

**Charakterisierung von lipid droplet-
Regulatoren der Fruchtfliege
*Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
"Doctor rerum naturalium"
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Katharina Thiel
aus Göttingen

Göttingen, 2012

Referent: Prof. Dr. Herbert Jäckle

Korreferent: Jun. Prof. Dr. Gregor Bucher

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2012

Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
ADRP	„adipocyte differentiation-related protein“
AK	Antikörper
Akt	Aktin
APS	Ammonium-Peroxidsulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATGL	„adipose triglyceride lipase“
BDGP	„Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project“
BL	Fliegenstamm vom „Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center at Indiana University“
<i>bmm</i>	<i>brummer</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CG	„computed gene“
COP	„coat protein complex“
DAG	Diazylglyzerol
dH ₂ O	„distilled water“, englisch für destilliertes Wasser
ddH ₂ O	„double distilled water“, englisch für doppelt-destilliertes Wasser
DGAT	„acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase“
d.h.	das heisst
<i>D.m.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DGRC	„ <i>Drosophila</i> Genomics Resource Center“
DIG	Digoxigenin
DNA	„deoxyribonucleic acid“, englisch für Desoxyribonukleinsäure
DRSC	„ <i>Drosophila</i> RNAi Screening Center“
dsRNA	doppelsträngige RNA

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	„expressed sequence tag“
et al.	„et alii“, lateinisch für „und andere“
FBB	„fat body buffer“
FK	Fettkörper
g	Gramm
GLD(s)	Phänotyp der deutlich vergrößerten, oft unregelmäßig geformten LDs; Abkürzung für „giant lipid droplet(s)“
h	Stunde(n)
HRP	„horseradish peroxidase“, englisch für Meerrettich-Peroxidase
HSL	„hormone-sensitive lipase“
kDa	Kilo-Dalton
KDEL R	KDEL Rezeptor
kg	Kilo-Gramm
L	Liter
LD(s)	„lipid droplet(s)“, englisch für Lipidtröpfchen
M	Molarität (mol/L)
mA	Milli-Ampere
mg	Milli-Gramm
min	Minute(n)
mL	Milli-Liter
μL	Mikro-Liter
μm	Mikro-Meter
MP	Mikrosomales Membranpellet
MPIbpc	Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
NA	„not applicable“; englisch für „nicht anwendbar“
n.d.	„not determined“, englisch für „nicht bestimmt“
nm	Nano-Meter

OA	„oleic acid“, englisch für Ölsäure
ORF	„open reading frame“, englisch für offener Leserahmen
PAT	Protein-Domäne, benannt nach: <u>P</u> erilipin, <u>A</u> DRP und <u>T</u> IP47
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	„Polymerase chain reaction“, englisch für Polymerase-Kettenreaktion
PLIN	PERILIPIN
RNA	„ribonucleic acid“, englisch für Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	„revolutions per minute“
RQ	Relative Quantifizierung
s	Sekunde(n)
S119A	Aminosäureaustausch des Serins an Position 119 gegen ein Alanin
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“, englisch für Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAG	SDS-Polyacrylamid-Gel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>sesB</i>	„ <i>stress-sensitive B</i> “
SNARE	„soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“
sog.	sogenannte(r)
SSC	„saline sodium citrate“, englisch für Kochsalz-Natriumcitrat
Tab.	Tabelle
TAG	Triazylglyzerol
TIP47	„tail-interacting protein of 47 kDa“
transf.	transfiziert(e)
Tub	Tubulin
UAS	„upstream activating sequence“
untransf.	untransfiziert(e)
UTR	untranslatierte Region

VDRC	„Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center“
<i>w</i>	„ <i>white</i> “
WMISH	„whole-mount <i>in situ</i> hybridization“
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Energie-Homöostase ist ein zentrales Element des Lebens.....	1
1.2 Lipid droplets.....	2
1.3 Größenregulation von LDs	4
1.4 Die Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus der metabolischen Forschung.....	6
1.5 Die Bedeutung von COPI bei der Lipidspeicherungsregulation.....	9
1.6 Ziele dieser Arbeit.....	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer	13
2.1.2 Oligonukleotide	17
2.1.3 ESTs.....	22
2.1.4 Plasmide	22
2.1.5 Antikörper (AK).....	27
2.1.6 dsRNAs	28
2.1.7 Fliegenlinien	28
2.1.8 Nährmedien.....	31
2.1.9 Zellkultur-Linien	32
2.1.10 Fluoreszenz-Farbstoffe	33
2.1.11 Besondere Geräte	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Histologische Methoden	34
2.2.1.1 RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	34
2.2.1.2 LD-Färbungen.....	34
2.2.1.3 AK-Färbungen	35
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	37
2.2.2.1 Gateway®-Klonierung	37
2.2.2.2 Gewinnung von RNA aus Zellen.....	37
2.2.2.3 Gewinnung von RNA aus <i>Drosophila</i>	38
2.2.2.4 Synthese von komplementärer DNA (cDNA).....	38

2.2.2.5 Gewinnung genomischer DNA von einzelnen <i>Drosophilae</i>	38
2.2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.2.2.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	39
2.2.2.8 Zielgerichtete Mutagenese.....	40
2.2.2.9 Sequenzierung von DNA.....	40
2.2.2.10 Herstellung doppelsträngiger RNA (dsRNA)	41
2.2.3 Biochemische Methoden	42
2.2.3.1 AK-Herstellung	42
2.2.3.2 Methanol-Chloroform Extraktion von Lipiden aus Zellen	42
2.2.3.3 „Coupled Colorimetric Assay“ (CCA).....	43
2.2.3.4 Subzelluläre Fraktionierungen	43
2.2.3.5 Methanol-Chloroform Proteinfällung	44
2.2.3.6 RC DC Protein Assay.....	44
2.2.3.7 BCA Protein Assay.....	45
2.2.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.2.3.9 Western Blot	45
2.2.4 Zellkultur	46
2.2.4.1 Einfrieren / Auftauen von Zellen	47
2.2.4.2 Transiente Transfektion	47
2.2.4.3 Generierung stabil-transfizierter, polyklonaler Zelllinien.....	47
2.2.4.4 RNAi-Experimente.....	48
2.2.5 Fliegentechniken	49
2.2.5.1 Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	49
2.2.5.2 Generierung von transgenen Fliegen.....	49
2.2.6 Mikroskopie	49
2.2.6.1 Konfokale Mikroskopie	49
2.2.6.2 Spinning Disk Konfokalmikroskopie.....	50
2.2.6.3 Elektronenmikroskopie (EM)	50
3. Ergebnisse	52
3.1 Die Rolle von COPI in der Lipidspeicherung.....	52
3.1.1 Embryonale Expression von COPI Komponenten	52
3.1.2 RNAi-vermittelter COPI knock-down in <i>Drosophila</i> Kc167 Zellen erhöht die LD Anzahl	53
3.1.3 RNAi-vermittelter COPI knock-down in Fliegen führt zu Letalität.....	58

3.1.4 Überlebende Fliegen des RNAi-vermittelten COPI knock-downs speichern mehr Lipide	60
3.1.5 Überexpression von α COP reduziert die organismische Lipidspeicherung	62
3.2 Zur Interaktion von COPI mit LD Proteinen und deren COPI-abhängigen Lokalisation.....	70
3.2.1 Screen auf Wechselwirkungen zwischen der Überexpression von LD-assoziierten Proteinen und der RNAi-vermittelten Herabregulation von COPI Komponenten in Kc167 Zellen.....	70
3.2.2 Die Überexpression von CG9186 in Kc167 Zellen mit erhöhtem Lipidgehalt resultiert in der Bildung von GLDs	75
3.3 Charakterisierung von CG9186.....	77
3.3.1 CG9186 ist eine evolutionär konservierte, LD-assoziierte annotierte Lipase	77
3.3.2 CG9186 transloziert nach Zugabe von OA auf die LDs.....	87
3.3.3 Identifizierung der notwendigen Sequenz für die LD Lokalisation von CG9186.....	89
3.3.4 CG9186 ist an der Regulation der LD-Größe und LD-Verteilung beteiligt.....	92
3.3.5 Zeitliche Abfolge der Entstehung von LD Clustern und GLDs nach Überexpression der CG9186 Varianten	93
3.3.6 Überexpression der CG9186 Varianten im Organismus.....	96
3.3.7 RNAi-vermittelter <i>CG9186</i> knock-down reduziert den Gesamtlipidgehalt der Fliegen	102
4. Diskussion.....	107
4.1 Die Funktion von COPI bei der Regulation der Lipidspeicherung von <i>Drosophila melanogaster</i>	107
4.2 CG9186 als Werkzeug zur Untersuchung der LD Biogenese und LD Lokalisationsmechanismen.....	111
4.3 Beteiligung von CG9186 an der Regulation der Größe, Verteilung und Menge der LDs.....	113
4.4 Eine mögliche Funktion von CG9186 im Phospholipid-Metabolismus?	119
5. Zusammenfassung	123
6. Anhang.....	125
7. Literaturverzeichnis	130

8. Danksagungen	143
9. Lebenslauf	144

1. Einleitung

1.1 Die Energie-Homöostase ist ein zentrales Element des Lebens

Alle Lebewesen benötigen Energie, um ihre Funktion zu erhalten. Aus der Nahrung aufgenommene, energiereiche Verbindungen, wie Kohlenhydrate und Fette, dienen hierbei als Energiequelle. Der Aufnahme steht der Verbrauch, z.B. durch biosynthetische Reaktionen oder physische Aktivität, gegenüber (Übersichtsartikel Friedman 2004). Um Situationen mit beschränkter Nahrungsverfügbarkeit oder erhöhtem Energieverbrauch zu überstehen, werden überschüssige Nährstoffe aus der Nahrung in Speicherformen überführt. Neben dem Kohlenhydratpolymer Glykogen sind Neutralfette, und hier v.a. die Triacylglycerole (TAGs), die mengenmäßig bedeutsamsten Energiespeicherformen (Flatt 1995). Das Gleichgewicht aus Energieaufnahme, Energieverbrauch und Energiespeicherung wird im Allgemeinen als Energie-Homöostase bezeichnet.

Eine erfolgreiche Regulation der Energie-Homöostase ist für den Organismus essenziell. Gerät das Gleichgewicht aus der Balance, z.B. durch das Fehlen von Energiespeicherkapazitäten, wie im Falle von menschlichen Lipodystrophie-Erkrankungen (z.B. Übersichtsartikel Garg & Agarwal 2009), oder das Vorhandensein überzähliger Fettspeicher, wie bei der humanen Adipositas, hat dies für den Organismus fatale Folgen. Dies kann deutlich an den Folgeerkrankungen der steigenden Anzahl von Adipositas-Patienten erkannt werden. Diese umfassen z.B. Insulinresistenz, Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen, mit schwerwiegenden Konsequenzen für die Patienten und das Gesundheitssystem (z.B. Übersichtsartikel Reaven et al. 2004).

Neben ihrer Rolle in der Energieversorgung werden die gespeicherten Lipide darüber hinaus als Membran-Bestandteile, für post-translationale Modifikationen oder auch als Signalmoleküle verwendet (Übersichtsartikel Murphy 2001). Während vermutlich alle Zellen zumindest zeitweise Fette speichern können, sind in multizellulären Organismen spezialisierte Zelltypen und Organe, wie die Säuger-Adipozyten und das Fettgewebe, vorhanden. Neben dem Fettgewebe erfolgt Fettspeicherung aber auch außerhalb des Fettgewebes, wie z.B. in der Leber. Auch bei Invertebraten wie z.B. der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (abgekürzt als *D.m.* oder nur *Drosophila*) können prominente Fettspeichermengen in Geweben neben dem sog. Fettkörper („FK“; siehe 1.4) vorgefunden

werden. Beispiele umfassen die Imaginalscheiben, die Malpighischen Gefäße oder Teile des Mitteldarms (Übersichtsartikel Kühnlein 2011).

1.2 Lipid droplets

Innerhalb der Zelle erfolgt die Speicherung von Lipiden in speziellen Organellen, den Lipid-Tröpfchen, welche im Folgenden als „lipid droplets“ (LDs) bezeichnet werden (Übersichtsartikel Murphy 2001). Der Aufbau von LDs ist trotz ihrer universellen Verbreitung in den unterschiedlichsten Organismen und Zelltypen und starker Größenunterschiede (von etwa 50nm bis zu 200µm) stereotyp (siehe Abb. 1.1).

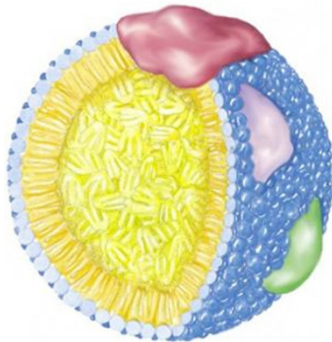


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau eines LDs

Gelb: hydrophober Kern mit Speicherfetten; Blau: Phospholipid-Hemimembran; Rot, Violett, Grün: mit der Hemimembran assoziierte Proteine. Die Abb. wurde von M. Beller bereitgestellt.

LDs bestehen aus einem hydrophoben Kern mit den Speicherfetten in Form von Neutral-Lipiden, hauptsächlich TAG und Sterol-Ester, welcher von einer mit Proteinen assoziierten Phospholipid-Hemimembran umgeben ist (Übersichtsartikel z.B. Walther & Farese 2009). Diese Hemimembran ist einzigartig unter allen bekannten zytoplasmatischen Organellen. Der häufigste Phospholipid-Bestandteil dieser Membran in Säugerzellen ist das Phosphatidylcholin (PC), gefolgt von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol (Tauchi-Sato et al. 2002; Bartz, Li et al. 2007). Hingegen weisen z.B. die LD Membranen von *Drosophila* S2 Zellen einen höheren Gehalt an Phosphatidylethanolamin als Phosphatidylcholin auf (Jones et al. 1992; Kraemer et al. 2011).

LDs werden heutzutage nicht nur als passive Lipidspeicherungsdepots in der Zelle angesehen, sondern vielmehr als „echte“, metabolisch aktive Organellen. Diese neue Sicht der LDs ist damit begründet, dass LDs neben der klassischen Lipidspeicherungsfunktion auch an ganz anderen unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind, wie z.B. der Replikation von Viren (Übersichtsartikel McLauchlan 2009; van der Meer-Janssen et al. 2010) oder auch der Lebensdauer-Regulation

von eukaryotischen Organismen, die durch begrenzte LD Ablagerung oder lipolytische Degradation von Neutral-Lipiden verlängert werden kann (Übersichtsartikel Goldberg et al. 2009). Außerdem zeigen LDs vielfältige Interaktionen mit anderen Organellen, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Robenek et al. 2006), Endosomen (Liu et al. 2007) oder dem Zytoskelett (Welte et al. 2005). Zudem konnten in zahlreichen LD Proteom-Studien verschiedener Organismen mehrere Hundert Proteine mit ganz unterschiedlicher Funktion als LD-assoziierte Komponenten identifiziert werden (Wu et al. 2000; Brasaemle et al. 2004; Beller et al. 2006; Cermelli et al. 2006; Bartz et al. 2007; Hodges & Wu 2010). Neben typischen LD-assoziierten Proteinen wie sog. PAT-Domänen Proteinen (siehe unten) oder Lipasen wurden beispielsweise auch Proteine zellulärer Transportprozesse entdeckt. Diese Befunde unterstützen die Sicht, dass die Komponenten der LD Oberfläche über den Lipid-Metabolismus hinaus an vielen weiteren metabolischen und zellulären Prozessen beteiligt sind.

Die PAT-Domänen Proteinfamilie ist die wohl am besten charakterisierte Gruppe der Säuger LD Proteine (Übersichtsartikel Londos et al. 1999; Brasaemle 2007; Bickel et al. 2009). Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen im Aminotermminus eine charakteristische, so genannte PAT-Domäne von etwa 100 AS, die funktional jedoch nicht charakterisiert ist. Die Benennung dieser Domäne erfolgte nach den ersten drei identifizierten Mitgliedern der Proteinfamilie: perilipin (plin)/PLIN1, „Adipocyte differentiation-related protein“ (ADRP)/Adipophilin/PLIN2 und „Tail-interacting protein of 47 kDa“ (TIP47)/PLIN3. Die Sichtweise der LD Oberfläche als regulatorisches Kompartiment wurde insbesondere durch die Erforschung des Perilipins PLIN1 verdeutlicht. Dieses erfüllt bei der Regulation der Lipolyse eine duale Funktion. Einerseits inhibiert es konstitutiv die basale Lipolyse, andererseits ist das Protein essenziell für die stimulierte Lipolyse (Martinez-Botas et al. 2000; Tansey et al. 2001). PAT-Domänen Proteine spielen demnach eine bedeutende Rolle bei der Zugänglichkeit für Lipasen wie ATGL („adipocyte triglyceride lipase“) (Zimmermann et al. 2004) (oder HSL („hormone-sensitive lipase“) (Übersichtsartikel Holm 2003) an der LD Oberfläche und der Regulation des LD „turnover“ (Brasaemle 2007; Listenberger et al. 2007).

Der Mechanismus der LD Biogenese ist deutlich schlechter Verstanden als die LD Remobilisierung. Das weit verbreitete, aktuelle Modell beinhaltet die „Abschnürung“ von im ER Intermembranraum gebildeten LDs (Brown 2001). Dies

erscheint logisch, da Enzyme wie die Diazylglyzerol Azyltransferasen DGAT1 und DGAT2, die für die Neutral-Lipid Synthese essenziell sind, hauptsächlich an der ER-Membran lokalisieren (Übersichtsartikel Yen et al. 2008). Zudem kann die ER-Membran oft in direkter Nähe zu LDs vorgefunden werden (z.B. Blanchette-Mackie et al. 1995). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde darüber hinaus beobachtet, dass über 90% der neu-entstehenden LDs am ER aufgefunden werden (Szymanski et al. 2007). In einem alternativen Modell wachsen naszierende LDs innerhalb einer vom ER gebildeten, becherartigen Struktur (Robenek et al. 2006). Neben diesen Haupt-Hypothesen sind noch weitere konkurrierende Modelle vorhanden (z.B. Übersichtsartikel Walther & Farese 2009). Die experimentelle Verifikation des einen oder anderen Modells steht noch aus.

1.3 Größenregulation von LDs

Obwohl der Aufbau der LDs evolutionär konserviert und stereotyp ist, gibt es sehr starke LD Größenunterschiede (siehe Abb. 1.2 und Übersichtsartikel Zweytick et al. 2000; Nishino et al. 2008).

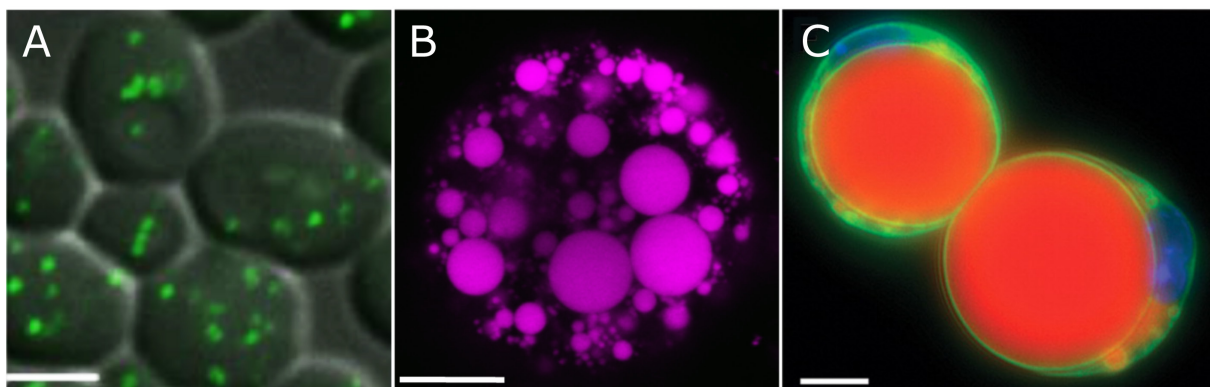


Abb. 1.2: Variationen in der LD Größe und Anzahl innerhalb unterschiedlicher biologischer Systeme

A: Die LDs von der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (grün) unterscheiden sich nur geringfügig in Bezug auf Anzahl oder Größe innerhalb einer Zelle (Abb. aus Szymanski et al. 2007). B: In freischwimmenden Fettzellen von *D.m.* variiert die Größe einzelner LDs (angefärbt mit LipidTOX Deep Red; violett) einer Zelle hingegen sehr stark. C: Differenzierte 3T3-L1 Zellen besitzen ein unilokuläres, riesiges LD (rot; grün: Perilipin; blau: Zellkern) (Abb. aus Wolins et al. 2006). Die Maßstabskala entspricht bei A 2µm, bei B 15µm und bei C 10µm.

Üblicherweise tendieren Teilchen bzw. Tröpfchen dazu, zu koaleszieren (fusionieren) (z.B. Übersichtsartikel Eggers 1998), um bei maximalem Volumen die Oberflächengröße möglichst gering zu halten. Durch Verringerung der Oberflächenenergie / des Reibungswiderstandes wird so ein energetisch

günstigerer Zustand erreicht. Aus diesem Grund muss die LD Größe in den unterschiedlichen Systemen und unter verschiedenen physiologischen Bedingungen strikt reguliert sein, um spontane Fusionen zu verhindern.

Studien mit murinen 3T3-L1 Adipozyten geben Hinweise darauf, dass die Oberflächengröße der LDs in direktem Zusammenhang mit der Zugänglichkeit für Lipasen zu stehen scheint (Londos et al. 1999; Brasaemle et al. 2004; Marcinkiewicz et al. 2006), jedoch ist diese Ansicht noch umstritten (Paar et al. 2012).

Das Wachstum von LDs kann durch zwei Arten erfolgen: durch Fusion von LDs (Boström et al. 2005; Boström et al. 2007) oder lokalisierte Lipid Synthese (siehe unten). Boström et al. beschreiben für LDs von NIH 3T3 Zellen eine „Fusionmaschinerie“, die aus bekannten Komponenten der Vesikel-Fusion wie Mikrotubuli, dem Motor-Protein Dynein (Boström et al. 2005; Andersson et al. 2006) oder auch SNARE („soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“)-Proteinen besteht (z.B. Übersichtsartikel Bonifacino & Glick 2004). Auch in primären Maus Hepatozyten ist das Wachstum von LDs durch dynamische Interaktion und TAG Transfer zwischen neu-gebildeten und bereits existierenden LDs anhand von temporären Fusions- und Teilungsprozessen beschrieben (H. Wang et al. 2010). Derzeit ist jedoch noch unklar, in welchem Umfang die Fusion von LDs auch in anderen zellulären Systemen von Bedeutung ist. In verschiedenen anderen zellulären Systemen konnte keine Fusion von LDs beobachtet werden (Wolins et al. 2005; Guo et al. 2008; Kuerschner et al. 2008; Murphy et al. 2010). LD Wachstum durch lokalisierte TAG Biosynthese findet vermutlich am ER in direkter Nähe zu LDs statt. Die Lipid-Ester gelangen durch Membrankontakt in die bestehenden LDs (Kuerschner et al. 2008; Cheng et al. 2009).

Neben den Details des Mechanismus des LD Wachstums ist vor allem auch die Regulation der LD Größe unklar. Die Oberfläche dieser Organellen scheint aber eine sehr wichtige Rolle zu spielen, so dass man davon ausgehen kann, dass Regulatoren des LD Wachstums mit den LDs assoziiert sind. In der Pflanze *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass der Verlust des LD Proteins Oleosin die Fusion von LDs zur Folge hat (Siloto et al. 2006). Neben den LD-assoziierten Proteinen spielt auch die Phospholipid-Zusammensetzung der Hemimembran bei der Regulation der LD Größe eine bedeutende Rolle (Szymanski et al. 2007; Guo et al. 2008; Fei et al. 2008; Fei, Shui, et al. 2011; Krahrmer et al. 2011). Durch

die regulierte Kopplung der TAG- und Phospholipid-Synthesewege können bestimmte LD Größen realisiert werden. Dieser Zusammenhang konnte z.B. in der Studie von Guo et al. (2008) verdeutlicht werden. Wenn die Phospholipid-Synthese inhibiert wird, während die von TAG kontinuierlich oder verstärkt weiter verläuft, so erfolgt eine Volumenzunahme der LDs, um die Oberflächengröße im Verhältnis zum Volumen zu reduzieren.

Die Phospholipid-Hauptbestandteile der LD Hemimembran Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin werden vor allem über zwei konservierte Stoffwechselwege synthetisiert bzw. modifiziert. Die *de novo* Synthese von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin erfolgt über den sog. „Kennedy pathway“. Die Enzyme Cytidintriphosphat:Phosphocholin-Cytidyltransferase und Cholinphosphotransferase oder Cholin/Ethanolamin-Phosphotransferase sind an den Reaktionen zur Bildung von Phosphatidylcholin im „Kennedy pathway“ beteiligt (Kennedy & Weiss 1956; Henneberry & McMaster 1999). Im Lands Zyklus erfolgt die Deazylierung und Reazylierung von zellulären Phospholipiden. Die Fettsäurezusammensetzung von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin wird modifiziert bzw. Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin werden aus Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidylethanolamin synthetisiert (Vance & Vance 2004; Carman & Han 2009). Die Fettsäuren werden an der sn2-Position vom Phospholipid durch Phospholipase A₂ abgespalten, wodurch Lysophosphatidylcholin entsteht (Lands 1958). Das Lysophosphatidylcholin kann schließlich durch Lysophosphatidylcholin-Azyltransferasen zu einem Phospholipid mit neuer Fettsäurezusammensetzung verestert werden (Hishikawa et al. 2008). Cytidintriphosphat:Phosphocholin-Cytidyltransferasen (Krahmer et al. 2011) und Lysophosphatidylcholin-Azyltransferasen (Moessinger et al. 2011) beispielsweise können direkt an der LD Oberfläche vorgefunden werden, wodurch die lokale Phospholipid-Synthese beim Wachstum von LDs ermöglicht wird.

1.4 Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus der metabolischen Forschung

Zahlreiche zelluläre und organismische Systeme werden zur Aufklärung regulatorischer Mechanismen der Lipidspeicherung, sowie der Identifizierung ihrer Proteinkomponenten, verwendet. Insbesondere die Fruchtfliege *D.m.* hat

sich in den letzten Jahren als Modellorganismus für metabolische Untersuchungen bewährt (Übersichtsartikel z.B. Baker & Thummel 2007; Schlegel & Stainier 2007; Bharucha 2009; Kühnlein 2010). Etwa 70% der Gene, die mit humanen Krankheiten assoziiert sind, haben eindeutige Orthologe im *Drosophila* Genom (<http://superfly.ucsd.edu/homophila/>; Reiter et al. 2001; Chien et al. 2002). Auch die molekularen Mechanismen, die metabolischen Krankheiten zugrunde liegen, sind größtenteils evolutionär konserviert. Beispielsweise ist das kombinierte „Insulin/insulin-like growth factor signalling“ System von Fliegen homolog zu dem Insulin System von Säugern (z.B. Übersichtsartikel Edgar 2006). Das *Drosophila* „Insulin/insulin-like growth factor signalling“ System ist sowohl an der Regulation der Glukosemenge, als auch an Wachstumsprozessen während der Entwicklung beteiligt, wie es in Vertebraten für das Insulin bzw. die „insulin-like growth factors“ zutrifft.

Nicht nur Insulin, sondern auch Hormone wie AKH („adipokinetic hormone“), das funktionale Homolog von Glukagon, spielen eine wichtige Rolle beim Katabolismus in verschiedenen Insekten-Spezies (Van der Horst 2003). AKH kontrolliert sowohl die Homöostase der in der Hämolymphe zirkulierenden Kohlenhydrate (Lee & Park 2004; Kim & Rulifson 2004), als auch die larvale Lipolyse (Lee & Park 2004; Isabel et al. 2005).

Diese Beispiele und die Tatsache, dass LDs in verschiedenen Entwicklungsstadien und Zelltypen vorhanden sind (siehe Abb. 1.3), die experimentell leicht zugänglich sind, verdeutlichen den Vorteil der Verwendung von *Drosophila* als Modell für die Erforschung der Mechanismen, die für die Regulation der Fettspeicherung notwendig sind.

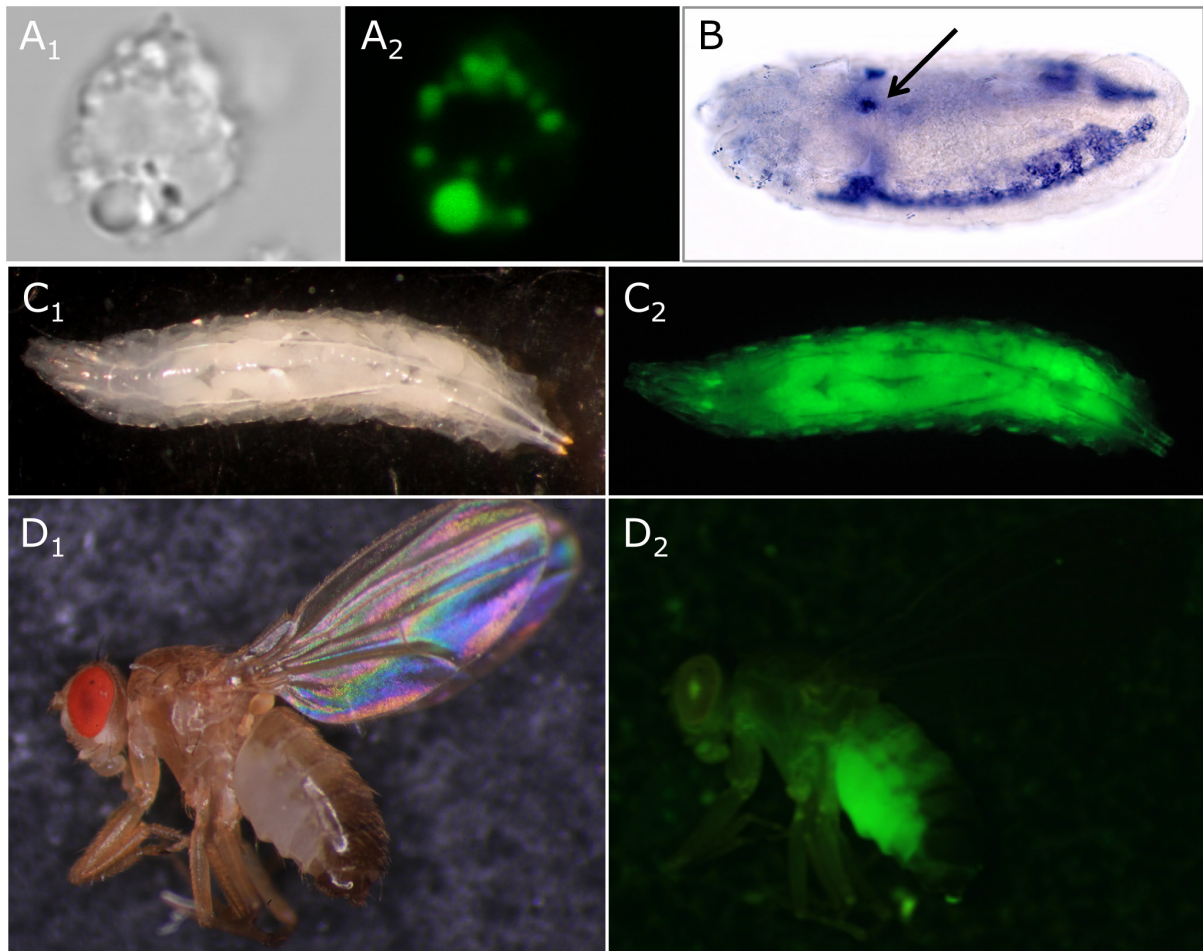


Abb. 1.3: Fettspeicherung in verschiedenen Entwicklungsstadien von *D.m.*

A_{1,2}: Die Bildung von LDs (grün) kann in embryonalen Kc167 Zellen durch die Inkubation mit 400µM Ölsäure-Lösung („OA“; siehe 2.1.8) induziert werden (A₁: Durchlicht-Kanal; A₂: Signal des LD Fluoreszenz-Farbstoffes LipidTOX Deep Red). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. B: Der FK eines *w* Embryos (Stadium 13-14) wurde anhand einer *in situ* Hybridisierung (siehe 2.2.1.1) mit einer DIG-markierten *plin1* antisense RNA Sonde (Beller et al. 2010) sichtbar gemacht. Die Orientierung des Embryos ist anterior nach links und dorsal nach oben. *plin1* Transkripte liegen im FK und der Ringdrüse (Pfeil) vor. Das Bild wurde mit dem Zeiss Axiophot Mikroskop aufgenommen. C_{1,2}: L3 Larve (FK-Gal4 Aktivator-Fliegenlinie) und D_{1,2}: adulte Fliege (RKF805 Aktivator-Fliegenlinie), die EGFP im FK überexprimieren (C₁ und D₁: Durchlicht, C₂ und D₂: EGFP Signal (grün)). Bilder in C und D wurden mit dem Zeiss SterEO Discovery.V8 Mikroskop aufgenommen.

Der Lebenszyklus wird bei *Drosophila* in sechs Entwicklungsstadien eingeteilt: Embryogenese, drei Larvenstadien (L1-L3), Puppenstadium und adulte Fliegen. Da der Embryo selbst aktiv noch keine Nahrung aufnehmen kann, steht diesem Dotter zur Verfügung. Energiespeicherungskomponenten wie TAG werden maternal bereitgestellt, welche für die Differenzierungs- und Wachstumsprozesse genutzt werden. In den späteren larvalen Entwicklungsstadien dient der FK, welcher sich am Ende der Embryogenese aus dem Mesoderm entwickelt (Riechmann et al. 1998), als primäres Energiespeicherorgan mit einer analogen Funktion zum Fettgewebe und der Leber von Säugetieren (Gilbert & Chino 1974; Arrese et al. 2001). Der FK füllt den Großteil der larvalen Körperhöhle aus (Abb.

1.3, C_{1,2}). Der hohe Gehalt gespeicherter Energie wird anschließend für die Metamorphose der Tiere im Puppenstadium benötigt (Demerec 1994). In diesem Entwicklungsstadium findet eine Umstrukturierung des larvalen FKs statt (Nelliot et al. 2006), d.h. der larvale FK dissoziiert in frei-schwimmende Fettzellen („Adipozyten“), welche bis zum Stadium der frisch-geschlüpften Fliegen bestehen bleiben. In etwa vier Tage alten Fliegen werden die Adipozyten durch den adulten FK ersetzt (Demerec 1994), welcher den Großteil des Abdomens ausfüllt (Abb. 1.3, D_{1,2}).

1.5 Die Bedeutung von COPI bei der Lipidspeicherungsregulation

Ein Vorteil von *Drosophila* als experimentelles System ist die relativ einfache Durchführung genetischer und RNAi-vermittelter „Screens“. Ungerichtete Screens haben den Vorteil, auch unvorhergesehene Regulatoren eines zellulären und organismischen Prozesses zu identifizieren. Als Beispiel konnte in zwei unabhängigen RNAi Screens mit *Drosophila* Zellkulturzellen eine Bedeutung des Vesikeltransportkomplexes COPI („coat protein complex I“) bei der Lipidspeicherungsmenge aufgedeckt werden (Beller et al. 2008; Guo et al. 2008).

Der COPI Komplex, welcher den retrograden Vesikeltransport von Lipiden und Proteinen vom Golgi zum ER vermittelt (Übersichtsartikel Lee et al. 2004; Beck et al. 2009), ist notwendig für die korrekte Regulation der Lipidspeicherungsmenge. Weitere Studien mit Säuger Zelllinien haben die evolutionäre Konserviertheit der COPI Funktion bei der Lipidspeicherungsregulation offenbart (Beller et al. 2008; Soni et al. 2009). Hingegen kommt dem COPII Komplex, der den anterograden Transport vom ER zum Golgi vermittelt, eine schwächere Bedeutung für die Lipidspeicherungsregulation zu (Beller et al. 2008; Guo et al. 2008). Nur in einer Studie mit HeLa Zellen konnte nach COPII Reduktion eine Beeinflussung der LD Lokalisation von ATGL beobachtet werden (Soni et al. 2009), woraus man schließen kann, dass die COPII Effekte auf LDs anscheinend stärker von Zellsystem zu Zellsystem variieren.

COPI Vesikel bestehen aus einer Proteinhülle, die aus den sieben Untereinheiten α , β , β' , γ , δ , ε und ζ zusammengesetzt wird (sog. „coatomer“). Dabei bilden die Untereinheiten β , γ , δ und ζ den F-Subkomplex und α , β' und ε den B-Subkomplex

(Fiedler et al. 1996). Von γ COP und ζ COP wurde jeweils noch eine zusätzliche Isoform im humanen Genom identifiziert (Blagitko et al. 1999; Futatsumori 2000), welche als γ 2COP und ζ 2COP bezeichnet werden und wie die anderen Untereinheiten nur in einer Kopie vorliegen. Bei Säugern gibt es Komplexe aus drei verschiedene Kombinationen der beiden Isoformen (γ 1/ ζ 1, γ 1/ ζ 2 und γ 2/ ζ 1), wobei der Anteil von γ 2/ ζ 2 sehr gering ist (Wegmann et al. 2004).

Die Assemblierung des COPI Komplexes wird durch das GDP/GTP bindende Protein Arf1, bzw. Arf79F bei *D.m.*, kontrolliert (siehe Abb. 1.4). Für den GDP/GTP Austausch wird ein GEF („guanine nucleotide exchange factor“) benötigt. Der Austausch gegen ein GTP führt zu einer Konformationsänderung von Arf1. Dadurch wird bei Arf1-GTP eine myristoylierte N-terminale amphipathische Helix frei, die das Protein stabil in der Membran verankert (Franco et al. 1996; Antony et al. 1997; Liu et al. 2009). Anschließend rekrutiert Arf1-GTP den COPI Komplex vom Zytosol an die Golgi Membran (Serafini et al. 1991; Donaldson et al. 1992; Palmer et al. 1993). Um die Fusion der Vesikel mit der Zielmembran zu gewährleisten, muss die Disassemblierung der COPI Proteinhülle stattfinden. Für diesen Prozess wird ein ARF GAP („Arf GTPase-activating protein“; ARF GAP1 bei Säugern) benötigt, welches die GTP Hydrolyse stimuliert (Tanigawa et al. 1993). Arf-GDP dissoziiert, transloziert zurück ins Zytosol und der Zyklus beginnt von vorne.

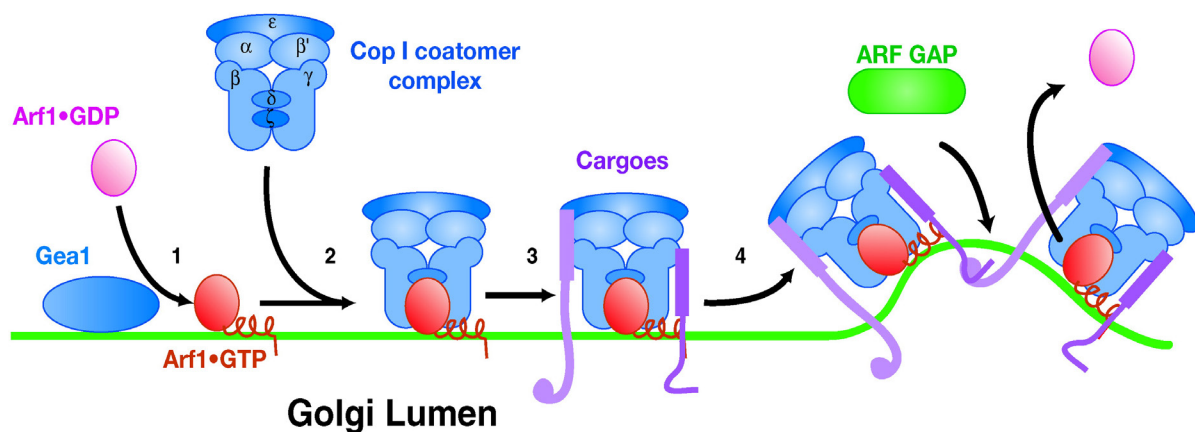


Abb. 1.4: Assemblierung des COPI Komplexes (Abb. aus Lee et al. 2004)

1: Die Assemblierung des COPI Komplexes wird durch GDP/GTP Austausch von Arf1, welcher durch das ARF GEF Gea1 in der Hefe (bzw. GBF1 in Säugern) vermittelt wird, initiiert. 2: Das Membran-gebundene Arf1-GTP rekrutiert den aus sieben Untereinheiten (α , β , β' , γ , δ , ε und ζ) bestehenden COPI Komplex. 3: Kargo-Proteine werden über bestimmte Erkennungssequenzen an einzelne Untereinheiten gebunden. 4: Durch Ausstülpung der Membran wird die Rekrutierung von ARF GAP begünstigt, welches die GTP Hydrolyse von Arf1 stimuliert. Arf1-GDP dissoziiert schließlich von der Membran.

Zusätzlich zu der kanonischen Transportfunktion von COPI führt der knock-down von *Arf79F* bzw. den COPI Untereinheiten α , β , β' , γ , δ und ζ zu einer erhöhten Lipidspeicherung in *Drosophila* Zellkulturzellen (Beller et al. 2008; Guo et al. 2008) und Säugerzellen (Beller et al. 2008; Soni et al. 2009). Wie dieser Effekt verursacht wird, konnte bisher nicht geklärt werden. Auch wenn vermutet werden könnte, dass die Beeinflussung der Lipidspeicherung durch COPI eher indirekt durch gestörten Vesikeltransport zwischen Golgi und ER zustande kommt, sprechen einige Daten für eine direkte Funktion bei der Lipidspeicherungsregulation. Zum einen wurde gezeigt, dass Arf1 direkt mit dem LD Protein ADRP interagiert (Nakamura et al. 2004). Außerdem konnten sowohl Arf1 als auch COPI Untereinheiten zumindest in einem Proteom-Screen aufgereinigter LDs identifiziert werden (Bartz, Zehmer, et al. 2007). Eine aktuelle Studie berichtet zudem von einer direkten Interaktion des Arf1 GEFs GBF1 („Golgi Brefeldin A resistance factor 1“) mit ATGL (Ellong et al. 2011).

In Säugerzellen wurde gezeigt, dass die erhöhte Lipidspeicherung durch eine verringerte Lipolyserate zustande kommt (Beller et al. 2008). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die LD Lokalisation der TAG Lipase ATGL inhibiert wird (Beller et al. 2008; Soni et al. 2009). Eine neue Studie berichtet, dass die Lokalisation von überexprimiertem ATGL in HeLa Zellen jedoch nicht durch COPI beeinflusst wird (Takashima et al. 2011).

COPI ist nicht nur spezifisch bei der Lokalisation von endogenem ATGL, sondern auch bei der von manchen PAT-Domänen Proteinen beteiligt (Beller et al. 2008; Soni et al. 2009). Die COPI abhängige Lokalisation der LD Proteine ist Zelltyp-spezifisch. Beispielsweise wurde in AML12 Leberzellen der Maus gezeigt, dass die Lokalisation von ADRP/PLIN2 durch den COPI knock-down nicht beeinflusst wird, während die Rekrutierung von Tip47/PLIN3 an die LD Oberfläche verstärkt wird bzw. das Protein dort stabilisiert wird (Beller et al. 2008). Hingegen ist die Lokalisation von Tip47/PLIN3 infolge des COPI knock-downs in HeLa Zellen unbeeinträchtigt und die Assoziation von ADRP/PLIN2 mit LDs inhibiert (Soni et al. 2009).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Funktion von COPI bei der Regulation der Lipidspeicherung zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der COPI Funktion bei der Lipidspeicherungsregulation im Organismus. Zudem sollte die Lokalisation der einzelnen COPI Komponenten analysiert werden. Darüber hinaus sollte die mögliche Funktion von COPI bei der LD Proteinlokalisierung genauer charakterisiert werden.

Außerdem wurde im Verlauf der durchgeführten Analysen herausgefunden, dass die Expression von CG9186, ein Protein mit bisher unbekannter Funktion, in Kombination mit COPI RNAi einen offensichtlichen zellulären Phänotyp hervorruft. Die detailliertere Charakterisierung von CG9186 ergab, dass das Protein maßgeblich an der Regulation der LD Größe und Verteilung innerhalb der Zellen beteiligt ist. Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnisse könnten den Grundstein für zukünftige Analysen zur Erforschung der LD Größenregulation legen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheit („pro analysis“) von den nachfolgenden Firmen, wenn nicht anders erwähnt, bezogen:

AppliChem (<http://www.applichem.com/>); Biomol (<http://www.biomol.de/>); Fermentas (<http://www.fermentas.de/>); Gibco/BRL Life Technologies (<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/brands/Gibco.html>); Invitrogen (<http://de-de.invitrogen.com/>); Merck (<http://www.merckgroup.com/>); Roth (<http://www.carlroth.com/>); Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/>); VWR (<https://de.vwr.com/>).

Sämtliche Lösungen wurden mit destilliertem Wasser (dH₂O) angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert.

AP-Puffer

20mM Tris/HCl pH 9,5
100mM NaCl
50mM MgCl₂

APS, 10%

1g Ammonium-Peroxidsulfat, auf 10mL mit H₂O auffüllen

BBT, 10x, 1L

10mM Tris
55mM NaCl
40mM KCl
7mM MgCl₂
20mM Glukose
50mM Sucrose
0,1% BSA (frisch hinzufügen)
0,1% TWEEN[®] 20 (frisch hinzufügen)
pH 6,95

Bleichlösung

50% Klorix (<http://www.colgate.de/>) in H₂O

Canada-Balsam (<http://www.sigmaaldrich.com/>)

Ethidiumbromid

10mg/mL (<http://www.carlroth.com/>)

FBB („Fat Body Buffer“)

10mM HEPES pH 7,6

10mM KCl

0,1mM EDTA

0,1mM EGTA

1mM DTT

1 Tablette „Complete, EDTA free“ (Protease Inhibitor Cocktail)
(<http://www.roche.de/>) für 50mL FBB

Hybe (pH 6,7)

50% Formamid

5x SSC

5µL/mL Heparin

5mg/mL Torula yeast RNA

0,1% TWEEN[®] 20

Hybe B

50% Formamid

5x SSC

Laufpuffer, 10x, 1L

30,3g Tris/HCl

144g Glyzin

1% SDS

Mowiol⁺⁺, etwa 50mL

12g Glyzerol
4,8g Mowiol 40-88
12mL H₂O
24mL 0,2M Tris/HCl (pH 8,5)
2,5mg DABCO/mL Mowiol und 2mg Gallate/mL (bis zu 8% (w/v))

PBS, 10x

95,5g/L vorgemischte Salze (<http://www.applichem.com/>)

PBT-Puffer

1x PBS
0,1% TWEEN[®] 20

Probenpuffer, 5x

250mM Tris/HCl pH 6,8
500mM DTT
10% SDS
0,5% Bromphenolblau (ein paar Körnchen)
5mL Glyzerol
➔ mit H₂O auf 10mL auffüllen

Proteinase K

5mg/mL in H₂O

RNA-Fixierer, 10x

100mL 10x PBS
100mL 0,5M EGTA pH 8,0
700mL H₂O
100g Paraformaldehyd
➔ pH-Wert 7,0, auf 1L mit H₂O auffüllen.

