrades	63
4.1.2	Analyse des Vorliegens von Perilipin-Spleißvarianten und -Modifikationen.	70
4.1.2.1	Phospho-Perilipin.....	70
4.1.2.2	Untersuchung von Perilipin-Spleißvarianten mittels PCR.....	71
4.1.2.3	Untersuchung der Spleißvarianten mittels Immunpräzipitation und Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie	72
4.1.3	Die Perilipin-Expression in chronischer Leberparenchymverfettung ist unabhängig von der Ätiologie	75
4.1.4	Interaktion von PAT-Proteinen mit anderen Proteinen.....	78
4.1.4.1	Co-Immunpräzipitation <i>in situ</i>	78
4.2	Mechanismen einer PAT-Proteininduktion <i>in vitro</i>	80
4.2.1	Perilipin wird in Kurzzeitsteatose-Modellen nicht induziert	80
4.2.1.1	Untersuchung der PAT-Proteine in <i>in vitro</i> Hypoxie-Modellen.....	86
4.2.1.2	Proteindegradation	86
4.2.2	Perilipin-Induktion bei chronischer Steatose <i>in vitro</i>	87
4.2.2.1	Effekte einer Oleat-Behandlung mit DMSO auf die PAT-Proteinexpression	88
4.2.2.2	Effekte eines Adipozyten-Differenzierungsmediums auf die PAT-Proteinexpression	90
4.2.2.3	Effekte einer Kombination des PAM-Modells mit DMSO auf die PAT-Proteinexpression	91
4.2.2.4	PAT-Proteine werden auf (post)-transkriptioneller und posttranslatonaler Ebene reguliert.....	96
4.2.3	Anwendung der Steatose-Modelle auf Zelllinien nicht-hepatischen Ursprungs	97
4.3	Effekte einer PAT-Protein-Herunterregulation <i>in vitro</i>	100
4.3.1	Transiente PAT-Herunterregulation (siRNA).....	100
4.3.1.1	Herunterregulation von Adipophilin und TIP47 verändert die Lipidtropfenmorphologie	101
4.3.2	Stabile Herunterregulation von Adipophilin und TIP47 in chronischen Steatose-Modellen induziert Perilipin	107
4.3.2.1	Frühere Perilipin-Induktion in Huh7-Zellen in Abwesenheit von	

Adipophilin durch DMSO-Oleat-Inkubation	108
4.3.2.2 Expressionserhöhung von Perilipin und MLDP in Abwesenheit von Adipophilin und TIP47 im PAM-DMSO-Modell.....	110
5. Diskussion.....	117
5.1 Induktion und mögliche Regulation von Perilipin.....	117
5.2 PAT-Proteine und Lipidakkumulation	121
5.3 Modell der Lipidtropfenreifung	123
5.4 Perilipin als Marker für eine chronische hepatozelluläre Steatose	127
6. Literatur	131
7. Danksagung.....	147
8. Anhang	149

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1: Morphologie eines Lipidtropfens.....	6
Abb. 1. 2: Modelle der Biogenese von Lipidtropfen am Endoplasmatischen Retikulum (ER).	7
Abb. 1. 3: Schematische Darstellung der strukturellen Ähnlichkeiten von PAT-Proteinen.	8
Abb. 1. 4: Funktion von Perilipin A bei der hormonell regulierten Lipolyse in Adipozyten.	17
Abb. 1. 5: Schematische Darstellung der Progression eines chronischen Leberschadens zum hepatozellulären Karzinom.....	19
Abb. 4. 1: Konfokale Laser-Scanning-Immunfluoreszenzmikroskopie von PAT-Proteinen in humaner Leberparenchymverfettung.	64
Abb. 4. 2: Immunblot-Analyse von PAT-Proteinen in menschlichen Lebergewebelysaten.	66
Abb. 4. 3: Densitometrische Auswertung der Immunblots von Abb. 4. 2	67
Abb. 4. 4: Semiquantitative real-time PCR von PAT- und Transkriptionsfaktoren-mRNAs in menschlichen Leberproben.	69
Abb. 4. 5: Phosphoryliertes Perilipin (Serin 522) kolokalisiert vollständig mit Perilipin in humanem Lebergewebe.....	71
Abb. 4. 6: PCR-Analyse von Perilipin-Isoformen in humanem Leber- und weißem Fettgewebe.	72
Abb. 4. 7: Immunpräzipitation (IP) von Perilipin mit Immunblot (A) und korrespondierender Silberfärbung (B).....	73
Abb. 4. 8: Sequenzabdeckung von Perilipin in der Elektrospray-Ionisations- Massenspektrometrie.....	74
Abb. 4. 9: Immunhistochemie von PAT-Proteinen in humaner Leberparenchymverfettung unterschiedlicher Ätiologie.....	76
Abb. 4. 10: Fehlen von Perilipin bei akuter Steatose.	77
Abb. 4. 11: Immunpräzipitation (IP) von Perilipin A aus humanem Lebergewebe.....	79
Abb. 4. 12: Co-Immunpräzipitation (IP) zur Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen Adipophilin und Perilipin.	80
Abb. 4. 13: Kurzfristige Induktion einer Steatose mit BSA-gekoppelter Ölsäure.	81
Abb. 4. 14: Immunfluoreszenzmikroskopie von PAT-Proteinen in einem Kurzzeitsteatose-Modell von Huh7-Zellen.	82
Abb. 4. 15: Immunfluoreszenzfärbung 2-tägig Oleat-behandelter Huh7-Zellen.	83
Abb. 4. 16: PAT-Proteine nach Inkubation von HepG2-Zellen mit unterschiedlichen	

steatogenen Substanzen.....	85
Abb. 4. 17: Immunblot von HIF1- α , Adipophilin (AP) und TIP47 bei Hypoxie.....	86
Abb. 4. 18: Immunblot von Perilipin (Peri) und Adipophilin (AP) in HepG2- und Huh7-Zellen nach 2-tägiger Oleat-Inkubation mit zusätzlich MG132 oder Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) für 24 h.	87
Abb. 4. 19: Perilipin wird durch Langzeitbehandlung von Huh7-Zellen mit DMSO und Oleat induziert.	89
Abb. 4. 20: Relative TAG-Konzentration von Huh7-Zellen nach Inkubation mit Oleat (OA), DMSO oder DMSO-Oleat.	90
Abb. 4. 21: PAM-Medium induziert Perilipin in Huh7-Zellen.....	91
Abb. 4. 22: Langzeitbehandlung von Huh7-Zellen mit Präadipozyten / Adipozyten-Differenzierungsmedium (PAM) mit DMSO verstärkt die Perilipin-Expression.	93
Abb. 4. 23: Relative TAG-Konzentration von Huh7-Zellen unter Langzeitbehandlung mit PAM-Medium mit bzw. ohne DMSO.	94
Abb. 4. 24: Relative Zellvitalität, Proliferationsaktivität und Differenzierungsgrad von Huh7-Zellen nach 10-tägiger PAM- oder PAM-DMSO-Behandlung.	95
Abb. 4. 25: PCR-Analyse der Perilipin-Isoformen A, B und C in Huh7-Zellen nach PAM-DMSO-Behandlung.....	97
Abb. 4. 26: Immunblot-Analyse von PAT-Proteinen in Caki-2-, HEK-293-, MCF-7-, Hela-, HCT 116- und LN229-Zellen nach Oleat- und PAM-Behandlung.....	98
Abb. 4. 27: Immunblot-Analyse von PAT-Proteinen in Caki-2-, HEK-293-, MCF-7-, Hela-, HCT 116-, LN229- und HaCaT-Zellen nach bis zu 30-tägiger PAM-DMSO-Behandlung.....	100
Abb. 4. 28: Immunblot-Analyse und Vitalitätstest (MTT) von Huh7- und HepG2-Zellen nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von Adipophilin und / oder TIP47.....	101
Abb. 4. 29: Immunblot und Zellvitalität siRNA-behandelter HepG2-Zellen mit und ohne Oleat-Behandlung.....	102
Abb. 4. 30: Immunfluoreszenzmikroskopie von Adipophilin und TIP47 in Huh7- und HepG2-Zellen nach siRNA-Transfektion gegen Adipophilin.....	103
Abb. 4. 31: Veränderte Lipidtropfenmorphologie in HepG2- und Huh7-Zellen durch transiente Herunterregulation von Adipophilin (A) und TIP47 (T).....	104
Abb. 4. 32: Fusionen von Lipidtropfen in HepG2-Zellen nach Herunterregulation von Adipophilin und TIP47.....	105

Abb. 4. 33: Immunfluoreszenzmikroskopie von Perilipin in siRNA-behandelten HepG2-Zellen.....	107
Abb. 4. 34: DMSO-Oleat behandelte Huh7-Zellen mit stabiler, kontinuierlicher Herunterregulation von Adipophilin und / oder TIP47.....	108
Abb. 4. 35: Zellvitalität (MTT) und Proliferationsaktivität (BrdU) von Huh7-Zellen nach stabiler shRNA-vermittelter Herunterregulation von Adipophilin und TIP47 nach 10 Tagen in PAM- und PAM-DMSO-Medium.....	110
Abb. 4. 36: Lentiviral-vermittelte stabile Herunterregulation von TIP47 und Adipophilin in Huh7-Zellen nach PAM-DMSO-Behandlung.....	112
Abb. 4. 37: Immunfluoreszenzmikroskopie von Huh7-Zellen mit lentiviral-vermittelter stabiler Herunterregulation von TIP47 und / oder Adipophilin nach PAM-DMSO-Behandlung.....	114
Abb. 4. 38: TAG-Gehalt nach PAM-DMSO-Behandlung in Huh7-Zellen mit lentiviral-vermittelter stabiler Herunterregulation von TIP47 und Adipophilin.....	116
Abb. 5. 1: Schematisches Modell der Lipidtropfenreifung in Hepatozyten.....	127

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. 1: In der Literatur beschriebene Funktionen der PAT-Proteine auf Lipidmetabolismus und Lipidtropfen.....	14
Tab. 1. 2: Lipidtropfen-assoziierte Proteine.....	15
Tab. 2. 1: Übersicht der verwendeten Antikörper.....	26
Tab. 2. 2: Primer für real-time PCR.....	28
Tab. 2. 3: Verwendete Primer für PCR- und Sequenzierungsanalysen.....	29
Tab. 2. 4: siRNA- und shRNA-Sequenzen.....	30
Tab. 2. 5: Menschliche Leberproben.....	32
Tab. 2. 6: Verwendete humane Zelllinien.....	33
Tab. 3. 1: Zellaussaatkonzentrationen der verschiedenen Steatose-Modelle.....	40
Tab. 3. 2: Eingesetzte Substanzen in der Zellkultur.....	42
Tab. 3. 3: Protokoll zur transienten siRNA-Transfektion am Beispiel der siRNA Standardkonzentration von 20 nM.....	43
Tab. 3. 4: Zusammensetzung eines Ansatzes einer reversen Transkription.....	48
Tab. 3. 5: Zusammensetzung eines 1x PCR-Ansatzes.....	49
Tab. 3. 6: Zusammensetzung eines 1x PCR-Ansatzes für Perilipin-Isoform spezifische Primer.....	49
Tab. 3. 7: 1x real-time PCR-Ansatz.....	50
Tab. 3. 8: Kolonie-PCR-Ansatz.....	52
Tab. 3. 9: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Prozentualitäten.....	55
Tab. 4. 1: Auswertung der Lipidtropfengröße (Pixelfläche) vor und nach Lipidtropfen Fusion.....	106

Abkürzungsverzeichnis

ADRP	„ <i>Adipose Differentiated Related Protein</i> “
AFLD	„ <i>Alcoholic Fatty Liver Disease</i> “
AGTL	„ <i>Adipose Triacylglycerid Lipase</i> “
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ASH	„ <i>Alcoholic Steatohepatitis</i> “
ATP	Adenosinriphosphat
BAT	„ <i>Brown Adipose Tissue</i> “
BLAST	Basic Local Alignment Research Tool
BODIPY®	4,4-Difluor-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene
bp	Basenpaar
BrdU	Brom-desoxy-Uracil
BS ³	Bis-sulfosuccinimidyl-Suberat
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cholesterin
c	„ <i>constitutive</i> “
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
C/EBP	„ <i>CCAAT/enhancer-binding-Proteine</i> “
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette
Cy3 / 5	Carbocyanin 3 / 5
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	„ <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> “
DMOG	Dimethyloxaloglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
DOC	Natriumdesoxycholat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
e	„ <i>exchangeable</i> “
ECL	„ <i>Enhanced Chemiluminescence</i> “
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetra-Acetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
FBS	Fetales Rinderserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
IBMX	1-Methyl-3-Isobutylxanthin
IL	Interleukin
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HCC	Hepatozelluläres Karzimon
HCV	Hepatitis C Virus
HIF	„ <i>Hypoxia Inducible Factor</i> “

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSL	Hormon-sensitive Lipase
HRP	„ <i>Horseradish Peroxidase</i> “
HSC	„ <i>Hepatic Stellate Cell</i> “
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDL	„ <i>Low Density Lipoprotein</i> “
Lep	Leptin
M	Molar
mAb	Monoklonaler Antikörper
ME	β-Mercaptoethanol
miRNA (miR)	mikroRNA
MLDP	„ <i>Myocardial Lipid Droplet Protein</i> “
mRNA	„ <i>messenger</i> “ RNA
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-1-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
n.b.	nicht bekannt
n.d.	nicht durchgeführt
NAFLD	„ <i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i> “
N-Terminus	Amino-Ende einer Polypeptidkette
NTP	Nukleosidtriphosphat
Oleat	BSA-gekoppelte Ölsäure
P	Pellet
pAb	Polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Präadipozyten / Adipozyten-Differenzierungsmedium
PAT-Familie	Perilipin-, Adipophilin-, TIP47-Proteinfamilie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pc	„ <i>Preclear</i> “
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P / S	Penicillin /Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	„ <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> “
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
siRNA	„ <i>small interfering RNA</i> “
ss	einzelsträngig

SDS	Natriumdodecylsulfat
SREBP	“ <i>Sterol regulatory element-binding protein</i> ”
TAG	Triacylglycerid
TBS	“ <i>Tris-Buffered Saline</i> ”-Puffer
TBST	“ <i>Tris-Buffered Saline</i> ”-Puffer mit Tween 20
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethylethyldiamin
TIP47	„ <i>Tail-Interacting Protein</i> “ (47 kDa)
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]- ether
Tween 20	Polyethylensorbitanmonolaurat
U	Enzymeinheit Unit
ÜB	Überstand
UTR	„ <i>untranslated region</i> “
UV	Ultraviolett
WAT	„ <i>White Adipose Tissue</i> “

Zusammenfassung

Die hepatozelluläre Steatose ist die häufigste Lebererkrankung in westlichen Industrieländern und geht mit einer erhöhten Inzidenz für Steatohepatitis, Leberzirrhose und hepatozelluläre Karzinome einher. Lipidtropfen-assoziierte Proteine der PAT-Familie (Perilipin, Adipophilin, TIP47 und MLDP) spielen eine maßgebliche Rolle in der Biogenese, Reifung und Degradation von Lipidtropfen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass Perilipin eine chronische Steatose *in vivo* und *in vitro* kennzeichnet und dadurch das Endstadium der Lipidtropfenreifung charakterisiert. *In situ* in einem Kollektiv von über 30 Leberproben unterschiedlichen Verfettungsgrads wurden die Perilipin-Isoformen A, B und C jeweils zusammen nachgewiesen und über Massenspektrometrie verifiziert; es bestand keine signifikante differentielle Expression der Perilipin-Isoformen. In einem weiteren Kollektiv von über 80 Leberbiopsien von Patienten mit einer akuten bzw. chronischen Leberzellschädigung unterschiedlicher Genese wurden Adipophilin und Perilipin unabhängig von Ätiologie, Geschlecht und Alter bei chronischer Leberparenchymverfettung gebildet. Bei akuter Leberparenchymverfettung wie bei ursprünglich nicht-verfetteten Transplantatlebern wurden TIP47, MLDP und Adipophilin verstärkt gebildet bzw. an Lipidtropfen rekrutiert; nicht jedoch Perilipin. In Übereinstimmung mit *in situ* Beobachtungen wurden TIP47, MLDP, und Adipophilin, nicht jedoch Perilipin, in hepatozytären Kurzzeitsteatose-Modellen in Kulturzellen der Linien Huh7, HepG2, Hep3B, und PLC unter Verwendung steatogener Substanzen wie BSA-gekoppelter Ölsäure, Cholesterin, LDL, PPAR γ -Agonisten, oder bei Hypoxie induziert. Perilipin wurde erst bei Langzeitbehandlung von Zellen von über 10 Tagen, insbesondere mit kombinierter Zugabe von DMSO mit BSA-gekoppelter Ölsäure oder einer Mischung aus PPAR γ -Agonisten, Biotin, IBMX und Hormonen wie L-Thyroxin, Insulin, und Dexamethason induziert. Die Lipidtropfenreifung ging mit einer sequentiellen Assoziation der ePAT-Proteine TIP47 und MLDP und der cPAT-Proteine Adipophilin und Perilipin mit Lipidtropfen einher. Neben den Transkriptionsfaktoren PPAR α und PPAR γ zeigten auch C/EBP β und SREBP1 zunehmende Proteinmengen in behandelten und unbehandelten Zellen, was auf kombinierte Faktoren für eine Perilipin-Induktion schließen lässt. In Kulturzellen waren für die Induktion von Perilipin eine niedrige Proliferationsrate und ein hoher Differenzierungsgrad der Zellen wichtig. In Kombinationen von Langzeitsteatose-Modellen mit einer Herunterregulation von Adipophilin und / oder TIP47, ersetzte TIP47 fehlendes Adipophilin, MLDP fehlendes TIP47 und Adipophilin sowie

Perilipin fehlendes Adipophilin. Die transiente Herunterregulation von Adipophilin oder kombiniert TIP47 und Adipophilin in den Zellkulturen verursachte große Perilipin-positive Lipidtropfen, die durch Lipidtropfenfusion entstanden, wie durch „*Live cell imaging*“ gezeigt werden konnte. Möglicherweise sind Lipidtropfenfusionen Ausdruck einer verminderten Lipidtropfenstabilität bei Fehlen von PAT-Proteinen, da Kontrollzellen dieses Phänomen nicht zeigten. Zellen mit vermindertem Adipophilin bildeten zwar mehr Perilipin, akkumulierten jedoch trotzdem weniger Triacylglyceride als Zellen mit verminderter TIP47-Menge oder Kontrollzellen. Demzufolge stellt Adipophilin einen entscheidenden Faktor in der intrahepatischen Lipidakkumulation dar. Der Einfluss von Perilipin konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Perilipin könnte jedoch sogar einen positiven Einfluss bei Patienten mit metabolischem Syndrom haben, da Perilipin bekanntermaßen über die Langzeitspeicherung von Triacylglyceriden die Lipotoxizität vermindert.

Antikörper gegen die PAT-Proteine TIP47, MLDP, Adipophilin und Perilipin sind hilfreiche diagnostische Marker für die Definition nicht nur steatotischer Lebererkrankungen, sondern auch akuter und chronischer Leberschäden. Langfristig sind therapeutische Ansätze, insbesondere mit dem cPAT-Protein Adipophilin denkbar, so wie es im Rahmen dieser Arbeit in Zellkulturmodellen und von anderen Autoren in der Maus gezeigt werden konnte.

Summary

Hepatocellular steatosis is the most prevalent liver pathology in the western world and can progress to steatohepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Lipid droplet-associated proteins of the PAT-family (perilipin, adipophilin, TIP47 and MLDP) play most important roles in the biogenesis, maturation and degradation of lipid droplets. This study demonstrates that perilipin characterizes chronic steatosis *in vivo* and *in vitro* thereby characterizing the final stage of lipid droplet maturation. Perilipin isoforms A, B and C were detected along with each other and were verified by mass spectrometry in a collective of over 30 human liver specimens *in situ* with different degrees of steatosis. There was no significant differential expression between the perilipin isoforms. Additionally, in a collective of over 80 human liver biopsies of patients with an acute or chronic liver damage, adipophilin and perilipin were expressed in chronic steatosis irrespective of etiology, gender and age. TIP47, MLDP and adipophilin, but not perilipin, were increasingly expressed or recruited to lipid droplets in acute liver steatosis in previously non-steatotic transplant livers due to drug-therapy, parenteral nutrition or HCV-reinfection. In accordance with the detection of TIP47, MLDP and adipophilin, but not Perilipin in acute steatosis *in situ*, these PAT-proteins were induced in short term-steatosis models in cultured hepatocytic cells of the lines Huh7, HepG2, Hep3B and PLC using steatogenic substances like BSA-coupled oleic acid, cholesterol, LDL, a PPAR γ -agonist or in hypoxia. Perilipin was induced in long term-steatosis culture models using combinations of DMSO and BSA-coupled oleic acid or using a mixture consisting of a PPAR γ -agonist, biotin, IBMX and the hormones L-thyroxine, insulin and dexamethasone. Lipid droplet maturation was characterized by a consecutive lipid droplet association of the ePAT-proteins TIP47 and MLDP followed by the cPAT-proteins adipophilin and perilipin. The transcription factors PPAR α , PPAR γ , C/EBP β and SREBP1 showed increasing protein amounts in treated and untreated cells, indicating that additional factors are needed for perilipin-induction. Low proliferative capacity and the differentiation status of cultured hepatocytic cells were important to induce perilipin. In combinations of long term-steatosis models with a stable downregulation of adipophilin and/or TIP47, TIP47 substituted for absent adipophilin, MLDP for absent TIP47 and adipophilin as well as perilipin replaced adipophilin. Transient downregulation of adipophilin and/or TIP47 lead to large perilipin-positive lipid droplets, which arose from lipid droplet fusion as shown by live cell imaging. This illustrates a reduced stability of lipid droplets in the absence of PAT-proteins, as

control cell did not show this phenomenon. Cells with downregulated adipophilin showed a higher perilipin amount, but accumulated less triacylglycerides than control cells or cells lacking TIP47. Therefore, adipophilin represents the major determinant of intrahepatic lipid accumulation. The impact of perilipin could not be finally clarified. However perilipin may even have a positive influence on patients with metabolic syndrome as perilipin is known to reduce lipotoxicity by long term-storage of triacylglycerides.

Antibodies against the PAT-proteins TIP47, MLDP, adipophilin and perilipin represent helpful diagnostic markers for the definition of not only steatotic liver diseases but also acute and chronic liver damage. In long term-consideration, therapeutic approaches are conceivable, especially with the PAT-member adipophilin, as shown in this and other studies involving cell culture and mouse models, respectively.

1. Einleitung

1.1 Intrazelluläre Lipidtropfen

Aufgrund der steigenden klinischen Relevanz Lipid-assoziiierter Erkrankungen, gewann die Erforschung der Regulation intrazellulärer Lipidtropfen zunehmend an Bedeutung [1-4]. Die Fähigkeit überschüssige freie Fettsäuren in Neutralfette umzuwandeln und diese in Form von intrazellulären Lipidtropfen zu speichern [5], schützt eukaryotische Zellen wie beispielsweise Hepatozyten [6-8], Myozyten des Herz- und Skelettmuskels [9-11] oder pankreatische β -Zellen [12, 13] vor lipotoxischen Effekten und gewährleistet die zelluläre Energie- und Lipidhomöostase. Bei Stoffwechselerkrankungen übersteigt das Lipidangebot die Kapazität der zellulären Speicherung und bioaktive Lipide können eine Schädigung des Gewebes verursachen [1, 14, 15].

1.1.1 Funktion von Lipidtropfen

Lipidtropfen sind dynamische Zellorganellen mit kontrolliertem Auf- und Abbau [16]. Sie sind der Hauptspeicherort von Neutralfetten wie Triacylglyceriden (TAG) und Cholesterinestern, die bei Bedarf mobilisiert und für Stoffwechsel, Membran- und Cholesterinsynthese verwendet werden können [17].

Um ihre Funktionen ausüben zu können, interagieren Lipidtropfen unter anderem mit Zellorganellen wie Mitochondrien, Peroxisomen oder mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) [18-20], wodurch möglicherweise der Lipidaustausch vereinfacht wird [21]. So liefern beispielsweise Lipidtropfen den am ER-lokalisierten Enzymen Lipide zur Steroidhormonsynthese in steroidogenen Zellen [20]. Lipidtropfen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Replikation des Hepatitis C Virus, wobei das Kapsid-Protein (Core) an Lipidtropfen in Hepatozyten bindet [22].

1.1.2 Morphologie und Zusammensetzung von Lipidtropfen

Lipidtropfen bestehen aus einem hydrophoben Kern, der von einer Phospholipid-Einzelschicht umgeben ist (Abb. 1. 1). Der hydrophobe Kern setzt sich vorwiegend aus Neutralfetten von Sterinestern (meist Cholesterinester) und TAG zusammen, wobei Adipozyten einen TAG-reichen [23], steroidogene Zellen [24] sowie Schaumzellen [25] einen Cholesterinester-reichen und „*Hepatic Stellate Cells*“ (HSC) einen Retinol-reichen

Lipidtropfenkern besitzen [26]. Bartz und Koautoren [27] zeigten, dass die äußere Lipidtropfenhülle aus einer komplexen Mischung aus über 160 amphiphilen Glycerophospholipiden (Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol) und Cholesterin besteht. Tauchi-Sato und Koautoren [28] wiesen zusätzlich auf eine unterschiedliche Phospholipid-Zusammensetzung zwischen Lipidtropfen und rauer ER-Membran bzw. Sphingolipid / Cholesterin-reiche Mikrodomäne hin. Der Phospholipid-Einzelschicht sind amphiphile Proteine assoziiert, die jedem Lipidtropfen gemäß Zelltyp und metabolischem Zellzustand eine spezifische Proteinzusammensetzung an seiner Oberfläche geben [29].

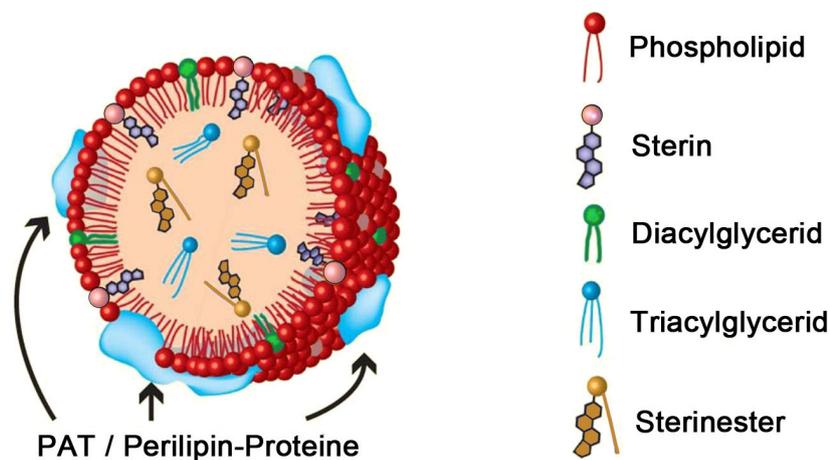


Abb. 1. 1: Morphologie eines Lipidtropfens. Der Neutralfett-reiche Lipidtropfenkern wird von einer Phospholipid-Einzelschicht mit daran assoziierten amphiphilen Proteinen der PAT / Perilipin-Proteinfamilie ummantelt. Modifiziert nach [21].

1.1.3 Biogenese und Reifung von Lipidtropfen

Da winzige Lipidtropfen oft in lokaler Nähe des ER beobachtet und Enzyme der Lipidestersynthese dort nachgewiesen wurden, nimmt man an, dass das ER der Entstehungsort der Lipidtropfen ist [30-32]. Die synthetisierten Lipidester sammeln sich in einem lokalen Aggregat in der Phospholipid-Doppelschicht des ER an [33], was eine örtliche Begrenzung der Lipidester voraus setzt. Es ist bis jetzt ungeklärt, ob dieser Vorgang durch spezifische Proteine einer ER-Domäne oder durch die Lipid-Eigenschaften selbst reguliert wird. In 3 hypothetischen Modellen wird versucht, die Absonderung der entstehenden Lipidtropfen mit einer Phospholipid-Einzelschicht von der ER-Membran zu erklären (Abb. 1. 2):

1. Abknospung von der zytoplasmatischen Phospholipidschicht der ER-Membran [34].
2. Micellenbildung, wobei die luminaire und zytoplasmatische Membranseite des ER ausgeschnitten wird und eine temporäre Pore im ER entsteht [35].
3. Vesikelabknospung mit einer Phospholipid-Doppelschicht, der Intermembranraum füllt sich dann mit Neutralfetten [36].

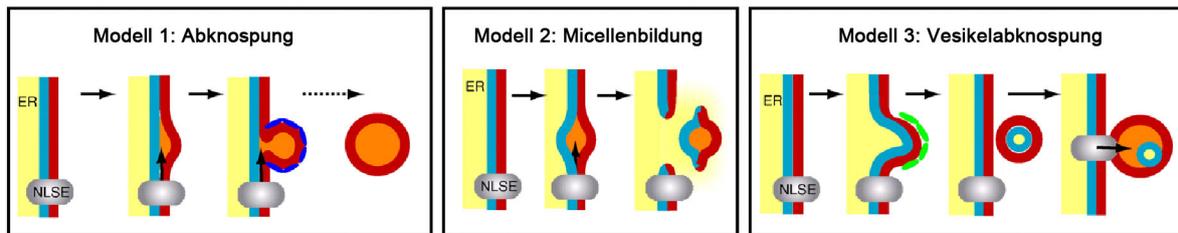


Abb. 1. 2: Modelle der Biogenese von Lipidtropfen am Endoplasmatischen Retikulum (ER). 3 hypothetische Modelle versuchen die Entstehung der Phospholipid-Einzelschicht zu erklären. Abk.: NLSE: Neutrallipid-synthetisierende Enzyme. Modifiziert nach [36].

Das weitere Wachstum (Reifung) der kleinen Lipidtropfen kann nun durch direkte Neutralfett-Synthese am Fetttropfen [37], Fusion von bereits vorhandenen Lipidtropfen [38, 39] oder noch unbekannte Transportprozesse vom ER ermöglicht werden. Der Abbau (Lipolyse) von Fetten in Adipozyten wird durch Lipasen ausgeführt und durch Phosphorylierung von Perilipin A reguliert [40, 41] (zum Prozess der regulierten Lipolyse vgl. Abschnitt 1.3).

1.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine

1.2.1 PAT-Proteine

In Säugetierzellen werden Lipidtropfen vorwiegend von amphiphilen Proteinen der PAT- bzw. Perilipin-Familie ummantelt. Die PAT-Proteine spielen eine wichtige Rolle in Bildung, Auf- und Abbau, Strukturhaltung und Regulation von Lipidtropfen [42, 43]. 2010 wurde eine einheitliche Nomenklatur für die 5 Mitglieder der PAT-Familie Perilipin (Perilipin 1) [44], Adipophilin (Perilipin 2) [45], TIP47 (Perilipin 3) [46], S3-12 (Perilipin 4) [47] und MLDP / OXPAT (Perilipin 5) [48] von Kimmel und Koautoren vorgeschlagen [49]. Charakteristisch für alle PAT-Proteine ist die Fähigkeit, an intrazelluläre Lipidtropfen zu binden, sowie unterschiedlich stark ausgeprägte Aminosäuresequenzähnlichkeiten einiger Bereiche untereinander (Abb. 1. 3). Die am stärksten konservierte Region ist die N-terminale, ~100 Aminosäuren lange PAT-Domäne (Abb. 1. 3). Die PAT-Domäne ist

weniger durch eine spezifische Aminosäuresequenz, als durch die daraus resultierende Sekundärstruktur charakterisiert. So sind nur 40 % der N-terminalen Sequenzen zwischen Perilipin und Adipophilin und nur 60 % zwischen Adipophilin und TIP47 identisch [50]. Der genaue Lipidtropfen-Bindungsmechanismus ist noch unklar. Bussell und Koautoren [51] wiesen Tandem-Wiederholungen von je 11 Aminosäuren (11-mer) in PAT-Proteinen nach, die höchstwahrscheinlich amphipathische α -Helices bilden und so die Lipidtropfenbindung vermitteln könnten. Zwar verhindert das Fehlen dieser Tandem-Wiederholungen die Lipidtropfenbindung von MLDP, jedoch nicht von TIP47 [48, 52]. Für Perilipin A wurde gezeigt, dass die 2 N-terminalen hydrophoben und die saure D/E-reiche Domäne die Lipidtropfenassoziation vermitteln können [53, 54]. TIP47 ist das einzige PAT-Protein, das bisher kristallisiert und strukturell analysiert werden konnte [55]. Der C-Terminus von TIP47 besitzt Ähnlichkeit mit dem N-Terminus von Apolipoprotein E, der mit dem LDL-Rezeptor im Beisein von Phospholipiden interagiert und somit einen Hinweis auf den Lipidtropfen-Bindungsmechanismus von TIP47 gibt [56].

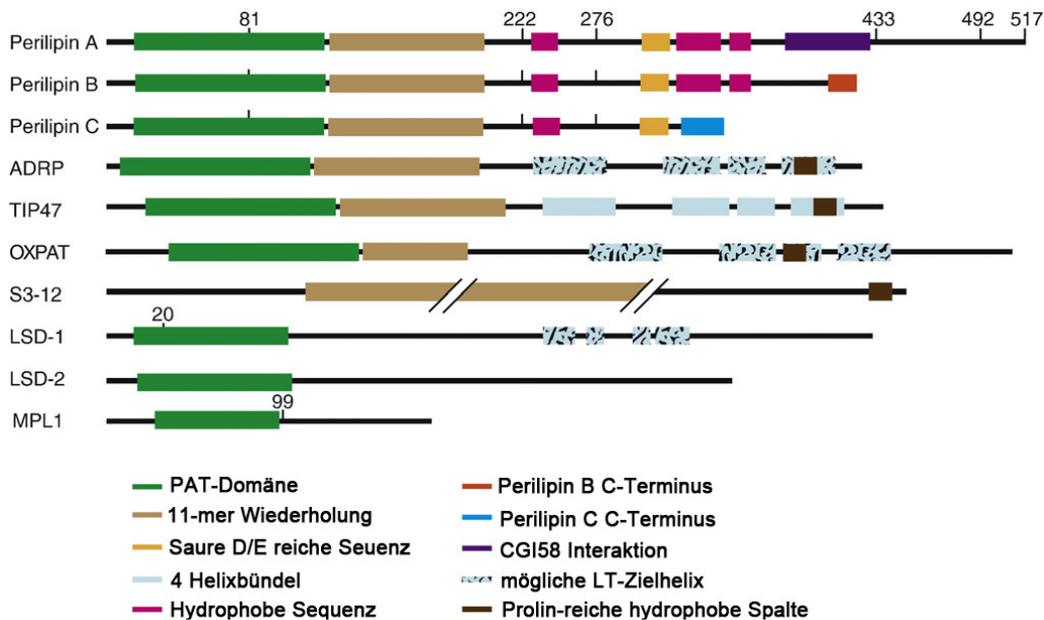


Abb. 1. 3: Schematische Darstellung der strukturellen Ähnlichkeiten von PAT-Proteinen. Perilipin A-C, ADRP (Adipophilin), TIP47, OXPAT (MLDP) und S3-12 gehören der Säugetierklasse an. LSD-1 und -2 wurden in Fliegen und MPL1 in Pilzen beschrieben. Die Ziffern betiteln Phosphorylierungsstellen. Abk.: HSL: Hormon-sensitive Lipase, ATGL: „Adipose Triglyceride Lipase“. Modifiziert nach [43].

PAT-Proteine werden aufgrund ihres Verhaltens in 2 funktionelle Gruppen eingeteilt [57]. Die ePAT-Proteine (e = „exchangeable“) TIP47, MLDP und S3-12 bilden einen zytoplasmatischen Pool und werden unter bestimmten metabolischen Zuständen an Lipidtropfen rekrutiert [58]. Dagegen werden die cPAT-Proteine (c = „constitutive“) Perilipin und Adipophilin ohne Lipidtropfenassoziation schnell lysosomal oder proteasomal abgebaut und sind damit nur an Lipidtropfen stabil [59, 60].

1.2.1.1 Perilipin (Perilipin-1)

Perilipin wurde 1990 als erstes Protein der PAT-Familie in Adipozyten und als Substrat der Proteinkinase A (PKA) unter lipolytisch aktiven Stoffwechselbedingungen beschrieben [44, 61]. Durch alternatives Spleißen entstehen aus einer Vorläufer-RNA 4 Isoformen für Perilipin mit sich verkürzenden, distinkten C-Termini (Perilipin A-D; Abb. 1. 3) [50]. Während Perilipin A (~56 kDa) und B (~46 kDa) in Adipozyten [44, 62], Talgdrüsen-Epithelzellen sowie humanen steatotischen Hepatozyten und den hiervon abgeleiteten Tumoren exprimiert werden [63, 64], wird in steroidogenen Zellen auch Perilipin C (~42 kDa) exprimiert [65, 66]. Kürzlich wurde von Hiesh und Koautoren gezeigt, dass Perilipin D (~26 kDa) in steroidogenen Zellen nicht nur auf RNA-Ebene existiert [50, 65], sondern auch auf Proteinebene [66]. Perilipin A, die am häufigsten vorkommende Isoform in Adipozyten, ist mit 522 Aminosäuren die längste Isoform (in Mäusen 517 Aminosäuren) [67]. Perilipin B ist um 95 Aminosäuren C-terminal verkürzt und teilt über die ersten 406 Aminosäuren die gleiche Peptidsequenz mit Perilipin A [62].

Während der Differenzierung von murinen Präadipozyten zu Adipozyten wird Perilipin A über den „*Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ 2*“ (PPAR γ 2) reguliert, nach 3 Tagen Differenzierung exprimiert und gilt somit als Marker der Adipogenese [68, 69]. Die Funktion von Perilipin A wurde fast ausschließlich in murinen 3T3-L1 (Prä) -Adipozyten und transfizierten „*Chinese Hamster Ovary*“ (CHO) -Zellen untersucht [70-74]. Perilipin A ist der maßgebliche Regulator der hormonell vermittelten Lipolyse in Adipozyten [44] (vgl. Abschnitt 1.3).

Eine Überexpression von Perilipin A in 3T3-L1-Präadipozyten erhöht die Fetteinlagerung durch reduzierte basale Lipolyse, welches den protektiven Effekt von Perilipin A gegenüber zytosolischer Lipasen widerspiegelt (Tab. 1. 1) [74]. Tansey [75] sowie Martinez [76] und Koautoren entwickelten unabhängig voneinander Perilipin A-defiziente Mäuse (PLIN^{-/-}). In beiden Mausmodellen führt das Fehlen von Perilipin A zu einem schlanken Phänotyp mit

erhöhter basaler Lipolyse, Insulinresistenz und histologisch kleineren Lipidtropfen im Fettgewebe im Vergleich zu Kontrollmäusen selbst bei hochkalorischer Ernährung [75, 76]. Der hepatische Fettgehalt in PLIN^{-/-}-Mäusen reduzierte sich im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen um 50-65 % [76]. Eine Kreuzung der PLIN^{-/-}-Mäuse mit Leptin-defizienten adipösen Mäusen führte trotz Hyperplasie zu normal schlanken Mäusen [76]. Interessanterweise führte eine hochkalorische Ernährung in transgenen Mäusen mit einer Fettgewebs-spezifischen Überexpression von Perilipin A ebenfalls zu einer geringeren Gewichtszunahme und zu weniger Fettgewebe im Vergleich zum Wildtyp; möglicherweise über eine Hochregulation oxidativer Gene des braunen und weniger des weißen Fettgewebes [77].

1.2.2.2 Adipophilin (Perilipin-2)

Die mRNA von Adipophilin steigt während der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten in den ersten Tagen stark an und wurde in Präadipozyten 1992 zum ersten Mal entdeckt [78, 79] (Synonyme „*adipose differentiation related protein*“ ADRP, ADFP, ADPH). Das ~50 kDa schwere Protein wird ubiquitär exprimiert und assoziiert spezifisch mit Lipidtropfen [45, 80, 81]. Eine Ausnahme bilden die Lipidtropfen von reifen univakuolären Adipozyten, an denen exklusiv Perilipin nachzuweisen ist [80].

Die Expression von Adipophilin wird durch PPAR-Transkriptionsfaktoren kontrolliert, die gewebsspezifisch vorkommen: In Hepatozyten wird Adipophilin vorwiegend über PPAR α [69, 82, 83] reguliert, bis *dato* fehlt der Beweis für eine direkte Regulation von Adipophilin über PPAR γ in Adipozyten [69]. Interessanterweise wurde von Dalen und Koautoren [84] gezeigt, dass in PPAR α ^{+/+}- und PPAR α ^{-/-}-Mausmodellen die Adipophilin-Expression in Hepatozyten durch Fasten induziert wurde und somit PPAR α nicht den alleinigen Regulationsmechanismus darstellte. Beispielsweise zeigten Motomura und Koautoren eine PPAR γ -abhängige Regulation in HepG2-Zellen [85] und Gimm und Koautoren [86] konnten nachgewiesen, dass unter hypoxischen Bedingungen Lipide vermehrt akkumuliert wurden und die Adipophilin-Expression anstieg. In Übereinstimmung wiesen Hu und Koautoren [87] eine Regulation von Adipophilin über den „*Hypoxia Inducible Factor 2- α* “ (HIF2- α) in einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie nach.

Das Fehlen von Adipophilin im Mausmodell durch Gendelektion [88] bzw. durch Gabe eines Adipophilin-Antisense-Oligonukleotids [89] verhindert die Entwicklung einer Fettleber bei hochkalorischer Ernährung (vgl. Tab. 1. 1). Eine *in vitro* Herunterregulation

mittels siRNA gegen Adipophilin in murinen AML12-Zellen und Fibroblasten sowie in humanen Huh7-Zellen wurde durch TIP47 kompensiert [52, 90, 91]. Erst die kombinierte Herunterregulation von Adipophilin und TIP47 in diesen Zellen verursachte vergrößerte Lipidtropfen mit einer verringerten Gesamt-TAG-Menge und eine verstärkte Lipolyse durch Rekrutierung der „*Adipose Triglyceride Lipase*“ (ATGL) an Lipidtropfen [90, 91]. Im Gegensatz dazu stimulierte eine Überexpression von Adipophilin *in vitro* die Lipideinlagerung [92-94]. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass Adipophilin wichtig für die Aufnahme langkettiger Lipide ist, intrazelluläre Lipidtropfen strukturell stärkt und sie vor dem Abbau schützt.

1.2.2.3 TIP47 (Perilipin-3)

TIP47 („*tail-interacting protein of 47 kDa*“) wurde zuerst als Sortierungsprotein der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren von Endosomen zum trans-Golgi-Apparat [95] beschrieben und kurze Zeit später ebenfalls als Lipidtropfen-assoziiertes Protein der PAT-Familie anerkannt [46, 96]. Hierbei transloziert TIP47 nach Oleat-Inkubation von z.B. HeLa- oder MA10 Leydig-Zellen vom zytoplasmatischen Pool zur Lipidtropfenoberfläche [46, 96, 97]. Diese Eigenschaft des ubiquitär exprimierten ePAT-Proteins unterscheidet es maßgeblich von den beiden cPAT-Proteinen Adipophilin und Perilipin. Ein weiterer Unterschied von TIP47 zu anderen PAT-Proteinen besteht in dessen PPAR-unabhängigen Regulation [69, 84].

TIP47 spielt in der Biogenese von Lipidtropfen eine wichtige Rolle. Es kann Liposomen *in vitro* reorganisieren [97] und assoziiert typischerweise an winzige Lipidtropfen in z.B. 3T3-L1-Adipozyten nahe der zytosolischen ER-Membran [58]. Immunfluoreszenz-mikroskopische Studien in Maus-Stromazellen zeigten zusätzlich eine Rekrutierung von TIP47 an die zytosolische Seite der ER-Membran nach Stimulation der Lipidakkumulation mit Ausbildung winziger, junger TIP47-positiver Lipidtropfen [98]. TIP47 scheint aber nicht nur in der Lipidtropfenbildung eine Rolle zu spielen, sondern wurde ebenfalls als möglicher Cofaktor für den Virus-Zusammenbau des Humanen Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) beschrieben, wobei es einen ternären Proteinkomplex mit den beiden Virusproteinen Gag und Env bildete [99].

Transiente Herunterregulation von TIP47 in murinen AML12-Leberzellen verursachte nach Inkubation mit Ölsäure eine Erhöhung der Lipidtropfenzahl mit gleichzeitiger Verringerung der Lipidtropfengröße und unverändertem Gesamt-TAG-Gehalt im Vergleich zu

Kontrollzellen (Tab. 1. 1) [91]. Das Fehlen von TIP47 nach siRNA-Behandlung zeigte keine Auswirkung auf die Adipophilin-Expression in Huh7-Zellen [52].

1.2.2.4 S3-12 (Perilipin-4)

S3-12 wurde zum ersten Mal in einer Screening-Untersuchung auf Adipozyten-spezifische Plasmamembranproteine beschrieben [100]. S3-12 ist ein ~150 kDa großes ePAT-Protein, das hauptsächlich in Adipozyten des weißen Fettgewebes exprimiert wird (Tab. 1. 1) [47, 100]. S3-12 Transkripte wurden zusätzlich in Herz- und Skelettmuskel nachgewiesen [69]. S3-12 besitzt keine PAT-Domäne, wird jedoch aufgrund des Vorhandenseins einer tandemartigen Wiederholungssequenz von 33 Aminosäuren ebenfalls zur PAT-Familie gezählt [100]. Diese Wiederholungssequenz entspricht den 11 Aminosäuren langen Tandem-Wiederholungen der anderen PAT-Proteine [51, 57]. Wolins und Koautoren [47, 58] wiesen nach, dass S3-12 an neu entstehende periphere Fetttropfen in 3T3-L1-Adipozyten bindet, wenn diese mit Oleat inkubiert wurden. S3-12 wird durch den Transkriptionsfaktor PPAR γ reguliert [69].

1.2.2.5 MLDP/OXPAT (Perilipin-5)

Das „*Myocardial Lipid Droplet Protein*“ (MLDP) [48] / OXPAT [101] bzw. „*Lipid Storage Droplet Protein 5*“ (LSDP5) [102] wurde von 3 unabhängigen Arbeitsgruppen fast zeitgleich als Lipidtropfen-assoziiertes Protein beschrieben. MLDP (~52 kDa) wird vorwiegend in Geweben mit einer hohen Fettsäureoxidationsrate, wie z.B. dem Herzmuskel, dem Skelettmuskel und der Leber nach Fasten sowie in Adipozyten des braunen Fettgewebes exprimiert [101, 102]. MLDP transloziert entsprechend seines ePAT-Protein-Charakters bei Fettsäurebelastung *in vitro* vom Zytoplasma an die Oberfläche von Fetttropfen [48, 101-103]. Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie regulieren die MLDP-Expression. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe des PPAR α -Agonisten WY-14643 in Mäusen eine Expressionserhöhung von MLDP in Leber, Herz und Skelettmuskel bewirkte [48] und PPAR α -defiziente Mäuse eine reduzierte MLDP-Expression aufwiesen [101]. Im Gegensatz dazu beschrieben Takahashi und Koautoren [104] eine Regulation von MLDP durch PPAR γ in Adipozyten subkutanen Fettgewebes. Trotz der transkriptionellen Regulation durch PPARs konnte kein PPRE in der Promotorregion des MLDP-Gens identifiziert werden.

Die humanen Gene für S3-12 und MLDP sind tandemartig auf Chromosom 19 angeordnet (in Maus auf Chromosom 17) [57, 102]. MLDP liegt interessanterweise nur ~160 kb entfernt vom TIP47-Genlocus. Diese Anordnung der 3 PAT-Proteine TIP47, S3-12 und MLDP legt eine Entwicklung aus einem Vorläufer-Gen nahe [102, 105].

Einzelne Hinweise auf die Funktion von MLDP wurden meist mittels Überexpressionsstudien gewonnen. Wolins [101] sowie Li [103] und Koautoren überexprimierten MLDP in OP9-, COS-7- bzw. AML12- Zellen, wodurch die Lipidakkumulation und die Fettsäureoxidation bei Oleat-Inkubation verstärkt wurde (Tab. 1. 1). In transfizierten murinen AML12-Zellen erhöhte sich die MLDP mRNA-Expression und Proteinmenge aufgrund von Oleat-Behandlung [103]. Eine Herunterregulation von MLDP in AML12-Zellen verminderte die Lipidakkumulation verursacht durch eine erhöhte Lipolyse [103]. Funktionelle Studien beschrieben, dass an Fetttropfen gebundenes MLDP entweder ATGL oder ihren Coaktivator CGI58 binden, konzentrieren und dadurch die Interaktion von ATGL und CGI58 erleichtern können [106, 107]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MLDP ein wichtiger Regulator dieser ubiquitär exprimierten Lipase ist [105, 108, 109].

Tab. 1. 1: In der Literatur beschriebene Funktionen der PAT-Proteine auf Lipidmetabolismus und Lipidtropfen.

	Perilipin	Adipophilin	TIP47	S3-12	MLDP
Synonyme	PLIN1	PLIN2, ADRP, ADFP	PLIN3	PLIN4	PLIN5, OXPAT, LSDP5
Gruppe	cPAT	cPAT	ePAT	ePAT	ePAT
Funktion bis dato	Regulation der hormonellen Lipolyse *	*	LT-Biogenese, Cofaktor HIV-1-Zusammenbau *	*	Regulation der basalen Lipolyse *
Interaktion mit Lipasen /Co-Aktivatoren	HSL, CGI-58	n.b.	n.b.	n.b.	ATGL, CGI-58
Gewebspezifität	Pluri- und univakuoläre Adipozyten, Talgdrüsenepithel-Z., steroidogene Z., steatotische Hepatozyten	Ubiquitär Ausnahme: univakuoläre Adipozyten	Ubiquitär	Univakuoläre Adipozyten	Oxidative Z.: Myozyten (Herz, Skelett), Leber (nach Fasten), plurivakuoläre Adipozyten
Einfluss der Überexpression auf LT	↑ Oxidation in braunem FG, ↑ Lipidakkumulation, ↓ basale Lipolyse	↑ Lipidakkumulation, ↓ basale Lipolyse	n.b.	n.b.	↑ Lipidakkumulation, ↑ Fettsäure-Oxidation
Einfluss der Herunterregulation auf LT	↑ basale Lipolyse, ↑ Adipophilin, ↓ LT-Größe, ↓ weißes FG, ↓ hepatischer Fettgehalt	↑ TIP47 an LT, ↓ hepatischer Fettgehalt	↑ LT-Anzahl, ↓ LT-Größe	n.b.	↓ Lipidakkumulation, ↑ basale Lipolyse,

* Jedes PAT-Protein erhält die strukturelle Integrität von Lipidtropfen. Abk.: c: „constitutive“, e: „exchangeable“, LT: Lipidtropfen, FG: Fettgewebe, Z.: Zellen, n.b.: nicht bekannt

1.2.2.6 PAT-Proteine außerhalb der Säugetierklasse

Perilipine sind evolutionär konservierte Proteine und auch außerhalb der Säugetierklasse zu finden wie beispielsweise in Pilzen, Schleimpilzen, Fliegen und Fröschen [96, 110-112]. Wie die Säugetier-PAT-Proteine, sind auch diese PAT-Proteine wichtig für die Lipidhomöostase. Beispielsweise unterstützen die PAT-Proteine von *Drosophila melanogaster* (LSD-1 und 2) [111] und des pathogenen Pilzes *Metarhizium anisopliae* (MPL1) [112] die Akkumulation von Neutralfetten (Abb. 1. 3)

1.2.3 Weitere Lipidtropfen-assoziierte Proteine

Mittels Proteom-Studien wurden neben den PAT-Proteinen weitere Lipidtropfen-assoziierte Proteine in einer Vielzahl von Zelllinien und Geweben entdeckt, die wichtige Rollen im Lipidmetabolismus, der Signaltransduktion, der Proteinsortierung und der Strukturhaltung spielen (Tab. 1. 2) [113-117]. Lipidtropfen interagieren eng mit dem Zytoskelett und Zellorganellen wie z.B. ER und Mitochondrien (Abschnitt 1.1.1) und können damit mittels Fraktionierung schwer von Proteinen anderer Organellen getrennt werden. Einige dieser Proteine weisen auf mögliche Funktionen neben der Lipidspeicherung hin (zusammengefasst in [118]); beispielsweise wurde für Lipidtropfen eine transiente Speicherung von überschüssigen Signaltransduktionsproteinen und von Membrantransportproteinen beschrieben [114]. Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass Proteine, die in Lipidtropfen zwischengelagert werden, die Zelle vor toxischen Proteinaggregaten schützen, bis diese abgebaut wurden [119, 120].

Tab. 1. 2: Lipidtropfen-assoziierte Proteine.

	Proteingruppe	Beispiele	Referenz
Strukturell	Struktur	Perilipin, Adipophilin	[44, 45]
	Zytoskelett	Aktin, Vimentin	[121, 122]
Funktionell	Lipidmetabolismus	ACSL, ATGL, CIDE	[115, 123]
	Membrantransport	Caveoline, Rab18	[113, 124, 125]
	Lipidtropfenmobilität	Kinesine	[126]
	ER, Mitochondrium	Calnexin	[115]
	Signaltransduktion	14-3-3	[113, 115]
	Degradation	AUP1	[127]
	Chaperone	BiP, HSPs	[128]

Abk.: ACSL: Acyl-CoA-Synthetase; AGTL: „*Adipose Triacylglycerid Lipase*“; AUP1: „*Ancient Ubiquitous Protein 1*“; BiP: „*Binding Immunoglobulin Protein*“; HSP: „*Heat Shock Protein*“.

1.3 Regulation des Lipidtropfenauf- und -abbaus

Aufgrund von hormonellen Stimuli durchlaufen murine Präadipozyten der Linie 3T3-L1 nach Kontaktinhibition mehrere Zellteilungen (mitotische klonale Expansion [129]) und die Transkriptionsfaktoren „*CAAT/enhancer-binding protein*“ β und δ (C/EBP β und C/EBP δ) werden aktiviert [130]. Die folgende terminale Differenzierung ist charakterisiert durch

einen Zellzyklus-Arrest und die Expression der Transkriptionsfaktoren PPAR γ (Isoform 1 (~53 kDa) und 2 (~57 kDa)) und C/EBP α [131]. PPAR γ aktiviert die Expression von adipogenen und lipogenen Genen, die wichtig für die Differenzierung von Präadipozyten [68, 132, 133], die Lipidakkumulation [133] und den Insulin-sensitiven Glukosetransport [134] sind. Da keine terminale Differenzierung ohne PPAR γ stattfindet und transgene PPAR γ -defiziente Mäuse Fettgewebe nicht vollständig ausbilden, wird PPAR γ als der essentielle Transkriptionsfaktor der Adipogenese angesehen [132, 135].

Eine Deletion von PPAR γ verhindert die Entwicklung einer Fettleber in Mäusen unter hochkalorischer Ernährung [136]. Schadinger und Koautoren beschrieben eine unterstützende Funktion von PPAR γ 2 in der Lipidakkumulation von Hepatozyten [137].

Eine weitere wichtige Transkriptionsfaktorfamilie sind die „*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*“ (SREBPs), die die Lipidhomöostase regulieren, indem sie die Expression der Enzyme der Cholesterin-, TAG-, Fettsäure- und Phospholipidsynthese kontrollieren [138]. *In vitro* werden SREBPs während der Adipogenese induziert und veranlassen somit die Synthese von PPAR γ -Liganden wie z.B. freien Fettsäuren [139, 140].