SB-Puffer („Squishing buffer“, 5mL)
10mM Tris/HCl, pH 8,2
1mM EDTA
25mM NaCl
200µg/mL Proteinase K (frisch hinzufügen)

TB-Puffer
10mM Pipes
15mM CaCl₂
250mM KCl
→ pH auf 6,7 einstellen (mit KOH)
MnCl₂ auf eine Endkonzentration von 55mM zugeben
Puffer sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

TBE-Puffer (pH 8,0), 10x
890mM Tris-Base
890mM Borsäure
20mM EDTA

TE-Puffer
10mM Tris/HCl
0,5mM EDTA, pH 8,0

Transferpuffer, 10x, 1L
30,3g Tris/HCl
144g Glyzin
→ Vor der Verwendung zu der einfach verdünnten Lösung 20% Methanol geben.

Triton® X-100
Standardmäßig 0,1% in PBS verdünnt zum Permeabilisieren von Zellen bzw. larvalem Gewebe

2.1.2 Oligonukleotide

Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung
9186_2ndhalf_fwd	PHO-TGC TAT ATG CTG TTC CCC ACC GTC	pENTR-CG9186 Mutagenese
9186_1sthalf_re	PHO-CTT TTG GAT GCG ACT CCG TAT CC	pENTR-CG9186 Mutagenese
9186_M_reverse	PHO-AAT GGA GAA AAT CAA GAA GTA GAT CTG TAT CAG	pENTR-CG9186 Mutagenese
9186_M_forward	PHO-GCC TTC ATC GAG AAA TAC GTG CC	pENTR-CG9186 Mutagenese
CG9186-S119A_fw	PHO-CCA CTT GAT TGG GCA CgC CAT CGG AGC GTG GAT G	pENTR- CG9186(S119A) Mutagenese
CG9186-S119A_re	PHO-ATC TTG ACA TCA CTT GGC ACG TAT TTC TCG ATG	pENTR- CG9186(S119A) Mutagenese
Vector_Stop_for	PHO-TAGGGGCGCGCCGACCCAGC	pENTR-CG9186 Mutagenese
Vector_Start_re	PHO-CATGGTGGCGCCGCGGAGC	pENTR-CG9186 Mutagenese
zCOP_Asc1_rev4	gcaaggcgcgccCTACCAAATAGACCATTAAGGG	<i>zetaCOP</i> ORF Amplifikation
zCOP_Not1_fwd3	gct tgc ggc cgc cac cAT GGA CGG ATT TAT GAT GGA TAT C	<i>zetaCOP</i> ORF Amplifikation
betaCOP_Asc1rev3	gca agg cgc gcc CTA GGC CGC CTG CAC CGA CTG CTT C	<i>betaCOP</i> ORF Amplifikation
betaCOP_Not1fwd 3	gct tgc ggc cgc cac cAT GAC GTC GCA AGT GCC GTG CTA C	<i>betaCOP</i> ORF Amplifikation
b'COP_Asc1_rev3	gca agg cgc gcc CTA ATC GTC GCT TAG AAA ATC GTC	<i>beta'COP</i> ORF Amplifikation
b'COP_Not1_fwd3	gct tgc ggc cgc cac cAT GCC TCT CAA ACT AGA CAT CAA GC	<i>beta'COP</i> ORF Amplifikation
eCOP_Asc1_rev3	gca agg cgc gcc CTA GAC GGC GAG CAG TTT TTC ACC G	<i>epsilonCOP</i> ORF Amplifikation

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung
eCOP_Not1_fwd3	gct tgc ggc cgc cac cAT GAG CCG ACA GCA GAA TGA GG	<i>epsilonCOP</i> ORF Amplifikation
Arf79F_Q71L_rev	GGGGACGAATTTTGTctagGCCACCCACATCCC	pENTR- Arf79F(Q71L) Mutagenese
Arf79F_Q71L_fwd	GGGATGTGGGTGGCctaGACAAAATTCGTCCCC	pENTR- Arf79F(Q71L) Mutagenese
Arf79F_T31N_rev	GTTTGTACAGAATTGTgttTTTACCAGCGGCATCC	pENTR- Arf79F(T31N) Mutagenese
Arf79F_T31N_fwd	GGATGCCGCTGGTAAaacACAATTCTGTACAAAC	pENTR- Arf79F(T31N) Mutagenese
KTO31	GCT TGC GGC CGC CAC CAT GAA CTA TTT TTC CCT TAC CTC GC	<i>gammaCOP</i> ORF Amplifikation
KTO32	GCA AGG CGC GCC TTA TCC AAT GGC CGC CGT TAT CAG C	<i>gammaCOP</i> ORF Amplifikation
KTO29	GCT TGC GGC CGC CAC CAT GCT GAC CAA CTT CGA GTC GAA GTC G	<i>alphaCOP</i> ORF Amplifikation
KTO30	GCA AGG CGC GCC CTA GCG GAA TTG CAG GTT TGA AAT GC	<i>alphaCOP</i> ORF Amplifikation
KTO27	GCT TGC GGC CGC CAC CAT GGG AAA CGT ATT CGC GAA CTT ATT C	<i>Arf79F</i> ORF Amplifikation
KTO28	GCA AGG CGC GCC TTA GCG ATT AGC GTT CTT CAA TTG GTT GG	<i>Arf79F</i> ORF Amplifikation
GFP_dsRNA_fwd	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CT	<i>EGFP</i> dsRNA Herstellung
GFP_dsRNA_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT CTT GAA GTT CAC CTT GAT GCC G	<i>EGFP</i> dsRNA Herstellung
bmm_fwd	taatacgactcactatagggCTGGAGGGTCTACAGAAG CATCTAC	<i>bmm</i> dsRNA Herstellung (http://www.dkfz.de/ ; Horn & Boutros 2010)

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung
bmm_rev	taatacgactcactatagggGAAACCACGAATGTCGA CTGAACC	<i>bmm</i> dsRNA Herstellung (http://www.dkfz.de/ ; Horn & Boutros 2010)
DRSC30831_R	taatacgactcactatagggGAACGAGTACAAGGCTTG GG	α COP dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC30831_S	taatacgactcactatagggAACAGATTCAGGGTCGGA TG	α COP dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC31264_R	taatacgactcactatagggTTGCCAACGACGTAATGCT A	γ COP dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC31264_S	taatacgactcactatagggTAGGGTAGCTTGGGACAT GG	γ COP dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC02003_R	taatacgactcactatagggACTGCAGGCCTTGCGT	ε COP dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC02003_S	taatacgactcactatagggCTTCTTCAGCAGAGATTCA C	ε COP dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC35610_R	taatacgactcactatagggCACAACTACTACG ACACGCT	ε COP dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC35610_S	taatacgactcactatagggTCTAGACGGCGAGCAGTT TT	ε COP dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC31426_R	taatacgactcactatagggACTACCGAGCATCCGAAA GA	<i>Arf79F</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC31426_S	taatacgactcactatagggCACATTGAAACCTAGGGG GA	<i>Arf79F</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung
DRSC07193_R	taatacgactcactatagggCATATCGGCGCACTATAAT C	<i>garz</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC07193_S	taatacgactcactatagggTTGCACAAACTTTGATTCC TG	<i>garz</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC32127_R	taatacgactcactatagggTCCTCCGCCTCGAGTAGTA A	<i>garz</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC32127_S	taatacgactcactatagggGGCAGCAGTTCGTTTAGG AG	<i>garz</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC14117_R	taatacgactcactatagggATAATGCCGGCAAGACGA	<i>Arf84F</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC14117_S	taatacgactcactatagggCTTTAATTTGTTGGATGA GAG	<i>Arf84F</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC24641_R	taatacgactcactatagggGAATTAAGGGCAAGGAAG GC	<i>pld</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC24641_S	taatacgactcactatagggTACCACGTGGCATGAGTG TT	<i>pld</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC38086_R	taatacgactcactatagggCGTCGTAATCGACCAAACC T	<i>pld</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC38086_S	taatacgactcactatagggCTTCATCGCGTTGTTCTTC A	<i>pld</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC37375_R	taatacgactcactatagggATGAAACCCCATGAAATCC A	<i>Arf51F</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC37375_S	taatacgactcactatagggTACGGATATTTACCGGCTG C	<i>Arf51F</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung
DRSC31247_R	taatacgactcactatagggGTTTCGGCGAGTACTCAAA GG	<i>sec23</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC31247_S	taatacgactcactatagggTGGCATGTCCTGGTATTTG A	<i>sec23</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC31248_R	taatacgactcactatagggTTACCAGCCTTTGAAGGAG C	<i>sec23</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC31248_S	taatacgactcactatagggCTCGGAAATGGCAGCATA TT	<i>sec23</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC09667_R	taatacgactcactatagggCTTATTGGCGTTGCTACTA C	<i>Arf72A</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC09667_S	taatacgactcactatagggGCGACTCTGCAGGGTGT	<i>Arf72A</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC05921_R	taatacgactcactatagggTTCTGTACAAACTGAAACT TGG	<i>Arf51F</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC05921_S	taatacgactcactatagggGCTTGTAGCAAATATCAG TATG	<i>Arf51F</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC08637_R	gtaatacgactcactatagggCCGCCAGAGGCCAGTAT	<i>CG9186</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC08637_S	gtaatacgactcactatagggCTCTACAATCTCCCTTTGA ATC	<i>CG9186</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC29932_R	gtaatacgactcactatagggTATATGCTGTTCCCCACCG T	<i>CG9186</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)
DRSC29932_S	gtaatacgactcactatagggTTGAGGAGGTCCAGGTTC TG	<i>CG9186</i> dsRNA Herstellung (www.flyrnai.org)

2.1.3 ESTs

Tab. 2.2 : Verwendete ESTs

Name	Gen	Verwendung
LD24904	<i>Arf79F</i>	RNA-Sonde; ORF Amplifikation
LD46584	<i>aCOP</i>	RNA-Sonde; ORF Amplifikation
GH09317	<i>βCOP</i>	ORF Amplifikation
GH18655	<i>β'COP</i>	ORF Amplifikation
RE37840	<i>γCOP</i>	RNA-Sonde; ORF Amplifikation
LD29885	<i>εCOP</i>	ORF Amplifikation
RE70427	<i>ζCOP</i>	ORF Amplifikation
LP01162	<i>CG9186</i>	RNA-Sonde

2.1.4 Plasmide

Tab. 2.3 : Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pENTR/D-TOPO	Donor-Vektor des Gateway Rekombinations-Systems	www.invitrogen.com/
pTGW	UAS-Expressionsvektor des Gateway Rekombinations-Systems mit N-terminalem EGFP	T. Murphy/DGRC
pUbi-EGFP-rfA	EGFP kodierende Sequenz für N-terminale Fusionen wurde zusammen mit der Gateway att Rekombinationskassette, unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors, in pBluescript (www.stratagene.com/) kloniert	A. Herzig
pUbi-TdT-rfA	TdT kodierende Sequenz für N-terminale Fusionen wurde zusammen mit der Gateway att Rekombinationskassette, unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors, in pBluescript (www.stratagene.com/) kloniert	A. Herzig

Name	Beschreibung	Referenz
pUbi-rfA-TdT	TdT kodierende Sequenz für C-terminale Fusionen wurde zusammen mit der Gateway att Rekombinationskassette, unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors, in pBluescript (www.stratagene.com/) kloniert	A. Herzig
pAkt-Gal4	Die Expression von Gal4 steht unter der Kontrolle des in der Zelle ubiquitär aktiven Aktin-Promotors	P. Müller
pH-YFP-N	Säuger Expressionsvektor des Gateway Rekombinations-Systems mit N-terminalem EYFP	Abteilung S. Hell, MPIbpc Göttingen
pENTR-CG9186	ORF von <i>CG9186</i> wurde vom EST per PCR amplifiziert und mit AscI/NotI in pENTR/D-TOPO kloniert	Y. Zhao, 2007
pTGW-CG9186	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-CG9186 mit pTGW	K. Thiel, 2008
pENTR-CG9186(S119A)	AS-Austausch Serin in Alanin an Position 119 vom <i>CG9186</i> ORF im Konstrukt pENTR-CG9186	Diese Arbeit
pTGW-CG9186(S119A)	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-CG9186(S119A) mit pTGW	Diese Arbeit
pTGW-SesB	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-sesB mit pTGW	K. Thiel, 2008
pTGW-CG42351	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-CG42351 mit pTGW	K. Thiel, 2008
pUbi-KdelR:TdT	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-KdelR mit pUbi-rfA-TdT	P. J. Thul
pCoBlast	Vektor mit Blasticidin Resistenz-Gen; zur Generierung von stabil-transfizierten Zelllinien	www.invitrogen.com/

Name	Beschreibung	Referenz
pENTR- α COP	ORF von α COP wurde vom EST per PCR amplifiziert und mit AscI/NotI in pENTR/D-TOPO kloniert	Diese Arbeit
pTGW- α COP	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- α COP mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR- β COP	ORF von β COP wurde vom EST per PCR amplifiziert und mit AscI/NotI in pENTR/D-TOPO kloniert	Diese Arbeit
pTGW- β COP	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- β COP mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR- β' COP	ORF von β' COP wurde vom EST per PCR amplifiziert und mit AscI/NotI in pENTR/D-TOPO kloniert	Diese Arbeit
pTGW- β' COP	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- β' COP mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR- γ COP	ORF von γ COP wurde vom EST per PCR amplifiziert und mit AscI/NotI in pENTR/D-TOPO kloniert	Diese Arbeit
pTGW- γ COP	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- γ COP mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR- ϵ COP	ORF von ϵ COP wurde vom EST per PCR amplifiziert und mit AscI/NotI in pENTR/D-TOPO kloniert	Diese Arbeit
pTGW- ϵ COP	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- ϵ COP mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR- ζ COP	ORF von ζ COP wurde vom EST per PCR amplifiziert und mit AscI/NotI in pENTR/D-TOPO kloniert	Diese Arbeit
pTGW- ζ COP	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- ζ COP mit pTGW	Diese Arbeit

Name	Beschreibung	Referenz
pENTR-Arf79F	ORF von <i>Arf79F</i> wurde vom EST per PCR amplifiziert und mit AscI/NotI in pENTR/D-TOPO kloniert	Diese Arbeit
pTGW-Arf79F	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- Arf79F mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR-Arf79F(T31N)	AS-Austausch Threonin in Asparagin an Position 31 vom <i>Arf79F</i> ORF im Konstrukt pENTR-Arf79F	Diese Arbeit
pTGW-Arf79F(T31N)	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- Arf79F(T31N) mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR-Arf79F(Q71L)	AS-Austausch Glutamin in Leucin an Position 71 vom <i>Arf79F</i> ORF im Konstrukt pENTR-Arf79F	Diese Arbeit
pTGW-Arf79F(Q71L)	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- Arf79F(Q71L) mit pTGW	Diese Arbeit
pUAST-PLIN1:EGFP	UAS-Expressionsvektor mit N-terminalem EGFP	R. P. Kühnlein
pUAST-PLIN2:EGFP	UAS-Expressionsvektor mit N-terminalem EGFP	R. P. Kühnlein
pTGW-CG2254	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- CG2254 mit pTGW	M. Beller
pUAST-Bmm:EGFP	UAS-Expressionsvektor mit N-terminalem EGFP	R. P. Kühnlein
pENTR-CG11055	ORF von <i>CG11055</i> wurde vom EST per PCR amplifiziert und mit AscI/NotI in pENTR/D-TOPO kloniert	Y. Zhao, 2007
pTGW-CG11055	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-CG11055 mit pTGW	Diese Arbeit
pUbi-PLIN2:TdT	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- PLIN2 mit pUbi-TdT-rfA	M. Beller

Name	Beschreibung	Referenz
pUbi-CG9186:EGFP	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-CG9186 mit pUbi-EGFP-rfA	Y. Zhao, 2007
pUbi- CG9186(S119A):EGFP	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-CG9186(S119A) mit pUbi- EGFP-rfA	Diese Arbeit
pH-CG9186:YFP	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-CG9186 mit pH-YFP-N	Diese Arbeit
pENTR-CG9186[delta1- 140]	Deletion der AS 1-140 vom <i>CG9186</i> ORF im Konstrukt pENTR-CG9186	Diese Arbeit
pTGW-CG9186[delta1- 140]	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- CG9186[delta1-140] mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR- CG9186[delta141-307]	Deletion der AS 141-307 vom <i>CG9186</i> ORF im Konstrukt pENTR- CG9186	Diese Arbeit
pTGW- CG9186[delta141-307]	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- CG9186[delta141-307] mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR- CG9186[delta201-307]	Deletion der AS 201-307 vom <i>CG9186</i> ORF im Konstrukt pENTR- CG9186	Diese Arbeit
pTGW- CG9186[delta201-307]	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- CG9186[delta201-307] mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR- CG9186(S119A) [delta201-307]	AS-Austausch Serin in Alanin an Position 119 und Deletion der AS 201-307 vom <i>CG9186</i> ORF im Konstrukt pENTR-CG9186	Diese Arbeit

Name	Beschreibung	Referenz
pTGW-CG9186(S119A) [delta201-307]	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR- CG9186(S119A)[delta201- 307] mit pTGW	Diese Arbeit
pENTR-CG9186[aa141- 200]	Deletion der AS 1-140 und 201-307 vom CG9186 ORF im Konstrukt pENTR-CG9186	Diese Arbeit
pTGW-CG9186[aa141- 200]	Erhalten durch Gateway Rekombinations-Reaktion von pENTR-CG9186[aa141-200] mit pTGW	Diese Arbeit

2.1.5 Antikörper (AK)

Tab. 2.4: Verwendete AK

AK	Verdünnungsfaktor	Referenz
Kaninchen anti EGFP	1:5000	http://www.sysy.com/
anti Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:40.000	http://www.piercenet.com
anti DIG, AP-gekoppelt	1:2000	http://www.roche.de/
anti Ratte, HRP-gekoppelt	1:20.000	http://www.jireurope.com/
anti Maus, HRP-gekoppelt	1:40.000	http://www.piercenet.com
Ratte anti CG9186 (#2)	1:250 (Färbung an Zellen); 1:3000 (Western Blot)	Diese Arbeit; http://www.peptid.de
Maus anti β -Tubulin E7	1:500	http://dshb.biology.uiowa.edu/
anti Ratte Alexa488	1:500	http://de-de.invitrogen.com/
anti Ratte Alexa568	1:500	http://de-de.invitrogen.com/
anti Maus Alexa568	1:500	http://de-de.invitrogen.com/
Kaninchen anti GM130	1:500	http://www.abcam.com/
anti Kaninchen Alexa568	1:500	http://de-de.invitrogen.com/
anti Maus Alexa488	1:500	http://de-de.invitrogen.com/
anti Kaninchen Alexa488	1:500	http://de-de.invitrogen.com/

AK	Verdünnungsfaktor	Referenz
Kaninchen anti PLIN1	1:3000	Beller et al. 2010
Kaninchen anti PLIN2	1:3000	Grönke et al. 2003

2.1.6 dsRNAs

Tab. 2.5: Hergestellte dsRNAs

Name	Gen	Verwendetes Oligonukleotidpaar
DRSC30831	<i>aCOP</i>	DRSC30831_R, DRSC30831_S
DRSC31264	<i>γCOP</i>	DRSC31264_R, DRSC31264_S
DRSC02003	<i>εCOP</i>	DRSC02003_R, DRSC02003_S
DRSC35610	<i>εCOP</i>	DRSC35610_R, DRSC35610_S
DRSC31426	<i>Arf79F</i>	DRSC31426_R, DRSC31426_S
DRSC32127	<i>gartenzwerg (garz)</i>	DRSC32127_R, DRSC32127_S
DRSC31248	<i>sec23</i>	DRSC31248_R, DRSC31248_S
DRSC14117	<i>Arf84F</i>	DRSC14117_R, DRSC14117_S
DRSC24641	<i>pld</i>	DRSC24641_R, DRSC24641_S
DRSC07193	<i>garz</i>	DRSC07193_R, DRSC07193_S
DRSC37375	<i>Arf51F</i>	DRSC37375_R, DRSC37375_S
DRSC38086	<i>pld</i>	DRSC38086_R, DRSC38086_S
DRSC31247	<i>sec23</i>	DRSC31247_R, DRSC31247_S
DRSC09667	<i>Arf72A</i>	DRSC09667_R, DRSC09667_S
DRSC05921	<i>Arf51F</i>	DRSC05921_R, DRSC05921_S
EGFP	<i>EGFP</i>	GFP_dsRNA_fwd, GFP_dsRNA_rev
bmm	<i>bmm</i>	bmm_fwd, bmm_rev
DRSC08637	<i>CG9186</i>	DRSC08637_R, DRSC08637_S
DRSC29932	<i>CG9186</i>	DRSC29932_R, DRSC29932_S

2.1.7 Fliegenlinien

Tab. 2.6: Verwendete Fliegenlinien

Fliegenlinie	Genotyp	Referenz
<i>w⁻</i>	<i>w¹¹¹⁸</i>	/
VDRC <i>w⁻</i> (RKF1084)	<i>w¹¹¹⁸</i>	R. P. Kühnlein
FK-Gal4 (RKF125)	<i>w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}FB+SNS</i>	Grönke et al. 2003

Fliegenlinie	Genotyp	Referenz
RKF805	$y^* w^*$; $P\{w[+mW.hs]=GawB\}FB$ $P\{w[+m^*]UAS-GFP\ 1010T2\}\#2/+;$ $P\{w[+mC]=tubP-GAL80[ts]\}2/+$	Beller et al. 2010
Sgs3-Gal4 (BL6870)	w^{1118} ; $P\{w[+mC]=Sgs3-GAL4.PD\}TP1$	Bloomington Drosophila Stock Center
patched-Gal4 (BL2017)	$w[*]$; $P\{w[+mW.hs]=GawB\}ptc[559.1]$	Bloomington Drosophila Stock Center
Aktin-Gal4	y^1 , w^* ; $P\{w[+mC]=Act5C-GAL4\}25FO1/CyO$, $y[+]$	Bloomington Drosophila Stock Center
Tubulin-Gal4	w^* ; $P\{w[+mC]=tubP-GAL4\}LL7/CyO$	A. Herzig
engrailed-Gal4 (BL30564)	$w[*]$; $P\{w[+mW.hs]=en2.4-GAL4\}e16E$	Bloomington Drosophila Stock Center
Hsp70-Gal4 (BL1799)	$w[*]$; $P\{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB\}89-2-1$	Bloomington Drosophila Stock Center
CG9186 RNAi; VDRC105945	$P\{KK108771\}VIE-260B$	VDRC
α COP RNAi; VDRC35305	w^{1118} ; $P\{GD12332\}v35305/TM3$	VDRC
α COP RNAi; VDRC35306	w^{1118} ; $P\{GD12332\}v35306/TM3$	VDRC
β COP RNAi; VDRC15419	w^{1118} ; $P\{GD5005\}v15419$	VDRC
β' COP RNAi; VDRC42071	w^{1118} ; $P\{GD12007\}v42071$	VDRC
γ COP RNAi; VDRC25101	w^{1118} ; $P\{GD8960\}v25101/CyO$	VDRC
δ COP RNAi; VDRC41549	w^{1118} ; $P\{GD8451\}v41549/TM3$	VDRC
ϵ COP RNAi; VDRC24059	w^{1118} ; $P\{GD14246\}v24059$	VDRC

Fliegenlinie	Genotyp	Referenz
ϵ COP RNAi; VDRC107588	$P\{KK100007\}VIE-260B$	VDRC
ζ COP RNAi; VDRC34768	$w^{1118}; P\{GD11168\}v34768/TM3$	VDRC
<i>Arf79F</i> RNAi; VDRC23082	$w^{1118}; P\{GD12522\}v23082$	VDRC
<i>plin2</i> RNAi; VDRC40734	$w^{1118}; P\{GD14108\}v40734$	VDRC
<i>mdy</i> RNAi; VDRC6367	$w^{1118}; P\{GD1749\}v6367$	VDRC
<i>bmm</i> RNAi; VDRC37877	$w^{1118}; P\{GD5139\}v37877$	VDRC
pTGW-CG9186, Insertionslinie #5	$P\{w[+mC]UAS-CG9186:EGFP\} *$	Diese Arbeit
pTGW-CG9186, Insertionslinie #7	$P\{w[+mC]UAS-CG9186:EGFP\} *$	Diese Arbeit
pTGW-CG9186, Insertionslinie #11	$P\{w[+mC]UAS-CG9186:EGFP\} *$	Diese Arbeit
pTGW- CG9186(S119A), Insertionslinie #3	$w^{1118}; P\{w[+mC]UAS-CG9186(S119A):EGFP\}/CyO$	Diese Arbeit
pTGW- CG9186(S119A), Insertionslinie #4	$w^{1118}; P\{w[+mC]UAS-CG9186(S119A):EGFP\}/CyO$	Diese Arbeit
pTGW- α COP, Insertionslinie #1	$w^{1118}; +/+; P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/TM3, Sb^1$	Diese Arbeit
pTGW- α COP, Insertionslinie #2	$w^{1118}; +/+; P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/TM3, Sb^1$	Diese Arbeit
pTGW- α COP, Insertionslinie #3	$w^{1118}; P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/CyO$	Diese Arbeit
pTGW- α COP, Insertionslinie #4	$w^{1118}; P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/CyO$	Diese Arbeit
pTGW- α COP, Insertionslinie #5	$w^{1118}; P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/FM7i$	Diese Arbeit
pTGW- α COP, Insertionslinie #6	$w^{1118}; +/+; P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/TM3, Sb^1$	Diese Arbeit

Fliegenlinie	Genotyp	Referenz
pTGW- α COP, Insertionslinie #7	$w^{1118}, P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/FM7i$	Diese Arbeit
pTGW- α COP, Insertionslinie #8	$w^{1118}; +/+; P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/TM3, Sb^1$	Diese Arbeit
pTGW- α COP, Insertionslinie #9	$w^{1118}; +/+; P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/TM3, Sb^1$	Diese Arbeit
pTGW- α COP, Insertionslinie #10	$w^{1118}; +/+; P\{w[+mC]UAS-\alpha COP:EGFP\}/TM3, Sb^1$	Diese Arbeit
UAS-2xEGFP (BL6874)	$w[*]; P\{w[+mC]=UAS-2xEGFP\}AH2$	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center

*: chromosomale Integrationsstelle noch nicht ermittelt

2.1.8 Nährmedien

Apfelsaft-Agarplatten (auf 3L ddH₂O)

- 100g Kristallzucker in 1L Apfelsaft
- 85g Agar-Agar
- 40mL Nipagin (15% in Ethanol)

Fliegenfutter (auf 20L ddH₂O)

- 125g gemahlener Agar-Agar
- 360g Hefe
- 200g Sojamehl
- 1,6kg Maismehl
- 440g Rübensirup
- 1,6kg Malz
- 30g Nipagin in 100mL Ethanol gelöst
- 126mL Propionat

LB-Agar

- 1L LB-Medium
- 15g Agar-Agar

LB-Medium (auf 1L ddH₂O)

10g Bacto-Trypton
5g Bacto-Hefe Extrakt
10g NaCl

Ölsäure-Lösung

2,8g BSA (Fettsäure-frei; <http://www.sigmaaldrich.com/>)
20mL 0,1M Tris, pH 8,0
78µL Ölsäure (Calbiochem; <http://www.merckmillipore.de/>)
Bei 37°C für 1h inkubieren, mit einem sterilen Filter (0,22µm) in ein Gefäß abfüllen und bei 4°C lagern.
➔ 32µL/mL Schneider's Medium entspricht einer Konzentration von 400µM.

Schneider's *Drosophila* Komplettmedium

500mL Schneider's *Drosophila* Medium
(Gibco®; <http://de-de.invitrogen.com/>)
10% fetales Kälberserum Gold (<http://www.paa.com/>)
5% Penicillin/Streptomycin (Gibco®; <http://de-de.invitrogen.com/>)
+ 10µg/mL Blastocidin S HCl (<http://de-de.invitrogen.com/>) für stabil-transfizierte Zelllinien mit Blastocidin-Resistenz

+ 100µg/mL Insulin solution human
(<http://www.sigmaaldrich.com/>) für ML-DmBG3-c2 Zellen

2.1.9 Zellkultur-Linien**Kc167 Zellen (Cherbas & Cherbas 1998):**

embryonale Zelllinie von *D.m.* des DGRC (*Drosophila* Genomics Resource Center (<https://dgrc.cgb.indiana.edu>) beziehungsweise aus Harvard; erhalten von M. Beller)

ML-DmBG3-c2 Zellen

larvale Zelllinie von *D.m.* des DGRC (<https://dgrc.cgb.indiana.edu>); erhalten von M. Beller

HEK-293 Zellen

erhalten von der Abteilung R. Jahn, MPIbpc Göttingen

2.1.10 Fluoreszenz-Farbstoffe

BODIPY 493/503 (Gocze & Freeman 1994)

(Molecular Probes; <http://de-de.invitrogen.com/>); Anregung: 488nm, detektierter Emissionsbereich: 500-560nm

HCS LipidTOX™ Deep Red neutral lipid stain (Granneman et al. 2009)

(Verdünnung 1:250 auf Zellen, 1:500 auf larvale Gewebe und Adipozyten frisch-geschlüpfter Fliegen; <http://de-de.invitrogen.com/>); Anregung: 633nm, detektierter Emissionsbereich: 650-720nm

Nile red (Greenspan et al. 1985)

(Molecular Probes; <http://de-de.invitrogen.com/>); Anregung: 514nm, detektierter Emissionsbereich: 550-690nm

2.1.11 Besondere Geräte

Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System
(<http://www.appliedbiosystems.com/>)

Bechmark Microplate Reader (<http://www.bio-rad.com>)

Bioruptor (<http://www.diagenode.com/>)

Leica MZ Flou III Fluoreszenz Binokular (<http://www.leica.de/>)

Leica TCS SP2 AOBS Konfokales Mikroskop (<http://www.leica.de/>)

Leica TCS SP5 Konfokales Mikroskop (<http://www.leica.de/>)

PerkinElmer UltraVIEW VoX Spinning Disk Konfokalmikroskop
(<http://www.perkinelmer.com/>)

Precellys 24 Homogenisator (<http://www.peqlab.de/>)

Zeiss Axiophot Mikroskop (<http://www.zeiss.de/>)

Zeiss Axiovert 200M Mikroskop (<http://www.zeiss.de/>)

Zeiss SteREO Discovery.V8 Mikroskop (<http://www.zeiss.de/>)

2.2 Methoden

2.2.1 Histologische Methoden

2.2.1.1 RNA *in situ* Hybridisierung

RNA *in situ* Hybridisierungen an Embryonen wurden basierend auf den Protokollen von Tautz & Pfeifle (1989) und Grönke et al. (2003) durchgeführt. Zur Herstellung DIG-markierter RNA Sonden diente das Digoxigenin (DIG) RNA-labeling and detection kit (<http://www.roche.de/>). Die RNA wurde anschließend mit dem RNeasy Mini Kit (www.qiagen.com) aufgereinigt, etwa 1:1 mit Hybe vermischt und bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 LD-Färbungen

A) Zellen

Konfluente Zellen wurden durch Auf- und Ab-Pipettieren vom Boden des Wells abgelöst und etwa 500µL der Zellsuspension auf ein Deckglas (22 x 22mm) pipettiert, um die Zellen zwischen 45min und 1h adhären zu lassen. Alternativ wurden die Zellen bereits direkt 3-4 Tage vor den Färbungen verdünnt und auf Deckgläsern in einer 6-Well Platte kultiviert, um den Adhäsionsschritt einzusparen. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt.

Die Zellen wurden zunächst mit RNA-Fixierer/PBS (1:1) 3-5min fixiert. Darauf erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,1% Triton[®] X-100 in PBS für 5min. Nach einem kurzen PBS Waschschrift wurden die Zellen schließlich mit dem entsprechenden LD Fluoreszenzfarbstoff, welcher in PBS verdünnt wurde (siehe 2.1.10), gefärbt und in Mowiol⁺⁺ auf einem Objektträger eingebettet. Die Präparate wurden entweder direkt mikroskopiert oder bei 4°C in einer abgedunkelten Box gelagert.

B) Larven

Für die Färbungen von larvalem Gewebe wie FK oder Speicheldrüsen wurden L3 Larven in kaltem PBS auf Eis gesammelt und mit Pinzetten die Kutikula von

anterior nach posterior aufgerissen. Die Larven wurden darauf in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit PBS überführt. Für alle folgenden Inkubationsschritte (auf RT) wurde das Eppendorf Reaktionsgefäß mit den Larven in eine kleine Box gelegt und leicht auf einem Orbitalschüttler geschwenkt. Die Fixierung der Larven mit RNA-Fixierer/PBS (1:1) und die Permeabilisierung mit 0,1% Triton[®] X-100 in PBS wurde jeweils 20min durchgeführt. Nach einem kurzen PBS Waschschrift erfolgte die LD Färbung mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff, welcher ebenfalls zuvor in PBS verdünnt wurde (siehe auch 2.1.10). Bei diesem Schritt wurde die Box mit Alufolie abgedunkelt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern. Die gewünschten larvalen Gewebe wurden schließlich mit Pinzetten in PBS auf einem Objektträger herauspräpariert, in 30% Glycerol/PBS eingebettet und direkt mikroskopiert.

C) Adipozyten adulter *Drosophilae*

Frisch-geschlüpfte, adulte *Drosophilae* wurden gesammelt und mit CO₂ betäubt. Der Kopf der Fliegen wurde mit Pinzetten entfernt. Ein Objektträger mit einem Tropfen 30%Glycerol/PBS und dem darin verdünnten LD Fluoreszenzfarbstoff wurde vorbereitet und die Fliegen auf den Objektträger überführt. Der Thorax wurde mit Pinzetten direkt in dem Tropfen aufgerissen. Nach Herausströmen der frei-schwimmenden Adipozyten wurden die restlichen Geweberückstände der Fliege von dem Objektträger entfernt. Ein Deckglas wurde auf den Flüssigkeitstropfen gelegt und das Präparat direkt danach mikroskopiert.

2.2.1.3 AK-Färbungen

A) Zellen

Konfluente Zellen wurden vor den Färbungen wie unter 2.2.1.2 (A) beschrieben auf ein Deckglas überführt. Die Zellen wurden für die Färbungen zunächst 10min mit RNA-Fixierer/PBS (1:1) fixiert und darauf ebenfalls 10min mit 0,1% Triton[®] X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x 10min mit BBT gewaschen und mit 5% Ziegenserum in BBT für 1h behandelt, um freie Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren und somit unspezifische Signale zu vermeiden. Der primäre AK (siehe Tab. 2.4) wurde in BBT/5% Ziegenserum

verdünnt und entweder 2h bei RT oder über Nacht im Kühlraum (4°C) inkubiert. Darauf folgten vier Waschschriffe für 10min mit BBT und erneutes Blocken mit 5% Ziegenserum in BBT für 15min. Der sekundäre AK wurde ebenfalls in BBT/5% Ziegenserum verdünnt und 1h auf den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden noch dreimal mit PBT gewaschen und zuletzt gegebenenfalls die LDs mit LipidTOX (oder einem anderen Fluoreszenzfarbstoff), verdünnt in PBS, angefärbt und anschließend in Mowiol⁺⁺ eingebettet.

B) Larven

Larven wurden wie unter 2.2.1.2 (B) beschrieben aufgerissen, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit PBS überführt und nach dem Protokoll AK-Färbungen Zellen (siehe 2.2.1.3 (A)) behandelt. Die Inkubationsschritte erfolgten ebenfalls auf dem Orbitalschüttler. Die Fixierung und Permeabilisierung der Larven erfolgte hierbei jeweils 20min, der primäre AK wurde stets über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Larven nach weiteren Waschschriffen und Inkubation mit dem sekundären AK schließlich entweder in PBS im Kühlschrank gelagert oder vorzugsweise die zu analysierenden larvalen Gewebe direkt in PBS präpariert, in 30% Glyzerol/PBS eingebettet und mikroskopiert.

Zur Präparation und Färbung von Flügelimaginalscheiben wurde zunächst das hintere Drittel von L3 Larven auf Eis in PBS mit einer feinen Schere abgetrennt. Der anteriore Teil der Larve wurde mithilfe von Pinzetten umgestülpt, so dass innere Gewebestrukturen nach Außen umgekehrt wurden. Die Larven wurden in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit PBS überführt, 30min mit RNA-Fixierer/PBS (1:1) fixiert und darauf 30min mit 0,3% Triton[®] X-100 in PBS permeabilisiert. Die Färbung der LDs erfolgte anschließend mit Nile red (2.1.10) (verdünnt in PBS/0,3% Triton[®] X-100) für etwa 1,5h. Nach zwei Waschschriffen mit PBS wurden die Larven in 30% Glyzerol/PBS auf einen Objektträger überführt und die Flügelimaginalscheiben herauspräpariert. Die Einbettung der Scheiben erfolgte in 60% Glyzerol/PBS.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders beschrieben, wurde nach Standard-Techniken verfahren (Sambrook et al. 1989). Rekombinante DNA wurde generell mit Standard-Klonierungstechniken oder dem Gateway[®] Rekombinations-system (<http://de-de.invitrogen.com/>; siehe 2.2.2.1) hergestellt. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden alle von NEB, (<http://www.neb.com/>), Fermentas (<http://www.fermentas.de/>), FINNZYMES (<http://www.finnzymes.fi/>) oder Pharmacia Biotech (<http://www.gelifesciences.com/>) erhalten. Die Aufreinigung der RNA bzw. DNA erfolgte mit Qiagen „Plasmid Purification“ Kits (Mini und Midi Maßstab; www.qiagen.com), die Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem „PCR Purification Kit“ (www.qiagen.com). Für die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen wurde das „NucleoSpin[®] Extract II“ Kit (<http://www.mn-net.com/>) verwendet. Zur Vervielfältigung rekombinanter DNA wurden die chemisch-kompetenten *E. coli* Stämme TOP10, DH5 α [™] oder DB3.1[™] (für Plasmide, die das *ccdB* Gen enthalten) (<http://de-de.invitrogen.com/>) genutzt.

2.2.2.1 Gateway[®]-Klonierung

Alle Klonierungen zur Generierung von Expressionsvektoren (siehe Tab. 2.3) wurden nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Anhand spezifischer Oligonukleotide (siehe Tab. 2.1) wurde der gewünschte ORF des entsprechenden EST (siehe Tab. 2.2) mittels PCR (siehe 2.2.2.6) amplifiziert und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *AscI* / *NotI* angehängt. Über diese wurde anschließend das PCR-Produkt in den pENTR/D-TOPO[™] Vektor des Gateway[®] Rekombinationssystems (<http://de-de.invitrogen.com/>) kloniert. Für die LR Rekombinations-Reaktion zur Generierung des Expressionsvektors wurde das Kit „Gateway[®] LR Clonase[®] II enzyme mix“ (<http://de-de.invitrogen.com/>) verwendet und diese nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2.2 Gewinnung von RNA aus Zellen

Konfluente Zellen eines 6-Wellns wurden mit Schneider's Kompletmedium resuspendiert und bei 300g für 5min zentrifugiert, um das alte Medium zu entfernen. Das Zellpellet wurde anschließend in 600 μ L RLT Puffer des RNeasy Mini Kits (www.qiagen.com) resuspendiert und die Zellen durch mehrmaliges

Auf- und Abpipettieren aufgebrochen. Die weitere Durchführung zur Isolierung der RNA erfolgte mit dem mitgelieferten Protokoll „Animal Cells Spin“ des Kits nach Herstellerangaben (Handbuch 4. Ausgabe, Version April 2006). Die RNA wurde schließlich in 60µL H₂O eluiert.

2.2.2.3 Gewinnung von RNA aus *Drosophila*

Vier bis acht adulte *Drosophila* Männchen wurden in einem 1,5mL Reaktionsgefäß gesammelt. Für die Gewinnung der RNA aus diesen wurde ebenfalls das RNeasy Mini Kit (www.qiagen.com) (siehe auch 2.2.2.2), allerdings hierbei das Protokoll „Animal Tissues“ verwendet. Zu den Fliegen in den Reaktionsgefäßen wurden 200µL RLT Puffer (mit β-Mercaptoethanol) hinzugefügt und diese mit einem automatisierten Pistill-Homogenisierer zerkleinert. Anschließend wurden weitere 200µL RLT Puffer (mit β-Mercaptoethanol) hinzugefügt und das Homogenat 3min bei 14.000rpm zentrifugiert. 400µL des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, kurz zentrifugiert und etwa 380µL des Überstandes in wiederum ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Die restliche Durchführung des Protokolls erfolgte nach Handbuch und die RNA wurde ebenfalls in 60µL H₂O eluiert.

2.2.2.4 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Die Synthese von cDNA für qRT-PCRs (2.2.2.7) wurde mit dem QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (www.qiagen.com) nach Herstellerangaben (Handbuch Version April 2005) durchgeführt. 1µg zuvor isolierter RNA (siehe 2.2.2.2 und 2.2.2.3) wurde als Template für die reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt und diese für 30min bei 42°C inkubiert.

2.2.2.5 Gewinnung genomischer DNA von einzelnen *Drosophilae*

Für die schnelle Isolierung genomischer DNA von Fliegen für Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) (2.2.2.6) wurde das Protokoll von Gloor et al. (1993) verwendet. Eine einzelne Fliege wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und in 50µL SB-Puffer mit einem Kunststoff-Pistill homogenisiert und 20-30min bei RT inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte anschließend bei 1-2min auf 95°C. Die genomische DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Studie wurden für Standard Klonierungen (2.2.2), zielgerichtete Mutagenese (2.2.2.8) oder Templates zur Herstellung doppelsträngiger RNA (2.2.2.10) DNA-Fragmente mittels PCR generiert (Saiki et al. 1988).

Üblicherweise wurde für Standard-PCRs die Phusion[®] DNA Polymerase (<http://www.finnzymes.fi/>), 1µL genomische DNA (2.2.2.5) (oder 80-150ng anderer Template-DNA) und je 10µM Oligonukleotid (Tab. 2.1) eingesetzt.

Beispiel-PCR-Protokoll:

94°C 5min

30 Zyklen:

94°C 1min

55°C 1min (→ abhängig von der Schmelztemperatur des verwendeten Oligonukleotidpaares)

72°C 30s (→ abhängig von verwendeter DNA-Polymerase und erwarteter Größe der DNA-Fragmente)

Finale Elongation:

72°C 4min

8°C bis zum Ende

2.2.2.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

qRT-PCRs (Higuchi et al. 1992) wurden mit dem Applied Biosystems StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (<http://www.appliedbiosystems.com/>) durchgeführt. Das Kit Fast SYBR[®] Green Master Mix (<http://www.appliedbiosystems.com/>) wurde verwendet und die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Gen-spezifische Oligonukleotide und Oligonukleotide für endogene Haushaltsgene zur Normalisierung der Daten (z.B. *Actin 5C*) wurden als fertiges 10-fach konzentriertes Gemisch (sog. „QuantiTect Primer Assays“) von der Firma Qiagen (www.qiagen.com) bezogen. Die zuvor synthetisierte cDNA (2.2.2.4) wurde 1:1 verdünnt und daraufhin wurden etwa 5 weitere Serienverdünnungsschritte (jeweils 1:5 oder 1:10) durchgeführt und diese in der folgenden PCR Reaktion eingesetzt.

Standard Reaktionsansatz:

(verdünnte) cDNA	2µL
Fast SYBR Green Master Mix (2x)	10µL
Qiagen QuantiTect Primer Assays (10x)	2µL
H ₂ O	6µL

Der Reaktionsansatz wurde in das Well einer MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well Reaction Plate (<http://www.appliedbiosystems.com/>) pipettiert und mit einer Folie (MicroAmp[®] Optical Adhesive Film; <http://www.appliedbiosystems.com/>) bedeckt. Für die PCR wurde das einprogrammierte Standard-Programm verwendet (mit Schmelzkurve).

2.2.2.8 Zielgerichtete Mutagenese

Für die Einführung der Punktmutation S119A im abgeleiteten katalytisch-aktiven Zentrum oder von Deletionen verschiedener Bereiche von *CG9186* wurde das Phusion[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (<http://www.finnzymes.fi/>) verwendet. Alternativ wurde die Mutagenese auch nach Standard-PCR-Protokoll (siehe 2.2.2.6) mit der Phusion[®] Hot Start DNA Polymerase und Phusion[®] GC Puffer (<http://www.finnzymes.fi/>) durchgeführt.

Die Mutagenese-PCRs erfolgten mit etwa 50-100pg der zu mutierenden Plasmid-DNA und spezifischen Oligonukleotiden (je 1µM), die die gewünschte(n) Mutation(en) und eine 5' Phosphorylierung enthielten (Tab. 2.1).

Die folgende Ligation wurde mit 5µL (etwa 25ng) der PCR-Produkte und dem Quick Ligation[™] Kit (<http://www.neb.com/>) durchgeführt. Darauf wurde die komplette zirkularisierte Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen (TOP10) transformiert.

2.2.2.9 Sequenzierung von DNA

15µL einer 100ng/µL Verdünnung der jeweiligen Plasmid DNA (Qiagen Mini-Präparation DNA Qualität) wurden zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon (<http://www.eurofinsdna.com/>) geschickt. Die von der Firma vorgegebenen Oligonukleotide „M13 uni (-21)“ und „M13 rev (-29)“ wurden für Standard Sequenzierungen von pENTR-Konstrukten verwendet.

2.2.2.10 Herstellung doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Für RNAi-Experimente in Zellkultur (siehe 2.2.4.4) wurden doppelsträngige RNAs basierend auf den Protokollen des *Drosophila* RNAi Screening Centers (DRSC; <http://www.flyrnai.org/>) hergestellt. Gen-spezifische Oligonukleotide (für die Amplifikation des Templates der folgenden *in vitro* Transkription) wurden nach Vorgabe der DRSC Website ausgewählt und die T7 Promotor-Sequenz (GTAATACGACTCACTATAGG) an das 5' Ende beider Oligonukleotide hinzugefügt. Für die PCR wurde genomische *w*- Fliegen-DNA (2.2.2.5) und die Taq-Polymerase (<http://www.fermentas.de/>) eingesetzt. Folgendes Programm (so genanntes „T7 Touch-up“ Protokoll) wurde durchgeführt:

94°C 5min

3 Zyklen:

94°C 30s

57°C 30s

72°C 90s

10 Zyklen:

94°C 30s

57°C 30s, +1,5°C pro Zyklus

72°C 90s

35 Zyklen:

94°C 30s

72°C 90s

72°C 10min

8°C bis zum Ende

Die folgende *in vitro* RNA Transkription erfolgte mit dem Ambion MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (<http://www.appliedbiosystems.com/>) nach Herstellerprotokoll mit je 5µL der generierten Template-DNA (siehe oben). Nach dem anschließenden Verdau mit der im Kit enthaltenen TURBO DNase wurde die dsRNA mit dem Qiagen RNeasy® Mini Kit (www.qiagen.com) nach

Herstellerprotokoll (Version September 2010) aufgereinigt, in 2x30µL H₂O eluiert und schließlich bei -80°C gelagert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 AK-Herstellung

AK für die Detektion von endogenem CG9186 wurden von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH (<http://www.peptid.de/>) hergestellt, nachdem für das Protein zwei Peptide ausgewählt wurden (siehe Abb. 3.15, C). Die Immunisierung erfolgte mit Ratten bzw. Meerschweinchen.

2.2.3.2 Methanol-Chloroform Extraktion von Lipiden aus Zellen

Die Methanol-Chloroform Extraktion von Lipiden zur Bestimmung des Gesamtlipidgehalts von Kc167 Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Le Belle et al. (2002).

Kc167 Zellen wurden in Wells einer 6-Well Platte überführt und in Anwesenheit von OA etwa 48h inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium entfernt, die Zellen mit 500µL H₂O resuspendiert und im Bioruptor für 5min bei niedrigster Stufe sonifiziert. 50µL der Zellsuspension wurden parallel für eine Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay verwendet (2.2.3.7), der Rest der Zellsuspension wurde in ein Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 250µL eines Methanol-Chloroform Gemisches (2:1; 4°C) wurden die Proben 15min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 250µL eines Chloroform-H₂O Gemisches (1:1) und die Proben wurden zur Begünstigung der Phasentrennung bei 4°C 20min bei 4.000rpm zentrifugiert. Die obere Phase (Methanol und H₂O) wurde entfernt und die untere, organische Phase wurde in ein Eppendorf Gefäß überführt, um das Lösungsmittel anschließend in einer Speed Vac abdampfen zu lassen. Die konzentrierten Lipide wurden in 200µL Konelab Reagenz (siehe 2.2.3.3) gelöst und in einem Eppendorf Thermomixer bei 37°C und 1.100rpm etwa 1h geschüttelt. Die Bestimmung des Gesamtlipidgehalts erfolgte wie unter 2.2.3.3 beschrieben.

2.2.3.3 „Coupled Colorimetric Assay“ (CCA)

Die Bestimmung des Gehaltes an Azyglyzeriden (Mono-, Di- und Triazyglyzeride) von fünf L3 Larven oder acht adulten Fliegenmännchen wurde mit dem Konelab™ TRIGLYCERIDES Kit (<http://www.thermo.com/>) durchgeführt (Grönke et al. 2003; Hildebrandt et al. 2011).

Zusammenfassend wurden die Larven bzw. Fliegen in 0,05% TWEEN®20/H₂O mit einem 14" Keramikzylinder (<http://www.bio101.com/>) mittels eines Precellys 24 (<http://www.peqlab.de/>) für 10sec bei 5.000rpm homogenisiert. Die Homogenate wurden für 5min bei 70°C hitzeinaktiviert und anschließend zentrifugiert. 50µL des Überstandes wurden in eine 96-Well Platte überführt. Die Inkubation mit dem Konelab Reagenz (200µL) erfolgte bei 180rpm und 37°C für etwa 30-45min. Der absolute Azyglyzeridgehalt wurde anhand des Thermo Trace Triglyceride Standard (www.thermoscientific.com/) bestimmt. Für die Normalisierung der Werte wurde parallel ein BCA Protein Assay durchgeführt (siehe 2.2.3.7).

2.2.3.4 Subzelluläre Fraktionierungen

Subzelluläre Fraktionierungen erfolgten nach dem Protokoll von Grönke et al. (2003). Konfluente Kc167 Zellen, die etwa vier Tage in einer 75cm² Schale kultiviert wurden, wurden resuspendiert und das Medium nach Zentrifugation für 5min bei 2.500rpm abgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und anschließendem Zentrifugationsschritt (s.o.) wurde das Zellpellet in 1mL FBB gelöst. Alternativ wurden pro Gradient etwa 50 FK von L3 Larven verwendet, die auf Eis präpariert und in 150µL FBB überführt wurden, um diese bei -80°C bis zur Verwendung zu lagern.

Die aufgetauten Proben wurden auf 1mL mit FBB aufgefüllt und für die Lyse 5min bei niedrigster Stufe im Bioruptor sonifiziert. Zelluläre Trümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt (3.500rpm, 8min) pelletiert. Der Überstand wurde auf 3mL mit FBB aufgefüllt, zu gleichen Teilen mit 1,08M Sucrose (gelöst in FBB) vermischt und in ein SW41 12mL Polyallomer Ultrazentrifugationsröhrchen (<http://www.beckmancoulter.de/>) überführt. Darüber folgten jeweils 2mL Schichten von 0,27M und 0,135M Sucrose (beide in FBB verdünnt) und schließlich FBB allein als oberste Schicht.

Die Gradienten wurden 1h 45min bei 30.000rpm und 4°C in einem Beckman SW41.Ti Rotor mit einer Beckman Optima L-90K Ultrazentrifuge (<http://www.beckmancoulter.de/>) zentrifugiert. Darauf wurden acht Fraktionen, jede aus 1,5mL bestehend, von oben nach unten abgenommen: LD Fraktionen (1 und 2), Mittelbereich zwischen LDs und Zytosol (3 und 4) und die zytosolischen Fraktionen (5-8). Das mikrosomale Pellet wurde direkt in PBS + 5x Probenpuffer (3:2) gelöst und im Bioruptor für 5min auf niedrigster Stufe sonifiziert. Die Proteine jeder der 8 Fraktionen wurden gefällt (siehe 2.2.3.5) und die Proteinpellets schließlich ebenfalls in PBS + 5x Probenpuffer (3:2) gelöst. Die Proteingehaltbestimmung von 25µL jeder Fraktion erfolgte mit dem *RC DC* Protein Assay (<http://www.bio-rad.com>) (siehe 2.2.3.6).

2.2.3.5 Methanol-Chloroform Proteinfällung

Die Proteinfällung erfolgte nach dem Protokoll von Wessel & Flügge (1984). Zu einem Probenvolumen von maximal 130µL wurden nacheinander 400µL Methanol, 100µL Chloroform und 300µL H₂O hinzugefügt und nach jedem Schritt gut vermischt. Nach Zentrifugation für 3min bei 14.000g wurde die Trennung der organischen (unten) von der wässrigen Phase (oben) erreicht, die Proteine befanden sich dabei in der Interphase. Die wässrige Phase wurde vorsichtig entfernt. Nach Zugabe von 400µL Methanol wurden die Proben erneut bei 14.000g für 15min zentrifugiert und die Proteine somit pelletiert. Der Großteil des Methanols wurde abgenommen und das Pellet schließlich im Vakuum mit einer Savant Speed Vac (<http://www.gmi-inc.com/>) getrocknet. Zuletzt wurden die Proteine in PBS + Probenpuffer gelöst und der Proteingehalt mit dem *RC DC* Protein Assay (siehe 2.2.3.6) ermittelt.

2.2.3.6 *RC DC* Protein Assay

Die Bestimmung des Proteingehaltes von bereits zuvor gefällten Proteinen, die in PBS + Probenpuffer gelöst wurden, wurde anhand des *RC DC* Protein Assay von Bio-Rad (<http://www.bio-rad.com>) nach Herstellerprotokoll „Microfuge Tube Assay Protocol (1.5 ml)“ durchgeführt. Definierte Mengen an Albumin Standard (aus dem Pierce[®] BCA Protein Assay Kit, siehe auch 2.2.3.7), ebenfalls verdünnt in PBS + Probenpuffer, dienten zur Erstellung einer Standardkurve.

Die optische Dichte der Proben wurde mit einem Spektrofotometer bei 750nm ermittelt.

2.2.3.7 BCA Protein Assay

Der BCA Protein Assay, basierend auf Smith et al. (1985), zur Bestimmung des Proteingehalts von L3 Larven oder adulter Fliegenmännchen wurde mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit (<http://www.piercenet.com/>) durchgeführt. Die identischen Homogenate, die auch für den CCA hergestellt wurden (siehe 2.2.3.3), konnten parallel für den BCA Protein Assay verwendet werden. 50µL des Überstandes der Fliegenhomogenate bzw. 25µL der Larvenhomogenate wurde für die Proteinbestimmung verwendet und in eine 96-Well Platte überführt. Die Homogenate und definierte Mengen von dem im Kit mitgelieferten Albumin Standard, verdünnt in 0,1% TWEEN®20/H₂O, wurden für etwa 30min bei 180rpm und 37°C mit 200µL des BCA Reagenzes (50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) inkubiert. Die optische Dichte der Proben wurde schließlich bei 570nm in einem Bechmark Microplate Reader (<http://www.bio-rad.com>) gemessen.

2.2.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE mit denaturierenden Polyacrylamidgelen erfolgte im diskontinuierlichen Gelsystem nach Standardprotokollen (Laemmli 1970). Hierfür wurde das Bio-Rad Mini-PROTEAN® 2 Gelsystem (<http://www.bio-rad.com>) verwendet.

2.2.3.9 Western Blot

Die Western Blot Analyse erfolgte nach Standard-Protokollen (Renart et al. 1979; Towbin et al. 1979). Die nach der SDS-PAGE (2.2.3.8) aufgetrennten Proteine wurden bei 150mA pro Gel für 1h auf eine Nitrocellulose-Membran (<http://www.thermoscientific.com/>) transferiert. Alle Waschschrte der Membranen erfolgten mit PBT und unspezifische Bindungsstellen wurden über Nacht bei 4°C mit 5% BSA in PBT geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 2h bei RT in 2,5% BSA/PBT. Der sekundäre Antikörper wurde nach mehrmaligem Waschen der Membran für 30min bei RT in

2,5% BSA/PBT inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden mit dem „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“ oder dem „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“ Kit (<http://www.piercenet.com/>). Die Chemilumineszenz wurde mit dem CCD-Kamera ausgestatteten LAS-1000plus System (<http://www.fujifilm.eu/>), einer Intelligent Dark Box II (<http://www.fujifilm.eu/>) und der Software Image Reader Version 2.11 (<http://www.fujifilm.eu/>) detektiert und analysiert.

Zur Wiederverwendung der Membran und Inkubation mit weiteren Antikörpern wurde diese nach der Detektion kurz gewaschen und anschließend bei RT mit 10mL Restore™ Western Blot Stripping Buffer (<http://www.thermoscientific.com/>) behandelt, um bereits gebundene Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde schließlich erneut gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 5% BSA/PBT geblockt oder bei 4°C in PBT bis zur erneuten Verwendung gelagert.

2.2.4 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden in 25cm² Flaschen (oder 75cm² Flaschen, wenn die Zellen in größerem Maß expandiert werden sollten) (www.nuncbrand.com/) in einem 25°C Inkubator mit atmosphärischem CO₂-Gehalt kultiviert. Als Nährmedium diente Schneider's *Drosophila* Medium (<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/brands/Gibco.html>) mit 10% hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum Gold (PAA, Pasching, Österreich) und 5% einer Penicillin/Streptomycin Mischung (<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/brands/Gibco.html>).

Für die Kultivierung von ML-DmBG3-c2 Zellen wurde dem Komplettmedium außerdem 100µg/mL Insulin solution human (<http://www.sigmaaldrich.com/>) beigefügt.

Stabil-transfizierte Kc167 Zellen (siehe 2.2.4.3) wurden mit Schneider's Komplettmedium, dem 10µg/mL Blasticidin S HCl (www.invitrogen.com) zugegeben wurde, kultiviert.

Die Arbeiten mit den Zellen wurden stets unter sterilen Bedingungen (Desinfektion aller Materialien mit 70% Ethanol) in einer Zellkultur Sterilbank durchgeführt. Alle 2-4 Tage wurden die Zellen in neue Flaschen passagiert,

indem diese vom Flaschenboden mit frischem Medium abgelöst und schließlich (meistens 1:5, abhängig von Dichte der Kultur und geplantem Experiment) verdünnt wurden.

2.2.4.1 Einfrieren / Auftauen von Zellen

Das Einfrieren und Auftauen von Zellen erfolgte nach den Protokollen des *Drosophila* RNAi Screening Centers (<http://www.flyrnai.org/>).

Konfluente Zellen einer 75cm² Flasche wurden nach dem Zentrifugationsschritt in 12mL Kälberserum mit 10% DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert (je 1mL) und in einer Styroporbox einige Tage zunächst bei -80°C gelagert. Danach wurden die Zellen im Stickstofftank eingefroren.

2.2.4.2 Transiente Transfektion

Konfluente Zellen wurden 1:5 oder 1:10 (je nach Länge der angestrebten Inkubationszeit des Transfektionsansatzes) verdünnt (etwa $2\text{-}5 \times 10^5$ Zellen/mL). 1,5mL der Zellsuspension wurde in eine 6-Well Platte pipettiert, um die Zellen mindestens 6h, meistens jedoch über Nacht, regenerieren zu lassen. Für transiente Plasmid-DNA Transfektionen wurde das Qiagen „Effectene[®] Transfection Reagent“ (www.qiagen.com) verwendet. 1µg jedes Expressionskonstrukts wurde in insgesamt 140µL EC-Puffer verdünnt und gemischt. Nach Zugabe von 8µL Enhancer und anschließendem Vortex-Schritt wurde der Ansatz für 5min bei RT inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 10µL Effectene, ein weiterer 15s Vortex-Schritt und 15min Inkubationszeit bei RT. Der Transfektionskomplex wurde anschließend zusammen mit 850µL Schneider's Kompletmedium tröpfchenweise auf die zuvor ausplattierten Zellen gegeben und üblicherweise 3-4 Tage bei 25°C inkubiert.

2.2.4.3 Generierung stabil-transfizierter, polyklonaler Zelllinien

Konfluente Zellen wurden auf ungefähr $2,5 \times 10^5$ Zellen/mL Medium verdünnt und 4mL der Zellsuspension in eine 25cm² Flasche pipettiert (→ ungefähr 1×10^6 Zellen). Nach etwa 20h wurde die Transfektion von 2µg des entsprechenden Expressionsvektors und 50ng des Selektionsvektors pCoBlast (für Blasticidin-Resistenz der Zellen; <http://www.invitrogen.com/>) mit dem Qiagen „Effectene[®]

Transfection Reagent“ (www.qiagen.com) durchgeführt (siehe auch 2.2.4.2). Folgende Volumina der einzelnen Komponenten des Kits wurden verwendet: 140µL EC Puffer, 16µL Enhancer, 20µL Effectene. Nach 15min wurde der Transfektionskomplex zusammen mit 840µL Komplettmedium auf die Zellen in der Flasche getropft und drei Tage inkubiert. In den folgenden Tagen erfolgte die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen mit Medium, welches 30µg/mL Blastocidin S HCl (www.invitrogen.com) enthielt. Hierzu wurde das alte Medium mit den toten Zellen etwa alle zwei Tage ausgetauscht. Nachdem resistente Zellkolonien auftraten, wurden die Zellen bei entsprechender Dichte nach Standardprotokoll mit Blastocidin-Medium verdünnt und in neue 25cm² Flaschen passagiert. Nachdem eine laufende Kultur stabil-transfizierter Zellen erhalten wurde, konnte die Blastocidin-Konzentration auf 10µg/mL Medium reduziert werden.

2.2.4.4 RNAi-Experimente

Für die Durchführung der RNAi-Experimente in Zellkultur wurden die RNAi Protokolle des *Drosophila* RNAi Screening Centers (DRSC; <http://www.flyrnai.org/>) und die zuvor hergestellten und aufgereinigten dsRNAs (siehe 2.2.2.10) verwendet.

a) Inkubation der Zellen mit dsRNAs in Serum-freiem Medium („Bathing“)

Für RNAi-Experimente, bei denen eine hohe Anzahl an Zellen benötigt wurde, wurden $1,5 \cdot 10^6$ Zellen in 6-Well Platten mit 15µg der jeweiligen dsRNA in Serum-freiem Medium für 35min bis höchstens 45min inkubiert. Nach Zugabe von 3mL Komplettmedium wurden die Zellen standardmäßig nach vier Tagen analysiert (siehe auch Beller et al. 2008).

b) dsRNA Transfektion

Für die Analyse von RNAi-Experimenten in einem kleineren Format oder die gleichzeitige Einbringung von dsRNA und Plasmid-DNA in die Zellen wurde das Qiagen „Effectene[®] Transfection Reagent“ (www.qiagen.com) verwendet (siehe auch 2.2.4.2). 600ng dsRNA wurden in die Kammer eines 4-Well Lab-Tek II

Chamber Slides (www.nuncbrand.com/) gegeben. Anschließend wurden 800ng jedes verwendeten Plasmids in insgesamt 121µL EC-Puffer verdünnt. 14µL Enhancer und 4,2µL Effectene wurden nach DRSC Protokoll hinzugefügt, der gesamte Mix auf die dsRNA in der Kammer gegeben und für 6-8min inkubiert. Die Zellen wurden auf 3×10^5 /mL Kompletmedium verdünnt und 800µL der Zellsuspension in der Kammer verteilt. Der Ansatz wurde ebenfalls standardmäßig für vier Tage im 25°C Inkubator in einer feuchten Kammer inkubiert.

2.2.5 Fliegentechniken

2.2.5.1 Haltung von *Drosophila melanogaster*

Alle verwendeten Fliegenstämme wurden nach Standardmethoden (Ashburner 1989) in Kunststoffröhrchen auf einer komplexen Futtermischung bei 18°C oder 25°C mit 20-30% Luftfeuchtigkeit und einem 12h Tag-/Nacht-Rhythmus gehalten.

2.2.5.2 Generierung von transgenen Fliegen

Transgene *Drosophilae*, die die konditionale Überexpression der zu untersuchenden Proteine mittels des Gal4/UAS-Systems (Brand & Perrimon 1993) gewährleisten, wurden von der Firma BestGene Inc. (<http://www.thebestgene.com>) generiert. Für die *Drosophila* P-Element Transformation (Spradling & Rubin 1982) wurden 50µg des jeweiligen UAS-DNA-Konstrukts (Qiagen Midi-Präparation DNA Qualität) zur Injektion von w^{1118} Embryonen benötigt.

2.2.6 Mikroskopie

2.2.6.1 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Bilder wurden mit einem Leica TCS SP2 AOBS oder Leica TCS SP5 (<http://www.leica-microsystems.com/>) aufgenommen.

Zellen und Gewebe von Larven oder adulten *Drosophilae* wurden wie in 2.2.1.2 beschrieben vorbereitet und in Mowiol⁺⁺ bzw. Glycerol/PBS auf Objektträgern eingebettet.

Für Z-Projektionen wurden Aufnahmen unterschiedlicher Fokusebenen (Z-Stapel) etwa alle 200-400nm (bei Zellen kleinere Abstände als beim Gewebe) aufgenommen. Die Z-Stapel Aufnahmen wurden darauf mit ImageJ (Version 1.41o) zu einer Z-Projektion zusammengefügt. Dies wurde insbesondere bei Analysen in Bezug auf die LD Anzahl pro Zelle durchgeführt (z.B. in der Speicheldrüse; siehe Abb. 3.33, C und C'), da die LDs in unterschiedlichen optischen Ebenen vorliegen. Dadurch wurde ermöglicht, dass alle LDs einer Zelle bewertet werden können.

2.2.6.2 Spinning Disk Konfokalmikroskopie

Zeitablauf-Bilder (siehe Abb. 3.24., B₁₋₄) wurden mit einem PerkinElmer UltraVIEW VoX Spinning Disk Konfokalmikroskop (<http://www.perkinelmer.com/>) am European Neuroscience Institute (ENI) in Göttingen aufgenommen.

Stabil mit pUbi-CG9186:EGFP transfizierte, lebende Kc167 Zellen wurden über Nacht in Serum-freiem Schneider's Medium gehungert, um den Anteil von bereits in den Zellen vorhandenen LDs zu minimieren. Am folgenden Tag wurde das Medium durch Schneider's Kompletmedium ersetzt und dieses vor den Aufnahmen mit 400µM Ölsäure-Lösung versetzt.

2.2.6.3 Elektronenmikroskopie (EM)

EM Bilder (siehe Abb. 3.4) wurden in Kollaboration mit D. Riedel (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) erstellt.

Ungefähr $1,8 \times 10^6$ Kc167 Zellen pro Well einer 6-Well Platte wurden nach dem „Bathing“ RNAi-Protokoll (siehe 2.2.4.4 (a)) behandelt und die Ansätze für vier Tage inkubiert. Insgesamt vier Wells pro Kondition + ein Well mit RNAi behandelten Zellen, die auf Aclar-Film (<http://www.agarscientific.com/>) in einer 6-Well Platte inkubiert wurden, wurden bei D. Riedel für die Mikroskopie abgegeben.

Die Aclar-Filme wurden vor Zugabe der Zellen auf 20mm x 20mm zugeschnitten und darauf unter der Zellkultur Sterilbank desinfiziert. Hierzu wurden die Filme zunächst einmal mit 100%igem Ethanol abgewischt und anschließend in den 6-

Wells dreimal mit 70%igem Ethanol abgespült. Nach Verdampfung des Ethanols wurden die Filme über Nacht bei 25°C in Schneider's Kompletmedium inkubiert.

3. Ergebnisse

3.1 Die Rolle von COPI in der Lipidspeicherung

3.1.1 Embryonale Expression von COPI Komponenten

Studien mit *Drosophila* und Säuger Zellkulturzellen haben gezeigt, dass der COPI („Coat Protein Complex I“) Komplex eine Funktion bei der Regulation der Lipidspeicherung hat (Beller et al. 2008; Guo et al. 2008; Soni et al. 2009).

Um herauszufinden, ob COPI Komponenten in Geweben exprimiert werden, die Lipidspeicherung zeigen, wurde die embryonale RNA Verteilung von α COP, γ COP und *Arf79F* anhand einer „whole-mount *in situ* Hybridisierung“ (WMISH) (siehe 2.2.1.1) analysiert (Abb. 3.1).

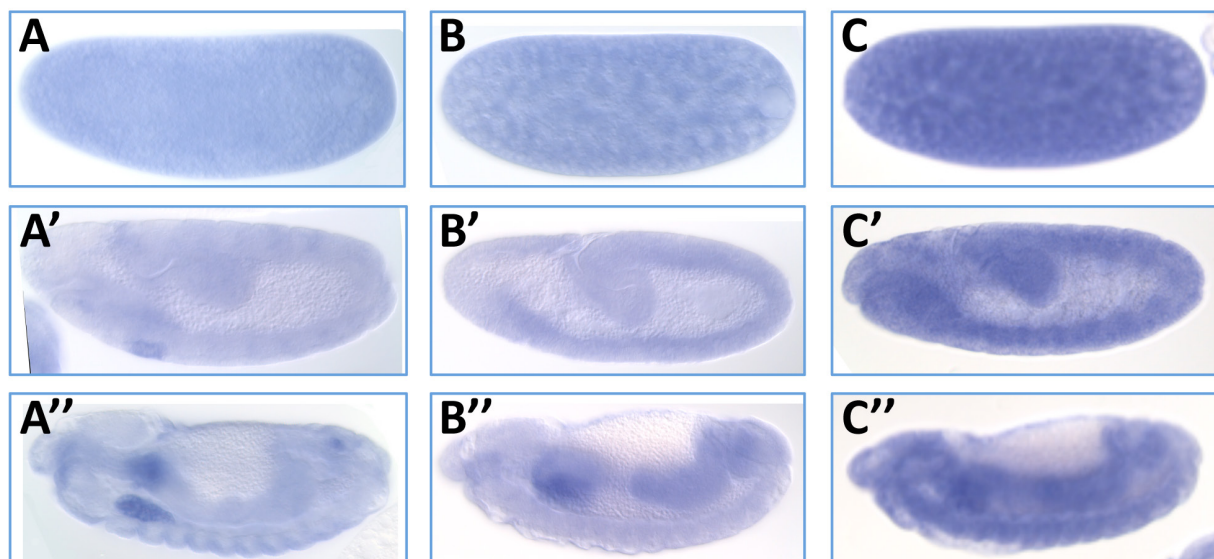


Abb. 3.1: Embryonale RNA Verteilung von COPI Komponenten

DIG-markierte antisense RNA Sonden wurden in einer WMISH (siehe 2.2.1.1) mit w^{1118} Embryonen verwendet, um das Expressionsmuster von COPI Komponenten während der Embryonalentwicklung von *D.m.* zu detektieren. Die Orientierung der Embryonen ist anterior nach links und dorsal nach oben. α COP (A), β COP (B) und *Arf79F* (C) Transkripte werden maternal im Embryo positioniert. In den späteren Stadien 10-11 (A', B', C') und 14 (A'', B'', C'') liegen COPI Transkripte ubiquitär vor und sind in der Speicheldrüsenanlage angereichert. Bilder wurden mit dem Zeiss Axiophot Mikroskop aufgenommen.

Die jeweiligen Transkripte werden maternal zur Verfügung gestellt und liegen in allen späteren embryonalen Stadien ubiquitär vor. In der Speicheldrüse kann eine Anreicherung der Transkripte festgestellt werden, was mit publizierten Daten übereinstimmt (BDGP: <http://insitu.fruitfly.org/> (Tomancak et al. 2002; Tomancak et al. 2007), Version 15.11.2011; Grieder et al. 2005).

Publizierten RNAseq- (Graveley et al. 2011) und Microarray-Daten (<http://www.flyatlas.org/>; Chintapalli et al. 2007) zufolge werden α COP und γ COP in den späteren larvalen und adulten Entwicklungsstadien von *Drosophila* weiterhin stark, vor allem in der Speicheldrüse, exprimiert. *Arf79F* scheint hierbei ubiquitär am stärksten exprimiert zu sein.

3.1.2 RNAi-vermittelter COPI knock-down in *Drosophila* Kc167 Zellen erhöht die LD Anzahl

Der COPI Komplex vermittelt den retrograden Vesikeltransport von Lipiden und Proteinen vom Golgi zum ER (Übersichtsartikel Lee et al. 2004; Beck et al. 2009). Wird der RNAi-vermittelte knock-down von COPI Komponenten durchgeführt, so hat dies erhöhte Lipidspeicherung (Beller et al. 2008; Guo et al. 2008; Soni et al. 2009), eine verminderte Lipolyserate (Beller et al. 2008) und eine veränderte LD Proteinzusammensetzung zur Folge (Beller et al. 2008; Soni et al. 2009). Es stellte sich die Frage, ob die erhöhte Lipidspeicherung spezifisch für COPI RNAi oder mehr ein genereller Nebeneffekt der gestörten Intaktheit des Vesikeltransports zwischen Golgi und ER ist. Um dies herauszufinden, wurden in Kc167 Zellen neben dsRNAs gegen alle COPI Komponenten auch solche gegen COPII Komponenten und weitere Arfs getestet (siehe Tab. 3.1; bereits publiziert in Beller et al. 2008). Bis auf ε COP resultiert RNAi gegen COPI Komponenten in einer erhöhten Lipidspeicherung in den Zellen (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.2), was für eine spezifische Beteiligung dieser Komponenten an der Lipidspeicherungsregulation spricht.

Gen	Anzahl getesteter dsRNAs	Phänotyp
COPI Komponenten:		
α COP	3	mehr LDs
β COP	3	mehr LDs
β' COP	3	mehr LDs
γ COP	3	mehr LDs
δ COP	3	mehr LDs
ε COP	2	kein Phänotyp
ζ COP	3	mehr LDs
<i>Arf79F</i>	3	mehr LDs

Gen	Anzahl getesteter dsRNAs	Phänotyp
<i>garz</i>	2	mehr LDs
COPII Komponenten:		
<i>CG10882</i>	2	kein Phänotyp
<i>sar1</i>	4	kein Phänotyp
<i>sec23</i>	3	kein Phänotyp
<i>sec31</i>	2	kein Phänotyp
<i>pld</i>	3	kein Phänotyp
Weitere Arfs:		
<i>Arf102F</i>	3	kein Phänotyp
<i>Arf51F</i>	3	kein Phänotyp
<i>Arf72A</i>	2	kein Phänotyp
<i>Arf84F</i>	2	kein Phänotyp

Tab. 3.1: RNAi-vermittelter COPI knock-down verändert den Lipidgehalt in Kc167 Zellen

Zusammenfassung der mikroskopischen Analysen auf LD Phänotypen (siehe auch Abb. 3.2). Der RNAi-vermittelte knock-down von COPI, COPII Komponenten und weiteren Arfs wurde in Kc167 Zellen mittels „Bathing“ Protokoll (siehe 2.2.4.4 (a)) durchgeführt. Verschiedene, unabhängige dsRNAs wurden für jedes Gen getestet und für vier Tage mit den Zellen inkubiert. Eine erhöhte LD Anzahl ist nur in COPI knock-down Zellen (alle bis auf *αCOP*) vorzufinden. Übersichtsaufnahmen der Zellen wurden mit dem Zeiss Axiovert 200M aufgenommen (siehe Abb. 3.2) und analysiert. Weisen die Zellen keine bzw. nur einzelne LDs auf (siehe auch Abb. 3.2, D-F), so entspricht dies keinem Lipid Phänotyp; weist ein Großteil der Zellen jeweils mehrere LDs auf (siehe auch Abb. 3.2, A-C), so wird dies als Phänotyp mit „mehr LDs“ bezeichnet.

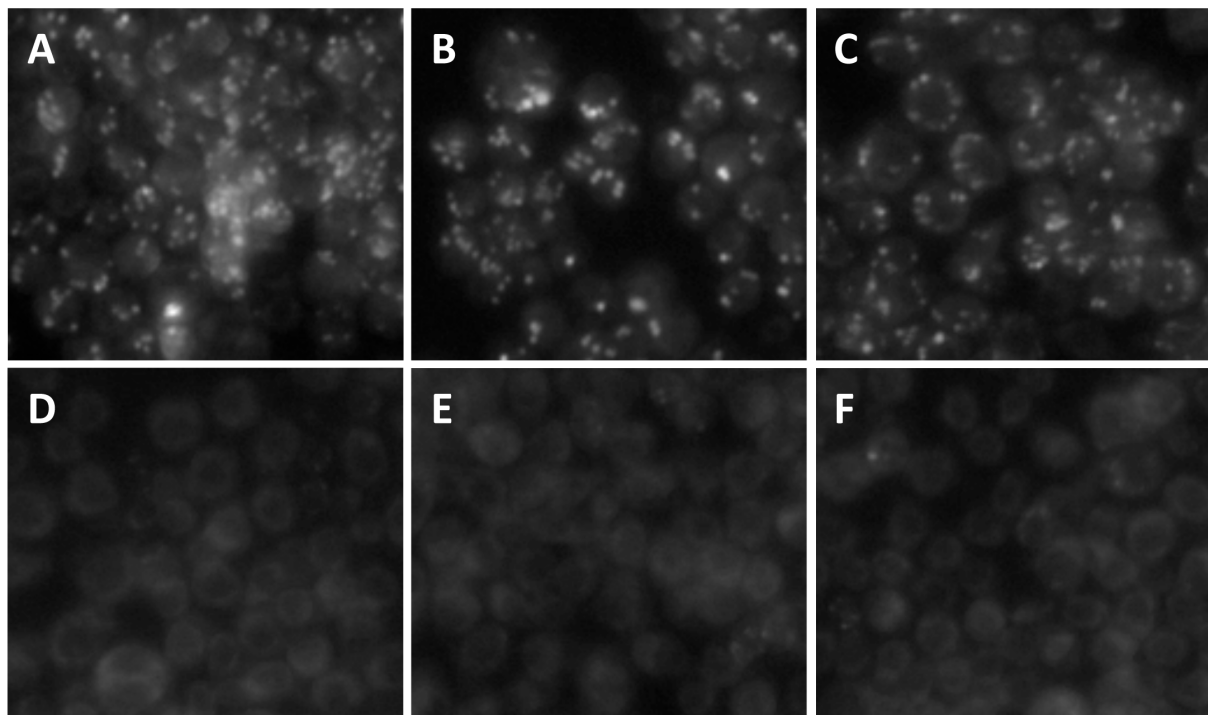


Abb. 3.2: RNAi-vermittelter COPI knock-down beeinflusst die LD Anzahl in Zellkulturzellen
Kc167 Zellen, die vier Tage mit dsRNAs gegen *αCOP* (DRSC30831; A), *Arf79F* (DRSC31426; B), *garz* (DRSC32127; C) *αCOP* (DRSC02003; D), *sec23* (DRSC31248; E) oder *Arf84F* (DRSC14117; F) inkubiert wurden, wurden fixiert und zur Detektion der LDs mit BODIPY 493/503 gefärbt (weiß).

Mit RNAi gegen *αCOP* (A), *Arf79F* (B) oder *garz* (C) ist eine erhöhte LD Anzahl in den Zellen vorhanden, während bei *αCOP* (D), *sec23* (E) oder *Arf84F* (F) RNAi nahezu keine LDs in den Zellen vorzufinden sind, wie es auch für Wildtyp Kc167 Zellen unter Standard-Wachstumsbedingungen der Fall ist (siehe z.B. Abb. 3.17, A). Bilder wurden mit dem Zeiss Axiovert 200M aufgenommen.

Um mehr über die zellulären Konsequenzen des COPI knock-down zu erfahren, wurden Effekte auf die Golgi Morphologie anhand eines gegen das cis-Golgi Protein GM130 gerichteten AKs untersucht (siehe Abb. 3.3) und EM-Studien (siehe Abb. 3.4) durchgeführt.

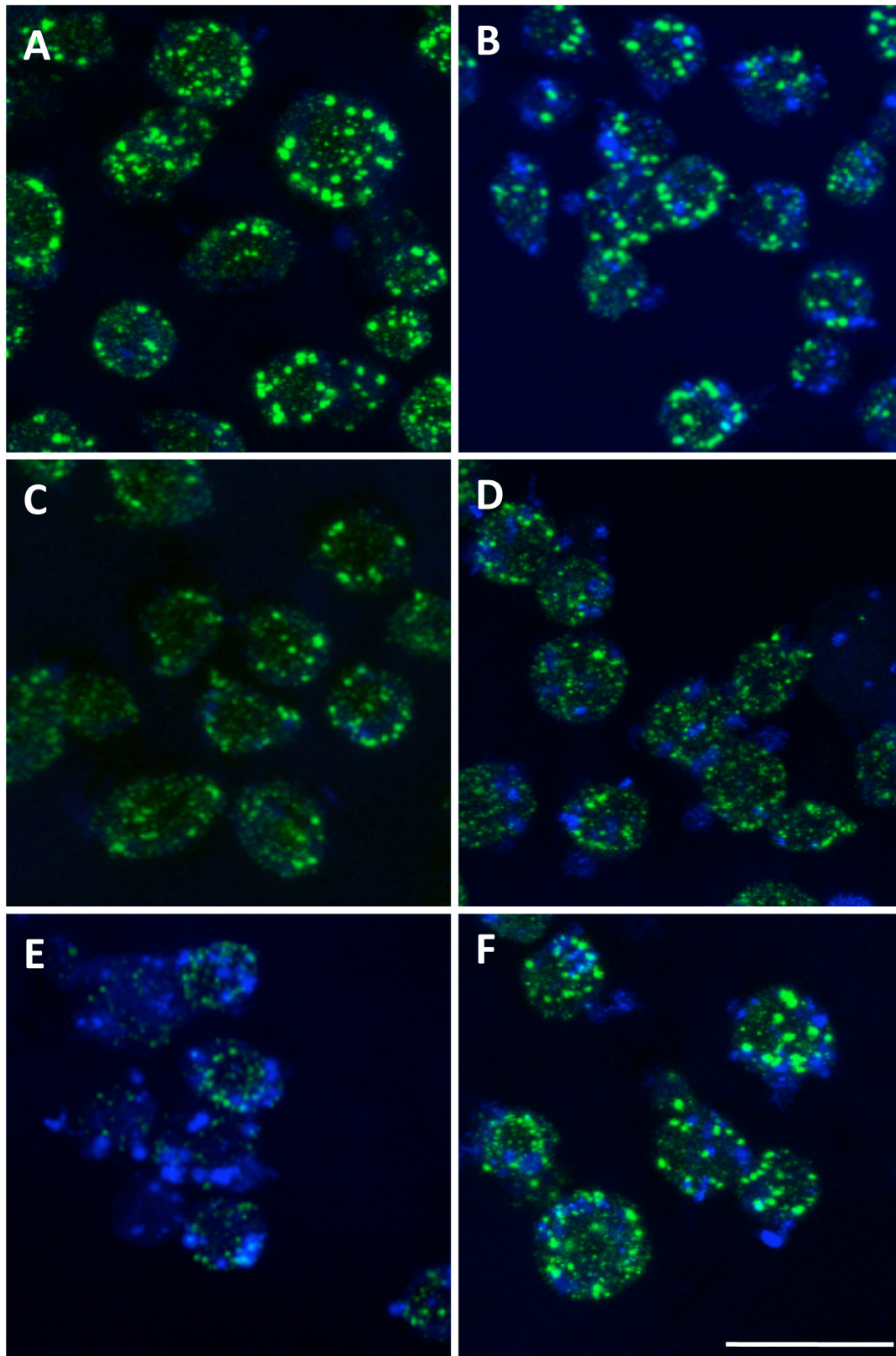


Abb. 3.3: RNAi-vermittelter COPI knock-down in Kc167 Zellen hat eine erhöhte LD Anzahl und eine veränderte Golgi Morphologie zur Folge

Kc167 Zellen wurden für vier Tage mit verschiedenen dsRNAs („Bathing“ Protokoll, siehe 2.2.4.4 (a)) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, eine AK-Färbung gegen das cis-Golgi Protein GM130 (grün) durchgeführt und die LDs mit LipidTOX (blau) gefärbt. In der Kontrolle (EGFP RNAi, A), wie auch bei α COP RNAi (C, DRSC35610), sind unter Standard-Wachstumsbedingungen fast keine LDs in den Zellen vorhanden. RNAi gegen Transkripte der TAG Lipase Bmm (B) und die COPI Komponenten α COP (D, DRSC30831), γ COP (E, DRSC31264) und *Arf79F* (F, DRSC31426) resultiert

in der Einlagerung von LDs. Das Golgi fragmentiert in Folge von ϵ COP (C), α COP (D), γ COP (E) sowie *Arf79F* (F) RNAi. Z-Stapel Bilder (maximale Projektionen) wurden mit dem Leica TCS SP5 Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 15 μ m.

Nach RNAi-vermitteltem knock-down einzelner COPI Komponenten kann eine veränderte cis-Golgi Morphologie beobachtet werden, die sich durch eine Fragmentierung (weniger bzw. sehr viel kleinere Strukturen; siehe Abb. 3.3, C-F) auszeichnet. Diese Beobachtung stimmt mit den Erwartungen überein, da bereits in früheren Studien mit Säugerzellen gezeigt werden konnte, dass COPI für die Intaktheit des Golgi notwendig ist (Guo et al. 1994). Das fragmentierte Golgi ist ebenfalls bei RNAi gegen die Untereinheit ϵ COP vorzufinden, welche als einzige keine erhöhte Lipidspeicherung als Folge des knock-downs zeigt (Abb. 3.3, C). Die EM-Studien zeigen, dass in Folge von COPI RNAi Membranmaterial rund um die LDs akkumuliert (siehe Abb. 3.4, Sternchen). Vermutlich handelt es sich hierbei um zusätzliches Membranmaterial des ERs. Auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte in früheren Studien bereits beobachtet werden, dass durch COPI Mutationen ER-Membranen angereichert werden (Duden et al. 1994). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bereits bei γ COP mutanten *Drosophila* Embryonen gemacht werden, bei denen das Golgi reduziert und das ER „aufgebläht“ ist (Jayaram et al. 2008).

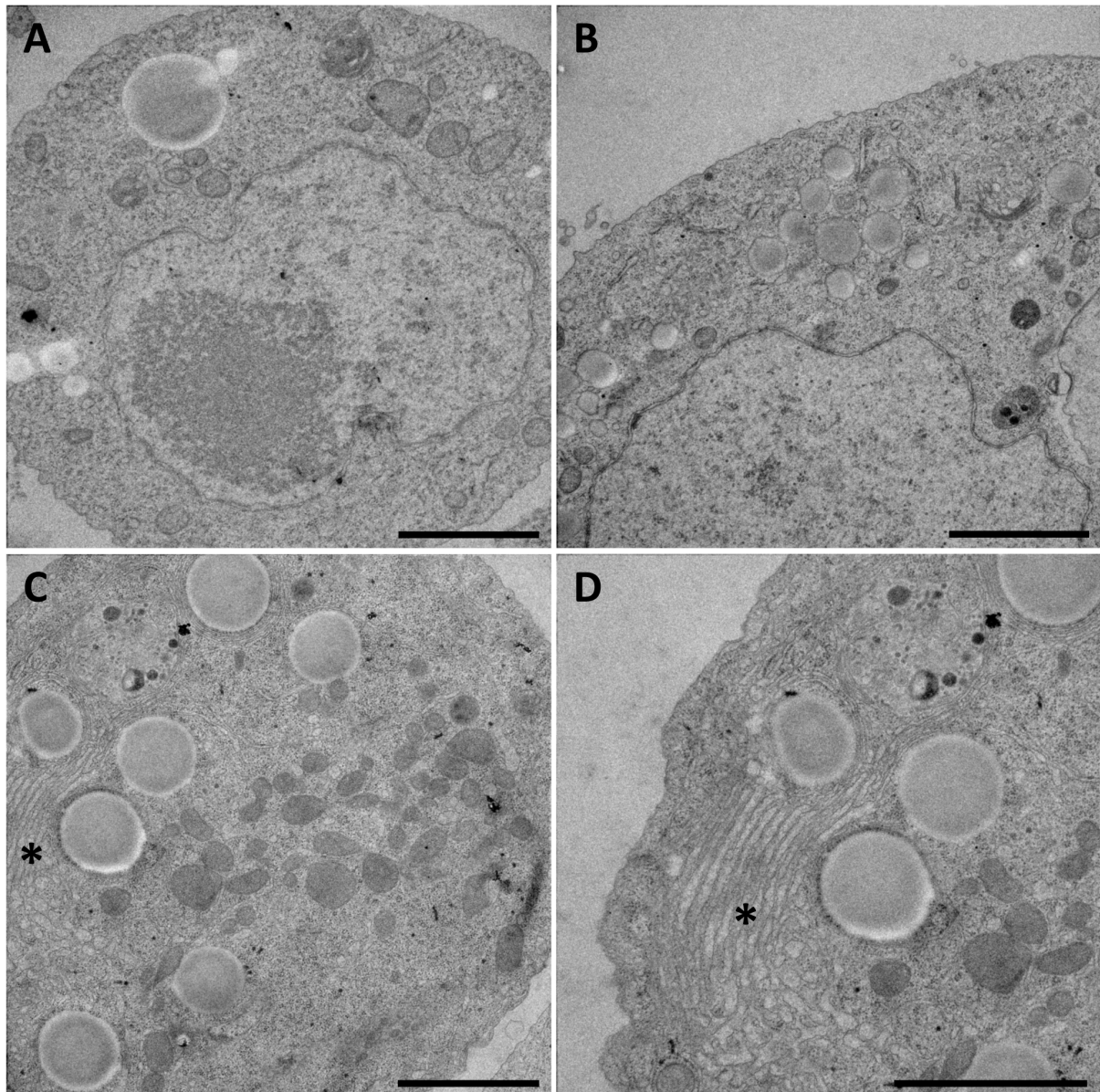


Abb. 3.4: RNAi-vermittelter α COP knock-down in Kc167 Zellen bedingt eine Veränderung der ER Morphologie

Kc167 Zellen wurden in Anwesenheit von 400 μ M OA für vier Tage mit dsRNAs gegen EGFP (A, B; Kontrolle) bzw. α COP (C, D; DRSC30831) behandelt („Bathing“ Protokoll, siehe 2.2.4.4 (a)) und mittels EM analysiert (siehe 2.2.6.3). Es ist zu erkennen, dass nach α COP RNAi (C, D) neben der erhöhten LD Anzahl auch sehr viel Membranmaterial um diese herum angehäuft ist (Sternchen), was zusätzliches ER Material darstellt (D. Riedel, persönliche Mitteilung). Die Maßstabskala der EM-Bilder entspricht 2 μ m.

3.1.3 RNAi-vermittelter COPI knock-down in Fliegen führt zu Letalität

Da alle bisherigen funktionalen Studien mit COPI in Bezug auf eine Rolle bei der Lipidspeicherungsregulation in Zellkultur durchgeführt wurden, sollte dieser Aspekt auch im Organismus untersucht werden. Hierfür wurde der RNAi-vermittelte knock-down einzelner COPI Komponenten unter Verwendung des

Gal4/UAS-Systems (Brand & Perrimon 1993) hauptsächlich im Fettgewebe durchgeführt. Da es sich bei dem COPI-vermittelten Vesikeltransport um einen essentiellen Mechanismus handelt und eine Mutation der Untereinheit γ COP zu Letalität führt (Grieder et al. 2008; Jayaram et al. 2008), wurden die Nachkommen zunächst auf Überlebensfähigkeit untersucht (siehe Tab. 3.2).

Gen	RNAi Linie	Lebensfähigkeit Strategie 1 (25°C)	Lebensfähigkeit Strategie 2 (18°C → 25°C)
<i>plin2</i>	VDRC40734	n.d.	überlebensfähig
<i>mdy</i>	VDRC6367	überlebensfähig	überlebensfähig
<i>bmm</i>	VDRC37877	überlebensfähig	überlebensfähig
<i>Arf79F</i>	VDRC23082	pupal letal	überlebensfähig
α COP	VDRC35305 VDRC35306	letal	letal
β COP	VDRC15419	n.d.	letal
β' COP	VDRC42071	überlebensfähig	überlebensfähig
γ COP	VDRC25101	letal	letal
δ COP	VDRC41549	überlebensfähig	überlebensfähig
ε COP	VDRC24059 VDRC107588	n.d.	überlebensfähig
ζ COP	VDRC34768	letal	letal

Tab. 3.2: Überlebensfähigkeit adulter *Drosophila* Männchen nach RNAi-vermitteltem COPI knock-down

Der RNAi-vermittelte knock-down von COPI Komponenten und bekannten Lipidspeicherungsregulatoren (*plin2* (Grönke et al. 2003), *mdy* (Buszczak et al. 2002), *bmm* (Grönke et al. 2005)) wurde mittels des Gal4/UAS-Systems (Brand & Perrimon 1993) hauptsächlich im Fettgewebe (FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie) durchgeführt und die Nachkommen auf Lebensfähigkeit getestet. Strategie 1: die Kreuzungen wurden permanent bei 25°C gehalten, d.h. Transgene sind während der kompletten Entwicklung aktiv; Strategie 2: die Kreuzungen wurden zunächst bei 18°C gehalten, nach dem Schlüpfen der F1-Generation wurde ein Temperaturwechsel auf 25°C durchgeführt, d.h. Transgene sind nur im adulten Stadium aktiv. „n.d.“: Kondition wurde nicht getestet.

Werden die Transgene permanent während der Entwicklung der F1-Generation aktiviert (Tab. 3.2, Strategie 1), so hat dies bei RNAi gegen α COP, γ COP und ζ COP eine sehr frühe Letalität zur Folge, da keine L1 Larven vorgefunden werden konnten. *Arf79F* RNAi ruft pupale Letalität der Nachkommen hervor, ein paar sehr wenige *Drosophilae* sind dabei fähig zu schlüpfen (Semi-Letalität; „Escaper“). RNAi gegen *plin2* (Grönke et al. 2003), *mdy* (Buszczak et al. 2002), *bmm* (Grönke et al. 2005) und die COPI Untereinheiten β COP und δ COP bedingt dagegen keine Beeinflussung der Überlebensfähigkeit.

Die Strategie des Experiments wurde daraufhin verändert, um die Letalität zu umgehen und eine weitere Analyse der Nachkommen möglich zu machen. Hierbei wurde das Transgen erst in adulten Fliegen aktiviert (siehe Tab. 3.2, Strategie 2). Mit dieser Strategie konnte zumindest die Überlebensfähigkeit von *Arf79F* knock-down Fliegen verbessert werden. Zusätzlich wurden noch die RNAi-Linien für *plin2* (überlebensfähig) und die COPI Untereinheiten β COP (frühzeitig letal in der Entwicklung) und δ COP (überlebensfähig) getestet.