Der regulierte Abbau von Lipidtropfen ist am besten in Adipozyten erforscht (Abb. 1. 4). Bei basaler Stoffwechsellage liegt Perilipin A unphosphoryliert vor und schützt den TAG-Kern vor dem Abbau [74]. Katecholamine und (Nor-) Adrenalin binden an G-Protein gekoppelte β -adrenerge Rezeptoren, wodurch über eine Adenylatzyklase die intrazelluläre cAMP-Menge erhöht wird [40]. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die unter anderem die Hormon-sensitive Lipase (HSL) und Perilipin A phosphoryliert [44, 141]. Phosphoryliertes Perilipin A entlässt den Coaktivator „ *α - β -hydrolase containing domain 5*“ (Abhd5, Synonym CGI58) der ATGL [72, 73] und ATGL gelangt somit an die Lipidtropfenoberfläche. Dort katalysiert ATGL den Abbau von Tri- zu Diacylglyceriden (Abb. 1. 4) [142]. Die phosphorylierte Form der HSL assoziiert an den Lipidtropfen und hydrolysiert Di- zu Monoacylglyceriden [143, 144]. Schlussendlich katalysiert die Monoacylglycerid-Lipase die Abspaltung der letzten Acylgruppe [145, 146]. Das Vorhandensein von 6 PKA-Phosphorylierungsstellen (Serin-Reste 81, 222, 276, 433, 492, 517, Abb. 1. 3) im murinen Perilipin A zeugt von einer komplexen Regulation der Lipolyse (Abb. 1. 4). Untersuchungen in murinen Adipozyten zeigen beispielsweise, dass die Phosphorylierung am C-terminalen Serin (S517, human S522) essentiell für die PKA-stimulierte Lipolyse ist und dass eine zusätzliche Phosphorylierung weiterer Serin-Reste die Lipolyse-Rate erhöht [70].

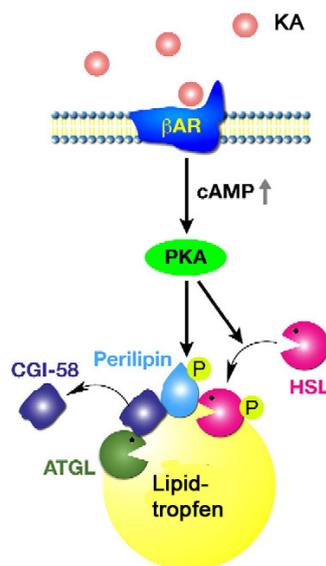


Abb. 1. 4: Funktion von Perilipin A bei der hormonell regulierten Lipolyse in Adipozyten. Katecholamine (CA) aktivieren den β -adrenergen Rezeptor, der über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels die PKA aktiviert. PKA phosphoryliert HSL und Perilipin A, das dann den Coaktivator CGI58 der ATGL entlässt und der HSL sowie der ATGL Zugang zum Lipidtropfen gewährt. Modifiziert nach [43].

1.4 Lipidtropfen-assoziierte Erkrankungen der Leber

In Säugetieren ist die Leber neben dem reifen Fettgewebe das zentrale Lipidstoffwechselorgan. Hepatozyten nehmen dazu veresterte oder freie Fettsäuren auf und speichern diese je nach metabolischem Zustand entweder als intrazelluläre Lipidtropfen, sezernieren diese als Lipoproteine (VLDL („*very low density lipoprotein*“), IDL („*intermediate density lipoprotein*“)) und LDL („*low density lipoprotein*“)) oder schleusen sie in weitere Fettsäure- oder Sterinsynthesen ein [17].

1.4.1 Steatose

Die Steatose oder Leberparenchymverfettung ist die häufigste Lebererkrankung in den westlichen Industrieländern [147]. Bei Leberparenchymverfettung übersteigt der TAG-Gehalt definitionsgemäß 5 % [148], bei einer Fettleber 50 % des Lebergewichts. Als häufigste Ursachen einer Leberparenchymverfettung in den westlichen Industrieländern gelten übermäßiger Alkoholkonsum (alkoholische Fettlebererkrankung, „*Alcoholic Fatty Liver Disease*“ AFLD / „*Alcoholic Steatohepatitis*“ ASH) [149-152] und das metabolische Syndrom (nicht-alkoholische Fettlebererkrankung, „*Nonalcoholic Fatty Liver Disease*“ NAFLD / „*Nonalcoholic Steatohepatitis*“ NASH) [153-155]. Das metabolische Syndrom

umfasst Veränderungen wie Hypertriglyceridämie, erniedrigte HDL-Cholesterin-Werte, Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus / Insulinresistenz [156]. Bei Fettleibigkeit liegt das Risiko einer Steatose bei 75 % und das einer Steatohepatitis bei 25 % [156].

Eine Steatose kann durch erhöhte Fettaufnahme, erhöhte *de novo* Fettsäuresynthese, verminderten Fettsäureabbau und / oder gestörte Lipoproteinsekretion entstehen [155, 157-160]. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass PPAR γ [137] und SREBP1c [161] in Patienten mit einer Steatose erhöht waren und die *de novo* Lipogenese positiv beeinflussten.

Neben den erwähnten Faktoren können auch das Hepatitis C Virus (insbesondere Genotyp 3a), genetische Faktoren wie Lipodystrophien und Speichererkrankungen, endokrine Störungen wie Hypothyroidismus, sowie zahlreiche Medikamente (z.B. Kortikosteroide) und Toxine (z.B. organische Lösungsmittel) zu einer Verfettung der Hepatozyten führen [162].

1.4.2 Steatohepatitis

Noch vor 30 Jahren war die NASH nahezu unbekannt, die Inzidenz steigt jedoch aufgrund der Zunahme an Patienten mit metabolischem Syndrom in den westlichen Industrieländern stetig an. 10-20 % der Steatohepatitisfälle entwickeln eine Leberzirrhose [156] und haben dann ein höheres Entstehungsrisiko für hepatozelluläre Karzinome (Abb. 1. 5) [163-165].

Eine Steatohepatitis unterscheidet sich von einer blanden Steatose nicht nur durch das Entzündungsinfiltrat, sondern zusätzlich durch das Vorhandensein von ballonierten und absterbenden Hepatozyten und / oder Kollagen-Ablagerungen [153].

Die „*Two-Hit*“-Theorie der Steatohepatitis von Day und James [166] besagt, dass die intrazelluläre Akkumulation von Fettsäuren zu metabolischen und molekularen Veränderungen führt („*First Hit*“) und die Leber dann für den „*Second Hit*“ durch oxidativen Stress und Zytokine sensibilisiert ist. Shi [167] sowie Shah [168] und Koautoren belegten, dass durch gesättigte Fettsäuren infiltrierende und hepatisch residierende Leukozyten möglicherweise über den Toll-like Rezeptor (TLR) aktiviert werden können und dies einen proinflammatorischen Effekt haben kann. So wurde ebenfalls gezeigt, dass von Kupffer-Zellen sezerniertes Interleukin-6 (IL-6) an der Hepatokarzinogenese beteiligt ist [169]. In Übereinstimmung beobachteten Tilg und Koautoren [170] erhöhte IL-6-Spiegel bei Fettleber, Zirrhose und HCC und es ist bekannt, dass IL-6 ein Hauptaktivator des pro-tumorigenen Transkriptionsfaktors STAT3 ist [171].

1.4.3 Hepatozelluläres Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache [172]. Während in den Entwicklungsländern eine chronische Hepatitis B- sowie toxische Leberschäden bedingt durch häufige Aflatoxin B1-Aufnahme positiv mit dem Auftreten von HCCs korrelieren [173-177], sind die Hauptgründe für eine HCC-Entwicklung in den westlichen Industrieländern und Japan eine chronische Hepatitis C sowie der Alkoholkonsum (Abb. 1. 5) [178-181]. Die Kombination von alkoholischer / kryptogener Leberzirrhose und Übergewicht erhöht das Risiko einer HCC-Entwicklung [182]. Neuere Studien assoziieren Übergewicht überdies als direkten *bona fide* Promotor für die HCC-Entwicklung, in denen sie zeigten, dass C57/BL6 und Leptindefiziente Mäuse in einem chemisch induzierten HCC-Modell unter einer hochkalorischen Ernährung verstärkt HCCs im Gegensatz zu den Kontrollmäusen entwickelten [171].

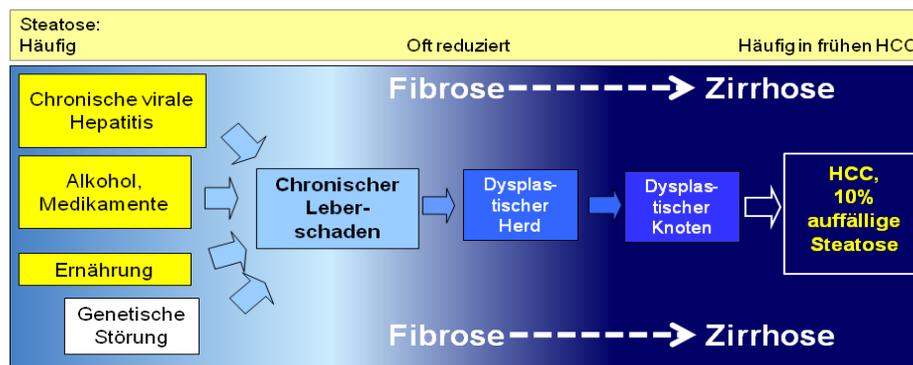


Abb. 1. 5: Schematische Darstellung der Progression eines chronischen Leberschadens zum hepatozellulären Karzinom.

Die molekulare Pathogenese der Karzinogenese ist ein komplexer Prozess, in dem Gene und Chromosomenstrukturen in Hepatozyten irreversible Änderungen erfahren [183-186]. Diese Änderungen umfassen überwiegend Signaltransduktionswege, die in der Zellproliferation, Zellvitalität und / oder Entwicklung eine Rolle spielen, Hochregulation von Wachstumsfaktoren, Hemmung von Zellzyklusregulatoren oder Inaktivierung von Tumorsuppressoren [174, 187]. Mutationen im CTNNB1-Gen (β -Catenin, [188-190]), dem Hauptregulator des „*Wingless*“ (Wnt) -Signalwegs, oder im Tumorsuppressorgen TP53 (P53 Protein, [191, 192]) treten beispielsweise in bis zu 30-45 % der HCCs auf.

10 % aller HCCs besitzen eine lichtmikroskopisch deutlich erkennbare hepatozelluläre Verfettung [193]. In unseren eigenen Studien wurde in bis zu 80 % der Fälle

immunhistochemisch eine zumindest geringe Steatose nachgewiesen [64]. Interessanterweise korrelierte die Steatose nicht mit der Ätiologie der HCCs und reflektiert eher einen veränderten Tumorstoffwechsel. HCCs weisen beispielsweise oft eine erhöhte Aktivität der Fettsäuresynthase (FAS), dem Schlüsselenzym der *de novo* Fettsäuresynthese, auf [194, 195]. Die Gabe von Metformin, einem Antidiabetikum, verminderte die Expression hepatischer lipogener Gene und schützte Mäuse gegen eine chemisch induzierte HCC-Entwicklung [196]. Interessanterweise scheint PPAR γ , der in der Leberparenchymverfettung eine prosteatotische Rolle aufweist, in der HCC-Entwicklung *in vivo* und *in vitro* als Tumorsuppressor zu wirken [197-199].

1.5 Zielsetzung

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei humaner Leberparenchymverfettung *in situ* neben den PAT-Proteinen Adipophilin und TIP47 *de novo* auch Perilipin in Hepatozyten vorkommt, die PAT-Proteine differentiell exprimiert werden [63] und selbst in hepatozellulären Karzinomen nachweisbar sind [64].

Aufgrund der Häufigkeit und klinischen Bedeutung der Steatose und beteiligter Lipidtropfen-assoziiertes Proteine der PAT-Familie war Ziel dieser Arbeit, die Dynamik der PAT-Proteinexpression in menschlicher Leberparenchymverfettung *in situ* und in hepatozytären Zellkulturen *in vitro* zu untersuchen und insbesondere Umstände, die zu einer *de novo* Perilipin-Expression führen, festzustellen. Hierfür sollten *in vitro* Steatose-Modelle ohne Zuhilfenahme artifizieller Überexpressionsstudien etabliert werden, die der menschlichen Situation *in situ* insbesondere bezüglich ihrer PAT-Proteinexpression möglichst nah kommen sollten. Diese Modellsysteme sollten dann mit molekularbiologischen, proteinbiochemischen, und immunfluoreszenzmikroskopische Methoden weiter analysiert werden. Mittels siRNAs und lentiviralen Assays sollten Effekte einer singulären bzw. kombinierten Verminderung von PAT-Proteinen auf die Steatoseentwicklung untersucht werden. Darüber hinaus sollten *in vitro* und *in vivo* Interaktionspartner der PAT-Proteine sowie Perilipin-Isoformen und -Modifikationen mittels Immunpräzipitation und massenspektrometrischer Verfahren untersucht werden.

Diese Dissertation sollte damit den Ansatzpunkt schaffen, PAT-Proteine wie insbesondere Perilipin und Adipophilin diagnostisch und langfristig auch therapeutisch bei Steatose, Steatohepatitis und hepatozellulären Karzinomen nutzbar zu machen.

2. Material

2.1 Geräte

CO ₂ -Inkubator	HERA Cell 150 (Thermo Scientific / Heraeus, Hanau)
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetboy (Integra Biosciences, Fernwald)
Fotografie	Kamera Altra 20 (Olympus, Hamburg) Kamera Colorview IIIu (Soft Imaging Systems, Münster)
Fluoreszenzmikroskope	Epifluoreszenz IX81 (Olympus) Konfokales Laserscanning-Mikroskop AR1 (Nikon Instruments, Düsseldorf)
Gelelektrophorese-Apparaturen	“Mini Protean [®] 3 System” (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) Agarosegelelektrophorese System (Keutz, Reiskirchen)
Gel-Dokumentationssystem	Alpha Imager [™] (Biozym, Oldendorf)
Heizblock	Techne DB-3D (Duxford, Cambridge, Großbritannien)
Immunblot-Detektion	FluorChem [®] SP Imaging System (Alpha Innotech, San Leandro, USA)
Kälteplatte	TypNr.: 1.411.50 K (Grünewald Prüf- und Messtechnik, Reimscheid)
Kryotom	Frigocut E 2800 (Reichert-Jung, Heidelberg)
Lichtmikroskope	BX51 (Olympus) CKX41 (Olympus) Labolux S (Leitz, Wetzlar)
Magnetrührer	MR-Hei Standard (Heidolph, Schwabach)
Magnetständer	12-Tube Magnet (Qiagen, Hilden)
Mikrotom	SM 2000 R (Leica Instruments, Nussloch)
Mikrowelle	Typ NN-5256 (Panasonic, Osaka, Japan)
UV-VIS Photometer	Nanodrop ND-1000 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, Dreieich) Eppendorf (Hamburg)
Netzgeräte	E861 and EV231 (Consort, Turnhout, Belgien)
pH-Meter	pH 210 Microprocessor (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)
Röntgenbedarf	Röntgenkassetten (rego universal, Augsburg) Entwickler für Röntgenfilme (Optimax Typ TR, Protec, Dielheim bei Heidelberg)
Schwingmühle	Retsch MM200 (VWR, Darmstadt)

Taumel-Rollenschüttler	CAT RM 5, (NeoLab, Heidelberg)
Taumelschüttler	WT 17, (Biometra, Göttingen)
Thermocycler	PCR Block (Multi Cycler PTC, Biozym, Oldendorf) ABI Prism 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt)
Ultraschallsonde	Misonix 4000 (QSonica LLC., USA)
Vortex-Mixer	7-2020 (NeoLab, Heidelberg)
Waagen	L4205 (Sartorius Laboratory, Göttingen)
Wasserbad	WB693 (Vogel, Leipzig)
Zellkultur-Werkbank	HeraSafe (Heraeus, Hanau)
Zentrifugen	Mikro 200 R, Rotina 380R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) Tischzentrifuge Galaxy Mini (VWR International, Darmstadt)
Zellzählkammer	Neubauer (Brand, Frankfurt am Main)

2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier	Macherey-Nagel, Düren
Einwegpipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße	Eppendorf Greiner, Nürtingen ABImed, Langenfeld
PVDF-Membran	Immun-Blot TM (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Objektträger, Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objektträger für Kryoschnitte	Superfrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig
Plastikware (Zellkultur)	Corning Incorporation, Kaiserslautern Falcon, Heidelberg Greiner, Nürtingen Nunc TM , Wiesbaden TPP, Basel, Schweiz Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien
Röntgenfilm	Super RX Fujifilm, Düsseldorf

2.3 Chemikalien, Lösungen und Enzyme

Antikörper- Verdünnungslösung	DakoReal (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
----------------------------------	---

Bradford-Lösung	5x-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Enzyme und Puffer, dNTPs und polydT-Primer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DynaBeads Protein A	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Standard	O'RangeRuler™ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
EUKITT	O. Kindler GmbH, Freiburg
Eindeckmedium mit DAPI	Fluoromont G (SouthernBiotech, Eching)
Mayer's Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt
MTT	Sigma, Deisenhofen
DNase / RNase-freies Wasser	UltraPURE™ (Invitrogen/Gibco, Karlsruhe)
Standardchemikalien (wenn nicht anders vermerkt)	Bio-Rad Laboratories GmbH BD-Bioscience (Heidelberg) Merck Roche (Mannheim) Roth (Karlsruhe) Sigma SERVA (Heidelberg) JTBaker (Griesheim) Thermo scientific (Schwerte) AppliChem (Darmstadt)
TaqMan-Master Mix	SYBR® Green (ABImed)
Protease-Inhibitorcocktail	Sigma
Proteinlysispuffer	Cell SignalingTechnology / New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Proteinstandard	PageRuler™ (MBI Fermentas)
Chemilumineszenz-Lösung Coumarin / Luminol	Western Lightning Plus-ECL™ (Perkin Elmer, Waltham, USA) SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Perkin Elmer).

2.4 Puffer und Medien

2.4.1 Allgemein

10x PBS	1,3 M NaCl 90 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 25 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O
---------	--

10x TBST	0,2 mM Tris, pH 7,6 1,4 M NaCl 1 % (v/v) Tween 20
10x Laufpuffer für Gelelektrophorese	250 mM Tris, pH 8,8 1,9 mM Glycerin 1 % (w/v) SDS
20x Boratpuffer für Nassblot	400 mM Borsäure, pH 8,8 20 mM EDTA
3x Lämmli-Proteinladepuffer	6 % (w/v) SDS 15 % (v/v) β -Mercaptoethanol 30 % (v/v) Glycerin 200 mM Tris, pH 6,8 + Bromphenolblau
50x TAE-Puffer	2 M Tris, pH 8,0 1 M Eisessig 50 mM EDTA
5x Stripping-Puffer	1 M Glycin, pH 2,2 0,5 % (w/v) SDS 5 % (v/v) Tween 20
RIPA-Puffer	20 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % (v/v) Triton X-100 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1 % (w/v) SDS 1x Protease Inhibitor Mix G 1 mM DTT 1 mM PMSF 1x Phosphostop

2.4.2 Bakterienkultur

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, pH 7,0
-----------	--

Vectastain ABC Standard Kit

Vector Laboratories

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up

Promega

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

Tab. 2. 1: Übersicht der verwendeten Antikörper.

Name	Klon	Spezies	Produkt, Hersteller	Eingesetzte Verdünnung	
				IF / IHC	WB
Abhd5 / CGI58	1F3	mAb Maus	H00051099M01, Biozol, Eching	1:300	1:2.000
Aktin	C4	mAb Maus	Millipore, Darmstadt	-	1:10.000
Adipophilin	AP125	mAb Maus	651102, Progen Biotechnik, Heidelberg	1:50	1:200
Adipophilin	-	pAb Meerschweinchen	GP40, Progen	1:250	1:500
Caveolin-1	C060	mAb Maus	610057, BD Biosciences, Heidelberg	1:50	1:1.000
Caveolin-2	EPR2220	mAb Kaninchen	2590-1, Epitomics, Burlingame, USA	1:100	1:1.000
C/EBPα	EP708Y	mAb Kaninchen	1703-1, Epitomics	-	1:2.000
C/EBPβ	E299	mAb Kaninchen	1479-1, Epitomics	-	1:500
C/EBPδ	-	pAb Kaninchen	NB110-85519, Novus Biologicals	-	1:5.000
CIDE-A	4B9	mAb Maus	H00001149M01, Biozol	1:50	1:500
CIDE-B	2A10	mAb Maus	H00027141M01, Biozol	1:50	1:500
CIDE-C	2E2	mAb Maus	H00063924M07, Biozol	1:50	1:500
Ki67	-	pAb Kaninchen	Dako, Hamburg	1:100	-
MLDP	-	pAb Meerschweinchen	GP31, Progen	1:100	1:1.000
MLDP	-	pAb Kaninchen	1.1., Beate Straub / Merita Hashani	1:20	1:100

Fortführung von Tabelle 2.1

Name	Klon	Spezies	Produkt, Hersteller	Eingesetzte Verdünnung	
				IF / IHC	WB
Perilipin	112.17	mAb Maus	651156, Progen	1:50	1:100
Perilipin A	-	pAb Kaninchen	P1998, Sigma	Immunpräzipitation	
Perilipin	-	pAb Kaninchen	HPA024299, Prestige AB Atlas	Immunpräzipitation	
Perilipin	k.A.	mAb Maus	4854, Vala Sciences, San Diego, USA	1:300	1:2.000
Phospho-Perilipin (S522)	k.A.	mAb Maus	4856, Vala Sciences	1:30	1:300
PPARα	-	pAb Kaninchen	Sc-9000, Santa Cruz Biotechnology	-	1:250
PPARγ	-	pAb Kaninchen	101700, Cayman Chemical	-	1:1.000
SREBP1	2A4	mAb Maus	NB600-582, Novus Biologicals	-	1:1.000
TIP47	-	pAb Meerschweinchen	GP30, Progen	1:300	1:1.000
ZO-1	-	pAb Kaninchen	40-2300, Invitrogen	1:200	-

Abk.: IF: Immunfluoreszenz, IHC: Immunhistochemie, WB: Immunblot, mAb: monoklonaler Antikörper, pAb: polyklonaler Ab, k.A.: keine Angabe.

2.6.2 Sekundärantikörper

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit den Fluorophoren Cy3 und Cy5 (Dianova, Hamburg) sowie Alexa 488 (Morbitec, Göttingen) konjugierte Antikörper gegen Kaninchen, Maus und Meerschweinchen in Verdünnungen von 1:500 (Cy3, Cy5) bzw. 1:300 (Alexa 488) eingesetzt. Biotinylierte Sekundärantikörper gegen Maus (Dianova), Kaninchen (Dako) und Meerschweinchen (Vector Laboratories Inc.) wurden 1:200 für immunhistochemische Färbungen eingesetzt. Meerrettichperoxidase (HRP) -gekoppelte Sekundärantikörper (anti-Kaninchen, -Maus, -Meerschweinchen) wurden von Cell Signaling Technology / New England Biolabs und Dianova zur Immunblotdetektion erworben und in einer Arbeitsverdünnung von 1:2.000 verwendet.

2.7 Oligonukleotid-Sequenzen

2.7.1 Primer-Sequenzen

Oligonukleotid-Primer wurden mit Hilfe der Online Programme Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) und NCBI Primer Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) designt und von der Firma Thermo Scientific / Biopolymers synthetisiert. (Stocklösung 100 μ M, eingesetzte Konzentration 10 μ M). Es wurde darauf geachtet, dass der GC-Gehalt der Primer zwischen 50 - 60 % aufwies (bezüglich Primersequenzen siehe Tab. 2. 2 und Tab. 2. 3).

Tab. 2. 2: Primer für real-time PCR.

Primerpaare (5' → 3') und GeneBank Accession-Nummer		Gleichung der Standardkurve, Korrelationskoeffizient (R^2)
Adipophilin	NM_001122.3	$y = -2.7666x + 15.939,$ $R^2 = 0,996$
Fw GAT GGC AGG CGA CAT CTA CT		
Rev GGA CCT ACC AGC CAG TTG AG		
β2-Mikroglobulin	NM_004048.2	$y = -2,933x + 12,88$ $R^2 = 0,997$
Fw CAC GTC ATC CAG CAG AGA AT		
Rev TGC TGC TTA CAT GTC TCG AT		
C/EBPα	NM_004364.3	$y = -3.6146x + 17.335$ $R^2 = 0,993$
Fw CCA AGA AGT CGG TGG ACA AG		
Rev TTG TCA CTG GTC AGC TCC AG		
C/EBPβ-LAP	NM_005194.2	$y = -3.0218x + 22.103$ $R^2 = 0,994$
Fw GGC ACC CGC GTT CAT GCA AC		
Rev ACG CAG CAG CCA AGC AGT CC		
C/EBPβ	NM_005194.2	$y = -3.4492x + 21.471$ $R^2 = 0,993$
Fw ACG TCC TCC TCG TCC AGC CC		
Rev CGG CGA TGT TGT TGC GCT CG		
C/EBPδ	NM_005195.3	$y = -4.0213x + 24.609$ $R^2 = 0,983$
Fw CGG AGC CTG CGC CCT TCT ACG AA		
Rev GGT GGG CAC GGC GGC CAT GGA GT		
MLDP	NM_001013706.2	$y = -3.1665x + 19.118$ $R^2 = 0,998$
Fw GCT GTG GAT GTT GTA CTG GA		
Rev CTG CTG TCT CCT CTG ATC CT		
Perilipin	NM_002666.4	$y = -2.9587x + 20.997$ $R^2 = 0,996$
Fw CTG CCG GTG GTG AGT GGC AC		
Rev CAC AGA GGC CAC CAG GGG GT		
PPARα	NM_005036.4	$y = -2.8347x + 18.738$ $R^2 = 0,992$
Fw CGG CAG CGT GGA CGA GTC TC		
Rev TTG CAG CTG CGG TCG CAC TT		

Fortführung von Tabelle 2. 2

Primerpaare (5' → 3') und GeneBank Accession-Nummer		Gleichung der Standardkurve, Korrelationskoeffizient (R ²)
PPARγ	NM_005037.5	y = -3.0778x + 18.622 R ² = 0,992
Fw CCC CCT GCA GGA GCA GAG CA		
Rev TCC TGC ACA GCC TCC ACG GA		
PPARγ2	NM_015869.4	y = -3.2545x + 25.682 R ² = 0,984
Fw CCC AGA AAG CGA TTC CTT CAC TGA T		
Rev TGG TGG GCC AGA ATG GCA TCT		
SREBP1c	NM_004176.4	y = -3.4709x + 18.56 R ² = 0,997
Fw CCC TGT AAC GAC CAC TGT GA		
Rev ACA GTG GCT CCG TCT GTC TT		
TIP47	NM_005817.4	y = -3.5877x + 19.159 R ² = 0,991
Fw ATC GGT CAT GGG CTC CCG CT		
Rev CTG TTC CTG CCG CTG CTG CT		

Abk. : Fw : Vorwärtsprimer, Rev : Rückwärtsprimer.

Tab. 2. 3: Verwendete Primer für PCR- und Sequenzierungsanalysen.

	Vorwärtsprimer 5' → 3'	Rückwärtsprimer 5' → 3'
Perilipin-Isoformen-Primer für PCR		
Perilipin A NM_002666.4	GCA GCA TTG AGA AGG TGG	CCA TCA GCG ACA GCC TGG
Perilipin B NM_002666.4	CAT GGC TCT GGC CTG AGG	GCA GCC CAC ACA GTG ACC
Perilipin C NM_002666.4	ACA GAA GGG GTG AGA AGC	CAA AGC AGG GTC AGT GCC
Primer der Hygromycin B-Resistenz (Kolonie-PCR und Sequenzierung)		
pAHMNT	GCC AGT CCT CCG ACA GAC	CGA AGC GAG CAC TTA ACA AG

2.7.2 siRNA- und shRNA-Sequenzen

Spezifische siRNA-Sequenzen wurden unter Verwendung von "Online Design-Tools" (Dharmacon (<http://www.dharmacon.com/>), Whitehead M.I.T. (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNA> und eRNAi (<http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai-3/>)) ausfindig gemacht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die siRNA-Sequenz 19 Nukleotide lang war, der GC %-Gehalt zwischen 30-50 % lag und ein UU-3'-Überhang angehängt wurde. Sequenzen mit mehr als 4 U's oder A's wurden vermieden, da dies als Terminationssignal der RNA-Polymerase III dient [200]. Die ausgewählten siRNA-Sequenzen wurden in der NCBI Datenbank (Blast) auf eine höchstmögliche Genspezifität

untersucht. siRNAs mit Homologien von mehr als 15 Nukleotiden zu anderen Genen wurden ausgeschlossen. Die siRNAs (Eurofins, MWG Operon, Ebersberg) wurden als Lyophilisate geliefert und mit 50 mM TrisHCL pH 7,5-8,0 mit 100 mM NaCl zu 100 μ M oder 20 μ M Stocks verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die siRNAs wurden nicht mehr als 3 Mal aufgetaut. Es wurden je 2 siRNAs gegen Adipophilin (Exon 8 (#1), 3'UTR (#2)) und TIP47 (Exon 5 (#1), Exon 6-7 (#2)) verwendet (Tab. 2. 4). Die verwendeten shRNA-Sequenzen zur lentiviralen Herunterregulation wurden freundlicherweise von Dr. Marie Hiet und Dr. Gualtiero Alvisi der Abteilung „Molekulare Virologie“ des Hygieneinstituts des Universitätsklinikums Heidelberg zur Verfügung gestellt (Tab. 2. 4).

Tab. 2. 4: siRNA- und shRNA-Sequenzen.

Gen, GeneBank Accession-Nummer	Nummer	Position 5'→3'	siRNA-Sequenz 5'→3'
Adipophilin, NM_001122.3	#1	1122-1140	GCA CAU UGA GUC ACG UAC U[dUdU]
	#2	1614-1632	GAA GCA AGU AGC UAG UAU A[dUdU]
TIP47, NM_005817.4	#1	871-889	GAA CAG AGC UAC UUC GUA C[dUdU]
	#2	1000-1018	GUC CUA AGC CUG AUG GAA A[dUdU]
Negativkontrolle siRNA	#1	-	UGG UUU ACA UGU CGA CUA A[dUdU] (Dharmacon #1)
	#2	-	UUC UCC GAA CGU GUC ACG U[dUdU] (Quiagen, #1022076)
<hr/>			
Gen, GeneBank Accession-Nummer	Nummer	Position 5'→3'	shRNA-Sequenz 5'→3'
Adipophilin, NM_001122.3	#1	1216-1236	CCC ACA GAA CAU CCA AGA UCA A
	#2	229-319	CCC UCA GCC UAU CUC AGU ACA A
TIP47, NM_005817.4	#1	2292-2315	AUG GUA UUC AGU AUU GCC UUA A
	#2	2145-2164	AUC CCU GAA UAU CAG CCU GUA
Negativkontrolle	#1	-	GCA CAA ACG CUC UCA UCG ACA AG

2.8 Vektoren

Zur Durchführung der stabilen lentiviralen Transfektion der zweiten Generation wurden 3 Vektoren verwendet (bezüglich Vektorkarten für die Verpackungsvektoren psPAX2 und pMD2.G, sowie für den Transfervektor pAPMshRNA siehe Anhang (Abb. 8. 1 - 3)).

2.9 Gewebe

Kryokonserviertes und Paraffin-eingebettetes humanes Lebergewebe wurde von der Gewebebank des Nationalen Centrums für Tumorerkrankungen (NCT) Heidelberg mit der Genehmigung der Ethikkommission der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt (Ethikantrag 206 / 2005: „Feingewebliche, immunhistologische und molekularbiologische Untersuchungen an langzeitarchiviertem Gewebematerial des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Heidelberg“ und Ethikantrag 207 / 2005: „Etablierung einer humanen Gewebe- und Tumorbank am Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Heidelberg im Rahmen des NCT“). Das Gewebe wurde bei -80°C gelagert. Klinisch-pathologische Daten der in dieser Studie verwendeten Leberproben sind in Tab. 2. 5 aufgelistet. Es wurde jeweils nicht-neoplastisches Lebergewebe mit möglichst großem Abstand vom Tumor bei Tumorfällen verwendet.

Tab. 2. 5: Menschliche Leberproben.

#	Geschlecht	Alter	μg Triacylglycerid / mg Protein	Diagnose
1	m	51	0,49	Leberzirrhose bei M. Wilson
2	m	76	0,57	Leberresektat bei Metastase CRC
3	w	84	0,66	verworfen Transplantatleber
4	m	70	0,8	Leberresektat bei GIST-Metastase
5	m	55	0,82	Leberresektat bei Cholangiokarzinom
6	w	44	0,89	Leberzirrhose
7	w	63	0,89	Leberresektat bei Cholangiokarzinom
8	m	69	1,59	Leberresektat bei HCC
9	w	49	1,63	Leberresektat bei Metastase Mammakarzinom
10	w	47	1,66	Leberresektat bei HCC
11	m	50	1,8	Leberresektat bei Klatskin-Tumor
12	w	46	2,28	Leberversagen
13	m	52	2,54	Hepatitis C, Leberzirrhose
14	n.b.	n.b.	3,55	verworfen Transplantatleber
15	w	58	5,17	Leberresektat bei Metastase CRC
16	m	72	8,5	Leberresektat bei Metastase, Azinuszellkarzinom der Speicheldrüse
17	m	74	9,8	Leberresektat bei Metastasen, endokriner Pankreastumor
18	w	33	10,8	Leberresektat bei Leberadenom
19	m	0,5	12,9	Glycogenose
20	m	63	13,26	Leberresektat bei HCC
21	w	67	13,17	Leberresektat bei Cholangiokarzinom
22	m	77	13,74	Leberresektat bei Cholangiokarzinom
23	m	57	25,67	Leberresektat bei D. cysticus Karzinom
24	m	34	29,31	Leberresektat bei Metastase CRC
25	n.b.	n.b.	40,76	verworfen Transplantatleber
26	m	70	42,97	verworfen Transplantatleber
27	m	59	46,74	verworfen Transplantatleber
28	m	49	46,96	verworfen Transplantatleber
29	n.b.	n.b.	64,23	verworfen Transplantatleber
30	m	66	64,76	Leberresektat bei Metastasen CRC
31	w	13	81,32	verworfen Transplantatleber

Abk.: m: männlich, w: weiblich, CRC: kolorektales Karzinom, GIST: Gastrointestinaler Stromatumor, n.b.: nicht bekannt.

2.10 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde der kommerziell erhältliche *Escherichia coli* XL1-Blue Stamm (#200249, Agilent Technologie) verwendet.

2.11 Zelllinien

Die Zellen wurden von der „*Japanese Collection of Research Biosources*“ (JCRB; Osaka, Japan), der „*American Type Culture Collection (ATCC) / LGC Standards*“ (Wesel) oder über „*Cell Line Services*“ (CLS; Heidelberg) erworben.

Tab. 2. 6: Verwendete humane Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Firma / Organisation, Artikelnummer	Kultivierungsmedium
Caki-2	Nierenzellkarzinom	ATCC, HTB-47	RPMI
HaCaT	Immortalisierte, nicht-neoplastische Keratinozyten der Epidermis	CLS, 300493	DMEM
HCT 116	kolorektales Adenokarzinom	ATCC, CCL-247	DMEM
HEK 293T/17	Embryonale Nierenepithelzellen	ATCC, CRL-11268	DMEM
Hela	Adenokarzinom (Zervix)	ATCC, CCL2	DMEM
Hep3B	Hepatozelluläres Karzinom	ATCC, HB-8064	MEM
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	ATCC, HB-8065	RPMI
Huh7	Hepatozelluläres Karzinom	JCRB, 0403	DMEM
LN-229	Glioblastom	ATCC, CRL-2611	DMEM
LS174T	Kolorektales Adenokarzinom	ATCC, CL-188	DMEM
MCF7	Mammakarzinom	ATCC, HTB-22	RPMI
PLC/PFR/5	Hepatozelluläres Karzinom	ATCC, CRL-8024	DMEM
U-251 MG	Glioblastom	CLS, 300385	DMEM

Abk.: ATCC: „*American Type Culture Collection*“, JCRB: „*Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank*“, CLS: „*Cell Line Service*“.

3. Methoden

3.1 Mikroskopische Techniken

3.1.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit Immunfluoreszenzmikroskopie können Proteine spezifisch in kultivierten Zellen und in kryokonservierten Geweben mittels spezifischer Antikörper detektiert und lokalisiert werden. Grundsätzlich wurde in dieser Arbeit die indirekte Färbemethode angewandt, in der zuerst ein spezifischer Primärantikörper das Protein und danach ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Sekundärantikörper gegen die Spezies des Erstantikörpers bindet. Man unterscheidet hierbei eine Lipid-erhaltende und eine Lipid-zerstörende Methode, die mit Hilfe verschiedener Fixierungen realisiert werden.

3.1.1.1 Herstellung und Fixierung

Kryogewebe wurde mit einem Kryotom in 5 µm dicke Gewebsschnitte geschnitten, auf Objektträgern (Superfrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und für 1 h bei RT getrocknet. Kulturzellen wurden auf sterile Deckgläser ausgesät und an definierten Zeitpunkten 3x mit 37 °C warmer Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit 1 mM MgCl₂ kurz gewaschen. Zellen oder Gewebe wurden danach entweder mit 4 %-iger Paraformaldehydlösung (PFA) für 10 min fixiert (Lipid-erhaltendes Protokoll) und danach mindestens 4x 5 min in PBS gewaschen, oder wenn Lipide nicht angefärbt werden sollten, für 5 min in -20 °C kaltem Methanol und für 5 min (Schnitte) oder 30 sec (Zellen) in -20 °C kaltem Aceton fixiert und luftgetrocknet (Lipid-zerstörendes Protokoll).

3.1.1.2 Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Fixierung folgte zunächst die Permeabilisierung mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 5-8 min, um die Zellen oder das Gewebe zugänglicher für die Antikörper zu machen. Nach zwei weiteren Waschsritten in PBS für 5 min wurden Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine aufgetragen. Antikörper wurden in einer Antikörperverdünnungslösung (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), der Natriumazid zugesetzt war, angesetzt. Nach 1 h Inkubation bei RT in einer feuchten Kammer folgten zwei Waschsritte in PBS für 5 min. Danach wurden die Zellen oder das Gewebe 30 min mit dem entsprechenden Sekundärantikörper bei RT in einer feuchten, dunklen Kammer

inkubiert (bzgl. Antikörperverdünnungen siehe Tab. 2. 1 bzw. Abschnitt 2.6.2). Es folgten 2x 5 min Waschen mit PBS und ein kurzes Spülen in doppelt destilliertem Wasser. PFA-fixierte Zellen wurden nass mit Eindeckmedium mit DAPI eingedeckelt. Bei Methanol-Aceton-Fixierung wurden die Zellen vor dem Eindeckeln 5 min in 100 % Ethanol entwässert und luftgetrocknet. Neutralfette wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY[®] 493 / 503 (D3922, Invitrogen) angefärbt. Hierzu wurde eine Stocklösung (1 mg BODIPY[®] / mL Ethanol, entsprechend 4 mM) 1:1,500 in der Sekundärantikörperlösung verdünnt, entsprechend einer Arbeitskonzentration von ca. 2,7 µM BODIPY[®]. Die gefärbten Gewebsschnitte bzw. Zellen wurden bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

Um die Lokalisation mehrerer unterschiedlicher Proteine in Bezug zueinander bestimmen zu können, wurden Doppel- und Tripelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Grundsätzlich wurde die Färbung wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben durchgeführt, jedoch wurden Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies in entsprechend angepasster Verdünnung (Faktor 2 bzw. 3) verwendet. Entsprechend wurden die Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Fluorophoren benutzt.

3.1.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen (IHC) an Formalin-fixierten und Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE) werden vor allem in der pathologischen Routinediagnostik eingesetzt. Wie bei der Immunfluoreszenzfärbung wurde auch bei der IHC eine indirekte Färbemethode durchgeführt, wobei jedoch der Sekundärantikörper, der den Avidin / Biotin-Enzymkomplex bindet und somit eine Farbreaktion katalysiert, biotinyliert war.

3.1.2.1 Herstellung und Fixierung von Paraffinschnitten

FFPE-Gewebe wurde mit einem Mikrotom in 2-3 µm dicke Schnitte geschnitten, die in einem warmen Wasserbad (40 °C) gestreckt und auf Objektträger (Histobond) aufgenommen wurden. Die Gewebsschnitte wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet. Die Deparaffinierung wurde in Xylol (3x je 10 min) durchgeführt. Danach wurde das Gewebe in einer absteigenden Ethanolreihe (2x 100 %, 96 %, 70 %, 50 %, H₂O je 5 min) rehydriert.

3.1.2.2 „Antigen-Retrieval“ und Immunhistochemische Färbung

Formaldehyd quervernetzt die Aminosäuren Histidin, Thyrosin, Lysin, Arginin, Asparagin, Glutamin, Serin unter Ausbildung von Methylen-Brücken, wodurch die dreidimensionale

Proteinstruktur, jedoch nicht dessen Primärstruktur, verändert wird [201-204]. Um Antikörperbindungsstellen zugänglich zu machen, wurde „Antigen-Retrieval“ angewandt. Die rehydrierten Gewebeschnitte wurden hierfür in Kunststoffküvetten in Tris / Harnstoff-Puffer (0.1 M, pH 9,5 Tris; 5 % (v/w) Harnstoff) 3x 5 min in der Mikrowelle (600 W) gekocht. Anschließend wurden die Proben 15 min bei RT abgekühlt.

Immunhistochemische Färbungen wurden mit den „Avidin / Biotin Blocking“, „ABC Standard“ und „DAB Substrat“ Kits (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, USA) nach der ABC-Methode durchgeführt. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch die Behandlung mit 3 % Wasserstoffperoxid in PBS für 30 min blockiert. Danach wurden die Gewebeschnitte kurz in Wasser und 2x 5 min in PBS gewaschen. Endogenes Biotin, Biotinrezeptoren und Avidin-Bindungsstellen wurden zuerst 30 min mit einer Lösung bestehen aus 4 Tropfen Avidin D in 1 mL 5 % (w/v)-igen Milchpulver in PBS und 10 % Normalserum (der Spezies des Sekundärantikörpers) blockiert. Nach kurzem Waschen (2x 5 min in PBS) folgte das zweite Blocken für 30 min mit 4 Tropfen Biotin in 1 mL 5 % (w/v)-igen Milchpulver in PBS und 10 % Normalserum (der Spezies des Sekundärantikörpers). Nun wurde der Erstantikörper über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Probe 2x 5 min in PBS gespült und der entsprechende Sekundärantikörper für 30 min zugefügt. Nach erneutem Waschen in PBS wurde der Gewebeschnitt mit dem frisch angesetzten Avidin / Biotin-Enzymkomplex für 30 min inkubiert. Dieser Komplex bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper, und das Enzym HRP katalysiert die Farbreaktion. Hierfür wird nach Waschen in PBS die DAB-Substratlösung auf den Gewebeschnitt hinzugefügt und die Umwandlung des Farbstoffs unter dem Mikroskop beobachtet. Um die Reaktion abzustoppen, wurden die Proben in doppelt destilliertes Wasser getaucht.

Zellkerne wurden 15-20 sec mit einer Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Lösung blau gegengefärbt und anschließend 5 min unter laufendem Leitungswasser gewaschen. In einer in der Konzentration aufsteigenden Reihe aus 50 %, 70 %, 96 % und 100 % Ethanol sowie 2x Xylol wurden die Gewebeschnitte für je 5 min dehydriert und mit EUKITT beschichtet.

3.1.3 „Live cell imaging“

Für Videoaufnahmen wurden Zellkulturzellen in 6-Mehrlochplatten in eine Inkubationskammer gestellt, die das Mikroskop zum Teil umschloss. Die Kammer gewährleistete 37 °C, 5 % CO₂ und 50 % Luftfeuchtigkeit. Die Aufnahmen intrazellulärer

Lipidtropfen wurden mit Hilfe der CellR-Software (Olympus) und der CCD-Kamera ORCA-R² (Hamamatsu, Japan) aufgenommen. Es wurde eine 200x oder 400x Vergrößerung mit Phasenkontrasteinstellung gewählt. Lipidtropfen wurden mit BODIPY[®] angefärbt, indem 4 µL der Stock-Lösung (Abschnitt 3.1.1.2) mit 1 mL Medium vermischt und für 30 min mit den Zellen bei 37 °C inkubiert wurde. Zellkerne lebender Zellen wurden zeitgleich mit 1 µg Hoechst 33342 / mL Medium (Stock 10 mg / mL H₂O) angefärbt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 2-3x mit Medium gewaschen und in phenolrotfreies Medium umgesetzt.

3.2 Bakterienkultur

3.2.1 Transformation rekombinanter DNA in Bakterien

Kompetente XL1blue *E.coli* (#200249 Alginet Technologies / Stratagene) wurden gemäß dem Protokoll von Stratagene transformiert. Abweichend zum Protokoll wurden 500-1.000 ng Vektor-DNA und nur 50 µL kompetente Zellen pro Transformation verwendet. Vor dem Ausplattieren wurde der Transformationsansatz für 2 min bei 2.000 g abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 100 µL LB-Medium resuspendiert und 10 µL bzw. 90 µL ausgestrichen. Für eine Retransformation, die zur Vervielfältigung bereits vorhandener Vektor-DNA eingesetzt wurde, wurden 10 µL des gesamten Retransformationsansatzes ausgestrichen. Es wurde kein Blau-Weiß-Screening durchgeführt, weswegen die LB-Agarplatten nur mit 50 µg Ampicillin / mL angesetzt wurden.

3.2.2 Übernachtskultur

Ausgewählte Bakterienkolonien von LB-Agarplatten wurden mit sterilen Pipettenspitzen punktiert und in 2-5 mL 37 °C warmes LB-Medium überführt. Nach 6-8 h bei 37 °C und 250 rpm wurde die Bakteriensuspension in 80-100 mL warmes LB-Medium transferiert und ebenfalls bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm über Nacht kultiviert. Das LB-Medium bzw. die LB-Agarplatten waren jeweils mit 50 µg Ampicillin / mL versetzt.

3.2.3 Einfrieren von Bakterien

1 mL Bakterien einer frischen Übernachtskultur wurde mit 330 µL 60 % Glycerin vermischt (Glycerin-Endkonzentration 15-20 %) und bei -80 °C eingefroren.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle verwendeten Zelllinien waren adhärent wachsend und wurden entweder in sterilen Petrischalen oder Mehrlochplatten in entsprechenden Medien bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Erreichen einer 80-90 %-igen Konfluenz wurden die Zellen wie folgt passagiert. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen einmal mit der Trypsin / EDTA-Lösung gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1-2 mL Trypsin / EDTA-Lösung beschichtet und ca. 5 min bei 37 °C abgelöst. Die Zellen wurden in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und die Enzymreaktion mit doppeltem Volumen Medium gestoppt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 110 g wurde das Zellpellet in 4-6 mL Medium pro 10 cm Zellkulturschale resuspendiert. Anschließend wurde 1 mL der Zellsuspension in eine neue Petrischale ausgesät und im Brutschrank kultiviert.

3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Zellpellet von Zellen mit einer 90 %-igen Konfluenz einer 10 cm Zellkulturschale wurde für die Kryokonservierung in 1,8 mL Zellkulturmedium, versetzt mit 10 % (v/v) DMSO, resuspendiert und zügig in Kryoröhrchen (Greiner) transferiert und kurzzeitig auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen um je 1 °C / min bis auf -80 °C abgekühlt und am folgenden Tag zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Um Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie aus dem flüssigen Stickstoff zügig auf 37 °C erwärmt, in 10 mL Medium überführt und bei 110 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Medium resuspendiert und die Zellen ausgesät.

3.3.3 Zellzahlbestimmung

Für Zellkulturexperimente war es wichtig, eine bestimmte Anzahl von Zellen auszusäen. Hierfür wurde die Zellzahl unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Der Mittelwert aus 4 Großquadraten wurde mit dem Kammerfaktor 10⁴ multipliziert und ergab die Zellkonzentration in Zellen / mL Medium.

3.3.4 Kontaminationsüberprüfung

Alle 3 Monate wurden die Zellen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Dabei diente das „Mycoplasma Test Kit 1/C“ Kit zur Überprüfung. Hierbei wurde der

Kulturüberstand auf Mykoplasmen-DNA mittels PCR untersucht. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die im Rahmen der Dissertation verwendeten Zellen waren stets negativ. Zusätzlich wurden zweimal pro Woche die Zellen lichtmikroskopisch auf Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien hin untersucht.

3.3.5 Steatose-Modelle

Unterschiedliche Zellkulturmodelle wurden entwickelt, um eine hepatozelluläre Verfettung zu induzieren. Hierfür wurden Zellen entweder nach einem Protokoll für Präadipozyten-Differenzierung, mit BSA-gekoppelter Ölsäure bzw. anderen Lipiden / Fettsäuren, DMSO oder Kombinationen behandelt (Abschnitte 3.3.5.1-3). Die Zellaussaat-Konzentrationen der einzelnen Versuche sind in Tab. 3. 1 aufgelistet. Die Medien wurden stets nach 3-4 Tagen gewechselt.

Tab. 3. 1: Zellaussaatkonzentrationen der verschiedenen Steatose-Modelle.

Zelllinie	DMSO-Oleat, 1 Tag vor Induktion	PAM-DMSO, 2 Tage vor Induktion	Oleat, Cholesterin, LDL, Hypoxie, MG-132, NH ₄ Cl 1 Tag vor Induktion
Huh7	~300.000	~350.000	~75.000-100.000
HepG2	~600.000	~700.000	~100.000-150.000
PLC	~300.000	~350.000	~75.000-100.000
Hep3B	~300.000	~350.000	~75.000-100.000
HeLa	n.d.	~400.000	~100.000
HaCaT	n.d.	~400.000	~100.000
LN-229	n.d.	~350.000	~90.000
MCF-7	n.d.	~400.000	~100.000
Caki-2	n.d.	~350.000	~90.000
HEK-293T/17	n.d.	~500.000	~125.000
HCT 116	n.d.	~500.000	~125.000
HT-29	n.d.	~500.000	~125.000

X Zellen / Vertiefung einer 6-Lochplatte. Abk.: PAM: Präadipozyten- / Adipozyten-Differenzierungsmedium, Oleat: BSA-gekoppelte Ölsäure.

3.3.5.1 Ölsäure-Modell

Zellen wurden entweder kurzzeitig (1-6 Tage) oder bis zu 40 Tage lang mit verschiedenen steatogenen Substanzen wie BSA-gekoppelter Ölsäure (O3008, Sigma), Cholesterin (SyntheCol NS0, S5442, Sigma), LDL (437644, Merck), oder Ciglitazon behandelt. Zusätzlich wurde die Proteindegradation mittels MG-132 (474790, Merck) oder Ammoniumchlorid (NH₄Cl) inhibiert (bezüglich Arbeitskonzentrationen siehe Tab. 3. 2). Nach 0, 3, 6, 10, 20, 30, 40 Tagen wurden Gesamtprotein- und RNA-Lysate hergestellt und

Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abschnitte 3.5.1, 3.4.1, 3.1.1). Einen Tag vor Induktion wurden die Zellen zu 70 % Konfluenz ausgesät (Tab. 3. 1). Als Kontrolle diente das entsprechende Medium ohne Supplementation. Zusätzlich wurden Zellen zu einer Konfluenz von 90-95 % einen Tag vor Induktion ausgesät (Tab. 3. 1) und mit Medium mit 1 % (v / v) DMSO und Oleat mit DMSO inkubiert (DMSO-Oleat-Modell).

3.3.5.2 Hypoxie

Die Herstellung hypoxischer Kulturbedingungen wurde entweder durch Zusatz von DMOG (D3695, Sigma, Tab. 3. 2) oder durch Inkubation der Zellen in einer Hypoxiekammer (Dr. Jonas Bläs, Neuroonkologie, DKFZ) unter 0 % Sauerstoff bis zu 12 Tage durchgeführt und Gesamtproteinlysate hergestellt (Abschnitt 3.5.1). Einen Tag vor Behandlung wurden die Zellen ausgesät (Tab. 3. 1). Kontrollzellen wurden in Medium ohne DMOG-Zusatz bzw. in einem Inkubator mit Normalsauerstoffgehalt inkubiert.

3.3.5.3 Präadipozyten-Differenzierungs-Modell

Die Zellen wurden gemäß einem Standardprotokoll für Differenzierung von Präadipozyten (C-27437, Promocell) behandelt. Hierfür wurden für 2 Tage postkonfluente Zellen (Tab. 3. 1) für weitere 3 Tage in einem Präadipozyten-Differenzierungsmedium ohne FBS und danach in einem Adipozyten-Nährmedium (C-27439, Promocell) mit 3 % FBS bis zu 37 Tage lang inkubiert (Tab. 3. 2). Als Kontrolle diente das Medium ohne die zusätzlichen Faktoren mit entsprechender FBS-Konzentration und normales Medium mit 10 % FBS. An definierten Zeitpunkten (0, 1 h, 6 h und 1, 2, 3, 6, 10, 20, 30, 40 Tage) wurden Gesamtprotein- und RNA-Lysate hergestellt und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abschnitte 3.5.1, 3.4.1, 3.1.1).

Zusätzlich wurde eine Kombination mit DMSO gewählt, wobei 1 % (v/v) DMSO über die gesamte Versuchsdauer in das Medium hinzugefügt wurde.

Tab. 3. 2: Eingesetzte Substanzen in der Zellkultur.

	Substanz	Effekt	Endkonzentration	Referenz
Nährmedium nach 3 Tagen Differenzierungsmedium Differenzierungsmedium für 3 Tage	Ciglitazon (Thiazolidin)	PPAR γ -Agonist	3 $\mu\text{g} / \text{mL}$	[205, 206]
	IBMX	- Inhibitor von Phosphodiesterasen => erhöht cAMP-Level - Erhöht PPAR-Expression - Induziert C/EBP β	44 $\mu\text{g} / \text{mL}$	[207-210]
	L-Thyroxin (T4, Schilddrüsenhormon)	- Wird in Zielzellen in aktives Triiodthyronin (T3) umgewandelt und unterstützt u.A. Lipidakkumulation - Induziert C/EBPs and PPARs	9 ng / mL	[211, 212]
	d-Biotin	- Prothetische Gruppe von Acetyl-CoA-Carboxylase, die den ersten irreversiblen Schritt in der Fettsäuresynthese katalysiert und dadurch u.A. die Lipidakkumulation erhöht	8 $\mu\text{g} / \text{mL}$	[213, 214]
	Insulin	- Erhöht Glukose-Aufnahme - Unterstützt adipogene Differenzierung - Aktiviert PPAR γ und SREBP-1c	500 ng / mL	[215-217]
	Dexamethason (Glukokortikoid)	- Aktiviert C/EBP- und PPAR-Transkription und induziert dadurch u.A. Lipidakkumulation	400 ng / mL	[208, 218, 219]
Oleat, Oleat-DMSO	Ölsäure	- wird zu Triacylglycerid konvertiert => Lipidtropfenbildung - PPAR-Agonist - Erhöht C/EBP α	~ 240 μM	[220, 221]
PAM-DMSO, Oleat-DMSO	DMSO	- Induziert und erhält Zelldifferenzierung	1 % (v/v)	[222-224]
LDL	LDL	- Cholesterin-tragendes Lipoprotein	40 $\mu\text{g} / \text{mL}$	[225]
Cholesterin	Cholesterin	- Bestandteil von Lipidtropfen	1:250-500	[226]
Hypoxie	DMOG	- Inhibitor der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase - Induziert HIF1- α	1 mM	[227]
MG-132	MG-132	- Inhibiert proteasomale Proteindegradation	3-15 μM	[60]
NH₄Cl	NH₄Cl	- Inhibiert lysosomale Proteolyse	10 mM	[60]

Abk.: LDL: „low density lipoprotein“, IBMX: 1-Methyl-3-Isobutylxanthin, ASH: „alcoholic steatohepatitis“.

3.3.6 siRNA-Transfektion

Für siRNA-Transfektionen wurden Zellen einen Tag vor Transfektion ausgesät (Kavität einer 12-Mehrlochplatte: 20.000 Huh7-Zellen bzw. 35.000 HepG2-Zellen; Kavität einer 6-Mehrlochplatte 50.000 Huh7-Zellen bzw. 100.000 HepG2-Zellen). Die transiente Transfektion wurde mittels des kationischen Trägers Oligofectamin realisiert, da siRNAs ihre hydrophoben Eigenschaften durch die Anlagerung von Kationen verlieren und somit durch Zellmembranen diffundieren können. Je nach Art der Analyse wurden Zellen in verschiedenen Formaten ausgesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen in zelltypischem Medium ohne FBS gewaschen und die entsprechende Menge OptiMEM vorgelegt. Die siRNA-Transfektion wurde nach optimierten Protokoll (Tab. 3. 3) durchgeführt. Die Transfektionslösung wurde vorsichtig auf die Zellen getropft. Zeitpunkte für funktionelle Analysen waren 48 bzw. 72 h. Es wurden jeweils zwei siRNAs gegen Adipophilin und TIP47 hergestellt (Tab. 2. 4). Typischerweise wurden siRNAs gegen Adipophilin und TIP47 in einer Konzentration von 20 nM eingesetzt. Wurden siRNAs gemischt (z.B. siRNA Adipophilin #1 und #2), so wurden sie jeweils in einer Konzentration von 10 nM verwendet. In einer Doppel-siRNA-Transfektion gegen Adipophilin und TIP47 wurden alle 4 siRNAs (Adipophilin #1 und #2, TIP47 #1 und #2) mit 10 nM verwendet und die Negativkontrolle in einer Konzentration von 40 nM.

Tab. 3. 3: Protokoll zur transienten siRNA-Transfektion am Beispiel der siRNA-Standardkonzentration von 20 nM.

Schritt	Lösung	12-Mehrlochplatte		
		Unbehandelte Zellen	Oligofectamin-Kontrolle	siRNA - Transfektion
OptiMEM (auf Zellen vorlegen)		500 µL	350 µL	350 µL
1. Lösung A (Endvolumen 150 µL)	OptiMEM	-	75 µL	74,5 µL
	siRNA (Stock 20 µM)	-	-	0,5 µL
2. Lösung B (Endvolumen 150 µL)	OptiMEM	-	73,5 µL	73,5 µL
	Oligofectamin	-	1,5 µL	1,5 µL
3.	Inkubation von Lösung A und B für 10 min bei RT; Vermischen beider Lösungen; Inkubation von Lösung A / B für 20 min bei RT			
4. Transfektions- endvolumen		500 µL	500 µL	500 µL
5. Nach 4 h Zugabe von 500 µL Medium mit FBS ohne P / S				
6. Vollständiger Medienwechsel nach 24 h mit FBS und P / S				

Abk.: RT: Raumtemperatur, FBS: Fetales Rinderserum, P / S: Penicillin / Streptomycin.

3.3.7 Herstellung stabiler Zellen durch lentivirale Transfektion

Eine stabile Herunterregulation von TIP47 und / oder Adipophilin in Huh7-Zellen mittels eines lentiviralen Systems zweiter Generation wurde mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. rer. nat. Bartenschlager und Dr. rer. nat. Gualtiero Alvisi vom Hygieneinstitut, Abteilung „Molekulare Virologie“ des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt [228, 229].

Die virale Transfektion der zweiten Generation arbeitet mit 3 Vektoren: Der erste Vektor (psPAX2) ist der Verpackungsvektor, der die enzymatischen und strukturellen Proteine Pol und Gag, sowie die regulatorischen Proteine Tat und Rev kodiert. Der zweite Vektor (pMD2.G) kodiert das Hüllprotein VSV-G (Glykoprotein (G) des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV). Die dritte Komponente ist der Transfervektor, für den pAPMshX für eine stabile Herunterregulation verschiedener PAT-Proteine eingesetzt wurde. „X“ steht hierbei universell für die entsprechende shRNA. Im ersten Schritt wird eine Helferzelllinie (HEK293T) mit allen drei Konstrukten transient transfiziert. Dadurch entstehen replikationsdefekte lentivirale Vektorpartikel, die von den Helferzellen in den Zellkulturüberstand abgegeben werden. Dieser Überstand wird auf die Zielzellen transferiert. Der Transfervektor wird nun revers transkribiert und mit Hilfe viraler Proteine in das Genom der Zelle stabil integriert. Der integrierte Vektor führt durch den zellulären Prozess der RNA-Interferenz zum Abbau komplementärer mRNA und somit zu einer stabilen Reduktion der PAT-Gene.

In dieser Arbeit wurden je 2 Transfervektoren mit unterschiedlichen shRNA-Sequenzen gegen TIP47 bzw. Adipophilin verwendet (Tab. 2. 4). Die 2x HEPES-gepufferte Salzlösung (HBS) und 2 M Kalziumchlorid-Lösung für die Kalziumphosphat-Transfektion wurden teils von Takara Bio Europe / Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) erworben, teils selbst hergestellt:

2x HBS	280 mM NaCl
	50 mM HEPES pH 7,0
	1,5 mM Na ₂ HPO ₄
	12 mM Dextrose
	10 mM KCl

Für eine 6 cm Zellkulturschale wurden $1,2 \times 10^6$ / HEK293T Helferzellen ein Tag vor Transfektion gleichmäßig ausgesät. Am folgenden Tag wurde das DMEM-Medium (4 mL) der Helferzellen 30 min vor Transfektion gewechselt. Währenddessen wurden die 3 benötigten Vektoren pAPMshX, psPAX2 und pMD2.G in einem 3:3:1 Verhältnis (6,4 µg: 6,4 µg: 2,1 µg) mit sterilem und DNase / RNase-freiem Wasser in einem Endvolumen von 438 µL verdünnt. Es wurden 62 µL 2 M Kalziumchlorid und 500 µL 2x HBS hinzugefügt. Hierbei wurde ein positiver Druck mit der Pipettierhilfe (1 mL) für ca. 45 sec ausgeübt, da durch den Sauerstoffkontakt die Komplexbildung unterstützt wird, und sofort tropfenweise zu den HEK293T-Zellen zugegeben. Ein Präzipitat war nach 3-4 h unter dem Mikroskop sichtbar. Nach einer 8 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 5 mL DMEM-Medium für 36 h kultiviert. Die Transfektionseffizienz wurde anhand der Positivkontrolle (GFP-Vektor) kontrolliert. Des Weiteren dienten nicht transfizierte Zellen als Kontrolle. Einen Tag nach Transfektion der Helferzellen wurden die Zielzellen (Huh7) in 6-Mehrlochplatten (je Kavität 90.000 Zellen) ausgesät. Der virale Zellkulturüberstand der HEK293T-Zellen wurde nach der 36-stündigen Inkubation abgenommen, filtriert (45 µm), 1:1 mit frischem Medium versetzt und als 2 mL-Aliquot bei 4 °C gelagert. 4 mL DMEM- Medium wurden erneut auf die Helferzellen gegeben. Das Medium der Huh7-Zellen wurde abgesaugt und 2 mL des viralen Überstandes hinzugegeben (erste Transfektionsrunde). Nach 6 h bei 37 °C wurde der Überstand der Huh7-Zellen mit 2 mL viralen Überstands aus 4 °C ersetzt und das kationische Polymer Polybren (H9268, Sigma) in einer Endkonzentration von 4 µg / mL hinzugefügt (zweite Transfektionsrunde). Polybren neutralisiert sich abstoßende Ladungen von Pseudoviruspartikeln und Zelloberfläche, wodurch die Transfektionseffizienz erhöht wird. Am darauffolgenden Tag wurde auf gleiche Weise eine dritte Transfektion ohne Polybren durchgeführt. Nach 6 h wurde der virale Überstand der Huh7-Zellen abgenommen, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und durch DMEM-Medium mit 20 % FBS ersetzt. Nach 30 h wurde das Medium gewechselt und mit der Selektion begonnen (Puromycin 1 µg / mL DMEM mit 20 % FBS). Die Zellen wurden mindestens 10 d mit Puromycin selektiert und die Herunterregulation von TIP47 und Adipophilin auf Proteinebene untersucht. Das Selektionsmedium wurde während dieser Zeit jeden Tag erneuert. Im Falle eines starken Vitalitätsverlusts wurde nach 5 d Selektion die Puromycinbeigabe für 3 d unterbrochen und danach wieder aufgenommen. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der Positivkontrolle (GFP-Vektor) kontrolliert. Um

zu gewährleisten, dass nur Zellen mit der stabilen shRNA-Integration kultiviert wurden, wurde ein Viertel der Selektionskonzentration von Puromycin nach der Selektion ständig dem Medium zugesetzt.

Um Huh7-Zellen mit einer doppelt stabilen Herunterregulation von TIP47 und Adipophilin herzustellen, wurde die Puromycinresistenz gegen eine Hygromycinresistenz ausgetauscht (Abschnitt 3.4.10). Die Hygromycin B-Resistenz-tragenden Vektoren wurden nach oben beschriebenem Protokoll in die bereits stabilen Puromycin-resistenten Huh7-Zellen eingebracht.

3.3.8 Vitalitätstest (MTT)

Vitale Zellen können das Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-1-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch eine mitochondriale Dehydrogenase zu Formazan reduzieren. Formazan bildet wasserunlösliche violette Kristalle. Die sterilfiltrierte MTT-Stammlösung (5 mg / mL PBS) wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert. Um die Vitalität von Zellen zu bestimmen, wurden diese in 24-Mehrlochplatten ausgesät und entsprechend des gewünschten Versuches behandelt. Zum definierten Zeitpunkt wurde das Zellkulturmedium durch MTT-haltiges Medium ersetzt (Stammlösung 1:10 verdünnt) und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das MTT-Medium entfernt und die Formazan-Kristalle mit 1 mL DMSO / Ethanol (1:2) gelöst. 5x 100 µL wurden nun von der violett-gefärbten DMSO / Ethanol-Lösung in eine 96-Mehrlochplatte pipettiert und bei 570 nm im Photometer gemessen. Für die Auswertung wurde die relative Zellvitalität prozentual zu den Kontrollzellen bestimmt.

3.3.9 Proliferationstest (BrdU-Einbau)

Zellen wurden in einer 96-Mehrlochplatte ausgesät und Zellzahlen entsprachen den auf die 96-Kavität relativierten Zellkonzentrationen der dementsprechenden Versuche. Nach entsprechender Behandlung wurde die Zellproliferation mit Hilfe des BrdU-Proliferationskits „Cell Proliferation ELISA Biotrak™ System Version 2“ analysiert. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Der BrdU-Antikörper wurde 1:100 eingesetzt und für 2 h inkubiert. Die Farbreaktion mittels TMB-Substrat wurde für 5 min entwickelt und nach dem Abstoppen mit 1 M Schwefelsäure bei 450 nm im Photometer gemessen. Für die Auswertung wurde die relative Proliferation prozentual zu den Kontrollzellen bestimmt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des „NucleoSpin RNA II“ Kits gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Methode basiert auf einer Säulen-Affinitätschromatographie. Abweichend vom Standardprotokoll für Zellen wurden 10 µm dicke Gewebeschnitte der kryokonservierten humanen Proben in 2 mL Zentrifugenröhrchen mit RA1-Puffer vermischt und 10 min bei 30 Hz in der Schwingmühle mit 2-3 Metallkügelchen lysiert. Von humanem Lebergewebe wurde ~50 mg verwendet. Die Elution der RNA erfolgte in 50 µL DNase / RNase-freiem Wasser.

Aufgrund des hohen Lipidgehalts wurden RNA und Proteine aus kryokonserviertem humanem Fettgewebe mit Phenol / Chloroform extrahiert. 150 mg humanes Fettgewebe wurde dazu mit 1,5 mL monophasischer Phenol / Guanidinthiocyanat-Lösung (TriFast 30-2010, Peqlab) vermischt und bei 10 min und 30 Hz in der Schwingmühle lysiert. Alle weiteren Schritte wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA- bzw. RNA-Konzentrationen wurden photometrisch mit Nanodrop bestimmt. Hierzu wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes in die Nukleinsäurenkonzentration umgerechnet. Das Lambert-Beersche Gesetz berücksichtigt neben der Absorption (A), die Konzentration der Lösung (c) in ng / µL, die Pfadlänge (d) in cm und den molaren dekadischen Extinktionskoeffizient (ε) in x ng-cm / µL. Für dsDNA ist ε = 50 ng-cm / µL und für RNA 40 ng-cm / µL.

$$c \text{ [ng / } \mu\text{L]} = (A * \epsilon) / d$$

Zusätzlich ermittelt das Photometer das Absorptionsverhältnis 260 / 280 nm. Dies gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA bzw. RNA. Der Quotient sollte ca. 1,8 für DNA und 2,0 für RNA betragen. Bei einem niedrigeren Quotienten ist die Probe durch Proteine oder Phenole, die bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum besitzen, verunreinigt. Die Umrechnung von x µg DNA in x pmol DNA wurde wie folgt durchgeführt:

$$0.662 * y \text{ kb} = x \text{ } \mu\text{g DNA} \triangleq 1 \text{ pmol DNA}$$

Dabei gibt „y kb“ die Größe der DNA in Kilobasen an.

3.4.3 Reverse Transkription / cDNA-Synthese

0,5-1 µg isolierte Gesamt-RNA wurde mit dem Enzym reverse Transkriptase „RevertAid™ HminusM MuLV“ (EP0451, Fermentas) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (Tab. 3. 4). Die Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA wurde durch Erhitzen auf 75 °C für 5 min gewährleistet. Nach Zugabe des RT-Puffers folgte eine 5 min Inkubation bei 25 °C, damit sich die Primer an die RNA anlagern konnten. Die reverse Transkription folgte nun bei 42 °C für 1 h. Schlussendlich wurde das Enzym 10 min bei 70 °C inaktiviert. Die generierte cDNA diente als Template für PCR und real-time PCR.

Tab. 3. 4: Zusammensetzung eines Ansatzes einer reversen Transkription.

PCR-Ansatz	Volumen	
0,5-1µg RNA in H ₂ O (DNase / RNase frei)	12 µL	} 75 °C, 5 min
Oligo(dT)-Primer	1 µL	
10 µM dNTP	2 µL	
5x RT-Puffer	4 µL	} 25 °C, 15 min Zugabe währenddessen in 5- minütigen zeitlichen Abstand
1 U / µL rev.Transkriptase	1 µL	
Σ	20 µL	

3.4.4 Amplifikation von cDNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Primer, die für die Amplifikation von cDNA in der real-time PCR eingesetzt wurden, wurden zuerst in einer konventionellen PCR auf ihre Genspezifität und die optimale Schmelztemperatur getestet (Tab. 3. 5). Als cDNA diente ein cDNA-Pool, welcher zur Erstellung der Standardkurve in der real-time PCR verwendet wurde. Folgendes PCR-Programm wurde angewandt: Initiale Denaturierung (95 °C, 2 min), 35x Denaturierung (95 °C, 30 sec) – Annealing (60 °C, 30 sec) – Extension (72 °C, 45 sec), und eine finale Extension (72 °C, 5 min). Nach Beendigung der PCR wurden 10 µL des Reaktionsansatzes über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Tab. 3. 5: Zusammensetzung eines 1x PCR-Ansatzes.

PCR-Ansatz	Volumen
H ₂ O (DNase / RNase frei)	15,4 µL
Taq-Polymerase	0,1 µL
10x (NH ₄) ₂ SO ₄ -Puffer	2,5 µL
10 mM dNTP Mix	0,5 µL
25 mM MgSO ₄	1,5 µL
cDNA (1:10)	2 µL
10 µM Vorwärts-Primer	1,5 µL
10 µM Rückwärts-Primer	1,5 µL
Σ	25 µL

Das PCR-Programm sowie der PCR-Ansatz änderten sich unter Verwendung von Perilipin-Isoform-spezifischen Primern (Tab. 3. 6, Tab. 2. 3) folgendermaßen: Initiale Denaturierung (95 °C, 3 min), Touchdown für 10 Zyklen mit je 1 °C Abnahme der Annealingtemperatur Denaturierung (92 °C, 20 sec) – Annealing (60 – 1 °C, 30 sec) – Extension (72 °C, 30 sec), nachfolgend 25x Denaturierung (92 °C, 20 sec) – Annealing (55 °C, 30 sec) – Extension (72 °C, 30 sec), finale Extension (72 °C, 5 min).

Tab. 3. 6: Zusammensetzung eines 1x PCR-Ansatzes für Perilipin-Isoform spezifische Primer.

PCR-Ansatz	Volumen
H ₂ O (DNase / RNase frei)	15,6 µL
Taq-Polymerase	0,4 µL
10x (NH ₄) ₂ SO ₄ -Puffer	2,5 µL
10 mM dNTP Mix	1 µL
25 mM MgSO ₄	1,5 µL
DMSO	1,5 µL
cDNA (1:10)	1,5 µL
10 µM Vorwärts-Primer	0,5 µL
10 µM Rückwärts-Primer	0,5 µL
Σ	25 µL

3.4.5 Semiquantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Untersuchung der Expression einzelner Gene wurde mit Hilfe der TaqMan[®]-PCR Technologie im ABI Prism[®] 7300 real-time System durchgeführt. Als endogene Kontrolle diente das Haushaltsgen β 2-Mikroglobulin, das keiner maßgeblichen Expressionsänderung durch die Experimente unterlag. Während der Amplifikationsreaktion wird das Fluoreszenzsignal von SYBR[®]Green gemessen, das nur nach Interkalation in doppelsträngige (ds) DNA an Fluoreszenzintensität zunimmt. Jedoch steigt dieses Fluoreszenzsignal auch bei Bildung unspezifischer Produkte an. Folglich wurden

hochspezifische Primer ausgewählt und deren Spezifität im Anschluss an die Amplifikations-PCR mittels einer Schmelzkurvenanalyse bestätigt. Jedes doppelsträngige PCR-Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur (T_m), bei der 50 % als dsDNA und 50 % als einzelsträngige DNA vorliegen. Während der Schmelzkurvenanalyse wurde der Reaktionsansatz langsam auf 95 °C erhitzt. Wenn die Temperatur die spezifische T_m des Produktes erreichte, nahm das Fluoreszenzsignal ab. Ein einzelner, schmaler Fluoreszenzpeak wies auf ein spezifisches PCR-Produkt hin.

Für jedes Primerpaar (Tab. 2. 2) wurde eine Standardkurve mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (1:12,5; 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400) eines cDNA-Pools erstellt. Die Steigung gibt Auskunft über die Effizienz der Amplifikationsreaktion. Gemäß der Standardkurve wurde die je nach Gen unterschiedlich verwendete cDNA-Verdünnung festgelegt (meist 1:25 – 1:200). Die cDNA-Verdünnung zur Expressionswert-Ermittlung des Haushaltgens betrug 1:50 für β 2-Mikroglobulin. Die entsprechenden Standardkurvengleichungen wurden zur Berechnung der relativen Expressionswerte verwendet. Des Weiteren wurden die Expressionswerte als Dreifachbestimmung für jede Probe erhoben. In Tab. 3. 7 ist der 1x Ansatz für eine Reaktion aufgelistet.

Tab. 3. 7: 1x real-time PCR-Ansatz.

real-time PCR-Ansatz	Volumen, Molarität
SYBR® Green Mastermix	12,5 μ L
Je Primer	300 nM
H ₂ O (DNase / RNase frei)	6 μ L
Template *	5 μ L
Σ	25 μ L

* Die cDNA wurde entsprechend des zu untersuchendes Gens unterschiedlich verdünnt.

Programm der real-time PCR

1. Hotstart 95 °C, 15min
 2. Denaturierung 95 °C, 15 sec
 3. Annealing/Extension 60 °C, 1 min
- } 40x

Programm der Schmelzkurvenanalyse

1. 95 °C, 15 sec
2. 60 °C, 30 sec
3. 95 °C, 15 sec

Die Auswertung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Umrechnung der Messwerte in durchschnittliche, relative Mengeneinheiten anhand der entsprechenden Standardkurve.
2. Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen von 1.
3. Normalisierung der durchschnittlichen relativen Mengeneinheit einer Genexpression gegen die durchschnittliche relative Mengeneinheit der endogenen Kontrolle (Haushaltsgen) einer Probe.
4. Errechnung der weiterführenden Standardabweichung gemäß statistischer Verfahren [230].
5. Die normalisierten Genexpressionsdaten eines Versuches wurden dann in Relation zu der normalisierten Genexpression unbehandelter Kontrollzellen (Kalibrator) gesetzt.

3.4.6 Isolierung von Vektor-DNA

Vektor-DNA wurde aus einer Plasmidpräparation aus Bakterien einer Übernachtskultur isoliert. Hierfür wurde das „Pure Yield™ Plasmid Midiprep System“ verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt.

3.4.7 Restriktionsverdau und Ligation von Vektor-DNA

Die Ausgangsvektoren für die Klonierung wurden freundlicherweise von Dr. Marie-Sophie Hiet (Hygieneinstitut, Abteilung „Molekulare Virologie“, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Ausgangsvektoren pAPMshADRP.1, pAPMshADRP.2, pAPMshTIP47.A und pAPMshTIP47.C unterschieden sich nur in der spezifischen shRNA-Sequenz der miR-Kassette (Tab. 2. 4). Ziel der Klonierung war es, die Puromycin-Resistenz gegen eine Hygromycin B-Resistenz aller Ausgangsvektoren auszutauschen. Der Vektor für die Negativkontrolle pAHMNT besaß die gewünschte Hygromycin B-Resistenz, welche sich an gleicher Position der Puromycin-Resistenz der Ausgangsvektoren befand.

1 µg Vektor-DNA wurden mit 1-10 U Enzym (NotI / XbaI) in einem Reaktionsvolumen von 50 µL verdaut. Die Bedingungen des Verdaus, wie Puffer, Inkubationszeit und Temperatur wurden gemäß den Herstellerangaben der verwendeten Enzyme (Fermentas) durchgeführt. Typischerweise dauerte der Restriktionsverdau 1-2 h bei 37 °C. Durch den NotI / XbaI Verdau wurde die Puromycin-Resistenz aus den Ausgangsvektoren bzw. die Hygromycin B-Resistenz aus dem Vektor pAHMNT geschnitten. Nach dem

Restriktionsverdau diente eine präparative Agarose-Gelelektrophorese zur Isolierung geschnittener DNA. Die entsprechenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up“ Kits nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel aufgereinigt.

Nun wurde die Hygromycin B-Resistenz (Insert) in die Ausgangsvektoren ligiert, wobei 50 ng Vektor (= 0,01 pmol) und 24 ng Insert (= 0,03 pmol) verwendet wurden. Die Ligation wurde mit der T4-DNA-Ligase in einem Endvolumen von 15 µL mit 1 U 1 h bei RT durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten hierbei ein Ligationsansatz ohne Ligase und ein Ligationsansatz ohne Insert. Nach der einstündigen Inkubation wurden 7,5 µL der Ansätze in kompetente *E.coli* transformiert (Abschnitt 3.2.1) und mittels Kolonie-PCR, Testverdau mit XbaI / XhoI und DNA-Sequenzierung auf ihre Richtigkeit kontrolliert (Abschnitte 3.4.8 und 3.4.9).

3.4.8 Kolonie-PCR

Mittels der Kolonie-PCR wurden Einzelkolonien nach der Transformation auf die Richtigkeit des Inserts im Vektor überprüft. Es wurden 8-10 Kolonien pro Vektor überprüft. Die Primer wurden so gewählt, dass sie das neue Insert einschlossen (Tab. 2. 3). Kolonien wurden mit einer weißen sterilen Pipettenspitze punktiert und die Spitze in 10 µL DNase / RNase-freiem Wasser ausgespült. Nach Durchmischung der Proben, wurden sie 10 min bei 95 °C erhitzt, erneut gemischt und auf Eis abgekühlt. Danach wurden sie 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und 2 µL des Überstandes in der Kolonie-PCR eingesetzt (Tab. 3. 8). Parallel dazu wurden alle getesteten Kolonien auf eine Meisterplatte (LB-Agarplatte mit Ampicillin) übertragen.

Tab. 3. 8: Kolonie-PCR-Ansatz.

PCR-Ansatz	Volumen
DNA-Template aus Einzelkolonie	2 µL
10x KCl Puffer	5 µL
25 mM MgCl ₂	3 µL
10 µM dNTP	1 µL
10 µM Vorwärts-Primer	3 µL
10 µM Rückwärts-Primer	3 µL
5 U / µL Taq-Polymerase	0,2 µL
H ₂ O (DNase / RNase frei)	32,8 µL
Σ	50 µL

Die Kolonie-PCR wurde in einem Thermocycler (Biozym, Oldenburg) wie folgt durchgeführt:

1. Denaturierung 98 °C, 30 sec
 2. Denaturierung 98 °C, 30 sec
 3. Annealing 54 °C, 30 sec
 4. Extension 72 °C, 30 sec
 5. Extension 72 °C, 30 sec
- } 30x

3.4.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte über die Firma SeqLab (Göttingen). Es wurden 700 ng DNA und 7 µL Primer (10 µM, Tab. 2. 3) in ein Endvolumen von 7 µL pipettiert. Das entstehende Differenzvolumen wurde mit DNase / RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

3.4.10 Agarose-Gelelektrophorese

Eine Agarose-Gelelektrophorese wurde zur qualitativen Überprüfung oder zur Aufreinigung von PCR-Produkten durchgeführt. Je nach PCR-Produktgröße wurden 1-2 %-ige Agarosegele mit 3 µL GelRedTM (Biotium / VWR, Darmstadt) / 150 mL 1x TAE-Puffer mit Agarose angefertigt. Die PCR-Produkte wurden vor dem Beladen mit DNA-Ladepuffer versetzt (6x Ladepuffer: 6x TAE-Puffer; 33 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Orange G). Die Spannung betrug je nach Größe des Agarosegels zwischen 80-150 V. Anschließend wurden die nach ihrer Größe aufgetrennten DNA-Fragmente mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Alpha ImagerTM digital dokumentiert. Bei präparativen Agarosegelen wurden die gewünschten DNA-Banden ausgeschnitten.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Kulturzellen und Gewebe

Für die Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturschalen wurden diese 3x mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen in Proteinisolierungspuffer aufgenommen (Kavität einer 12-Mehrlochplatte in 20 µL, einer 6-Mehrlochplatte in 30-50 µL, eine 6 cm Schale in 50-60 µL).

Proteinisolierungspuffer:

- 1x Zelllysispuffer (Cell Signaling)
- 2,5x Protease Inhibitor Mix G (SERVA)
- 1 mM DTT
- 1 mM PMSF

Mit Hilfe eines Zellkulturschabers wurden die Zellen in 1,5 mL Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min unter gelegentlichem Durchmischen auf Eis inkubiert. Nach zwei Einfrier-/Auftauzyklen in flüssigem Stickstoff und 2x 30 sec Ultraschallbad-Behandlungen wurden die Zelllysate bei 4 °C für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die Proteinextrakte bei -20 °C gelagert.

Für die Isolierung von Gesamtprotein aus kryokonserviertem Gewebe wurde dieses in 10-15 µm dicke Schnitte geschnitten. In einem 2 mL Zentrifugenröhrchen wurden ~50 mg Gewebsschnitte mit Proteinisolierungspuffer vermischt und 10 min bei 30 Hz in einer Schwingmühle mit 2-3 Metallkügelchen lysiert. Die Lysate wurden 10 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration der aufgereinigten Proteinlysate wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt. Für die Messung wurden 2,5 µL Proteinprobe mit 22,5 µL Reinstwasser (1:10 Verdünnung) und 1,25 mL 1x Bradfordlösung in einer Einwegküvette vermischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm in einem Photometer gemessen und mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden die Proteinkonzentration errechnet.

3.5.3 Diskontinuierliche Proteingelektrophorese nach Lämmli (SDS-PAGE)

Proteinlysate wurden nach Lämmli [231] in einem 10 %-igen Polyacrylamidgel, das aus einem Sammel- und einem Trenngel bestand, nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt (Tab. 3. 9). Ein 10 %-iges Trenngel wurde dabei zur Auftrennung von Proteinen über 50 kDa und ein 12 %-iges Trenngel von Proteinen unter 50 kDa verwendet. Aliquots mit gleicher Proteinmenge wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 3x Lämmli-puffer vermischt, 5 min bei 95 °C inkubiert und kurz abzentrifugiert. Die Elektrophorese wurde in 1x Laufpuffer in zwei Schritten durchgeführt: Zuerst 20-30 min

bei 70 V, dann 1-2 h bei 120 V. Ein vorgefärbter Proteinstandard (BP3603, Fisher BioReagents) diente als Größenmarker (5 μ L pro Geltasche).

Tab. 3. 9: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Prozentualitäten.

Komponenten	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Sammelgel
Acrylamid-Mix (v/v)	10 %	12 %	5 %
Tris-HCl	375 mM (pH 8,8)	375 mM (pH 8,8)	127 mM (pH 6,8)
SDS (w/v)	0,1 %	0,1 %	0,1 %
Ammoniumpersulfat (v/v)	0,1 %	0,1 %	0,1 %
TEMED (v/v)	0,04 %	0,04 %	0,01 %

3.5.4 Immunblot, Signaldetektion und densitometrische Auswertung

Die in der SDS-PAGE gemäß ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurde die Membran in Methanol 1 min aktiviert und anschließend in Boratpuffer gewaschen. Der Nassblot wurde bei 90 V / 52 cm² für 70 min in Boratpuffer durchgeführt. Das Blocken möglicher unspezifischer Bindungsstellen wurde in TBST mit 5 % (w / v) Milchpulver für 1 h bei RT in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen auf einem Rollenschüttler durchgeführt. Anschließend wurde die Blockierungslösung gegen eine frische Lösung, in der der Erstantikörper entsprechend verdünnt war, ausgetauscht. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte unter ständigem Rollen bei 4 °C ü.N. Die Membran wurde 3x für je 10 min in TBST gewaschen. Danach folgte die 1-stündige Inkubation bei RT mit dem Spezies-spezifischen HRP-gekoppeltem Zweitantikörper (1:2.000), welcher in der Blockierungslösung verdünnt wurde. Vor der Signaldetektion wurde die Membran 3x in TBST für je 5-10 min gewaschen. Die Signaldetektion mit „ECL plus Western Blotting“ oder „SuperSignal West Femto“ wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die digitale Dokumentation wurde mit Hilfe der AlphaEase[®] FC Software und des FluorChem[®] SP Systems realisiert.

Die semiquantitative densitometrische Auswertung der Intensitäten von Proteinbanden erfolgte mit dem Programm „Quantify One“ (BioRad). Für die Auswertung wurde darauf geachtet, dass keine gesättigten Signale und nur zu vergleichende Gele mit identischen Detektionsbedingungen verwendet wurden. Es wurde zunächst ein Rechteck gleicher Größe um die zu quantifizierenden Proteinbanden und in einen repräsentativen Hintergrundbereich der Membran gelegt und die Signalstärke des Hintergrundrechtecks von der Signalstärke der Proteinbanden subtrahiert. Um Abweichungen in der Auftragsmenge zu

berücksichtigen, wurden die Signalstärken der entsprechenden Aktinbanden (Ladekontrolle) analysiert und mit der Signalstärke der dazugehörigen Proteinbanden verrechnet.

$$\text{Relative Signalstärke}_{\text{Zielprotein}} = \frac{\text{Signalstärke}_{\text{Zielprotein}}}{\text{Signalstärke}_{\text{Aktin}}}$$

Für die densitometrische Auswertung von Perilipin und MLDP von *in vitro* Experimenten wurde ein künstlicher Anfangswert (= 1) gewählt, wenn keine Proteinbande bei 0 d vorhanden war.

3.5.5 Entfernen gebundener Antikörper von PVDF-Membranen („Strippen“)

Der Zweitantikörper wurde von PVDF-Membranen entfernt, um andere Antigene mit einem Antikörper einer anderen Spezies auf derselben Membran zu detektieren. Hierzu wurde die Membran 1 h in TBST gewaschen, um Rückstände der Detektionslösung vollständig zu entfernen. Danach folgte eine Inkubation der PVDF-Membran in ca. 60-70 °C warmen Strippingpuffer. Anschließend wurde die Membran 3x für je 10 min in TBST gewaschen, 1 h blockiert und dann mit einem neuen Erstantikörper inkubiert.

3.5.6 Immunpräzipitation aus Gewebslysaten

Mit einer Immunpräzipitation (IP) kann spezifisch ein Protein und dessen Interaktionspartner aus Proteinlysaten angereichert und analysiert werden. Ein Primärantikörper bindet hierbei zum einen das gewünschte Protein und zum anderen Protein A, welches wiederum an magnetischen Kügelchen (Beads, 10001D, Invitrogen) gebunden ist. Der Protein-Antikörper-Protein A-Komplex wird dann gewaschen, die gebundenen Proteine abgelöst und über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine können nun entweder mittels Immunblot oder nach Silbernitratfärbung über Massenspektrometrie analysiert werden.

Für eine IP wurden 100-120 mg 15 µm dick geschnittenes humanes Kryolebergewebe benutzt. Das Gewebe wurde in 500-600 µL RIPA-Puffer lysiert. Es wurde je 50 µL Bead-Lösung für einen Vorklärschritt (pc) für die IP verwendet. Um überschüssiges Protein A von den Beads zu entfernen, wurden diese 8 min bei RT in 500 µL 50 mM Glycin pH 2,8 inkubiert, anschließend mit PBS mit 0,02 % Tween-20 (PBST) und 3x in 50 mM Tris pH 7,5 (IP-Beads) bzw. 3x in RIPA-Puffer (pc-Beads) gewaschen. Alle Waschschritte wurden

in 500 μL Volumen auf Eis durchgeführt. Das Lysat wurde nun 3 h bei 4 °C unter Rotation mit den pc-Beads vorgeklärt, um unspezifische Bindungen in der IP zu minimieren. Gleichzeitig wurde der entsprechende Antikörper (8-10 μL) bzw. das Normalserum der Antikörperspezies (Dianova) in 150 μL 50 mM Tris pH 7,5 an die IP-Beads für 3 h bei 4 °C unter Rotation gekoppelt. Anschließend wurden die IP-Beads 2x mit 50 mM Tris pH 7,5 und 2x mit RIPA-Puffer gewaschen, das vorgeklärte Lysat (pc-ÜB) zur Hälfte mit den Antikörper-IP-Beads und zur anderen Hälfte mit den Normalserum-Kontroll-Beads über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die pc-Beads wurden ebenfalls gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit RIPA-Puffer unter Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurde der IP-Überstand (IP-ÜB) von Antikörper- und Kontroll-Beads abgenommen. Nach 5x Waschen der Beads mit je 500 μL RIPA-Puffer und 2x mit 50 mM Tris, pH 7,5 wurden die Beads in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und die gebundenen Proteine in 20 μL Glycin pH 2,8 für 8 min bei gelegentlicher Durchmischung abgelöst (IPP bzw pcP). Um die noch gebundenen Proteine abzulösen, wurden die Beads 2x mit 50 mM Tris pH 7,5 gewaschen und die Beads in 1x Laemmli-Probenpuffer bei 70 °C für 10 min abgekocht (IPPrest bzw. pcPrest). Die Proben der IP (20 μL von je pc-ÜB, pcP, IP-ÜB, IPP) wurden mit 3x Laemmli-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach folgte eine SDS-PAGE (Abschnitt 3.5.3). Proteine wurden dann entweder mittels Immunblot (Abschnitt 3.5.4) oder nicht-destruktiver Silberfärbung / Massenspektrometrie untersucht (Abschnitt 3.5.7). Für die Immunblotdetektion wurde darauf geachtet, dass der Antikörper der IP und der Antikörper des Immunblots in unterschiedlichen Spezies hergestellt wurden, damit die schweren und leichten IgG-Ketten bei 55 kDa und 30 kDa nicht mit dem Zweitantikörper des Immunblots reagierten.

Antikörper können mit Hilfe von chemischen Crosslinkern wie z.B. BS³ vor der IP an Protein A bzw. G Beads stabil gebunden werden. 50 μL magnetische Beads wurden dafür 2x in 250 μL PBST gewaschen und in 200 μL PBST aufgenommen. Der entsprechende Antikörper (5-10 μL) wurde hinzugefügt und 20 min bei RT rotiert (alternativ: 3 h bei 4 °C). Überschüssiger Antikörper wurde nach der Inkubation durch 2x Waschen in PBST entfernt. Es folgten 2 Waschschritte mit Konjugationspuffer (PBS). Die 10 mM BS³-Lösung wurde in 250 μL Konjugationspuffer zu 5 mM verdünnt und die Beads mit dieser Lösung für 30 min bei RT rotiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12,5 μL Quenchpuffer (1 M Tris pH 7,5) 15 min bei RT gestoppt. Anschließend wurden die Beads

2x in PBST gewaschen, kurz für einige Sekunden in 50 mM Glycin pH 2,8 inkubiert und 3x in PBST und 3x in RIPA-Puffer gewaschen.

3.5.7 Nicht-destruktive Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Mit Hilfe einer Silberfärbung können bereits geringste Mengen Protein in Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden silbergefärbte Proteinbanden ausgeschnitten und mit massenspektrometrischen Methoden analysiert. Hierzu wurde ein Protokoll einer nicht-destruktiven Silberfärbung, das mit der Massenspektrometrie kompatibel ist, verwendet (abgesprochen mit Dr. Martina Schnölzer (DKFZ)). Es wurde darauf geachtet, dass doppelt destilliertes Wasser und sehr saubere Färbebehältnissen benutzt wurden. Alle Lösungen wurden stets frisch angesetzt und die Färbung auf einem Wankelschüttler durchgeführt. Pro Gel wurden jeweils 100 mL Lösung verwendet. Das zu färbende Polyacrylamidgel wurde über Nacht in der Fixierlösung inkubiert, wobei diese nach den ersten 30 min gewechselt wurde. Am darauf folgenden Tag wurde das Gel 45 min in der Sensibilisierungslösung geschwenkt und anschließend 6x 10 min in doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Die Inkubation mit der Silbernitratlösung wurde für 1 h im Dunkeln durchgeführt. Danach wurde das Gel für maximal 15 sec in destilliertes Wasser getaucht, um es dann in die Entwicklungslösung für 8-15 min zu transferieren. Die Entwicklung wurde mit der Stopplösung gestoppt (45 min). Schlussendlich folgten 2x 30 min Waschschrte in destilliertem Wasser und die gefärbten Gele wurden dann bei 4 °C in Wasser für wenige Tage gelagert. Die silbergefärbten Proteine wurden für weitere Analysen von Dr. Martina Schnölzer der „Core Facility Proteinanalysis W120“ des DKFZs prozessiert (Abschnitt 3.5.8).

Fixierungslösung	30 % (v/v) Ethanol
	10 % (v/v) Eisessig
Sensibilisierung- Lösung	0,3 % (w/v) Kaliumtetrathionat
	0,5 M Kaliumacetat
	30 % (v/v) Ethanol

Silbernitrat-Lösung	0,2 % (w/v) Silbernitrat
Entwicklungslösung	220 mM Kaliumcarbonat 12,5 µL einer frischen 10 % (w/v) Natriumthiosulfatpentahydrat-Lösung 30 µL 37 % Formalin (kurz vor Gebrauch hinzu)
Stopp-Lösung	330 mM Tris 2 % (v/v) Eisessig

3.5.8 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Proteine können enzymatisch in definierte Peptide gespalten werden. Die häufig verwendete Endopeptidase Trypsin spaltet Proteine spezifisch an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Argininresten, wodurch ein für das Protein spezifisches Peptidgemisch entsteht. Bei Verwendung komplexer Proteingemische aus Proteinbanden eines silbergefärbten 1D-Polyacrylamidgels, wurden die Peptidgemische zuerst über eine Flüssigkeitschromatografie („*Ultra Pressure Liquid Chromatography*“, UPLC) aufgetrennt. Daraufhin wurden die Peptide mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) [232] ionisiert und in einer linearen Ionenfalle (LTQ) entsprechend ihres Masse / Ladungs-Verhältnis (m/z) gespeichert. Ausgewählte Peptidionen können zur zweiten nachfolgenden Ionenfalle („*Orbitrap*“), mit oder ohne vorherige Fragmentierung, geschleust werden, um dort MS- oder MS / MS-Spektren zu erzeugen, die in einer Datenbank abgeglichen wurden (3.5.8.2). Zusätzlich erstellte MS / MS-Spektren von fragmentierten Peptidionen geben Aminosäuresequenzinformationen der entsprechenden Peptide und sichern unter anderem das Ergebnis des MS-Spektrums ab. Der Verdau, die ESI-MS und Proteinidentifizierung (Abschnitt 3.5.8.1-2) wurden von Dr. Martina Schnölzer (DKFZ) durchgeführt.

3.5.8.1 Tryptischer Verdau und ESI-MS

Die aus dem 1D-Gel ausgeschnittenen silbergefärbten Proteinbanden wurden mit 10 mM DTT bei 56 °C für 1 h erhitzt und freie Sulfhydrylreste der Cysteine mit 55 mM Jodacetamid bei RT in 30 min zu Carbamidomethyl modifiziert. Danach wurden die Gelstücke in 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat und Ethanol gewaschen und anschließend 5 min in reinem Acetonitril inkubiert. Die getrockneten Gelstücke wurden mit 40 mM Ammoniumcarbonatlösung mit 100 ng Trypsin (Promega) rehydriert und die

Proteine ü.N. bei 37 °C verdaut. Die Extrakte mit 0,1 % Trifluoressigsäure in 50 % Acetonitril und mit 0,1 % Trifluoressigsäure in 100 % Acetonitril wurden gesammelt und in einem Konzentrator für 2 h bei 37 °C getrocknet. Die Peptide wurden in 5 µL 0,1 % Trifluoressigsäure für 15 min in einem Ultraschallbad resuspendiert und in einer C18-Säule (180 µm x 20 mm, Partikelgröße 5 µm) einer „nanoAcquity UPLC“ (Waters GmbH, Eschborn) gefangen. Die Säulenchromatografie wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 400 nL / min auf einer BEH 130 C18 Säule (100 µm x 100 µm, Partikelgröße 1,7 µm, Waters GmbH) bei folgenden Gradienten durchgeführt (Lösung A bestehend aus 98,9 % Wasser, 1 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure und wurde durch Lösung B bestehend aus 99,9 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure ersetzt): 1 min 0-4 % B; 40 min 4-40 % B; 5 min 40-60% B; 0,1 min 60-85 % B; 6 min 85 % B; 0,1 min 85-0 %; 9 min 0 % B. Die nanoAcquity UPLC war an das Massenspektrometer „LTQ Orbitrap XL“ (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt. Daten wurden durch Scanzyklen eines Scans mit einer Auflösung von 60.000 bei 400 m / z und einer Breite von 370-2.000 m / z parallel zu 6 MS / MS-Scans in der Ionenfalle der am meisten vorkommenden Ionen ermittelt.

3.5.8.2 Proteinidentifizierung

Die Datenbanksuche mit den ermittelten m / z-Verhältnissen der Peptide eines Proteins in der „NCBIInr“-Datenbank (Veröffentlichungen 3.11.2010, 30.3.2011, 31.7.2011) mit Hilfe der Mascot-Software (Version 2.2), entwickelt von Matrix Science (London, UK), diente zur Identifizierung der Proteine. Die Taxonomie wurde auf die Säugetierklasse begrenzt, die Peptidmassentoleranz auf 0,4 Da festgelegt und eine fehlende Schnittstelle zugelassen. Carbamidomethyl wurde als feste Cystein-Modifikation, die variable Oxidation von Methionin sowie die Desaminierung von Asparagin und Glutamin berücksichtigt. Für einige Proteinbanden wurde die Suche auf phosphorylierte Serin-, Tyrosin- oder Threoninreste ausgeweitet. Mascot vergleicht die experimentell ermittelten Massenspektren mit theoretischen Massenspektren der Datenbank und errechnet einen „Score“, der die Übereinstimmung beider Spektren angibt. Proteine wurden als identifiziert anerkannt, wenn mehr als ein Peptid einen individuellen Score über dem Mascot-Schwellenwert besaß.

3.6 Triacylglycerid-Bestimmung

3.6.1 Vorbereitung der Proben

25-30 mg kryokonserviertes humanes Lebergewebe wurden in 500 μ L PBS mit 2 mM EDTA lysiert (Abschnitt 3.5.1). Kultivierte Zellen aus 6-Mehrlochplatten wurden 2x mit kaltem PBS gewaschen und mit 500 μ L PBS / EDTA in ein 1,5 mL Zentrifugationsröhrchen transferiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Ultraschallsonde aufgeschlossen (Amplitude 15, 2x 20 sec, dazwischen 1 min auf Eis). Unlösliche Bestandteile wurden kurz abzentrifugiert (15 sec, 14.000 g). Für die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Nanodrop wurden je 2,5 μ L des Überstandes entnommen.

3.6.2 Lipidextraktion nach Bligh&Dyer

350 μ L des Lysates wurden in ein 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 1330 μ L Methanol / Chloroform (2:1) für 1 min gemischt [233]. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden 437,5 μ L Chloroform addiert und die Probe erneut 1 min gut gemischt. Danach wurden 437,5 μ L doppelt destilliertes Wasser für 1 min mit der Probe gut vermischt. Zur Phasenbildung wurde eine Zentrifugation bei 1.000 rpm bei RT für 5 min durchgeführt. Es entstand eine wässrige obere, eine milchige Inter- und eine organische untere Phase, in der die Fette gelöst waren. 700 μ L der unteren Phase wurden mit einer 1 mL Pipette entnommen. Dabei wurde ein positiver Druck beim Durchstechen der oberen und Interphase ausgeübt. Die untere Phase wurde in ein 2 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und unter Stickstoffbegasung für 20 min verdampft. Anschließend wurde das Pellet mit 100 μ L Isopropanol / 1 % Triton X-100 gelöst.

Die Bestimmung der Triacylglycerid-Konzentration erfolgte unter Zuhilfenahme der Triacylglycerid-Bestimmung-Kits. Eine Standardgerade des mitgelieferten Triacylglycerid (TAG)-Standard wurde von 2-200 μ g / mL TAG erstellt. Die Messung bei 500 nm wurde mit je 10 μ L Probe und 90 μ L aktivierter Reagenz in einer 96-Mehrlochplatte nach 15-20-minütiger Inkubation bei RT durchgeführt. Die Proben wurden in Triplikaten gemessen und auf 1 mg Protein der Probe bezogen.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der Perilipin / PAT-Proteinexpression *in situ* und *in vitro*

4.1.1 Differentielle PAT-Proteinexpression in Lebern unterschiedlichen Steatosegrades

In Voruntersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass bei humaner Leberparenchymverfettung *in situ* Adipophilin, TIP47 und *de novo* Perilipin in Hepatozyten vorkommen und differentiell exprimiert werden [63]. In dieser Arbeit wurde nun das bestehende Kollektiv erweitert und über 30 Kryoproben humanen Lebergewebes mit unterschiedlich stark ausgeprägter Parenchymverfettung mit mikroskopischen, proteinbiochemischen und molekularbiologischen Methoden hinsichtlich der PAT-Proteinexpression und deren Regulation untersucht. Perilipin- und Adipophilin-positive Lipidtropfen mikrovesikulär verfetteter Hepatozyten waren in Richtung des basolateralen Zellpols verteilt (siehe Anhang Abb. 8. 4). TIP47 und MLDP waren, passend zu ihrer beschriebenen Lokalisation, um winzige Lipidtropfen angelagert und zytoplasmatisch nachweisbar. In stark verfetteten humanen Hepatozyten mit vorwiegend makrovesikulärer Steatose lokalisierten Perilipin und Adipophilin um mittelgroße bis große und gelegentlich MLDP um mittelgroße Lipidtropfen. Perilipin-positive Lipidtropfen waren vorwiegend perizentral (Zone 3 des Leberläppchens) vorhanden, wie bereits beschrieben. Zur Frage einer Kolo-kalisation bzw. differentiellen Lokalisation der PAT-Proteine an Lipidtropfen, wurden Mehrfachimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Adipophilin und Perilipin wiesen eine Kolo-kalisation an einzelnen, als auch eine differentielle Expression an anderen Lipidtropfen auf. MLDP kolo-kalisierte mit Perilipin und / oder Adipophilin, jedoch nur sehr selten mit TIP47. TIP47 in HSCs kolo-kalisierte mit Adipophilin (Abb. 4. 1).

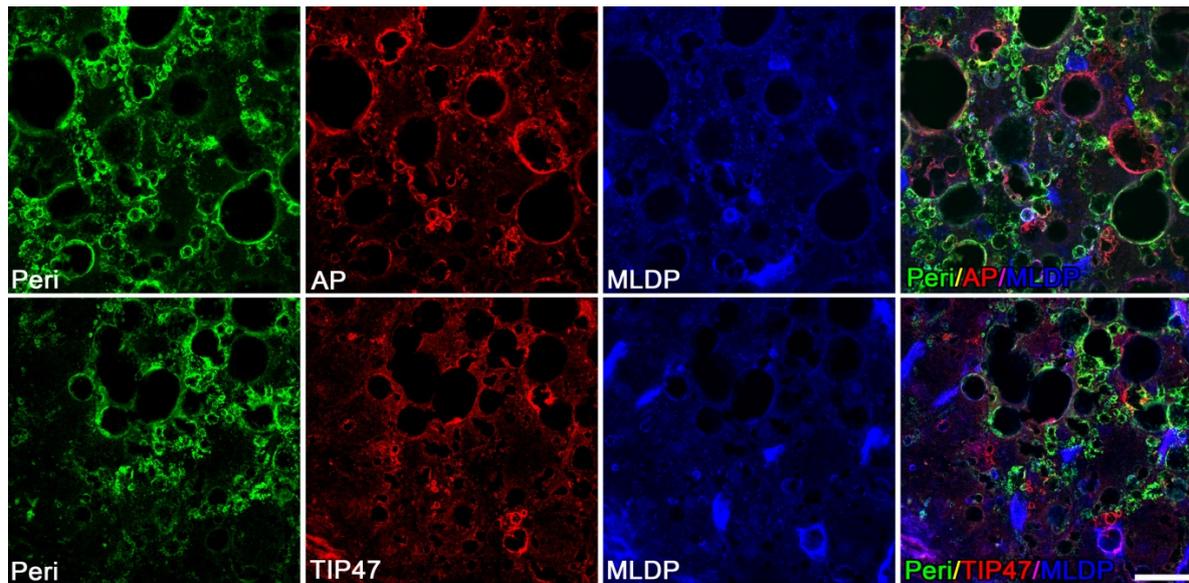


Abb. 4. 1: Konfokale Laser-Scanning-Immunfluoreszenzmikroskopie von PAT-Proteinen in humaner Leberparenchymverfettung. Perilipin (Peri, grün), Adipophilin (AP, rot), MLDP (blau) und TIP47 (rot) zeigen ein differentielles Verteilungsmuster an Lipidtröpfchen. Kolokalisation von Perilipin und Adipophilin (gelbe Mischfarbe) mit gelegentlich MLDP (weiße Mischfarbe) an Lipidtröpfchen sind nachzuweisen, jedoch nur vereinzelt Kolokalisation von MLDP mit TIP47 (pinkfarbene Mischfarbe). Messbalken: 25µm.

Die Triacylglycerid (TAG)-Konzentrationen der 31 humanen Lebern wurde bestimmt und diese entsprechend ihres TAG-Gehalts für weitere Analysen geordnet (Abb. 4. 2A). Nachfolgend wurden Immunblot-Analysen mit Antikörpern gegen die PAT-Proteine Perilipin, Adipophilin (~55 kDa), TIP47 (~47 kDa) und MLDP (~56 kDa) und gegen die bereits in der Literatur bekannten Haupttranskriptionsfaktoren des Lipidmetabolismus PPAR α (~55 kDa, [234]), PPAR γ (~57 kDa Isoform 2, [137]), sowie SREBP1 (~60-70 kDa, [235]) durchgeführt (Abb. 4. 2B). Es wurde ein monoklonaler Antikörper (Progen) gegen ein Epitop am N-Terminus von Perilipin verwendet, welcher 3 Proteinbanden verschiedener Größen in den Lebergewebelysaten detektierte, die gemäß Lu und Koautoren [50] am ehesten Perilipin A, B und C (~68 kDa, ~52 kDa und ~36 kDa) entsprachen. Die Größen der Proteinbanden stimmten mit den beschriebenen Isoformen des humanen Fettgewebes überein (siehe Anhang Abb. 8. 5). Die beiden niedrigeren Banden (Perilipin B und C) wurden nur in Zusammenhang mit einer starken Expression von Perilipin A (~68 kDa) beobachtet. Die detektierten Perilipin-Banden wurden nach Immunpräzipitation in parallel durchgeführten silbergefärbten SDS-PAGE zusätzlich massenspektrometrisch analysiert und die Proben zur Frage der Isoform-Expression auf mRNA-Ebene untersucht (vgl. hierzu Abschnitt 4.1.2). Zusätzlich wurde ein Antikörper, der die phosphorylierte

Form von Perilipin A an Serin 522 erkennt, verwendet. Die Menge an Phospho-Perilipin korrelierte positiv mit der detektierten Perilipin A-Menge im Immunblot.

Um die detektierte Proteinmenge untereinander vergleichen zu können, wurden densitometrische Analysen durchgeführt und diese mit den entsprechenden Aktin-Ladekontrollen verrechnet (Abb. 4. 3A). Anschließend wurde der prozentuale Anteil der densitometrischen Werte für das jeweilig untersuchte Protein ermittelt, indem die Summe der Werte von Lebern mit einer geringen Verfettung und denjenigen mit einer mittleren bis hohen Verfettung dem Gesamtwert gegenüber gestellt wurden (Abb. 4. 3B). Die PAT-Proteine Perilipin, Adipophilin und MLDP, sowie PPAR γ und SREBP1 zeigten jeweils eine positive Tendenz mit dem Grad der Verfettung der Hepatozyten. Im Gegensatz dazu zeigten TIP47 (60,4 % zu 39,6 %) und PPAR α (53,5 % zu 46,5 %) tendenziell eine höhere Expression in Lebern mit geringerem Verfettungsgrad.

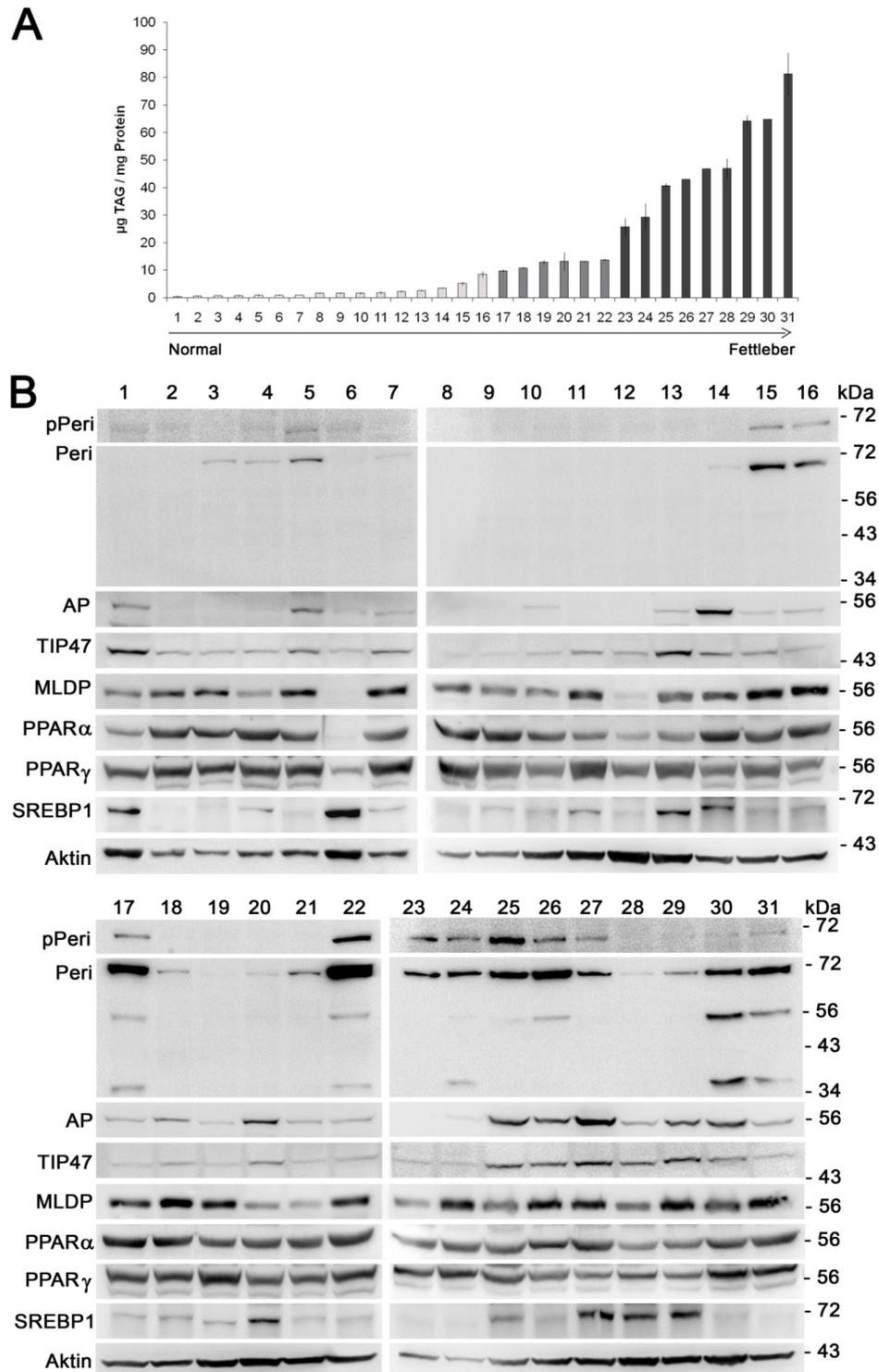


Abb. 4. 2: Immunblot-Analyse von PAT-Proteinen in menschlichen Lebergewebelysaten. A) Gesamtzelllysate von Leberproben (1-31) wurden nach aufsteigender TAG-Konzentration ($\mu\text{g TAG} / \text{mg Protein}$) aufgetragen. B) Antikörper gegen phosphoryliertes Perilipin (pPeri, Serin 522), Perilipin (Peri, $\sim 68 \text{ kDa}$, $\sim 52 \text{ kDa}$, $\sim 36 \text{ kDa}$), Adipophilin (AP, $\sim 55 \text{ kDa}$), TIP47 ($\sim 47 \text{ kDa}$), MLDP ($\sim 56 \text{ kDa}$), PPAR α ($\sim 55 \text{ kDa}$), PPAR γ ($\sim 57 \text{ kDa}$) und SREBP1 ($\sim 60\text{-}70 \text{ kDa}$) reagierten mit Proteinbanden in entsprechenden Höhen auf Immunblots. Jeweils $120 \mu\text{g}$ Protein pro Spur wurde aufgetragen (vgl. hierzu Aktin ($\sim 42 \text{ kDa}$)). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite angegeben.