3.1.4 Überlebende Fliegen des RNAi-vermittelten COPI knock-downs speichern mehr Lipide

Männliche überlebende *Drosophilae* der experimentellen Strategie 2 wurden nach dem Schlüpfen sechs Tage auf Futter bei 25°C gealtert und schließlich für eine biochemische Quantifizierung des Gesamtlipidgehalts mittels CCA (siehe 2.2.3.3) verwendet (siehe Abb. 3.5).

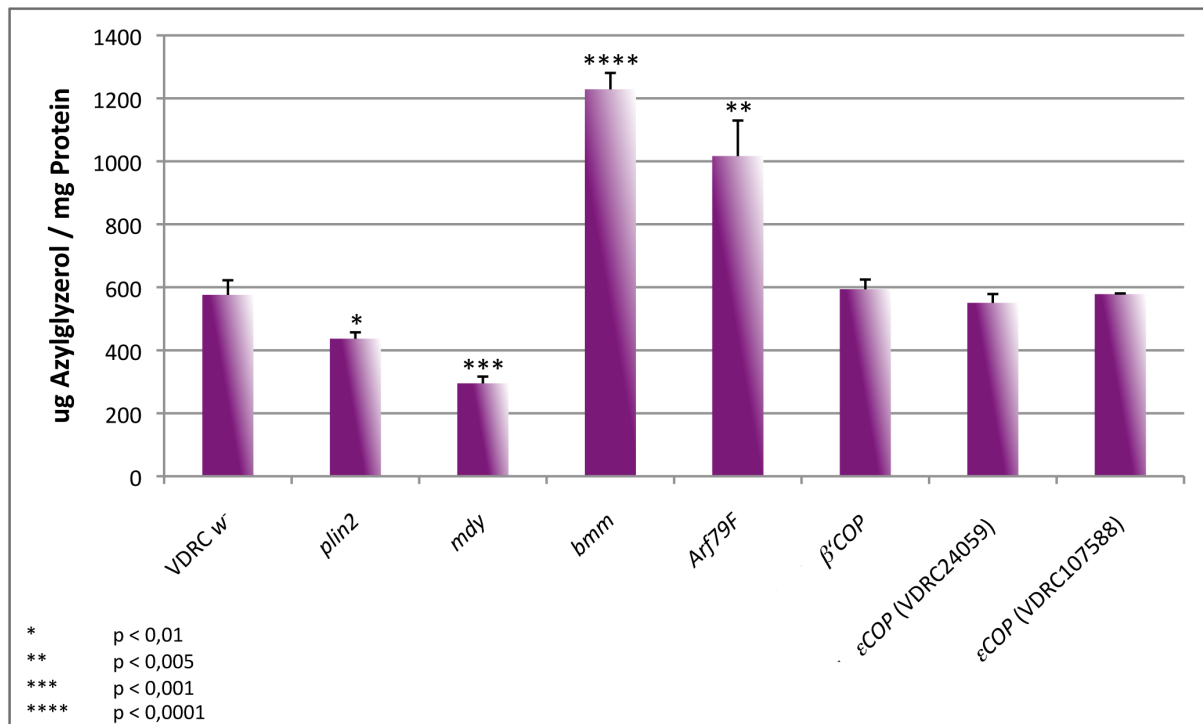


Abb. 3.5: RNAi-vermittelter *Arf79F* knock-down resultiert in einem erhöhten Gesamtlipidgehalt adulter *Drosophila*

Quantifizierung des Gesamtlipidgehalts mittels CCA (siehe 2.2.3.3) von sechs Tage alten adulten *Drosophila* Männchen (N=3x8), bei denen der RNAi-vermittelte knock-down von den COPI Komponenten *Arf79F* (VDRC23082), β -COP (VDRC42071) und ϵ -COP (VDRC24059 und VDRC107588) bzw. von den bekannten Lipidspeicherungsregulatoren *plin2* (Grönke et al. 2003; VDRC40734), *mdy* (Buszczak et al. 2002; VDRC6367) und *bmm* (Grönke et al. 2005; VDRC37877) im FK durchgeführt wurde (FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie). Als Kontrolle diente die VDRC *w*⁻ Linie. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils drei Datenpunkten mit der entsprechenden Standardabweichung. Statistische Unterschiede, alle in Bezug auf VDRC *w*⁻, wurden mit dem ungepaarten t-Test analysiert und als p-Wert ausgedrückt.

Mittels qRT-PCR wurde festgestellt, dass die Transkriptmenge durch den knock-down auf etwa 25% reduziert wird (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht). Es ist zu erkennen, dass *Arf79F* RNAi im Vergleich zu VDRC *w*⁻, welche als Wildtyp Kontrolle für die RNAi-Linien verwendet wurde, in einer sehr starken Erhöhung des Gesamtlipidgehalts adulter *Drosophila* Männchen resultiert. Die Erhöhung ist mit dem Phänotyp in Folge von RNAi gegen Transkripte der TAG Lipase *Bmm* vergleichbar. Knock-downs der Gene anderer COPI Untereinheiten hingegen zeigen keinen eindeutigen Lipid-Phänotyp (siehe 4.1). Wie erwartet bedingen die *plin2* (Grönke et al. 2003) und *mdy* (Buszczak et al. 2002) RNAi Kontrollen eine Erniedrigung des Gesamtlipidgehalts.

3.1.5 Überexpression von α COP reduziert die organismische Lipidspeicherung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der RNAi-vermittelte knock-down von *Arf79F* kodierenden Transkripten zu einer Reduktion des organismischen Lipidgehalts führt (siehe Abb. 3.5), stellte sich die Frage, ob nach Überexpression von COPI Komponenten der komplementäre Phänotyp, also eine Reduktion des Lipidgehalts, eintreten würde.

Um die subzelluläre Lokalisation der COPI Untereinheiten zu bestimmen, wurden Überexpressionskonstrukte mit N-terminalem EGFP hergestellt (siehe Tab. 2.3) und in Kc167 Zellen exprimiert (siehe Abb. 3.6).

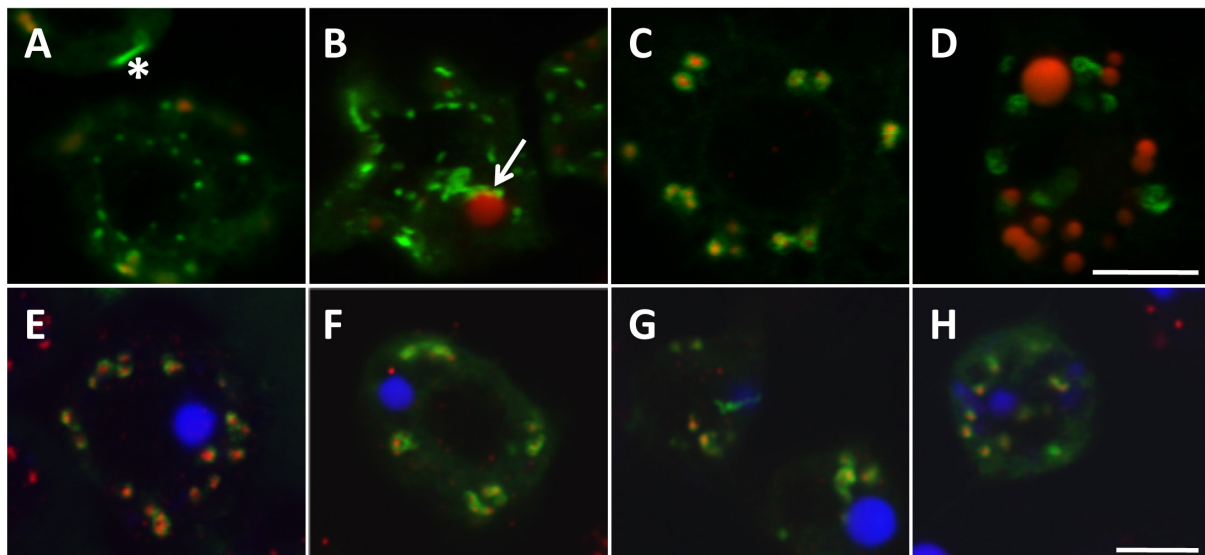


Abb. 3.6: Überexpression EGFP-fusionierter COPI Untereinheiten in Kc167 Zellen

COPI Untereinheiten wurden transient in Kc167 Zellen überexprimiert (grün; pUbi- α COP:EGFP (A, B); oder pAkt-Gal4 + pTGW- γ COP (C, D) / pTGW- β COP (E) / pTGW- β' COP (F) / pTGW- ε COP (G) / pTGW- ζ COP (H)), nach vier Tagen fixiert und entweder nur mittels einer AK-Färbung gegen das cis-Golgi Protein GM130 (rot; A, C, E-H) und/oder einer LD Färbung mittels LipidTOX Deep Red (rot; B, D; blau: E-H) (siehe 2.1.10) gegengefärbt. Alle COPI Untereinheiten zeigen Kollokalisation mit dem Golgi (A, C, E-H). α COP zeigt als einzige Komponente ein zusätzliches, punktförmiges Lokalisationsmuster (A, B), oftmals eine balkenartige Lokalisation (A, Sternchen) und ist häufig in direkter Nähe zu LDs aufzufinden (B, Pfeil), was auch für das pTGW-Konstrukt zutrifft (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala für A-D bzw. E-H entspricht jeweils 5 μ m.

In Säugerzellen wurde gezeigt, dass COPI hauptsächlich am Golgi lokalisiert (Duden et al. 1991; Oprins et al. 1993; Orci et al. 1997). Die mögliche Assoziation der COPI Untereinheiten mit LDs oder dem Golgi wurde unter Verwendung des LD Farbstoffs LipidTOX DeepRed und/oder eines AKs gegen das

cis-Golgi Marker-Protein GM130 untersucht. Alle getesteten COPI Untereinheiten zeigen eine Kollokalisierung mit dem cis-Golgi in *Drosophila* Kc167 Zellen.

α COP zeigt als einzige Untereinheit ein komplexeres Lokalisationsmuster (siehe Abb. 3.6, A, B), da zusätzlich zu der cis-Golgi Lokalisation auch noch ein punktförmiges Signal und oftmals balkenartige Strukturen (Abb. 3.6, A, Sternchen) aufzufinden sind. Interessanterweise lokalisiert α COP oft auch in direkter Nähe zu LDs (Abb. 3.6, B, Pfeil). Ein LD Phänotyp konnte nach Überexpression von α COP in Zellkulturzellen jedoch nicht vorgefunden werden.

Darüber hinaus wurde auch die subzelluläre Lokalisation von Arf79F sowie der dominant-negativen Arf79F(T31N) und konstitutiv-aktiven Arf79F(Q71L) Mutanten analysiert (Guo et al. 2008) (siehe Abb. 3.7). Die EGFP-Fusionsproteine zeigen eine zytoplasmatische Lokalisation mit Anreicherung im Zellkern (Zellkern nicht angefärbt; Abb. 3.7, Pfeile), jedoch keine Kollokalisierung mit dem cis-Golgi oder LDs und auch keinen LD Phänotyp. Die Überexpression der dominant-negativen Variante Arf79F(T31N) resultiert in einer leichten Fragmentierung des Golgis, was sich in der Reduktion größerer Golgi Strukturen äußert (Abb. 3.7, B₂). Dies ähnelt dem beobachteten Golgi Phänotyp nach RNAi-vermitteltem *Arf79F* knock-down in Kc167 Zellen (siehe Abb. 3.3, F).

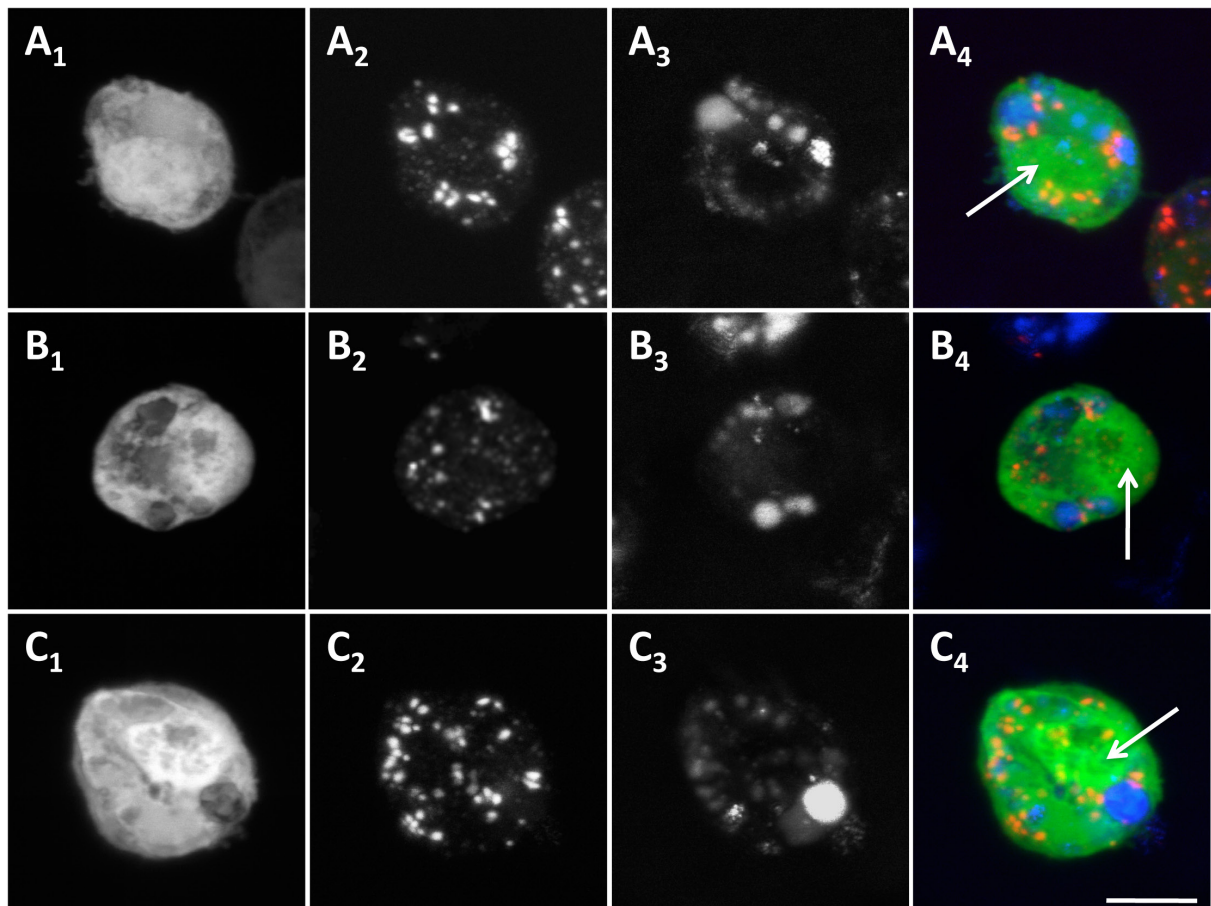


Abb. 3.7: Überexpression EGFP-fusionierter Arf79F Varianten in Kc167 Zellen

Kc167 Zellen wurden transient mit den Konstrukten pAkt-Gal4 + pTGW-Arf79F (A₁₋₄) / pTGW-Arf79F(T31N) (B₁₋₄) oder pTGW-Arf79F(Q71L) (C₁₋₄) transfiziert (grün) und in Anwesenheit von 400µM OA vier Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, eine AK-Färbung gegen das cis-Golgi Protein GM130 (rot) durchgeführt und die LDs mit LipidTOX Deep Red (blau) gefärbt. A₁-C₁: EGFP Signal, A₂-C₂: GM130, A₃-C₃: LipidTOX, A₄-C₄: Überlagerung aller drei Kanäle. Alle Arf79F Varianten lokalisieren zytoplasmatisch und sind im Zellkern (nicht angefärbt) angereichert (Pfeile). Eine Kolo-kalisation mit LDs oder dem Golgi bzw. ein LD Phänotyp ist nach Überexpression aller Arf79F Varianten nicht zu erkennen. In Zellen, die Arf79F(T31N):EGFP überexprimieren, sind Golgi Strukturen in der Größe reduziert (B₂). Z-Stapel Bilder (maximale Projektionen) wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 5µm.

Die COPI Untereinheiten α COP, β' COP, γ COP und ϵ COP und die Arf79F Varianten wurden jeweils auch im Organismus überexprimiert, um zu untersuchen, wie das Lokalisationsmuster aussieht und ob bei diesen Konditionen eine Reduktion des organismischen Lipidgehalts vorliegt.

Zunächst wurde α COP mittels Gal4, welches unter Kontrolle des *patched* Promotors exprimiert wird, in den Flügelimaginalscheiben von L3 Larven überexprimiert (siehe Anhang, Abb. 6.1), da eine Beeinflussung der Expression im FK oder im gesamten Organismus möglicherweise zu Letalität führen würde. Die Überexpression von α COP in diesem Gewebe führt allerdings zu keinem diagnostizierbaren LD Phänotyp.

Weiterhin wurde die α COP Überexpression auch im FK von L3 Larven untersucht (Abb. 3.8). Zusätzlich zu der punktförmigen Lokalisation, wie sie auch in Zellkultur (siehe Abb. 3.6, A, B) und in Flügelimaginalscheiben (siehe Anhang, Abb. 6.1) beobachtet werden konnte, findet man eine deutliche ringförmige α COP Lokalisation an der LD Oberfläche, sowohl in Bereichen des intakten Gewebes (siehe Abb. 3.8, A₄, Sternchen) als auch an isolierten LDs des FKs (siehe Abb. 3.8, B₃). α COP stellt auch im Organismus einen Sonderfall von COPI dar, da die anderen überexprimierten COPI Untereinheiten β' COP, γ COP und ε COP nur die punktförmige Lokalisation (vermutlich Golgi, ohne Gegenfärbung) bzw. die zytoplasmatische Lokalisation bei Arf79F im larvalen Gewebe zeigen (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht).

Die verwendete FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie zeigt eine sehr heterogene Expressionsstärke in den einzelnen Zellen des FKs, was auch unabhängig mit einer Überexpression von EGFP bestätigt wurde (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht). Vergleicht man die LDs von Zellen, die α COP sehr stark überexprimieren (siehe Abb. 3.8, A₂, unterer Pfeil), mit denen ohne starke Expression (Abb. 3.8, A₂, oberer Pfeil), so lässt sich erkennen, dass die LD Größe in Abhängigkeit von zunehmender Expressionsstärke geringer wird. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass die starke α COP Überexpression eine Reduktion des Lipidgehalts im larvalen FK bewirkt.

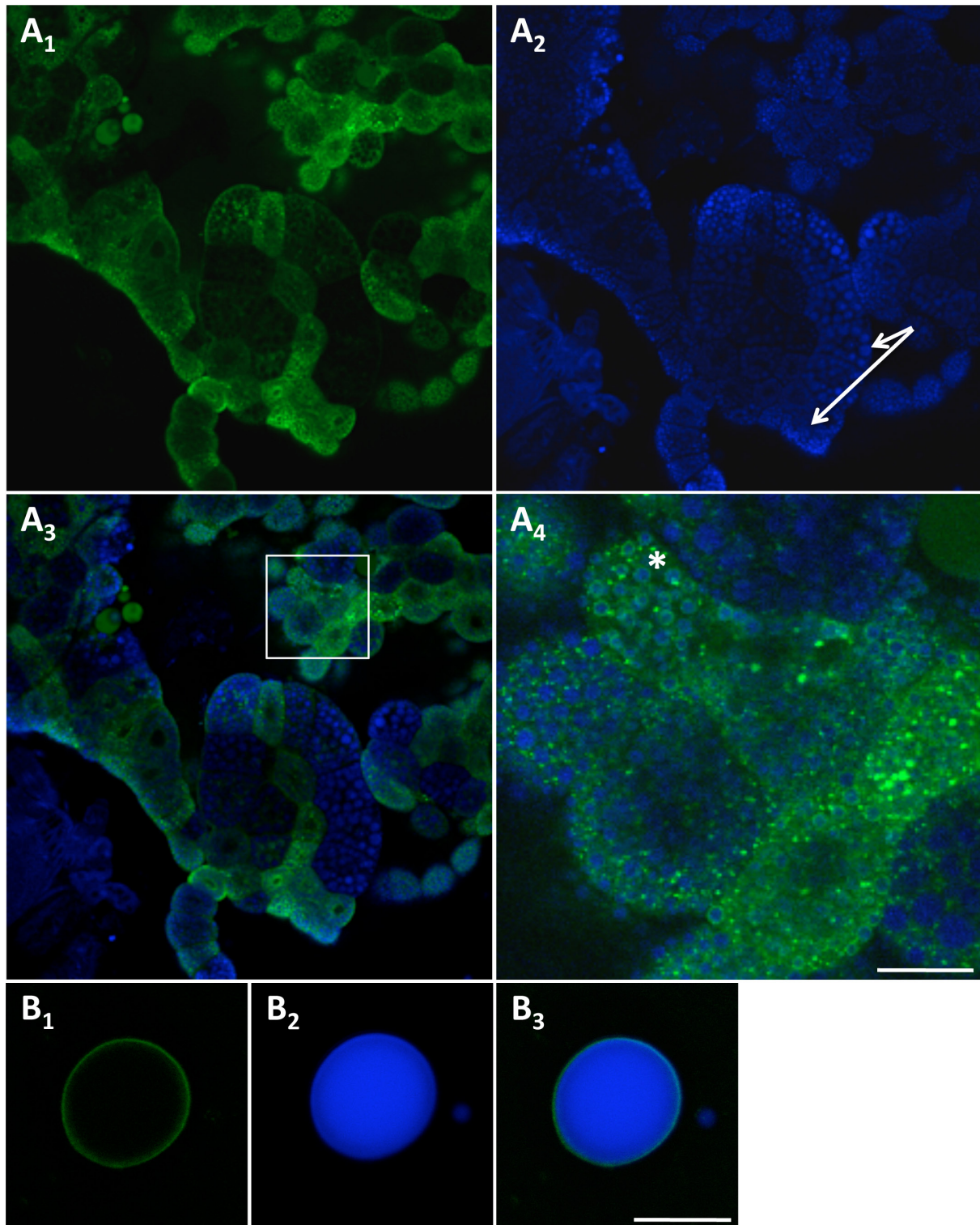


Abb. 3.8: Überexpression von α COP:EGFP im larvalen FK

L3 Larven, die α COP:EGFP (grün; A₁₋₄: Insertionslinie #1, B₁₋₃: #5) im FK überexprimieren (FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie), wurden fixiert und die LDs mit LipidTOX Deep Red (blau) gefärbt. A₁, B₁: EGFP Signal, A₂, B₂: LipidTOX Signal (LDs), A₃, B₃: Überlagerung beider Kanäle, A₄: Ausschnitt aus A₃ (weißer Kasten). α COP lokalisiert im FK hauptsächlich punktförmig (A₄). Zusätzlich findet man Bereiche, in denen α COP:EGFP ringförmig an den LDs lokalisiert (A₄, Sternchen; B₁₋₃: isolierte LDs des FKs). In Bereichen, in denen eine stärkere α COP Expression vorliegt, sind die LDs kleiner (A₂, unterer Pfeil) als in Bereichen mit geringerer Expression (A₂, oberer Pfeil). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 150 μ m für A und 15 μ m für B.

Um diese Hypothese zu testen, wurde der Gesamtlipidgehalt von α COP überexprimierenden L3 Larven biochemisch mittels CCA (siehe 2.2.3.3) bestimmt (siehe Abb. 3.9, A). Zehn verschiedene α COP Insertionslinien mit unterschiedlicher EGFP Signalstärke, die unter dem Fluoreszenzbinokular bestimmt wurde, wurden getestet.

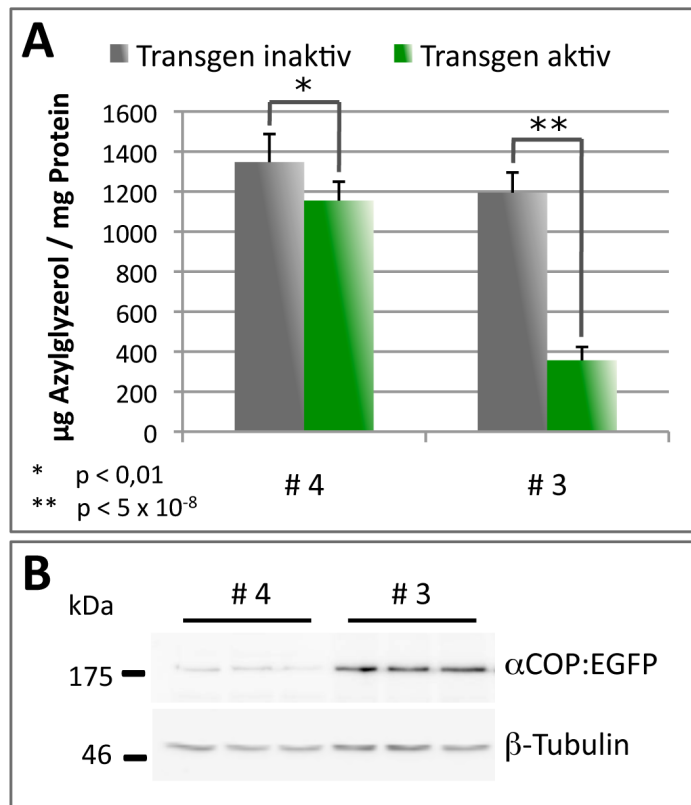


Abb. 3.9: Überexpression von α COP:EGFP im FK resultiert in einer Dosis-abhängigen Reduktion des organismischen Gesamtlipidgehalts

A: Der Gesamtlipidgehalt von L3 Larven (N= 4 bis 6 x 5 Larven) zwei verschiedener Insertionslinien (#4 und #3), die α COP:EGFP im FK überexprimieren (FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie; grün), wurde mittels CCA (siehe 2.2.3.3) bestimmt und mit solchen ohne aktives Transgen (grau; gleicher genetischer Hintergrund) verglichen. Die Überexpression von α COP:EGFP reduziert den Gesamtlipidgehalt der Larven. Dargestellt werden die Mittelwerte von den vier bis sechs Datenpunkten mit der entsprechenden Standardabweichung. Statistische Unterschiede wurden mit dem ungepaarten t-Test analysiert und als p-Wert ausgedrückt. Die Abb. zeigt ein Ergebnis, das mit einem unabhängigen Wiederholungsexperiment reproduziert wurde.

B: Western Blot (siehe 2.2.3.9) mit FK-Extrakten der in A verwendeten α COP:EGFP exprimierenden Larven. Die

Expressionsstärke korreliert mit der Lipidgehalt Reduktion. Als Ladekontrolle diente β -Tubulin.

Abb. 3.9 zeigt repräsentativ das Ergebnis der Insertionslinien #3 und #4. Heterozygote Parentaltiere wurden mit der homozygoten FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie verkreuzt, so dass der Lipidgehalt der Transgen-exprimierenden F1-Generation direkt mit der Kontrolle ohne aktives Transgen verglichen werden konnte. Die Larven einer Insertionslinie stammten dabei aus demselben Futterröhrchen, so dass den Lipidgehalt beeinflussende Nebeneffekte, wie z.B. Unterschiede in der verfügbaren Futtermenge, eliminiert werden konnten. Der CCA zeigt, dass die Überexpression von α COP auf Basis aller getesteten Insertionslinien eine signifikante Reduktion des Gesamtlipidgehalts als Ergebnis hat (siehe Anhang, Abb. 6.2). Bei den Insertionslinien ließen sich allerdings Unterschiede in Bezug auf die Reduktion des Lipidgehalts feststellen. Diese Unterschiede ließen sich mit der zuvor festgestellten Expressionsstärke korrelieren.

Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurde die Expressionsstärke der Insertionslinien #3 und #4 anhand einer Western Blot Analyse (siehe 2.2.3.9) mit larvalen FK-Extrakten bestimmt (siehe Abb. 3.9, B). In der Tat ist die Reduktion des Gesamtlipidgehalts proportional zu der α COP Expressionsstärke.

Die Überexpression der anderen COPI Untereinheiten β' COP, γ COP und ϵ COP und der Arf79F Varianten hatte keinen offensichtlichen LD Phänotyp zur Folge. Auch die Quantifizierung des Gesamtlipidgehalts von überexprimierenden Larven oder Fliegen mittels CCA (siehe 2.2.3.3) zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen ohne aktives Transgen (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht; siehe 4.1).

Die FK Morphologie α COP überexprimierender L3 Larven wurde zudem noch in lebenden Tieren mit dem Fluoreszenzbinokular untersucht (siehe Abb. 3.10, C_{1,2}). Als Kontrollen dienten Larven der gleichen Kreuzung ohne aktives Transgen (Abb. 3.10, A) und Larven, die nur EGFP überexprimieren (Abb. 3.10, B). Sowohl im Durchlicht- (Abb. 3.10, C₁) als auch im EGFP-Kanal (Abb. 3.10, C₂) wird erkennbar, dass die starke Überexpression von α COP auch eine starke Reduktion des larvalen FKs zur Folge hat. Die Dissoziation der polygonalen, zusammenhängenden Zellen des larvalen FKs zu runden, frei-schwimmenden Zellen, ein Prozess, der normalerweise erst während der frühen Metamorphose im Puppenstadium stattfindet (Hoshizaki 2005; Nelliott et al. 2006), scheint frühzeitig einzutreten (Abb. 3.10, C₂). Außerdem sind in fast allen stark überexprimierenden Larven deutlich erkennbare, melanotische Tumore zu sehen (Abb. 3.10, C₂, Pfeile).

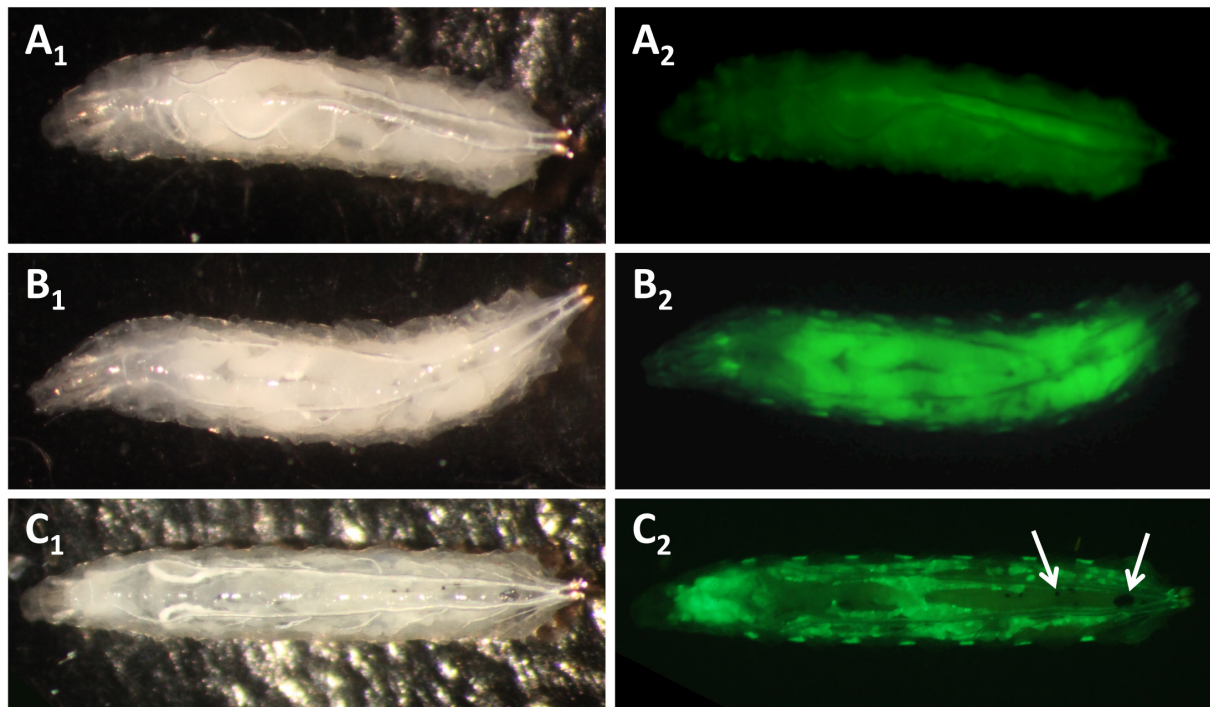


Abb. 3.10: Die Überexpression von α COP:EGFP verursacht eine Reduktion sowie eine veränderte Morphologie des larvalen FKs

L3 Larven ohne aktives Transgen ($A_{1,2}$; gleicher genetischer Hintergrund wie $C_{1,2}$), die nur EGFP ($B_{1,2}$) oder α COP:EGFP ($C_{1,2}$; Insertionslinie #3) im FK, den Speicheldrüsen und Oenozyten überexprimieren (FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie) wurden auf Eis betäubt und die Bilder mit dem Zeiss SteREO Discovery.V8 Mikroskop aufgenommen (A_1 - C_1 : Durchlicht, A_2 - C_2 : EGFP Signal). Bei den Larven ohne aktives Transgen (A_1) oder EGFP überexprimierenden Larven (B_1) erscheint der FK sehr kompakt und lichtundurchlässig. Wie erwartet ist bei Larven ohne aktives Transgen nur Hintergrundfluoreszenz vorzufinden (A_2), während der FK bei EGFP überexprimierenden Larven im EGFP Kanal deutlich erkennbar wird (B_2). Larven, die α COP:EGFP überexprimieren, wirken sehr durchsichtig (C_1). Durch die starke Expression wird im EGFP Kanal erkennbar, dass der FK-Gehalt stark reduziert ist und frühzeitig zu dissoziieren scheint (C_2). Zudem treten in den meisten α COP:EGFP überexprimierenden Larven melanotische Tumore auf (C_2 , Pfeile).

Mit diesen Beobachtungen konnte also gezeigt werden, dass COPI eine wichtige Rolle bei der Regulation der Lipidspeicherung in *Drosophila* spielt. Der genaue Mechanismus, über den die Lipidspeicherung durch COPI beeinflusst wird, ist jedoch weiterhin unbekannt. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass COPI die LD Proteinzusammensetzung beeinflusst (Beller et al. 2008; Soni et al. 2009). Es ist anzunehmen, dass durch den COPI knock-down wichtige Lipidspeicherungsregulatoren ihre Funktion nicht mehr korrekt erfüllen können. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Screen auf Wechselwirkungen zwischen LD-assoziierten Proteinen und COPI in Zellkultur durchgeführt (siehe 3.2.1).

3.2 Zur Interaktion von COPI mit LD Proteinen und deren COPI-abhängigen Lokalisation

Um zu erfahren, ob auch die Lokalisation unterschiedlicher *Drosophila* LD Proteine durch COPI knock-down verändert wird und um zusätzlich mehr über eine mögliche genetische Interaktion zwischen COPI und solchen Proteinen herauszufinden, wurde ein Screen in Zellkultur durchgeführt (Abb. 3.11 und 3.12).

3.2.1 Screen auf Wechselwirkungen zwischen der Überexpression von LD-assoziierten Proteinen und der RNAi-vermittelten Herabregulation von COPI Komponenten in Kc167 Zellen

Für den Interaktionsscreen wurde die Überexpression EGFP-fusionierter LD Proteine mit gegen *Arf79F* sowie α , γ und ϵ COP gerichteter RNAi kombiniert. Als Kontrolle diente die Überexpression der Proteine in dsRNA-unbehandelten Zellen. Um LDs zu induzieren, wurden die Zellen für vier Tage in Anwesenheit von 400 μ M OA inkubiert. Während dieses Zeitraums wurden die Zieltranskripte effizient reduziert (siehe Anhang, Abb. 6.3). Die von mir getesteten, exprimierten Proteine wurden in einem LD Proteom-Screen (Beller et al. 2008) identifiziert und decken eine große Bandbreite unterschiedlicher Funktionen ab. Die verwendeten Expressionskonstrukte dieser Proteine wurden größtenteils in einer früheren Studie generiert (K. Thiel 2008). Da aufgrund bisheriger Studien bereits gezeigt werden konnte, dass die Lokalisation von PERILIPINEN (ADRP, TIP47) bzw. von der Lipase ATGL von COPI beeinflusst wird (Beller et al. 2008; Soni et al. 2009), wurden die *Drosophila* PERILIPINE PLIN1 und PLIN2 (Grönke et al. 2003; Beller et al. 2010) und die Lipase Bmm (ATGL Homolog; Grönke et al. 2005) ausgewählt. Zudem wurden die zwei weiteren Lipasen CG11055 (mögliches HSL Homolog; Übersichtsartikel Bickel et al. 2009) und die annotierte Lipase CG9186 (McQuilton et al. 2011) und ein Protein mit bisher unbekannter Funktion, CG42351 (McQuilton et al. 2011) getestet. Diese überexprimierten Proteine lokalisieren an allen LDs in Kc167 Zellen (Abb. 3.12, A₁, B₁, C₁, F₁, G₁ und H₁). Außerdem wurden noch die Proteine SesB (Rikhy et al. 2003; Terhzaz et al. 2010; McQuilton et al. 2011), eine abgeleitete ADP/ATP Translokase, und die annotierte Dehydrogenase CG2254 (Beller et al. 2006) untersucht. Diese zeigen

eine außergewöhnliche Lokalisation in Kc167 Zellen, da sie nur an manchen LDs lokalisieren (Abb. 3.12, D₁ und E₁).

Als Resultat dieses experimentellen Aufbaus haben alle Zellen die dsRNAs aufgenommen (Abb. 3.11, grüne und rote Umrandung). Von diesen exprimiert jedoch nur eine Subpopulation zusätzlich auch noch das jeweilige Fusionsprotein (Abb. 3.11, grüne Umrandung). Dieser experimentelle Aufbau lässt den direkten Vergleich zwischen überexprimierenden und nicht exprimierenden Zellen zu, die alle RNAi-behandelt sind.

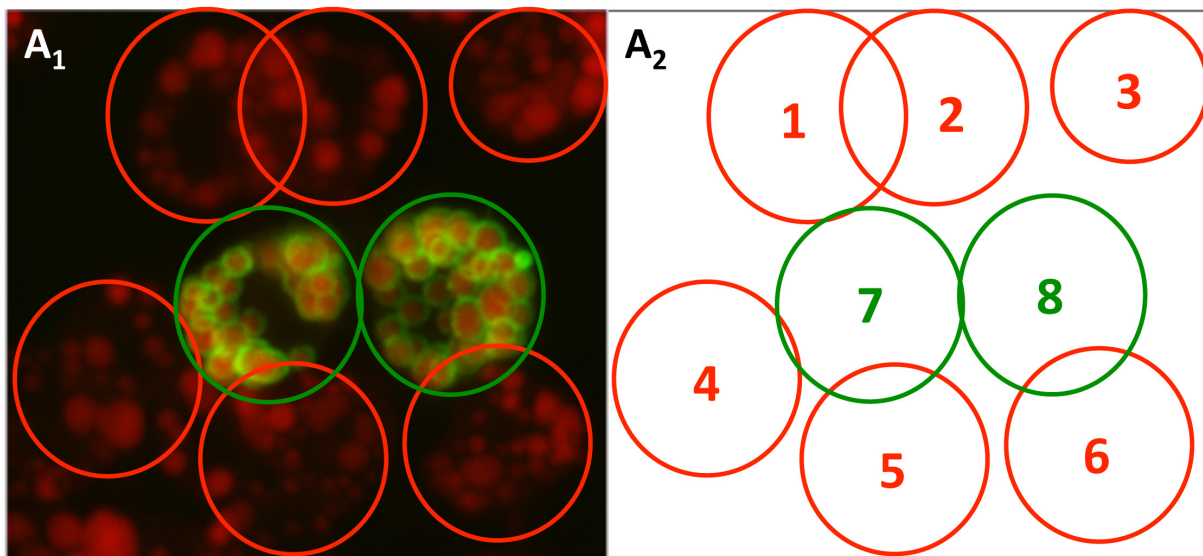


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des Tests auf Wechselwirkungen zwischen COPI knock-down und LD-assoziierten Proteinen

A₁: Kc167 Zellen wurden gleichzeitig mit COPI dsRNAs (hier α COP, DRSC30831) und Expressionskonstrukten EGFP-fusionierter LD Proteine (grün dargestellt; hier pTGW-CG42351) transfiziert (siehe 2.2.4.4 (b)) und in Anwesenheit von 400 μ M OA für vier Tage inkubiert. Die Zellen wurden darauf fixiert und die LDs mit LipidTOX angefärbt (rot). Die Dokumentation erfolgte mittels des Leica TCS SP5 Konfokalmikroskops, mit dem Z-Stapel aufgenommen wurden. A₂: Schematische Darstellung des Mikroskopbildes A₁. Zur Verdeutlichung wurden die Zellen nummeriert (#1-8). Als Resultat dieser experimentellen Strategie haben alle Zellen die dsRNAs aufgenommen (#1-8; grüne und rote Umrandung), während nur eine Subpopulation der Zellen gleichzeitig das EGFP-Fusionsprotein überexprimiert (#7 und #8; grüne Umrandung). Hierdurch können direkt nebeneinander liegende Zellen verglichen werden, die entweder nur die RNAi Behandlung oder aber zusätzlich auch noch die Protein-Überexpression erfahren haben. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Präparationen werden so minimiert.

Zuerst wurde getestet, ob die Überexpression der Proteine in der Kontrollkondition, also ohne Zugabe von dsRNAs, bereits einen LD Phänotyp zeigt (Abb. 3.12, A₁-H₁). Die Überexpression von PLIN2 (Abb. 3.12, B₁) führt zu der Bildung von größeren LDs in den Zellen. Auch die Überexpression von PLIN2 im FK resultiert in einem erhöhten Lipidgehalt in adulten *Drosophilae* (Grönke et al. 2003), was den Befund in Zellkultur unterstützt. Hingegen führt die Überexpression der beiden Lipasen Bmm (Grönke et al. 2005) und CG11055 zu

einer starken Reduktion der LD Anzahl und Größe (Abb. 3.12, F₁, G₁). Für das abgeleitete HSL Homolog CG11055 (<http://flybase.org/>, Version FB2012_02; McQuilton et al. 2011) stellt dies den ersten experimentellen Hinweis dar, dass es sich bei dem Protein um eine funktionale Lipase handeln könnte.

Bei den Kombinationen der überexprimierten Proteine mit COPI RNAi haben alle, bis auf die vom COPI knock-down mit der Überexpression von SesB und CG9186, im Vergleich zur Kontrollkondition ohne dsRNAs weder einen unterschiedlichen LD Phänotyp noch eine veränderte Lokalisation der Fusionsproteine gezeigt (Abb. 3.12, A, B, C, E, F, G).

In Folge des COPI knock-downs lokalisiert SesB hauptsächlich zytoplasmatisch (Abb. 3.12, D₂₋₅).

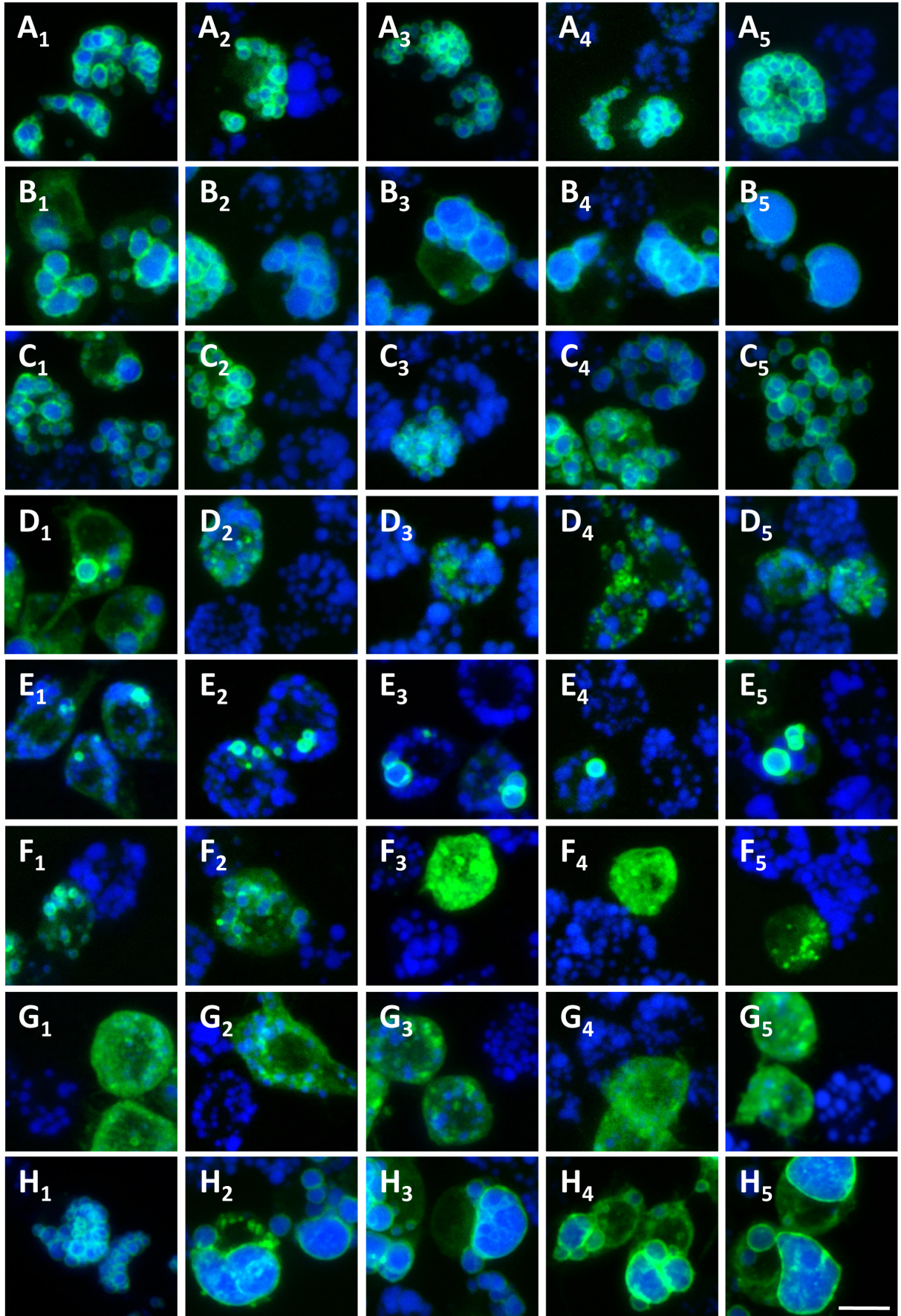


Abb. 3.12: Wechselwirkungen zwischen der Überexpression von LD-assoziierten Proteinen und der RNAi-vermittelten Herabregulation von COPI Komponenten

Abb. 3.12: Wechselwirkungen zwischen der Überexpression von LD-assoziierten Proteinen und der RNAi-vermittelten Herabregulation von COPI Komponenten Kc167 Zellen wurden gleichzeitig mit H₂O (A₁-H₁ (Kontrollen)) oder dsRNAs gegen COPI Komponenten (A₂-H₂: α COP (DRSC30831), A₃-H₃: γ COP (DRSC31264), A₄-H₄: ϵ COP (DRSC35610), A₅-H₅: *Arf79F* (DRSC31426) und Expressionskonstrukten EGFP-fusionierter LD Proteine (grün dargestellt; pAkt-Gal4 + A: pUAST-PLIN1:EGFP, B: pUAST-PLIN2:EGFP, C: pTGW-CG42351, D: pTGW-SesB, E: pTGW-CG2254, F: pUAST-Bmm:EGFP, G: pTGW-CG11055, H: pTGW-CG9186) transfiziert (siehe 2.2.4.4 (b)) und in Anwesenheit von 400 μ M OA für vier Tage inkubiert. Die Zellen wurden darauf fixiert und die LDs mit LipidTOX Deep Red angefärbt (blau). Überexpression der annotierten Lipase CG9186 in Kontrollzellen resultiert oftmals in der Bildung von LD Clustern (H₁). Wird die Überexpression von CG9186 mit COPI RNAi kombiniert, so entstehen GLDs bei allen getesteten dsRNAs (H₂-H₅). (Weitere Details siehe Text 3.2.1.) Z-Stapel Bilder (maximale Projektionen) wurden mit dem Leica TCS SP5 Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 5 μ m.

Die stärkste genetische Interaktion konnte zwischen COPI und der bisher uncharakterisierten, annotierten Lipase CG9186 gefunden werden. Bei Kombination von RNAi-vermitteltem COPI knock-down und der gleichzeitigen Überexpression von CG9186:EGFP kann die Bildung von deutlich vergrößerten, oft unregelmäßig geformten LDs beobachtet werden (Abb. 3.12, H₂-H₅), welche folgend als „GLD(s)“ („giant lipid droplet(s)“) bezeichnet werden. In dieser Kondition ist die Anzahl deutlich vergrößerter LDs im Vergleich zu untransfizierten, benachbarten Zellen stark erhöht (Abb. 3.13, A₁), während gleichzeitig die Gesamtzahl aller LDs pro Zelle auf etwa 20% reduziert ist (Abb. 3.13, A₂).

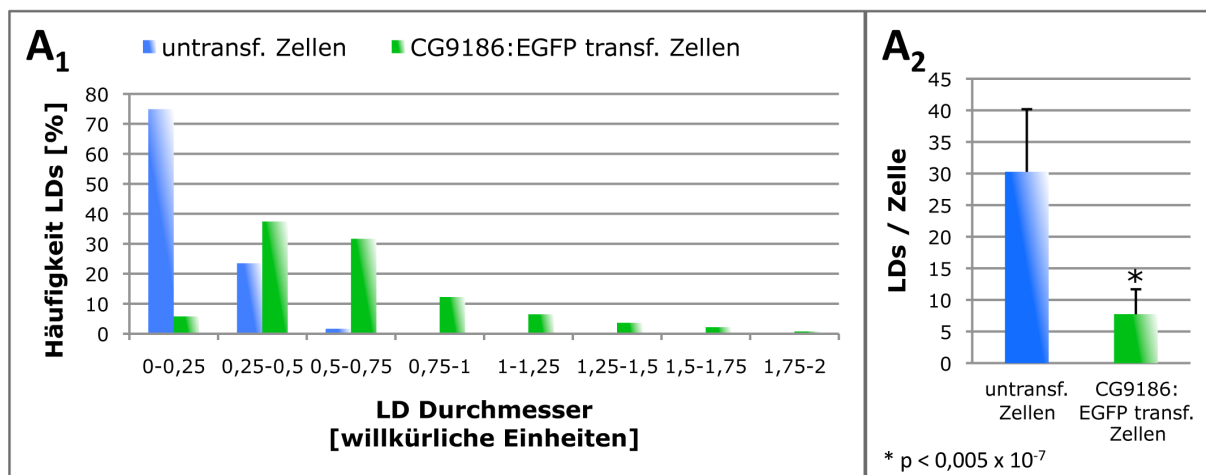


Abb. 3.13: Auswirkung der CG9186 Überexpression auf die LD Größe und Anzahl in COPI knock-down Kc167 Zellen

Gleichermaßen wie in Abb. 3.12, H₂, H₃ und H₅ behandelte Zellen wurden verwendet, um den LD Durchmesser (A₁) bzw. die LD Anzahl pro Zelle (A₂) in diesen Konditionen zu quantifizieren. CG9186:EGFP transfizierte Zellen (grüne Balken) wurden hierbei mit benachbarten, untransfizierten Zellen (blaue Balken) verglichen. Die Aufnahmen wurden mit ImageJ (Version 1.41o) analysiert und von jeweils 18 Zellen pro Kondition der größte Durchmesser der einzelnen LDs vermessen und in willkürlichen Einheiten angegeben (A₁). Die LD Durchmesser wurden dabei in acht verschiedene Klassen eingeteilt und der prozentuale Anteil der LDs in einer Klasse (in Relation zu allen gezählten LDs) in dem Balkendiagramm dargestellt. Zudem wurde die Anzahl aller LDs pro Zelle, von jeweils 18 transfizierten und untransfizierten Zellen, ausgezählt und die Mittelwerte als Balkendiagramm in A₂ dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren die

Standardabweichung ausgehend von den jeweiligen 18 Stichproben. Statistische Unterschiede wurden mit dem ungepaarten t-Test analysiert und als p-Wert ausgedrückt.

All diese Konditionen wurden auch ohne die Zugabe von OA getestet, wodurch die LD Biogenese nicht bereits nach kurzer Zeit, sondern erst später infolge des RNAi-vermittelten COPI knock-downs induziert wird. Die Translokation der Proteine auf die LDs erfolgt also erst in der COPI knock-down Situation und nicht schon zuvor. Durch diese veränderte Strategie wurden bis auf die Bildung kleiner LD Cluster nach Überexpression von CG9186 bzw. eine leichte Vergrößerung der LDs nach PLIN2 Überexpression jedoch keine anderen, erkennbaren Phänotypen hervorgerufen (siehe Anhang, Abb. 6.4). Möglicherweise war der gespeicherte Lipidgehalt der Zellen bei dieser Strategie zu gering, so dass kein starker LD Phänotyp beobachtet werden konnte (siehe auch 4.1).

3.2.2 Die Überexpression von CG9186 in Kc167 Zellen mit erhöhtem Lipidgehalt resultiert in der Bildung von GLDs

Die Kombination von COPI RNAi mit der Überexpression von CG9186:EGFP ruft die Bildung der GLDs oder großer LD Cluster hervor (siehe Abb. 3.12, H₂-H₅). Zur Beantwortung der Frage, ob dieser LD Phänotyp spezifisch für den RNAi-vermittelten COPI knock-down oder für den dadurch bedingten generellen Anstieg der Lipidspeicherung in den Zellen ist, wurden weitere Konditionen getestet, die zu einem erhöhten zellulären Lipidgehalt führen (siehe Abb. 3.14).

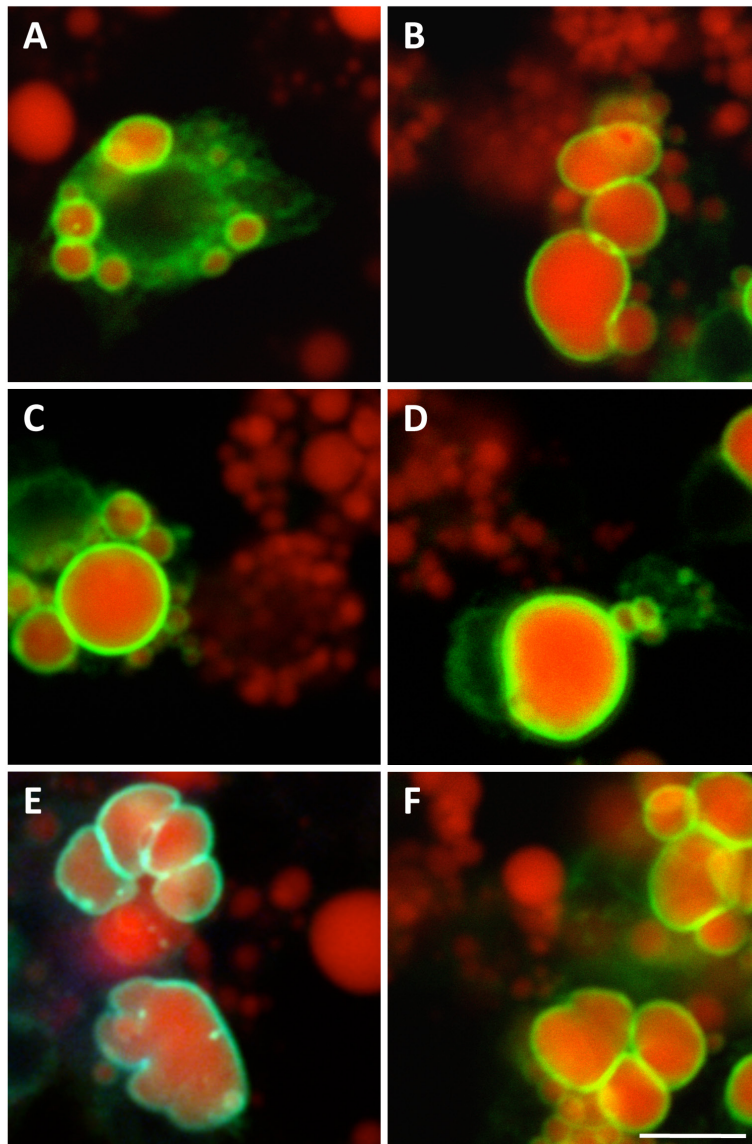


Abb. 3.14: CG9186:EGFP Überexpression in Zellen mit erhöhtem Lipidgehalt resultiert in der Entstehung von GLDs

Kc167 Zellen wurden mit pUbi-CG9186:EGFP (grün) transfiziert, und mit Konditionen, die zu erhöhtem Lipidgehalt in den Zellen führen (B: α COP RNAi (DRSC30831), C: *Arf79F* RNAi (DRSC31426), D: *bmm* RNAi, E: pUbi-PLIN2:TdT; A-E: 400 μ M OA; F: 800 μ M OA) oder *EGFP* RNAi (A) als Kontrolle, kombiniert. Die Zellen wurden fixiert und die LDs mit LipidTOX Deep Red angefärbt (rot). In allen getesteten Konditionen mit erhöhtem Lipidgehalt liegen in den CG9186:EGFP exprimierenden Zellen stark gebündelte und auch GLDs vor (B-F). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstab-skala entspricht 5 μ m.

Neben Kombination von CG9186 Überexpression mit α COP und *Arf79F* RNAi (Abb. 3.14, B, C) wurde der *bmm* knock-down mittels RNAi durchgeführt (Abb. 3.14, D), das Protein PLIN2 überexprimiert (Abb. 3.14, E) oder die Zellen mit erhöhter Menge an OA (800 μ M anstatt 400 μ M wie bei den anderen Konditionen) inkubiert (Abb. 3.14, F). Es konnte biochemisch bestimmt werden, dass die Inkubation der Kc167 Zellen mit ansteigender Menge an OA auch eine direkte Abhängigkeit von der gespeicherten Lipidmenge zeigt (siehe Anhang, Abb. 6.5). In allen getesteten experimentellen Ansätzen, die zu einer erhöhten Lipidspeicherung führen (Abb. 3.14, B-F), treten die GLDs auf. Dies zeigt, dass der Phänotyp in CG9186 überexprimierenden Zellen nur dann auftritt, wenn ein sehr hoher Lipidgehalt vorliegt und dieser nicht COPI abhängig ist. Da das überexprimierte CG9186 die Lipidspeicherung in dieser sensitivierten Situation so stark beeinflussen kann, war es von großem Interesse, mehr über das Protein

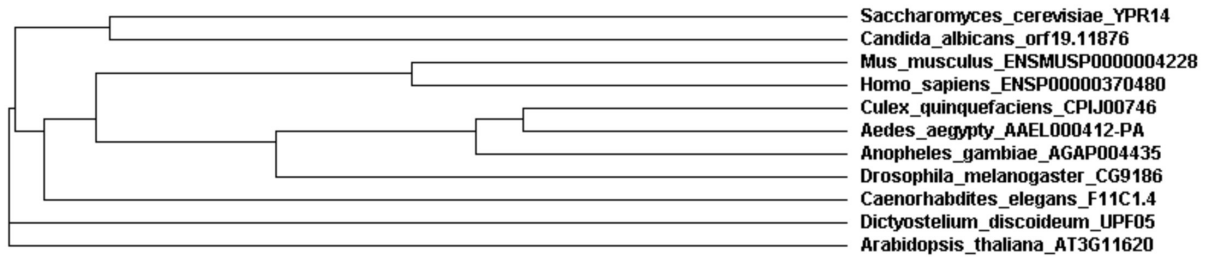
und die Funktionsweise zu erfahren, so dass weitere Untersuchungen durchgeführt wurden.

3.3 Charakterisierung von CG9186

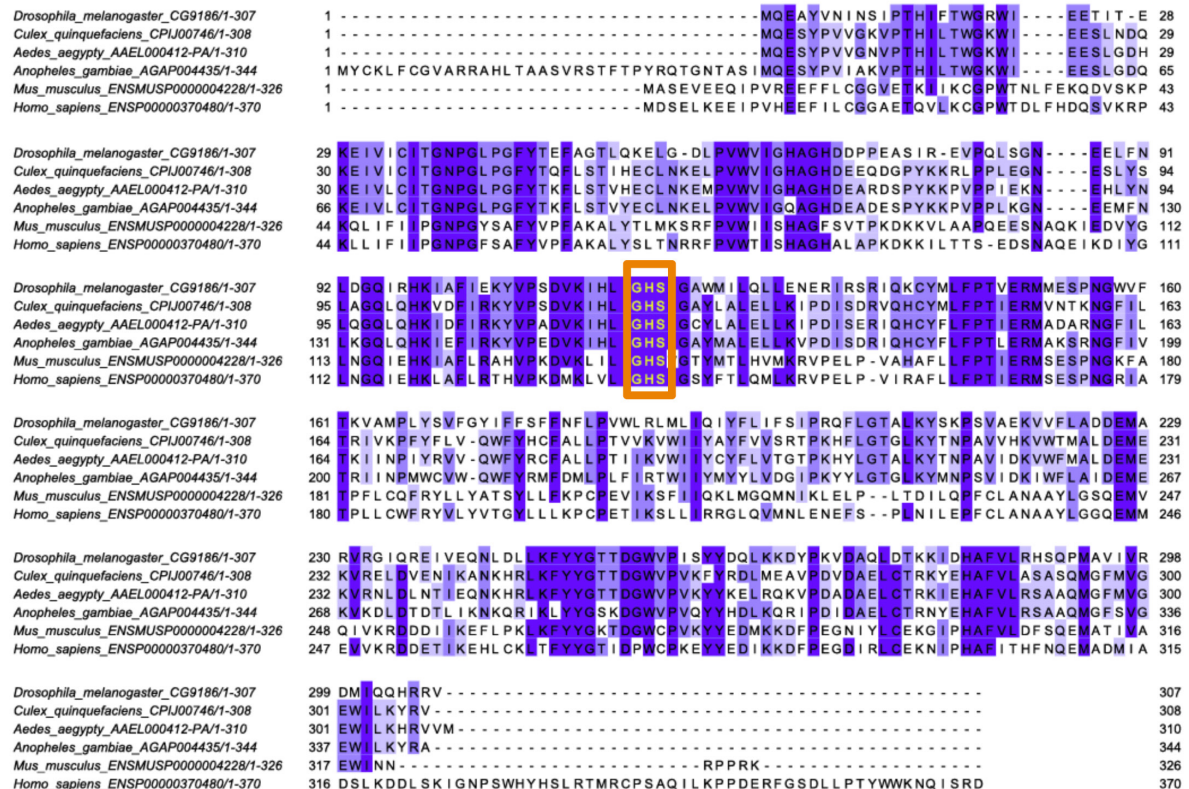
3.3.1 CG9186 ist eine evolutionär konservierte, LD-assoziierte annotierte Lipase

CG9186 ist evolutionär stark konserviert mit Homologen innerhalb der Vertebraten und Invertebraten (siehe Abb. 3.15, A und B), die ebenfalls uncharakterisiert sind. Die Sequenzidentität mit Insekten-Homologen entspricht dabei etwa 50%, die mit den Homologen von *Mus musculus* und *Homo sapiens* etwa 35% (UniProt, Version Februar 2012; <http://www.uniprot.org>). Die Zugehörigkeit zu der Esterase/Lipase-Superfamilie basiert auf der abgeleiteten Lipase-Domäne (Abb. 3.15, B, oranger Kasten) mit einem Serin im katalytischen Zentrum, das für Lipasen funktionell charakteristisch ist (z.B. Grönke et al. 2005; Marchler-Bauer et al. 2011).

A



B



C

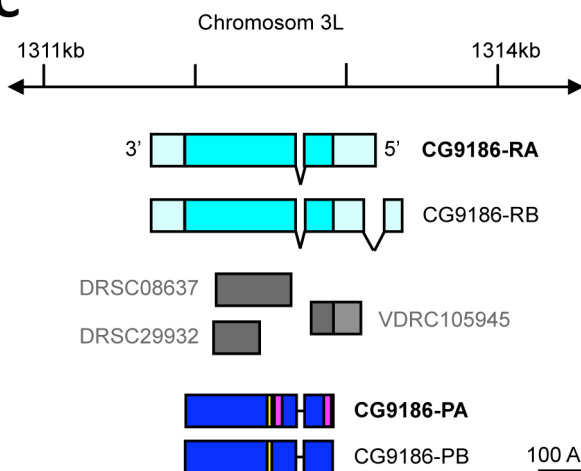


Abb. 3.15: CG9186 ist ein evolutionär konserviertes Protein

A: Phylogenetischer Baum von CG9186 und ähnlichen Sequenzen verschiedener Spezies. B: Sequenzalignment von CG9186 und homologen Sequenzen verschiedener Insekten- und Säugerspezies. Die bei allen Spezies konservierte abgeleitete Lipasedomäne (katalytisches Zentrum) ist mit einem orangen Kasten markiert. Homologe Sequenzen in fünf oder sechs Spezies sind dunkellila dargestellt, in vier bzw. zwei oder drei Spezies in helleren lila Tönen. C: Genomische Organisation von CG9186 (erstellt nach Angaben von FlyBase (<http://flybase.org/>, Version FB2012_02;

McQuilton et al. 2011). CG9186 ist auf dem linken Arm des dritten Chromosoms (3L) lokalisiert und hat zwei annotierte Transkript-Varianten (RA und RB); ORF türkis, hellerer Ton: untranslatierte Regionen) und zwei Protein-Varianten (PA und PB); dunkelblau). Die abgeleitete Lipasedomäne ist in gelb dargestellt. Für alle Studien in dieser Arbeit wurde die Isoform A verwendet (fett gedruckt). Zusätzlich sind die in dieser Studie verwendeten RNAi Konstrukte dargestellt (grau) und die für die

AK-Herstellung ausgewählten Peptidsequenzen (pink; in dieser Studie wurde stets der AK #2 verwendet).

Das CG9186 Gen befindet sich auf dem linken Arm des dritten Chromosoms (3L) an Position 61F6 und besitzt zwei annotierte Transkript- und Protein-Varianten (siehe Abb. 3.15, C) (basierend auf FlyBase (<http://flybase.org/>), Version FB2012_02; McQuilton et al. 2011). Beide Transkript-Varianten (RA und RB; türkis), die sich lediglich in der 5' UTR unterscheiden, führen zur Translation von Proteinen mit identischer AS-Sequenz (PA und PB; dunkelblau) von 307 AS Länge. Außer der konservierten Lipase-Domäne (Abb. 3.15, C, gelb) mit dem abgeleiteten katalytisch-aktiven Serin an Position 119 verfügt das Protein über keine weiteren bekannten Proteindomänen.

Die Zeit- und Gewebe-spezifische Expression von *CG9186* wurde mittels WMISH analysiert (siehe Abb. 3.16). *CG9186* kodierende maternale Transkripte liegen relativ schwach vor, zygotische sind in späteren embryonalen Stadien nur in der Speicheldrüse vorzufinden. Die Spezifität der RNA Sonde wurde verifiziert (Abb. 3.16, D). Das Expressionsmuster stimmt mit bereits publizierten Daten überein (BDGP: <http://insitu.fruitfly.org/> (Tomancak et al. 2002; Tomancak et al. 2007)). In post-embryonalen Entwicklungsstadien ist *CG9186* Expression in Fettspeichernden Geweben, wie im FK oder Mitteldarm, und außerdem in der Speicheldrüse detektierbar (basierend auf Microarray Daten; <http://www.flyatlas.org/> (Chintapalli et al. 2007)).

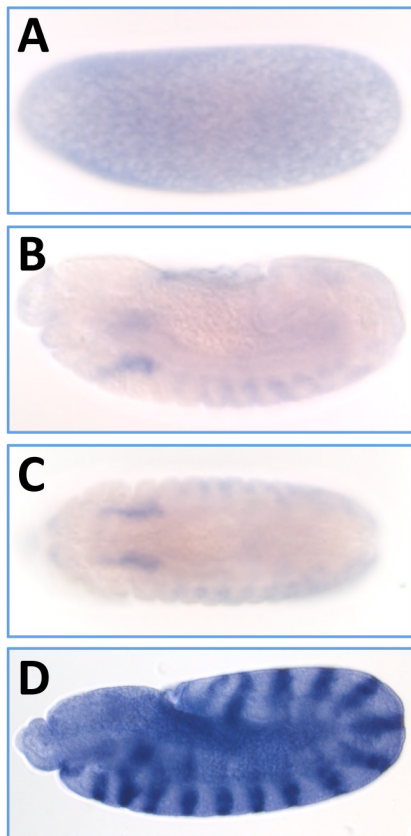


Abb. 3.16: Embryonale RNA Verteilung von *CG9186*

Der *CG9186* cDNA Klon LP01162 wurde verwendet, um eine DIG-markierte antisense RNA Sonde zu generieren. Diese wurde in einer WMISH (siehe 2.2.1.1) mit *D.m.* Embryonen unterschiedlicher Stadien (0-22h nach Eiablage) verwendet, um das Expressionsmuster von *CG9186* während der Embryonalentwicklung zu detektieren. Die Embryonen sind mit dem anterioren Pol nach links und dem dorsalen Bereich nach oben ausgerichtet. *CG9186* Transkripte liegen im Prä-Blastoderm Stadium von *w¹¹¹⁸* Embryonen schwach vor (A) und die Expression ist im Stadium 12 (B und C) auf die Speicheldrüsenanlage reduziert (C: ventrale Ansicht eines Embryos). D: Um die Spezifität der *CG9186* RNA Sonde zu testen, wurden Embryonen verwendet, die *CG9186* durch Gal4, welches unter Kontrolle des *engrailed* Promotors steht, in einem Streifenmuster überexprimieren (Stadium 11 Embryo). Die Färbungen wurden mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop dokumentiert.

CG9186 wurde außerdem sowohl in embryonalen als auch larvalen LD Proteom-Screens als LD-assoziiertes Protein identifiziert (Cermelli et al. 2006; Beller et al. 2006). Um herauszufinden, ob die LD Lokalisation Zelltyp-spezifisch ist, wurde zunächst die Lokalisation des überexprimierten, EGFP-fusionierten Proteins auch in anderen *Drosophila* Zelllinien in An- und Abwesenheit von OA untersucht (siehe Abb. 3.17). Unter Standard-Wachstumsbedingungen lokalisiert *CG9186* in Kc167 (Abb. 3.17, A) und ML-DmBG3-c2 Zellen (Abb. 3.17, C) in einem perinukleären, retikulären Muster.

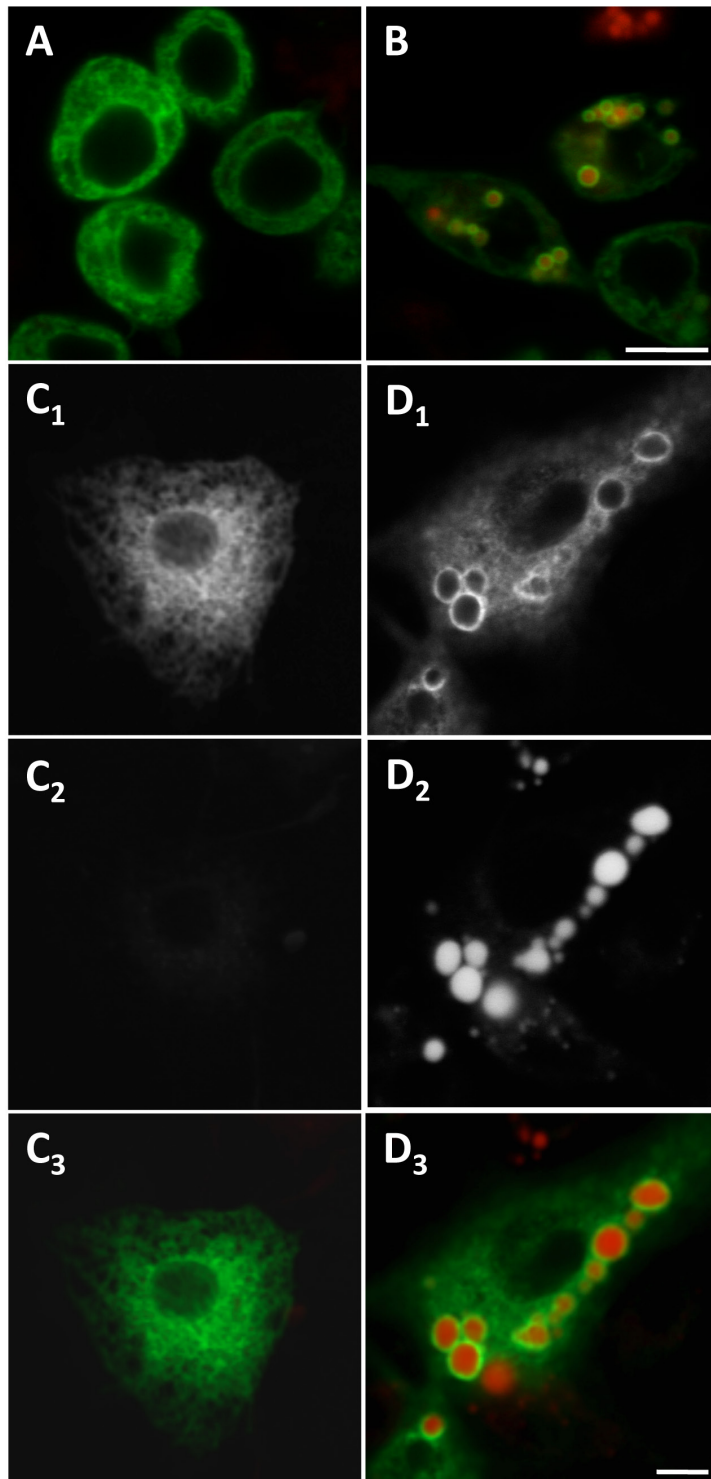


Abb. 3.17: Subzelluläre Lokalisation von CG9186:EGFP in verschiedenen *D.m.* Zellkulturlinien mit und ohne Zugabe von OA

Kc167 (A, B) bzw. ML-DmBG3-c2 Zellen (C₁-C₃, D₁-D₃) wurden transient mit pAkt-Gal4 + pTGW-CG9186 bzw. mit pUbi-CG9186:EGFP transfiziert und nach Fixierung mit LipidTOX Deep Red gegengefärbt (in den Überlagerungskanälen ist das Fusionsprotein in grün dargestellt, LDs in rot). C₁, D₁: EGFP Signal, C₂, D₂: Signal des LD Farbstoffs LipidTOX, C₃, D₃: Überlagerung beider Kanäle. Unter Standard Wachstumsbedingungen zeigen beide Zelllinien nahezu keine LDs (A, C) und CG9186:EGFP lokalisiert in einem retikulären Muster. Nach Inkubation der Zellen mit 400µM OA werden viele LDs gebildet, an denen CG9186:EGFP lokalisiert (B, D), wobei meistens das retikuläre Muster bestehen bleibt. Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht jeweils 5µm.

Aufgrund dieser Beobachtung habe ich getestet, ob eine Kolo­kalisierung von CG9186 mit dem ER Marker KDEL-Rezeptor (KDELR) vorliegt (Abb. 3.18). Die Kolo­kalisierung beider Proteine bestätigt, dass CG9186 in Abwesenheit von LDs am ER lokalisiert.

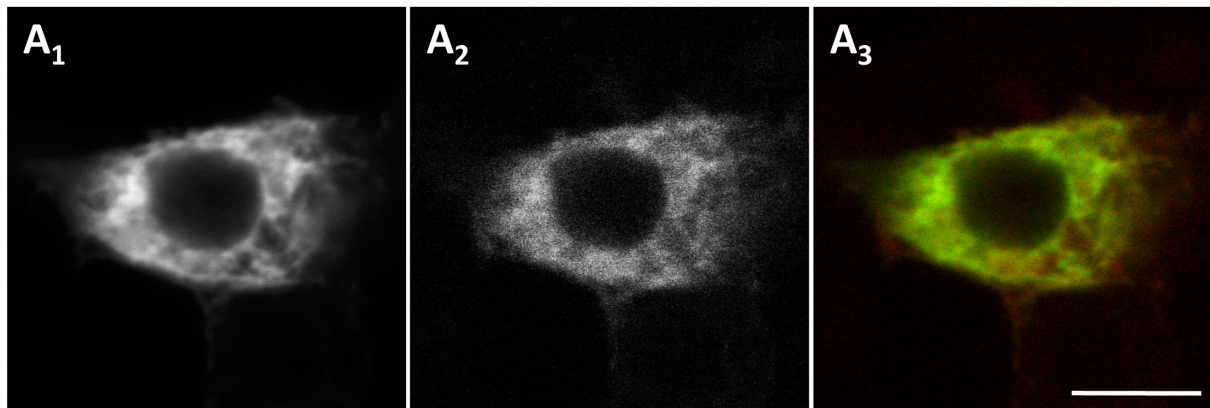


Abb. 3.18: CG9186 lokalisiert in Abwesenheit von LDs am ER

ML-DmBG3-c2 Zellen wurden mit pUbi-CG9186:EGFP (grün) und pUbi-KdelR:TdT (rot) transfiziert und unter Standard-Wachstumsbedingungen inkubiert. A₁: EGFP Signal, A₂: TdT Signal, A₃: Überlagerung beider Kanäle. Die Kolokalisation beider Proteine zeigt, dass CG9186:EGFP in Abwesenheit von LDs am ER lokalisiert (A₃). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 5µm.

Nach Inkubation der Zellen mit 400µM OA zur Induktion der LD Biogenese findet man CG9186 ringförmig an der LD Oberfläche (Abb. 3.17, B, D₃), wobei meistens ein Teil des überexprimierten Proteins weiterhin am ER lokalisiert.

Um herauszufinden, ob die Lokalisation evolutionär konserviert ist, wurde das EGFP-fusionierte *Drosophila* Protein in der humanen, embryonalen Nieren-Zelllinie HEK („human embryonic kidney“)-293 überexprimiert (Abb. 3.19). CG9186 lokalisiert in den Zellen in einem mit Fliegenzellen vereinbaren Muster, was für die evolutionäre Konserviertheit der Lokalisation spricht.

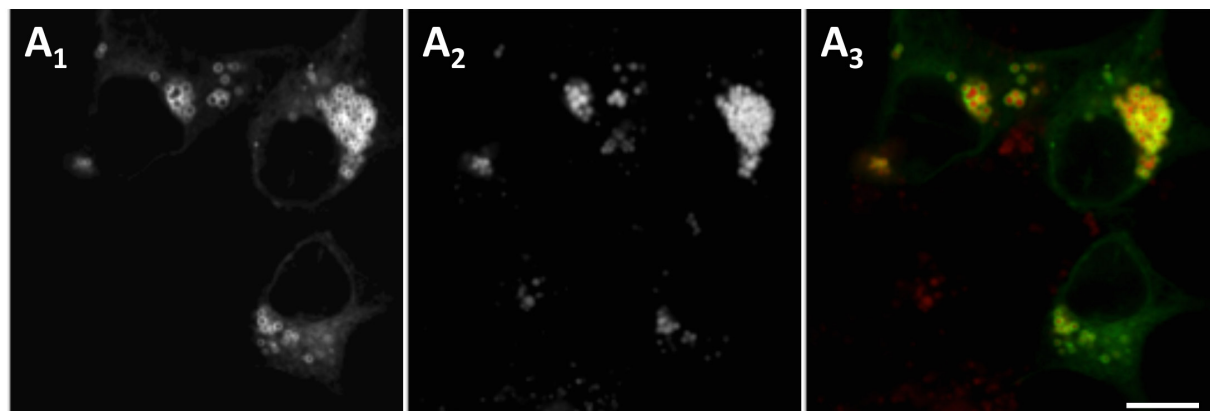


Abb. 3.19: Die subzelluläre Lokalisation von CG9186:EGFP ist evolutionär konserviert

HEK-293 Zellen wurden transient mit pH-CG9186:YFP transfiziert und gleichzeitig mit 400µM OA inkubiert. A₁: YFP Signal, A₂: Signal der mit LipidTOX angefärbten LDs, A₃: Überlagerung beider Kanäle. Das *Drosophila* CG9186:YFP Fusionsprotein (grün) lokalisiert in HEK-293 Zellen ebenfalls an allen LDs (rot) und zeigt zugleich ein schwaches, retikuläres Lokalisationsmuster (A₃). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 10µm.

Für Studien zur Detektion des endogenen CG9186 Proteins wurden zwei Ratten mit jeweils zwei identischen Peptiden immunisiert, um AK zu generieren (siehe 2.2.3.1; Abb. 3.15, C: verwendete Peptidsequenzen in pink dargestellt). Der hergestellte AK #2 wurde mittels Gewebefärbungen und Western Blot Analyse überprüft.

Zunächst wurde der AK in Färbungen am larvalen FK und in Western Blot Analysen mit Extrakten adulter Fliegen getestet (siehe Abb. 3.20). Das beobachtete Laufverhalten des endogenen Proteins bei etwa 30kDa unterscheidet sich etwas von dem abgeleiteten Molekulargewicht von 35,7kDa (<http://flybase.org/>, FlyBase Version FB2012_02; McQuilton et al. 2011). Proteine, die sich bei der SDS-PAGE unterhalb ihres tatsächlichen Molekulargewichts bewegen, könnten z.B. solche mit sehr stabiler Sekundärstruktur sein, die durch SDS nur unvollständig denaturiert werden (Davis et al. 1986). Zudem ist auch bekannt, dass hydrophobe Proteine, die eine verstärkte Interaktion mit SDS aufweisen können, auch ein niedrigeres Molekulargewicht in der SDS-PAGE zeigen (Newman et al. 1981; Carrasco et al. 1982).

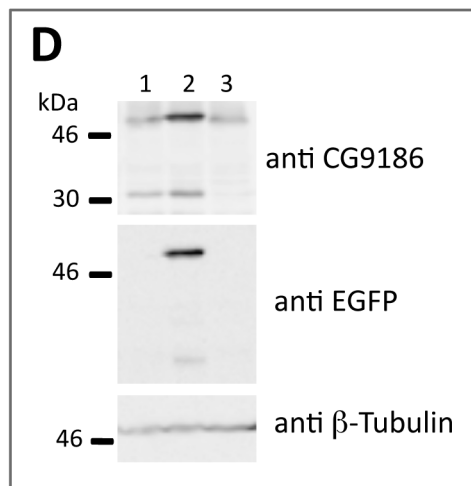
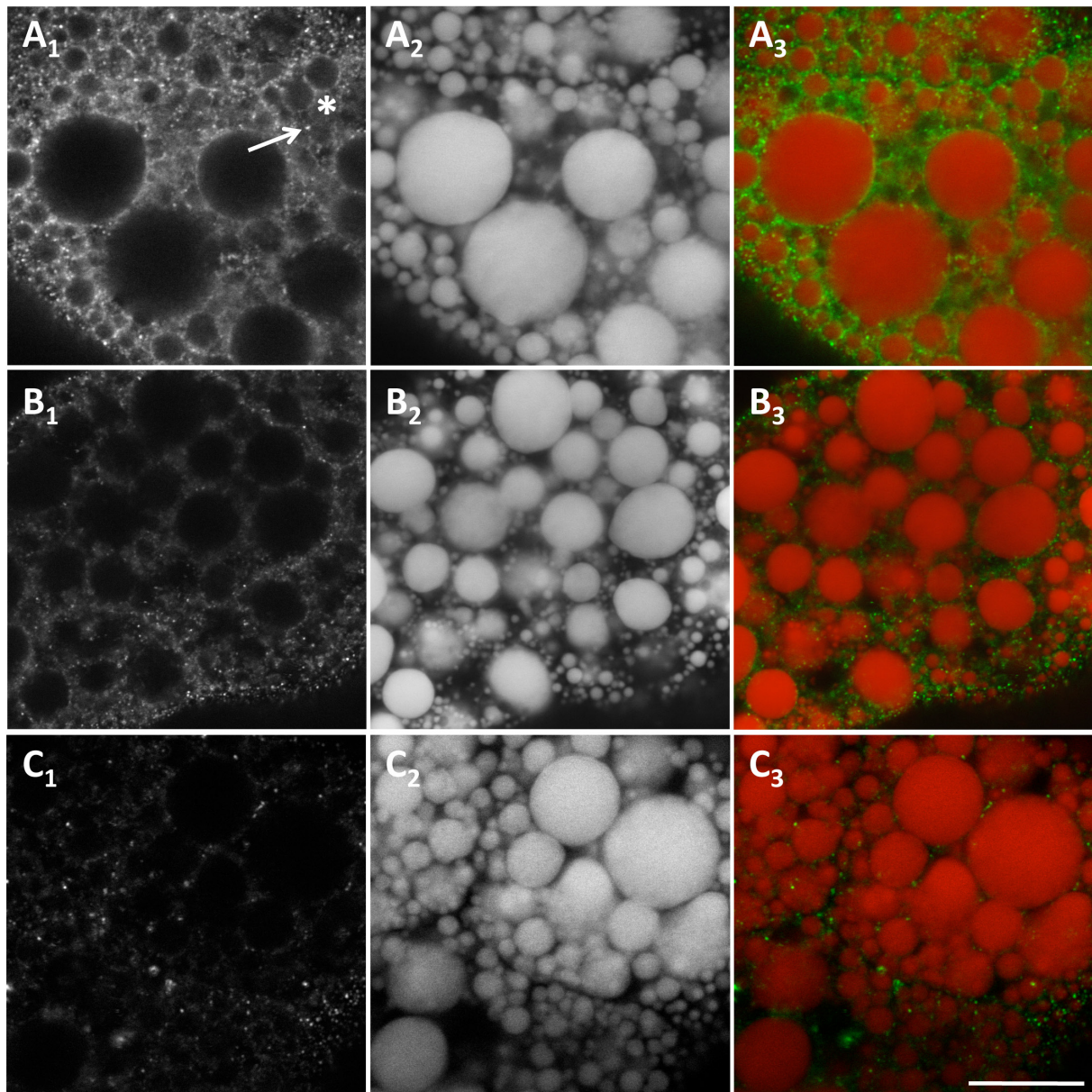


Abb. 3.20: Spezifität des CG9186 AKs in FK-Färbungen und in der Western Blot Analyse

Eine Färbung gegen CG9186 mit dem AK #2 (A₃, grün) wurde mit VDRC *w*⁻ L3 Larven durchgeführt und die LDs mit LipidTOX Deep Red (rot) gefärbt (siehe 2.2.1.3 (B)). A₁, B₁, C₁: Signal des fluoreszent-markierten Sekundär-AKs (anti rat Alexa488), A₂, B₂, C₂: LipidTOX Signal (LDs), A₃, B₃, C₃: Überlagerung beider Kanäle. B₁₋₃: Larven, in denen der RNAi-vermittelte *CG9186* knock-down durchgeführt wurde (FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie; gleicher genetischer Hintergrund wie die in A₁₋₃ verwendeten Larven). C₁₋₃: *w*¹¹¹⁸ Larven, Färbung mit dem CG9186 Prä-Immuneserum #2.

Bilder A-C wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBs Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 15µm.

D: Western Blot Analyse (siehe 2.2.3.9) von Extrakten

sieben Tage gealterter *Drosophila* Männchen. 1: VDRC *w*⁻ (verwendet als Wildtyp Kontrolle), 2: CG9186:EGFP (Insertionslinie #7), 3: CG9186 RNAi; Tub-Gal4 Aktivator Fliegenlinie. Es wurde der CG9186 AK #2 verwendet; β-Tubulin diente als Ladekontrolle.

Zusätzlich detektiert der CG9186 AK noch eine schwache Proteinbande bei etwa 48-49kDa (Abb. 3.20, D, #1 und #3), etwas unterhalb der Bande des EGFP-fusionierten CG9186, was durch post-translationale Modifikation des Proteins bedingt sein kann. Das detektierte AK Signal ist spezifisch, da RNAi-vermittelter *CG9186* knock-down eine Reduktion dieses Signals sowohl bei Gewebefärbungen (siehe Abb. 3.20, B) als auch in der Western Blot Analyse (Abb. 3.20, D) bedingt. Auch das im FK überexprimierte CG9186:EGFP wird mittels Western Blot klar detektiert und ist auch anhand von Färbungen in der Flügelimaginalscheibe detektierbar (siehe Anhang, Abb. 6.6). Aufgrund dieser Ergebnisse, die die Spezifität des CG9186 AKs #2 belegen, wurde dieser AK für alle weiteren Lokalisations- und Expressionsstudien der vorliegenden Arbeit verwendet.

Das endogene CG9186 Protein lokalisiert deutlich an den LDs in Kc167 Zellen, in der larvalen Speicheldrüse (Abb. 3.21, A und B) und dem FK (Abb. 3.20, A₁, Sternchen). In den Malpighischen Gefäßen von L3 Larven liegt das Protein hauptsächlich zytoplasmatisch vor, so dass eine LD Lokalisation nur schwer erkannt werden kann (Abb. 3.21, C). Zusätzlich lokalisiert CG9186 noch punktförmig sowohl in Zellkulturzellen (Abb. 3.21, A, Pfeil) als auch in allen untersuchten larvalen Geweben (Abb. 3.21, B, C und Abb. 3.20, A₁, Pfeile).

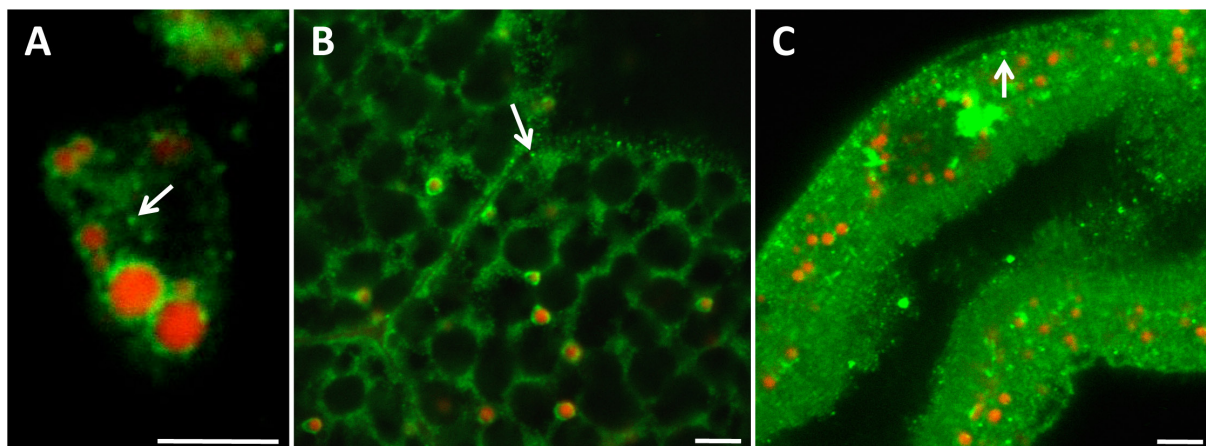


Abb. 3.21: Subzelluläre Lokalisation des endogenen CG9186 Proteins in *Drosophila* Kc167 Zellen und verschiedenen larvalen Geweben

Kc167 Zellen und L3 Larven wurden mit dem CG9186 AK #2 (grün) behandelt (siehe 2.2.1.3 (A und B)) und die LDs mit LipidTOX Deep Red (rot) gegengefärbt. Das endogene CG9186 Protein lokalisiert in Zellkulturzellen (A) und larvalen Speicheldrüsen an allen LDs (B). Zusätzlich findet man das Protein noch in punktförmigen Strukturen (Pfeile). In den Malpighischen Gefäßen von L3 Larven (C) liegt CG9186 hauptsächlich zytoplasmatisch vor. Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht jeweils 5µm.

Eine neuere Studie berichtet hingegen von der Abwesenheit von LDs in der Speicheldrüse (Tian et al. 2011). Dieser Befund widerspricht den hier

beschriebenen Ergebnissen. Die von CG9186 dekorierten Strukturen konnten mittels Gegenfärbung durch den Lipid-Farbstoff LipidTOX Deep Red eindeutig als LDs identifiziert werden (Abb. 3.21, B und Abb. 3.22, C). Neben LipidTOX färben auch die Lipid-Farbstoffe BODIPY 493/503 (Abb. 3.22, A) und Nile red (Abb. 3.22, B) LDs wie auch Membranen in der Speicheldrüse an. Diese Ergebnisse belegen, dass Speicheldrüsen-Zellen der Fliege LDs aufweisen, die jedoch bezüglich der Anzahl und Größe von typischem Fettspeichergewebe reduziert sind. Zusätzlich zu CG9186 konnte auch die Lokalisation weiterer LD-assoziiierter Proteine, wie z.B. PLIN1, mit LDs in der Speicheldrüse gezeigt werden (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht).

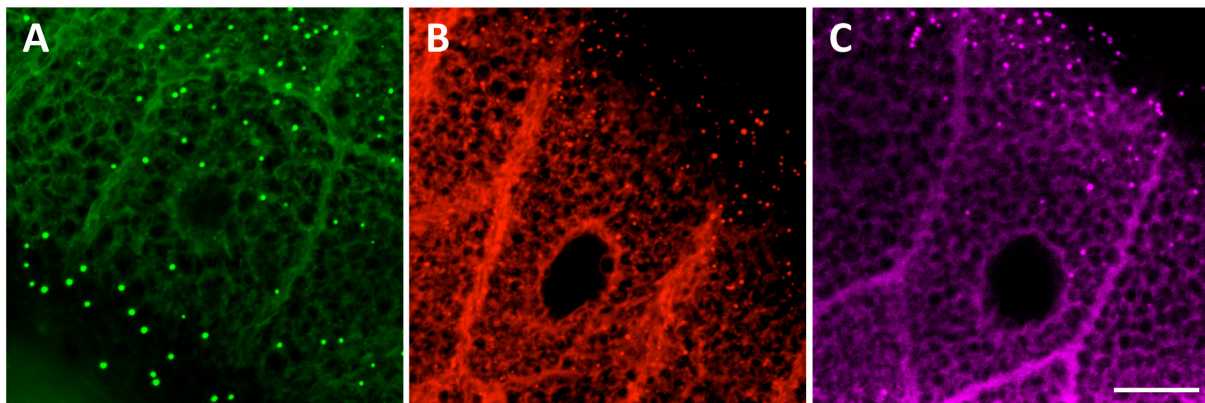


Abb. 3.22: LD Färbungen in Speicheldrüsen mit verschiedenen Farbstoffen

Um herauszufinden, ob es sich bei den von CG9186 dekorierten Strukturen der Speicheldrüse (siehe Abb. 3.21, B) um LDs handelt, wurden weitere Lipid-Farbstoffe in diesem Gewebe getestet. Speicheldrüsen von späten VDRC *w*¹¹¹⁸ L3 Larven wurden fixiert und mit verschiedenen LD Fluoreszenzfarbstoffen (A: BODIPY 493/503 (grün), B: Nile red (rot), C: LipidTOX Deep Red (pink)) behandelt (siehe 2.2.1.2 (B)). Die Farbstoffe färben alle sowohl die zahlreich vorhandenen LDs als auch die Membranen an. Z-Stapel Bilder (maximale Projektionen) wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht jeweils 20µm.