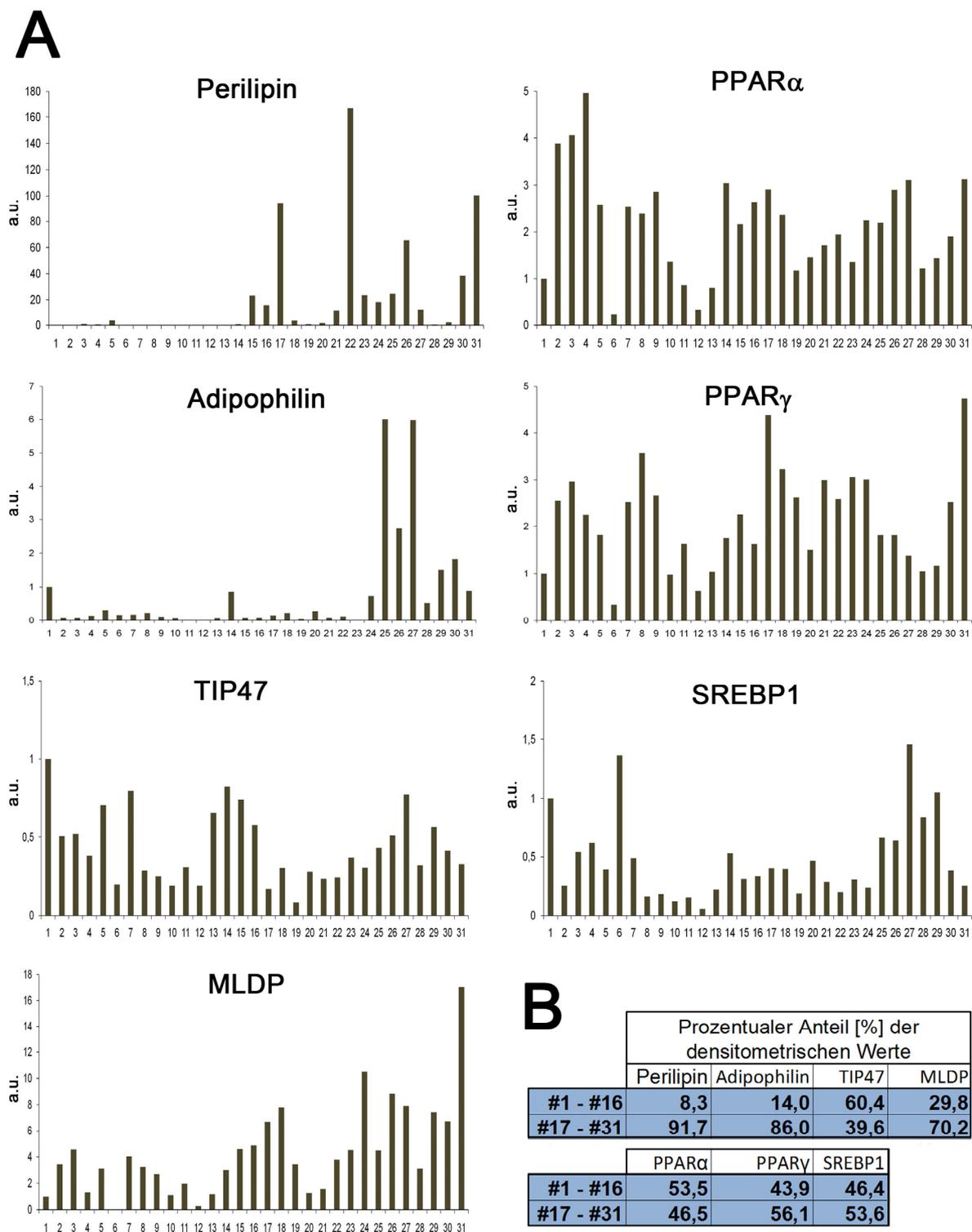


Abb. 4. 3: Densitometrische Auswertung der Immunblots von Abb. 4. 2. A) Für Perilipin wurden die 3 Perilipin-Isoform-Banden summiert. Werte wurden mit entsprechenden Aktinen verrechnet und auf Leberprobe Nr. 1 normalisiert (für Perilipin Leberprobe Nr. 3). B) Der prozentuale Anteil der densitometrischen Werte der analysierten Proteine wurde von Leberproben mit geringer (Nr. 1-16) und mittlerer bis hoher (Nr. 17-31) Verfettung ermittelt (bzgl. Nummerierung siehe Abb. 4. 2A). Abk.: a.u.: willkürliche Einheit.

Der Zusammenhang zwischen PAT-Proteinmenge und PAT mRNA-Expression wurde anhand einer kleineren Auswahl an Leberproben untersucht. Die mRNA-Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Leberprobe Nr. 10 mit der geringsten Verfettung normalisiert. Die PAT mRNA-Expression korrelierte partiell mit der entsprechenden Proteinmenge (Abb. 4. 4). Beispielsweise stimmten die relative Perilipin mRNA-Expression der Leberproben Nr. 25, 27, 30 und 31 mit den analysierten Proteinbanden in Abb. 4. 2B überein. Vergleicht man jedoch Proben Nr. 23 und 24 miteinander, so zeigten diese sehr unterschiedliche mRNA-Expressionen in Bezug zur Perilipin-Proteinmenge. Da die verwendeten Primer der real-time PCR alle Perilipin-Isoformen erkannten, wurde in der densitometrischen Analyse die Summe aller 3 detektierten Perilipin-Banden einbezogen. Lebern Nr. 25 und 27 zeigten in Übereinstimmung mit dem Proteingehalt die höchste Adipophilin mRNA-Expression innerhalb der untersuchten Proben. Im Gegensatz dazu reflektierte die Adipophilin mRNA der Probe Nr. 31 nicht die relativ hohe Proteinmenge. Die Tendenz einer höheren Proteinmenge von TIP47 in gering verfetteten Leberproben gegenüber den Fettlebern und *vice versa* für MLDP korrelierte nicht mit der mRNA-Expression (Abb. 4. 3A, Abb. 4. 4). Allgemein betrachtet wies die mRNA-Expression der cPATs Perilipin und Adipophilin größere Schwankungen auf, als die mRNA-Expression der ePATs TIP47 und MLDP. Die mRNA-Expression für PPAR α und PPAR γ zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Proben. Interessanterweise korrelierte jedoch die höhere PPAR γ 2 mRNA-Expression der Leberproben Nr. 15, 24, 30 und 31 mit der relativen Perilipin mRNA-Expression. Die SREBP1c mRNA-Expression korrelierte positiv mit Leberparenchymverfettung.

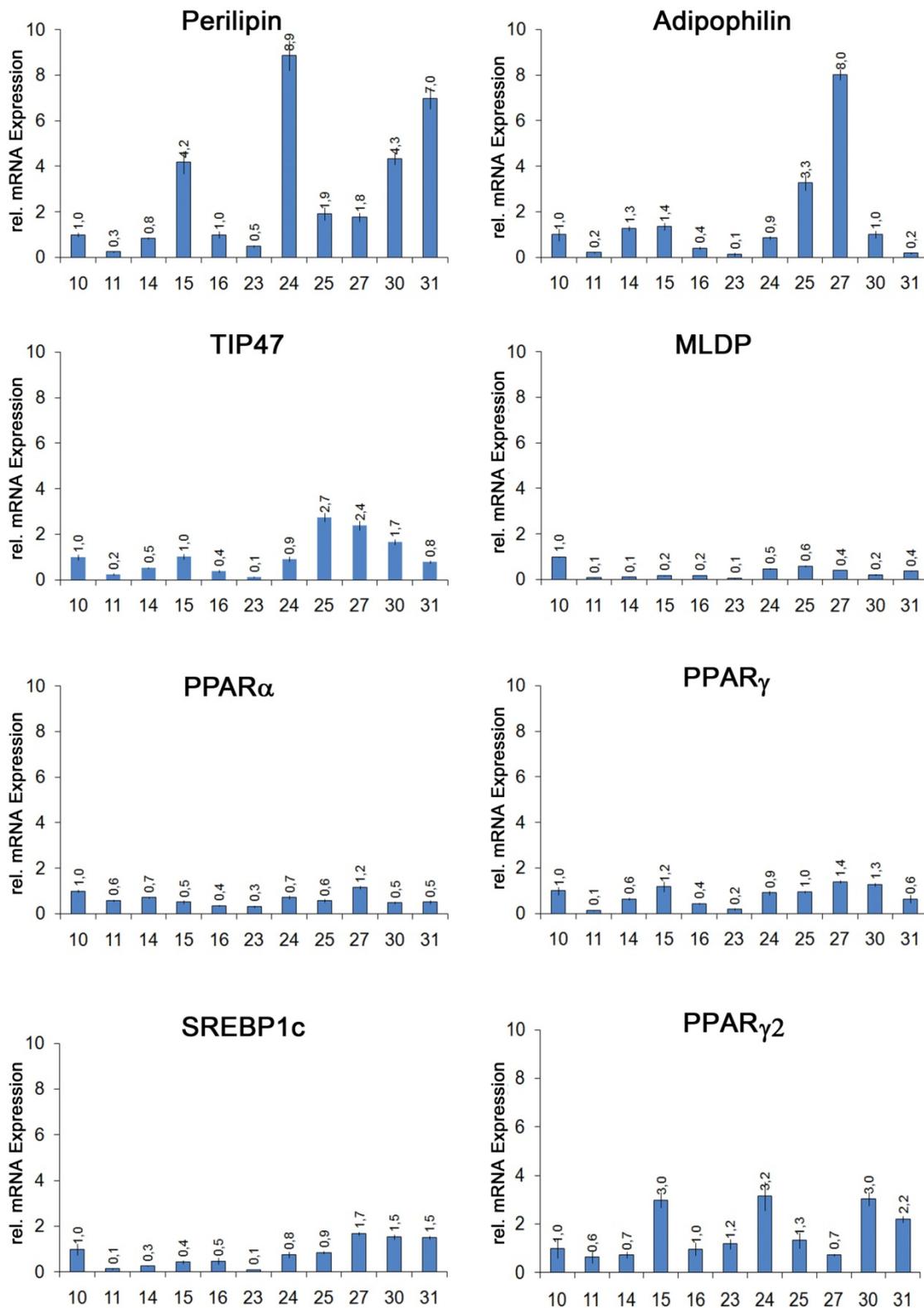


Abb. 4. 4: Semiquantitative real-time PCR von PAT- und Transkriptionsfaktoren-mRNAs in menschlichen Leberproben. Ermittelte mRNA-Expressionen wurden auf die entsprechende mRNA-Expression von Leber Nr. 10 (mit dem geringsten TAG-Gehalt) normalisiert (bzgl. Nummerierung siehe Abb. 4. 2A).

4.1.2 Analyse des Vorliegens von Perilipin-Spleißvarianten und -Modifikationen

In Adipozyten wird die Lipolyse durch die Phosphorylierung mehrerer Serine von Perilipin reguliert [44, 141]. Aus Arbeiten in murinen Adipozyten, davon abgeleiteten Zelllinien (3T3-L1) und steroidogenen Zellen ist bekannt, dass es mindestens 3 Isoformen von Perilipin gibt, welche C-terminal verkürzt sind (siehe Abschnitt 1.2.1.1, [50]). Da Untersuchungen zu Perilipin-Spleißvarianten und Modifikationen in humanen Lebern fehlen, haben wir unser Leberkollektiv daraufhin gehend mittels Immunblot, Immunfluoreszenzmikroskopie und Massenspektrometrie untersucht [1].

4.1.2.1 Phospho-Perilipin

Mit Antikörpern, die die phosphorylierte Form an Serin 522 von humanem Perilipin erkennen, war im Immunblot eine schwache Bande in allen Perilipin-positiven Leberproben nachweisbar (Abb. 4. 2B). In Doppelimmunfluoreszenzfärbungen verschiedener humaner Leberproben (Nr. 15, 22, 23) kolokalisierte Phospho-Perilipin vollständig mit Perilipin (Abb. 4. 5). Mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie von Dr. Martina Schnölzer (DKFZ) konnten Phosphorylierungen an Serin 130 und 382 festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.1.4.1).

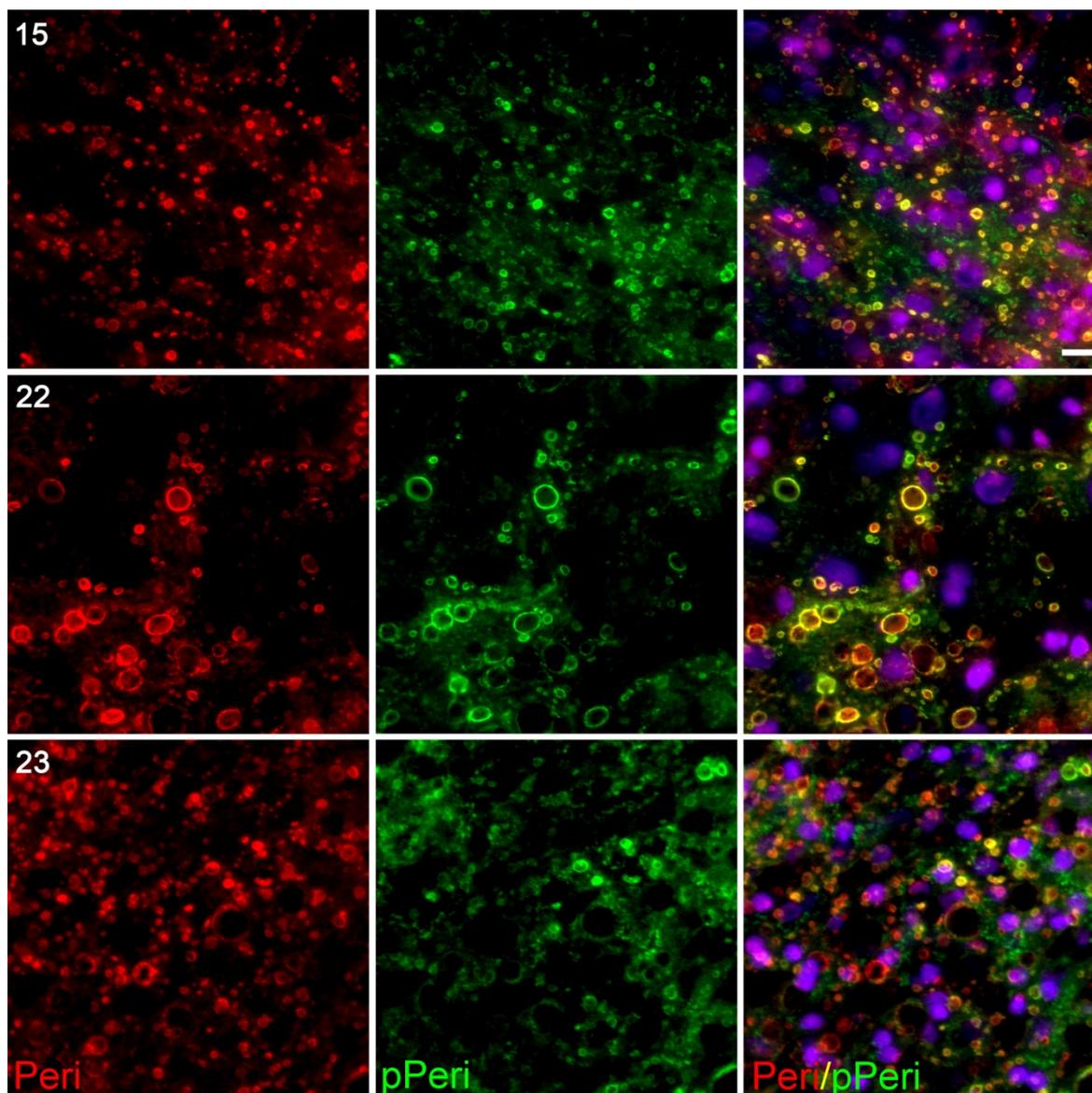


Abb. 4. 5: Phosphoryliertes Perilipin (Serin 522) kolokalisiert vollständig mit Perilipin in humanem Lebergewebe. Die Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie zeigt Positivität von Phospho-Perilipin (pPeri, grün) an Perilipin-positiven Lipidtröpfchen (Peri rot; gelbe Mischfarbe) und nur wenige ausschließlich Perilipin-positiv Lipidtröpfchen (bzgl. Nummerierung siehe Abb. 4. 1A). Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Messbalken: 20 μm .

4.1.2.2 Untersuchung von Perilipin-Spleißvarianten mittels PCR

Immunblot-Untersuchungen mit Perilipin-Antikörpern zeigten 3 Perilipin-Banden in humanem Lebergewebe (Abb. 4. 2A). Weiterführend wurden die Isoformen von Perilipin unter Verwendung bereits bekannter Primer in cDNA-Lysaten von Lebergewebe und weißem Fettgewebe untersucht [63]. Es wurden alle 3 Perilipin-Isoformen in humanem Lebergewebe und weißem Fettgewebe nachwiesen (Abb. 4. 6). Die Banden auf dem

Agarosegel entsprachen den erwarteten Größen: Perilipin A - 687 bp, Perilipin B - 497 bp, Perilipin C - 374 bp. In weißem Fettgewebe waren Perilipin B und C im Gegensatz zu Perilipin A nur sehr gering vorhanden. Die Leberproben Nr. 22, 24, 30 und 31 zeigten im Immunblot je 3 Proteinbanden bei ~68 kDa, ~52 kDa und ~36 kDa (Abb. 4. 2B). In Übereinstimmung konnten die mRNAs von Perilipin A, B und C in diesen Lebern nachgewiesen werden (Ausnahme Nr. 30, Peri C). Die 3 mRNAs für Perilipine A-C waren auch in Nr. 15 nachweisbar, wohingegen auf Proteinebene nur Perilipin A und B detektiert werden konnten. Die Leberproben Nr. 2 und 11 zeigten positive Signale für Perilipin B und C mittels PCR, waren jedoch negativ für Perilipin im Immunblot, passend zur besseren Sensitivität der cDNA-Amplifikation mittels PCR.

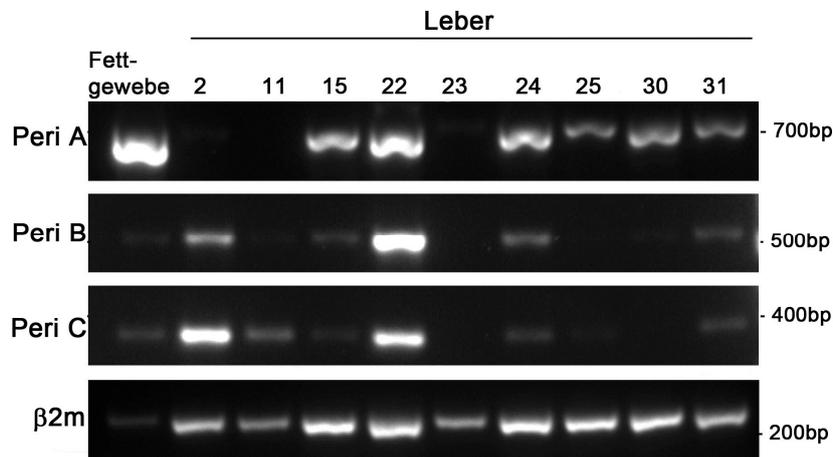


Abb. 4. 6: PCR-Analyse von Perilipin-Isoformen in humanem Leber- und weißem Fettgewebe. Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate mit Primern für Perilipin (Peri) A (687 bp), Peri B (497 bp) und Peri C (374 bp). β-2-Mikroglobulin (β2m) diente zur Ladekontrolle (bzgl. Nummerierung siehe Abb. 4. 1A). Die DNA-Marker-Referenz ist auf der rechten Seite angegeben. Abk.: bp: Basenpaare.

4.1.2.3 Untersuchung der Spleißvarianten mittels Immunpräzipitation und Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie

Um die Perilipin-Spleißvarianten auf Proteinebene zu verifizieren, wurden diese mittels Immunpräzipitation (IP) aus einem Leberlysat angereichert. Hierzu wurde ein N-terminaler panPerilipin-Antikörper (polyklonal, aus Kaninchen, Atlas Antibodies) verwendet. Der Immunblot des Immunpräzipitats zeigte mehrere Perilipin-spezifische Banden von ~68 kDa bis 25 kDa, während die Kontroll-IP mit Kaninchen-Normalserum (NS) keine Banden aufwies (Abb. 4. 7A). Um die Banden massenspektrometrisch analysieren zu können, wurde die IP-Fraktion in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit einer für

die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) kompatiblen Silberfärbung gefärbt (Abb. 4. 7B).

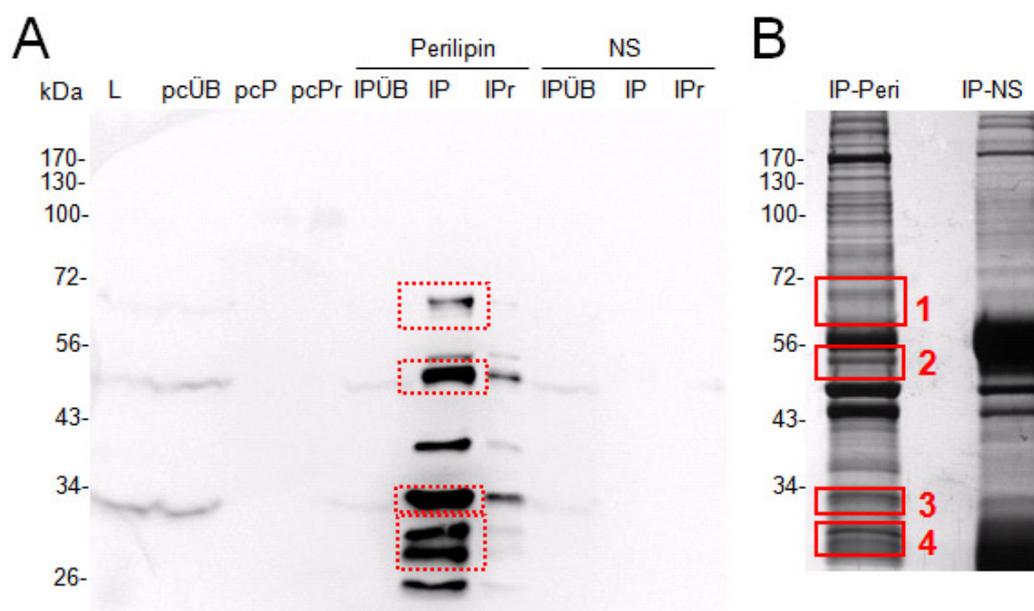


Abb. 4. 7: Immunpräzipitation (IP) von Perilipin mit Immunblot (A) und korrespondierender Silberfärbung (B). A) Immunblot (mit monoklonalem Mausantikörper) der IP-Fractionen von panPerilipin (Peri) mit mehreren Banden zwischen ~68 kDa und ~25 kDa. B) Silberfärbung der IP-Fractionen. Molekulargewichtsmarker sind auf der linken Seite angegeben. Abk.: NS: Normalserum, L: Lysat, pc: Vorklärschritt, ÜB: Überstand, P: Sediment, Pr: Sedimentrest nach nochmaligem Aufschluss.

Banden, die ausschließlich im Perilipin-Immunpräzipitat und nicht im Kontroll-Präzipitat nachweisbar waren (rot umrandet in Abb. 4. 7B), die den Bandengrößen des Immunblots entsprachen (rot gestrichelt umrandet in Abb. 4. 7A), und ein zusätzlicher Bereich zwischen 27-30 kDa wurden mittels ESI-MS von Dr. Martina Schnölzer (DKFZ) untersucht. Für Probe 1 konnten Peptide über die gesamte Perilipin A-Proteinsequenz nachgewiesen werden (Abb. 4. 8). Damit konnten wir nochmals sichern, dass es sich um Volle-Länge Perilipin in humaner Leber handelt und nicht um eine leberspezifische Perilipin-Variante. Interessanterweise nahm die Sequenzabdeckung der Peptide von Probe 1 zu 4 C-terminal ab. Da die in der Literatur beschriebenen murinen Perilipin-Isoformen ebenfalls C-terminal verkürzt sind [50], unterstützt dieses Ergebnis zusammen mit den detektierten Perilipin-Proteinbanden das Vorhandensein von Perilipin-Isoformen in humanem Lebergewebe.

1	1	MAV NKGLTLL	DGDLPEQENV	LQRVLQLPVV	SGTCECFQKT	YTSTKEAHPL
	51	VASVCN AYEK	GVQSASSLAA	WSMEPVVRR	STQFTAANEL	ACRGLDHLEE
	101	KIPALQYPPE	KIASSELKDTI	STRLRSARNS	ISVPIASTSD	KVLGAALAGC
	151	ELANG VARDT	AEFAANTRAG	RLASGGADLA	LGSIEKVVEY	LLPADKEESA
	201	PAPGHQQAQK	SPKAKP SLLS	RVGALTNTLS	RYTVQTMARA	LEQGHTVAMW
	251	IPGVV PLSSL	AQWGAS VAMQ	AVSRRR SEVR	VPWLH SLAAA	QEEDHEDQTD
	301	TEGED TEEEE	ELETEEN KFS	EVAAL PGPRG	LLGGVAHTLQ	KTLQTTISAV
	351	TWAP AAVLGM	AGRVL H LTPA	PAVSSTKGRA	MSLSDALKGV	TDNVVD TVVH
	401	YVPL PRLSLM	EPES EFRDID	NPPA EVERRE	AERR ASGAPS	AGPEPAPRLA
	451	QPRR SLRSAQ	SPGAP PGPGL	EDEV ATPAAP	RPGFPAVPRE	KPKRRVSDSF
	501	FRPSVMEPII	GRTHYSQLRK	KS		
2	1	MAV NKGLTLL	DGDLPEQENV	LQRVLQLPVV	SGTCECFQKT	YTSTKEAHPL
	51	VASVCN AYEK	GVQSASSLAA	WSMEPVVRR	STQFTAANEL	ACRGLDHLEE
	101	KIPALQYPPE	KIASSELKDTI	STRLRSARNS	ISVPIASTSD	KVLGAALAGC
	151	ELANG VARDT	AEFAANTRAG	RLASGGADLA	LGSIEKVVEY	LLPADKEESA
	201	PAPGHQQAQK	SPKAKP SLLS	RVGALTNTLS	RYTVQTMARA	LEQGHTVAMW
	251	IPGVV PLSSL	AQWGAS VAMQ	AVSRRR SEVR	VPWLH SLAAA	QEEDHEDQTD
	301	TEGED TEEEE	ELETEEN KFS	EVAAL PGPRG	LLGGVAHTLQ	KTLQTTISAV
	351	TWAP AAVLGM	AGRVL H LTPA	PAVSSTKGRA	MSLSDALKGV	TDNVVD TVVH
	401	YVPL PRLSLM	EPES EFRDID	NPPA EVERRE	AERR ASGAPS	AGPEPAPRLA
	451	QPRR SLRSAQ	SPGAP PGPGL	EDEV ATPAAP	RPGFPAVPRE	KPKRRVSDSF
	501	FRPSVMEPIV	GRTHYSQLRK	KS		
3	1	MAV NKGLTLL	DGDLPEQENV	LQRVLQLPVV	SGTCECFQKT	YTSTKEAHPL
	51	VASVCN AYEK	GVQSASSLAA	WSMEPVVRR	STQFTAANEL	ACRGLDHLEE
	101	KIPALQYPPE	KIASSELKDTI	STRLRSARNS	ISVPIASTSD	KVLGAALAGC
	151	ELANG VARDT	AEFAANTRAG	RLASGGADLA	LGSIEKVVEY	LLPADKEESA
	201	PAPGHQQAQK	SPKAKP SLLS	RVGALTNTLS	RYTVQTMARA	LEQGHTVAMW
	251	IPGVV PLSSL	AQWGAS VAMQ	AVSRRR SEVR	VPWLH SLAAA	QEEDHEDQTD
	301	TEGED TEEEE	ELETEEN KFS	EVAAL PGPRG	LLGGVAHTLQ	KTLQTTISAV
	351	TWAP AAVLGM	AGRVL H LTPA	PAVSSTKGRA	MSLSDALKGV	TDNVVD TVVH
	401	YVPL PRLSLM	EPES EFRDID	NPPA EVERRE	AERR ASGAPS	AGPEPAPRLA
	451	QPRR SLRSAQ	SPGAP PGPGL	EDEV ATPAAP	RPGFPAVPRE	KPKRRVSDSF
	501	FRPSVMEPIV	GRTHYSQLRK	KS		
4	1	MAV NKGLTLL	DGDLPEQENV	LQRVLQLPVV	SGTCECFQKT	YTSTKEAHPL
	51	VASVCN AYEK	GVQSASSLAA	WSMEPVVRR	STQFTAANEL	ACRGLDHLEE
	101	KIPALQYPPE	KIASSELKDTI	STRLRSARNS	ISVPIASTSD	KVLGAALAGC
	151	ELANG VARDT	AEFAANTRAG	RLASGGADLA	LGSIEKVVEY	LLPADKEESA
	201	PAPGHQQAQK	SPKAKP SLLS	RVGALTNTLS	RYTVQTMARA	LEQGHTVAMW
	251	IPGVV PLSSL	AQWGAS VAMQ	AVSRRR SEVR	VPWLH SLAAA	QEEDHEDQTD
	301	TEGED TEEEE	ELETEEN KFS	EVAAL PGPRG	LLGGVAHTLQ	KTLQTTISAV
	351	TWAP AAVLGM	AGRVL H LTPA	PAVSSTKGRA	MSLSDALKGV	TDNVVD TVVH
	401	YVPL PRLSLM	EPES EFRDID	NPPA EVERRE	AERR ASGAPS	AGPEPAPRLA
	451	QPRR SLRSAQ	SPGAP PGPGL	EDEV ATPAAP	RPGFPAVPRE	KPKRRVSDSF
	501	FRPSVMEPIV	GRTHYSQLRK	KS		

Abb. 4. 8: Sequenzabdeckung von Perilipin in der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie. Proteinproben der Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen panPerilipin aus Abb. 4. 7B wurden analysiert. Rot markiert sind Peptide, die durch die ESI-MS-Analyse in den jeweils 4 Proteinbanden gefunden wurden. Dargestellt ist jeweils das Volle-Länge Perilipin A.

4.1.3 Die Perilipin-Expression in chronischer Leberparenchymverfettung ist unabhängig von der Ätiologie

Es wurde in Vorarbeiten gezeigt, dass die PAT-Proteinexpression sich nicht bezüglich der Fettleberätiologie, wie z.B. AFLD / ASH, NAFLD / NASH und chronischer Hepatitis C (HCV) unterscheidet [63]. Da die Perilipin-Expression in einigen Fällen von mikrovesikulärer Steatose besonders niedrig war, führten wir zusätzlich weitere immunhistochemische PAT-Proteinanalysen mit Lebergewebe anderer, auch seltener Ätiologien durch. Als Positivkontrolle waren Lebergewebe mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) und chronischer Hepatitis C stark positiv für Perilipin. Zusätzlich konnte Perilipin bei 16 Leberproben mit Leberparenchymverfettung, die durch Medikamenteneinnahme, wie bei Kortison- oder Tetracyclin-Therapie (8), Morbus Wilson (3) oder durch genetische Erkrankungen (z.B. Glykogenose (2), Mitochondriopathie (3)) bei Kindern verursacht wurden, nachgewiesen werden (Abb. 4. 9). Die Perilipin-Expression war nicht nur unabhängig von verschiedenen Ätiologien, sondern auch von Alter und Geschlecht.

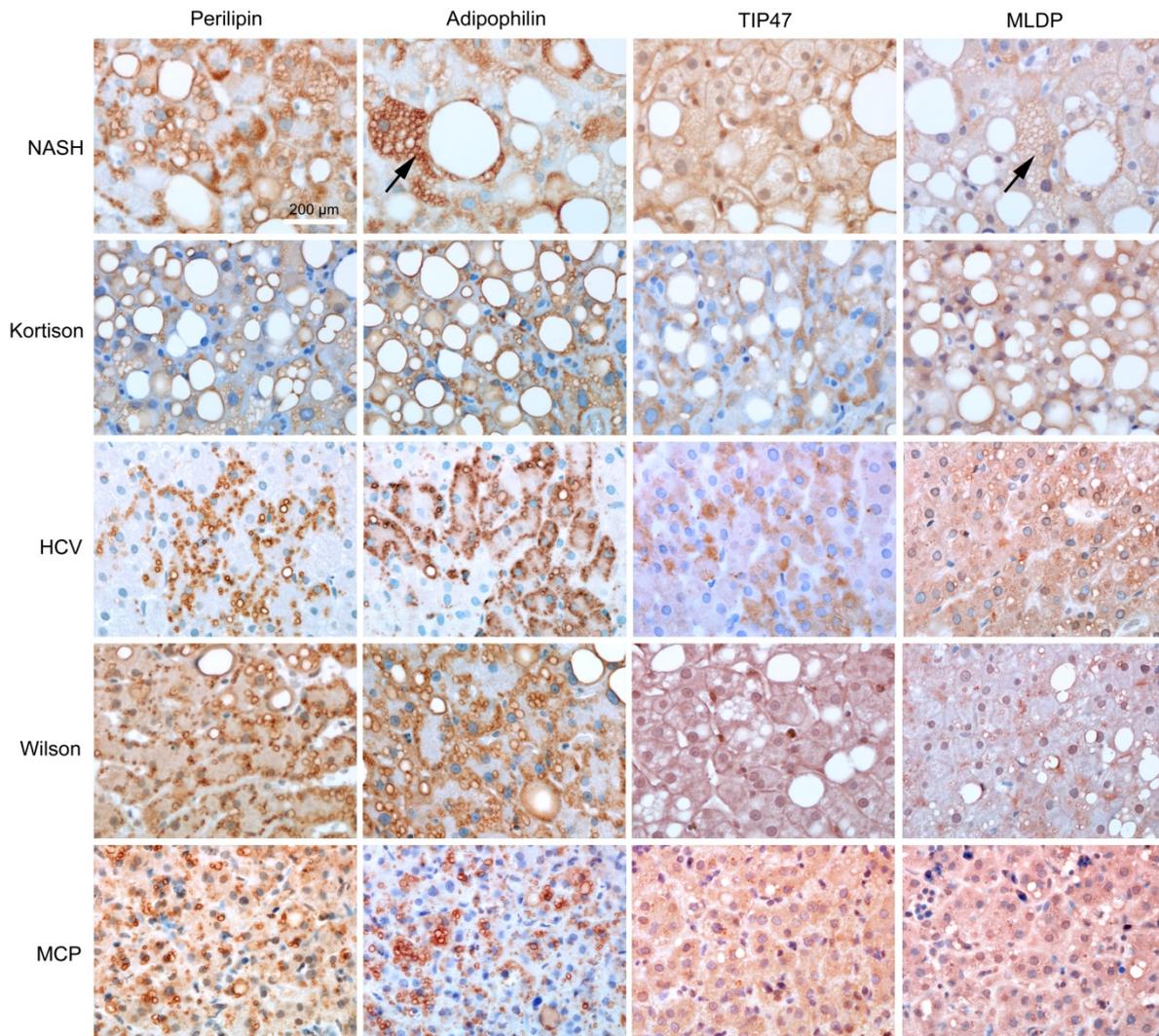


Abb. 4. 9: Immunhistochemie von PAT-Proteinen in humaner Leberparenchymverfettung unterschiedlicher Ätiologie. Perilipin und Adipophilin werden in NASH, Kortison-induzierter hepatozellulärer Steatose, chronischer Hepatitis C (HCV), Morbus Wilson und Mitochondriopathie (MCP) exprimiert. MLDP und TIP47 lagern sich vor allem um Lipidtropfen in mikrovesikulärer Steatose und in ballonierten Hepatozyten (NASH, schwarzer Pfeil). Messbalken: 200 µm.

In differenzierenden 3T3-L1-Prädipozyten lässt sich Perilipin auf mRNA- und Proteinebene erst nach 3 Tagen nachweisen [80]. Um zu überprüfen, ob Perilipin ebenfalls charakteristisch für eine Langzeitspeicherung aber nicht Kurzzeitspeicherung von Triacylglyceriden in Hepatozyten ist, wurden Biopsien von Patienten nach Lebertransplantation (LTX) untersucht, bei denen in kurzen Abständen Kontrollproben vorlagen. In einem Fall waren zum Zeitpunkt der Transplantation nur sehr geringe Mengen der PAT-Proteine nachweisbar (Abb. 4. 10A). 2 Wochen nach Transplantation entwickelte sich eine milde mikrovesikuläre Steatose mit Adipophilin-, MLDP-, und TIP47-positiven

Lipidtropfen aufgrund parenteraler Ernährung und Medikamenteneinnahme. Nach 10 Monaten nach Lebertransplantation war eine schwergradige Kortison-induzierte Leberparenchymverfettung nachweisbar. Nun waren neben Adipophilin-, MLDP-, und TIP47-positiven Lipidtropfen auch schwach Perilipin-positive Lipidtropfen nachweisbar. In Abb. 4. 10B, ist eine weitere Transplantatleberbiopsie mit einer Medikamenten-induzierter Steatose (TX) eines anderen Kindes gezeigt, die positiv für Adipophilin, TIP47 und MLDP, jedoch negativ für Perilipin war. Ähnliche Ergebnisse konnten in weiteren 21 Patienten nachgewiesen werden (Pawella et al. in Vorbereitung).

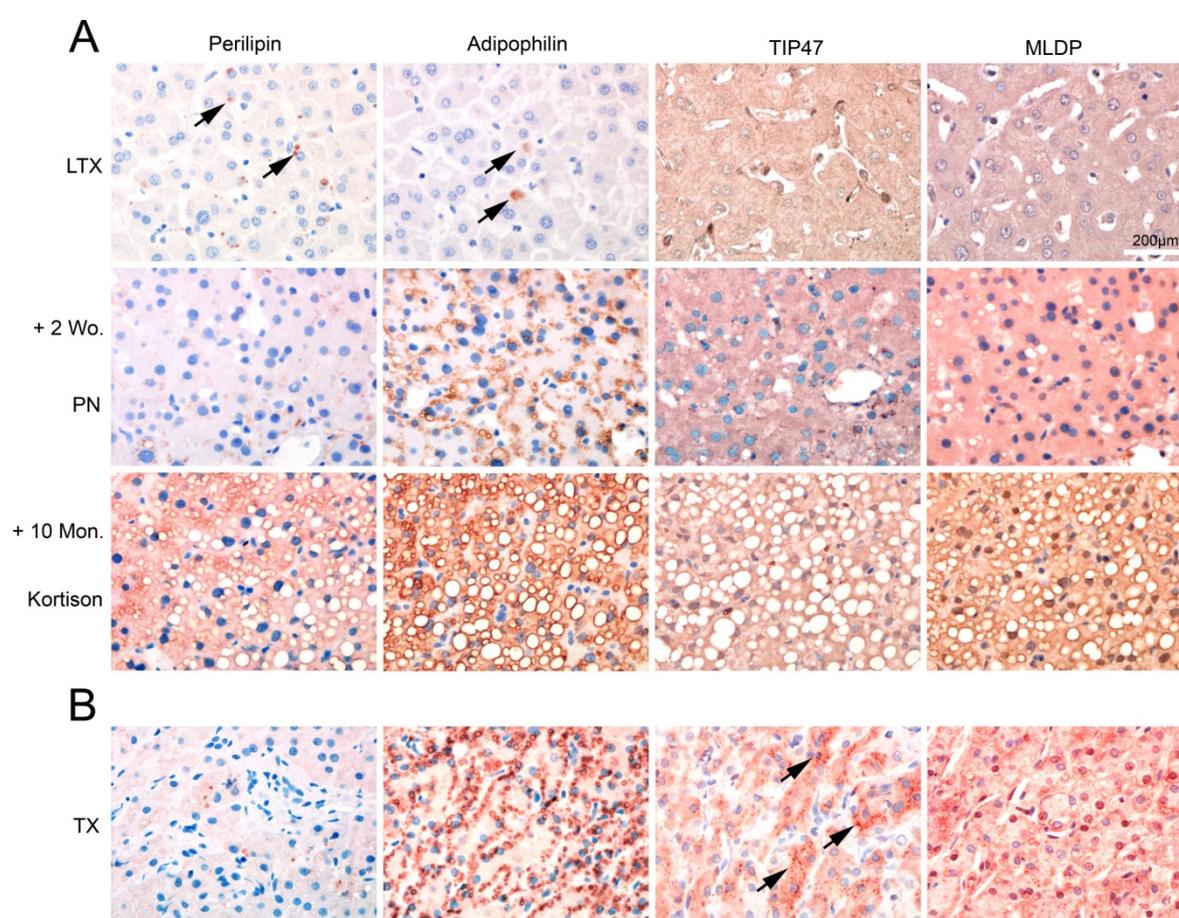


Abb. 4. 10: Fehlen von Perilipin bei akuter Steatose. Immunhistochemische Analysen der PAT-Proteine in Leberbiopsien nach Lebertransplantation (LTX). A) Nullbiopsie bei LTX eines 4-Monate alten Kindes. Mittlere Reihe: 2 Wochen nach LTX: Steatose durch parenterale Ernährung (PN). Untere Reihe: 10 Monate nach LTX eine starke Kortison-induzierte Leberparenchymverfettung mit Positivität für alle PAT-Proteine (einschließlich Perilipin). B) Leberbiopsie aus einer Transplantatleber eines Kindes mit Steatose ohne Perilipin-positive Lipidtropfen. Pfeile: kleine Perilipin-, Adipophilin, oder TIP47-positive Lipidtropfen. Messbalken: 200 µm.

4.1.4 Interaktion von PAT-Proteinen mit anderen Proteinen

In der Literatur wurden neben den PAT-Proteinen weitere Lipidtropfen-assoziierte Proteine in einer Vielzahl von Zelltypen beschrieben (Abschnitt 1.2.2). Wir waren nun daran interessiert, mögliche Interaktionspartner von Perilipin in Hepatozyten und weitere hepatische Lipidtropfen-assoziierte Proteine zu identifizieren. Hierzu wählten wir die folgenden zwei Ansätze: Co-Immunpräzipitation aus Lebergewebe, um mögliche unbekannte Interaktionspartner mittels ESI-MS zu finden sowie gezielte Immunfluoreszenzfärbung bereits bekannter Lipidtropfen-assoziiierter Proteine *in situ*. In der Immunfluoreszenz waren CIDEB, CGI58, Caveolin-1 und -2 nicht mit Lipidtropfen in Hepatozyten *in situ* assoziiert.

4.1.4.1 Co-Immunpräzipitation *in situ*

Für Co-Immunpräzipitationsanalysen wurde ein Perilipin A-spezifischer Antikörper gewählt (Sigma, Kaninchen, Abb. 4. 11, Immunblot). Diese Perilipin A-Bande war ebenfalls in der Silberfärbung des Perilipin-Präzipitats gut sichtbar (Abb. 4. 11, rote Umrandung, massenspektrometrische Analyse siehe Anhang Abb. 8. 6). Da die IgG-Banden des Antikörpers sehr stark waren, wurde versucht, diese durch chemisches Crosslinking des Perilipin-Antikörpers an die Beads zu reduzieren. Der Protein-Antikörper-Komplex löste sich damit erst durch Abkochen von den Beads (IP-Restfraktion (IPr), Abb. 4. 11) und nicht durch Änderung des pH-Werts (IP-Fraktion). Wir analysierten 5 Banden mit Hilfe von ESI-MS, die nicht im Vorklärschritt und Kontrollserum präzipitierten (siehe Anhang Abb. 8. 7). Ein möglicher Interaktionspartner von Perilipin könnte das „*WD repeat-containing protein 11*“ (WDR11, Bande 1, Abb. 4. 11) mit 53 % Proteinsequenzabdeckung und übereinstimmenden Molekulargewicht sein. WDR-Proteine sind ubiquitär exprimiert und spielen vielseitige Rollen in zellulären Prozessen, wie z.B. auch in Vesikeltransportprozessen. Banden 2 und 3 (Abb. 4. 11) präsentierten aufgrund der niedrigen Sequenzabdeckung und nicht korrelierender Proteingrößen keine signifikanten Interaktionspartner. Die Doppelbande bei ~68 kDa entsprach Perilipin A (Bande 4 und 5, Abb. 4. 11). Perilipin A in Bande 5 lag an Serin 130 und 382 phosphoryliert vor. Die Doppelbande könnte demnach entweder durch die Phosphorylierung verursacht werden, oder durch Degradation des Proteins während des zeitaufwendigen IP-Protokolls.

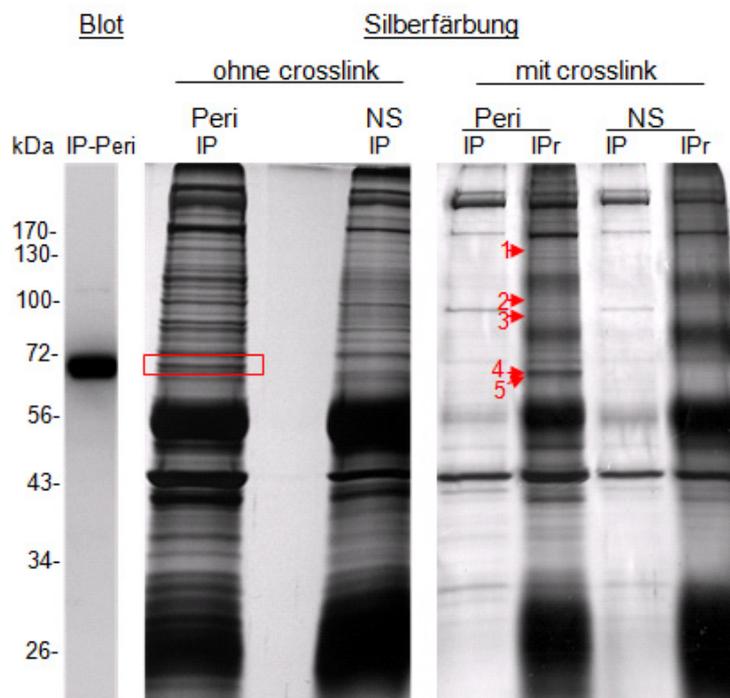


Abb. 4. 11: Immunpräzipitation (IP) von Perilipin A aus humanem Lebergewebe. Der Antikörper reichert Perilipin A an, welches als Proteinbande gut in der Silberfärbung zu erkennen ist (rote Umrandung). Die IP-Kontrolle wurde mit Normalserum (NS) durchgeführt. Perilipin A-Antikörper (Peri) wurde an Beads durch Crosslink gekoppelt. Die Proteine dissoziierten erst in der IPr-Fraktion. Die Protein-Banden 1-5 wurden mittels ESI-MS analysiert (vgl. Anhang Abb. 8. 7). Molekulargewichtsmarker sind auf der linken Seite angegeben. Abk.: IPr: Sedimentrest nach nochmaligem Aufschluss des Immunpräzipitats.

Weitere Co-IP-Analysen ergaben, dass Perilipin und Adipophilin nicht miteinander interagieren (Abb. 4. 12). Hierzu wurde eine IP im Gewebelysate humaner Fettleber mit Antikörpern gegen Adipophilin durchgeführt (Abb. 4. 12A). Perilipin-Antikörper reagierten mit einer für Perilipin A spezifischen Bande bei ~68 kDa im IP-Überstand, jedoch nicht im Immunpräzipitat von Adipophilin. Das Immunpräzipitat von Perilipin zeigte wiederum im Immunblot keine Bande für Adipophilin (Abb. 4. 12B).

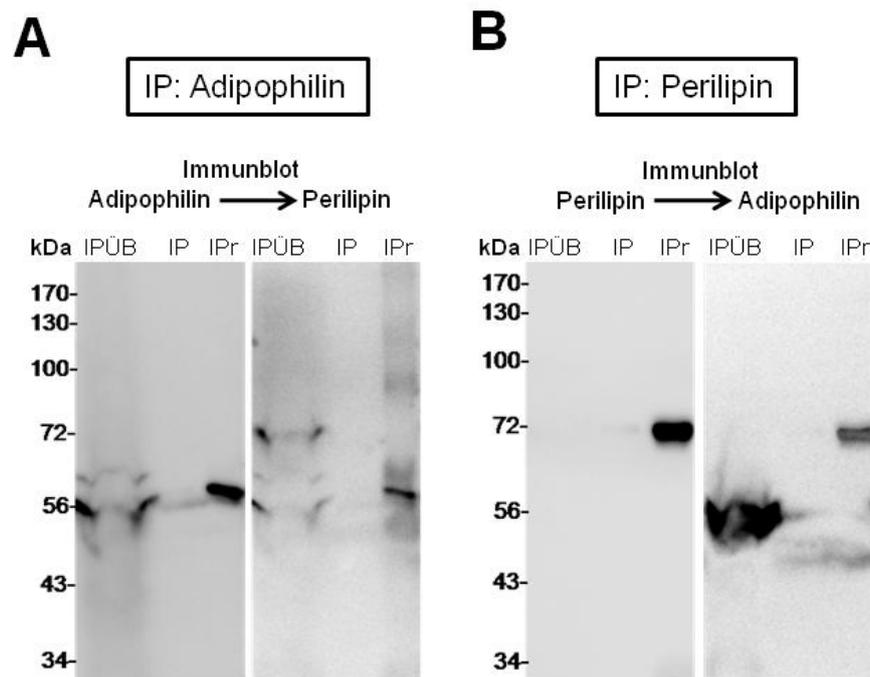


Abb. 4. 12: Co-Immünpräzipitation (IP) zur Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen Adipophilin und Perilipin. A) IP mit Antikörpern gegen Adipophilin; Immunblot mit Antikörpern gegen Perilipin. Die Bande bei ~55 kDa in IPr-Spur des Perilipin-Immunblots entspricht Adipophilin. B) Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Perilipin; Immunblot mit Antikörpern gegen Adipophilin. Die Bande bei ~68 kDa in IPr-Spur entspricht Perilipin. Abk.: ÜB: Überstand, IPr: Sedimentrest nach nochmaligem Aufschluss.

4.2 Mechanismen einer PAT-Proteininduktion *in vitro*

4.2.1 Perilipin wird in Kurzzeitsteatose-Modellen nicht induziert

Da primäre humane Hepatozyten oft schon Perilipin exprimieren und *in vitro* schnell dedifferenzieren, wurden die hepatozytären Zelllinien PLC, Huh7, Hep3B und HepG2 für nachfolgende Versuche herangezogen.

Um die Effekte einer Fettbelastung auf das Expressionsniveau der PAT-Proteine zu untersuchen, wurden die Zelllinien PLC, Huh7, Hep3B und HepG2 zuerst bis zu 6 Tage lang mit BSA-gekoppelter Ölsäure inkubiert und mit unbehandelten Kontrollen verglichen (Abb. 4. 13A, C, D, E). Durch die Oleat-Behandlung stieg in allen Zellkulturen die Adipophilin-Proteinmenge schneller über die Zeit an als in den unbehandelten Kontrollzellen. Die TIP47-Proteinmenge blieb von der Oleat-Inkubation in Huh7-, Hep3B- und PLC-Zellen unbeeinflusst. In HepG2-Zellen erhöhte sich die TIP47-Proteinmenge nach 24 h. Mit ansteigendem TAG-Gehalt wurde eine abnehmende zytoplasmatische Färbung von TIP47 beobachtet (Abb. 4. 14). Für MLDP war eine Erhöhung in HepG2-Zellen mit

der Zeit mit und ohne Oleat-Inkubation nachweisbar (Abb. 4. 13C). Gleichzeitig mit der Zunahme der TAG-Menge in Oleat-behandelten HepG2- und Huh7-Zellen, stieg die Adipophilin-Proteinmenge an. In Kontrollzellen war erst zu späteren Zeitpunkten eine geringe TAG-Erhöhung zu beobachten (Abb. 4. 13B). Perilipin A war in den Kurzzeitsteatose Experimenten nicht nachweisbar.

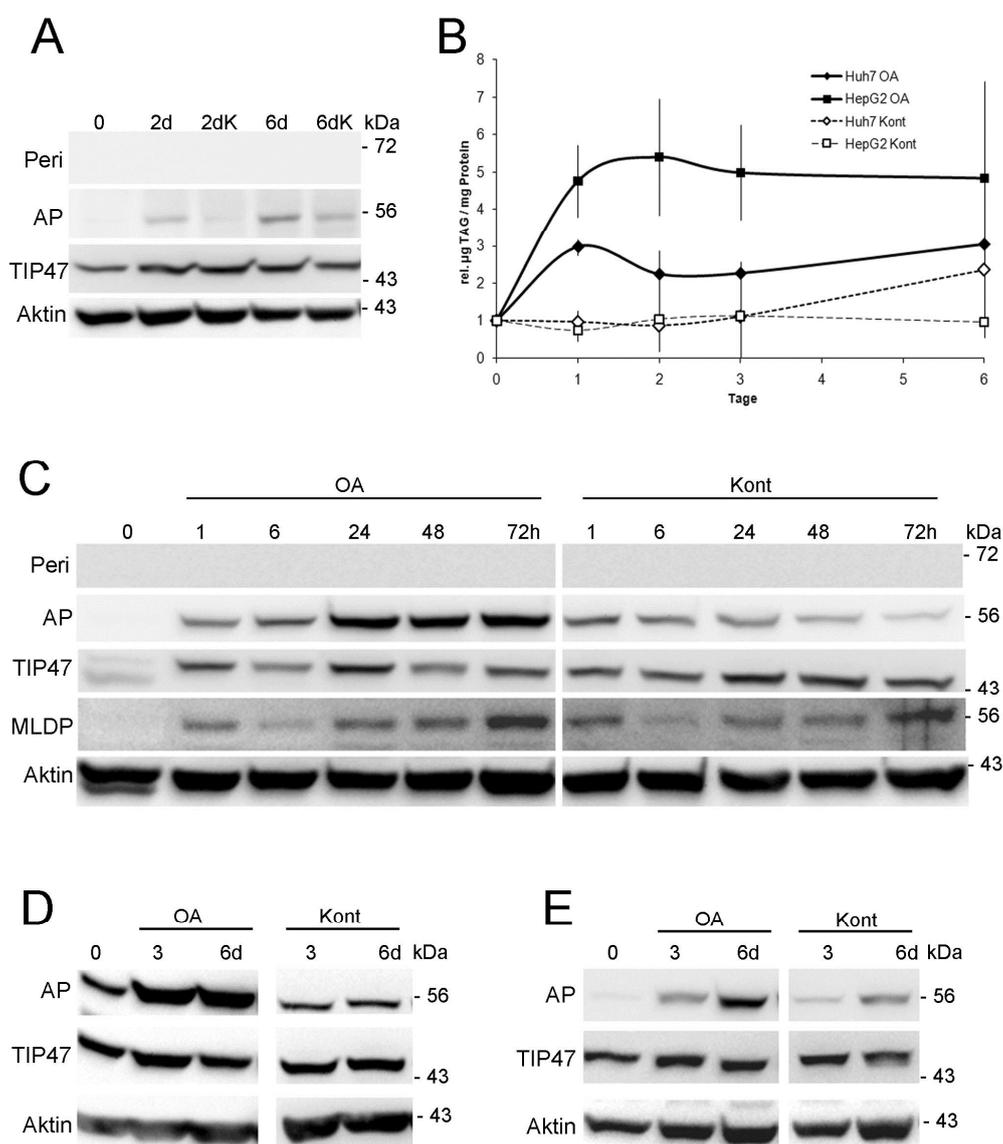


Abb. 4. 13: Kurzfristige Induktion einer Steatose mit BSA-gekoppelter Ölsäure. Immunblot von Gesamtzelllysaten (jeweils 50 μ g Protein pro Spur) mehrerer Tage Oleat-behandelter Huh7- (A), HepG2- (C), Hep3B- (D) und PLC-Zellen (E) sowie von Kontrollzellen (Kont) ohne Oleat-Behandlung. Antikörper gegen Perilipin (Peri, ~68 kDa), Adipophilin (AP, ~55 kDa), TIP47 (~47 kDa), MLDP (~56 kDa) und Aktin (~42 kDa) wurden verwendet. Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite angegeben. B) Relative TAG-Konzentrationen (μ g TAG / mg Protein) von Huh7- und HepG2-Zellen mit und ohne Oleat-Inkubation (OA, Kont) normalisiert auf den entsprechenden Nullwert (n = 3).

Immunfluoreszenzmikroskopisch stieg nach 2-tägiger Inkubation von Huh7-Zellen mit Oleat die Anzahl und Größe Adipophilin-positiver Lipidtropfen zusammen stark an (Abb. 4. 14b). TIP47 translozierte vom Zytoplasma zur Oberfläche einiger größerer Lipidtropfen (Abb. 4. 14d). Perilipin konnte immunfluoreszenzmikroskopisch nicht um Fetttropfen nachgewiesen werden (Abb. 4. 14f).

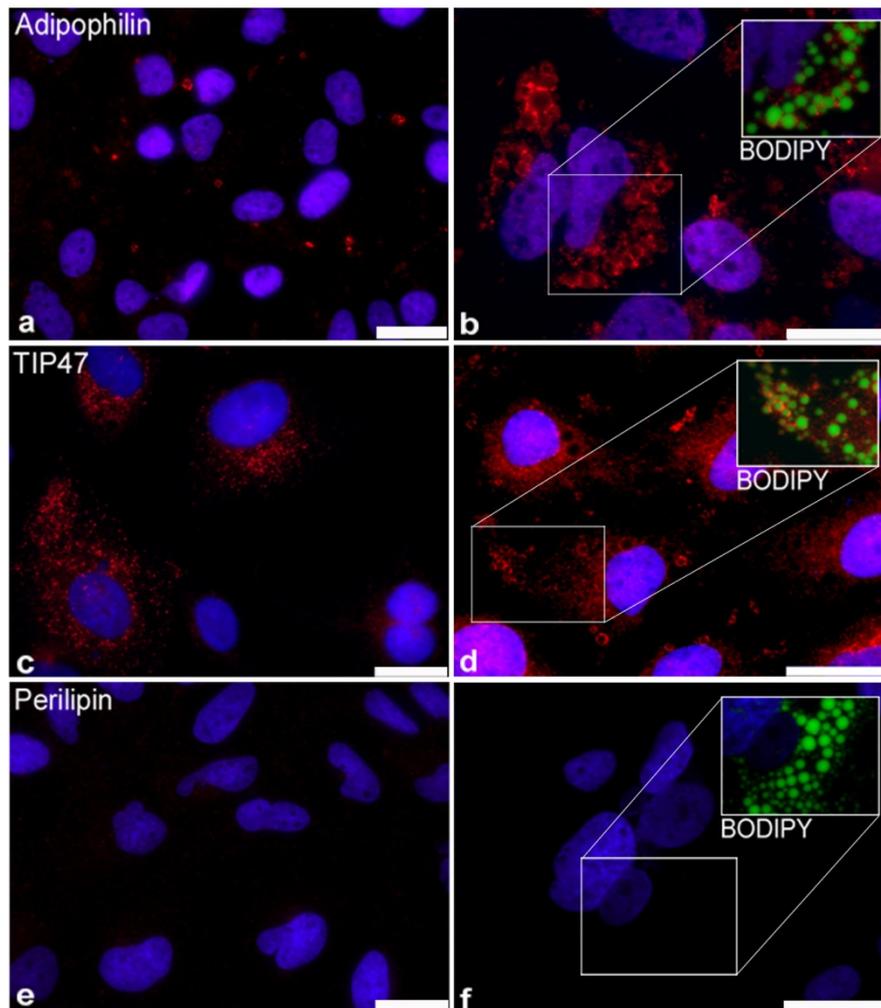


Abb. 4. 14: Immunfluoreszenzmikroskopie von PAT-Proteinen in einem Kurzzeitsteatose-Modell von Huh7-Zellen. Adipophilin (a, b), TIP47 (c, d), und Perilipin (e, f) in unbehandelten (rot, jeweils links) und 2-tägig Oleat-behandelten Huh7-Zellen (rot, jeweils rechts). Bzgl. Kolokalisation mit BODIPY-positiven Lipidtropfen (grün) siehe Einsatz. Die Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Messbalken jeweils 20 µm.

Immunfluoreszenzmikroskopie bekannter Lipidtropfen-assoziiierter Proteine außerhalb der PAT-Proteinfamilie zeigte CGI58- und CIDEB-positive Lipidtropfen nach einer 2-tägigen Oleat-Inkubation von Huh7-Zellen. Caveolin-2 translozierte vom ER / Golgi-Komplex zu Lipidtropfen (Abb. 4. 15).

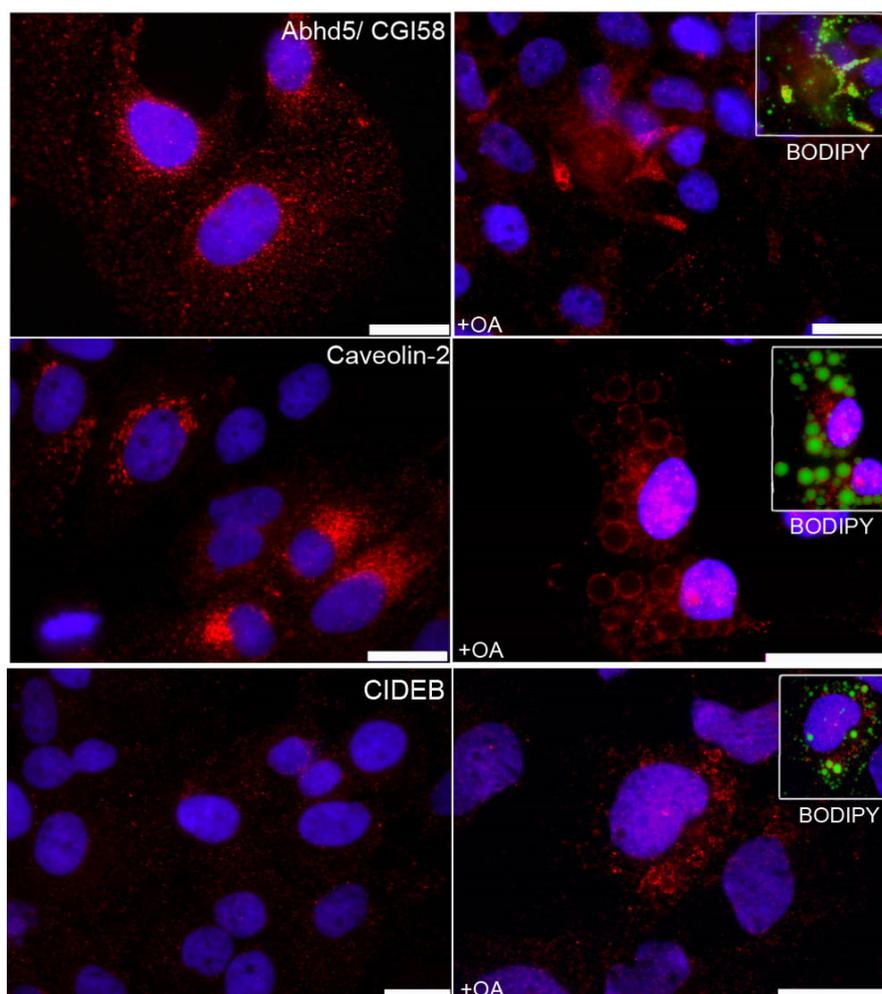


Abb. 4. 15: Immunfluoreszenzfärbung 2-tägig Oleat-behandelter Huh7-Zellen. CGI58 und CIDEB assoziieren mit Lipidtropfen und Caveolin-2 (rot) transloziert vom ER/Golgi-Komplex zu Lipidtropfen nach Oleat (OA)-Inkubation. Lipidtropfen wurden mit BODIPY gefärbt (grün). Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Messbalken jeweils 20 μm .

Zusätzlich zu BSA-Oleat wurde die PAT-Expression in Huh7- und HepG2-Zellen nach Inkubation mit Kombinationen von Oleat, Cholesterin, LDL und dem PPAR γ -Agonisten Ciglitazon untersucht (Abb. 4. 16A, B, C). In HepG2-Zellen verursachte die kombinierte Gabe von Oleat und Cholesterin nach 3 Tagen eine höhere Adipophilin-Menge als in HepG2-Zellen mit alleiniger Oleat-Inkubation (Abb. 4. 16A); dieser Effekt war jedoch nach 6 Tagen nicht mehr zu beobachten. Die alleinige Gabe von Cholesterin verursachte nach 6-tägiger Inkubation in HepG2-Zellen eine höhere Adipophilin-Menge als in den Kontrollzellen (Abb. 4. 16A, B). Die Adipophilin-Proteinmenge korrelierte positiv mit der Zelldichte bei Aussaat. Je konfluenter die Zellen zu Beginn des Experiments waren, desto mehr Adipophilin wurde exprimiert (vgl. z.B. die Adipophilin in Abb. 4. 16B). In Zellen,

die bei Aussaat bereits 100 % konfluent waren, konnte keine oder nur eine allenfalls schwache Adipophilin-Zunahme bei unterschiedlichen Oleat-Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 4. 16C). Ciglitazon und / oder LDL hatten keinen Einfluss auf die PAT-Proteinexpression (Abb. 4. 16A, C). Perilipin konnte in keinem dieser Kurzzeitsteatose-Modelle in signifikanter Proteinmenge detektiert werden. TIP47 zeigte keine Änderung der Proteinmenge in den Immunblots.

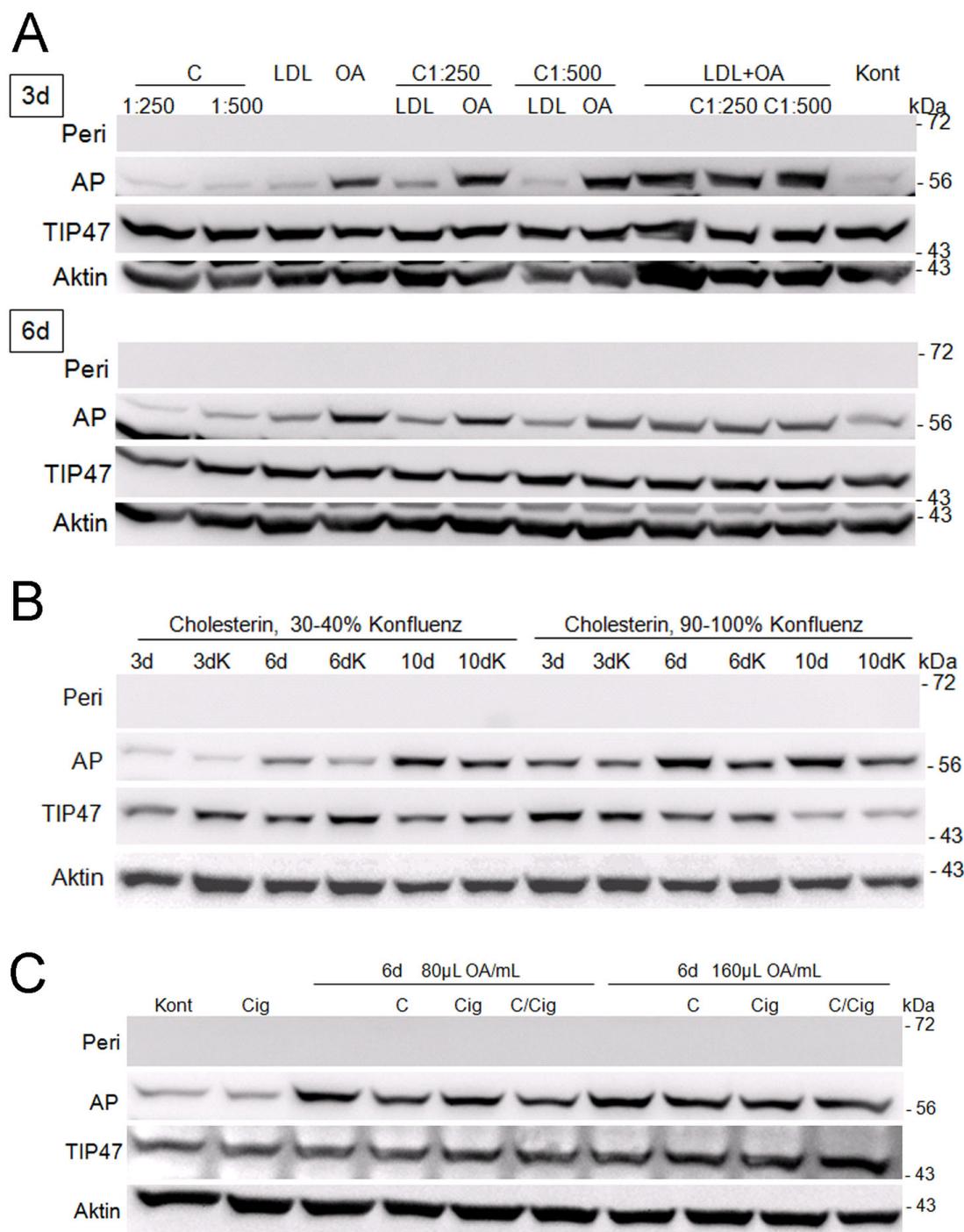


Abb. 4. 16: PAT-Proteine nach Inkubation von HepG2-Zellen mit unterschiedlichen steatogenen Substanzen. Immunblot-Analyse (jeweils 50 µg Protein pro Spur) von Perilipin (Peri, ~68 kDa), Adipophilin (AP, ~55 kDa), TIP47 (~47 kDa) und Aktin. A) HepG2-Zellen wurden 3 und 6 Tage lang mit Kombinationen aus Cholesterin (C), LDL und Oleat (OA) inkubiert. Cholesterin wurde in einer Verdünnung von 1:250 und 1:500 eingesetzt. B) Immunblot von HepG2-Zellen nach Inkubation mit Cholesterin-haltigem Medium (1:250) für bis zu 10 Tage mit 2 verschiedenen Aussaatzellichten. C) Immunblot von HepG2-Zellen nach Inkubation mit 2 verschiedenen Oleat-Konzentrationen und / oder Cholesterin (1:250) und / oder Ciglitazon (Cig) für 6 Tage. Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt. Abk.: C: Cholesterin.

4.2.1.1 Untersuchung der PAT-Proteine in *in vitro* Hypoxie-Modellen

Da Perilipin *in situ* vorwiegend im sauerstoffärmeren perizentralen Bereich des Leberläppchens exprimiert wird, untersuchten wir den Einfluss von hypoxischen Kulturbedingungen (mittels DMOG oder Hypoxiekammer) in Huh7- und HepG2-Zellen auf die PAT-Expression und die Perilipin-Induktion. Zur Überprüfung der hypoxischen Bedingungen wurde der „*Hypoxia Inducible Factor 1- α* “ (HIF1- α) als Positivkontrolle verwendet. Die HIF1- α - und Adipophilin-Proteinmenge stiegen bereits nach einigen Stunden in hypoxischer Umgebung an (Abb. 4. 17A, B). Sogar nach einer bis zu 12-tägigen Inkubation in der Hypoxiekammer, konnte Perilipin nicht nachgewiesen werden. Die TIP47-Proteinmenge blieb unbeeinflusst.

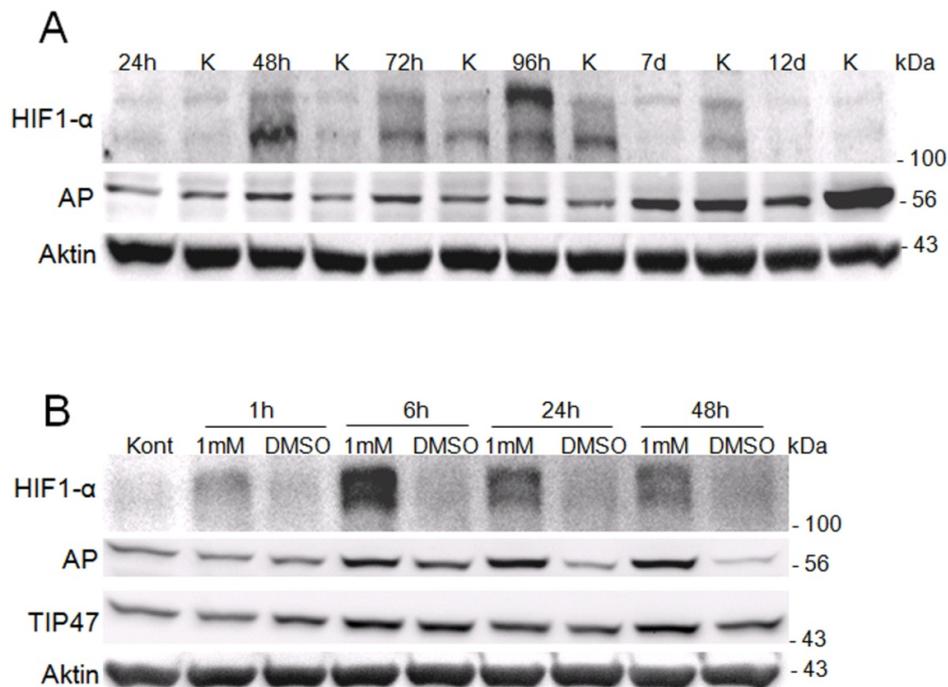


Abb. 4. 17: Immunblot von HIF1- α , Adipophilin (AP) und TIP47 bei Hypoxie. A) Huh7-Zellen wurden in einer Hypoxiekammer und Kontrollzellen (K) unter normoxischen Bedingungen bis zu 12 Tage lang kultiviert. B) In HepG2-Zellen wurden hypoxische Bedingungen durch die Zugabe von 1 mM DMOG verursacht. DMSO diente als Kontrolle. Jeweils 50 μ g Protein pro Spur wurde aufgetragen (vgl. dazu Aktin). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt.

4.2.1.2 Proteindegradation

Um den PAT-Proteinabbau zu verringern, wurde die proteasomale und lysosomale Proteindegradation mit MG132 bzw. Ammoniumchlorid in Oleat-behandelten HepG2- und Huh7-Zellen blockiert (Abb. 4. 18). Hierzu wurde nach 2-tägiger Oleat-Inkubation

entweder MG132 oder Ammoniumchlorid für 24 h zu den Zellen zugefügt. In HepG2-Zellen verminderte sich die Adipophilin-Proteinmenge geringfügig durch die Zugabe von Ammoniumchlorid. Die Degradations-blockierenden Substanzen hatten jedoch keine signifikante Auswirkung auf die Adipophilin-Menge in Huh7-Zellen und auf die Perilipin-Expression.

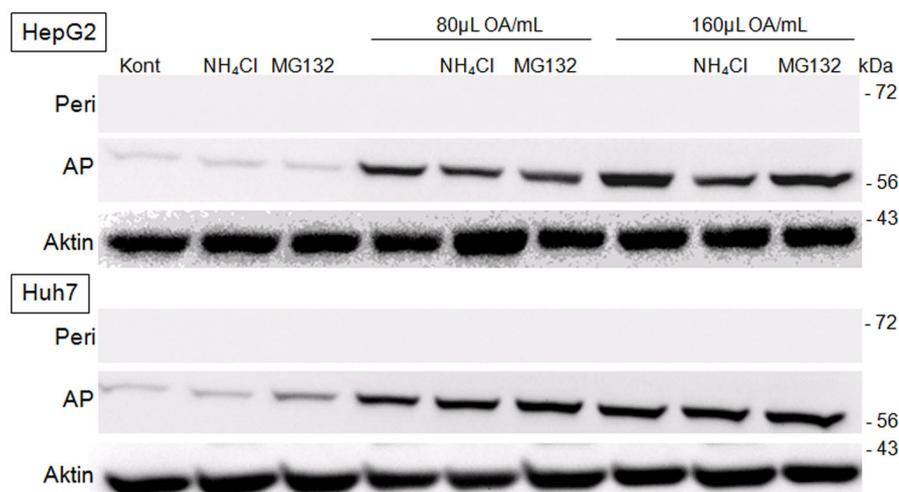


Abb. 4. 18: Immunblot von Perilipin (Peri) und Adipophilin (AP) in HepG2- und Huh7-Zellen nach 2-tägiger Oleat-Inkubation mit zusätzlich MG132 oder Ammoniumchlorid (NH₄Cl) für 24 h. Jeweils 50 µg Protein pro Spur wurde aufgetragen (vgl. dazu Aktin). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt.

4.2.2 Perilipin-Induktion bei chronischer Steatose *in vitro*

Während bei chronischen Lebererkrankungen Perilipin und Adipophilin Lipidtropfen steatotischer Hepatozyten ummanteln, sind in hepatozytären Zellkulturlinien in verschiedenen Steatose-Modellen nur Adipophilin, TIP47 und MLDP, jedoch nicht Perilipin, nachweisbar. Die Situation *in situ* wird damit durch diese Zellkulturmodelle nicht hinreichend abgebildet. Möglicherweise spielt Perilipin eine Rolle bei der Langzeitspeicherung von Fetten (vgl. Abschnitt 4.1.3), die in den Kurzzeit-Zellkulturmodellen nicht ausreichend widerspiegelt wird. Deswegen wurden Huh7-Zellen bis zu 40 Tage mit unterschiedlichen steatogenen Substanzen behandelt.

4.2.2.1 Effekte einer Oleat-Behandlung mit DMSO auf die PAT-Proteinexpression

Eine Inkubation mit BSA-gekoppelter Ölsäure zeigte in den Kurzzeit-Versuchen die stärkste Verfettung von Zellen. Deswegen wurden Huh7- und HepG2-Zellen bis zu 40 Tage lang mit Oleat inkubiert. Bei Wiederholungen zeigte sich jedoch, dass die PAT-Expression, insbesondere die Perilipin-Expression, starke Schwankungen aufwies. Interessanterweise zeigten HepG2-Zellen einer jungen Passage (P10-12) und Huh7-Zellen einer alten Passage (P80-90) immunfluoreszenzmikroskopisch die beste Induktion von Perilipin mittels Oleat-Inkubation. In Huh7-Zellen war jedoch generell nur eine schwache Perilipin-Färbung in Immunfluoreszenzfärbungen an einigen Lipidtropfen zu beobachten. Da hohe Passagen einen negativen Einfluss auf die genetische Stabilität haben kann, wurden in allen nachfolgenden Modellen nur Huh7-Zellen zwischen P15-30 verwendet [236].

Die Perilipin-Proteinmenge in jungen Huh7-Zellen konnte durch alleinige Oleat-Inkubation nicht sichtbar induziert werden. Jedoch nach kombinierter Gabe von DMSO mit Oleat (DMSO-OA), war Perilipin A nach 10 Tagen mit einer Bande bei ~68 kDa zu detektieren (Abb. 4. 19A). DMSO ist ein bekannter Faktor, der die Zelldifferenzierung induzieren und das Zellwachstum arretieren kann [237-239]. Die Perilipin-Proteinmenge nahm im Verlauf des Experiments zu. Die Adipophilin-Menge stieg durch die Inkubation mit Oleat mit oder ohne DMSO an, während die TIP47-Menge nach anfänglich starker Expression nach 3 - 6 Tagen abnahm. MLDP wurde wie Adipophilin durch die Verfettung erhöht (Abb. 4. 19A). Immunfluoreszenzmikroskopisch war nach 10-tägiger DMSO-OA-Behandlung Areale mit Perilipin-positiven Fetttropfen nachweisbar. Interessanterweise waren in Immunfluoreszenzfärbungen gegen Perilipin in allen Modellen immer positive Areale und negative Areale auf dem Zellrasen sichtbar. Perilipin kolokalisierte vollständig mit Adipophilin an Lipidtropfen (Abb. 4. 19B). Ab 10 Tagen DMSO-Behandlung konnte Perilipin ebenfalls um kleine Lipidtropfen nachgewiesen werden. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 zeigten, dass Perilipin besonders in nicht-proliferierenden Zellen exprimiert wurde. Durch DMSO wurde zusätzlich, wie in der Literatur beschrieben [223, 224, 237], eine Differenzierung von Huh7-Zellen induziert, wie durch die Bildung Gallenkanalikuli-ähnlicher Strukturen durch Färbung mit Antikörpern gegen das „Tight Junction“ Protein ZO-1 nach 10 Tagen nachweisbar war (Abb. 4. 19B).

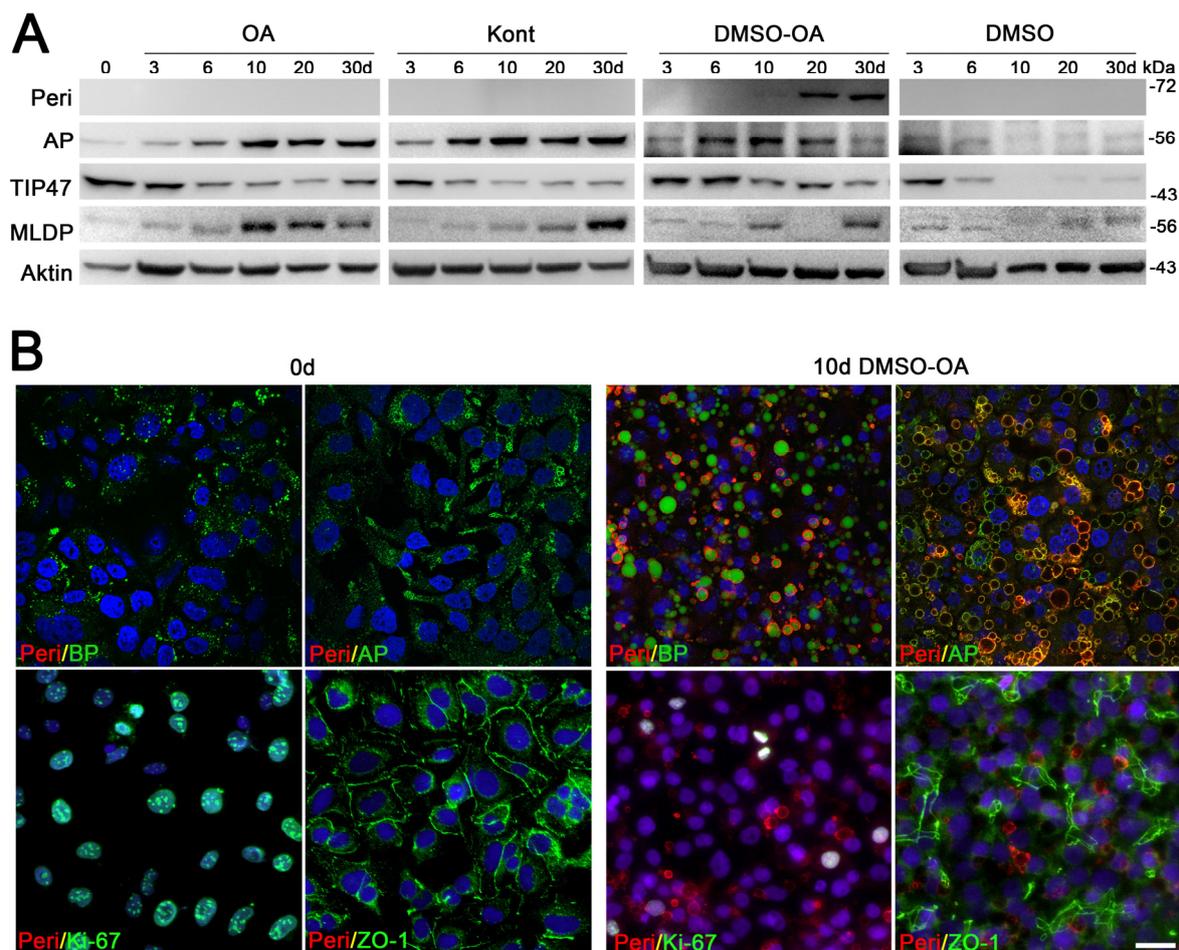


Abb. 4. 19: Perilipin wird durch Langzeitbehandlung von Huh7-Zellen mit DMSO und Oleat induziert. A) Immunblot (jeweils 25 µg Protein pro Spur) von Perilipin (Peri, ~68 kDa), Adipophilin (AP, ~55 kDa), TIP47 (~47 kDa), MLDP (~56 kDa) und Aktin in Zelllysaten einer 3- 30-tägigen BSA-Oleat- (OA), DMSO-, bzw. DMSO / Oleat- (DMSO-OA) Inkubation im Vergleich zu Zelllysaten in normalem Medium (Kont). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt. B) Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie mit Perilipin (rot) und BODIPY, Adipophilin, Ki-67 oder ZO-1 (grün) zum Zeitpunkt 0 und 10 d nach DMSO-OA-Behandlung. Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Obere Reihe: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Untere Reihe: Epifluoreszenz-Mikroskopie. Messbalken: 25 µm.

Interessanterweise akkumulierten Lipide in Huh7-Zellen nicht nur nach Oleat- und DMSO-Oleat-Behandlung, sondern auch in DMSO- und DMEM-Kontrollmedium. Die TAG-Konzentration nahm in alleinig Oleat-behandelten Zellen zu Anfang schneller zu als in Zellen, die mit DMSO-Oleat inkubiert wurden. Alleinige Behandlung mit DMSO zeigte eine spätere TAG-Zunahme, jedoch konnte nach 6 und 10 Tagen kein signifikanter Unterschied mehr im TAG-Gehalt aller Behandlungen beobachtet werden (Abb. 4. 20).

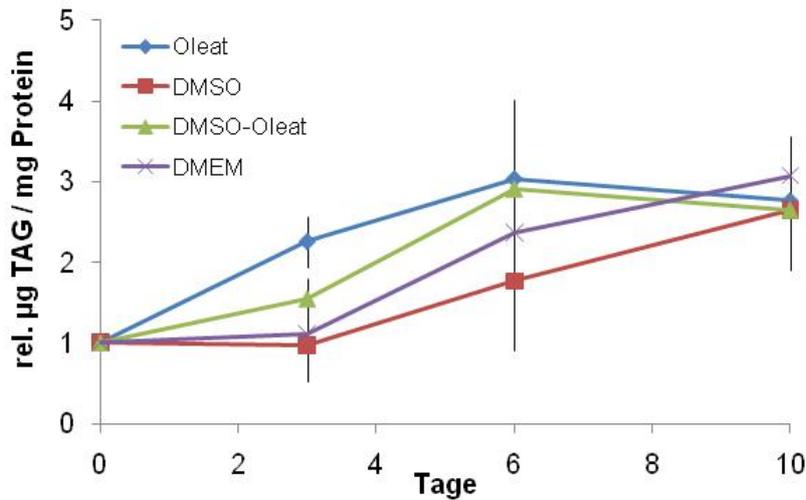


Abb. 4. 20: Relative TAG-Konzentration von Huh7-Zellen nach Inkubation mit Oleat (OA), DMSO oder DMSO-Oleat. Kontrollzellen in normalem DMEM-Medium wurden ebenfalls mitgeführt (DMEM). Werte sind auf den Anfangswert (0 d) bezogen (n = 3).

4.2.2.2 Effekte eines Adipozyten-Differenzierungsmediums auf die PAT-Proteinexpression

Perilipin ist das mengenmäßig am meisten vorkommende Lipidtropfen-assoziierte Protein in reifen univakuolären Adipozyten. Aus diesem Grund testeten wir eine Mischung aus adipogenen Faktoren, die zu einer *in vitro* Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten verwendet wird (PAM: Präadipozyten / Adipozyten-Differenzierungsmedium). 2 Tage postkonfluente Huh7-Zellen wurden zu diesem Zweck 3 Tage mit einer Kombination aller 6 Faktoren inkubiert (Insulin, Biotin, Dexamethason, Ciglitazon, Thyroxin, IBMX) und anschließend für bis zu 37 Tage mit Biotin, Insulin und Dexamethason weiter differenziert. Da dieses Medium eine geringere FBS-Konzentration (3 %) aufwies als normales Medium (DMEM, 10 % FBS) wurde ein Kontrollmedium mit entsprechend niedrigem FBS-Gehalt mitgeführt. Perilipin (Isoform A) wurde nur durch PAM-Medium nach 10 Tagen deutlich induziert (Abb. 4. 21). In den Kontrollzellen wurden nach ca. 30 Tagen nur vereinzelt Perilipin-positive Lipidtropfen immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Auch in diesem Modell wurde eine nacheinanderfolgende Proteinmengen Zunahme von TIP47, MLDP, Adipophilin und dann Perilipin beobachtet. Die Adipophilin-Menge stieg auch in Kontrollzellen zusammen mit dem Lipidanstieg in diesen Zellen an (Abb. 4. 23).

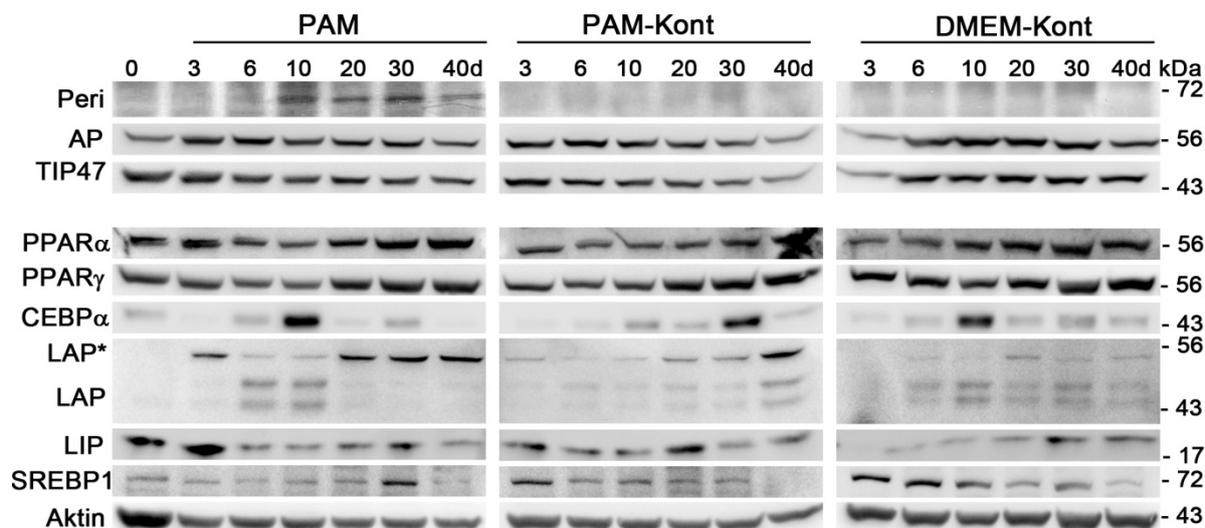
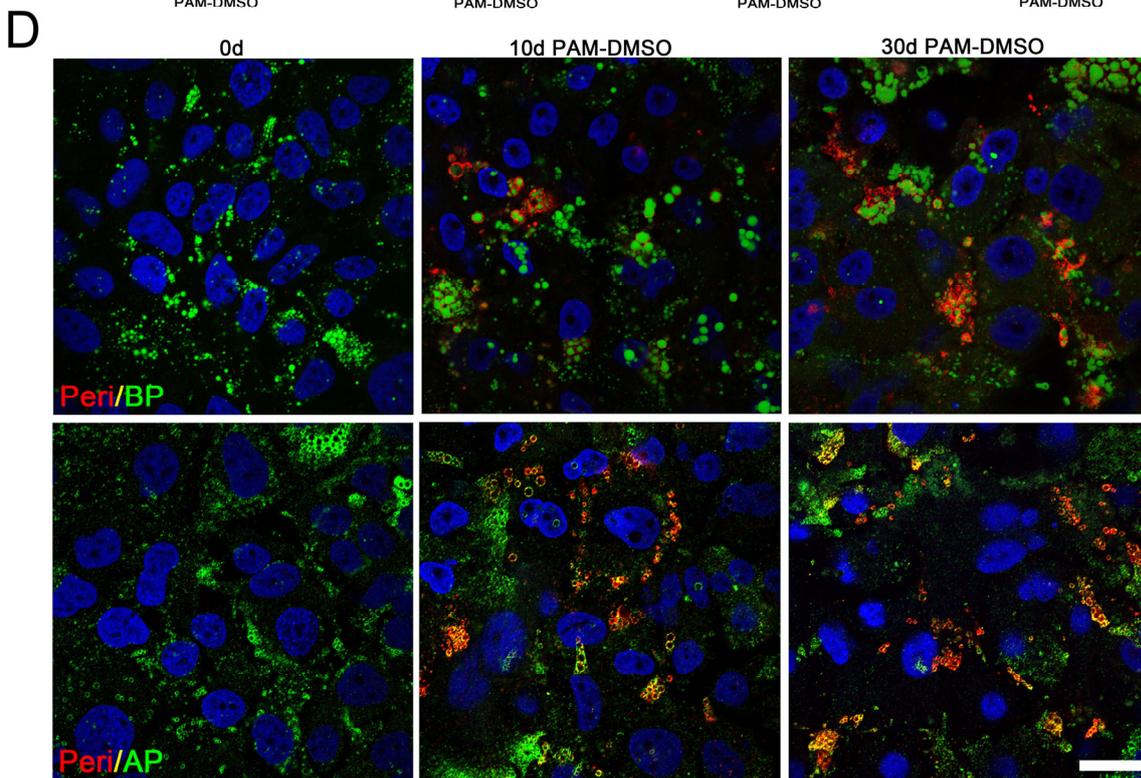
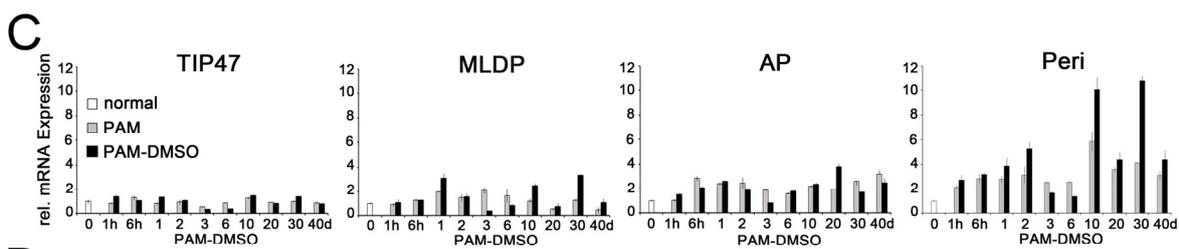
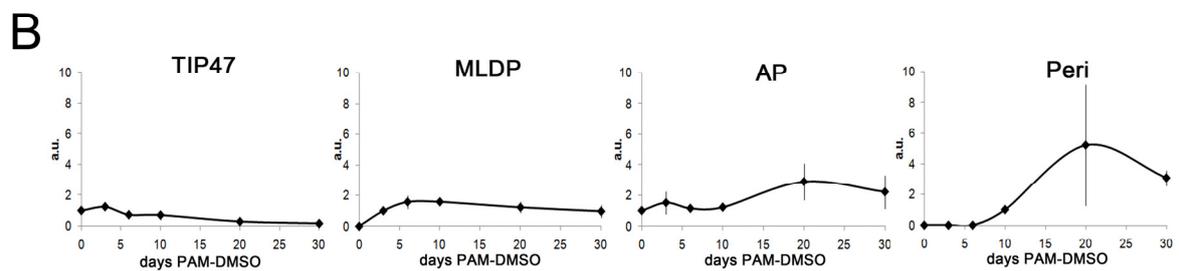
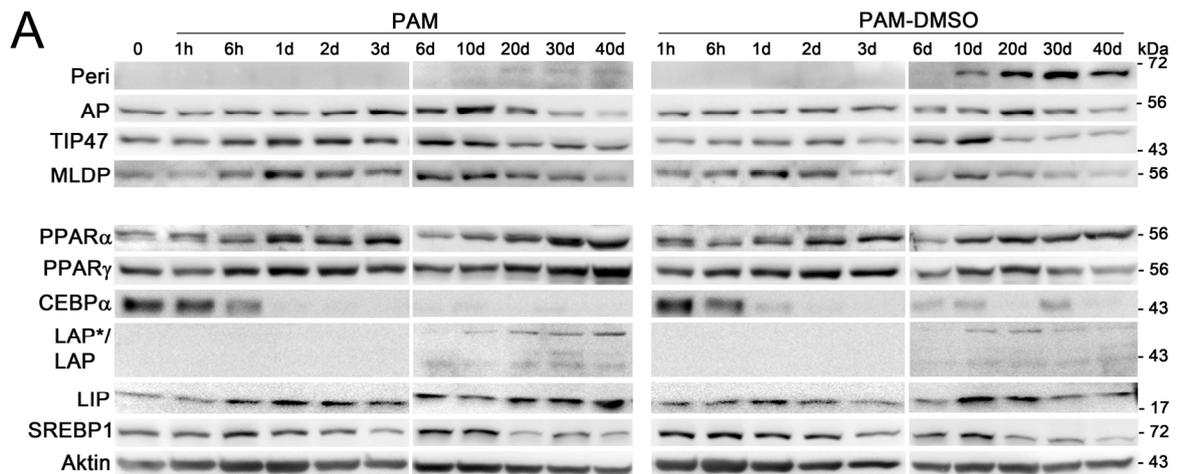


Abb. 4. 21: PAM-Medium induziert Perilipin in Huh7-Zellen. Immunblot mit Antikörpern gegen die PAT-Proteine Perilipin (Peri, ~68 kDa), Adipophilin (AP, ~55 kDa), TIP47 (~47 kDa) und gegen die Transkriptionsfaktoren PPAR α (~55 kDa), PPAR γ (~55 kDa), CEBP α (~43 kDa), CEBP β (LAP*, ~55 kDa; LAP, ~50 und ~45 kDa; LIP, 20 kDa) und SREBP1 (~70 kDa) nach PAM-Inkubation bis zu 40 Tage. Jeweils 50 μ g Protein pro Spur wurde aufgetragen (vgl. hierzu Aktin). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt. Abk.: PAM: Präadipozyten / Adipozyten-Differenzierungsmedium.

4.2.2.3 Effekte einer Kombination des PAM-Modells mit DMSO auf die PAT-Proteinexpression

Da DMSO einen positiven Einfluss auf die Perilipin-Expression im Oleat-Modell hatte, kombinierten wir das PAM-Modell mit DMSO, um die Perilipin-Expression zu verstärken. Im PAM-DMSO-Modell, konnte bereits nach 10 Tagen eine stärkere Perilipin-Expression (Isoform A) induziert werden, die im Laufe der Zeit weiter zunahm (Abb. 4. 22A). In Wiederholungen konnte Perilipin durch PAM-DMSO-Behandlung jeweils reproduzierbar nach 10 Tagen im Immunblot nachgewiesen werden. Betrachtet man die Expression der einzelnen PAT-Proteine, stellt man fest, dass sequentiell TIP47 und MLDP, dann Adipophilin und schließlich Perilipin zu- und dann wieder abnahmen (Abb. 4. 22A, B). Perilipin ummantelte BODIPY-positive Lipidtröpfchen aller Größen und kolokalisierte mit Adipophilin (Abb. 4. 22D). Die Analyse der PAT-Protein-Transkripte zeigte eine anfängliche Zunahme der Perilipin, Adipophilin und MLDP mRNA und einem zweiten Expressionspeak nach 10 Tagen (Abb. 4. 22C). Adipophilin und MLDP stiegen auf Proteinebene zusammen mit der mRNA-Expressionszunahme an. Perilipin konnte erst zu späteren Zeitpunkten (~10-20 d) im Immunblot detektiert werden, obwohl die mRNA bereits früher zunahm.

Abb. 4. 22: Langzeitbehandlung von Huh7-Zellen mit Präadipozyten / Adipozyten-Differenzierungsmedium (PAM) mit DMSO verstärkt die Perilipin-Expression. A) Immunblot-Analysen von Gesamtzelllysaten PAM- und PAM-DMSO behandelter Huh7-Zellen, detektiert mit Antikörpern gegen Perilipin (Peri, ~68 kDa), Adipophilin (AP, ~55 kDa), TIP47 (~47 kDa) und MLDP (~56 kDa) sowie die Transkriptionsfaktoren PPAR α (~55 kDa), PPAR γ (~55 kDa), CEBP α (~43 kDa), CEBP β (LAP*, ~55 kDa; LAP, ~50 und ~45 kDa; LIP, 20 kDa) und SREBP1 (~70 kDa). Jeweils 25 μ g Protein pro Spur wurde aufgetragen (vgl. hierzu Aktin). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt. B) Densitometrische Analyse der Immunblots von A (n = 3). Werte wurden jeweils auf Aktin normalisiert. Für Perilipin und MLDP wurde ein künstlicher Anfangswert (= 1) gewählt. C) Semiquantitative real-time-PCR-Analysen der PAT mRNAs. Werte sind auf den Nullwert normalisiert. D) In Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie umrandet Perilipin (rot) BODIPY-positive Lipidtropfen (grün) und kolokalisiert mit Adipophilin (grün) nach 10 und 30 Tagen PAM-DMSO. Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI). Messbalken: 25 μ m. Abk.: a.u.: willkürliche Einheit.



Der TAG-Gehalt in Zellen kultiviert in PAM- und Kontrollmedium nahm zu Beginn der Behandlung stärker zu als in Zellen in PAM-DMSO (Abb. 4. 23). Zum Ende des Behandlungszeitraumes wiesen Huh7-Zellen aller Behandlungen einen vergleichbaren TAG-Gehalt auf. Die Induktion der Perilipin-Expression scheint folglich nur teilweise vom TAG-Gehalt der Zellen abhängig zu sein.

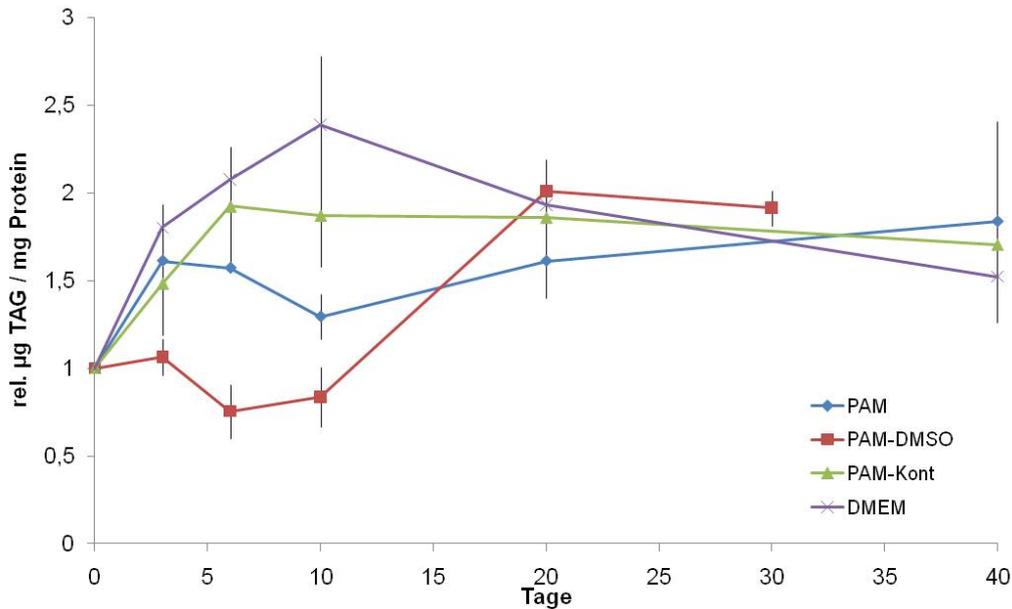


Abb. 4. 23: Relative TAG-Konzentration von Huh7-Zellen unter Langzeitbehandlung mit PAM-Medium mit bzw. ohne DMSO. Als Vergleich wurden Zellen in Kontrollmedien (PAM-Kont, DMEM) kultiviert. Werte wurden auf einen Ausgangswert (Nullwert) bezogen (n = 2).

Zusätzlich untersuchten wir Zellvitalität (MTT) und die Proliferationsaktivität (BrdU) in Huh7-Zellen nach PAM- bzw. PAM-DMSO-Behandlung. Die Zellvitalität und Proliferationsaktivität gingen nach 10-tägiger Behandlung auf etwa 60-80 % im Vergleich zum Anfangswert zurück. Ein toxischer Effekt von DMSO konnte nicht festgestellt werden (Abb. 4. 24A). Doppelimmunfluoreszenzfärbungen nach 10-tägiger PAM-, PAM-DMSO-Behandlung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 sowie mit dem „Tight Junction“ Protein ZO-1 zeigten, dass Perilipin besonders in nicht-proliferierenden, differenzierten Zellen mit dargestellten Gallenkanalikuli, exprimiert wurde (vgl. hierzu Abb. 4. 19B). Zusätzlich waren, in Übereinstimmung mit Immunblot-Analysen (Abb. 4. 21A, Abb. 4. 22A) nach 10 Tagen PAM-DMSO-Behandlung im Gegensatz zu PAM-Behandlung vermehrt Perilipin-positive Lipidtropfen nachweisbar.

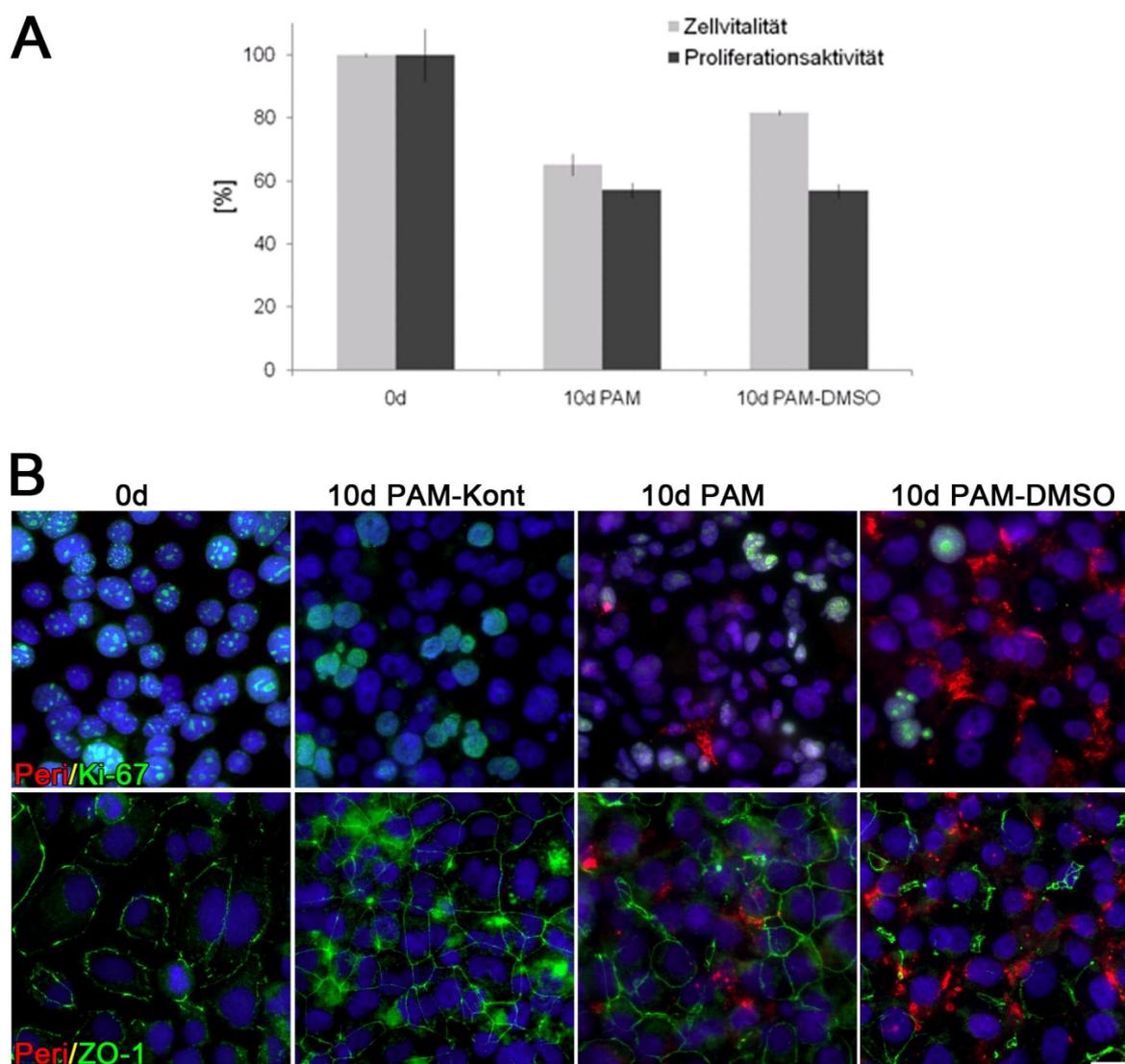


Abb. 4. 24: Relative Zellvitalität, Proliferationsaktivität und Differenzierungsgrad von Huh7-Zellen nach 10-tägiger PAM- oder PAM-DMSO-Behandlung. A) Relative Zellvitalität und Proliferationsaktivität gemessen mit MTT und BrdU in Relation zum Nullwert (0 d). Anzahl der Versuche $n = 5$. B) Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie mit Perilipin (rot) und Ki-67 oder ZO-1 (grün) zum Zeitpunkt 0 und 10 d in Huh7-Zellen nach PAM- und PAM-DMSO-Behandlung sowie in Kontrollzellen. Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Messbalken: 25 μm .

4.2.2.4 PAT-Proteine werden auf (post)-transkriptioneller und posttranslationaler Ebene reguliert

Um Modulatoren der Perilipin-Expression in den chronischen Steatose-Modellen zu bestimmen, wurden Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle im hepatischen Lipidmetabolismus spielen, analysiert. Die PAT-Proteine Perilipin, Adipophilin und MLDP, jedoch nicht TIP47, werden durch die PPARs reguliert. Die PPAR α - und PPAR γ -Proteinmenge nahm während der Behandlung mit Oleat, PAM, PAM-DMSO und Kontrollmedium zu (Abb. 4. 21, Abb. 4. 22A).

Antikörper gegen C/EBP α („CCAAT/Enhancer Binding Protein α “) wiesen zeitlich zuerst eine Zu- und dann Abnahme (Abb. 4. 21) oder nur eine Abnahme (Abb. 4. 22A) der aktiven Isoform (~43 kDa) während PAM-Behandlung nach. Die inaktive Isoform bei ~30 kDa wurde nicht detektiert. Antikörper gegen C/EBP β detektierten mehrere Proteinbanden bei ~55 (LAP*), ~50 und ~45 (LAP) und 20 kDa (LIP) auf (bzgl. Protein-Bandengröße vgl. [240]). Die aktiven Isoformen von C/EBP β (LAP*/LAP) wurden in Zellen mit PAM-Behandlung mit und ohne DMSO, sowie in Kontrollzellen, über die Zeit hochreguliert. Die Proteinmenge der inhibierenden Isoform (LIP) nahm während PAM-Behandlung entweder geringfügig ab (Abb. 4. 21) oder zu (Abb. 4. 22A). SREBP1 zeigte im PAM-Modell nur eine schwache Hochregulation. Einhergehend mit der an- oder absteigenden PAT-Proteinmenge, fand in allen untersuchten Modellen eine Veränderung der Expression von Transkriptionsfaktoren statt.