Anhand einer Fraktionierung (siehe 2.2.3.4) mit anschließender Western Blot Analyse (siehe 2.2.3.9) von larvalen *w*¹¹¹⁸ FK-Extrakten wurde die LD Lokalisation des endogenen CG9186 und die Verteilung des Proteins innerhalb der anderen subzellulären Kompartimente untersucht (siehe Abb. 3.23). Wie aufgrund der Immunfluoreszenz-Daten erwartet, ist CG9186 in den beiden LD Fraktionen („LDs“) und dem mikrosomalen Membranpellet („MP“) angereichert. Dies kann ebenfalls für die beiden LD Proteine PLIN1 und PLIN2 beobachtet werden, jedoch ist der Membran-assoziierte Proteinanteil sehr viel geringer als bei CG9186. Ein geringer Anteil der drei Proteine lässt sich auch in den zytoplasmatischen Fraktionen detektieren.

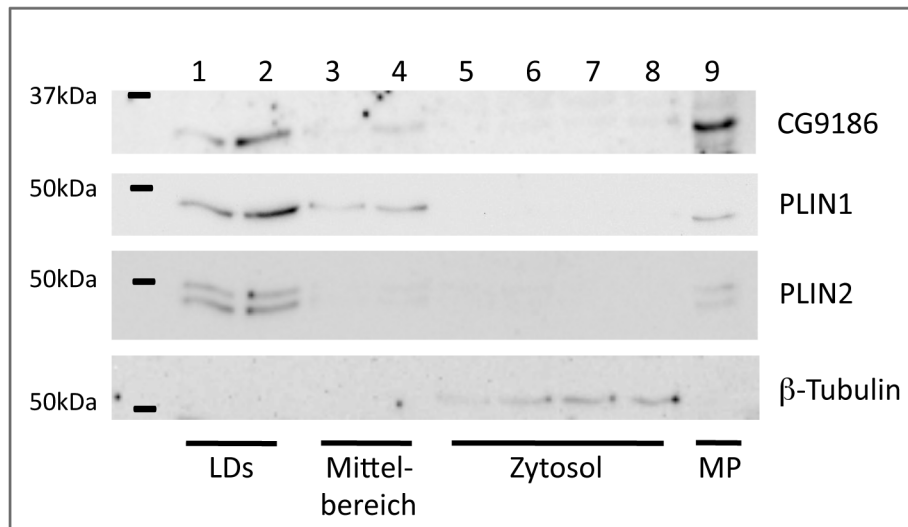


Abb. 3.23: CG9186 ist ein LD-assoziiertes Protein

Etwa 50 FK von *w¹¹¹⁸* L3 Larven wurden homogenisiert und die subzellulären Kompartimente mittels einer Fraktionierung durch Sukrose-Gradienten Ultrazentrifugation (siehe 2.2.3.4) separiert. Von allen Fraktionen wurden jeweils gleiche Proteinmengen auf ein Gel geladen (siehe 2.2.3.8). Die Membranen wurden schließlich in der Western Blot Analyse (siehe 2.2.3.9) mit AKn gegen CG9186, PLIN1, PLIN2 und β -Tubulin behandelt. CG9186 ist sowohl in der LD Fraktion („LDs“) als auch in der Membranfraktion (MP: mikrosomales Membranpellet) angereichert und liegt schwach in den Fraktionen zwischen LDs und Zytosol („Mittelbereich“) und kaum in den zytosolischen Fraktionen („Zytosol“) vor. Ähnliche Signale findet man für die beiden LD Proteine PLIN1 und PLIN2, jedoch ist der Anteil im MP in Relation zu der LD Fraktion sehr viel geringer als bei CG9186. β -Tubulin ist ausschließlich im Zytosol vorzufinden. Die Abb. zeigt ein Ergebnis, das mit einem unabhängigen Wiederholungsexperiment reproduziert wurde.

3.3.2 CG9186 transloziert nach Zugabe von OA auf die LDs

In allen bisherigen Studien in dieser Arbeit konnte für CG9186 eine duale Lokalisation gezeigt werden - an den LDs und am ER (siehe z.B. Abb. 3.17 und 3.18). Um zu verfolgen, wie sich die Verteilung des Proteins innerhalb der subzellulären Kompartimente in An- und Abwesenheit von LDs verändert, wurde eine Fraktionierung zur Separierung dieser Kompartimente mit anschließender Western Blot Analyse durchgeführt (siehe Abb. 3.24, A). Hierfür wurden Kc167 Zellen mit und ohne OA in Anwesenheit von Cycloheximid inkubiert, um die Proteinsynthese zu hemmen (Obrig et al. 1971) und somit die mögliche Translokation von bereits in den Zellen vorhandenem Protein zu verfolgen.

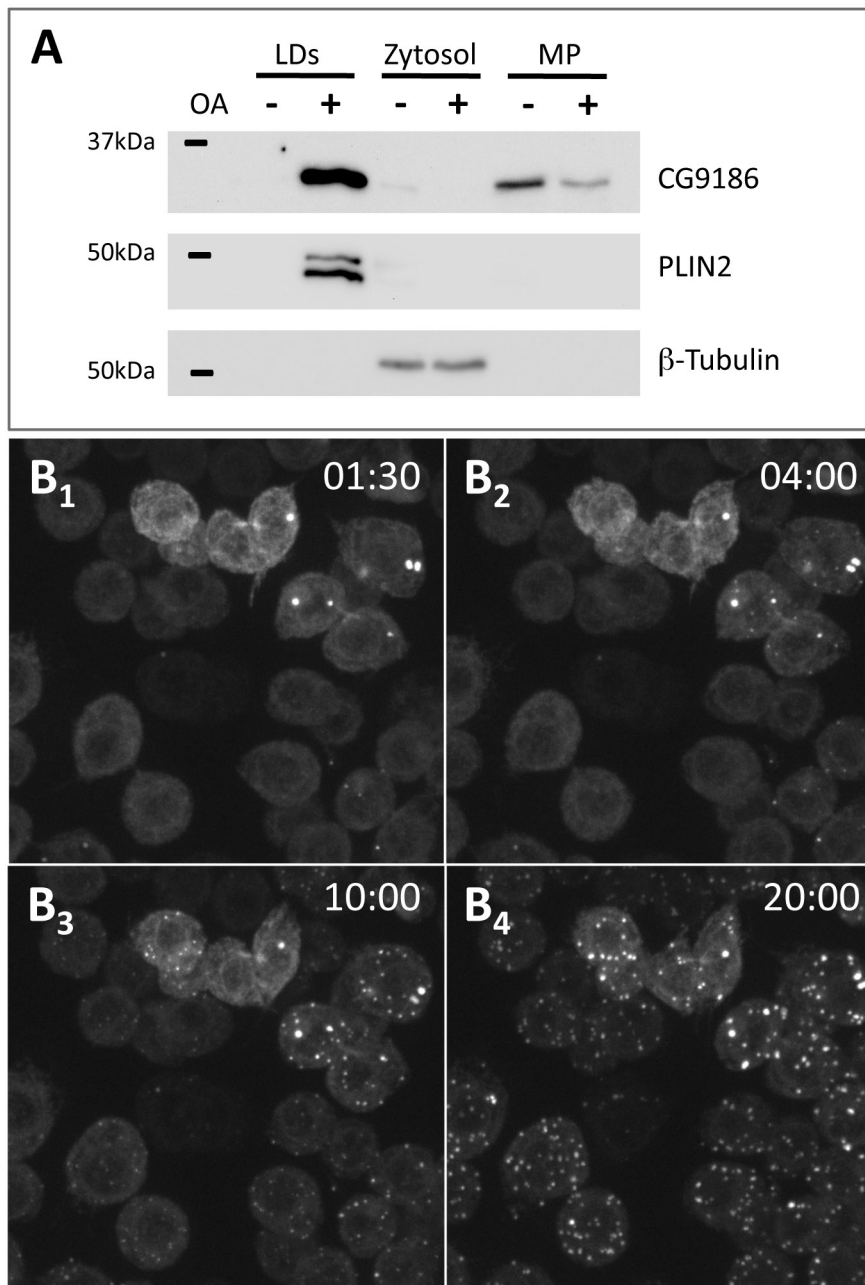


Abb. 3.24: Translokation des CG9186 Proteins auf die LDs

A: Konfluente Kc167 Zellen wurden entweder unter Standard-Wachstumsbedingungen (-OA) oder mit 400 μ M OA (+OA) für 15h mit Medium inkubiert, welches 5 μ g/mL Cycloheximid enthielt, um die Proteinsynthese zu unterbinden (Obrig et al. 1971). Die subzellulären Kompartimente der Zellextrakte wurden anhand einer Fraktionierung (siehe 2.2.3.4) separiert. Von den Fraktionen wurden jeweils gleiche Volumina (20 μ L der LD Fraktion) bzw. gleiche Proteinmengen (10 μ g von zytosolischen und Membranproteinen (MP: mikrosomales Membranpellet)) auf ein Gel geladen. Die Membranen wurden schließlich in der Western Blot Analyse (siehe 2.2.3.9) mit AKn gegen CG9186, PLIN2 und β -Tubulin behandelt. Die Abb. zeigt ein Ergebnis, das mit einem unabhängigen Wiederholungsexperiment reproduziert wurde.

B₁₋₄: Standbilder eines Zeitraffer-Videos von lebenden Kc167 Zellen zeigen, dass CG9186 sehr schnell eine punktförmige Lokalisation aufweist, welche wahrscheinlich neu-gebildete LDs darstellt (ohne Gegenfärbung). Die Zellen wurden mit pUbi-CG9186:EGFP stabil transfiziert (EGFP Signal in weiß dargestellt) und vor den Aufnahmen über Nacht in Serum-freiem Medium inkubiert. Nach Zugabe von 400 μ M OA (Zeitpunkt 00:00) wurden alle 10sek über 24min hinweg Z-Stapel Bilder mit dem PerkinElmer UltraVIEW VoX Spinning Disk Konfokalmikroskop aufgenommen. Zellen 1min 30sek (B₁), 4min (B₂), 10min (B₃) und 20min (B₄) nach Zugabe von OA werden hier dargestellt.

Ohne Zugabe von OA („- OA“) ist das endogene CG9186 Protein im mikrosomalen Membranpellet („MP“) angereichert, ein vergleichsweise geringer Anteil lässt sich zugleich auch im Zytosol der Zellen detektieren. In Anwesenheit von vielen LDs („+ OA“) ist CG9186 sehr stark in der LD Fraktion („LDs“) angereichert, wobei gleichzeitig die Proteinmenge im Zytosol und in der Membranfraktion abnimmt. Dieser Befund ist mit der Annahme vereinbar, dass LD-assoziiertes Protein aus dem mit dem ursprünglich ER assoziierten Pool stammt.

Um die Translokation auf die LDs auch zeitlich aufgelöst verfolgen zu können, wurde „Spinning Disc Live Imaging“ Mikroskopie angewendet. Abb. 3.24, B₁₋₄ zeigt Standbilder eines Live Imaging Videos von einer polyklonalen Kc167 Linie, die stabil mit CG9186:EGFP transfiziert wurde. Die Aufnahmen zeigen, dass CG9186 nach Zugabe der OA bereits nach 4min (Abb. 3.24, B₂) in sehr kleinen, punktförmigen Strukturen erscheint, welche höchstwahrscheinlich neu-entstehende LDs repräsentieren. Gleichzeitig nimmt die Intensität des in dem retikulären Muster vorliegenden EGFP-Signals mit der Zeit ab.

Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass zumindest ein Teil des Proteins direkt vom ER auf die LDs transloziert, da CG9186 unmittelbar nach Zugabe der OA mit den LDs assoziiert ist.

3.3.3 Identifizierung der notwendigen Sequenz für die LD Lokalisation von CG9186

Um strukturell und funktional mehr über CG9186 herauszufinden, wurden unterschiedliche Deletionskonstrukte generiert (siehe 2.2.2.8 und Abb. 3.25, A) und in Kc167 Zellen in An- und Abwesenheit von OA exprimiert (Abb. 3.25, B-H). Deletion der N-terminalen Hälfte (delta1-140) oder des C-terminalen Drittels (delta201-307) des Proteins hat keinen Einfluss auf die LD Lokalisation (Abb. 3.25, B', D'). Wird jedoch die komplette C-terminale Hälfte von CG9186 deletiert (delta141-307), so ist die Proteinvariante nicht mehr an der LD Oberfläche vorzufinden und lokalisiert zytoplasmatisch (Abb. 3.25, C, C'). Dies ließ vermuten, dass sich die LD Signalsequenz innerhalb der AS 141-200 befindet, was in der Tat mit dem Konstrukt CG9186[aa141-200]:EGFP gezeigt werden konnte (Abb. 3.25, E'). Die 60 AS, die die zweite abgeleitete

Transmembrandomäne einschließen, sind notwendig und ausreichend, um EGFP an die LD Oberfläche zu bringen.

In An- und Abwesenheit von OA zeigen die Proteinvarianten CG9186[delta 1-140]:EGFP und CG9186[aa141-200]:EGFP zusätzlich zu dem retikulären Lokalisationsmuster und der Assoziation mit LDs einige punktförmige Strukturen (Abb. 3.25, B, B', E, E'). Gegenfärbung mit dem cis-Golgi Markerprotein GM130 zeigt Kolo-kalisation mit den beiden Proteinvarianten (Abb. 3.25, G, G', H, H'), was für das Voll-längenprotein nicht der Fall ist (Abb. 3.25, F, F').

Nachdem herausgefunden wurde, welcher Teil des Proteins notwendig für die LD Lokalisation ist, stellte sich die Frage, ob CG9186 auch eine Rolle bei der Lipidspeicherungsregulation in Zellen spielt. Hierfür wurden ebenfalls die Deletionskonstrukte verwendet und nach Überexpression dieser wurden die Zellen auf Unterschiede bezüglich der LD Größe und Verteilung genauer untersucht (siehe 3.3.4).

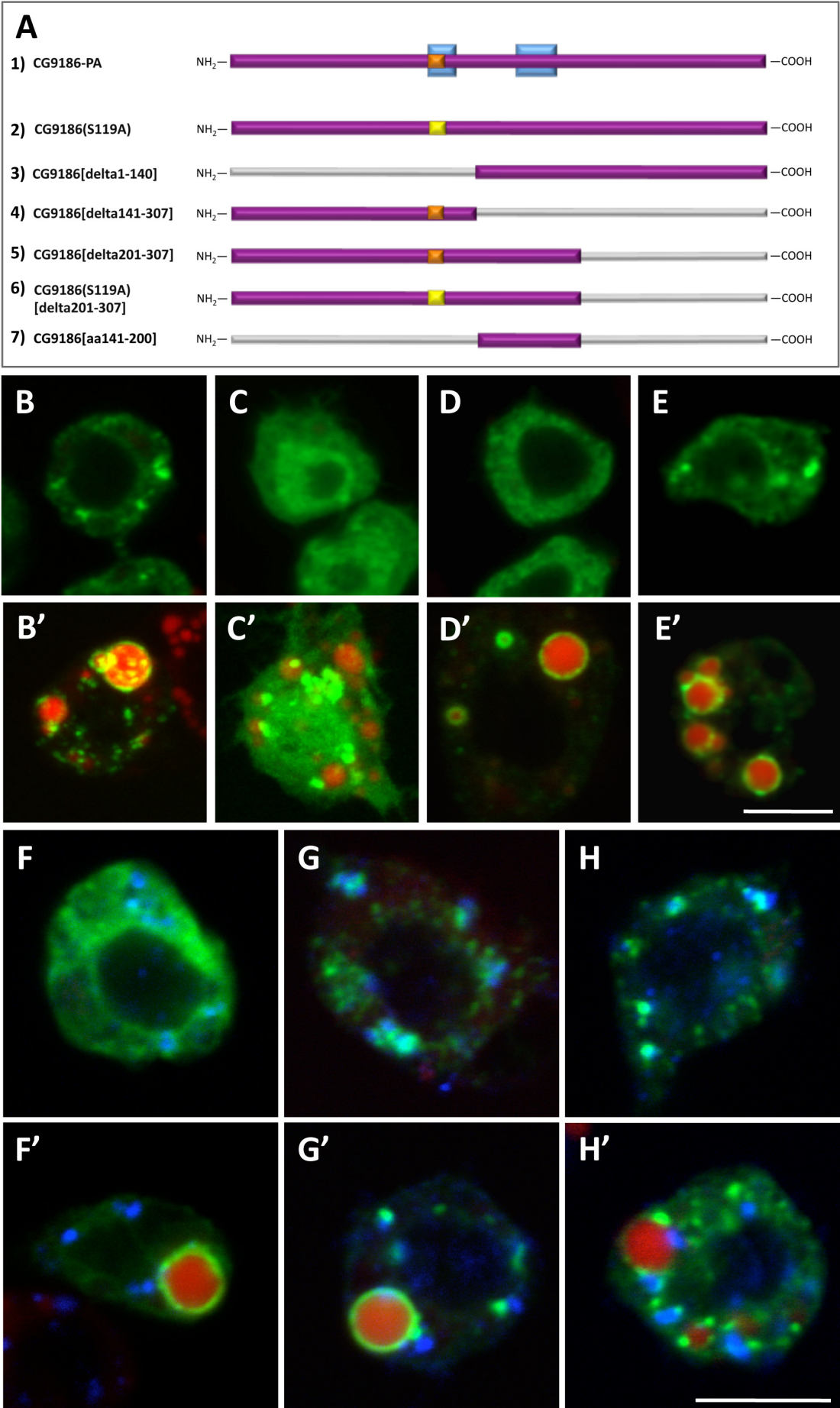


Abb. 3.25: Struktur-Funktionsanalyse von CG9186

Abb. 3.25: Struktur-Funktionsanalyse von CG9186

A: CG9186 (Protein Isoform A (PA)) verfügt über insgesamt 307 AS (lila) und besitzt zwei abgeleitete Transmembrandomänen (blaue Kästen; AS 113-129 und 163-186) sowie eine annotierte Lipasedomäne (oranger Kasten; AS 113-122), wovon das Serin in den Konstrukten 2) und 6) durch ein Alanin ersetzt wurde (gelb). Kc167 Zellen wurden transient mit pAkt-Gal4 + dem WT CG9186 Volllängenprotein (F, F') bzw. den angefertigten Deletionskonstrukten (alles pTGW Expressionsvektoren) CG9186[delta1-140] (B, B', G, G'), CG9186[delta141-307] (C, C'), CG9186[delta201-307] (D, D') und CG9186[aa141-200] (E, E', H, H') transfiziert und entweder mit 400µM OA (B'-E', F'-H') oder ohne (B-E, F-H) inkubiert. Die EGFP-Fusionsproteine sind in grün dargestellt, LDs (angefärbt mit LipidTOX Deep Red) in rot, cis-Golgi in blau (AK-Färbung gegen GM130). Während die CG9186[delta141-307] Proteinvariante nicht mehr an den LDs lokalisieren kann und nur ein zytoplasmatisches Muster aufweist (C, C'), genügen AS 141-200, um EGFP an die LD Oberfläche zu bringen (E'). Proteinvarianten, bei denen AS 1-140 deletiert wurden, zeigen teilweise Kolo-kalisation mit dem cis-Golgi (G, G', H, H'). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht jeweils 5µm.

3.3.4 CG9186 ist an der Regulation der LD-Größe und LD-Verteilung beteiligt

Bei der CG9186 Struktur-Funktionsanalyse (siehe 3.3.3) zeigten CG9186[delta1-140]:EGFP überexprimierende Zellen in Anwesenheit von OA oftmals große LDs (Abb. 3.25, B' und K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht). Dies ließ die Vermutung zu, dass die N-terminale Proteinhälfte eine Funktion bei der LD Größenregulation besitzt, da sich in diesem Bereich auch das katalytisch-aktive Serin befindet.

Um diese Hypothese zu testen, wurde das Serin im abgeleiteten katalytisch-aktiven Zentrum der Lipasedomäne durch ein Alanin (S119A) ersetzt (siehe Abb. 3.25, A, #2) und die so veränderte Proteinvariante ebenfalls in Kc167 Zellen in Anwesenheit von OA exprimiert (Abb. 3.26, B). Im Vergleich zu der Expression des WT Proteins hat die Überexpression der CG9186(S119A):EGFP Mutante neben dem Auftreten der LD Cluster auch die Bildung von GLDs zur Folge (Abb. 3.26, B).

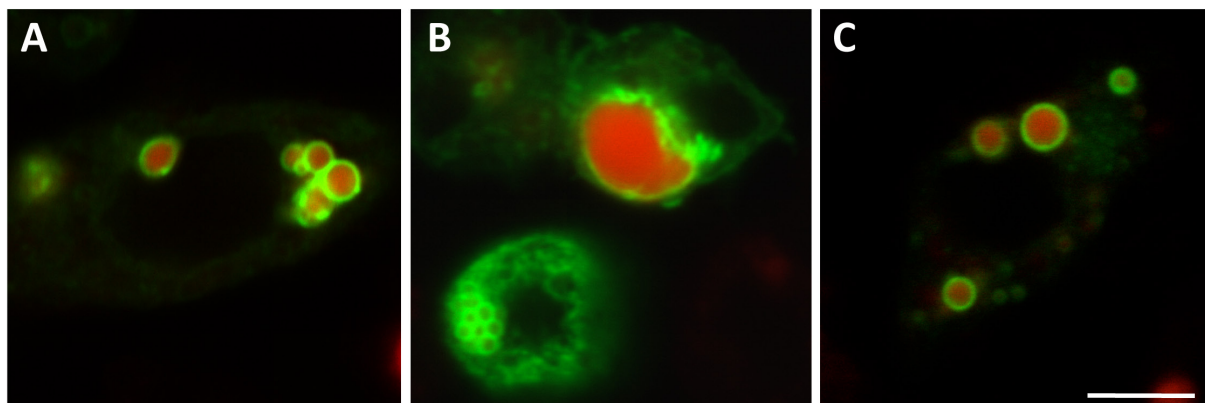


Abb. 3.26: Überexpression von CG9186(S119A):EGFP in Kc167 Zellen resultiert in der Ausbildung der GLDs

Abb. 3.26: Überexpression von CG9186(S119A):EGFP in Kc167 Zellen resultiert in der Ausbildung der GLDs

Kc167 Zellen wurden transient mit pAkt-Gal4 + pTGW-CG9186 (A) / pTGW-CG9186(S119A) (B) oder pTGW-CG9186(S119A)[delta201-307] (C) transfiziert und gleichzeitig für vier Tage mit 400µM OA inkubiert (siehe auch Abb. 3.25, A). Nach Fixierung der Zellen wurden die LDs mit LipidTOX Deep Red angefärbt (rot), überexprimierte Proteinvarianten sind in grün dargestellt. Zellen, die CG9186(S119A):EGFP überexprimieren, zeigen stark gebündelte, kleinere LDs und GLDs (B). Kombination des AS-Austauschs S119A und der Deletion von AS 201-307 verhindert das Auftreten dieses LD Phänotyps (C). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 5µm.

Ein einzelner AS-Austausch ist demnach ausreichend, um den Lipid-Phänotyp zu verursachen. Das Serin an Position 119 scheint also eine wichtige Funktion bei der LD Größenregulation zu besitzen. Darauf stellte sich die Frage, welche weiteren Teile des Proteins, neben dem mutierten Serin, bei der Ausbildung der GLDs essentiell sind. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde zusätzlich eine Proteinvariante generiert, bei der neben der Punktmutation S119A das C-terminale letzte Drittel des Proteins deletiert ist (CG9186(S119A)[delta201-307]; siehe Abb. 3.25, A, #6). Diese Variante enthält noch die identifizierte LD Lokalisationssequenz (siehe 3.3.3), so dass die mögliche Funktion an der LD Oberfläche nicht beeinflusst werden sollte. Die Expression dieser Variante verhindert im Gegensatz zu CG9186(S119A) die Ausbildung der GLDs und vermindert sehr stark das Auftreten von LD Clustern, so dass fast keine mehr vorhanden sind (Abb. 3.26, C). Dies bedeutet, dass das C-terminale Drittel von CG9186 für die Ausprägung des GLD Phänotyps essentiell ist (siehe auch 4.3).

3.3.5 Zeitliche Abfolge der Entstehung von LD Clustern und GLDs nach Überexpression der CG9186 Varianten

Es stellte sich die Frage, wie GLDs entstehen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde die zeitliche Dynamik des LD Phänotyps näher untersucht. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden transient transfizierte und mit OA gefütterte Kc167 Zellen auf die Stärke der durch Überexpression von CG9186:EGFP (Abb. 3.27, A-A'') bzw. CG9186(S119A):EGFP (Abb. 3.27, B-B'') hervorgerufenen Phänotypen untersucht. Diese Experimente haben gezeigt, dass die stärksten LD Phänotypen (Cluster und GLDs) etwa 40h nach der Transfektion auftreten (Abb. 3.27, A', B'). Es konnte zudem beobachtet werden, dass die LDs in untransfizierten Zellen fast ausschließlich über die Zelle verstreut vorliegen. Hingegen zeigen CG9186:EGFP überexprimierende Zellen zahlreiche LD Cluster

und CG9186(S119A):EGFP überexprimierende zusätzlich zu diesen auch sehr viele GLDs.

Um die Verteilung der LD Phänotypen in den unterschiedlichen Konditionen zu untersuchen, wurde das Auftreten dieser 40h nach der Transfektion quantifiziert (siehe Abb. 3.27, C-F; normal verteilte LDs („verstreut“) (C), LD Cluster („gebündelt“) (D) oder GLDs („riesig“) (E)). Wie bereits beobachtet resultiert sowohl die Überexpression von CG9186:EGFP als auch von CG9186(S119A):EGFP in der Ausbildung stark gebündelter LDs in etwa 55% der Zellen (Abb. 3.27, F). In untransfizierten Zellen ist der Anteil an LD Clustern dagegen mit etwa 3% kaum präsent, 97% der Zellen zeigen normal verteilte LDs. Nur die Überexpression von CG9186(S119A):EGFP ruft eine stark vermehrte Bildung der GLDs hervor (etwa 22%), während in dieser Kondition zugleich auch der geringste Anteil an Zellen mit normal verteilten LDs (etwa 18%) vorliegt.

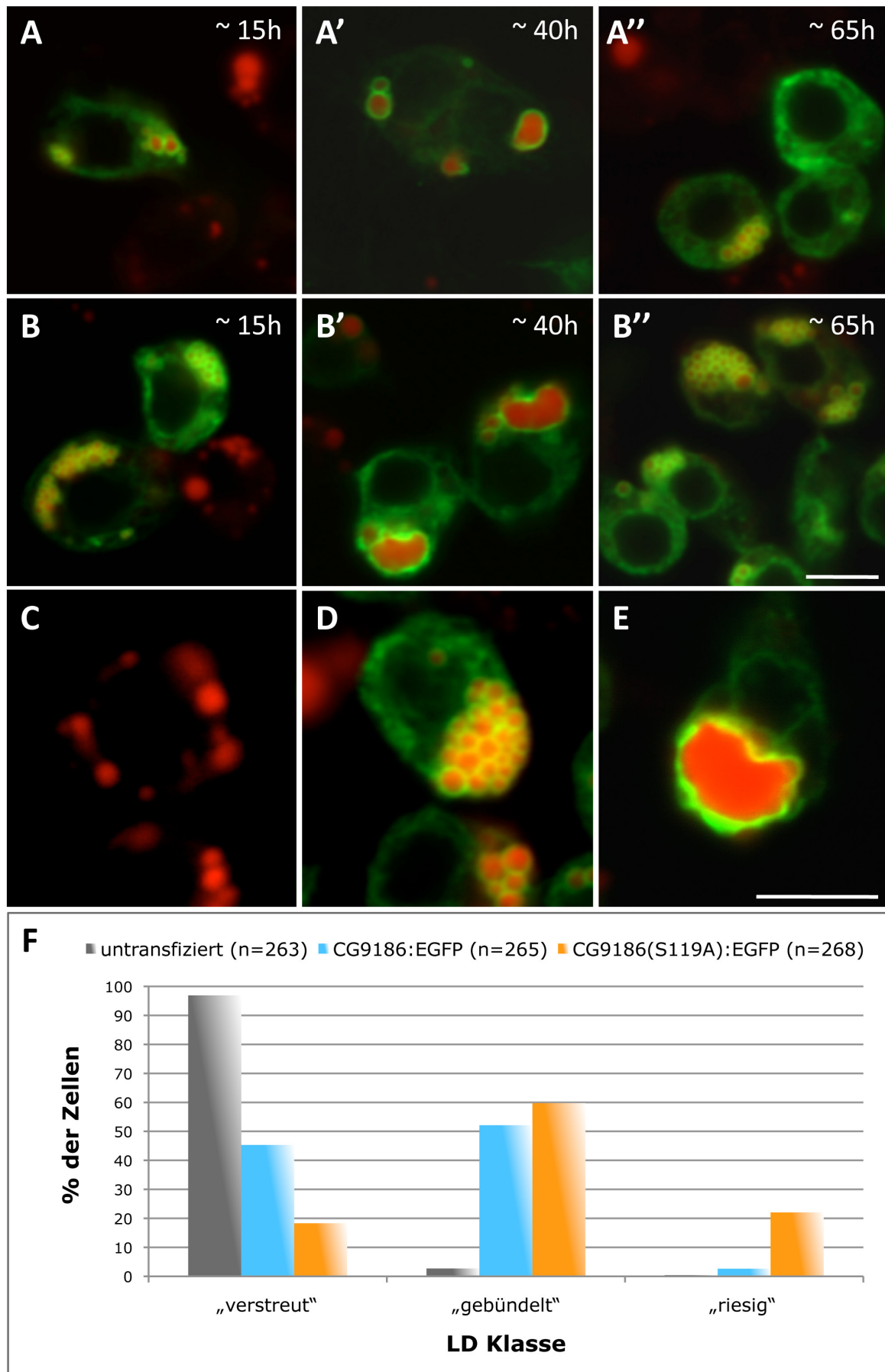


Abb. 3.27: Zeitlich aufgelöste Untersuchung der Expression von CG9186:EGFP / CG9186(S119A):EGFP in Kc167 Zellen

Abb. 3.27: Zeitlich aufgelöste Untersuchung der Expression von CG9186:EGFP / CG9186(S119A):EGFP in Kc167 Zellen

Kc167 Zellen wurden transient mit pUbi-CG9186:EGFP (A-A'') oder pUbi-CG9186(S119A):EGFP (B-B'') transfiziert (grün dargestellt) und gleichzeitig mit 400µM OA inkubiert. Nach etwa 15h (A, B), 40h (A', B') und 65h (A'', B'') wurden die Zellen fixiert und die LDs mit LipidTOX (rot) angefärbt. Etwa 15h nach Transfektion und Inkubation mit OA (A, B) liegen bereits viele kleine, stark gebündelte LDs in Zellen vor, die die Protein-Varianten überexprimieren. Der GLD Phänotyp tritt etwa 40h nach der Transfektion in CG9186(S119A):EGFP überexprimierenden Zellen auf (B'). Nach etwa 65h (A'', B'') liegen überwiegend wieder Cluster kleinerer LDs in überexprimierenden Zellen vor, oft sind auch keine LDs mehr vorhanden.

C-F: Quantifizierung des Auftretens von LD Clustern und GLDs in Kc167 Zellen, die transient mit pUbi-CG9186:EGFP oder pUbi-CG9186(S119A):EGFP transfiziert und gleichzeitig mit 400µM OA inkubiert wurden (siehe oben). 40h nach der Transfektion wurden die LDs anhand ihrer unterschiedlichen Morphologie und Verteilung innerhalb der Zelle in drei verschiedene Klassen eingeteilt: LDs, die verstreut innerhalb einer Zelle vorliegen (C; untransfizierte Zelle; „verstreut“), LD Cluster (D; hier CG9186:EGFP überexprimierende Zelle; „gebündelt“) und GLDs (E; hier CG9186(S119A):EGFP überexprimierende Zelle; „riesig“). Im Durchschnitt wurden jeweils 265 untransfizierte (grau), CG9186:EGFP (blau) und CG9186(S119A):EGFP (orange) überexprimierende Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil der Zellen mit der jeweiligen LD Klasse berechnet (F). Während stark gebündelte LDs bei CG9186:EGFP bzw. CG9186(S119A):EGFP überexprimierenden Zellen etwa gleich häufig auftreten (52-60%), zeigen hauptsächlich CG9186(S119A):EGFP überexprimierende Zellen den GLD Phänotyp (22%). Bilder A-E wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBs Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht jeweils 5µm. F zeigt ein Ergebnis, das mit zwei unabhängigen Wiederholungsexperimenten reproduziert wurde. Insgesamt wurden in den drei Experimenten etwa 660 Zellen pro Kondition, d.h. jeweils in untransfizierten, CG9186:EGFP oder CG9186(S119A):EGFP exprimierenden Zellen, ausgezählt.

3.3.6 Überexpression der CG9186 Varianten im Organismus

Um eine mögliche Funktion von CG9186 bzw. CG9186(S119A) bei der Regulation der LD Größe, LD Verteilung und Lipidspeicherung im Organismus zu analysieren, wurden die EGFP-fusionierten Proteinvarianten im Fettgewebe anhand des Gal4/UAS-Systems (Brand & Perrimon 1993) überexprimiert. Beide Proteinvarianten lokalisieren an allen LDs (Abb. 3.28).

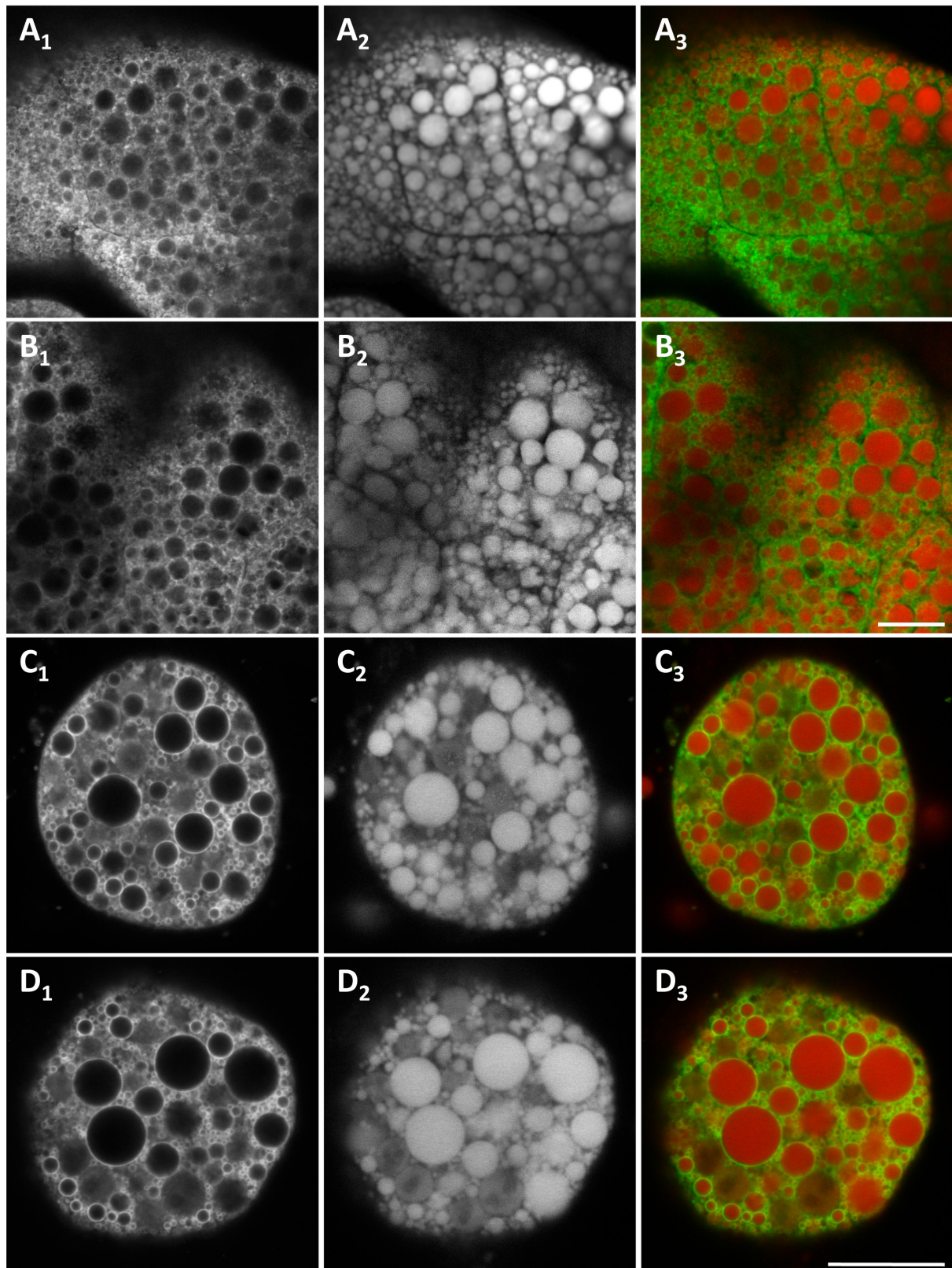


Abb. 3.28: Überexpression von CG9186:EGFP / CG9186(S119A):EGFP in den larvalen FKn und Adipozyten adulter *Drosophila*

FK von späten L3 Larven bzw. Adipozyten männlicher, frisch-geschlüpfter *Drosophila*, die CG9186:EGFP (A, Insertionslinie #11; C, Linie #7) bzw. CG9186(S119A):EGFP (B, Linie #4; D, Linie #3) überexprimieren (FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie). Die FK wurden in kaltem PBS präpariert, die LDs der FK und Adipozyten mit LipidTOX Deep Red angefärbt (siehe 2.2.1.2 (B und C)). 1: EGFP Signal, 2: LipidTOX Signal (LDs), 3: Überlagerung beider Kanäle (grün: EGFP Fusionsprotein, rot: LDs). Beide CG9186 Proteinvarianten lokalisieren an allen LDs des FKs (A, B) und der Adipozyten (C, D). Die Überexpression der Varianten bewirkt keine erkennbare, veränderte

Morphologie oder Anzahl der LDs im Fettgewebe. Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht jeweils 20µm.

Sowohl in den FKn von L3 Larven als auch in Adipozyten frisch-geschlüpfter *Drosophila* ließen sich mit mehreren getesteten Gal4-Aktivator Fliegenlinien keine offensichtlichen morphologischen LD Phänotypen feststellen (siehe auch Tab. 3.3). Auch die Quantifizierungen des Gesamtlipidgehalts adulter Fliegen zeigten keinen Unterschied zwischen CG9186:EGFP bzw. CG9186(S119A):EGFP exprimierenden und nicht-exprimierenden *Drosophila* (FK-spezifisch und ubiquitär; K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht).

Werden die Fusionsproteine hingegen in der larvalen Speicheldrüse überexprimiert (Abb. 3.29), so entstehen Clusterbildungen der LDs, die nach Überexpression der S119A Mutante noch stärker sind (Abb. 3.29, B).

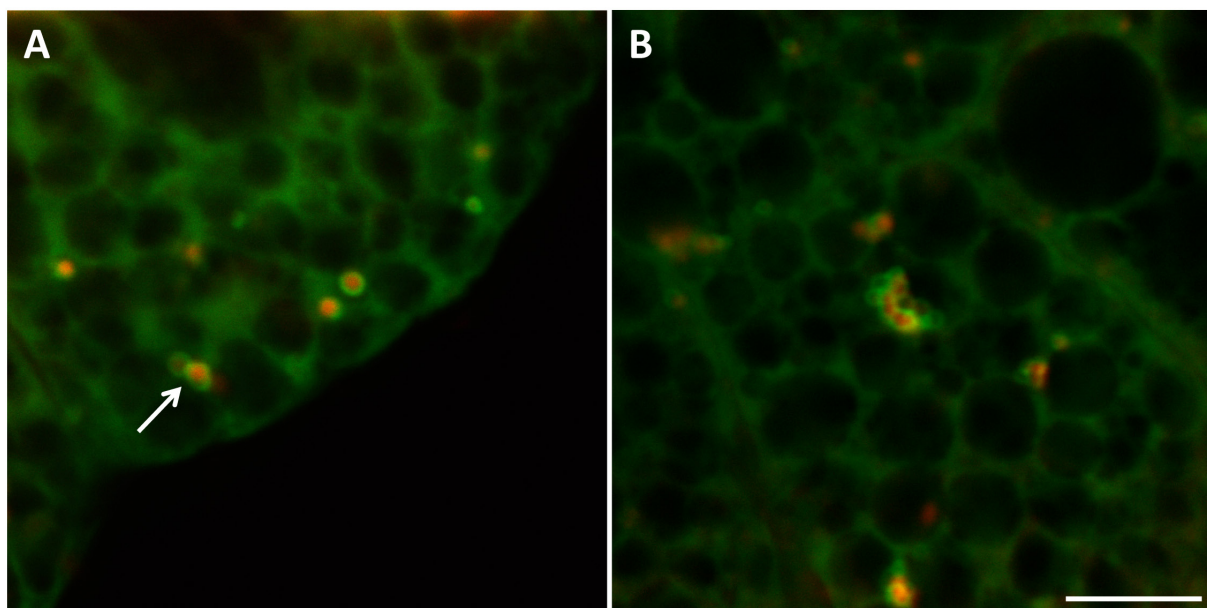


Abb. 3.29: Überexpression von CG9186:EGFP / CG9186(S119A):EGFP in der larvalen Speicheldrüse

Die Speicheldrüsen später L3 Larven, die CG9186:EGFP (A, grün; Insertionslinie #11) bzw. CG9186(S119A):EGFP (B, grün; Linie #4) überexprimieren (FK-Gal4 Aktivator Fliegenlinie) wurden fixiert und die LDs mit LipidTOX (rot) gefärbt (siehe 2.2.1.2 (B)). Überexpression von CG9186:EGFP bewirkt eine schwache Clusterbildung der LDs (A, Pfeil), während die Überexpression der Mutante CG9186(S119A):EGFP diesen Phänotyp verstärkt (B). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 10µm.

Dadurch, dass im Fettgewebe von Larven und adulten Fliegen kein LD Phänotyp beobachtet werden konnte (Abb. 3.28), wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine bestimmte zeitliche Abfolge zwischen LD Bildung und Überexpression der Proteine notwendig ist, um einen Phänotyp (Clusterbildung oder GLDs) hervorzurufen. Dies basiert auf Beobachtungen aus Zellkulturstudien, wobei der

stärkste LD Phänotyp hauptsächlich nur zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Überexpression der Varianten und LD Bildung aufgetreten ist (Abb. 3.27, A', B'). Die Überexpression der CG9186 Proteinvarianten wurde im FK (Abb. 3.30) und in der Speicheldrüse (Abb. 3.31) untersucht, nachdem die Proteine unter Kontrolle eines ubiquitär aktiven Hitzeschock-Promotors (von *Hsp70*; Tissieres et al. 1974) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung aktiviert wurde.

Je häufiger ein Hitzeschock in der larvalen Entwicklung bzw. je näher dieser zeitlich gesehen vor Fixierung der Larven durchgeführt wird, desto stärker wird die Expression der entsprechenden Proteine induziert und desto stärker erscheint demnach auch die detektierte Fluoreszenz bei den mikroskopischen Analysen.

Im larvalen FK zeigt die zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführte Überexpression von CG9186:EGFP (Abb. 3.30, B-B'') bzw. CG9186(S119A):EGFP (Abb. 3.30, C-C'') im Vergleich zur EGFP-Kontrolle (Abb. 3.30, A-A'') jedoch weiterhin keinen Phänotyp in Bezug auf LD Größe oder Anzahl.

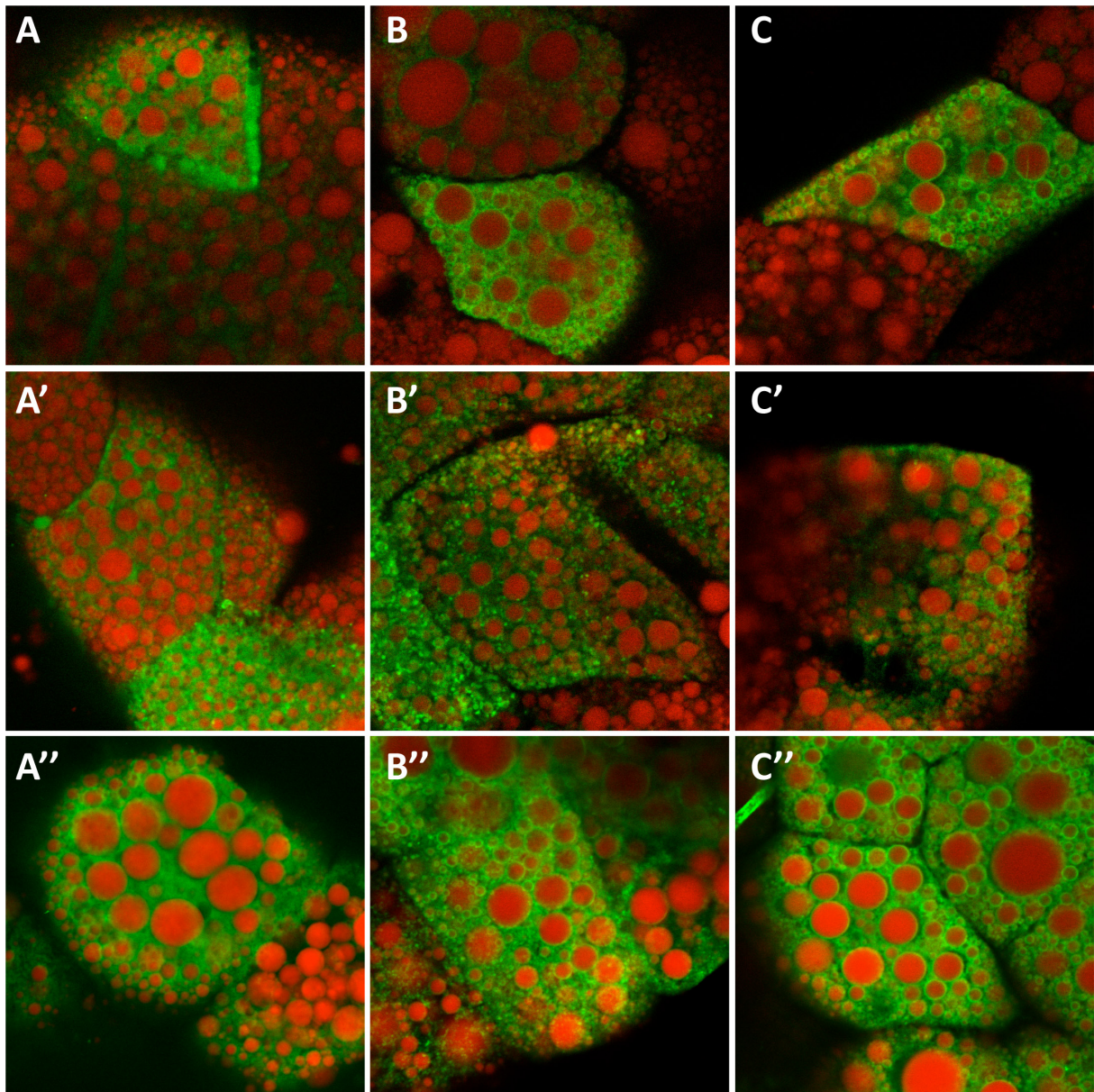


Abb. 3.30: In unterschiedlichen Entwicklungsstadien induzierte, ubiquitäre Überexpression von CG9186:EGFP / CG9186(S119A):EGFP im larvalen FK

Nachkommen von Kreuzungen, die eine zeitabhängige Expression von EGFP (A-A''), CG9186:EGFP (B-B'', Insertionslinie #5) und CG9186(S119A):EGFP (C-C'', Linie #4) unter Kontrolle des Hitzeschock-Promotors (*Hsp70*; Tissieres et al. 1974) erlauben, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in der embryonalen / larvalen Entwicklung Hitzeschocks bei 37,5°C unterzogen, um die Überexpression der Proteine (grün) zu initialisieren. Die FK (A-C'') der L3 Larven wurde darauf fixiert und die LDs mit LipidTOX Deep Red (rot) gefärbt. A-C: ein Hitzeschock (45min) früh in der Entwicklung (Embryonen / L1 Larven); A'-C': zwei frühe Hitzeschocks (Übergang Embryonen/L1 Larven und L1/L2 Larven); A''-C'': drei späte Hitzeschocks (30min; L2/L3 Larven). Je häufiger ein Hitzeschock durchgeführt wird, desto stärker ist die detektierte Fluoreszenz, also demnach die Expression der Proteine. Beide CG9186 Varianten zeigen Lokalisation an den LDs (B-B'', C-C''). Ein LD Phänotyp konnte nach Überexpression der Proteine im FK nicht vorgefunden werden. Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 20µm.

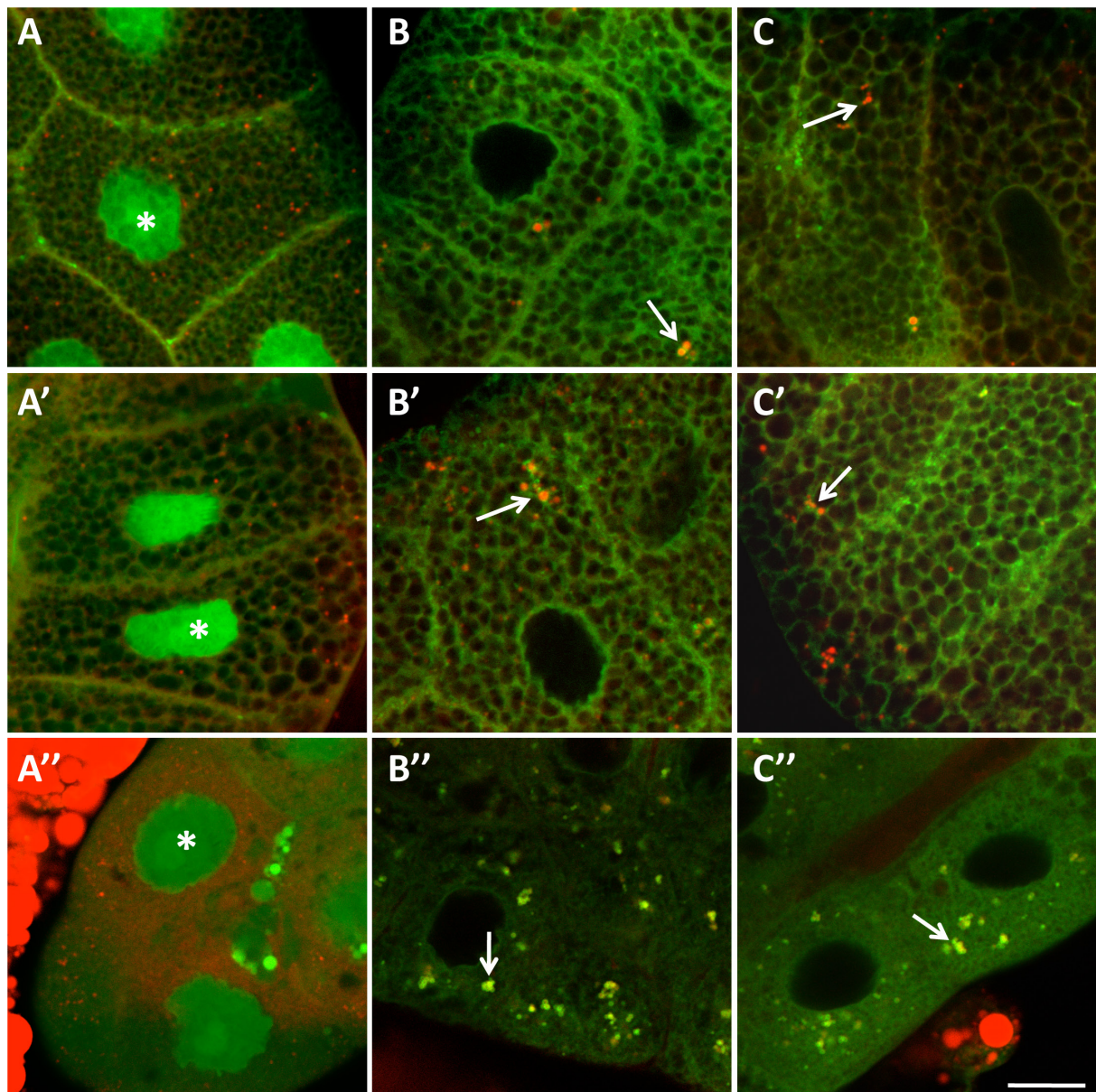


Abb. 3.31: In unterschiedlichen Entwicklungsstadien induzierte, ubiquitäre Überexpression von CG9186:EGFP / CG9186(S119A):EGFP in der larvalen Speicheldrüse
 Speicheldrüsen der L3 Larven von Nachkommen der gleichen Kreuzungen wie in Abb. 3.30 beschrieben wurden fixiert und die LDs mit LipidTOX Deep Red (rot) gefärbt. Die Hitzeschocks wurden gleichermaßen durchgeführt. Während EGFP zytoplasmatisch lokalisiert und im Zellkern angereichert ist (A-A''), zeigen beide CG9186 Varianten Lokalisation an den LDs (B-B'', C-C''). Bei Überexpression der CG9186 Varianten in der Speicheldrüse tritt eine Clusterbildung der LDs auf (B-B'', C-C'', Pfeile), die mit der Stärke der Expression korreliert. Die Cluster CG9186(S119A) überexprimierender Zellen (C-C'') sind dabei zahlreicher vorhanden und etwas größer als bei CG9186 (B-B''). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 20µm.

Wie bereits als Folge permanenter Überexpression der beiden Proteinvarianten in der larvalen Speicheldrüse beobachteten LD Clusterbildung (Abb. 3.29) konnte dieser Phänotyp ebenfalls in allen getesteten Konditionen bei zeitabhängiger Überexpression festgestellt werden (Abb. 3.31, B-B'', C-C''). Im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Larven, in denen die Speicheldrüsen-LDs gleichmäßig in

der Zelle verteilt sind (Abb. 3.31, A-A''), nimmt die LD Clusterbildung (Anzahl der LDs eines Clusters und Gesamtzahl aller Cluster) mit steigender Expressionsstärke beider CG9186 Varianten zu (Abb. 3.31, B-B'', C-C''), wobei jedoch die durch die Überexpression von CG9186(S119A):EGFP hervorgerufenen LD Cluster etwas größer und zahlreicher sind als die durch CG9186:EGFP hervorgerufenen.

3.3.7 RNAi-vermittelter CG9186 knock-down reduziert den Gesamtlipidgehalt der Fliegen

Nach den Überexpressionsstudien in Zellkultur und im Organismus (Abb. 3.26 - 3.31) stellte sich die Frage, ob der RNAi-vermittelte *CG9186* knock-down ebenfalls zu einem Phänotyp in Bezug auf LD Größe oder Verteilung innerhalb einer Zelle führt.

Um dies zu untersuchen, wurden zunächst in Zellkultur zwei unterschiedliche dsRNAs gegen *CG9186* getestet (Abb. 3.32). RNAi-vermittelter *CG9186* knock-down in Kc167 Zellen für vier Tage zeigt, dass das Protein sehr stabil zu sein scheint, da der Proteingehalt zwar reduziert ist, jedoch immer noch so viel Protein in den Zellen vorhanden ist, dass dieses mittels des CG9186 AKs in der Western Blot Analyse detektiert werden kann (Abb. 3.32, D). Dagegen liegt der Proteingehalt nach einer sechstägigen Inkubation mit beiden *CG9186* dsRNAs unter dem Detektionslimit des AKs (Abb. 3.32, D), ein LD Phänotyp konnte in den Zellen auch nicht beobachtet werden (Abb. 3.32, B, C).

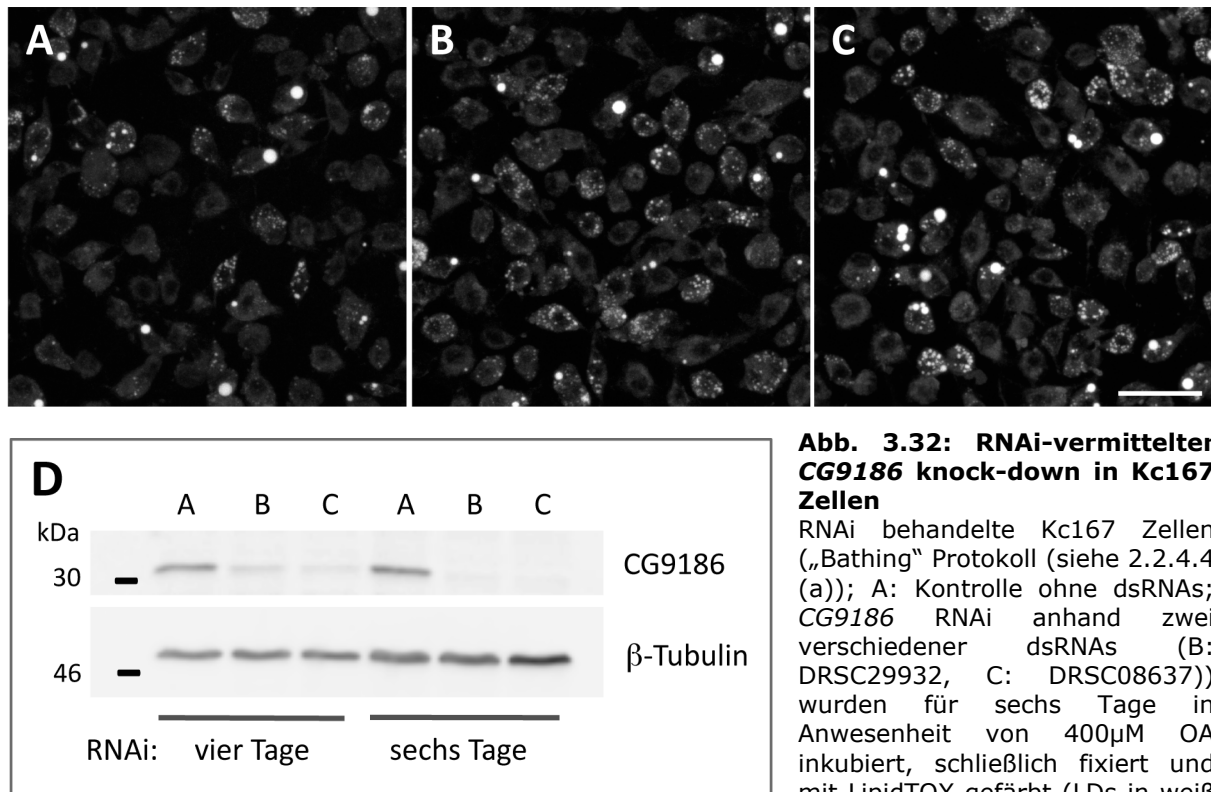
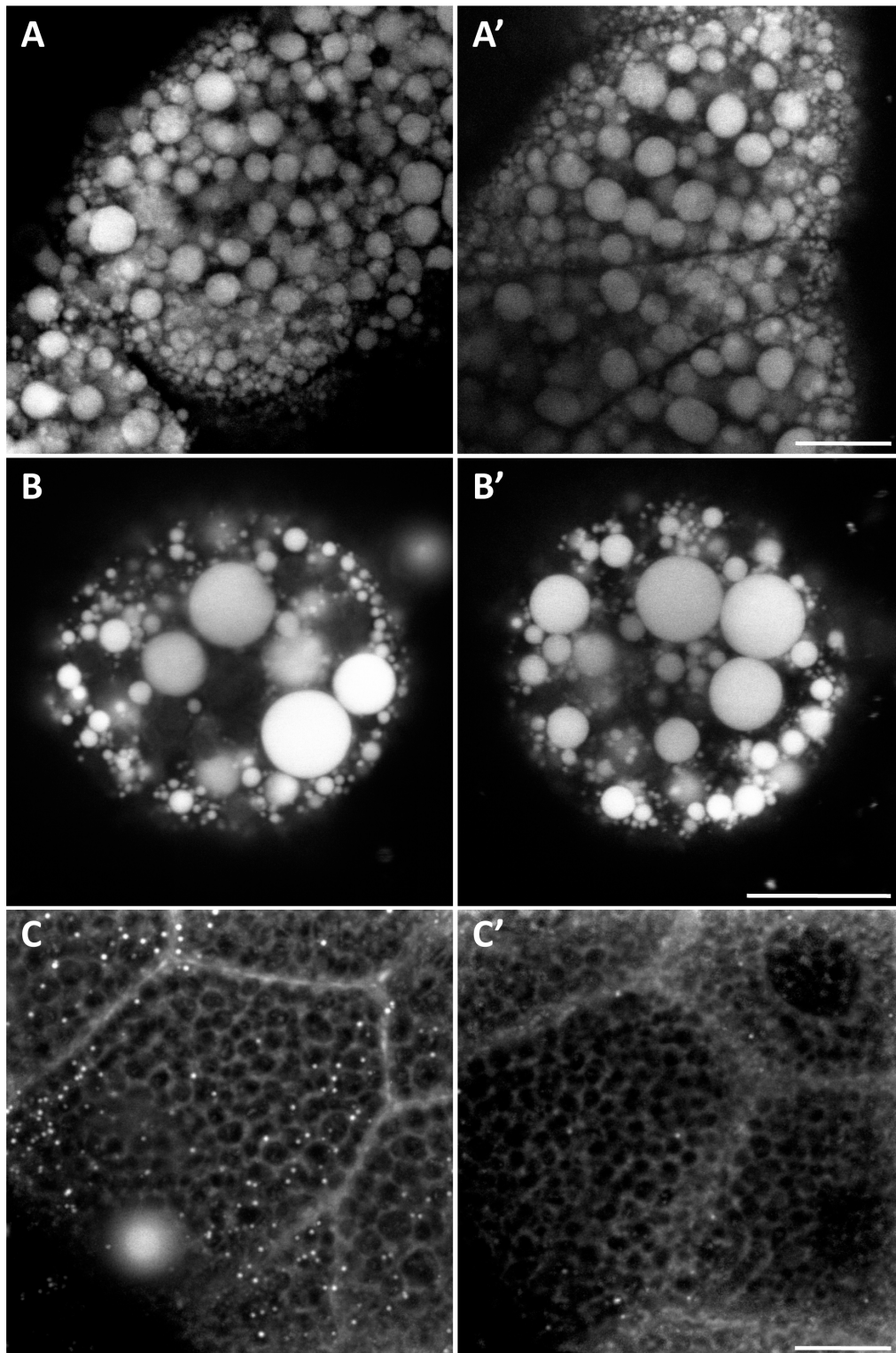


Abb. 3.32: RNAi-vermittelter CG9186 knock-down in Kc167 Zellen

RNAi behandelte Kc167 Zellen („Bathing“ Protokoll (siehe 2.2.4.4 (a))); A: Kontrolle ohne dsRNAs; CG9186 RNAi anhand zwei verschiedener dsRNAs (B: DRSC29932, C: DRSC08637)) wurden für sechs Tage in Anwesenheit von 400 μ M OA inkubiert, schließlich fixiert und mit LipidTOX gefärbt (LDs in weiß dargestellt).

D: Vier und sechs Tage RNAi behandelte Kc167 Zellen, ebenfalls in Anwesenheit von 400 μ M OA, wurden sonifiziert und gleiche Volumina der Zellextrakte auf ein SDS-PAG geladen und die Proteine aufgetrennt (siehe 2.2.3.8). Die Membranen wurden schließlich in der Western Blot Analyse (siehe 2.2.3.9) mit AKn gegen CG9186 und β -Tubulin (Ladekontrolle) behandelt. CG9186 RNAi hat keinen offensichtlichen Phänotyp bezüglich Größe und Anzahl der LDs zur Folge (B, C), vermutlich da das Protein sehr stabil ist (D). Z-Stapel Bilder A-C (maximale Projektionen) wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 25 μ m.

Wird der RNAi-vermittelte CG9186 knock-down im Fettgewebe transgener *Drosophila* herabreguliert (Abb. 3.33), so hat dies ebenfalls keine erkennbare, veränderte Größe oder Anzahl der LDs sowohl in larvalen FKs als auch in Adipozyten frisch-geschlüpfter *Drosophila* zur Folge (Abb. 3.33, A und B; siehe auch Tab. 3.3). In larvalen Speicheldrüsen hingegen resultiert der CG9186 knock-down mit mehreren getesteten Gal4-Aktivatoren Fliegenlinien (siehe Tab. 3.3) in einer stark reduzierten Anzahl und meistens auch einer verminderten Größe der verbleibenden LDs (Abb. 3.33, C').

**Abb. 3.33: RNAi-vermittelter *CG9186* knock-down im Organismus**

Der anhand der Aktivator-Fliegenlinie FK-Gal4 durchgeführte *CG9186* knock-down im FK von L3 Larven (A) oder Adipozyten frisch-geschlüpfter *Drosophila* Männchen (B') zeigt im Vergleich zur VDRC *w⁻* Kontrolle (A, B) keinen offensichtlichen LD Phänotyp (weiß: LDs, angefärbt mit LipidTOX Deep Red). *CG9186* RNAi bewirkt jedoch in den Speicheldrüsen von späten L3 Larven (C) im Vergleich zur VDRC *w⁻* Kontrolle (C) eine starke Reduktion der LD Anzahl (C, C' Z-Stapel (maximale Projektionen)). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht jeweils 20µm.

Die Quantifizierung des Gesamtlipidgehalts von sechs Tage alten *CG9186* knock-down Fliegen offenbart eine signifikante Reduktion (Abb. 3.34). Dies konnte mit ubiquitären als auch FK-spezifischen Gal4-Aktivatoren Fliegenlinien gezeigt werden und passt auch mit dem LD Phänotyp in der larvalen Speicheldrüse zusammen (Abb. 3.33, C'). Daher kann man davon ausgehen, dass *CG9186* eine bedeutende Rolle bei der organismischen Lipidspeicherungsregulation spielt.

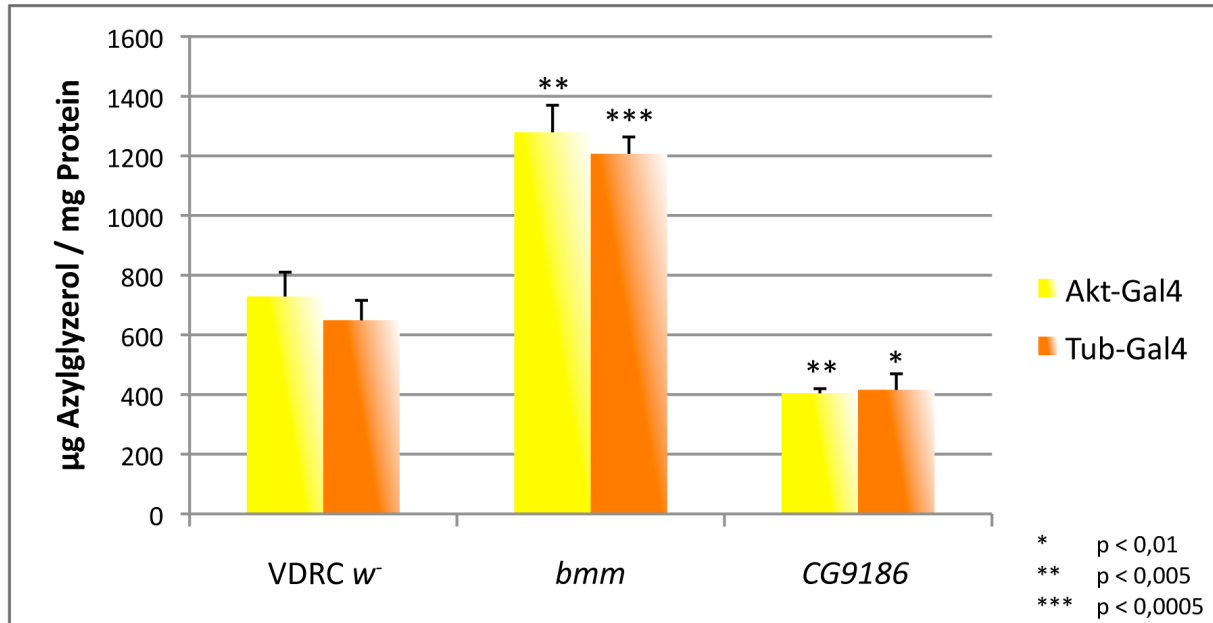


Abb. 3.34: RNAi-vermittelter *CG9186* knock-down beeinflusst den Gesamtlipidgehalt adulter *Drosophila*

Quantifizierung des Gesamtlipidgehalts von sechs Tage gealterten *Drosophila* Männchen (N=3x8 Fliegen) mittels CCA (siehe 2.2.3.3). Der RNAi-vermittelte *CG9186* knock-down wurde anhand der Aktivator-Fliegenlinien Aktin-Gal4 (gelb) bzw. Tubulin-Gal4 (orange) ubiquitär durchgeführt. Im Vergleich zur VDRC *w* Kontrolle hat *CG9186* RNAi eine ca. 50%ige Reduktion des organismischen Gesamtlipidgehalts zur Folge. Hingegen verursacht der *bmm* knock-down wie erwartet einen bedeutenden Anstieg des Lipidgehalts. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils drei Datenpunkten mit der entsprechenden Standardabweichung. Statistische Unterschiede, alle in Bezug auf die VDRC *w* Kontrolle, wurden mit dem ungepaarten t-Test analysiert und als p-Wert ausgedrückt. Die Abb. zeigt ein Ergebnis, das mit drei unabhängigen Wiederholungsexperimenten reproduziert wurde.

	FK-Gal4			Sgs3-Gal4			Tub-Gal4		
	FK / Adipozyten	Speicheldrüse	andere Gewebe	FK / Adipozyten	Speicheldrüse	andere Gewebe	FK / Adipozyten	Speicheldrüse	andere Gewebe
CG9186:EGFP	X	Cluster	X	X (NA)	wenig Cluster	X (NA)	X	Cluster	X
CG9186 (S119A):EGFP	X	viele Cluster	X	X (NA)	wenig Cluster	X (NA)	X	viele Cluster	X
CG9186 RNAi	X	Anzahl & Größe der LDs reduziert	X	X (NA)	Anzahl & Größe der LDs reduziert	X (NA)	X	Anzahl & Größe der LDs reduziert	X

Tab. 3.3: Zusammenfassung der LD Phänotypen nach Überexpression der CG9186 Varianten bzw. RNAi-vermitteltem knock-down im Organismus

Anhand des Gal4/UAS-Systems (Brand & Perrimon 1993) wurden die Varianten CG9186:EGFP und CG9186(S119A):EGFP in verschiedenen organismischen Geweben überexprimiert bzw. RNAi gegen CG9186 durchgeführt. Für die Kreuzungen wurden die Aktivator-Fliegenlinien FK-Gal4 (Expression im FK, der Speicheldrüse und den Oenozysten), Sgs3-Gal4 (Expression nur in der Speicheldrüse) und Tub-Gal4 (ubiquitäre Expression) verwendet. Die Tiere wurden permanent auf 25°C gehalten, so dass die Expression während der kompletten Entwicklung der F1-Generation gegeben war. Zusammenfassend sind die LD Phänotypen in Bezug auf Anzahl, Größe und zellulärer Verteilung in den unterschiedlichen Geweben von L3 Larven dargestellt. X: kein Phänotyp; NA („not applicable“): Analyse entfällt (Gal4 Aktivator-Fliegenlinie nicht in dem entsprechenden Gewebe aktiv).

4. Diskussion

4.1 Die Funktion von COPI bei der Regulation der Lipidspeicherung von *Drosophila melanogaster*

In Zellkultur bedingt der RNAi-vermittelte knock-down nahezu aller COPI Komponenten eine erhöhte Lipidspeicherung (Tab. 3.1; Beller et al., 2008; Guo et al., 2008). Allein ϵ COP RNAi stellt eine Ausnahme dar (Tab. 3.1; Beller et al., 2008; Guo et al., 2008). Dies ist jedoch nicht dadurch bedingt, dass der RNAi-vermittelte knock-down von ϵ COP ineffizient war, da mittels qRT-PCR gezeigt werden konnte, dass die Transkript-Menge in diesen Zellen auf weniger als 10% reduziert ist (siehe Anhang, Abb. 6.3). Eine lange Halbwertszeit des ϵ COP Proteins könnte ebenfalls den fehlenden Phänotyp erklären. Dagegen spricht jedoch, dass das Golgi durch ϵ COP RNAi in einem Umfang fragmentiert wird, wie es auch nach knock-down der anderen COPI Komponenten geschieht (siehe Abb. 3.3). Daraus kann zusätzlich geschlossen werden, dass der Lipidphänotyp nicht allein durch ein fragmentiertes Golgi verursacht wird. Auch die Anzahl der toten Zellen (Zelltrümmer) ist nach RNAi-Behandlung gegen ϵ COP vergleichbar mit der nach RNAi gegen die anderen COPI Untereinheiten und *Arf79F* (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht). Des Weiteren resultiert der knock-down von ϵ COP in einer veränderten Lokalisation von SesB (Abb. 3.12, D₄) bzw. in gebündelten und teilweise auch vergrößerten LDs in Kombination mit der Überexpression von PLIN2 (Abb. 3.12, B₄) und CG9186 (Abb. 3.12, H₄). Somit kann davon ausgegangen werden, dass für ϵ COP bei der Lipidspeicherungsregulation keine (große) Bedeutung zukommt. Frühere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen für ϵ COP. Zum Beispiel ist bei der Replikation des *Drosophila* C Virus ϵ COP die einzige entbehrliche Untereinheit. Neben Genen der Fettsäuresynthese spielen die anderen COPI Untereinheiten, sowie *Arf79F* als regulatorische Komponente, bei der Replikation dieses Virus eine wichtige Rolle (Cherry et al. 2006). Weiterhin wurde in der Hefe gezeigt, dass ϵ COP eine eher stabilisierende Rolle für α COP im COPI Komplex spielt und für das Überleben der Zellen nicht essentiell ist (R Duden et al. 1998).

Die Rolle von COPI bei der Lipidspeicherung wurde im Organismus bislang nicht untersucht, da Mutationen der COPI Gene zu Letalität führen (siehe Tab. 3.2, Strategie 1; Grieder et al. 2008). Durch Aktivierung der RNAi im adulten Tier

konnten jedoch *Drosophilae* gewonnen werden, bei denen der *Arf79F* knock-down analysierbar war (siehe Tab. 3.2, Strategie 2). Die Quantifizierung des Gesamtlipidgehalts dieser *Drosophilae* ergab, dass *Arf79F* RNAi-Behandlung eine erhöhte Lipidspeicherung zur Folge hat und somit zumindest diese COPI Komponente auch an der organismischen Lipidspeicherungsregulation beteiligt ist. Dadurch, dass RNAi-Interventionen gegen β' COP, δ COP und ϵ COP im Gegensatz zu α COP, β COP, γ COP und ζ COP in Fliegen nicht letal sind (siehe Tab. 3.2) und auch kein erhöhter Lipidgehalt bestimmt werden konnte, ist es möglich, dass der knock-down dieser COPI Untereinheiten nicht effizient war. Erste Experimente haben gezeigt, dass dies tatsächlich für β' COP und δ COP zutrifft, der knock-down von ϵ COP hingegen war sehr effizient. Dies spricht dafür, dass ϵ COP nicht nur in Zellkultur, sondern auch im Organismus keine wesentliche Bedeutung für die Lipidspeicherungsregulation zukommt.

Da die Aktivierung der *Arf79F* RNAi früh in der Entwicklung zu Letalität führt, wurde versucht, eine weitere Strategie zu finden, um die Lebensfähigkeit der Tiere zu ermöglichen. Auf Basis der Studie von Guo et al. (2008) wurden dominant-negative *Arf79F*(T31N) und konstitutiv-aktive *Arf79F*(Q71L) Varianten generiert. Guo et al. (2008) haben gezeigt, dass die Überexpression von *Arf79F*(T31N) in *Drosophila* S2 Zellen zu vergrößerten LDs führt und diese Proteinvariante zudem ringförmig an LDs lokalisiert. In den von mir durchgeführten Überexpressionsexperimenten konnte jedoch mit beiden *Arf79F* Varianten weder ein Phänotyp in Bezug auf LD Anzahl oder Größe in Kc167 Zellen (siehe Abb. 3.7), noch ein veränderter Gesamtlipidgehalt adulter Fliegen (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht) festgestellt werden. Western Blot Analysen haben gezeigt, dass die *Arf79F* Fusionsproteine, und nicht nur EGFP allein exprimiert wird (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht). Das einzige Indiz, dass es sich bei *Arf79F*(T31N) wirklich um eine Variante mit Funktionsverlust handelt, ist die Tatsache, dass die Überexpression von *Arf79F*(T31N):EGFP in einer Fragmentierung des Golgis resultiert (siehe Abb. 3.7, B₂). Dieser beobachtete Phänotyp ähnelt stark dem durch RNAi-vermittelten *Arf79F* knock-down Phänotyp (siehe Abb. 3.3, F).

Die Unterschiede zwischen den beobachteten LD Phänotypen in meiner und der Studie von Guo et al. (2008) nach Überexpression der *Arf79F* Varianten könnten auf die verschiedenen Zelllinien zurückzuführen sein, d.h. *Drosophila* Kc167 bzw. S2 Zellen. Bei den Lokalisationsstudien von Guo et al. (2008) wurde

Arf79F(T31N), im Gegensatz zu dem von mir verwendetem EGFP, an mCherry fusioniert. Es ist denkbar, dass die Fusion mit einem fluoreszierenden Protein die enzymatische Aktivität von Proteinen (durch z.B. sterische Hinderung) verringert und/oder die korrekte Lokalisation des Proteins beeinflussen kann.

Auch die möglichen Effekte der Überexpression der anderen COPI Komponenten auf die Lipidspeicherung wurden getestet. Der gegensätzliche Lipid-Phänotyp, d.h. eine Reduktion des Gesamtlipidgehalts von L3 Larven (siehe Abb. 3.9, A), kann nach Überexpression von α COP:EGFP beobachtet werden. In Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Lipidspeicherung nach COPI RNAi durch eine verringerte Lipolyserate bedingt ist (Beller et al. 2008). Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Reduktion des Lipidgehalts nach Überexpression von α COP dementsprechend als Folge einer erhöhten Lipolyserate zustande kommt. Der Versuch, diese Annahme experimentell zu bestätigen, blieb jedoch ohne Ergebnis (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht). Nach Überexpression anderer COPI Komponenten konnte keine Reduktion des Lipidgehalts festgestellt werden. Auch die Lokalisation von α COP stellt sowohl in Zellkultur (siehe Abb. 3.6) als auch im Organismus (siehe Abb. 3.8) einen Sonderfall dar, da die anderen COPI Untereinheiten vorrangig am Golgi lokalisieren. Um auszuschließen, dass die Fusion von α COP mit EGFP die korrekte Lokalisation durch z.B. Fehlfaltung des Proteins oder Verdeckung der Lokalisationssequenz beeinflusst, wurde α COP ebenfalls mit Myc fusioniert und in Zellen exprimiert. Dies führt zu einem sehr ähnlichen Lokalisationsmuster (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht). Eine nur durch EGFP bedingte Misslokalisierung des Fusionsproteins kann somit ausgeschlossen werden.

Neben der veränderten Lipolyserate in Säugerzellen ist COPI auch an der Regulation der Proteinzusammensetzung der LD Oberfläche beteiligt (Beller et al. 2008; Soni et al. 2009). Um diese Befunde näher zu untersuchen, wurde in meinen Studien der RNAi-vermittelte knock-down von COPI Komponenten mit der Überexpression unterschiedlicher LD Proteine kombiniert (siehe Abb. 3.12). Mit SesB wurde ein Protein gefunden, dessen Lokalisation in *Drosophila* Kc167 Zellen nach COPI RNAi verändert ist (siehe Abb. 3.12, D₂₋₅). Die Lokalisation der anderen überexprimierten Proteine, wie z.B. von dem ATGL Homolog Bmm (Grönke et al. 2005), ist hingegen nach RNAi-vermitteltem COPI knock-down unverändert (siehe Abb. 3.12, F₂₋₅). Dies ist im Einklang mit einer aktuellen Studie, die zeigt, dass die Lokalisation von überexprimiertem ATGL auch in HeLa

Zellen nicht durch COPI beeinflusst wird (Takashima et al. 2011). Die LD Lokalisation von endogenem ATGL hingegen wird durch COPI RNAi reduziert (Beller et al. 2008; Soni et al. 2009). Die Unterschiede könnten einerseits Zelltyp-spezifisch bedingt sein, da beispielsweise in HeLa Zellen die Lokalisation von ADRP durch COPI knock-down beeinflusst wird (Soni et al. 2009), während dies in AML12 Zellen nicht der Fall ist (Beller et al. 2008). Andererseits ist es auch vorstellbar, dass die Lokalisation von ATGL bei zu hoher Expressionsstärke des Proteins nicht durch COPI beeinflusst werden kann. In folgenden Studien wäre es demnach wahrscheinlich von Vorteil, bei einem Screen die Lokalisation der endogenen und nicht der überexprimierten Proteine in Abhängigkeit von der COPI Funktion zu untersuchen.

Eine weitere Begründung dafür, dass die Lokalisation der anderen Proteine wie Bmm nach COPI RNAi unbeeinflusst war, könnte der von mir durchgeführte experimentelle Aufbau sein, wobei gleichzeitig die COPI dsRNAs, die Überexpressionskonstrukte der LD Proteine und die OA zur Induktion der LD Biogenese zu den Zellen gegeben wurde. Die LDs werden bei dieser Strategie relativ schnell gebildet, wahrscheinlich bereits nach 10-20min (basierend auf Live Imaging Ergebnissen, siehe Abb. 3.24, B), worauf die Fusionsproteine direkt nach der eintretenden Expression (nach etwa 12h, basierend auf den in Abb. 3.27 gezeigten Experimenten) auf diese translozieren können, also lange bevor der COPI knock-down erfolgt. In nachfolgenden Studien könnte also einerseits ein wahrscheinlich schneller eintretender COPI knock-down durch die Verwendung von Brefeldin A (J Lippincott-Schwartz et al. 1989; Klausner et al. 1992) oder Exo1 (Feng et al. 2003) erreicht werden. Andererseits könnte die generelle Abfolge der Zugabe von dsRNAs, Plasmiden und OA komplett verändert werden, so dass zuerst der COPI knock-down erfolgt und danach erst die Induktion der LDs und somit die Lokalisation der neu gebildeten Fusionsproteine stattfindet. Letzteres wurde bereits indirekt mit der Inkubation der Zellen in Abwesenheit von OA getestet, da erst nach dem effizienten COPI knock-down viele neue LDs gebildet werden, auf die die bereits exprimierten Proteine erst dann translozieren können. Jedoch konnte mit dieser Strategie kein weiterer Phänotyp beobachtet werden (siehe Anhang, Abb. 6.4), da möglicherweise in dieser Kondition zu wenig Lipid in den Zellen vorhanden war.

4.2 CG9186 als Werkzeug zur Untersuchung der LD Biogenese und LD Lokalisationsmechanismen

Aufgrund des in dem unter 4.1 dargestellten Zellkultur Screen beobachteten, prominenten LD Phänotyps bei Kombination von COPI RNAi und CG9186 Überexpression (siehe Abb. 3.12, H₂₋₅), wurde im Verlauf der Dissertation eine detailliertere Charakterisierung von CG9186 vorgenommen.

Zunächst wurde besonderes Augenmerk auf die Lokalisation von CG9186 in unterschiedlichen Zelltypen und unter verschiedenen Konditionen gelegt. Dabei stellte sich heraus, dass CG9186 in Abwesenheit von LDs am ER lokalisiert (siehe z.B. Abb. 3.18 und 3.24). Dies führte zu der Hypothese, dass CG9186 direkt vom ER auf neu-gebildete LDs transloziert, was zeitlich aufgelöst verfolgt wurde (siehe Abb. 3.24). In der Tat transloziert das Protein nach Zugabe von OA sehr schnell auf LDs. Gleichzeitig nimmt die Intensität des CG9186 Signals in dem retikulären Muster ab. Diese Signal-Abnahme spricht entweder für eine Depletion der CG9186 Proteinmenge am ER, also einer Translokation des vorhandenen Proteins, oder aber ist auf ein Ausbleichen der Fluoreszenz zurückzuführen. In folgenden Studien müsste noch detaillierter untersucht werden, ob und wie das bereits in den Zellen vorhandene CG9186 Protein transloziert. Eine gute Möglichkeit, um die Dynamik von fluoreszent-markierten Proteinen in lebenden Zellen zu untersuchen, wäre beispielsweise FRAP („fluorescence recovery after photobleaching“) (z.B. Übersichtsartikel (Meyvis 1999; Lippincott-Schwartz et al. 2001; Lippincott-Schwartz et al. 2003)).

Auch andere Proteine wie SesB (Abb. 3.12, D₁) oder UBXD8 (Zehmer et al. 2009) zeigen dieses duale Lokalisationsmuster. Daher kann man die Hypothese aufstellen, dass es einen Mechanismus für die Protein-Translokation vom ER auf die LDs gibt, entweder direkt vom LD auf das benachbarte ER oder vom LD über das Zytoplasma auf das ER (siehe auch Abb. 3.24, A).

CG9186 könnte demnach also ein interessantes Markerprotein in der Fliege darstellen, um nicht nur LD Lokalisationsmechanismen zu untersuchen, sondern auch um wichtige Aufschlüsse darüber zu gewinnen, wie die LD Biogenese abläuft (siehe 1.2). Es wird angenommen, dass gerade solche Proteine, die transient in der ER-Membran integriert sind und auch an LDs lokalisieren, wichtige Marker für die Erforschung der LD Biogenese darstellen (Zehmer et al. 2009).

Um Signalsequenzen für die ER und besonders auch die LD Lokalisation von CG9186 zu identifizieren, wurde in dieser Studie eine Struktur-Funktionsanalyse durchgeführt (siehe 3.3.3). Eine typische KDEL (Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin) Signalsequenz, die sich bei ER-assoziierten Proteinen im C-terminalen Bereich befindet (Munro & Pelham 1987), konnte bei CG9186 nicht vorgefunden werden. Nach Deletion der N-terminalen Hälfte des Proteins (AS 1-140) kann jedoch eine Reduktion des ER-assoziierten Proteins und zugleich eine Anreicherung am cis-Golgi festgestellt werden (Abb. 3.25, G und H). Dies spricht dafür, dass sich eine ER-Signalsequenz in den AS 1-140 befindet (siehe unten).

Generell bestehen drei Möglichkeiten für das Schicksal von Proteinen in Bezug auf den Vesikeltransport zwischen subzellulären Kompartimenten wie ER und Golgi (Übersichtsartikel Rothman & Wieland 1996). Entweder das Protein besitzt ein Transport-Signal, wodurch der COPII Vesikeltransport zum Golgi spezifiziert wird, oder es besitzt ein Retentionssignal, so dass das Protein mit dem ER assoziiert bleibt. Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass das Protein weder über Transport-, noch über Retentionssignale verfügt. In diesem Fall kann ein Vesikeltransport durch sog. „bulk flow“ stattfinden (Wieland et al. 1987). Für manche lösliche Proteine wurde gezeigt, dass dieser Transportprozess zumindest teilweise auch COPII abhängig ist (Phillipson et al. 2001). In den ersten 140 AS von CG9186 könnte sich demnach ein bestimmtes Signal befinden, was für die Retention im ER benötigt wird. Nach dieser Hypothese würden die Deletionsmutanten CG9186[delta1-140] und CG9186[aa141-200] das ER über COPII Vesikel verlassen und am Golgi akkumulieren. Um zu testen, ob COPII beteiligt ist, wurde der RNAi-vermittelte knock-down von der COPII Komponente *sec23* mit der Überexpression der Proteinvarianten CG9186[delta1-140] und CG9186[aa141-200] kombiniert. Es konnte jedoch keine Veränderung der Koloalisation mit dem cis-Golgi gezeigt werden (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht), so dass man davon ausgehen kann, dass COPII bei der Lokalisation dieser Proteinvarianten am Golgi unbeteiligt ist.

Die kürzeste, von mir positiv getestete Sequenz für die LD Lokalisation von CG9186 (AS 141-200) setzt sich aus einem Bereich von 60 AS zusammen, die zum größten Teil (etwa 50%) hydrophob und unpolar sind. Der einzigen Proteinvariante, die eine zytoplasmatische Lokalisation zeigt, fehlen diese 60 AS. Daher kann man vermuten, dass diese Sequenz entweder sowohl für die ER- als

auch die LD-Lokalisation wichtig ist, oder das Protein instabil ist bzw. nicht mehr korrekt gefaltet werden kann.

Für integrale Transmembranproteine ist es bekannt, dass solche hydrophoben AS die Membran in Form einer α -Helix durchspannen (Alberts et al. 1994), wodurch das Protein fest verankert ist und nur durch die Zerstörung der Membran isoliert werden kann. Die von mir identifizierte LD Lokalisationssequenz von CG9186 beinhaltet solch eine abgeleitete Helix-Sekundärstruktur (APSSP, <http://imtech.res.in/raghava/apssp>). Ob CG9186 eine Membran-durchspannende Topologie am ER aufweist, könnte beispielsweise mit FPP („fluorescence protease protection“) Experimenten (Lorenz et al. 2006; Moessinger et al. 2011) getestet werden.

Es ist nicht ganz klar, ob alle LD Proteine hydrophoben Sequenzen besitzen, die in Form einer α -Helix in die Membran eingebettet werden, wie es z.B. bei Apolipoproteinen der Fall ist (Frank & Marcel 2000; Segrest et al. 2001; Bolanos-Garcia & Miguel 2003), oder eine andere Sekundärstruktur. Das Säuger PAT-Domänen Protein ADRP z.B. weist keine größere hydrophobe Domäne auf (Nakamura & Fujimoto 2003), was die Definition einer konservierten LD Lokalisationssequenz schwierig gestaltet.

4.3 Beteiligung von CG9186 an der Regulation der Größe, Verteilung und Menge der LDs

Die Kombination von CG9186 Überexpression mit RNAi gegen α COP, γ COP, ϵ COP und *Arf79F* hat in dem Zellkultur Screen den GLD Phänotyp hervorgerufen (Abb. 3.12, H₂₋₅). Die riesigen, deformierten LDs könnten jedoch auch sehr enge Cluster von kleineren LDs sein, was aufgrund technischer Einschränkungen der verwendeten Mikroskope nicht aufgelöst werden konnte.

Alternativ könnten die eng beieinander liegenden LDs aufgrund der Fixierung fusionieren. Eine sekundäre Fusion von LDs wurde unter bestimmten Bedingungen bereits beschrieben (DiDonato & Brasaemle 2003; Ohsaki et al. 2005).

Die Expression von CG9186 in weiteren Situationen mit erhöhtem, zellulären Lipidgehalt (Abb. 3.14) zeigt, dass der GLD Phänotyp auch hier auftritt. Dieser Phänotyp ist demnach nicht spezifisch für die Kombination von CG9186 Überexpression und RNAi gegen COPI Komponenten.

Auch die Kombination von RNAi-vermitteltem α COP, γ COP, ε COP und *Arf79F* knock-down mit der Überexpression von PLIN2 hat die Bildung von sehr großen LDs zur Folge (siehe Abb. 3.12, B₂₋₅). Dies ist im Einklang mit den Beobachtungen, dass einerseits eine stabil transfizierte PLIN2 exprimierende Zelllinie erhöhten TAG Gehalt zeigt (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht) und andererseits auch die PLIN2 Überexpression im Organismus zu erhöhtem Gesamtlipidgehalt der *Drosophila* führt (Grönke et al. 2003). Im Gegensatz zu PLIN2 hat die Überexpression von CG9186 allein keine derartige Vergrößerung der LDs zur Folge (siehe Abb. 3.12, H₁) und auch der TAG Gehalt von stabil mit CG9186:EGFP transfizierten Kc167 Zellen war in einem ersten Experiment nicht erhöht (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht). Dies bedeutet, dass der GLD Phänotyp allein bei CG9186 Überexpression in Kombination mit erhöhtem, zellulären Lipidgehalt auftreten kann, während die durch PLIN2 Überexpression bereits hervorgerufenen großen LDs durch COPI RNAi nur verstärkt werden. Man könnte also davon ausgehen, dass der GLD Phänotyp unspezifisch für CG9186 ist, da bereits die PLIN2 Überexpression einen ähnlich starken Phänotyp hervorruft. Jedoch sprechen die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse (z.B. der CG9186(S119A) Mutante, siehe unten) für eine eher spezifische Funktion von CG9186 bei der LD Größenregulation. Auch PLIN2 stellt mit dem nur durch die Überexpression hervorgerufenen, starken Lipid Phänotyp sicher eine Ausnahme dar.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Serin an Position 119 im abgeleiteten katalytisch-aktiven Esterase/Lipase Zentrum des Proteins an der Funktion von CG9186, also möglicherweise an der Regulation der LD Größe, beteiligt ist. Diese Hypothese wurde zudem auch damit begründet, dass nach Überexpression der Deletionsmutante CG9186[delta1-140] oftmals große LDs in den Zellen vorzufinden sind (siehe 3.3.3). In der Tat entstehen nach transienter Überexpression der Mutante CG9186(S119A) in Kc167 Zellen auch GLDs, was die Vermutung bestätigt, dass das Serin 119 an der LD Größenregulation beteiligt ist.

Es muss bedacht werden, dass die Überexpression der CG9186 Proteinvarianten immer im genetischen Wildtyp Hintergrund stattfindet, also demnach eine mögliche Aktivität vom endogenen CG9186 in den Zellen bestehen bleibt und der beobachtete LD Phänotyp somit abgeschwächt werden könnte. Zudem könnte die Fusion mit EGFP die enzymatische Aktivität von CG9186 (durch z.B. sterische

Hinderung) auch zusätzlich noch beeinflussen, d.h. z.B. verringern. Dies könnte beispielsweise die beobachtete LD Clusterbildung nach Überexpression beider CG9186:EGFP Varianten erklären, wodurch nach dieser Hypothese die Cluster durch die eingeführte S119A Mutation noch stärker ausgeprägt wären. Erste Experimente haben gezeigt, dass die Überexpression von CG9186(S119A) mit einer Myc-Fusion auch in der Bildung von GLDs resultiert, was gegen die oben erwähnte Hypothese sprechen würde. Es müssten also in weiteren Studien zusätzlich CG9186 Konstrukte mit anderen, d.h. z.B. kleineren Fusionsproteinen bzw. nur Proteinen ohne Fusionszusatz getestet werden, um abzusichern, dass die CG9186 Mutation S119A, und nicht die Fusion mit EGFP an der Ausbildung der GLDs beteiligt ist.