Perilipin wird auf posttranskriptioneller Ebene durch alternatives Spleißen reguliert, wodurch 3 Isoformen (A, B, C) entstehen können. Perilipin A war in situ die am mengenmäßig am meisten vorkommende Isoform in Immunblot und PCR, aber auch die anderen Isoformen B und C konnten ebenfalls in humanen Lebern nachgewiesen werden (Abb. 4. 2B, Abb. 4. 6). In den *in vitro* Steatose-Modellen konnte nur Perilipin A auf Proteinebene detektiert werden. Auf mRNA-Ebene waren jedoch auch die mRNAs von Perilipin B und C in Huh7-Zellen nach PAM-DMSO-Behandlung nachweisbar (Abb. 4. 25). Die mRNAs von Perilipin B und C konnten in Oleat-, DMSO-Oleat- und PAM-Behandlung ohne DMSO nicht nachgewiesen werden.

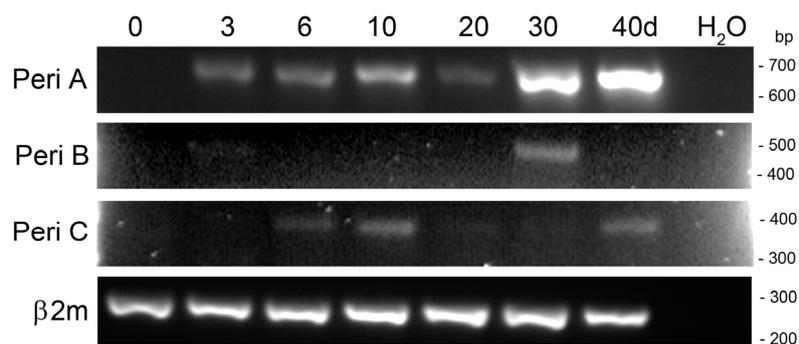


Abb. 4. 25: PCR-Analyse der Perilipin-Isoformen A, B und C in Huh7-Zellen nach PAM-DMSO-Behandlung. Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Proben mit Primern für Perilipin (Peri) A (687 bp), Perilipin B (497 bp) und Perilipin C (374 bp). β -2-Mikroglobulin (β 2m) diente zur Ladekontrolle. Die DNA-Marker ist auf der rechten Seite angegeben. Abk.: bp: Basenpaare.

In der Literatur sind zusätzlich posttranslationale regulatorische Mechanismen der PAT-Proteine bekannt [80, 241]. Die beiden cPAT-Proteine Adipophilin und Perilipin sind nur gebunden an Lipidtropfen vor der Degradation geschützt, weshalb die TAG-Menge einen wichtigen Einfluss auf die PAT-Proteinmenge ausübt. In allen Zellkultur-Modellen korrelierte die Perilipin- und vor allem die Adipophilin-Menge positiv mit der Lipidtropfenakkumulation / TAG-Konzentration (Abb. 4. 20, Abb. 4. 23).

4.2.3 Anwendung der Steatose-Modelle auf Zelllinien nicht-hepatischen Ursprungs

Um zu überprüfen, ob Perilipin auch in Zelllinien anderen Ursprungs induziert werden kann, wurden die Steatose-Zellkulturmodelle (Oleat, PAM, PAM-DMSO sowie Kontrollzellen) in zahlreichen weiteren Zelllinien wie Nierenepithelzellen (Caki-2, HEK-293), Zellen eines kolorektalen Adenokarzinoms (HCT 116), Zellen eines Glioblastoms (LN229), Zellen eines Adenokarzinoms des Gebärmutterhalses (HeLa), Zellen eines Mammakarzinoms (MCF-7) und immortalisierte Keratinozyten (HaCaT) angewendet. Im Langzeit-Oleat-Modell stieg in allen Zelllinien, außer in LN229, Adipophilin an. Die TIP47-Menge nahm nach Oleat-Behandlung in Caki-2-, HeLa- und LN229-Zellen und in PAM-Medium in MCF-7- und HeLa, sowie in Kontrollzellen, mit der Zeit ab. Bei PAM-Behandlung blieb die Adipophilin-Menge gleich. Perilipin konnte mit einer bis zu 13-tägigen PAM-Behandlung und bis zu 35-tägigen Oleat-Behandlung nicht nachgewiesen werden (Abb. 4. 26).

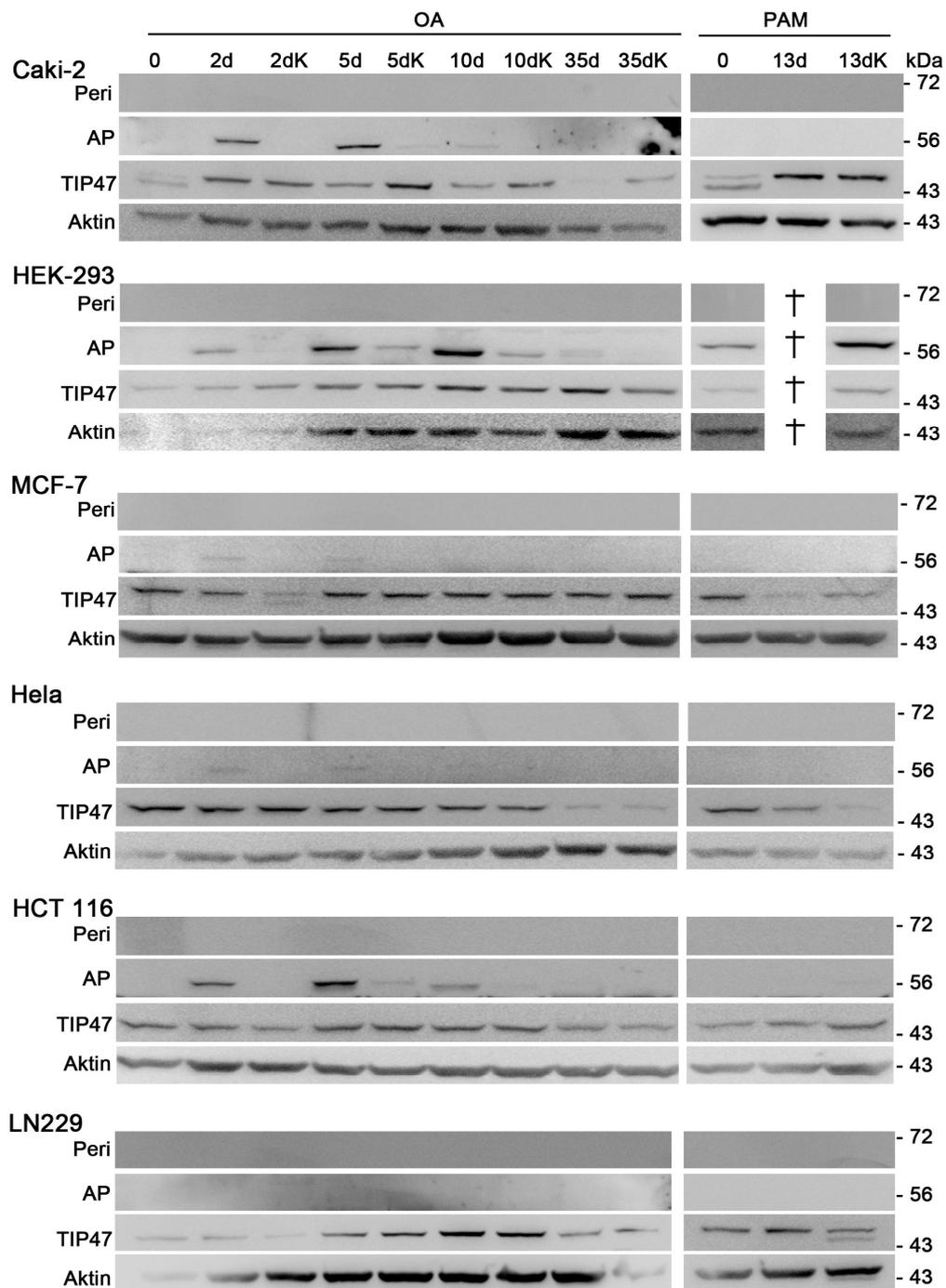


Abb. 4. 26: Immunblot-Analyse von PAT-Proteinen in Caki-2-, HEK-293-, MCF-7-, Hela-, HCT 116- und LN229-Zellen nach Oleat- und PAM-Behandlung. Zellen wurden bis zu 35 Tage mit BSA-Oleat (OA) und bis zu 13 Tage mit PAM-Medium oder in Kontrollmedium (K) inkubiert und auf Perilipin (Peri), Adipophilin (AP) und TIP47 untersucht. †: HEK-293-Zellen starben nach 13 Tagen mit PAM-Medium. Pro Spur wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen (vgl. hierzu Aktin). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt.

Durch den Zusatz von DMSO bei der PAM-Inkubation wurde Adipophilin in Caki-2- und HaCaT-Zellen hochreguliert und TIP47 in allen Zelllinien herunterreguliert (Abb. 4. 27). Perilipin konnte in Immunfluoreszenzfärbungen zu keinem Zeitpunkt detektiert werden, Immunblots zeigten jedoch eine schwache Bande bei ~68 kDa in unbehandelten Hela-Zellen, oder zu späteren Zeitpunkten nach PAM-DMSO-Behandlung in Hela-, Caki-2-, HEK-293-, MCF-7-, HCT 116- und HaCaT-Zellen. Interessanterweise konnte Perilipin in unbehandelten Hela-Zellen im Oleat und PAM-Versuch nicht detektiert werden (Abb. 4. 26). Die Immunblots gegen Perilipin wiesen einen hohen Hintergrund mit vielen unspezifischen Banden auf, sodass unklar bleibt, ob wirklich spezifisch Perilipin induziert wurde; insbesondere da in der Immunfluoreszenzfärbung keine Lipidtropfen angefärbt wurden. Einige Zelllinien starben nach Behandlung mit PAM oder PAM-DMSO ab (Abb. 4. 26, Abb. 4 27). Zusätzlich konnte in MCF-7-, Hela-, LN229- und HaCaT-Zellen während der PAM-DMSO-Behandlung zunehmende MLDP-Mengen nachgewiesen werden.

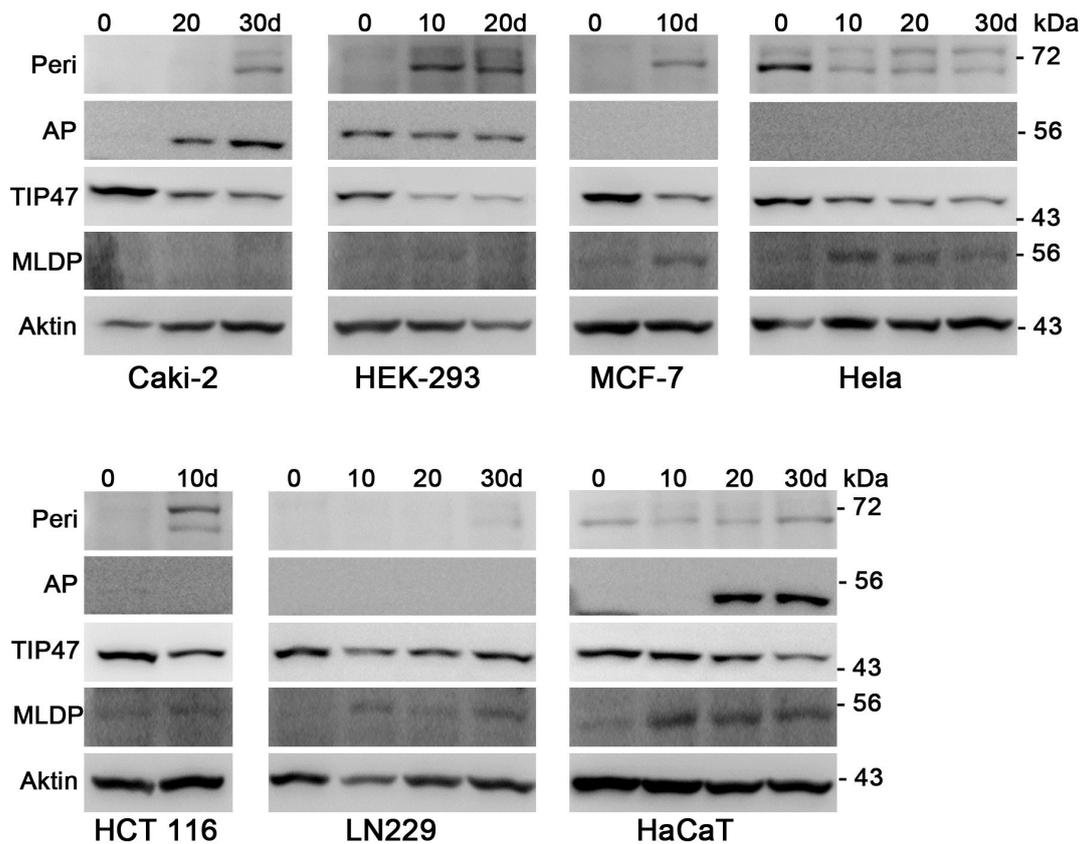


Abb. 4. 27: Immunblot-Analyse von PAT-Proteinen in Caki-2-, HEK-293-, MCF-7-, HeLa-, HCT 116-, LN229- und HaCaT-Zellen nach bis zu 30-tägiger PAM-DMSO-Behandlung. Antikörper gegen Perilipin (Peri), Adipophilin (AP), TIP47 und MLDP detektierten Proteinbanden entsprechender Proteingrößen. HEK-293-, MCF-7- und HCT 116-Zellen starben 10-20 Tagen in PAM-DMSO-Medium. Jeweils 25 µg Protein pro Spur wurde aufgetragen (vgl. hierzu Aktin). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt.

4.3 Effekte einer PAT-Protein-Herunterregulation *in vitro*

4.3.1 Transiente PAT-Herunterregulation (siRNA)

Um das Zusammenspiel der einzelnen PAT-Proteine genauer zu untersuchen wurden die Effekte einer Herunterregulation von Adipophilin und/oder TIP47 in hepatozytären Zellkulturen analysiert. Jeweils 2 unterschiedliche siRNAs gegen Adipophilin bzw. TIP47 erzielten eine deutliche Verminderung der Proteinmenge nach 72 h in Huh7- (Abb. 4. 28A) und HepG2-Zellen (Abb. 4. 28B). Die Herunterregulation von TIP47 zeigte nach 72 h keinen Einfluss auf die Adipophilin-Proteinmenge und die Herunterregulation von Adipophilin keinen auf die TIP47-Proteinmenge. Nach 72 h konnte keine signifikante Expressionsänderung von Perilipin und MLDP durch eine Herunterregulation von

Adipophilin und / oder TIP47 festgestellt werden. Die Zellvitalität wurde durch die Herunterregulation von Adipophilin nach 3 Tagen nur gering reduziert. Die Zellvitalität bei Herunterregulation von TIP47 sank nach 72 h auf ~60% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 4. 28C).

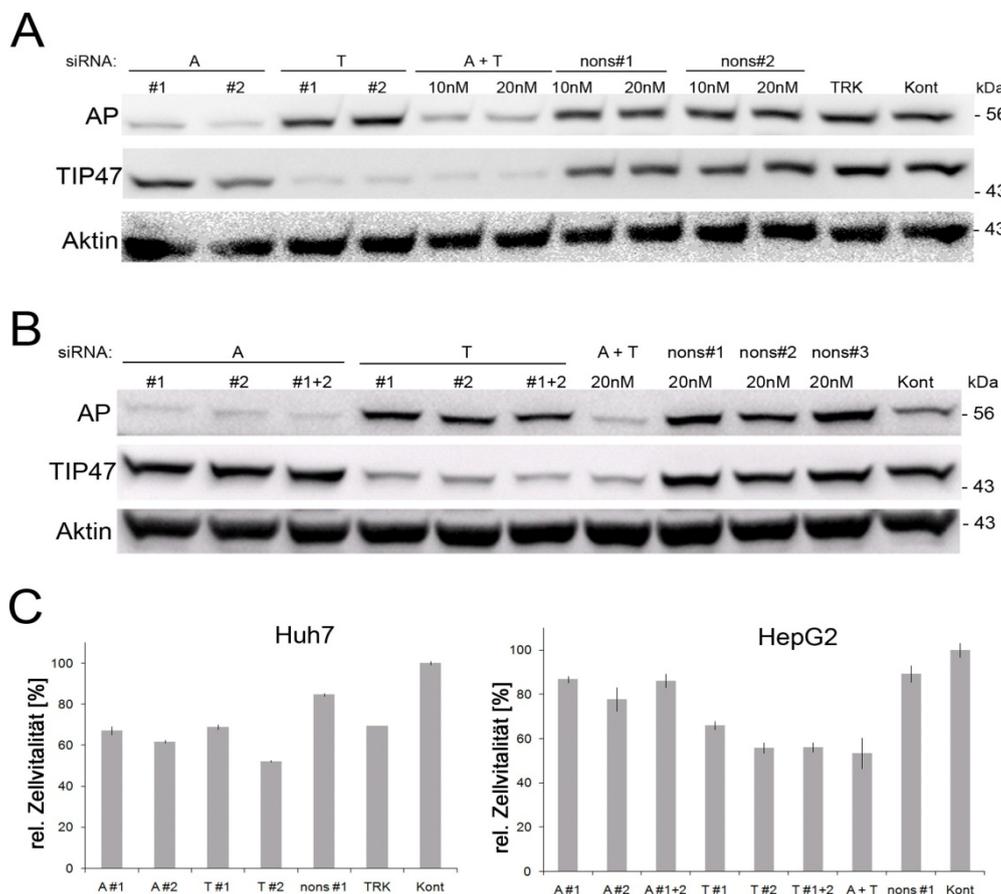


Abb. 4. 28: Immunblot-Analyse und Vitalitätstest (MTT) von Huh7- und HepG2-Zellen nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von Adipophilin und / oder TIP47. A) Immunblot (50 µg Protein / Spur) von Gesamtzelllysaten von Huh7-Zellen und B) Immunblot (jeweils 50 µg Protein pro Spur) von HepG2-Zellen mit Antikörpern gegen Adipophilin (AP, ~55 kDa) und TIP47 (~47 kDa). Die Herunterregulation von Adipophilin (A) und / oder TIP47 (T) wurde mit je zwei unterschiedlichen siRNAs (10 nM) durchgeführt. Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite angegeben. C) Zellvitalitätstest von Huh7 (n = 1) und HepG2 (n = 3) -Zellen mittels MTT-Test. Die Werte sind auf die Kontrollzellen normalisiert. Abk.: nons: nonsense siRNA; TRK: Transfektionsreagenzkontrolle; Kont: unbehandelte Zellen.

4.3.1.1 Herunterregulation von Adipophilin und TIP47 verändert die Lipidtropfenmorphologie

HepG2- und Huh7-Zellen wurden 24 h bzw. 48 h nach Transfektion für 24 h mit Oleat inkubiert und die Lipidtropfen in den lebenden Zellen mit BODIPY angefärbt. Die Oleat-

Inkubation hatte weder einen Einfluss auf die Proteinmenge von Adipophilin und TIP47 in Zellen, die mit siRNAs gegen diese beiden Proteine behandelt waren (Abb. 4. 29A), noch auf die Zellvitalität (Abb. 4. 29B). Die Herunterregulation von TIP47 mit und ohne Oleat-Inkubation, jedoch nicht von Adipophilin, verursachte eine Abnahme der Zellvitalität um 40 %.

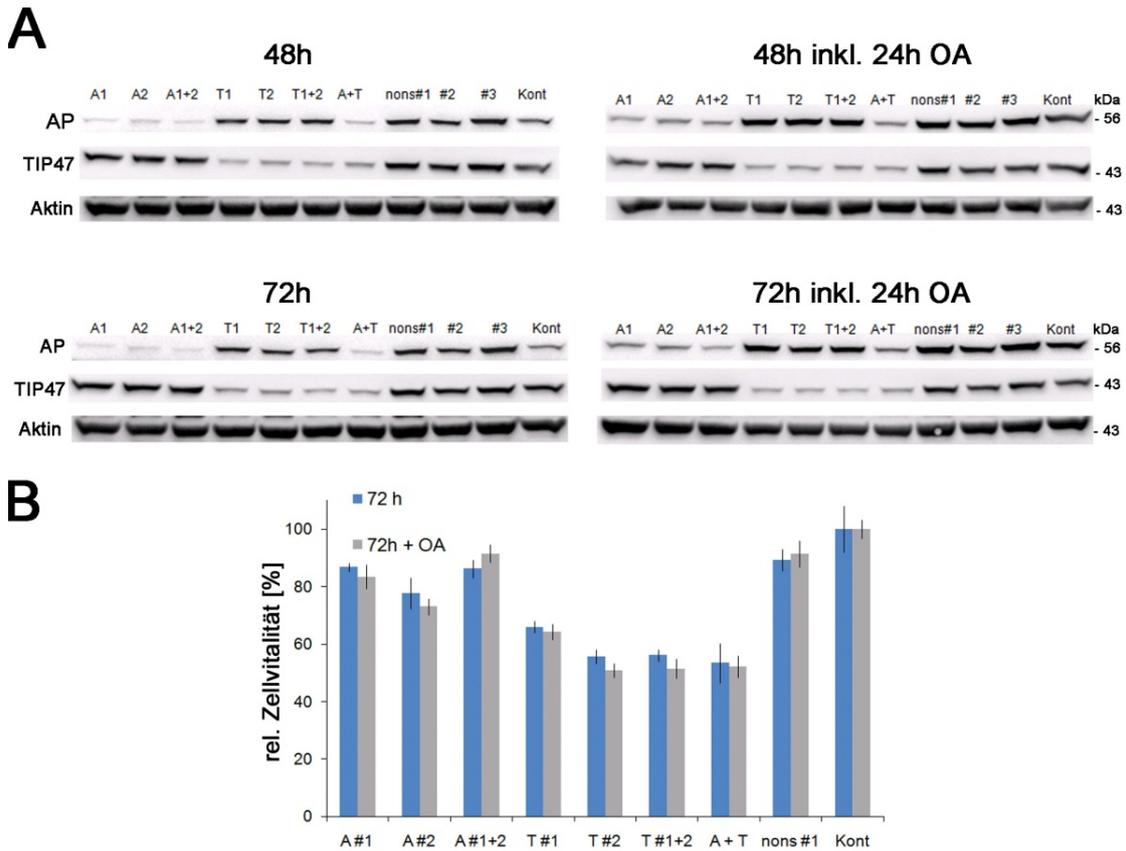


Abb. 4. 29: Immunblot und Zellvitalität siRNA-behandelter HepG2-Zellen mit und ohne Oleat-Behandlung. A) Immunblot (jeweils 50 µg Protein pro Spur) von HepG2-Gesamtproteinlysaten nach siRNA-Behandlung von Adipophilin (A1 und 2, AP) und / oder TIP47 (T1 und 2) für 48 h, 48 h inklusive 24 h Oleat (OA), 72 h oder 72 h inklusive 24 h OA. Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt. B) Zellvitalitätstest (MTT) von HepG2-Zellen unter siRNA-Behandlung mit und ohne Oleat. Abk.: nons: nonsense siRNA; Kont: unbehandelte Zellen.

Bei Fehlen von Adipophilin waren immunfluoreszenzmikroskopisch größere TIP47-positive Lipidtropfen in Huh7- und HepG2-Zellen nach 18 h Oleat-Inkubation nachweisbar. In Kontrollzellen ummantelte Adipophilin Lipidtropfen und das ePAT-Protein TIP47 zeigte eine zytoplasmatische Färbung (Abb. 4. 30).

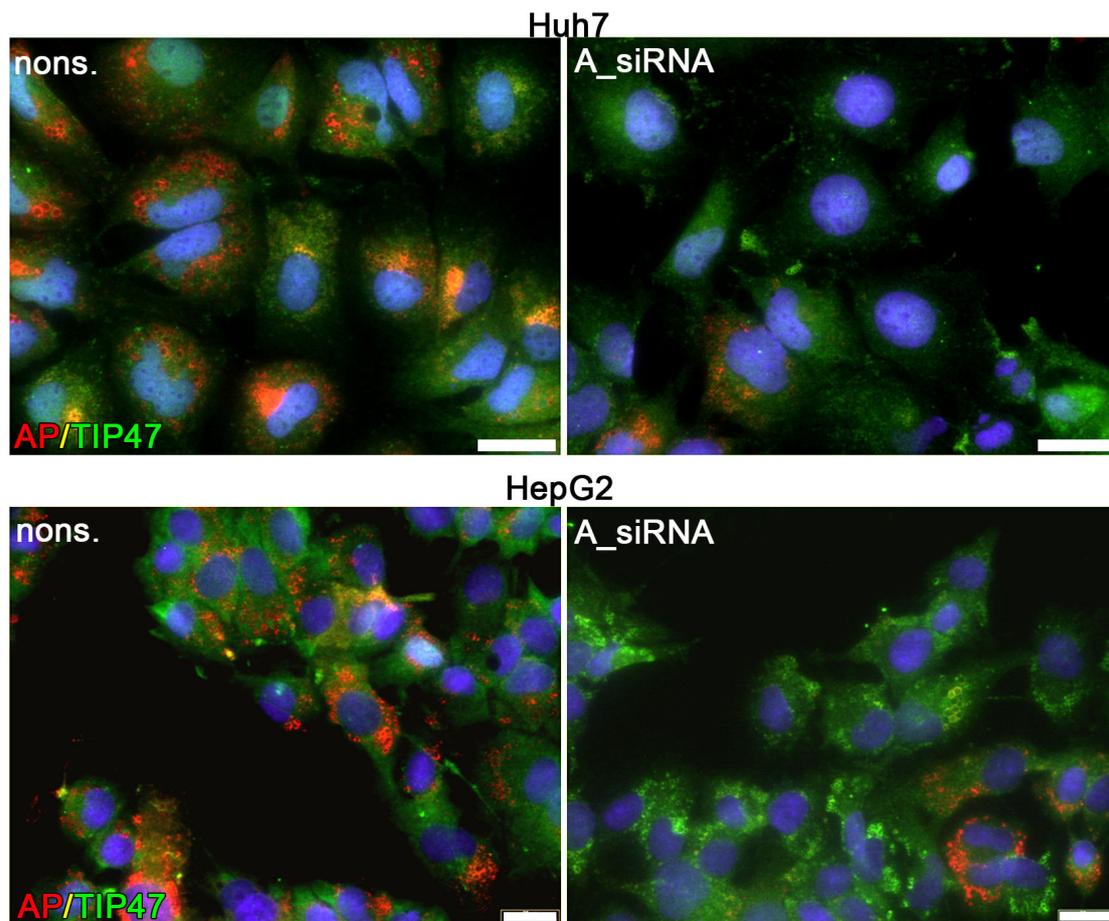


Abb. 4. 30: Immunfluoreszenzmikroskopie von Adipophilin und TIP47 in Huh7- und HepG2-Zellen nach siRNA-Transfektion gegen Adipophilin. 72 h nach Transfektion wurden Huh7- und HepG2-Zellen für 18 h mit Oleat inkubiert. TIP47 (grün) wurde an größere Lipidtröpfchen in Abwesenheit von Adipophilin (AP, rot) rekrutiert. Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Abk.: A_siRNA: siRNA gegen Adipophilin, nons: Kontrollzellen. Messbalken: 20 μ m.

Die Herunterregulation von Adipophilin, insbesondere die kombinierte Abwesenheit von Adipophilin und TIP47 verursachte weniger, aber größere Lipidtröpfchen in HepG2- und Huh7-Zellen (Abb. 4. 31). Kontrollzellen und Zellen mit einer Herunterregulation von TIP47 allein zeigten keine veränderte Lipidtröpfchenmorphologie.

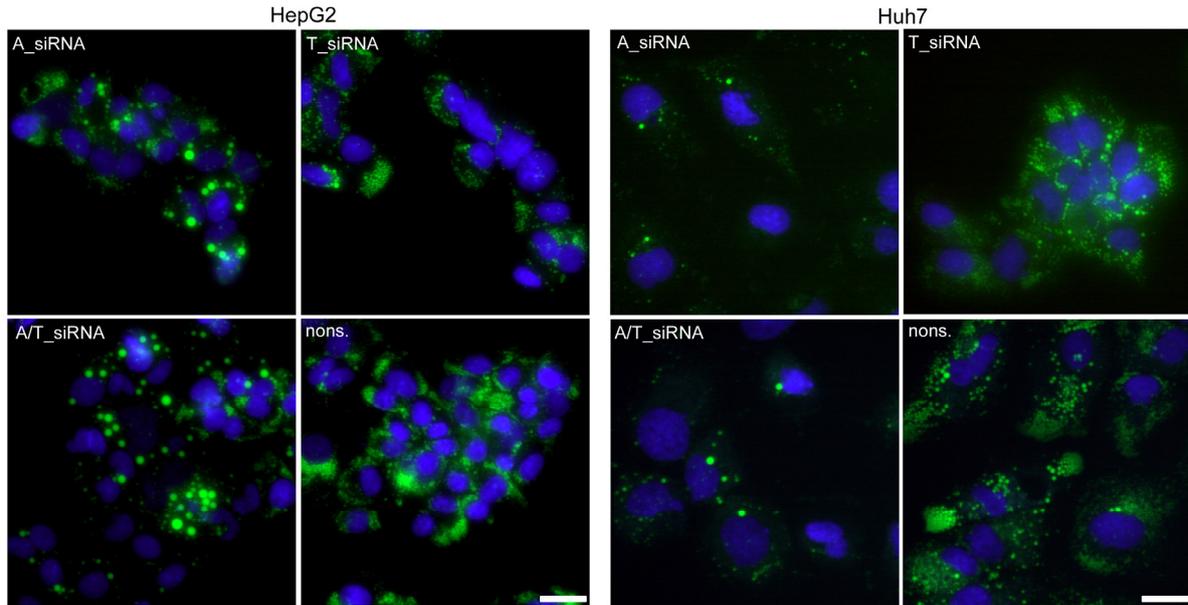


Abb. 4. 31: Veränderte Lipidtropfenmorphologie in HepG2- und Huh7-Zellen durch transiente Herunterregulation von Adipophilin (A) und TIP47 (T). 72 h nach Transfektion einschließlich 24 h Oleat-Inkubation wurden lebende Zellen mit BODIPY (Lipidtropfen, grün) und Höchst33342 (Zellkerne, blau) gefärbt. Abk.: nons: Kontrollzellen. Messbalken jeweils 20 μm .

Zur Klärung der Frage, ob große Lipidtropfen in Zellen mit herunterreguliertem Adipophilin und TIP47 durch Fusion kleinerer Lipidtropfen entstehen, wurden HepG2-Zellen 60-70 h nach Transfektion für ca. 8-12 h mit Oleat inkubiert, die Lipidtropfen in lebenden Zellen mit BODIPY gefärbt und für 24 h Videos aufgenommen. Fusionen von Lipidtropfen wurden während der gesamten Aufnahmezeit beobachtet, wobei aus mittelgroßen, nahe zusammenliegenden Lipidtropfen große Lipidtropfen entstanden (Abb. 4. 32A-C). Die Fusion zwischen 2 Lipidtropfen fand in einem sehr kurzen Zeitraum statt. Die Aufnahmegeschwindigkeit wurde weiter verkürzt (von 4 min auf 0,5 min), jedoch konnte selbst bei einem kurzen Abstand von 0,5 min zwischen 2 Aufnahmen kein Übergangstatus beobachten werden.

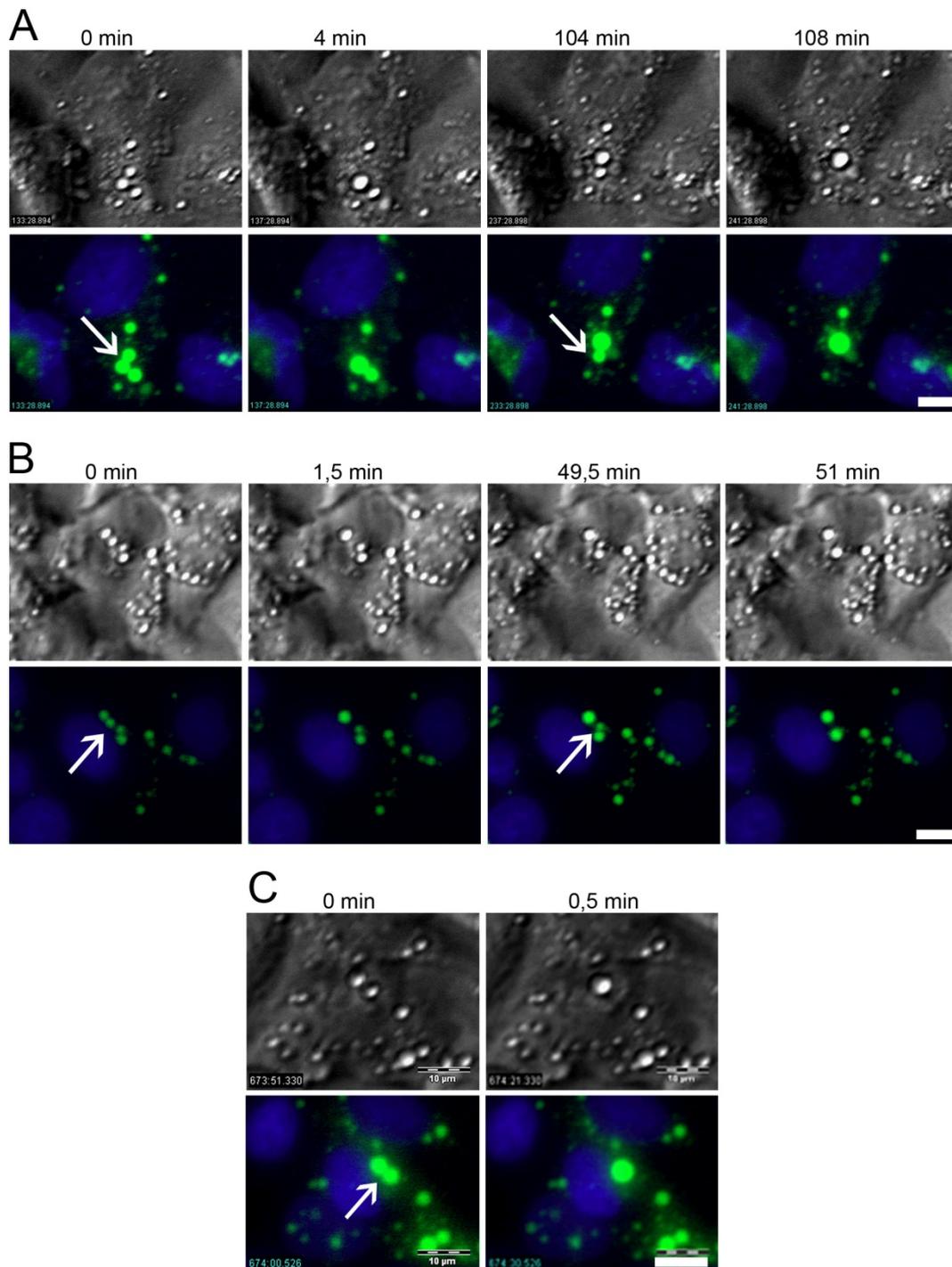


Abb. 4. 32: Fusionen von Lipidtropfen in HepG2-Zellen nach Herunterregulation von Adipophilin und TIP47. Ausschnitte von Videoaufnahmen zu Zeitpunkten direkt vor und nach Fusion von siRNA-behandelten und Oleat-inkubierten Zellen. A) 2 Fusionen von 3 Lipidtropfen zu einem größeren Lipidtropfen (Pfeil). Aufnahmegeschwindigkeit: 1 Bild / 4 min. B) 2 Fusionen von 4 Lipidtropfen zu 2 größeren Lipidtropfen (Pfeil). Aufnahmegeschwindigkeit: 1 Bild / 1,5 min. C) Eine Fusion von 2 Lipidtropfen (Pfeil). Aufnahmegeschwindigkeit: 1 Bild / 0,5 min. Obere Reihe jeweils Phasenkontrast-Aufnahme. Untere Reihe jeweils Lipidtropfen mit BODIPY (grün) angefärbt und Zellkerne sind mit Hoechst 33342 (blau) markiert. Messbalken jeweils 10 μm .

Die Größe des im Fokus liegenden Querschnitts, der an der Fusion beteiligten Lipidtropfen, wurde vor und nach Lipidtropfen-Fusion als Pixelfläche ausgemessen (Tab. 4. 1). Dabei entsprach die Pixelfläche des fusionierten Lipidtropfens näherungsweise der theoretisch erwarteten Fläche. Abweichungen können dadurch erklärt werden, dass die Lipidtropfen nicht immer mit ihrem Mittelpunkt in der Fokusebene lagen. Die Größenänderung legte nahe, dass die Lipidtropfen tatsächlich fusionierten und nicht aus der Fokusebene des Mikroskops entwichen. Folglich entstanden die großen Lipidtropfen in siRNA-behandelten Zellen gegen Adipophilin und TIP47 (Abb. 4. 31, Abb. 4. 33) teilweise durch Fusion. Dies zeigt, dass Adipophilin maßgeblich an der strukturellen Integrität der Lipidtropfen beteiligt ist. Die Beobachtungen schließen jedoch nicht aus, dass zum einen kleinere Lipidtropfen ebenfalls fusionieren und zum anderen Fusionen auch in unbehandelten Zellen vorkommen.

Tab. 4. 1: Auswertung der Lipidtropfengröße (Pixelfläche) vor und nach Lipidtropfen-Fusion.

	Pixelfläche			
	Fusion 1		Fusion 2	
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher
A	293 / 315	558	577 / 192	749
B	225 / 208	300	288 / 216	349
C	238 / 176	398	-	-

A, B und C entsprechen den Videoausschnitten von Abb. 4. 32. Untersucht wurden jeweils 2 Fusionen in A und B und eine Fusion in C.

In Immunblots nach kurzfristiger Herunterregulation von Adipophilin und / oder TIP47 mit oder ohne Oleat-Behandlung konnte kein Perilipin nachgewiesen werden (Abb. 4. 28A, B, Abb. 4. 29A). Jedoch zeigten Immunfluoreszenzfärbungen in den mit Adipophilin siRNA-behandelten HepG2-Zellen nach Zugabe von Oleat für 24 h einige große Perilipin-positive Lipidtropfen (Abb. 4. 33). Im Gegensatz dazu wurden keine Perilipin-positiven Lipidtropfen in Kontrollzellen und in Zellen mit TIP47-Herunterregulation nachgewiesen.

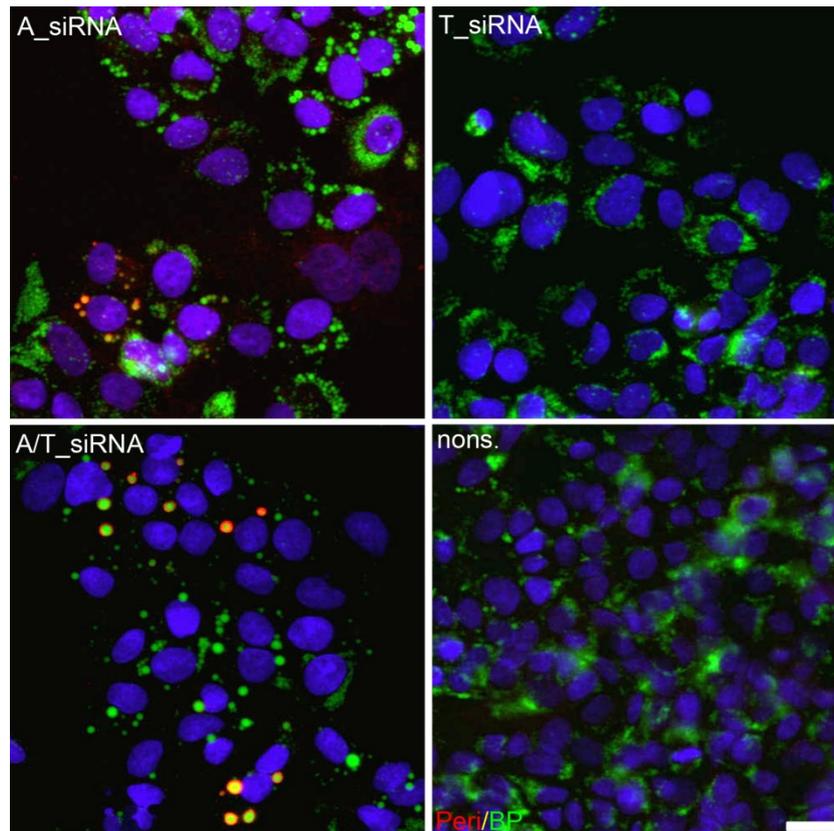


Abb. 4. 33: Immunfluoreszenzmikroskopie von Perilipin in siRNA-behandelten HepG2-Zellen. 48 h nach Transfektion wurden HepG2-Zellen für 24 h mit Oleat inkubiert. Perilipin (Peri) ummantelte meist große BODIPY (BP)-positive Lipidtropfen in Abwesenheit von Adipophilin. Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Abk.: A_siRNA: siRNA gegen Adipophilin, T_siRNA: siRNA gegen TIP47, A/T_siRNA: siRNA gegen Adipophilin und TIP47, nons: Kontrollzellen. Messbalken: 20 µm.

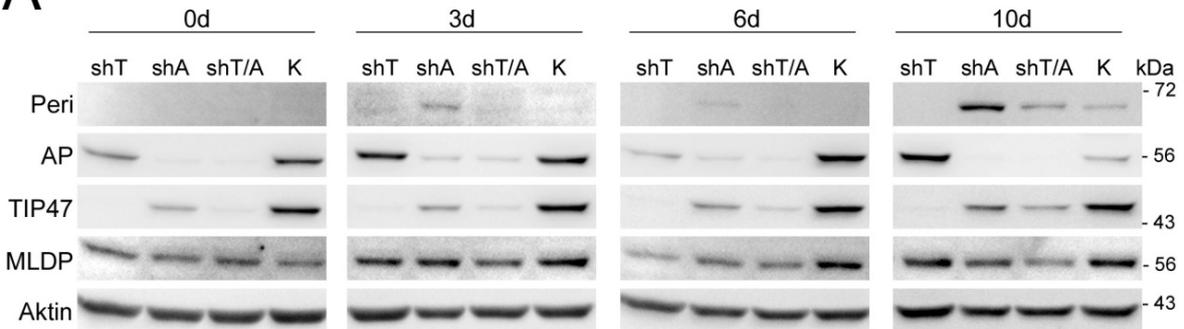
4.3.2 Stabile Herunterregulation von Adipophilin und TIP47 in chronischen Steatose-Modellen induziert Perilipin

Um die Effekte einer Herunterregulation von Adipophilin und / oder TIP47 auf die dynamische PAT-Proteinexpression, besonders von Perilipin, in hepatozytären Zellen genauer analysieren zu können, kombinierten wir die in Abschnitt 4.2.2 charakterisierten Langzeitsteatose-Modelle mit einer stabilen, kontinuierlichen Herunterregulation von Adipophilin und / oder TIP47. Hierfür wählten wir die beiden erfolgreichsten *in vitro* Modelle für die Perilipin-Induktion Oleat-DMSO und PAM-DMSO (Abschnitte 4.2.2.1 und 4.2.2.3). Die stabile Herunterregulation wurde mittels eines lentiviralen Systems der zweiten Generation und synthetisch hergestellten „small hairpin“ Ribonukleinsäuren (shRNA) gegen die mRNA von Adipophilin und TIP47 realisiert (freundliche Gabe von Dr. Marie Hiet und Dr. Gualtiero Alvisi). Die verwendeten shRNAs waren nicht sequenzidentisch mit den vorher verwendeten siRNAs.

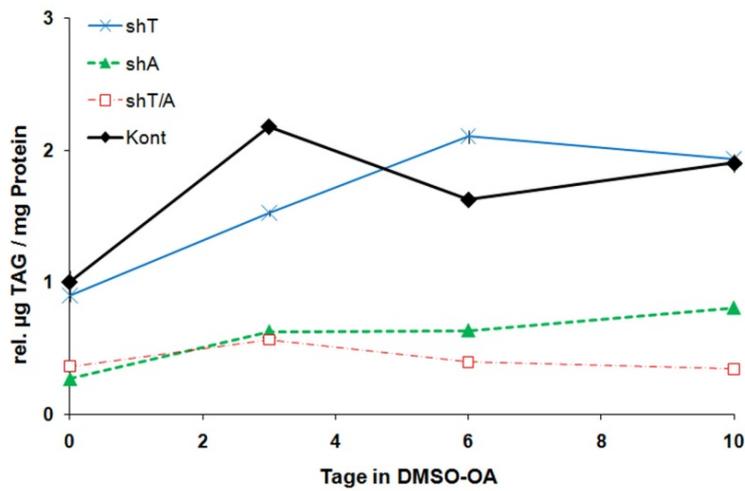
4.3.2.1 Frühere Perilipin-Induktion in Huh7-Zellen in Abwesenheit von Adipophilin durch DMSO-Oleat-Inkubation

Huh7-Zellen mit stabil, kontinuierlich herunterreguliertem TIP47 (Huh7_shT), Adipophilin (Huh7_shA), oder TIP47 und Adipophilin (Huh7_shT/A) wurden bis zu 10 Tage mit einer Kombination aus DMSO und Oleat behandelt (Abschnitt 4.2.2.1).

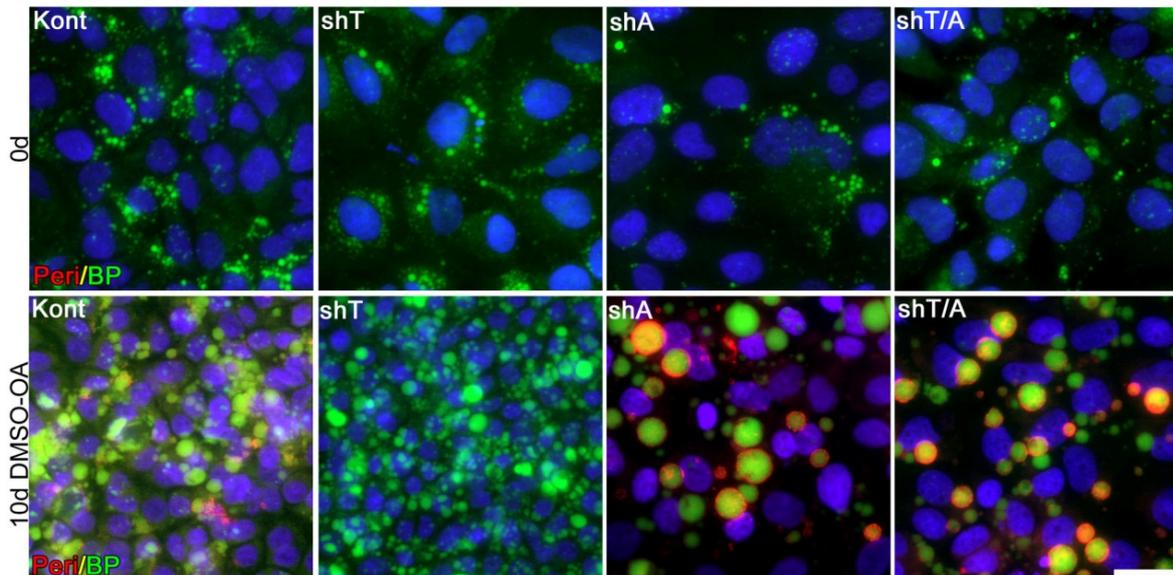
A



B



C



Die Herunterregulation von Adipophilin und TIP47 blieb trotz steatogener Behandlung weitgehend konstant (Abb. 4. 34A). Die Lipidtropfenmorphologie veränderte sich insbesondere bei Herunterregulation von Adipophilin oder TIP47 und Adipophilin zu größeren, aber in der Anzahl geringeren Lipidtropfen im Vergleich zu Huh7_shT- und Kontrollzellen (Abb. 4. 34C). Bereits nach 3 Tagen stieg Perilipin in Huh7_shA-Zellen sichtbar an und nahm weiter zu. Obwohl die Perilipin-Menge in Huh7_shA-Zellen anstieg, blieb die TAG-Konzentration geringer als in Huh7_shT- und Kontrollzellen (Abb. 4. 34B). Die Abwesenheit von TIP47 hatte negative Auswirkungen auf die Perilipin-Induktion, da nach 10 Tagen unter DMSO-Oleat-Behandlung kein Perilipin im Immunblot detektiert werden konnte. Zusätzlich wurde in den Huh7_shT/A-Zellen Perilipin deutlich später induziert, obwohl in diesen Zellen ebenfalls Adipophilin herunterreguliert war, so dass eine frühere Perilipin-Expression erwartet wurde. In normalen Huh7-Zellen wurde Perilipin stets nach 10 Tagen mit DMSO-OA-Behandlung nachgewiesen (Abb. 4. 19A), in Übereinstimmung damit konnte Perilipin in Kontrollzellen ebenfalls erst nach 10 Tagen detektiert werden (Abb. 4. 34A). Die Herunterregulation von Adipophilin resultierte in einer Abnahme von TIP47 im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dies wurde jedoch nicht in siRNA-behandelten Zellen nachgewiesen (Abb. 4. 28A). Huh7_shT-Zellen zeigten unter der DMSO-OA-Inkubation eine starke Varianz zwischen den Zeitwerten in der Adipophilin-Proteinmenge, obwohl die TAG-Menge kontinuierlich zunahm. Die MLDP-Menge nahm in den Kontrollzellen, welche 2-fach mit Kontroll-shRNA transfiziert wurden, mit der Zeit zu. Während die kombinierte Herunterregulation von TIP47 und Adipophilin keinen Einfluss auf die MLDP-Proteinmenge hatte, zeigten Huh7-Zellen mit einer Herunterregulation von Adipophilin oder TIP47 eine schwache Zunahme der MLDP-Proteinmenge mit der Zeit.

Abb. 4. 34: DMSO-Oleat behandelte Huh7-Zellen mit stabiler, kontinuierlicher Herunterregulation von Adipophilin und / oder TIP47. A) Immunblot-Analyse (jeweils 25 µg Protein pro Spur (vgl. hierzu Aktin)) von Perilipin (Peri, ~68 kDa), Adipophilin (AP, ~55 kDa), TIP47 (~47 kDa) und MLDP (~56 kDa) in Huh7-Zellen mit shRNAs gegen TIP47 (shT), Adipophilin (shA) oder gegen TIP47 und Adipophilin (shT/A) sowie Kontrollzellen (Kont) nach 3-10 d DMSO-Oleat-Inkubation. Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite dargestellt. B) Relative TAG-Konzentrationen der shRNA_Huh7-Zellen nach bis zu 10-tägiger DMSO-Oleat-Behandlung. Die Werte beziehen sich auf den Anfangswert (0 d) der Kontrollzellen (n = 1). C) Immunfluoreszenzmikroskopie von Huh7-Zellen nach 0 und 10 d DMSO-Oleat-Behandlung. Perilipin (rot) ummantelt nach 10 d Behandlung große BODIPY (BP)-positive Lipidtropfen (grün) in Huh_shA und Huh7_shT/A-Zellen. Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Messbalken: 25 µm.

4.3.2.2 Expressionserhöhung von Perilipin und MLDP in Abwesenheit von Adipophilin und TIP47 im PAM-DMSO-Modell

Huh7-Zellen wurden mit der stabilen, kontinuierlichen Herunterregulation von TIP47 (Huh7_shT), Adipophilin (Huh7_shA), oder beiden (Huh7_shT/A) im PAM-DMSO-Medium kultiviert (Abschnitt 4.2.2.3). Die Inkubation der Zellen mit PAM-DMSO beeinträchtigte nicht die stabile Herunterregulation von Adipophilin und TIP47 (Abb. 4. 36A). Die Zellvitalität nahm nach 10-tägiger Behandlung in Huh7_shT, _shA und _shT/A um ca. 20 % ab und mit Zusatz von DMSO um 40 %. Die Kontrollzellen zeigten keinen Unterschied nach 10 Tagen mit oder ohne DMSO, ihre Vitalität nahm um 50 % in beiden Behandlungen ab. (Abb. 4. 35). Die Zellproliferation ging nach 10 Tagen in PAM- oder PAM-DMSO-Medium auf 30-50 % zurück, wobei der Effekt von DMSO auf die Proliferationsaktivität der Huh7_shT-Zellen am stärksten war. Interessanterweise zeigten Huh7_shA- und Huh7_shT/A-Zellen eine bessere Überlebensrate nach PAM-DMSO-Behandlung als Huh7_shT- und Kontrollzellen.

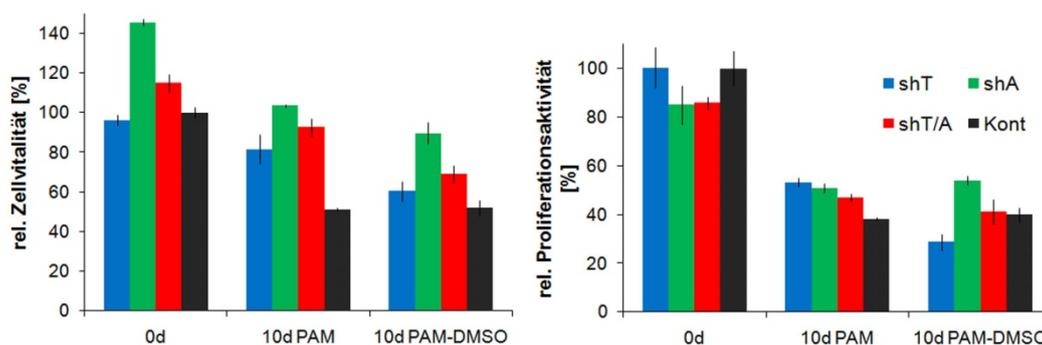
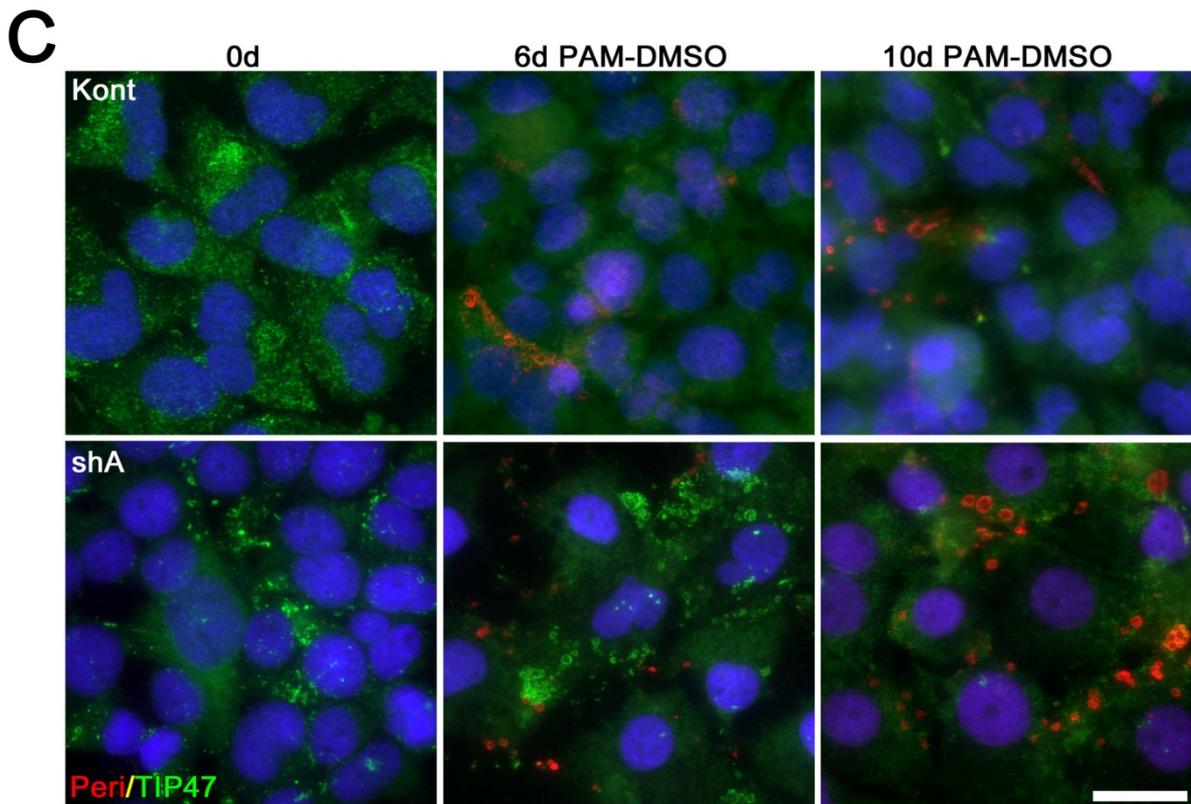
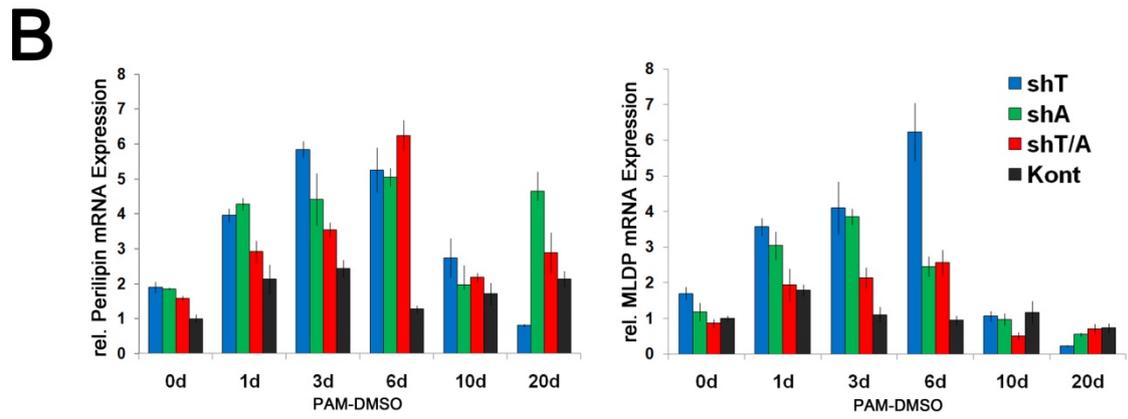
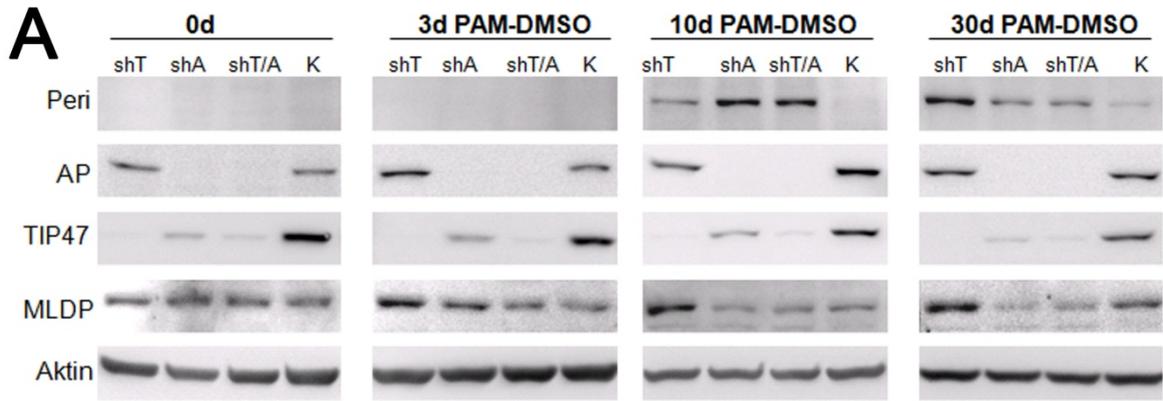


Abb. 4. 35: Zellvitalität (MTT) und Proliferationsaktivität (BrdU) von Huh7-Zellen nach stabiler shRNA-vermittelter Herunterregulation von Adipophilin und TIP47 nach 10 Tagen in PAM- und PAM-DMSO-Medium. Huh7-Zellen mit shRNAs gegen Adipophilin (A), TIP47 (T), TIP47 und Adipophilin (T/A) oder sequenzunspezifisch (Kont) zum Zeitpunkt 0 und 10 Tage nach Behandlung mit PAM-Medium mit und ohne DMSO. Die Werte sind auf den Anfangswert (0 d) der Kontrollzellen normalisiert (n = 5).

Wie für das DMSO-Oleat-Modell gezeigt, wurde Perilipin auch in PAM-DMSO-behandelten Huh7_shA und shT/A-Zellen stärker induziert, als in Huh7_shT oder Kontrollzellen, obwohl der TAG-Gehalt konstant niedrig blieb (Abb. 4. 36A, Abb. 4. 38A). Zu späteren Zeitpunkten war die Perilipin-Proteinmenge in Huh7_shT-Zellen höher als in den Zellen mit einer Adipophilin-Herunterregulation. In Huh7-Zellen mit

herunterreguliertem Adipophilin umrandete TIP47 nach 6-tägiger PAM-DMSO-Behandlung große Lipidtropfen, kolokalisierte jedoch nicht mit Perilipin (Abb. 4. 36C). Nach 10 Tagen Behandlung waren keine großen TIP47-positiven Lipidtropfen mehr nachweisbar, sondern nur noch die zytoplasmatische Färbung von TIP47. Interessanterweise wurde mehr MLDP in Huh7-Zellen mit verminderter TIP47-Menge nachgewiesen, jedoch blieb MLDP nahezu unbeeinflusst in Huh7_shA- und Huh7_shT/A-Zellen. Die Änderung der MLDP-Proteinexpression in Huh7_shT-Zellen korrelierte mit der ansteigenden MLDP mRNA-Expression. Im Gegensatz dazu zeigten Huh7_shT-Zellen im DMSO-OA-Modell nach bis zu 10 Tagen keine stark erhöhte MLDP-Proteinmenge und keine Perilipin-Induktion (Abb. 4. 34A).

In Kontrollzellen, die 2-fach mit einer sequenzspezifischen-shRNA transfiziert wurden, war Perilipin im Immunblot erst nach 30 Tagen nachweisbar. Der zeitliche Unterschied der Perilipin-Induktion im Vergleich zu normalen Huh7-Zellen unter PAM-DMSO-Behandlung könnte durch die 2-fache lentivirale Transfektion erklärt werden. Die relative mRNA-Expression von Perilipin stieg in den ersten Tagen der Behandlung in Huh7_shT-, Huh7_shA- und Huh7_shT/A-Zellen stark an (Abb. 4. 36B). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DMSO-Oleat-Inkubation der shRNA-behandelten Zellen (Abb. 4. 34A) verminderte die Herunterregulation von Adipophilin die TIP47-Proteinmenge im Gegensatz zu den Kontrollzellen, was im Gegensatz zu den siRNA-Ergebnissen steht, in denen die TIP47-Proteinmenge durch die Adipophilin Herunterregulation nicht beeinflusst wurde (Abb. 4. 28). Dies könnten aber auch Nebeneffekte der verwendeten siRNAs sein. Die Adipophilin-Expression in Huh_shT- und Kontrollzellen stieg während des Versuchs an.



Immunfluoreszenzfärbungen von Huh7_shT-, Huh7_shA, Huh7_shT/A-, und Kontrollzellen nach 6 und 10 Tagen PAM-DMSO-Behandlung zeigten neben der zytoplasmatischen Färbung von MLDP große MLDP-positive Lipidtropfen besonders in Zellen mit fehlendem Adipophilin und TIP47 (Abb. 4. 37). Dabei kolokalisierte MLDP mit Perilipin. Huh7-shT-Zellen, welche eine erhöhte MLDP-Proteinmenge nach PAM-DMSO-Behandlung aufwiesen (Abb. 4. 36A), zeigten vermehrt winzige MLDP-positive Lipidtropfen zu Beginn der Behandlung. MLDP ersetzte demnach fehlendes TIP47 und Adipophilin (vgl. hierzu. Abb. 4. 34A).

Abb. 4. 36: Lentiviral-vermittelte stabile Herunterregulation von TIP47 und Adipophilin in Huh7-Zellen nach PAM-DMSO-Behandlung. A) Immunblot von Gesamtzelllysaten (jeweils 25 µg Protein pro Spur) shRNA-transfizierter Huh7-Zellen von Perilipin (Peri, ~68 kDa), Adipophilin (AP, ~55 kDa), TIP47 (~47 kDa) und MLDP (~56 kDa) nach 3, 10 und 30 Tagen PAM-DMSO-Inkubation (TIP47 (shT), Adipophilin (shA), TIP47 und Adipophilin (shT/A) oder sequenzspezifische (K, Kont) shRNA). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite angegeben. B) Relative Perilipin und MLDP mRNA-Expression in Huh7_shT, Huh7_shA, Huh7_shT/A und Kontrollzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach PAM-DMSO-Behandlung. Werte sind auf den Anfangswert (0 d) der Kontrollzellen bezogen. C) Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie von Huh7-shA- und Kontrollzellen nach 0 d, 6 d und 10 d PAM-DMSO-Behandlung, wobei TIP47 (grün) größere Lipidtropfen nach 6 d im Vergleich zu Kontrollzellen ummantelt und nicht mit Perilipin (Peri, rot) kolokalisiert. Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Messbalken: 25 µm.

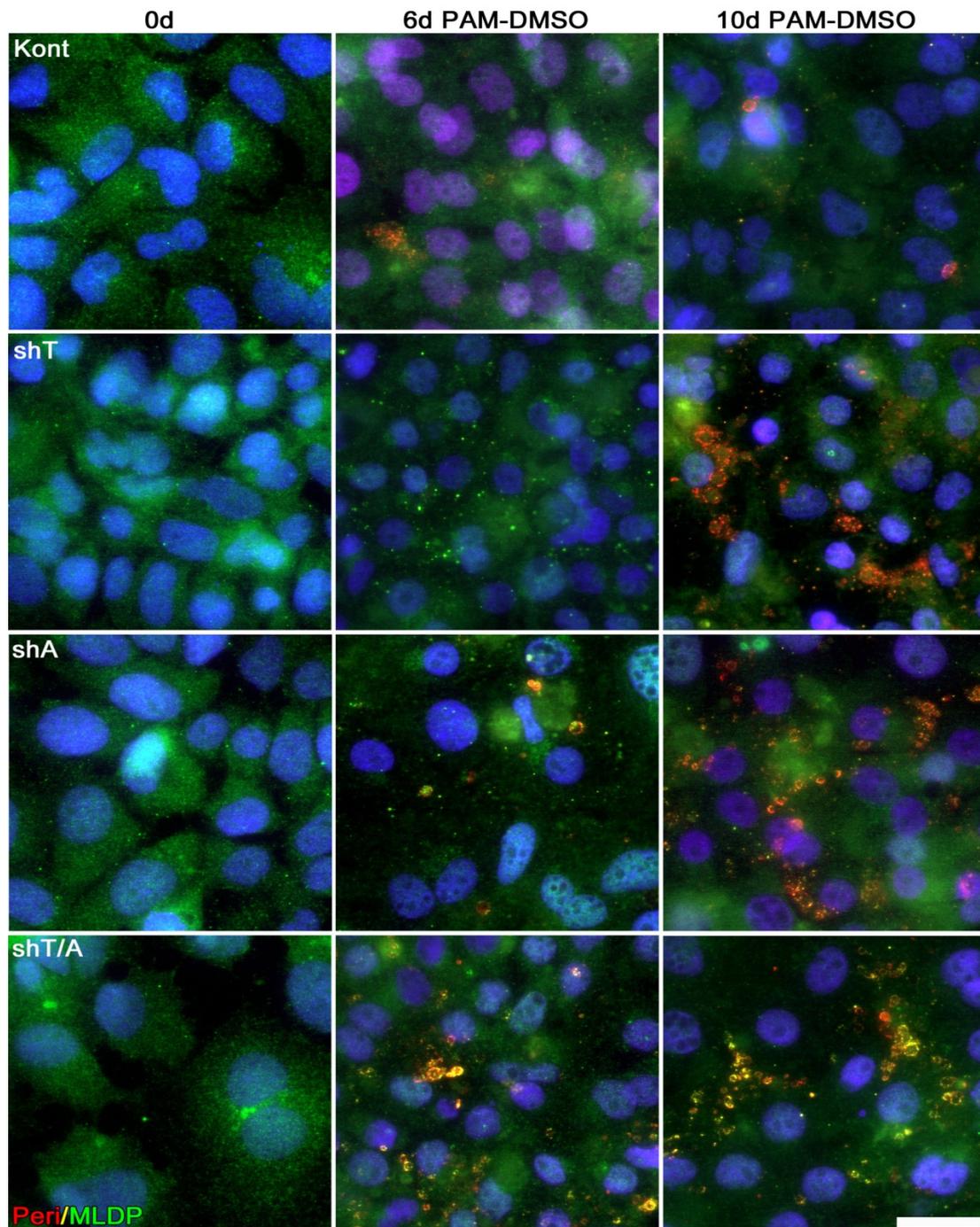


Abb. 4. 37: Immunfluoreszenzmikroskopie von Huh7-Zellen mit lentiviral-vermittelter stabiler Herunterregulation von TIP47 und / oder Adipophilin nach PAM-DMSO-Behandlung. MLDP (grün) ummantelt in Kolokalisation mit Perilipin (Peri, rot) große Lipidtropfen in Huh7_shT/A-Zellen nach 6 d und 10 d PAM-DMSO-Behandlung und winzige Lipidtropfen nach 6 d PAM-DMSO-Behandlung in Huh7_shT-Zellen (shRNAs: TIP47 (shT), Adipophilin (shA), TIP47 und Adipophilin (shT/A) oder sequenzunspezifisch (Kont)). Zellkerne sind blau (DAPI) dargestellt. Messbalken: 25 μ m.

Wie im DMSO-OA-Modell (siehe Abschnitt 4.2.2.1) wurde die Kapazität der TAG-Speicherung in Zellen mit reduzierter Adipophilin-Menge auch im PAM-DMSO-Modell stark beeinträchtigt (Abb. 4. 38B). Im Gegensatz dazu stiegen TAG-Konzentration, Perilipin-, Adipophilin- und MLDP-Menge in Huh7_shT-Zellen und Kontrollzellen während der PAM-DMSO-Behandlung kontinuierlich an (Abb. 4. 38A). In der Immunfluoreszenzmikroskopie waren Perilipin-positive Lipidtropfen in Huh7_shA und Huh7_shT/A-Zellen nach 10-tägiger PAM-DMSO-Inkubation erkennbar (Abb. 4. 38B). Kontrollzellen zeigten zu diesem Zeitpunkt in Übereinstimmung mit den Immunblot-Ergebnissen wenig Perilipin (Abb. 4. 36A). In Huh7_shT-Zellen kolokalisierte Adipophilin mit Perilipin an Lipidtropfen.

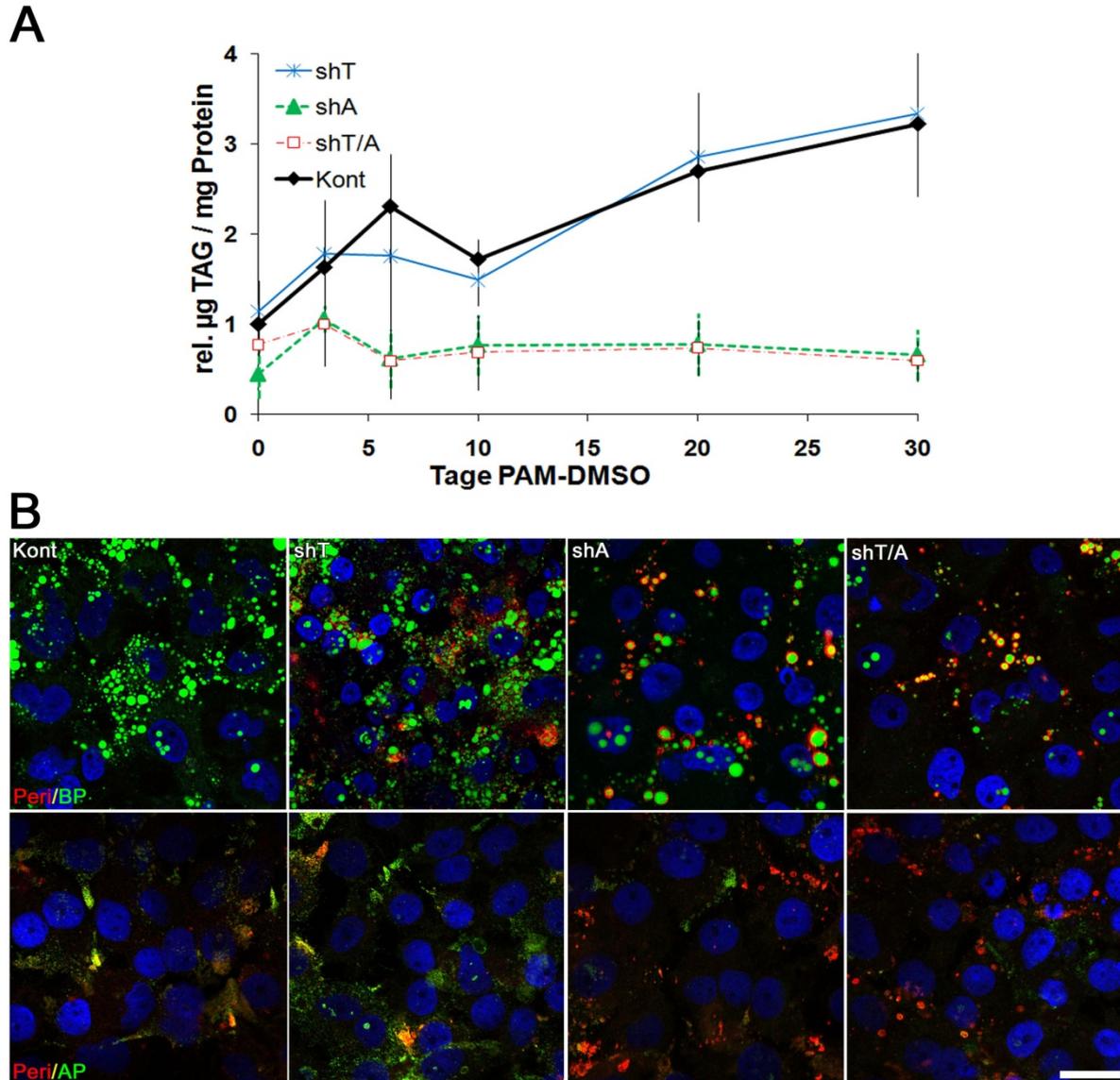


Abb. 4. 38: TAG-Gehalt nach PAM-DMSO-Behandlung in Huh7-Zellen mit lentiviral-vermittelter stabiler Herunterregulation von TIP47 und Adipophilin. A) Relative TAG-Konzentrationen in Huh7_shT, Huh7_shA, Huh7_shT/A and Kontrollzellen nach PAM-DMSO-Behandlung (shRNAs: TIP47 (shT), Adipophilin (shA), TIP47 und Adipophilin (shT/A) oder sequenzunspezifisch (K, Kont)). Die Werte sind auf den Anfangswert der Kontrollzellen bezogen (n = 3). B) Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von Huh7-Zellen nach 10 d PAM-DMSO-Behandlung, wobei Perilipin in Kolokalisation mit Adipophilin (AP, grün) wenige kleine BODIPY (BP)-positive Lipidtröpfchen (grün) in Huh7_shT und nahezu alle im Vergleich größerer Lipidtröpfchen in Huh7_shA, Huh7_shT/A ummantelt. Zellkerne sind blau dargestellt (DAPI). Messbalken: 25 µm.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass Perilipin unabhängig von der zugrunde liegenden Ätiologie eine chronische Steatose *in situ* und *in vitro* charakterisiert. Bei einem akuten Leberschaden translozieren MLDP und TIP47 vom Zytoplasma an die Lipidtropfenoberfläche und Adipophilin wird induziert. Während der Lipidtropfenreifung *in vitro* bei Langzeitbehandlungen von hepatozytären Zellkulturen bis zu 40 Tage mit einer Kombination von DMSO und BSA-gekoppelter Ölsäure oder einer Mischung adipogener und steatogener Substanzen zeigten TIP47, MLDP, Adipophilin und schlussendlich Perilipin eine sequentielle Induktion mit Zunahme der Proteinmenge und Assoziation an Lipidtropfen. Die ePATs TIP47 und MLDP bzw. die cPATs Adipophilin und Perilipin konnten sich bei Fehlen am Lipidtopfen ersetzen, wohingegen Perilipin bei Fehlen von Adipophilin nur partiell die Triacylglyceridmenge im Vergleich zu Kontrollzellen erhöhen konnte.

5.1 Induktion und mögliche Regulation von Perilipin

Perilipin A wurde in Langzeit-Zellkulturmodellen durch verschiedene Agenzien wie BSA-gekoppelte Ölsäure in Kombination mit DMSO oder einer Mischung aus dem PPAR γ -Agonisten Ciglitazon und Hormonen wie L-Thyroxin, Insulin und Dexamethason induziert; nur in sehr geringem Maße jedoch mit BSA-Oleat oder DMSO alleine. Beispielsweise konnte in Leptin-defizienten, adipösen Mäusen keine signifikante Perilipin A-Expression in Hepatozyten nach bis zu einem Jahr beobachtet werden, was auf die Rolle zusätzlicher Faktoren neben einer gewöhnlicher Fettbeladung hinweist [63]. Interessanterweise verursachte die Zugabe von DMSO in den Zellkulturmodellen eine erhebliche Zunahme der Perilipin-Proteinmenge. DMSO ist eine Substanz, die die hepatozelluläre Differenzierung aufrechterhalten bzw. induzieren [237], das Zellwachstum arretieren [239] und das epigenetische Profil [238] beeinflussen kann. Auch ohne DMSO-Behandlung wurde Perilipin vorwiegend in konfluenten, nicht-proliferierenden hepatozytären Zellen mit differenziertem Phänotyp vorgefunden. Neben den durchgeführten Proliferationsaktivitätstests, zeigten Immunfluoreszenzfärbungen in DMSO-Oleat- und PAM-DMSO-behandelten Zellen eine Perilipin-Expression in vorwiegend nicht-proliferierenden Zellen, die Gallenkanalikuli-ähnliche Strukturen ausbildeten. In

Übereinstimmung benötigen Präadipozyten bei der *in vitro* Differenzierung zu Adipozyten mit einhergehender Perilipin-Induktion einen Proliferationsstop bei 100 % Konfluenz [242] und den Zusatz einiger adipogener Substanzen wie z.B. Glukokortikoide [243], Thiazolidine [206] Insulin [215], Dexamethason [244, 245] und IBMX [209]. Da diese Substanzen eine Lipidakkumulation fördern und verschiedenste Transkriptionsfaktoren der Adipogenese in Adipozyten aktivieren, verwendeten wir diese Substanzmischung, um Perilipin *in vitro* in hepatozytären Zelllinien zu induzieren. Dabei lag unser Augenmerk jedoch nicht nur auf einer möglichen Transdifferenzierung von Hepatozyten zu Adipozyten, die eine Ursache für die Perilipin-Expression *in situ* sein könnte [137], sondern auf der Etablierung eines hepatozytären Steatose-Zellkulturmodells, das die *in vivo* Situation besser widerspiegeln sollte [246]. Dies sollte ohne das Einbringen von Expressionsvektoren der PAT-Proteine stattfinden, um Rückschlüsse auf die Regulation und Dynamik der PAT-Proteinexpression *in vivo* ziehen zu können.

In unseren Zellkulturmodellen, in denen unter anderem PPAR γ -Agonisten wie Oleat oder Ciglitazon [247, 248] verwendet wurden, korrelierte der Anstieg von PPAR γ -Proteinmenge mit der Perilipin-Proteinmenge. In unseren Studien wurden Gesamtzelllysate für die Immunblot-Detektion verwendet; Transkriptionsfaktoren der PPAR- oder C/EBP-Familie können jedoch erst durch eine Translokation in den Zellkern aktiv wirken, so dass hier keine Aussage über die Aktivität der Transkriptionsfaktoren möglich ist. PPAR γ , der Haupttranskriptionsfaktor der terminalen adipogenen Differenzierung, aktiviert die Expression von adipogenen und lipogenen Genen [68, 132-134] und wird selbst durch Liganden wie langkettige Fettsäuren [247] und PPAR-Agonisten wie Fibrate [249] oder Thiazolidine / Glitazone [248] aktiviert. In murinen Adipozyten wird die Perilipin-Expression über PPAR γ 2 reguliert, der an ein „Peroxisomen-Proliferator-Response-Element“ (PPRE) in der Perilipin-Promotorregion bindet [68, 69]. Zusätzlich ist PPAR γ 2 in murinen steatotischen Lebern von ob/ob-Mäusen [250] hochreguliert und eine gezielte Deletion von PPAR γ in Hepatozyten schützt Mäuse gegen eine HFD-verursachte Fettleber, wodurch PPAR γ von Moran-Salvador und Koautoren als prosteatotischer Faktor in Hepatozyten bezeichnet wurde [136]. Rahimian [250] sowie Moran-Salvador [136] und Koautoren analysierten allerdings in ihren Studien keine PAT-Proteine. In einer murinen Hepatozyten-Zelllinie (AML12) wurde mittels Überexpression von PPAR γ 2 gezeigt, dass dieser Transkriptionsfaktor einen positiven Effekt auf die Lipidakkumulation und auf die Expression des lipogenen Transkriptionsfaktors SREBP1 hatte [137]. Schadinger und

Koautoren [137] inkubierten 2 Tage postkonfluente PPAR γ 2-exprimierende AML12-Zellen für 5 Tage mit Troglitazon, einem weiteren PPAR γ -Agonisten, und konnten Perilipin weder auf mRNA- noch auf Proteinebene nachweisen. Da in den behandelten AML12-Zellen die Expression nur einiger, aber nicht aller (wie beispielsweise Perilipin und Adiponectin) Adipozyten-spezifische Gene induziert wurde und zusätzlich Hepatozyten-spezifische Gene wie Albumin, α 1-Antitrypsin und „*hepatocyte nuclear factor 4*“ (HNF4) weiterhin exprimiert wurden, schlossen die Autoren daraus, dass die AML12-Zellen bei PPAR γ 2-Überexpression nicht zu Adipozyten transdifferenzierten [137]. In Übereinstimmung konnten wir durch eine alleinige Ciglitazon-Behandlung Perilipin nicht nachweisen. In Langzeitsteatose-Modellen nahm die PPAR γ -Proteinmenge gleichwohl in Perilipin-exprimierenden behandelten Zellen und in nicht Perilipin-exprimierenden Kontrollzellen zu. Der Grund für die PPAR γ -Zunahme in Kontrollzellen liegt höchstwahrscheinlich in der Zunahme des TAG-Gehalts, da verstoffwechseltes TAG freie Fettsäuren freisetzt, welche PPARs induzieren [247]. Da die Perilipin mRNA-Expression einen Anstieg in behandelten und unbehandelten Zellen zeigte, gehen wir davon aus, dass die Zunahme von PPAR γ in unseren Modellen wichtig für die transkriptionelle Perilipin-Induktion ist. Durch die alleinige oder mit Oleat kombinierte Gabe des PPAR-Agonisten Ciglitazon konnte Perilipin jedoch nicht auf Proteinebene in Immunblots nachgewiesen werden, so dass PPAR γ offenbar nicht ausschließlich verantwortlich ist und Kofaktoren hinzu kommen müssen. In geringem Maße wurden vereinzelt Perilipin-positive Lipidtropfen nach Langzeit-Oleat-Behandlung immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Zusätzliche cis-wirkende Elemente scheinen beispielsweise wichtig für die Transaktivierung der Perilipin-Expression unter PPAR γ zu sein, wodurch ein komplexes Regulationssystem entsteht [251]. Shimizu und Koautoren beschrieben NF-1 als einen trans-wirkenden Faktor für eines dieser cis-wirkenden Elemente. Darüber hinaus wurde Perilipin als ein Zielgen des „*Estrogen related receptors α* “ (ERR α) beschrieben [251, 252].

In Übereinstimmung mit dem beschriebenen Einfluss von Dexamethason und Insulin [218] detektierten wir zusätzlich zu PPAR γ eine Zunahme der Proteinmenge von C/EBP β [LAP*/LAP] in PAM-, PAM-DMSO-behandelten und unbehandelten Zellen. C/EBPs regulieren unter anderem die terminale Differenzierung und Proliferation in Hepatozyten und Adipozyten [253, 254], das Fehlen von C/EBP β in *Lep^r^{db/db}*-Mäusen schützt diese vor einer Leberverfettung [255]. Die Tatsache, dass sich Änderungen von C/EBP β [LAP*/LAP] und C/EBP α in behandelten Perilipin-positiven und unbehandelten Perilipin-

negativen Zellen zeigten und dass sich bekanntermaßen die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und C/EBPs gegenseitig beeinflussen [133, 256], deutet auf eine komplexe Perilipin-Induktion hin.

In dieser Studie bestand nur eine partielle Korrelation zwischen der PAT mRNA-Expression und der PAT-Proteinmenge, was auf weitere Regulationsmechanismen hindeutet. Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben bereits, dass die PAT mRNA-Expression nur in geringem Maße mit der entsprechenden Proteinmenge korreliert [84, 103, 257-259]. Weitere Regulationsmechanismen könnten post-transkriptionelle Regulation durch alternatives Spleißen, insbesondere für Perilipin [50], oder post-translationale Regulation wie phosphorylierungs-gesteuerte Lipolyse und proteasomale Degradation bei Fehlen intrazellulärer Lipide [241] und Stabilisation von PAT-Proteinen an Lipidtröpfchen [241] umfassen. Bezüglich alternativen Spleißens wurden für Perilipin 4 Isoformen (A, B, C, D) beschrieben [50]. Die ausführlichste Untersuchung wurde mit murinem Perilipin von Lu und Koautoren durchgeführt, indem genomische und vollständige cDNA-Sequenzen aus primären murinen Adipozyten und steroidogenen Zellen isoliert wurden [50]. Eine vierte Isoform Perilipin D (~26 kDa) wurde auf cDNA-Ebene gezeigt [50, 65], und konnte kürzlich in murinen steroidogenen Zellen auf Proteinebene nachgewiesen werden [66]. Die Transkripte für Perilipin A-C konnten mittels Isoform-spezifischer Primer [63] in Lebern *in situ* und in Huh7-Zellen unter PAM-DMSO-Behandlung nachgewiesen werden. In Immunblots von über 30 humanen Lebergeweben waren jeweils 3 Proteinbanden für Perilipin, vergleichbar zu den Proteinbanden des Fettgewebelysats, bei ~68 kDa, ~52 kDa und ~36 kDa nachweisbar. Interessanterweise waren die beiden Perilipin-Banden bei ~52 kDa und ~36 kDa nur detektierbar, wenn Perilipin A (~68 kDa) ebenfalls vorhanden war. In der hier vorliegenden Arbeit wurde aufbauend zu den Vorarbeiten von Straub und Koautoren [63] das Vorkommen der Perilipin-Isoformen A-C massenspektrometrisch nach Immunpräzipitation mit einem N-terminal bindenden Perilipin-Antikörper untersucht. Die massenspektrometrische Analyse zeigte eine C-terminal abnehmende Sequenzabdeckung mit abnehmender Proteinbandengröße. Diese Daten unterstützen damit das Vorhandensein mehrerer Perilipin-Isoformen in Leber *in situ*. Auf post-translationaler Ebene werden die cPAT-Proteine Adipophilin und Perilipin bekanntermaßen durch steigenden intrazellulären Lipidgehalt stabilisiert [241, 259]. Demnach waren die erhöhten TAG-Gehalte wichtig für die Expression dieser PAT-Proteine, jedoch nicht alleinige Ursache, da die TAG-Konzentration auch in Kontrollzellen anstieg, in welchen keine Perilipin-Induktion

nachzuweisen war. Interessanterweise waren in Mauszellen der Nebennierenrinde und transfizierten Rattenhepatomzellen bestimmte PAT-Proteine entweder bevorzugt an TAG-reichen (Perilipin A und B, MLDP) oder Cholesterin-reichen (Perilipin C, S3-12) Lipidtropfen assoziiert und zeigten zusätzlich einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung [66]. Adipophilin und TIP47 assoziierten an Lipidtropfen unabhängig ihrer Lipidzusammensetzung [66].

Die Adipophilin-Menge und interessanterweise auch die Proteinmenge des ePATs MLDP wurden in unserem Steatose-Modell unter PAM- bzw. PAM-DMSO-Behandlung und in Kontrollzellen ohne stimulierende Faktoren (PAM-Kont) nach 3 Tagen erhöht. Da die ersten 3 Tage ohne FBS-Zusatz durchgeführt wurden, entsprach dies einer 72-stündigen Fastenzeit. Adipophilin wird *in situ* und *in vitro* hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor PPAR α reguliert [69, 82, 83] und in den Langzeitsteatose-Modellen stieg die PPAR α -Menge im Experimentverlauf an. In Übereinstimmung zeigte die Arbeitsgruppe von Nebb, dass die Expression für Adipophilin [84] und MLDP [102] nach 24 h Fasten stark in Hepatozyten und weniger stark in Muskelzellen in PPAR $\alpha^{+/+}$ -Mäusen, jedoch nicht in PPAR $\alpha^{-/-}$ -Mäusen zunahm. Adipophilin konnte aber auch in PPAR $\alpha^{-/-}$ -Mäusen durch Fasten induziert werden, was auf eine alternative Regulation hindeutet [84]. Das zweite ePAT-Protein TIP47 zeigte in Übereinstimmung mit einer PPAR-unabhängigen Regulation [69, 84] keine erhöhte Proteinmenge nach Behandlung.

5.2 PAT-Proteine und Lipidakkumulation

In verfetteten Hepatozyten und hepatozytären Kulturzellen korrelierte die Adipophilin-, Perilipin A- [63], sowie partiell die MLDP-Proteinmenge, nicht jedoch die TIP47-Menge, positiv mit dem Grad der Verfettung. Obwohl MLDP ein ePAT-Protein ist und durch Fettbeladung von z.B. transfizierten CHO- oder AML12-Zellen vom zytoplasmatischen Pool an die Lipidtropfen transloziert, wird die Expression, im Gegensatz zu TIP47, durch Lipidakkumulation erhöht [101, 103, 260].

Die Adipophilin-Proteinmenge korreliert positiv mit der Lipidakkumulation in nicht-adipogenen Zellen, wohl aufgrund der vermehrten Transkription durch die Fettsäuren-induzierte PPAR-Aktivierung und durch die vermehrte intrazelluläre Lipideinlagerung, die Adipophilin stabilisiert [261, 262]. Beispielsweise wurde die Lipidaufnahme in COS7-Zellen oder murinen Fibroblasten durch eine Adipophilin-Überexpression stimuliert [92, 93] und die Lipidakkumulation in Rattenhepatomzellen erhöht [263]. Exogen

überexprimiertes murines Adipophilin in humanen HEK293-Zellen erniedrigte die Anlagerung von Lipasen wie ATGL an Lipidtropfen und reduzierte die TAG-Hydrolyse [94]. In Übereinstimmung mit der positiven Korrelation von Perilipin A und MLDP mit dem TAG-Gehalt der untersuchten Lebergewebe zeigten *in vitro* Überexpressionsstudien in murinen OP-9-Zellen von MLDP [101] und von Perilipin A in murinen 3T3-L1-Präadipozyten [74] ebenfalls eine verstärkte Lipidakkumulation. Bei Fehlen von Perilipin waren betroffene Mäuse schlank mit erhöhter basaler und erniedrigter hormoneller Lipolyse bei gleicher Diät im Vergleich zu Perilipin^{+/+}-Mäusen [75, 76].

In den Steatose-Zellkulturmodellen war die TAG-Menge durch die Herunterregulation von Adipophilin trotz Behandlung mit steatogenen Substanzen bei gleichzeitiger Hochregulation von Perilipin gering gehalten und Huh7-Zellen mit herunterreguliertem Adipophilin zeigten eine bessere Zellvitalität. Das Fehlen von Adipophilin im Mausmodell durch Gendeletion [88] bzw. durch Gabe eines Adipophilin-Antisense-Oligonukleotids [89] verhinderte die Entwicklung einer Fettleber durch hochkalorische Ernährung. Russel und Koautoren veröffentlichten jedoch, dass die ADFP^{-/-}-Mäuse (Gendeletionsmodell) von Chang und Koautoren [88] eine N-terminal verkürzte Adipophilin-Variante exprimieren und dass somit der Knockdown von Adipophilin in diesem Mausmodell nicht vollständig ist [264]. Unter normaler Diät haben ADFP^{-/-}-Mäuse einen bis zu 60% reduzierten hepatischen TAG-Gehalt und eine unveränderte Lipolyse im Fettgewebe im Vergleich zu Wildtypmäusen [88]. mRNA von Perilipin A in der Leber dieser Mäuse war nicht nachweisbar. Die Adipophilin-Antisense-Oligonukleotid-Behandlung in hyperphagen, adipösen Lep^{ob/ob}-Mäusen reduzierte die hepatische TAG-Menge ebenfalls und verbesserte zusätzlich die Insulinsensitivität und Glukosetoleranz [89]. S3-12 und TIP47 wurden durch das Fehlen von Adipophilin nicht beeinflusst. Perilipin A wurde in Lebern in diesem Modell nicht untersucht, ist aber in Mäuselebern, wie auch schon von anderen Autoren gezeigt, negativ. Im Gegensatz zum ADFP^{-/-}-Mausmodell, waren im Antisense-Oligonukleotid-Modell lipogene Proteine, Blutplasma-TAG und die hepatische TAG-Sekretion erniedrigt. Adipophilin ist damit der wichtigste Regulator der Lipidtropfenakkumulation und der beste Angriffspunkt für die therapeutische Reduktion einer hepatozellulären Steatose. Unsere Arbeitsgruppe und andere Autoren sehen Adipophilin übereinstimmend als einen guten und diagnostisch hilfreichen Marker für die Lipidtropfenakkumulation in der Leber und anderen Geweben [45, 63, 261].

In den Zellkultur-Modellen beeinflusste die TIP47-Herunterregulation nicht die TAG-Menge, da dies möglicherweise durch eine erhöhte MLDP-, Adipophilin- und Perilipin-Proteinmenge kompensiert wurde. Im Gegensatz dazu beschrieben Carr und Koautoren 2012 eine um bis zu 50 % verringerte TAG-Menge in Lebern von C57BL/6J-Mäusen nach 4-wöchiger hochkalorischer Diät unter TIP47-Antisense-Oligonukleotid-Behandlung im Gegensatz zu Kontrollmäusen [265]. Studien in AML12-Zellen zeigten im Gegensatz keine verminderte Triacylglycerid-Menge unter Oleat-Inkubation nach Herunterregulation von TIP47 [91]. Beide Arbeitsgruppen untersuchten jedoch nicht die Effekte des Fehlens von TIP47 auf die MLDP-Expression, was die unterschiedliche Lipidakkumulation erklären könnte.

5.3 Modell der Lipidtropfenreifung

In den hier etablierten Steatose-Zellkulturmodellen und in Hepatozyten *in situ* wurden häufige Kollokalisierungen zwischen Perilipin und Adipophilin, TIP47 und Adipophilin, sowie MLDP und Adipophilin bzw. Perilipin beobachtet. Interessanterweise kollokalisieren TIP47 und MLDP *in situ* nur selten, so dass diese beiden Proteine sich offenbar ausschließen. Interessanterweise konnten Bartholomew und Koautoren [266], obwohl überexprimiertes TIP47 und MLDP in CHO-Zellen gemeinsam an winzigen (15 nm) lipidtropfenähnliche Strukturen im zytoplasmatischen Pool vorlagen, keine immunfluoreszenzmikroskopische Kollokalisierung und keine Co-Immunpräzipitation der beiden Proteine zeigen. Die PAT-Proteine lokalisierten in der hier vorliegenden Arbeit um Lipidtropfen unterschiedlicher Größe, d.h. TIP47 und MLDP um winzige Lipidtropfen und Adipophilin, Perilipin und gelegentlich MLDP um mittelgroße und große Lipidtropfen. Die Reifung von Lipidtropfen wurde vor allem in 3T3-L1 Adipozyten und steroidogenen Leydig-Zellen von Mäusen untersucht [47, 57, 58, 98]. In Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Daten fanden Wolins und Koautoren in immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen TIP47, MLDP und S3-12 vorwiegend an winzigen peripheren Lipidtropfen vor, die vom zytoplasmatischen Pool an die naszierenden Lipidtropfen rekrutiert wurden. Zu späteren Zeitpunkten wurden diese durch Adipophilin und schließlich Perilipin A ersetzt [57, 58]. Während die winzigen Lipidtropfen mit TIP47 und S3-12 in der Peripherie der Adipozyten lokalisierten, richteten sich die mittelgroßen Adipophilin-positiven und großen Perilipin A-positiven Lipidtropfen zentral aus [47, 58]. Da TIP47 in der Biogenese von Lipidtropfen eine wichtige Rolle spielt, erscheint es nur sinnvoll, dass es

oft um winzige Lipidtropfen beschrieben wurde [98]. Die Lokalisation von MLDP in Abhängigkeit der Lipidtropfengröße wurde in der Literatur kontrovers beschrieben und variiert je nach Gewebe und Organismus. In Hepatozyten von „*fatty liver dystrophic*“ (*fld*)-Mäusen lokalisierte MLDP an winzigen Lipidtropfen [259], aber in transfizierten murinen Leydig-Zellen ummantelte es größere ringförmige Lipidtropfen [48]. Eine Erklärung für die Lokalisation an unterschiedlich großen Fetttropfen in verschiedenen Zelltypen könnte die sich mit dem metabolischen Zellstatus dynamisch verändernde Protein- und Lipidzusammensetzung sein. In murinen 3T3-L1-Adipozyten fragmentierten nach lipolytischer Aktivierung große Lipidtropfen nach 2 h zu vielen kleinen und verteilten sich in der Zelle. Die fragmentierten kleinen Lipidtropfen sind nun nicht mehr ausschließlich von Perilipin umgeben, sondern von den anderen PAT-Proteinen Adipophilin und S3-12, die unter basalen Bedingungen nicht am Lipidtropfen assoziiert sind [115]. Die einzelnen PAT-Proteinvertreter könnten aufgrund ihrer Assoziation an unterschiedlich große Lipidtropfen eine unterschiedliche Rolle in der Lipidtropfenreifung einnehmen [57, 58]. Unterstützt wird diese Annahme durch Arbeiten in transfizierten Rattenhepatozyten von Hiesh und Koautoren, in denen, im Gegensatz zu Wolins und Koautoren [57] TAG-reiche Perilipin A / B und MLDP-positive Lipidtropfen in der Peripherie und Cholesterin-reiche Lipidtropfen mit S3-12 im Zentrum der Zellen beobachtet wurden [66]. PAT-Überexpressionsstudien in murinen AML12-Zellen zeigten zusätzlich eine Beeinflussung der TAG- bzw. Cholesterinester-Aufnahme in Abhängigkeit des überexprimierten PAT-Proteins [66].

Zusätzlich zu den Lokalisationsstudien in Bezug auf die Lipidtropfengröße, untersuchten wir die Effekte der Herunterregulation von TIP47 und / oder Adipophilin, um weitere Einblicke in die Dynamik der PAT-Proteinzusammensetzung an Lipidtropfen zu gewinnen. In den Steatose-Zellkulturmodellen gelang es uns als Erste, die Expression aller 4 PAT-Proteine ohne das Einbringen zusätzlicher Expressionsvektoren in hepatozytären Zellen zu untersuchen. In den hier durchgeführten lentiviralen und siRNA-Studien mit 24-stündiger Lipidbeladung zeigten Zellen mit herunterreguliertem Adipophilin verstärkt größere TIP47-positive Lipidtropfen. In Immublots wurde keine erhöhte TIP47-Proteinmenge in Zellen mit herunterreguliertem Adipophilin nachgewiesen, da sich aufgrund des ePAT-Charakters von TIP47 die Gesamtproteinmenge von TIP47 in den verwendeten Gesamtzelllysaten nicht veränderte. In einer vergleichenden Studie von Leberzellen mit und ohne Expression vom HCV Core-Protein wurde festgestellt, dass die Core-exprimierenden Zellen weniger

Adipophilin um die Fetttropfen anlagerten, dies durch TIP47 kompensiert wurde und folglich diese Zellen eine Erhöhung des TIP47-Gehalts an Lipidtropfen zeigten [267]. In Übereinstimmung beobachteten verschiedene Arbeitsgruppen eine Kompensation von fehlendem Adipophilin durch TIP47 *in vitro* [52, 90, 91, 267]. Interessanterweise erhöhte sich die MLDP-Proteinmenge in Zellen mit stabil herunterreguliertem TIP47 und MLDP-positive winzige Lipidtropfen waren nachweisbar nach PAM-DMSO-Behandlung. MLDP ummantelte größere Lipidtropfen in Kolokalisation mit Perilipin in Zellen mit herunterreguliertem Adipophilin und TIP47. Das ePAT-Protein MLDP scheint demnach das fehlende ePAT-Protein TIP47 und das fehlende cPAT-Protein Adipophilin zu ersetzen; zusätzlich wurde Perilipin hochreguliert. Im Gegensatz dazu war MLDP in Huh7-Zellen mit herunterreguliertem TIP47 nach DMSO-Oleat-Behandlung nicht erhöht im Immunblot und Perilipin nicht nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass MLDP wichtig für die Reifung der Lipidtropfen und die Assoziation von Perilipin sein könnte. Darüber hinaus ersetzte das cPAT-Protein Perilipin das fehlende Adipophilin an Lipidtropfen. Dies weist auf überlappende Funktionen dieser PAT-Proteine während der Lipidtropfenreifung hin. Mit Doppelimmunfluoreszenzfärbungen konnten wir feststellen, dass Perilipin nur an Lipidtropfen präsent war, die wenigstens geringe Mengen von Adipophilin aufwiesen, so dass möglicherweise zuerst Adipophilin an Lipidtropfen assoziiert und danach Perilipin. Übereinstimmend ersetzte Adipophilin fehlendes Perilipin in univakuolärem Fettgewebe von PLIN^{-/-}-Mäusen [75] und in differenzierenden murinen 3T3-L1-Päradipozyten Perilipin nach 3-4 Tagen Adipophilin [80].

In den siRNA- und lentiviral transfizierten Huh7- und HepG2-Zellen gegen Adipophilin und TIP47 sank die Lipidtropfenanzahl und die Lipidtropfengröße stieg. Effekte einer Herunterregulation von Adipophilin in Hepatozyten auf die Lipidtropfenmorphologie wurden in der Literatur kontrovers beschrieben. Während Chang und Koautoren in ADFP^{-/-}-Mäusen eine Abnahme der Lipidtropfen in Anzahl und Größe in Hepatozyten zeigten [88], wiesen Bell und Koautoren in *in vitro* Adipophilin siRNA-behandelten AML12-Zellen, insbesondere mit kombinierter Herunterregulation von TIP47, weniger, aber größere Lipidtropfen nach [91]. Mit Hilfe von „Live cell imaging“ konnten wir zeigen, dass große Lipidtropfen bei Fehlen von Adipophilin und TIP47 durch Fusion entstanden. Folglich spielen die PAT-Proteine eine besondere Rolle in der Strukturhaltung bzw. Strukturgebung von Lipidtropfen [91]. Die unter normalen zellphysiologischen Bedingungen beobachteten Fusionsraten sind sehr unterschiedlich und der Mechanismus ist

noch nicht vollständig aufgeklärt. In Adipozyten scheint „*cell death-inducing DFFA-like effector c*“ (CIDEC / FSP27) eine Rolle im Fusionsprozess zu spielen, da eine Überexpression dieses Proteins zu größeren [268-270] und ein Fehlen von FSP27 zu kleineren Lipidtropfen [270] führt. Gong und Koautoren [271] zeigten, dass FSP27 am Kontaktpunkt zweier Lipidtropfen den Lipidtransfer vermittelt. In aktuellen Studien wurde Perilipin als Verstärker der FSP27-abhängigen Lipidtropfenvergrößerung in 3T3-L1-Adipozyten nachgewiesen [271, 272]. Übereinstimmend beobachteten wir interessanterweise in Zellen mit herunterreguliertem Adipophilin und TIP47 vereinzelt große Perilipin-positive Lipidtropfen. Fusionen werden zusätzlich durch Phosphatidate positiv beeinflusst [273] und durch eine Verminderung von Phosphatidylcholin durch Minimierung der Oberflächenspannung bei Fettbeladung begünstigt [274-276]. Ein weiteres Konzept der Lipidtropfenfusion beinhaltet das Zusammenspiel von SNAP-Rezeptoren [277]. Zusammenfassend deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass Perilipin Adipophilin ersetzen und MLDP alternativ zu TIP47 wirken könnte. Wir haben in unseren chronischen Verfettungsmodellen eine nacheinanderfolgende Zunahme der Proteinmenge von zuerst TIP47, MLDP, Adipophilin und dann Perilipin während fortschreitender Verfettung beobachtet. Die PAT-Protein-Komposition ändert sich demnach mit der Reifung und Größe der Fetttropfen in Hepatozyten. Zusätzliche Beobachtungen *in situ* zeigen eine perizentrale Lokalisation von Perilipin im Leberläppchen [63]. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen *in situ* und *in vitro* ist Perilipin ein Marker für eine chronische Leberparenchymverfettung, während TIP47 und MLDP stärker bei akuter Leberschädigung exprimiert werden.

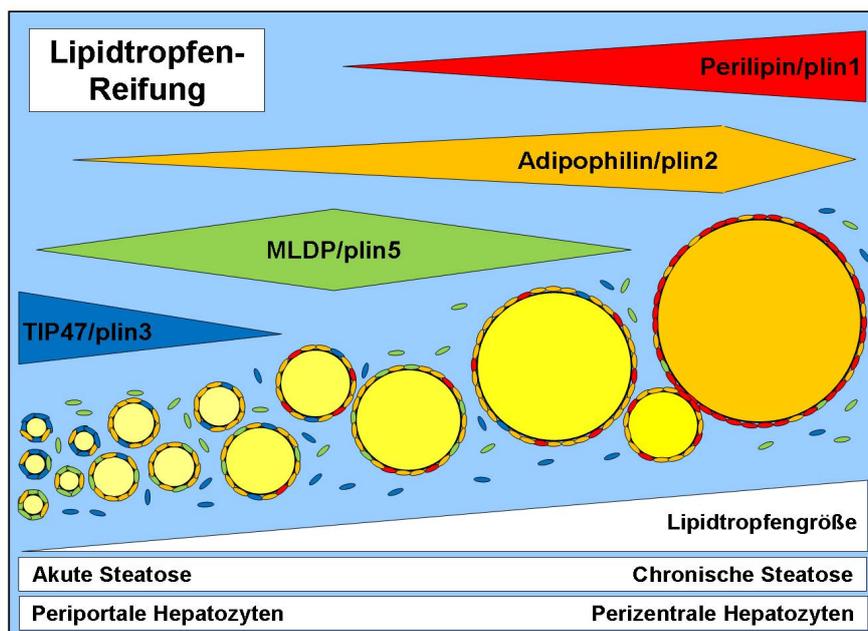


Abb. 5. 1: Schematisches Modell der Lipidtropfenreifung in Hepatozyten. Die PAT-Protein-Komposition ändert sich während der Lipidtropfenreifung, mit der Lipidtropfengröße und der Lokalisation im Leberläppchen. TIP47 und MLDP sind stabil im Zytoplasma und werden an sehr junge Lipidtröpfchen rekrutiert und sequentiell durch Adipophilin und Perilipin ersetzt.

5.4 Perilipin als Marker für eine chronische hepatozelluläre Steatose

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in normalen Hepatozyten Lipidtröpfchen mit TIP47, MLDP und Adipophilin ummantelt sind, jedoch nicht mit Perilipin. Dagegen wiesen Lipidtröpfchen von steatotischen Hepatozyten Positivität für Perilipin, Adipophilin, TIP47 und MLDP auf [63]. Es wurde neben einer Leberparenchymverfettung durch eine alkoholische und nicht-alkoholische Genese und bei chronischer Hepatitis C [63] auch Leberzellverfettung durch Medikamenteneinnahme (z.B. Kortison), Morbus Wilson und genetischen Erkrankungen in Neugeborenen (Glykogenose, Mitochondriopathie) untersucht. Die Perilipin- und Adipophilin-Expression war hierbei unabhängig von der Ätiologie, dem Geschlecht und dem Alter. Übereinstimmend mit der Perilipin-Induktion bei chronischer Leberparenchymverfettung konnten Orlicky und Koautoren 2011 [278] Perilipin A erfolgreich in Mausethern nach chronischer Ethanolgabe für 6 Wochen kombiniert mit hochkalorischer Ernährung (HFD) induzieren. Im Gegensatz war Perilipin A in Mäusethern nach Kurzzeit-Behandlung nicht nachweisbar. In menschlichen Lebern dieser Studie war Ethanol nicht der alleinige ausschlaggebende Faktor für die Perilipin A-Induktion, da auch Patienten mit NAFLD und genetischen Erkrankungen wie Glykogenosen und Mitochondriopathien eine starke hepatische Perilipin-Expression

aufwiesen. Übereinstimmend zu den *in situ* Daten zeigen Untersuchungen in 3T3-L1-Präadipozyten, dass Perilipin A frühestens nach 3 Tagen während der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten nachgewiesen werden kann [80].

Die Rolle von Perilipin in Bezug auf menschliche Fettleber und deren Progression konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, aber es erscheint sogar eine vorteilhafte Rolle möglich. Eine Perilipin-Defizienz im Menschen durch heterozygote C-terminale *PLIN1*-Frameshift Mutationen („*loss-of-function*“) bedingte eine partielle Lipodystrophie, schwere Dyslipidämie, einen Insulin-resistenten Diabetes mellitus und interessanterweise eine Fettleber [279]. Weitere Studien zeigten, dass durch die erhöhte Lipolyse Makrophageninfiltrate und eine verstärkte Fibrose im Fettgewebe dieser Patienten zu beobachten waren und geschlussfolgert dass lipolytische Inhibitoren therapeutisch von Vorteil wären [280]. Übereinstimmend hatte die Gabe von PPAR γ -Agonisten in Patienten mit einer NASH [281-283] oder bei Diabetes mellitus [284, 285] vorteilhafte Effekte auf den hepatischen Fettgehalt, obwohl PPAR γ eine prosteatotische Rolle bei NAFLD [136] besitzt. Patienten mit einer NASH, die mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon behandelt wurden, zeigten weniger ballonierte Hepatozyten und eine verbesserte Insulinsensitivität, Nekroinflammation, eine geringere Fibrose und niedrigere Leberenzymwerte sowie weniger Steatose trotz Gewichtszunahme [281, 282]. Die Untersuchung der Perilipin-Expression in diesen Patienten wäre interessant, da PPAR γ ein Hauptregulator von Perilipin ist. Neuere Studien mit Ratten unter 8-wöchiger hochkalorischer Ernährung mit dem weniger toxischen PPAR γ -Agonisten SKLB102 zeigten ebenfalls eine um 50 % reduzierte Steatose, eine erhöhte Insulinsensitivität und erhöhte Adiponectin-Konzentration, sowie eine verringerte Leptin-Konzentration im Blut im Vergleich zu Kontrollratten [286]. Die Perilipin-vermittelte TAG-Speicherung könnte also Patienten mit Fettleber und Fettleberhepatitis vor Lipotoxizität schützen. Borg und Koautoren [287] konnten zeigen, dass eine Überexpression von Perilipin in einer Rattenzelllinie klonaler β -Zellen diese vor Lipotoxizität schützten, indem die Zellen vermehrt Lipide akkumulierten und eine verminderte lipolytische Aktivität aufwiesen. Die duale Rolle von Perilipin in der lipolytischen Regulation wird hier deutlich; während unphosphoryliertes Perilipin Lipide vor Lipasen schützt [74] und so Zellen vor lipotoxischen Effekten bewahrt, benötigt die maximale Lipolyse in Adipozyten mehrfach phosphoryliertes Perilipin [44, 70, 141]. Ob Perilipin jedoch in steatotischen Hepatozyten ebenfalls eine Rolle in der phosphorylierungs-gesteuerten Lipolyse hat, bleibt ungewiss. Auch für Adipophilin sind

protektive Effekte beschrieben; so verhinderte Adipophilin eine Apoptose in den Nierentubulusepithelien von Diabetes mellitus-Patienten [288].

Bereits die jetzigen Kenntnisse über die Funktion der PAT-Proteine bieten viele diagnostische und therapeutische Einsatzmöglichkeiten. TIP47 und MLDP sind vor allem um Lipidtropfen während eines akuten Leberschadens mit einhergehender akuter Verfettung vorhanden und scheinen sich gegenseitig zu kompensieren (Pawella et al. in Vorbereitung). Während Adipophilin in nahezu jeder akuten und chronischen Fettleber, in der Leberzirrhose und im HCC vorhanden ist, ist Perilipin nur bei chronischen Lebererkrankungen exprimiert und nimmt in den meisten Fällen während der Karzinogenese ab [64]. Immunhistochemische Analysen der PAT-Proteine könnten daher die histopathologische Definition steatotischer Lebererkrankungen aber auch von akuten und chronischen Leberschaden unterstützen.

Experimente dieser Arbeit und anderer Arbeitsgruppen zeigten [88, 89], dass das Fehlen von Adipophilin, im Gegensatz zum Fehlen von TIP47, die Lipidakkumulation in Hepatozyten bzw. hepatozytären Kulturzellen vermindert. Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass Perilipin das fehlende Adipophilin zwar ersetzt, aber nicht die Lipidakkumulation in gleichem Maße wie Adipophilin unterstützt. Dies macht Adipophilin zu einer geeigneten Zielstruktur in der Behandlung einer Fettleber oder Fettleberhepatitis. Perilipin könnte verbleibende Lipide ummanteln und die Zellen, unter Einsatz von lipolytischen Inhibitoren wie beispielsweise PPAR γ -Agonisten, längere Zeit vor erhöhter Lipolyse und Lipotoxizität schützen. Da HCCs viele Adipophilin- und TIP47-positive Lipidtropfen aufweisen [64], wäre es denkbar, Zellen durch Herunterregulation von Adipophilin oder TIP47 die Energie für das schnelle Zellwachstum zu nehmen. PAT-Proteine, insbesondere das cPAT-Protein Adipophilin, sind damit interessante therapeutische Zielstrukturen bei Lipid-assoziierten Erkrankungen der Leber und anderer Organe.

6. Literatur

1. Greenberg, A.S., et al., *The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2102-10.
2. Unger, R.H., et al., *Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 209-14.
3. Olofsson, S.O., et al., *The formation of lipid droplets: possible role in the development of insulin resistance/type 2 diabetes*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2011. **85**(5): p. 215-8.
4. Kopelman, P.G., *Obesity as a medical problem*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 635-43.
5. Murphy, D.J., *The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms*. Prog Lipid Res, 2001. **40**(5): p. 325-438.
6. Listenberger, L.L., et al., *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3077-82.
7. Feldstein, A.E., et al., *Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway*. Hepatology, 2004. **40**(1): p. 185-94.
8. Ricchi, M., et al., *Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes*. J Gastroenterol Hepatol, 2009. **24**(5): p. 830-40.
9. Liu, L., et al., *DGAT1 expression increases heart triglyceride content but ameliorates lipotoxicity*. J Biol Chem, 2009. **284**(52): p. 36312-23.
10. Kuramoto, K., et al., *Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation*. J Biol Chem, 2012. **287**(28): p. 23852-63.
11. Bosma, M., et al., *Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2679-90.
12. Shao, S., et al., *Signaling molecules involved in lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction*. DNA Cell Biol, 2013. **32**(2): p. 41-9.
13. El-Assaad, W., et al., *Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 4154-63.
14. Walther, T.C. and R.V. Farese, Jr., *Lipid droplets and cellular lipid metabolism*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 687-714.
15. Neuschwander-Tetri, B.A., *Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 774-88.
16. Martin, S. and R.G. Parton, *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 373-8.
17. Gibbons, G.F., K. Islam, and R.J. Pease, *Mobilisation of triacylglycerol stores*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1483**(1): p. 37-57.
18. Binns, D., et al., *An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies*. J Cell Biol, 2006. **173**(5): p. 719-31.
19. Blanchette-Mackie, E.J. and R.O. Scow, *Movement of lipolytic products to mitochondria in brown adipose tissue of young rats: an electron microscope study*. J Lipid Res, 1983. **24**(3): p. 229-44.

20. Yokoi, Y., et al., *Regulated expression by PPARalpha and unique localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11 protein in mouse intestine and liver*. FEBS J, 2007. **274**(18): p. 4837-47.
21. Guo, Y., et al., *Lipid droplets at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 6): p. 749-52.
22. Miyanari, Y., et al., *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(9): p. 1089-97.
23. Mersmann, H.J., J.R. Goodman, and L.J. Brown, *Development of swine adipose tissue: morphology and chemical composition*. J Lipid Res, 1975. **16**(4): p. 269-79.
24. Szabo, D., K.S. Szalay, and I.E. Toth, *Correlation of lipid droplet content and steroidogenic capacity in zona glomerulosa and fasciculata cells from lipoprotein-deficient rats*. Mol Cell Endocrinol, 1984. **34**(1): p. 59-66.
25. McGookey, D.J. and R.G. Anderson, *Morphological characterization of the cholesteryl ester cycle in cultured mouse macrophage foam cells*. J Cell Biol, 1983. **97**(4): p. 1156-68.
26. Blaner, W.S., et al., *Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 467-73.
27. Bartz, R., et al., *Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 837-47.
28. Tauchi-Sato, K., et al., *The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 44507-12.
29. Gross, D.N., et al., *Dynamics of lipid droplet-associated proteins during hormonally stimulated lipolysis in engineered adipocytes: stabilization and lipid droplet binding of adipocyte differentiation-related protein/adipophilin*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(2): p. 459-66.
30. Novikoff, A.B., et al., *Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes*. J Cell Biol, 1980. **87**(1): p. 180-96.
31. Turro, S., et al., *Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets*. Traffic, 2006. **7**(9): p. 1254-69.
32. Robenek, H., et al., *Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 20): p. 4215-24.
33. Lacey DJ, B.F., Dempsey CE, Shewry PR, Napier JA, *The accumulation of triacylglycerols within the endoplasmic reticulum of developing seeds of Helianthus annuus*. Plant J, 1999. **17**: p. 397-405.
34. Murphy, D.J. and J. Vance, *Mechanisms of lipid-body formation*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(3): p. 109-15.
35. Ploegh, H.L., *A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 435-8.
36. Walther, T.C. and R.V. Farese, Jr., *The life of lipid droplets*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 459-66.
37. Kuerschner, L., C. Moessinger, and C. Thiele, *Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets*. Traffic, 2008. **9**(3): p. 338-52.
38. Murphy, S., S. Martin, and R.G. Parton, *Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15030.
39. Bostrom, P., et al., *Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(9): p. 1945-51.

40. Londos, C., et al., *On the control of lipolysis in adipocytes*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **892**: p. 155-68.
41. Zimmermann, R., et al., *Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 494-500.
42. Londos, C., et al., *Role of PAT proteins in lipid metabolism*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 45-9.
43. Bickel, P.E., J.T. Tansey, and M.A. Welte, *PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 419-40.
44. Greenberg, A.S., et al., *Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11341-6.
45. Heid, H.W., et al., *Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases*. Cell Tissue Res, 1998. **294**(2): p. 309-21.
46. Wolins, N.E., B. Rubin, and D.L. Brasaemle, *TIP47 associates with lipid droplets*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5101-8.
47. Wolins, N.E., et al., *Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37713-21.
48. Yamaguchi, T., et al., *MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14232-40.
49. Kimmel, A.R., et al., *Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins*. J Lipid Res, 2010. **51**(3): p. 468-71.
50. Lu, X., et al., *The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin*. Mamm Genome, 2001. **12**(9): p. 741-9.
51. Bussell, R., Jr. and D. Eliezer, *A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins*. J Mol Biol, 2003. **329**(4): p. 763-78.
52. Ohsaki, Y., et al., *Recruitment of TIP47 to lipid droplets is controlled by the putative hydrophobic cleft*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(1): p. 279-87.
53. Garcia, A., et al., *The central domain is required to target and anchor perilipin A to lipid droplets*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 625-35.
54. Subramanian, V., et al., *Hydrophobic sequences target and anchor perilipin A to lipid droplets*. J Lipid Res, 2004. **45**(11): p. 1983-91.
55. Hynson, R.M., et al., *Solution structure studies of monomeric human TIP47/perilipin-3 reveal a highly extended conformation*. Proteins, 2012. **80**(8): p. 2046-55.
56. Hickenbottom, S.J., et al., *Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47*. Structure, 2004. **12**(7): p. 1199-207.
57. Wolins, N.E., D.L. Brasaemle, and P.E. Bickel, *A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins*. FEBS Lett, 2006. **580**(23): p. 5484-91.
58. Wolins, N.E., et al., *S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 19146-55.
59. Xu, G., C. Sztalryd, and C. Londos, *Degradation of perilipin is mediated through ubiquitination-proteasome pathway*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(1): p. 83-90.

60. Kovsan, J., et al., *Regulation of adipocyte lipolysis by degradation of the perilipin protein: nelfinavir enhances lysosome-mediated perilipin proteolysis*. J Biol Chem, 2007. **282**(30): p. 21704-11.
61. Egan, J.J., et al., *Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation*. J Biol Chem, 1990. **265**(31): p. 18769-75.
62. Greenberg, A.S., et al., *Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 12035-9.
63. Straub, B.K., et al., *Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis*. Hepatology, 2008. **47**(6): p. 1936-46.
64. Straub, B.K., et al., *Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis*. Mod Pathol, 2010. **23**(3): p. 480-92.
65. Servetnick, D.A., et al., *Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16970-3.
66. Hsieh, K., et al., *Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 17): p. 4067-76.
67. Nishiu, J., T. Tanaka, and Y. Nakamura, *Isolation and chromosomal mapping of the human homolog of perilipin (PLIN), a rat adipose tissue-specific gene, by differential display method*. Genomics, 1998. **48**(2): p. 254-7.
68. Arimura, N., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10070-6.
69. Dalen, K.T., et al., *Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1243-52.
70. Miyoshi, H., et al., *Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 996-1002.
71. Shen, W.J., et al., *Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis*. J Lipid Res, 2009. **50**(11): p. 2306-13.
72. Subramanian, V., et al., *Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 42062-71.
73. Lass, A., et al., *Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome*. Cell Metab, 2006. **3**(5): p. 309-19.
74. Brasaemle, D.L., et al., *Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38486-93.
75. Tansey, J.T., et al., *Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6494-9.
76. Martinez-Botas, J., et al., *Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in Lepr(db/db) mice*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 474-9.
77. Miyoshi, H., et al., *Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity*. J Lipid Res, 2010. **51**(5): p. 975-82.

78. Jiang, H.P., S.E. Harris, and G. Serrero, *Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246*. Cell Growth Differ, 1992. **3**(1): p. 21-30.
79. Jiang, H.P. and G. Serrero, *Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 7856-60.
80. Brasaemle, D.L., et al., *Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein*. J Lipid Res, 1997. **38**(11): p. 2249-63.
81. Heid, H.W., M. Schnolzer, and T.W. Keenan, *Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane*. Biochem J, 1996. **320 (Pt 3)**: p. 1025-30.
82. Targett-Adams, P., et al., *A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1728**(1-2): p. 95-104.
83. Edvardsson, U., et al., *PPARalpha activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes*. J Lipid Res, 2006. **47**(2): p. 329-40.
84. Dalen, K.T., et al., *PPARalpha activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver*. J Lipid Res, 2006. **47**(5): p. 931-43.
85. Motomura, W., et al., *Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(4): p. 1111-8.
86. Gimm, T., et al., *Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1*. FASEB J, 2010. **24**(11): p. 4443-58.
87. Hu, C.J., et al., *Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(24): p. 9361-74.
88. Chang, B.H., et al., *Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(3): p. 1063-76.
89. Imai, Y., et al., *Reduction of hepatosteatosis and lipid levels by an adipose differentiation-related protein antisense oligonucleotide*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 1947-54.
90. Sztalryd, C., et al., *Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34341-8.
91. Bell, M., et al., *Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance*. Diabetes, 2008. **57**(8): p. 2037-45.
92. Gao, J. and G. Serrero, *Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 16825-30.
93. Imamura, M., et al., *ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(4): p. E775-83.

94. Listenberger, L.L., et al., *Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover*. J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2751-61.
95. Diaz, E. and S.R. Pfeffer, *TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking*. Cell, 1998. **93**(3): p. 433-43.
96. Miura, S., et al., *Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, Drosophila, and Dictyostelium*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32253-7.
97. Bulankina, A.V., et al., *TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets*. J Cell Biol, 2009. **185**(4): p. 641-55.
98. Skinner, J.R., et al., *Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization*. J Biol Chem, 2009. **284**(45): p. 30941-8.
99. Lopez-Verges, S., et al., *Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(40): p. 14947-52.
100. Scherer, P.E., et al., *Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(6): p. 581-6.
101. Wolins, N.E., et al., *OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3418-28.
102. Dalen, K.T., et al., *LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(2): p. 210-27.
103. Li, H., et al., *LSDP5 enhances triglyceride storage in hepatocytes by influencing lipolysis and fatty acid beta-oxidation of lipid droplets*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e36712.
104. Takahashi, Y., et al., *The gene expression of the myocardial lipid droplet protein is highly regulated by PPARgamma in adipocytes differentiated from MEFs or SVCs*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **399**(2): p. 209-14.
105. Wang, H. and C. Sztalryd, *Oxidative tissue: perilipin 5 links storage with the furnace*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(6): p. 197-203.
106. Granneman, J.G., et al., *Functional interactions between Mldp (LSDP5) and Abhd5 in the control of intracellular lipid accumulation*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 3049-57.
107. Granneman, J.G., et al., *Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase*. J Biol Chem, 2011. **286**(7): p. 5126-35.
108. Wang, H., et al., *Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein*. J Biol Chem, 2011. **286**(18): p. 15707-15.
109. Wang, H., et al., *Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria*. J Lipid Res, 2011. **52**(12): p. 2159-68.
110. Chan, A.P., M. Kloc, and L.D. Etkin, *fatvg encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FVLE1) to localize to the vegetal cortex of Xenopus oocytes*. Development, 1999. **126**(22): p. 4943-53.
111. Gronke, S., et al., *Control of fat storage by a Drosophila PAT domain protein*. Curr Biol, 2003. **13**(7): p. 603-6.
112. Wang, C. and R.J. St Leger, *The Metarhizium anisopliae Perilipin Homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, Appressorial Turgor Pressure, and Virulence*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21110-5.

113. Liu, P., et al., *Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3787-92.
114. Cermelli, S., et al., *The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot*. Curr Biol, 2006. **16**(18): p. 1783-95.
115. Brasaemle, D.L., et al., *Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46835-42.
116. Yang, L., et al., *The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans*. J Lipid Res, 2012. **53**(7): p. 1245-53.
117. Ding, Y., et al., *Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012. **44**(5): p. 394-406.
118. Welte, M.A., *Proteins under new management: lipid droplets deliver*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(8): p. 363-9.
119. Ohsaki, Y., et al., *Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(6): p. 2674-83.
120. Cole, N.B., et al., *Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6344-52.
121. Franke, W.W., M. Hergt, and C. Grund, *Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules*. Cell, 1987. **49**(1): p. 131-41.
122. Prattes, S., et al., *Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 17)**: p. 2977-89.
123. Bartz, R., et al., *Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation*. J Proteome Res, 2007. **6**(8): p. 3256-65.
124. Ozeki, S., et al., *Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 12): p. 2601-11.
125. Robenek, H., M.J. Robenek, and D. Troyer, *PAT family proteins pervade lipid droplet cores*. J Lipid Res, 2005. **46**(6): p. 1331-8.
126. Shubeita, G.T., et al., *Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1-driven lipid droplets*. Cell, 2008. **135**(6): p. 1098-107.
127. Klemm, E.J., E. Spooner, and H.L. Ploegh, *Dual role of ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) in lipid droplet accumulation and endoplasmic reticulum (ER) protein quality control*. J Biol Chem, 2011. **286**(43): p. 37602-14.
128. Umlauf, E., et al., *Association of stomatin with lipid bodies*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23699-709.
129. Tang, Q.Q., T.C. Otto, and M.D. Lane, *Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 44-9.
130. Yeh, W.C., et al., *Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins*. Genes Dev, 1995. **9**(2): p. 168-81.

131. Tang, Q.Q., J.W. Zhang, and M. Daniel Lane, *Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **319**(1): p. 235-9.
132. Rosen, E.D., et al., *PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro*. *Mol Cell*, 1999. **4**(4): p. 611-7.
133. Rosen, E.D., et al., *C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway*. *Genes Dev*, 2002. **16**(1): p. 22-6.
134. Wu, Z., et al., *PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(1): p. 22-32.
135. He, W., et al., *Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(26): p. 15712-7.
136. Moran-Salvador, E., et al., *Role for PPARgamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts*. *FASEB J*, 2011. **25**(8): p. 2538-50.
137. Schadinger, S.E., et al., *PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **288**(6): p. E1195-205.
138. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor*. *Cell*, 1997. **89**(3): p. 331-40.
139. Tontonoz, P., et al., *ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(8): p. 4753-9.
140. Kim, J.B. and B.M. Spiegelman, *ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism*. *Genes Dev*, 1996. **10**(9): p. 1096-107.
141. Brasaemle, D.L., et al., *Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism*. *Mol Cell Biochem*, 2009. **326**(1-2): p. 15-21.
142. Zimmermann, R., et al., *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. *Science*, 2004. **306**(5700): p. 1383-6.
143. Haemmerle, G., et al., *Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4806-15.
144. Sztalryd, C., et al., *Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(6): p. 1093-103.
145. Chmelarova, M. and M. Chmelar, *Heterogeneity of triglyceride lipase of rat adipocytes. Comparison of triglyceride and monoglyceride lipase activities in soluble and particulate fractions*. *Eur J Biochem*, 1974. **44**(1): p. 235-42.
146. Karlsson, M., et al., *cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(43): p. 27218-23.
147. Bedogni, G., et al., *Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study*. *Hepatology*, 2005. **42**(1): p. 44-52.
148. Szczepaniak, L.S., et al., *Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **288**(2): p. E462-8.

149. Guzman, M. and J. Castro, *Alterations in the regulatory properties of hepatic fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I activity after ethanol feeding and withdrawal*. Alcohol Clin Exp Res, 1990. **14**(3): p. 472-7.
150. Crabb, D.W., et al., *Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver: role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. Alcohol, 2004. **34**(1): p. 35-8.
151. You, M. and D.W. Crabb, *Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver: role of sterol regulatory element-binding proteins*. Alcohol, 2004. **34**(1): p. 39-43.
152. Garcia-Villafranca, J., A. Guillen, and J. Castro, *Ethanol consumption impairs regulation of fatty acid metabolism by decreasing the activity of AMP-activated protein kinase in rat liver*. Biochimie, 2008. **90**(3): p. 460-6.
153. Cohen, J.C., J.D. Horton, and H.H. Hobbs, *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Science, 2011. **332**(6037): p. 1519-23.
154. Marchesini, G., G. Forlani, and E. Bugianesi, *Is liver disease a threat to patients with metabolic disorders?* Ann Med, 2005. **37**(5): p. 333-46.
155. Farrell, G.C. and C.Z. Larter, *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S99-S112.
156. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
157. Chitturi, S. and G.C. Farrell, *Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 27-41.
158. Charlton, M., et al., *Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2002. **35**(4): p. 898-904.
159. Bradbury, M.W. and P.D. Berk, *Lipid metabolism in hepatic steatosis*. Clin Liver Dis, 2004. **8**(3): p. 639-71, xi.
160. Grieco, A., et al., *Fatty liver and drugs*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2005. **9**(5): p. 261-3.
161. Shimomura, I., Y. Bashmakov, and J.D. Horton, *Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30028-32.
162. Burt, A.D.P., C. D.; Ferrell, L. D., *MacSween's Pathology Of The Liver*. 5 ed2007, Philadelphia, USA: Elsevier.
163. Starley, B.Q., C.J. Calcagno, and S.A. Harrison, *Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection*. Hepatology, 2010. **51**(5): p. 1820-32.
164. Kew, M.C. and H. Popper, *Relationship between hepatocellular carcinoma and cirrhosis*. Semin Liver Dis, 1984. **4**(2): p. 136-46.
165. Llovet, J.M., A. Burroughs, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2003. **362**(9399): p. 1907-17.
166. Day, C.P. and O.F. James, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology, 1998. **114**(4): p. 842-5.
167. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
168. Shah, P.K., *Innate immune pathway links obesity to insulin resistance*. Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1531-3.
169. Naugler, W.E., et al., *Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production*. Science, 2007. **317**(5834): p. 121-4.
170. Tilg, H., et al., *Serum levels of cytokines in chronic liver diseases*. Gastroenterology, 1992. **103**(1): p. 264-74.

171. Park, E.J., et al., *Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression*. Cell, 2010. **140**(2): p. 197-208.
172. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
173. Gomaa, A.I., et al., *Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(27): p. 4300-8.
174. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
175. Kirk, G.D., et al., *The Gambia Liver Cancer Study: Infection with hepatitis B and C and the risk of hepatocellular carcinoma in West Africa*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 211-9.
176. Chen, C.J., L.Y. Wang, and M.W. Yu, *Epidemiology of hepatitis B virus infection in the Asia-Pacific region*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15 Suppl**: p. E3-6.
177. Qian, G.S., et al., *A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994. **3**(1): p. 3-10.
178. Yoshizawa, H., *Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future*. Oncology, 2002. **62 Suppl 1**: p. 8-17.
179. Hoek, J.B. and J.G. Pastorino, *Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury*. Alcohol, 2002. **27**(1): p. 63-8.
180. Purohit, V., et al., *Roles of alcohol and tobacco exposure in the development of hepatocellular carcinoma*. Life Sci, 2013. **92**(1): p. 3-9.
181. El-Serag, H.B., *Hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2011. **365**(12): p. 1118-27.
182. Nair, S., et al., *Is obesity an independent risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis?* Hepatology, 2002. **36**(1): p. 150-5.
183. Farazi, P.A. and R.A. DePinho, *Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(9): p. 674-87.
184. Villanueva, A., et al., *Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma*. Semin Liver Dis, 2007. **27**(1): p. 55-76.
185. Moinzadeh, P., et al., *Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis*. Br J Cancer, 2005. **92**(5): p. 935-41.
186. Calvisi, D.F., et al., *Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2713-22.
187. Thorgeirsson, S.S. and J.W. Grisham, *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*. Nat Genet, 2002. **31**(4): p. 339-46.
188. Ishizaki, Y., et al., *Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas*. Int J Oncol, 2004. **24**(5): p. 1077-83.
189. Moon, R.T., et al., *WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(9): p. 691-701.
190. Cui, J., et al., *Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes*. J Gastroenterol Hepatol, 2003. **18**(3): p. 280-7.

191. Coursaget, P., et al., *High prevalence of mutations at codon 249 of the p53 gene in hepatocellular carcinomas from Senegal*. Br J Cancer, 1993. **67**(6): p. 1395-7.
192. Minouchi, K., S. Kaneko, and K. Kobayashi, *Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver*. J Hepatol, 2002. **37**(2): p. 231-9.
193. Goodman, Z.D.T., L.M., *Tumours and tumourlike lesions of the liver.*, in *MacSween's Pathology of the Liver 5th edn.* 2007, Churchill Livingstone, Elsevier: Philadelphia. p. 761-814.
194. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 763-77.
195. Yahagi, N., et al., *Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma*. Eur J Cancer, 2005. **41**(9): p. 1316-22.
196. Bhalla, K., et al., *Metformin prevents liver tumorigenesis by inhibiting pathways driving hepatic lipogenesis*. Cancer Prev Res (Phila), 2012. **5**(4): p. 544-52.
197. Borbath, I., et al., *The PPARgamma agonist pioglitazone inhibits early neoplastic occurrence in the rat liver*. Eur J Cancer, 2007. **43**(11): p. 1755-63.
198. Yu, J., et al., *Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo*. Hepatology, 2006. **43**(1): p. 134-43.
199. Hsu, M.C., et al., *Overexpression of Jab1 in hepatocellular carcinoma and its inhibition by peroxisome proliferator-activated receptor{gamma} ligands in vitro and in vivo*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4045-52.
200. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 326-30.
201. Fraenkel-Conrat, H. and H.S. Olcott, *Reaction of formaldehyde with proteins; participation of the guanidyl groups and evidence of crosslinking*. J Am Chem Soc, 1946. **68**: p. 34-7.
202. Fraenkel-Conrat, H. and H.S. Olcott, *The reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups*. J Am Chem Soc, 1948. **70**(8): p. 2673-84.
203. Fraenkel-Conrat, H. and H.S. Olcott, *Reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups*. J Biol Chem, 1948. **174**(3): p. 827-43.
204. Auerbach, C., M. Moutschen-Dahmen, and J. Moutschen, *Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds*. Mutat Res, 1977. **39**(3-4): p. 317-61.
205. Lambe, K.G. and J.D. Tugwood, *A human peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma is activated by inducers of adipogenesis, including thiazolidinedione drugs*. Eur J Biochem, 1996. **239**(1): p. 1-7.
206. Hiragun, A., M. Sato, and H. Mitsui, *Preadipocyte differentiation in vitro: identification of a highly active adipogenic agent*. J Cell Physiol, 1988. **134**(1): p. 124-30.
207. Hansen, J.B., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3175-82.
208. Cao, Z., R.M. Umek, and S.L. McKnight, *Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells*. Genes Dev, 1991. **5**(9): p. 1538-52.
209. Costa, M., C.A. Manen, and D.H. Russell, *In vivo activation of cAMP-dependent protein kinase by aminophylline and 1-methyl, 3-isobutylxanthine*. Biochem Biophys Res Commun, 1975. **65**(1): p. 75-81.

210. Russell, T.R. and R. Ho, *Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: triggering of differentiation by prostaglandin F₂alpha and 1-methyl-3-isobutyl xanthine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(12): p. 4516-20.
211. Obregon, M.J., *Thyroid hormone and adipocyte differentiation*. Thyroid, 2008. **18**(2): p. 185-95.
212. Hausman, G.J. and Z.K. Yu, *Influence of thyroxine and hydrocortisone in vivo on porcine preadipocyte recruitment, development and expression of C/EBP binding proteins in fetal stromal vascular (S-V) cell cultures*. Growth Dev Aging, 1998. **62**(3): p. 107-18.
213. Numa, S., E. Ringelmann, and F. Lynen, [*on the Biochemical Function of Biotin. 8. The Binding of Carbon Dioxide into Carboxylated Acetyl-Coa-Carboxylase*]. Biochem Z, 1964. **340**: p. 228-42.
214. Mackall, J.C., et al., *Induction of lipogenesis during differentiation in a "preadipocyte" cell line*. J Biol Chem, 1976. **251**(20): p. 6462-4.
215. Green, H. and O. Kehinde, *An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion*. Cell, 1975. **5**(1): p. 19-27.
216. Zhang, B., et al., *Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 31771-4.
217. Deng, X., et al., *Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(1): p. 256-62.
218. Wu, Z., et al., *Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis*. Genes Dev, 1995. **9**(19): p. 2350-63.
219. Rubin, C.S., et al., *Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells*. J Biol Chem, 1978. **253**(20): p. 7570-8.
220. Xu, H.E., et al., *Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors*. Mol Cell, 1999. **3**(3): p. 397-403.
221. Ding, S. and H.J. Mersmann, *Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins**. J Nutr Biochem, 2001. **12**(2): p. 101-108.
222. Choi, S., et al., *Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells*. Xenobiotica, 2009. **39**(3): p. 205-17.
223. Isom, H.C., et al., *Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(10): p. 3252-6.
224. Mizuguchi, T., et al., *Alteration of expression of liver-enriched transcription factors in the transition between growth and differentiation of primary cultured rat hepatocytes*. J Cell Physiol, 1998. **174**(3): p. 273-84.
225. Skipski, V.P., et al., *Lipid composition of human serum lipoproteins*. Biochem J, 1967. **104**(2): p. 340-52.
226. Le Lay, S., et al., *Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16904-10.
227. Lando, D., et al., *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch*. Science, 2002. **295**(5556): p. 858-61.

228. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
229. Scherr, M. and M. Eder, *Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors*. Curr Gene Ther, 2002. **2**(1): p. 45-55.
230. Ewens, W.J., Grant G. R., *Statistical Methods in Bioinformatics*2001, New York: Grant Springer-Verlag.
231. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
232. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
233. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
234. Rakhshandehroo, M., et al., *Comprehensive analysis of PPARalpha-dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling*. PPAR Res, 2007. **2007**: p. 26839.
235. Shimano, H., et al., *Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes*. J Biol Chem, 1999. **274**(50): p. 35832-9.
236. Conner, E.A. and P.J. Wirth, *Protein alterations associated with gene amplification in cultured human and rodent cells*. Electrophoresis, 1996. **17**(7): p. 1257-64.
237. Isom, I., et al., *Persistence of liver-specific messenger RNA in cultured hepatocytes: different regulatory events for different genes*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 2): p. 2877-85.
238. Iwatani, M., et al., *Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body*. Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2549-56.
239. Sainz, B., Jr. and F.V. Chisari, *Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells*. J Virol, 2006. **80**(20): p. 10253-7.
240. Eaton, E.M., et al., *Characterization of C/EBPbeta isoforms in normal versus neoplastic mammary epithelial cells*. J Cell Physiol, 2001. **189**(1): p. 91-105.
241. Brasaemle, D.L., et al., *Post-translational regulation of perilipin expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9378-87.
242. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
243. Hauner, H., et al., *Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium*. J Clin Invest, 1989. **84**(5): p. 1663-70.
244. Elks, M.L., V.C. Manganiello, and M. Vaughan, *Hormone-sensitive particulate cAMP phosphodiesterase activity in 3T3-L1 adipocytes. Regulation of responsiveness by dexamethasone*. J Biol Chem, 1983. **258**(14): p. 8582-7.
245. Feve, B. and J. Pairault, *Dexamethasone-dependent expression of beta 1-24 corticotropin stimulated adenylate cyclase during adipose conversion of 3T3-F442A cells*. FEBS Lett, 1987. **219**(1): p. 56-64.
246. Pawella, L.M., et al., *[Lipid droplet-associated proteins in steatosis. Effects of induction and siRNA-mediated downregulation of PAT proteins in cell culture models of hepatocyte steatosis]*. Pathologie, 2010. **31 Suppl 2**: p. 126-31.

247. Gao, J., H. Ye, and G. Serrero, *Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids*. J Cell Physiol, 2000. **182**(2): p. 297-302.
248. Spiegelman, B.M., *PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor*. Diabetes, 1998. **47**(4): p. 507-14.
249. Staels, B. and J.C. Fruchart, *Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2460-70.
250. Rahimian, R., et al., *Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus*. Mol Cell Biochem, 2001. **224**(1-2): p. 29-37.
251. Shimizu, M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor subtypes differentially cooperate with other transcription factors in selective transactivation of the perilipin/PEX11 alpha gene pair*. J Biochem, 2006. **139**(3): p. 563-73.
252. Akter, M.H., et al., *Perilipin, a critical regulator of fat storage and breakdown, is a target gene of estrogen receptor-related receptor alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **368**(3): p. 563-8.
253. Ferrini, J.B., et al., *Expression and DNA-binding activity of C/EBPalpha and C/EBPbeta in human liver and differentiated primary hepatocytes*. J Hepatol, 2001. **35**(2): p. 170-7.
254. Ramji, D.P. and P. Foka, *CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation*. Biochem J, 2002. **365**(Pt 3): p. 561-75.
255. Schroeder-Gloeckler, J.M., et al., *CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in Lepr(db/db) mice*. J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15717-29.
256. Wu, Z., et al., *Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity*. Mol Cell, 1999. **3**(2): p. 151-8.
257. Londos, C., et al., *Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(1): p. 51-8.
258. Lee, B., et al., *Differential association of adipophilin and TIP47 proteins with cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes during dietary fat absorption*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(12): p. 1173-80.
259. Hall, A.M., et al., *Dynamic and differential regulation of proteins that coat lipid droplets in fatty liver dystrophic mice*. J Lipid Res, 2010. **51**(3): p. 554-63.
260. Grasselli, E., et al., *PAT protein mRNA expression in primary rat hepatocytes: Effects of exposure to fatty acids*. Int J Mol Med, 2010. **25**(4): p. 505-12.
261. Steiner, S., et al., *Induction of the adipose differentiation-related protein in liver of etomoxir-treated rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(3): p. 777-82.
262. Russell, T.D., et al., *Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism*. J Lipid Res, 2007. **48**(7): p. 1463-75.
263. Magnusson, B., et al., *Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(7): p. 1566-71.
264. Russell, T.D., et al., *Mammary glands of adipophilin-null mice produce an aminotermally truncated form of adipophilin that mediates milk lipid droplet formation and secretion*. J Lipid Res, 2008. **49**(1): p. 206-16.

-
265. Carr, R.M., et al., *Reduction of TIP47 improves hepatic steatosis and glucose homeostasis in mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **302**(8): p. R996-1003.
266. Bartholomew, S.R., et al., *Distinct cellular pools of perilipin 5 point to roles in lipid trafficking*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(2): p. 268-78.
267. Sato, S., et al., *Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein*. J Biochem, 2006. **139**(5): p. 921-30.
268. Puri, V., et al., *Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage*. J Biol Chem, 2007. **282**(47): p. 34213-8.
269. Keller, P., et al., *Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol*. J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14355-65.
270. Nishino, N., et al., *FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2808-21.
271. Gong, J., et al., *Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites*. J Cell Biol, 2011. **195**(6): p. 953-63.
272. Jambunathan, S., et al., *FSP27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28614.
273. Fei, W., et al., *A role for phosphatidic acid in the formation of "supersized" lipid droplets*. PLoS Genet, 2011. **7**(7): p. e1002201.
274. Kraemer, N., et al., *Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase*. Cell Metab, 2011. **14**(4): p. 504-15.
275. Guo, Y., et al., *Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 657-61.
276. Moessinger, C., et al., *Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine*. J Biol Chem, 2011. **286**(24): p. 21330-9.
277. Bostrom, P., et al., *SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(11): p. 1286-93.
278. Orlicky, D.J., et al., *Chronic ethanol consumption in mice alters hepatocyte lipid droplet properties*. Alcohol Clin Exp Res, 2011. **35**(6): p. 1020-33.
279. Gandotra, S., et al., *Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy*. N Engl J Med, 2011. **364**(8): p. 740-8.
280. Kozusko, K., S. Patel, and D.B. Savage, *Human congenital perilipin deficiency and insulin resistance*. Endocr Dev, 2013. **24**: p. 150-5.
281. Neuschwander-Tetri, B.A., et al., *Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone*. Hepatology, 2003. **38**(4): p. 1008-17.
282. Ratzliff, V., et al., *Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 100-10.
283. Bell, L.N., et al., *Relationship between adipose tissue insulin resistance and liver histology in nonalcoholic steatohepatitis: a pioglitazone versus vitamin E versus placebo for the treatment of nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis trial follow-up study*. Hepatology, 2012. **56**(4): p. 1311-8.
284. Bajaj, M., et al., *Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28**(6): p. 783-9.

285. Jung, H.S., et al., *The effects of rosiglitazone and metformin on the plasma concentrations of resistin in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Metabolism*, 2005. **54**(3): p. 314-20.
286. Zheng, H., et al., *A novel agonist of PPAR-gamma based on barbituric acid alleviates the development of non-alcoholic fatty liver disease by regulating adipocytokine expression and preventing insulin resistance*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **659**(2-3): p. 244-51.
287. Borg, J., et al., *Perilipin is present in islets of Langerhans and protects against lipotoxicity when overexpressed in the beta-cell line INS-1*. *Endocrinology*, 2009. **150**(7): p. 3049-57.
288. Urahama, Y., et al., *Lipid droplet-associated proteins protect renal tubular cells from fatty acid-induced apoptosis*. *Am J Pathol*, 2008. **173**(5): p. 1286-94.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Schirmacher danke ich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit am Pathologischen Institut der Universität Heidelberg, die hilfreichen Anregungen, die Begutachtung und die Unterstützung der Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Bartenschlager danke ich für das Interesse und die Unterstützung dieser Dissertation sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Walter Nickel und Prof. Dr. Peter Angel danke ich für die Bereitschaft, als Prüfer dieser Dissertation zu agieren.

Dr. Beate K. Straub danke ich für ihre uneingeschränkte professionelle, stets verfügbare Betreuung, in welcher sie mich positiv bestärkte und mich auf Kurs hielt. Vielen lieben Dank für die Korrektur dieser Arbeit!

Dr. Hans Heid und Ralf Zimbelmann des DKFZ danke ich für die Bereitstellung Perilipin-Isoform-spezifischer Primer und Aushilfe, als die BSA-gekoppelte Ölsäure während eines Versuches nicht mehr lieferbar war.

Dr. Gualtiero Alvisi Dr. Marie Hiet der Arbeitsgruppe „Molekulare Virologie“ des Hygieneinstituts danke ich für die Bereitstellung der lentiviralen Vektoren und die Unterstützung in der Herstellung der stabilen Zellen in deren Laborräumen. Den Mitarbeitern der NCT Gewebekbank unter Leitung von Dr. Esther Herpel danke ich für die Bereitstellung von humanen Gewebeproben.

Dem Arbeitsgruppen- und Laborleiter PD Dr. Kai Breuhahn der Arbeitsgruppe „Molekulare Hepatopathologie“ danke ich für die fachliche Beratung und Ermöglichung der Durchführung meiner Arbeit in den Laborräumlichkeiten.

Frau Elisabeth Specht-Delius danke ich für ihre Unterstützung in der Anfertigung von Gewebeschnitten und immunhistochemischen Färbungen. Ein besonderer Dank geht an Frau Eva Eiteneuer, die mir während der letzten eineinhalb Jahre mit tatkräftiger Unterstützung und ihrem sonnigen Gemüt den Laboralltag erleichterte.

Prof. Dr. Jürgen Kopitz der Abteilung „Angewandte Tumorbiologie“ danke ich für die freundliche Bereitstellung der Stickstoffbegasungsanlage. Frau Martina Keith der AG Roth danke ich für die Erlaubnis der Mitbenutzung ihrer Zellkulturräumlichkeiten und für so manchen netten kleinen Kaffeeschwatz. Dr. Jonas Bläs der Neuroonkologie des DKFZ danke ich für das Entgegenkommen der Benutzung der Hypoxiekammer.

Liebe Kellerkinder der AG Roth, AG Bergmann und AG Sinn, insbesondere aber Merita Hashani und Friederike Mietzsch, ich danke Euch für unterhaltsame Mittagspausen und aufbauende Gespräche in den schweren Zeiten und fachlichen Diskussionen. Ich danke den Mitgliedern des „Molekulare Hepatopathologie“-Labors und denen aller weiteren assoziierten Arbeitsgruppen, besonders Dr. Franziska Ehrmann, Juliane Winkler, Carolin Mogler, Olaf Neumann und Dr. Mona Malz für die schöne und lustige Zeit, die Ihr mir (nicht nur im Labor) beschert habt.

Meinen treuen Berliner Freunden und meiner Familie in Berlin, im Schwabenland und in Frankfurt möchte ich mich herzlich für das jahrelange Verständnis bedanken. Liane und Peter, meine liebsten Eltern, ohne Euch wäre ich nie da, wo ich jetzt bin und Worte reichen für meine Dankbarkeit hier nicht mehr aus.

Zu guter Letzt bedanke ich mich aus tiefstem Herzen bei meinem Freund Niko, mit dem ich das Abenteuer Heidelberg gestartet habe und der mich bedingungslos in sämtlichen mentalen Phasen der Doktorarbeit liebevoll unterstützt hat.

8. Anhang

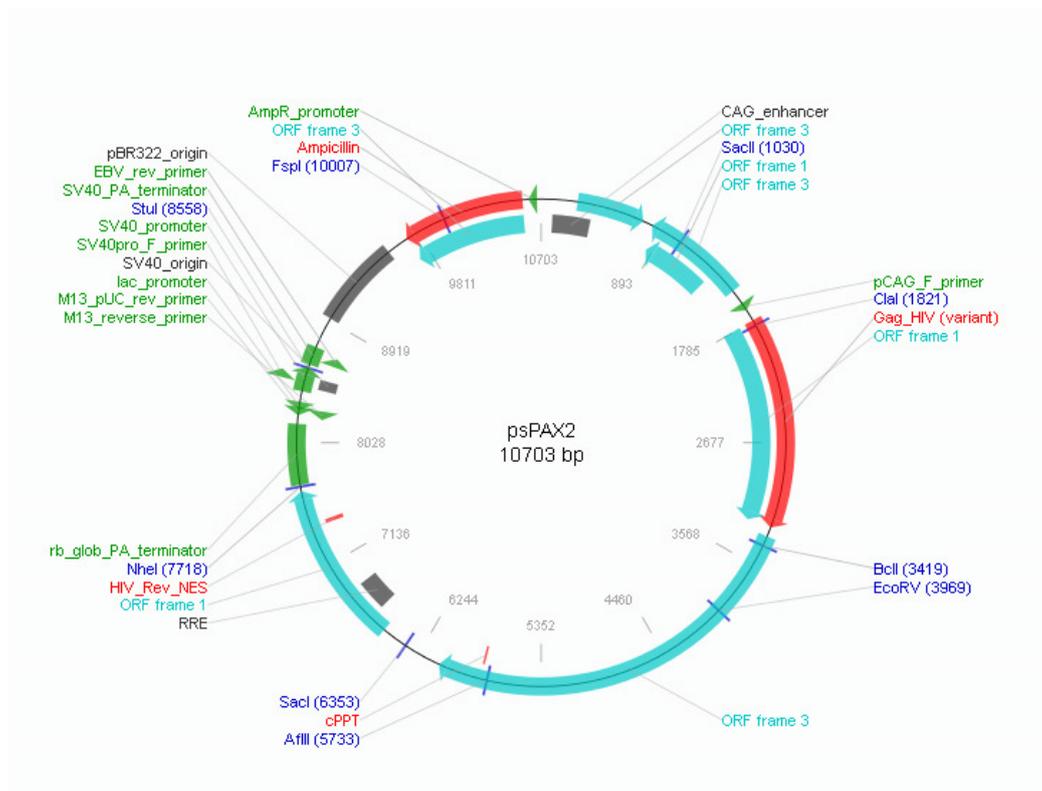


Abb. 8. 1: Verpackungsvektor für die lentiviralen Transfektion.

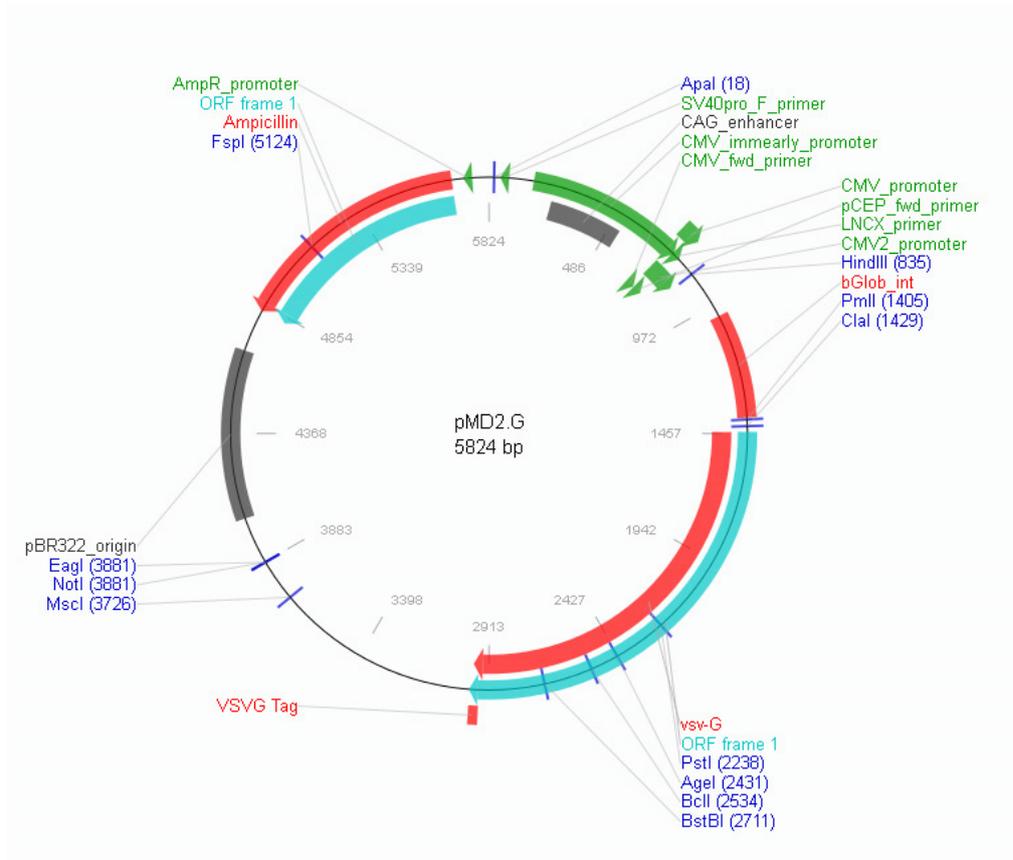


Abb. 8. 2: Vektor für die lentivirale Transfektion, der das Hüllprotein VSVG codiert.

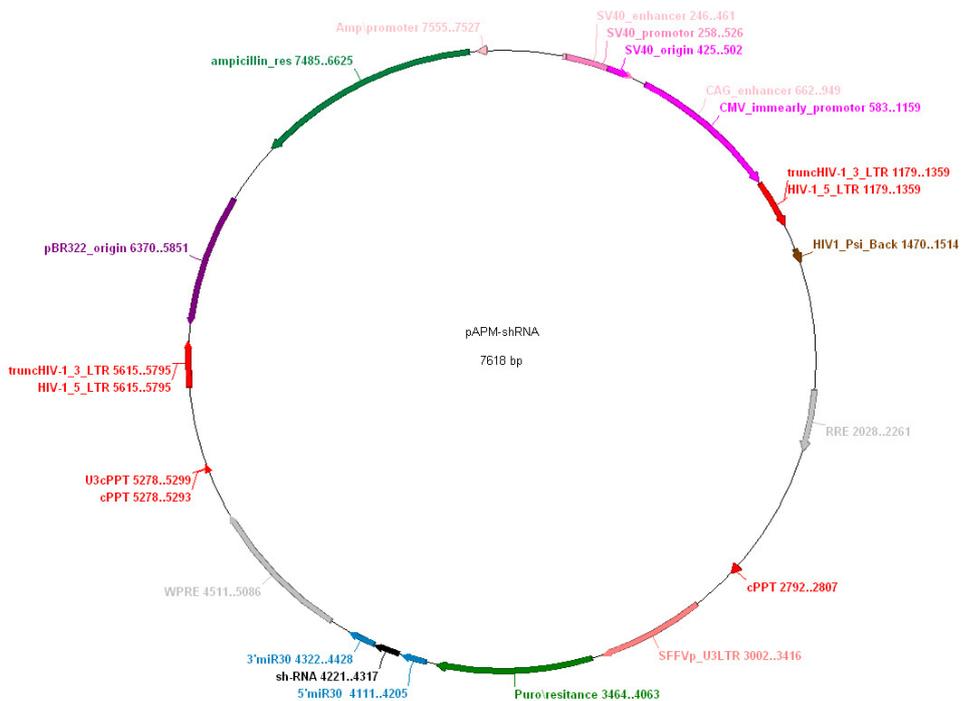


Abb. 8. 3: Transfektor für die lentivirale Transfektion, der spezifische shRNAs codiert.

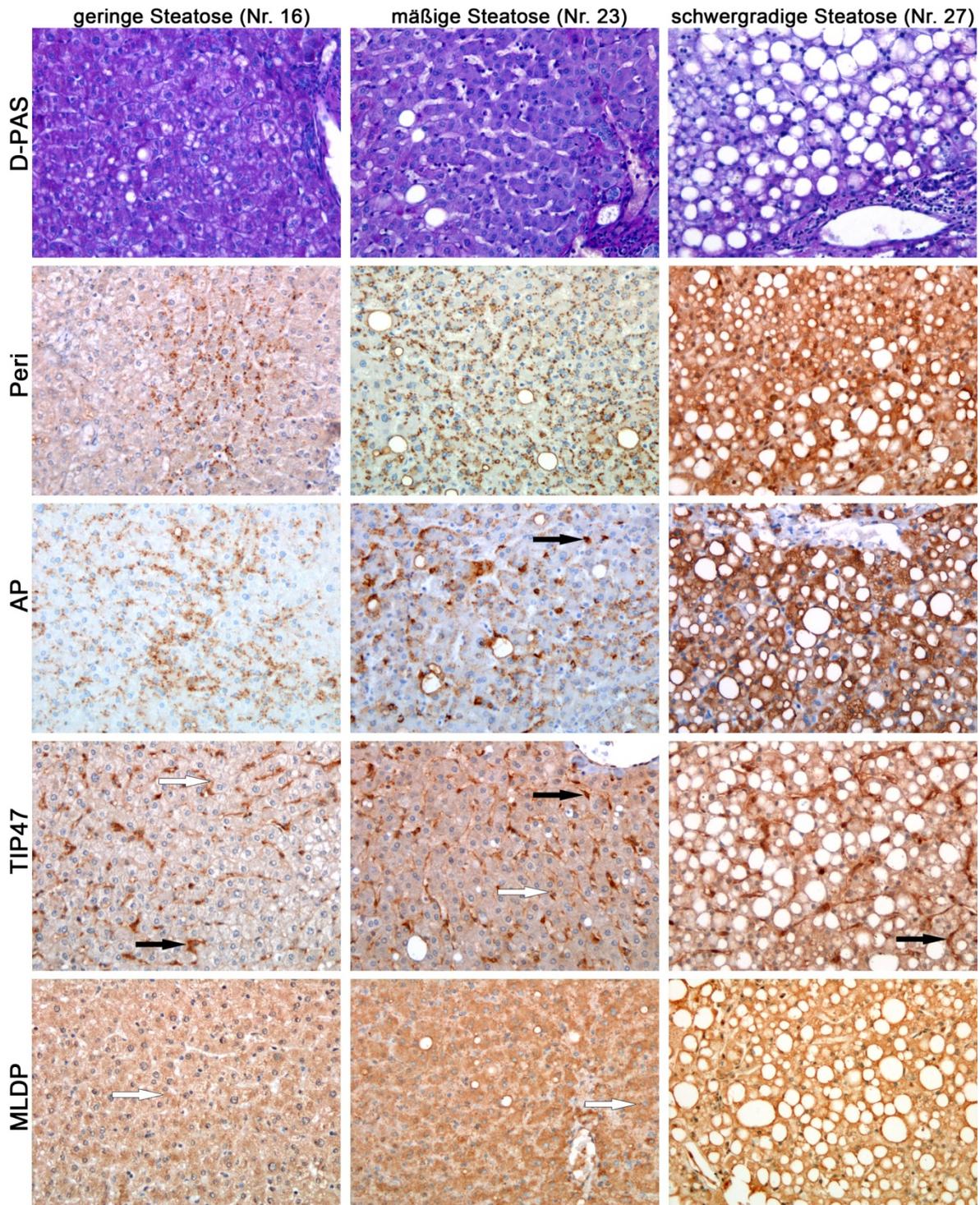


Abb. 8. 4: Differentielles Lokalisationsmuster von PAT-Proteinen in menschlicher Leber *in situ*.

Immunhistochemische Analysen zeigen, dass Perilipin (Peri), Adipophilin (AP) und gelegentlich MLDP an mittelgroßen / großen hepatozellulären Lipidtropfen einer makrovesikulären Steatose lokalisieren (Nr. 27, bzgl. Nummerierung siehe Abb. 4. 2). A. schwarze Pfeile: Lipidtropfen in HSC. Weiße Pfeile: Lipidtropfen in Hepatozyten. Vergrößerung jeweils 200x.

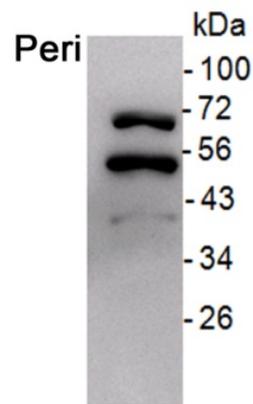


Abb. 8. 5: Immunblot von humanem weißem Fettgewebslysat mit Antikörper gegen panPerilipin.

Ein PanPerilipin Antikörper erkennt 3 Proteinbanden bei ~68 kDa, ~52 kDa und ~38 kDa.

Protein Nr.	Acc. Nr.	Protein Description	Protein score	Protein Mass in Da	No. of hits
1	gi 119622466	perilipin [Homo sapiens]	2308	56215	227
2	gi 11935049	**** keratin 1 [Homo sapiens]	1423	66198	53
3	gi 12667788	myosin-9 [Homo sapiens]	1404	227646	47
4	gi 4557235	very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial isoform 1	1342	70745	57
5	gi 47132620	**** keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal [Homo sapiens]	1236	65678	39

Abb. 8. 6: ESI-MS-Auswertung einer Proteinbande bei ~68 kDa nach Immunpräzipitation von Perilipin aus humanem Fettlebergewebe.

1						
prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	prot_score	prot_mass	prot_matches	prot_cover
1	gij13324688	WD repeat-containing protein 11 [Homo sapiens]	3048	138423	70	53,4
2	gij194328685	myosin-1b isoform 1 [Homo sapiens]	2272	132928	53	44,1
3	gij28317	unnamed protein product [Homo sapiens]	1409	59720	34	44,9
4	gij47132620	keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal [Homo sapiens]	1257	65678	22	42,7
5	gij11935049	keratin 1 [Homo sapiens]	1245	66198	26	28,9
2						
prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	prot_score	prot_mass	prot_matches	prot_cover
1	gij136429	RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor	370	25078	34	26,8
2	gij11935049	keratin 1 [Homo sapiens]	347	66198	8	12,3
3	gij28317	unnamed protein product [Homo sapiens]	250	59720	5	8,3
4	gij16751921	dermcidin preproprotein [Homo sapiens]	149	11391	3	32,7
5	gij435476	cytokeratin 9 [Homo sapiens]	125	62320	2	3,7
3						
prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	prot_score	prot_mass	prot_matches	prot_cover
1	gij11935049	keratin 1 [Homo sapiens]	1289	66198	28	29
2	gij28317	unnamed protein product [Homo sapiens]	1091	59720	21	27,7
3	gij181402	epidermal cytokeratin 2 [Homo sapiens]	1007	66110	15	31
4	gij908801	keratin type II [Homo sapiens]	992	60448	19	29,4
5	gij5031039	keratin, type II cytoskeletal 6A [Homo sapiens]	901	60293	19	29,4
6	gij119617035	keratin 6E, isoform CRA_b [Homo sapiens]	949	60144	17	29,5
7	gij55956899	keratin, type I cytoskeletal 9 [Homo sapiens]	948	62255	18	35,3
8	gij38044288	gelsolin isoform b [Homo sapiens]	942	80876	21	23,9
9	gij908803	keratin type II [Homo sapiens]	934	60472	17	29,4
10	gij18999435	Keratin 5 [Homo sapiens]	848	62568	19	26,9
11	gij332260810	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 14-like [Nomascus leucogenys]	666	51729	12	22,3
12	gij31074631	keratin 1b [Homo sapiens]	563	62049	13	17,1
13	gij1195531	type I keratin 16 [Homo sapiens]	512	51548	10	17,8
4						
prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	prot_score	prot_mass	prot_matches	prot_cover
1	gij21410323	Perilipin [Homo sapiens]	1420	56216	33	54,8
2	gij11935049	keratin 1 [Homo sapiens]	675	66198	13	23,6
3	gij435476	cytokeratin 9 [Homo sapiens]	669	62320	12	18,3
5						
prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	prot_score	prot_mass	prot_matches	prot_cover
1	gij119622466	perilipin [Homo sapiens]	2132	56215	68	74,5
2	gij47132620	keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal [Homo sapiens]	2049	65678	35	53,8
3	gij11935049	keratin 1 [Homo sapiens]	1861	66198	35	40,7
4	gij28317	unnamed protein product [Homo sapiens]	1298	59720	28	32,5
5	gij435476	cytokeratin 9 [Homo sapiens]	838	62320	19	23,3

Abb. 8. 7: ESI-MS-Analyse der 5 Proteinbanden der Immunpräzipitation von Perilipin aus humanem Fettlebergewebe.

9. Erklärung gemäß § 8 (3b, c) der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Perilipin-Induktion und Dynamik der PAT-Proteinexpression in menschlicher Leberparenchymverfettung und in Steatose-Zellkulturmodellen“ selbst verfasst und sich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren bestätige ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den

Lena Maria Pawella