Geht man von einer katalytisch-inaktiven CG9186(S119A):EGFP Variante aus, so gibt es jedoch Widersprüche bezüglich des Lipid-Phänotyps nach Überexpression dieses mutierten Proteins und den RNAi knock-down Experimenten. Während in Zellkultur die Überexpression von CG9186(S119A) in der Bildung der GLDs resultiert (Abb. 3.26, B), kann in den Zellen kein Lipid-Phänotyp durch CG9186 RNAi beobachtet werden (Abb. 3.32). Manche LD-assoziierte Proteine sind an der LD Größenregulation beteiligt, wie es z.B. kürzlich für Ubx2/Ubx2d8 in Hefe (Wang & Lee 2012) oder auch das *Drosophila* PERILIPIN PLIN1 (Beller et al. 2010) gezeigt werden konnte. Möglicherweise wird für die Ausbildung der GLDs eine bestimmte Protein-Protein Interaktion benötigt. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass durch die Deletion des C-terminalen Teils zusätzlich zu der S119A Mutation keine GLDs mehr vorhanden sind, das Protein jedoch noch LD-assoziiert ist (Abb. 3.26, C). Der entsprechende Ko-Faktor würde nach dieser Hypothese über eine Interaktionsdomäne an den C-terminalen Teil von CG9186 binden und so bei Ausprägung des GLD Phänotyps beteiligt sein. Durch eine Erschöpfung der CG9186 Proteinmenge in den Zellen nach RNAi-vermitteltem knock-down könnte dieser Ko-Faktor demnach nicht mehr an die LDs binden und einen Lipid-Phänotyp hervorrufen. In weiteren Studien müssten also Protein-Protein Interaktionstests wie z.B. mit sog. „protein complementation assays“ (Übersichtsartikel Morell et al. 2009) oder dem Split-Ubiquitin-System (Johnsson & Varshavsky 1994) durchgeführt werden, um genauere Aussagen über die Wirkungsweise von CG9186 machen zu können.

RNAi-vermittelter knock-down von CG9186 im Organismus bedingt eine starke Reduktion der LD Anzahl in der larvalen Speicheldrüse (Abb. 3.33, C') und eine

etwa 50%ige Reduktion des Gesamtlipidgehalts adulter *Drosophila* (siehe Abb. 3.34). Die Diskrepanz, dass nach *CG9186* RNAi im Organismus eine Reduktion der Lipidmenge vorliegt, während in Zellkultur kein Phänotyp beobachtet werden kann, könnte z.B. darauf zurückzuführen sein, dass sich die Proteom-Zusammensetzung der LDs je nach Differenzierungsstadium unterscheidet. Diese Hypothese basiert auf Beobachtungen, bei denen gezeigt wurde, dass die Zusammensetzung verschiedener PAT-Domänen Proteine je nach Reifegrad der LDs variiert (Wolins, Brasaemle, et al. 2006). Nach dieser Hypothese fehlen bestimmte Faktoren in den Kc167 Zellen, die für die Ausprägung eines LD Phänotyps notwendig sind. Zudem könnte der knock-down von *CG9186* zu kurz gewesen sein, um einen Effekt hervorzurufen, da das endogene *CG9186* in Kc167 Zellen (siehe Abb. 3.32, D), im larvalen FK (K. Thiel und M. Beller, unveröffentlicht) und adulten Fliegen (Abb. 3.20, D) sehr stabil ist und stets ein geringer Proteinanteil detektierbar bleibt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Proteinmenge ausreichend ist, um einen detektierbaren LD Phänotyp zu verhindern. In nachfolgenden Studien müsste beispielsweise auch eine zweite *CG9186* RNAi-Linie getestet werden, um sicherzustellen, dass der beobachtete LD Phänotyp im Organismus nicht aufgrund unspezifischer Herabregulation anderer Transkripte (sog. „off-target“ Effekte) zustande kommt. Vorhergesagt wird jedoch bei der von mir verwendeten *CG9186* RNAi-Linie kein off-target Effekt (VDRC; <http://stockcenter.vdrc.at/>). Um eindeutig zu zeigen, dass *CG9186* eine wichtige Funktion bei der Lipidspeicherungsregulation in *Drosophila* erfüllt, muss jedoch zusätzlich eine Null-Mutante hergestellt werden. Die einfachste Strategie zur Generierung einer Deletion im Gen wäre die P-Element Remobilisierung (Voelker et al. 1984). Man müsste auf *p{EP}CG9153[G486]* zurückgreifen, welches etwa 400bp vom *CG9186* Transkriptionsstartpunkt entfernt ist. Dies wäre mit der Gefahr verbunden, dass auch das angrenzende Gen *CG9153*, mit annotierter Ubiquitin-Ligase Aktivität, von der möglichen Deletion betroffen werden würde, so dass in diesem Falle noch ein genomischer „Rescue“ durchgeführt werden müsste.

Nach Überexpression der *CG9186* Varianten in der larvalen Speicheldrüse liegen LD Cluster vor (Abb. 3.29), was bei der *CG9186*(S119A) Mutante wie in Kc167 Zellen stärker ausgeprägt ist. Die Funktion von LDs in der Speicheldrüse von *Drosophila* ist unbekannt. Dieses Gewebe wurde funktional bei Fliegen bisher hauptsächlich in Bezug auf polytäre Chromosomen (z.B. Lane et al. 1972) und

die Sekretion von Proteinen erforscht, die als eine Art „Klebstoff“ wirken, welcher für die Haftung der Puppen am Trägermaterial benötigt wird (Fraenkel & Brookes 1953; Beckendorf & Kafatos 1976). In Proteom-Studien der Speicheldrüsen von *Anopheles stephensi* konnte auch eine annotierte TAG Lipase identifiziert werden. Ihre Funktion in der Speicheldrüse ist jedoch unbekannt (Valenzuela et al. 2003). Überexpression der beiden CG9186 Varianten im larvalen FK oder in freischwimmenden Fettzellen frisch-geschlüpfter *Drosophila* bedingt hingegen keinen offensichtlichen LD Phänotyp (Abb. 3.28). Dadurch, dass im Fettgewebe die LD Anzahl pro Zelle sehr viel höher ist als in der larvalen Speicheldrüse, wird ein LD Clustering Phänotyp schwer erkennbar sein. Dies würde im Gegensatz zu der Hypothese stehen, dass die GLDs in Kc167 Zellen nur durch eine sehr enge räumliche Nähe einzelner LDs und eine nicht ausreichende mikroskopische Auflösung verursacht werden. Es wäre vorstellbar, dass im larvalen FK bestimmte Proteine, die für das Clustering oder die Bildung der GLDs notwendig sind, im Gegensatz zu den Zellkulturzellen nicht exprimiert werden. Andererseits könnte das LD Wachstum in diesem Gewebe auch strikter kontrolliert sein als in embryonalen Kc167 Zellen, so dass die Ausbildung der LD Cluster oder GLDs durch bestimmte Faktoren verhindert wird.

Es stellt sich nach wie vor die Frage, wie GLDs in Zellen entstehen können und welche Funktion CG9186 dabei erfüllt. Generell ist das Wachstum von LDs durch Fusion (Boström et al. 2005; Boström et al. 2007) oder lokalisierte TAG Biosynthese am ER in direkter Nähe zu LDs möglich (Kuerschner et al. 2008; Cheng et al. 2009; siehe auch 1.3).

Eine durch den Fixierungsvorgang bedingte Fusion der LDs (siehe oben) wird eher ausgeschlossen, da durch die Überexpression von CG9186(S119A) in der Speicheldrüse, welche auch fixiert wurde, zwar LD Cluster, aber keine GLDs beobachtet werden können. Zudem liegen nach Überexpression beider CG9186 Varianten in Kc167 Zellen zwar ebenfalls Cluster vor, GLDs entstehen jedoch nach Überexpression der S119A Mutante.

Fusion könnte z.B. durch Platzbeschränkungen in den Zellen bedingt sein und würde zudem durch die Verringerung der Oberflächengröße im Verhältnis zum Volumen eine energetisch günstigere Form darstellen. LD Fusionsprozesse konnten in bisherigen Studien erst relativ selten beobachtet werden, jedoch lassen einige Beobachtungen in meiner Studie vermuten, dass Fusion an der Bildung der GLDs beteiligt ist.

Der GLD Phänotyp kann außer bei Zellen mit erhöhtem Lipidgehalt, die CG9186:EGFP überexprimieren, ebenfalls nach Überexpression der mutanten Version CG9186(S119A):EGFP festgestellt werden. Zusätzlich kann nach Überexpression beider CG9186 Varianten eine Clusterbildung der LDs beobachtet werden (siehe z.B. Abb. 3.26, A und B). Dies lässt vermuten, dass durch die Überexpression von CG9186(S119A) zunächst LD Cluster entstehen und sich durch Fusion aus den vielen kleinen LDs der Cluster die GLDs bilden. Aufgrund dieser Hypothese wurde untersucht, ob die LD Cluster und GLDs nur ab einem bestimmten Zeitpunkt vorzufinden sind. Um den Zeitraum der Entstehung von GLDs einzugrenzen, wurde die LD Morphologie zu bestimmten Zeitpunkten nach transienter Transfektion der Zellen mit den CG9186 Varianten und Zugabe von OA untersucht (siehe Abb. 3.27, A-B''). Hierdurch konnte die Zeitabhängigkeit des GLD Phänotyps gezeigt werden. Dabei liegen nach Überexpression der CG9186(S119A) Variante zunächst Cluster kleiner LDs vor und nach etwa 48h sind die GLDs ausgebildet. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass GLDs aus den LD Clustern entstehen und der mögliche Fusionsprozess erst nach der Clusterbildung der LDs (nach etwa 40h) stattfinden kann. Auch die LD Cluster bzw. die einzelnen LDs der Cluster wachsen im Verlauf der Zeit nach Zugabe von OA noch an, so dass möglicherweise nach 40h die maximale Lipid-Speichermenge erreicht und dadurch die Neigung der LDs zum Fusionieren am größten ist.

Um die mögliche Fusion zu verfolgen, könnte dies in folgenden Studien mit „Live Imaging“ genauer analysiert werden. Es wurde gezeigt, dass Fusion abhängig ist von Komponenten des Zytoskeletts und solchen, die an vesikulären Fusionsprozessen in der Zelle beteiligt sind, wie z.B. SNARE Proteinen (Boström et al. 2005; Boström et al. 2007). Durch Testen bestimmter Zytoskelett-Inhibitoren wie Nocodazol oder Colchizin auf Beeinträchtigung der möglichen LD Fusionsprozesse und anschließender Kombination der CG9186(S119A) Überexpression mit diesen Inhibitoren bzw. RNAi-vermitteltem knock-down gegen Komponenten von Fusionsprozessen könnten Aufschlüsse darüber gewonnen werden, ob CG9186 an solchen Mechanismen beteiligt ist. Wird dadurch keine Verminderung der Ausbildung des GLD Phänotyps beobachtet, so ist es vorstellbar, dass CG9186 direkt bei der lokalisierten Lipid-Biosynthese am ER in direkter Nähe zu LDs beteiligt ist (siehe auch 1.3 und 4.4), da das Protein

eine duale Lokalisation in beiden subzellulären Kompartimenten zeigt (siehe z.B. Abb. 3.17).

Die Regulation der LD Größe ist bisher ungeklärt, jedoch scheinen LD assoziierte Proteine eine wichtige Funktion bei diesen Prozessen zu erfüllen (1.3). Mehrere neue Studien berichten, dass der Phospholipid-Zusammensetzung der LD Hemimembran eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation der LD Größe und Verteilung zukommt (Szymanski et al. 2007; Guo et al. 2008; Fei et al. 2008; Fei, Shui, et al. 2011; Kraemer et al. 2011). Es ist vorstellbar, dass CG9186 eine Funktion beim Phospholipid-Metabolismus erfüllt und die durch Überexpression der CG9186 Varianten hervorgerufenen LD Phänotypen (Cluster bzw. GLDs) durch ein Ungleichgewicht zwischen TAG- und Phospholipid-Synthese zustande kommen (siehe 4.4).

4.4 Eine mögliche Funktion von CG9186 im Phospholipid-Metabolismus?

Ein besseres Verständnis von der Fusion oder generell dem Wachstum von LDs wäre von hoher Bedeutung. Die bisher erwähnten Daten sprechen für eine Beteiligung vom Serin 119 an der Funktion von CG9186. Das Auftreten der LD Cluster und GLDs nach Überexpression der CG9186 Varianten geben einen ersten Hinweis darauf, dass die LD Phospholipid-Zusammensetzung unter diesen Konditionen beeinflusst sein könnte (siehe auch 4.3). Somit stellte sich die Frage, welche spezifische Funktion bzw. welche enzymatische Aktivität CG9186 besitzt.

Erst kürzlich wurden Studien mit dem murinen CG9186 Homolog begonnen, die anhand von enzymatischen Tests mehr Hinweise darüber geben sollen, welche Substratspezifität das Protein besitzt (V. Haberl 2011). Die Maus besitzt drei Isoformen des CG9186 Homologen, wovon jede das für Esterasen/Lipasen typische Sequenzmotiv GX SXG aufweist. In diesen Studien wurde auch gefunden, dass sowohl Isoform 1 des murinen Homologs als auch CG9186 (an Position 66) das für AzyI-Transferasen typische H(X)₄D Sequenzmotiv besitzen. Wie CG9186 lokalisieren alle Isoformen sowohl am ER als auch an LDs und werden sehr stark im Fettgewebe exprimiert. Erste Hinweise solcher enzymatischer Studien in COS-7 Zellen deuten darauf hin, dass die murinen Isoformen 2 und 3 *in vitro* eine schwache Lysophosphatidyl-AzyI-KoA Transferase

Aktivität besitzen. Beide Isoformen besitzen kein H(X)₄D Sequenzmotiv, allerdings wurde auch nur für bisher wenige Proteine gezeigt, dass dieses Motiv für eine Azyl-Transferase Aktivität essentiell ist (Heath & Rock 1998; Lewin et al. 1999; Yamashita et al. 2007; Shindou & Shimizu 2009). Zudem wird anhand dieser Studien vermutet, dass die Überexpression der murinen Isoformen 1 und 3 zu einem Transfer der Fettsäuren von TAG auf Phospholipide führt, da in Anwesenheit von radioaktiv-markierter Ölsäure ein vermehrter Einbau in Phospholipide beobachtet werden konnte.

Es ist durchaus vorstellbar, dass CG9186 eine Rolle im Glyzerophospholipid-Metabolismus spielt. Azyl-Transferasen wie die Lysophosphatidyl-Azyl-KoA Transferase erfüllen bei den daran beteiligten Prozessen wichtige Funktionen. Wie bereits unter 1.3 erwähnt, haben mutierte Enzyme, die im Phospholipid-Metabolismus beteiligt sind, wie z.B. Cytidintriphosphat:Phosphocholin-Cytidyltransferase 1 (Guo et al. 2008; Kraemer et al. 2011), eine veränderte LD Größe zur Folge. Dies ist auf ein Ungleichgewicht zwischen Phospholipid- und TAG-Synthese zurückzuführen. Eine veränderte Morphologie und Verteilung der LDs konnte beispielsweise bei *fldp1* (*seipin*) mutanten Zellen des Menschen und der Hefe beobachtet werden. Die beobachteten Veränderungen konnten hierbei mit einer Beeinflussung der Phospholipid-Zusammensetzung der LD Hemimembran erklärt werden (Szymanski et al. 2007; Fei et al. 2008; Boutet et al. 2009; Wolinski et al. 2011). Neben der veränderten, zellulären LD Verteilung wurde Seipin auch in weiteren Studien als beeinflussender Faktor der Adipogenese/Lipogenese identifiziert (Payne et al. 2008; Chen et al. 2009; Fei, H. Li, et al. 2011; Tian et al. 2011). Durch die sehr ähnlichen LD Phänotypen, die durch Überexpression der CG9186 Varianten bzw. Beeinflussung von Komponenten des Phospholipid-Metabolismus hervorgerufen werden, kann vermutet werden, dass auch CG9186 (direkt oder indirekt) durch eine Veränderung der Phospholipid-Zusammensetzung die Größe und Verteilung der LDs beeinflusst. Die abgeleitete Esterase/Lipase-Aktivität von CG9186 wäre ein weiteres Indiz für eine Beteiligung am Lipid-Metabolismus, wobei die Substrat-Spezifität des Proteins jedoch noch unbekannt ist. Zudem lokalisiert das Protein sowohl an den LDs als auch am ER, an welchem die meisten Schritte der Neutrallipid- und Phospholipid-Synthese stattfinden. Es wurde bereits nachgewiesen, dass das Wachstum der LDs durch lokale Synthese von TAG und Phospholipiden durch die Enzyme DGAT (Kuerschner et al. 2008) bzw.

Lysophosphatidylcholin-Azyltransferase (Moessinger et al. 2011) und Cytidintriphosphat:Phosphocholin-Cytidyltransferase (Krahmer et al. 2011) direkt an der LD Oberfläche stattfindet. DGAT2 beispielsweise zeigt wie CG9186 auch eine duale Lokalisation am ER und den LDs (Kuerschner et al. 2008; Stone et al. 2009).

Die Phospholipid-Hauptbestandteile der LD Hemimembran Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin (PC) werden vorwiegend über den Lands Zyklus und den „Kennedy pathway“ gebildet bzw. modifiziert (siehe 1.3). Geht man für CG9186 von einer Lysophosphatidyl-Azyl-KoA Transferase ähnlichen Funktion als Azyl-Transferase aus (siehe oben), so wäre eine Rolle im Lands Zyklus naheliegend. Es ist bekannt, dass ein hoher PC-Anteil in der Membran die LD Clusterbildung begünstigt (z.B. Übersichtsartikel Thiele & Spandl 2008), die Fusion von LDs hingegen verhindert (Krahmer et al. 2011). Vorstellbar wäre, dass durch CG9186 Überexpression die PC Synthese verstärkt wird, wodurch viele LD Cluster in Zellen vorgefunden werden können, die Fusion dieser jedoch verhindert wird. Durch Überexpression der möglichen inaktiven Variante CG9186(S119A) hingegen wäre der PC Gehalt erniedrigt, wodurch das Fusionieren und somit die Bildung der GLDs gegeben wäre (siehe Abb. 4.1). Da PC aus DAG im „Kennedy pathway“ gebildet wird, würde nach verstärkter PC Bildung DAG gleichzeitig nicht mehr für die TAG Synthese zur Verfügung stehen. Dies würde erklären, warum eine Clusterbildung vieler einzelner LDs, jedoch keine Fusion der LDs stattfindet, da die Oberfläche der Organellen im Verhältnis zum Volumen vergrößert werden würde.

<u>Überexpression:</u>		<u>LDs:</u>
CG9186:EGFP	→ PC ↑ DAG ↓	→ Cluster ↑ Fusion ↓
CG9186(S119A):EGFP	→ PC ↓ DAG ↑	→ Fusion ↑ GLDs ↑

Abb. 4.1: Hypothetischer Einfluss der CG9186 Überexpression auf den Glycerophospholipid-Metabolismus

Um die Hypothese zu untersuchen, dass CG9186 am Glycerophospholipid-Metabolismus beteiligt ist, könnte in zukünftigen Studien durch eine Kombination von RNAi-vermitteltem knock-down solcher Komponenten, die an Reaktionen zur Synthese von Neutral- und Phospholipiden beteiligt sind, und Überexpression der

CG9186 Varianten bzw. *CG9186* RNAi getestet werden, ob eine genetische Interaktion vorliegt. Wird der LD Phänotyp durch eine knock-down Kondition verstärkt bzw. vermindert, so würde dies für eine Beteiligung des jeweiligen Gens als Aktivator bzw. Repressor zur Ausbildung des Phänotyps im gleichen oder einem anderen Signalweg sprechen. Zusätzlich könnte man mittels Dünnschichtchromatografie oder „Lipidomics“ untersuchen, ob die Lipidzusammensetzung in *CG9186* überexprimierenden bzw. *CG9186* knock-down Zellen und Fliegen verändert ist, um so Aufschlüsse über eine Beteiligung beim Phospholipid-Metabolismus zu gewinnen.

Fasst man die vorliegenden Ergebnisse zusammen, so wird deutlich, dass mit *CG9186* in dieser Studie ein LD-assoziiertes Faktor identifiziert wurde, der in nachfolgenden Analysen viele neue Erkenntnisse über die Mechanismen der LD Größenregulation geben kann. Gerade die mögliche Beteiligung am Glycerophospholipid-Metabolismus könnte wichtige Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen Phospholipid-Zusammensetzung der LD Membran und Größe liefern, ein Gebiet, das noch weitgehend unerforscht ist. Zudem könnte *CG9186* als Marker für Fusionsprozesse dienen, die möglicherweise konserviert sind. *CG9186* ist evolutionär stark konserviert, jedoch das bisher erste charakterisierte Protein dieser Homologe und bietet somit einen ersten Zugang zu LD Fusionsmechanismen. Insbesondere weiterführende Studien in Säugern könnten in Zukunft wichtige Hinweise auf Regulationsmechanismen liefern, deren Störung zu metabolischen Krankheiten wie Adipositas oder Lipodystrophie führt.

5. Zusammenfassung

Die Speicherung von Lipiden zur Bereitstellung von Energie und metabolischer Bausteine ist ein zentrales Element des Lebens. Mengenmäßig stellen Lipide die bedeutsamste Energiespeicherform dar und tragen maßgeblich zur Energie-Homöostase bei, d.h. der Balance zwischen Aktivität, Energiespeicherung und Speichermobilisierung, die durch einen komplexen Regelkreis erreicht wird. Eine Fehlregulation der Energie-Homöostase hat drastische Konsequenzen für den Organismus, die in Anbetracht humaner, metabolischer Krankheiten wie Adipositas, Diabetes oder Lipodystrophie offensichtlich sind.

Zellen aller Organismen speichern Lipide in spezialisierten Organellen, den so genannten Lipidtröpfchen („Lipid droplets“, LDs). LDs agieren als wichtige regulatorische Plattform für die zelluläre und organismische Energiespeicherung. Trotz ihrer Bedeutung sind viele Fragen zur Zellbiologie, zum Mechanismus der Entstehung der LDs und ihres Wachstums bisher weitestgehend unerforscht.

In den letzten Jahren wurde zunehmend eine Reihe von Hochdurchsatzverfahren zur Identifikation von Regulatoren der Lipidspeicherung etabliert und durchgeführt. So konnte in Studien mit *Drosophila* und Säuger Zellkulturzellen gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust des COPI-vermittelten Vesikeltransports vom Golgi zum ER zu erhöhter Lipidspeicherung führt.

Ziel meiner Arbeit war es, die Rolle von COPI in der Lipidspeicherung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* näher zu untersuchen. Anhand von Studien mit transgenen Fliegen konnte ich zeigen, dass COPI auch im Organismus an der Regulation der Speicherlipidmenge beteiligt ist. Während der RNAi-vermittelte knock-down von bestimmten Komponenten zu erhöhten Speichermengen führt, führt die Überexpression der entsprechenden Komponenten zu einer Reduktion des Lipidspeichers.

Im weiteren Verlauf der Studie wurde die Funktion von COPI bei der LD Proteinlokalisierung untersucht. Daher konnte ich die LD-assoziierte, annotierte Esterase/Lipase CG9186 als einen möglichen Interaktionspartner von COPI identifizieren. Die Expression von CG9186 in Zellen mit reduzierter COPI Funktion resultiert in stark vergrößerten, deformierten LDs. Außerdem hat die Überexpression von CG9186 sowohl in Zellkulturzellen als auch in der larvalen Speicheldrüse die Bildung von LD Clustern zur Folge. Diese Ergebnisse lassen auf

eine Rolle von CG9186 bei der Positionierung und Größenregulation von LDs schließen. Eine weiterführende Charakterisierung von CG9186 und dessen Einbindung in entsprechende Regelkreise kann maßgeblich dazu beitragen, die an der LD Größenregulation beteiligten Mechanismen aufzuklären.

6. Anhang

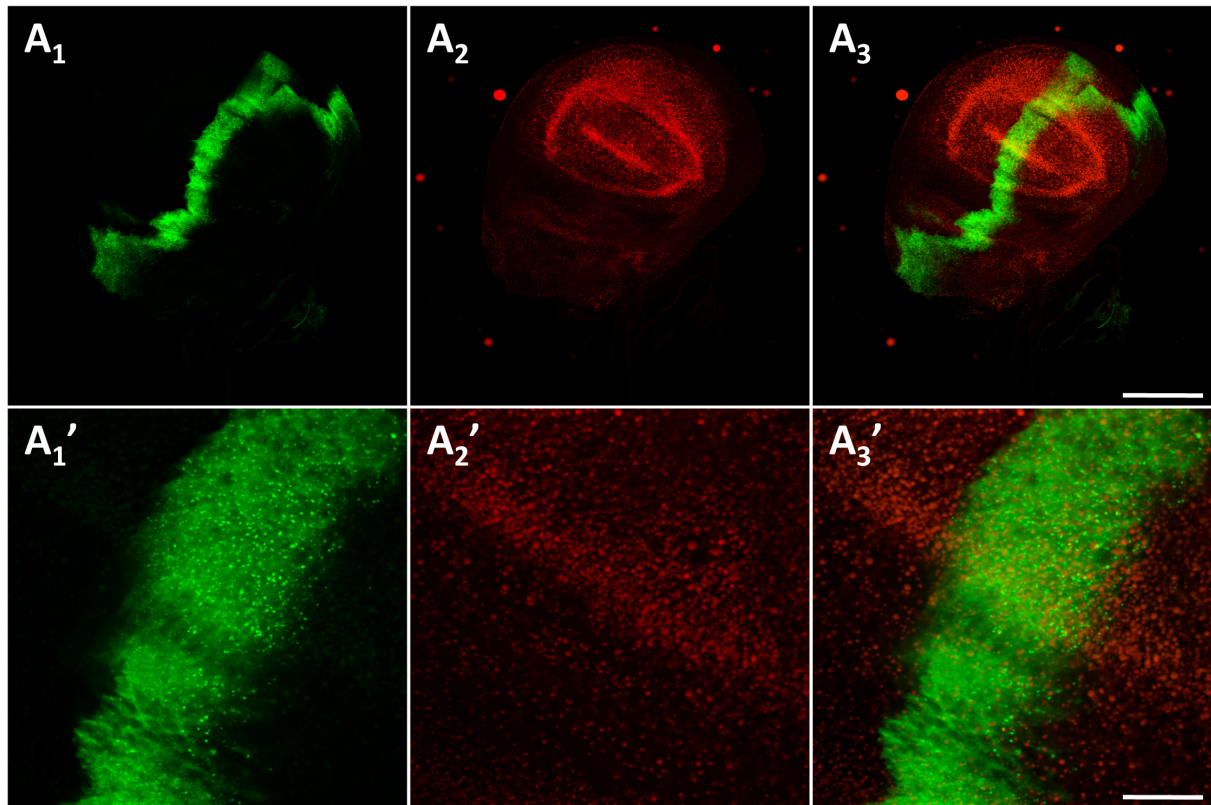


Abb. 6.1: Überexpression von α COP:EGFP in der larvalen Flügelimaginalscheibe

Flügelimaginalscheiben von L3 Larven, die α COP:EGFP (Insertionslinie #10) mittels Gal4, welches unter Kontrolle des *patched* Promotors exprimiert wird, stark in einem Streifen überexprimieren (grün), wurden fixiert und die LDs mit Nile red gefärbt (rot). A₁, A₁' : EGFP Signal, A₂, A₂' : Nile red Signal (LDs), A₃, A₃' : Überlagerung beider Kanäle. In der *patched* Expressionsdomäne der Flügelimaginalscheibe lokalisiert α COP:EGFP punktförmig, ähnlich wie es auch in Kc167 Zellen beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3.6, A und B). Ein Unterschied in Bezug auf die LD Größe oder LD Anzahl zwischen α COP überexprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen ist in der Flügelimaginalscheibe nicht zu erkennen. Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 150 μ m (A₁-A₃) bzw. 25 μ m (A₁'-A₃').

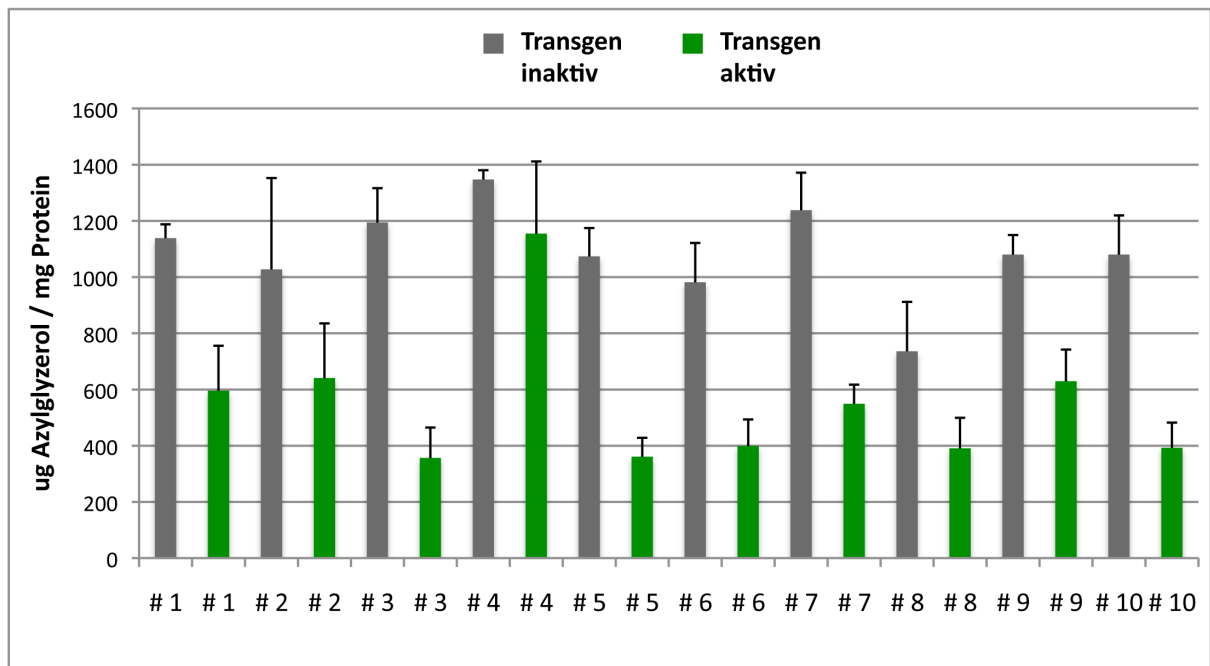


Abb. 6.2: Überexpression von α COP:EGFP im FK resultiert in einer Dosis-abhängigen Reduktion des organismischen Gesamtlipidgehalts

Der Gesamtlipidgehalt von L3 Larven der gleichen Kreuzungen wie in Abb. 3.9 beschrieben wurde mittels CCA (siehe 2.2.3.3) bestimmt. Dargestellt sind die Gesamtlipidgehalt-Werte aller generierten α COP Insertionslinien (#1-10; siehe auch 2.1.7). Die Überexpression von α COP:EGFP aller Insertionslinien reduziert den Gesamtlipidgehalt der Larven. Dargestellt werden die Mittelwerte von den vier bis sechs Datenpunkten mit der entsprechenden Standardabweichung.

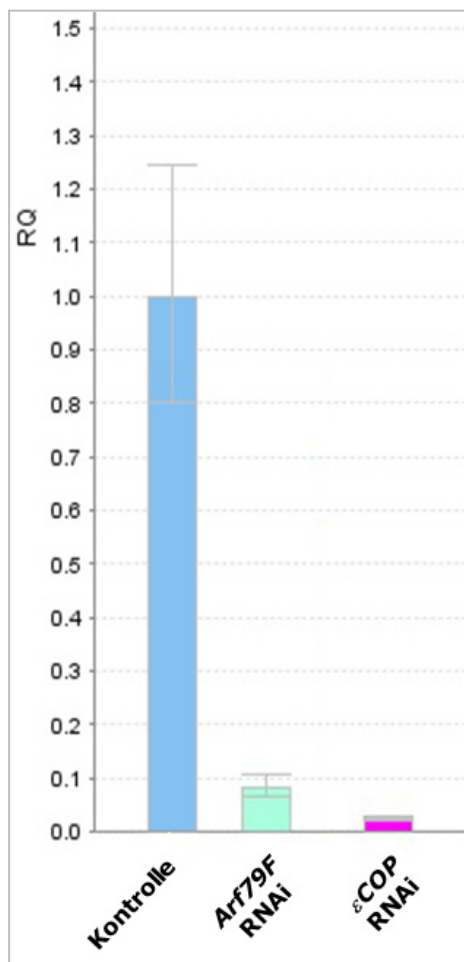


Abb. 6.3: Effiziente Reduktion der Zieltranskripte nach RNAi-vermitteltem *Arf79F* und α COP knock-down in Kc167 Zellen

RNAi behandelte Kc167 Zellen („Bathing“ Protokoll, siehe 2.2.4.4 (a); blau: Kontrolle ohne dsRNAs; grün: *Arf79F* RNAi (DRSC31426); pink: α COP RNAi (DRSC35610)) wurden für drei Tage in Abwesenheit von OA inkubiert. Nach RNA-Extraktion (2.2.2.2) und cDNA-Synthese (2.2.2.4) erfolgte eine qRT-PCR (2.2.2.7), um die Menge der Transkripte von *Arf79F* und α COP zu quantifizieren. Als Referenz-Gen der relativen Quantifizierung (RQ) diente *Actin 5C*. In Bezug auf die Kontrolle (100%) ist die Transkript-Menge nach RNAi-vermitteltem knock-down von *Arf79F* bzw. α COP jeweils auf weniger als 10% reduziert.

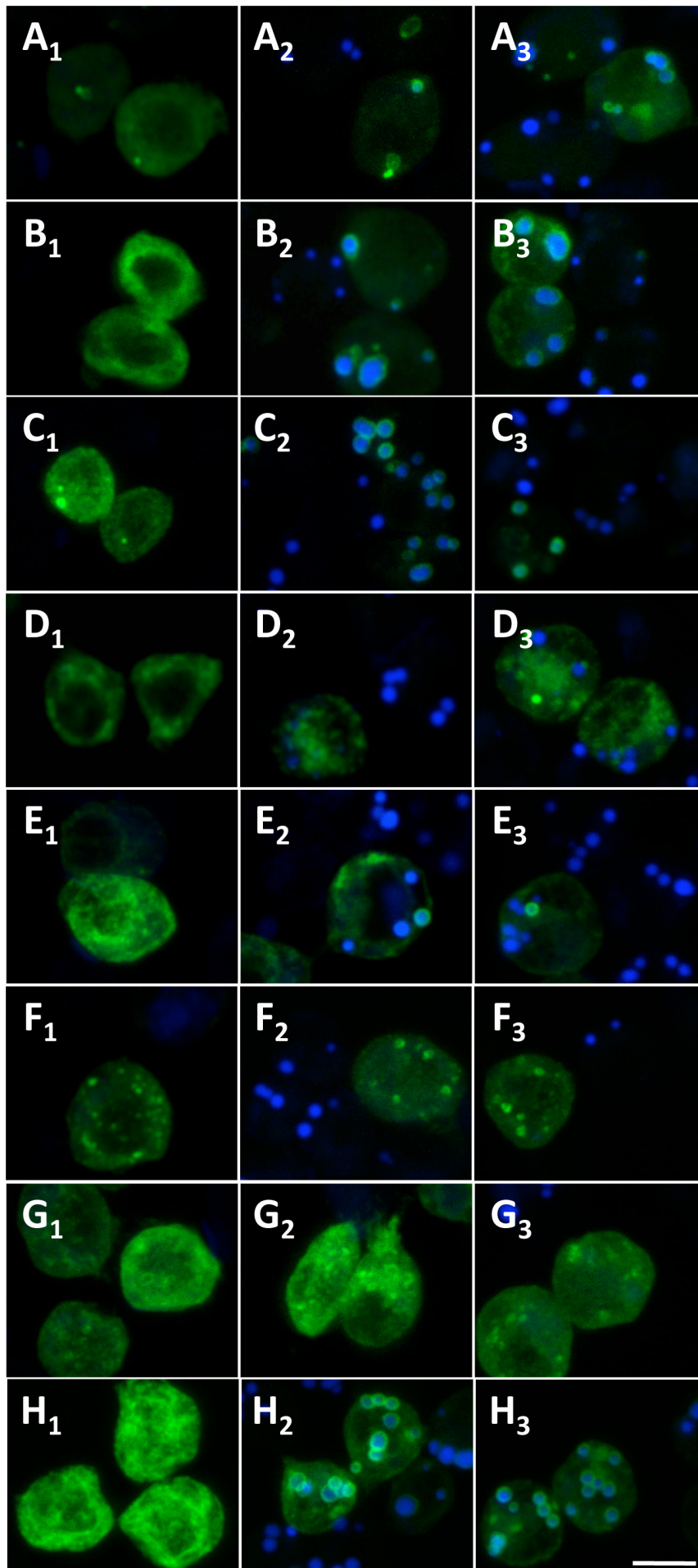


Abb. 6.4: Wechselwirkungen zwischen der Überexpression von LD-assoziierten Proteinen und der RNAi-vermittelten Herabregulation von COPI Komponenten

Kc167 Zellen wurden gleichzeitig mit H₂O (A₁-H₁ (Kontrollen)) oder dsRNAs gegen COPI Komponenten (A₂-H₂: α COP (DRSC30831), A₃-H₃: γ COP (DRSC31264)) und Expressionskonstrukten EGFP-fusionierter LD Proteine (grün dargestellt; pAkt-Gal4 + A: pUAST-PLIN1:EGFP, B: pUAST-PLIN2:EGFP, C: pTGW-CG42351, D: pTGW-SesB, E: pTGW-CG2254, F: pUAST-Bmm:EGFP, G: pTGW-CG11055, H: pTGW-CG9186) transfiziert (siehe 2.2.4.4 (b)) und ohne die Zugabe von OA für vier Tage inkubiert. Die Zellen wurden darauf fixiert und die LDs mit LipidTOX Deep Red angefärbt (blau). Überexpression der annotierten Lipase CG9186 resultiert oftmals in der Bildung von kleinen LD Clustern (H₁, H₂), die Überexpression von PLIN2 hat leicht vergrößerte LDs zur Folge (B₂, B₃). Z-Stapel Bilder (maximale Projektionen) wurden mit dem Leica TCS SP5 Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 5 μ m.

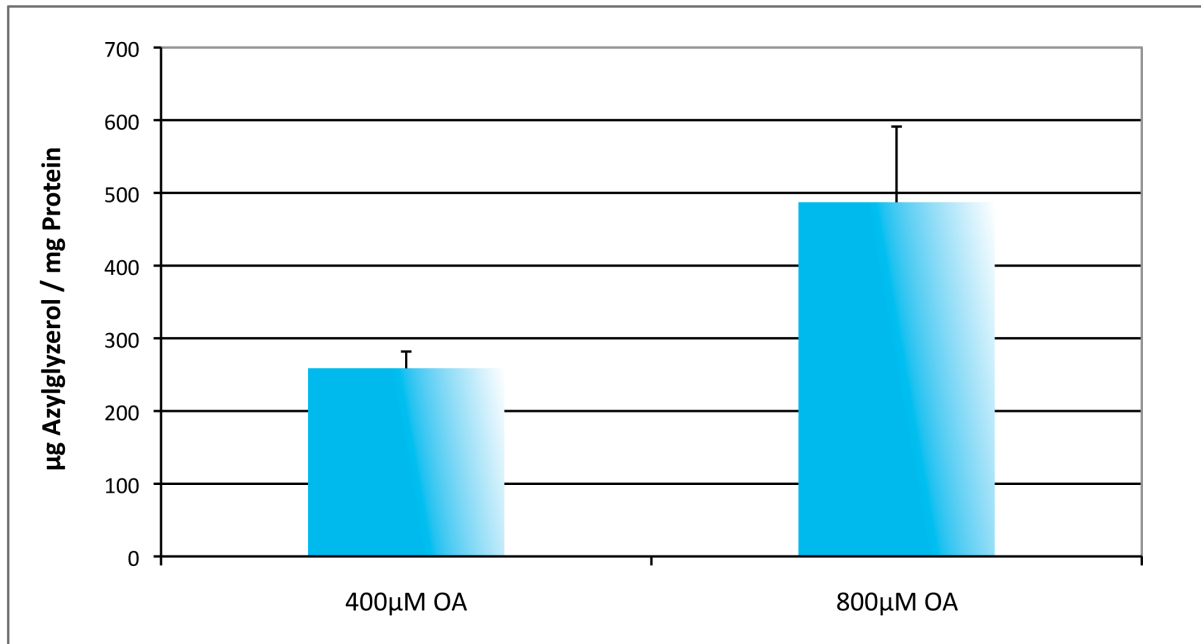


Abb. 6.5: Quantifizierung des Gesamtlipidgehalts von Kc167 Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen an OA inkubiert wurden

Kc167 Zellen wurden etwa 48h mit 400µM bzw. 800µM OA inkubiert. Eine Methanol-Chloroform-Extraktion der Lipide wurde durchgeführt und der Gesamtlipidgehalt der Zellen anschließend bestimmt (siehe 2.2.3.2). Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils drei Datenpunkten mit der entsprechenden Standardabweichung. Die Abb. zeigt ein Ergebnis, das mit drei unabhängigen Wiederholungsexperimenten reproduziert wurde.

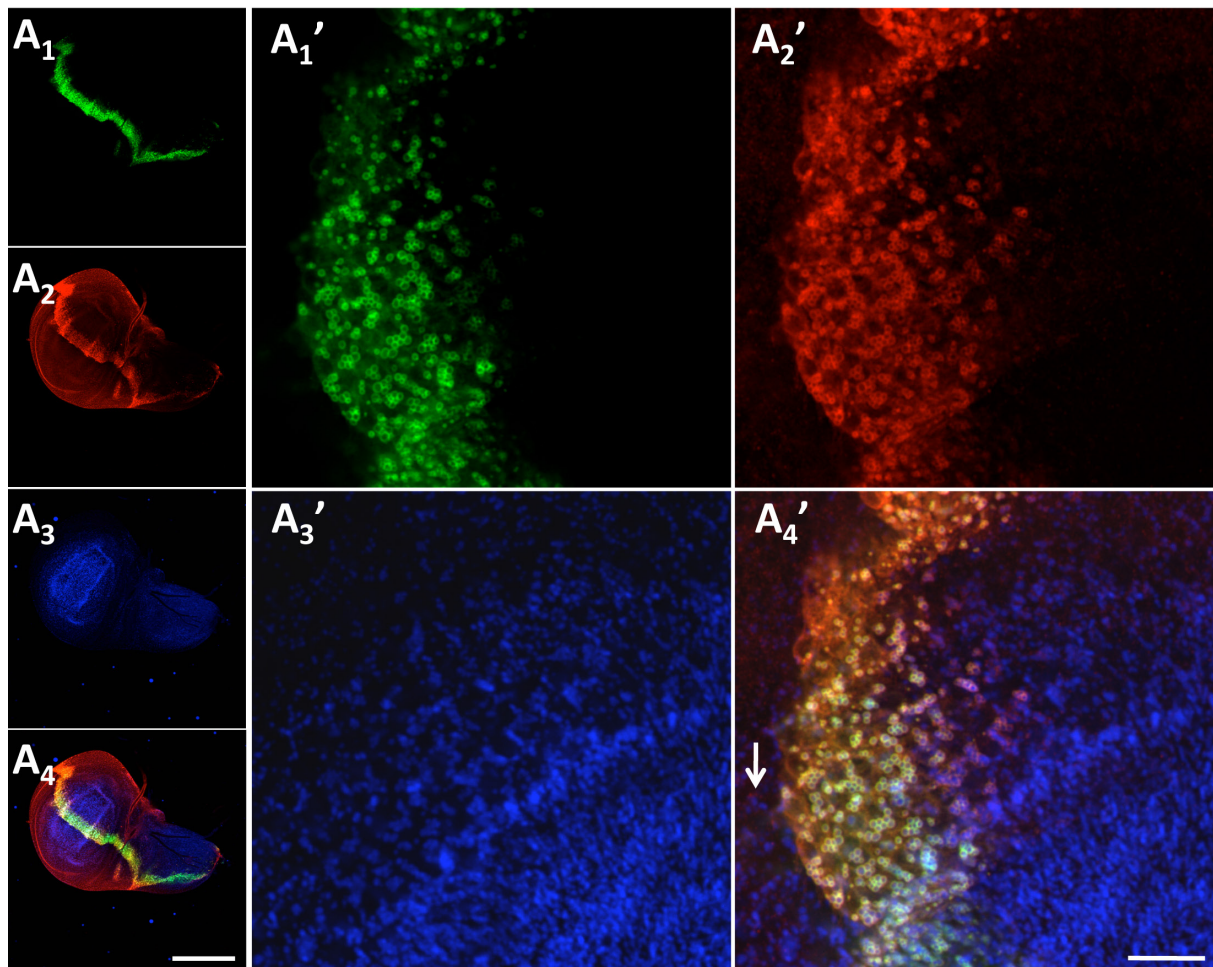


Abb. 6.6: AK-Test an CG9186:EGFP überexprimierenden Flügelimaginalscheiben von L3 Larven

Der CG9186 AK #2 wurde an Flügelimaginalscheiben von L3 Larven, die CG9186:EGFP (Insertionslinie #7) durch Gal4, welches unter Kontrolle des *patched* Promotors steht, überexprimieren, getestet und die LDs mit LipidTOX Deep Red angefärbt. Gleichzeitig konnte untersucht werden, ob das endogene CG9186 in diesem Gewebe exprimiert wird. A₁, A₁' : EGFP Signal (grün), A₂, A₂' : AK Signal (rot), A₃, A₃' : LipidTOX Signal (LDs; blau), A₄, A₄' : Überlagerung der drei Kanäle. Während das endogene CG9186 mit dem AK nur schwach detektiert wird (A₄', Pfeil), gibt es ein sehr starkes AK Signal in dem Streifen der Flügelimaginalscheibe, in dem CG9186:EGFP überexprimiert wird (gelb: Kolokalisation). Das überexprimierte EGFP Fusionsprotein lokalisiert an allen LDs der Flügelimaginalscheibe (A₄'). Bilder wurden mit dem Leica TCS SP2 AOBS Mikroskop aufgenommen. Die Maßstabskala entspricht 150µm (A₁-A₄) bzw. 15µm (A₁'-A₄').

7. Literaturverzeichnis

- Alberts B, Bray D, Lewis J, et al., 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition. New York: *Garland Science*.
- Andersson, L. et al., 2006. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *Journal of cell science*, 119(Pt 11), pp.2246-57.
- Antonny, B. et al., 1997. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*, 36(15), pp.4675-84.
- Arrese, E.L. et al., 2001. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect biochemistry and molecular biology*, 31(1), pp.7-17.
- Ashburner, M., 1989. *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual*. Two volumes. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Baker, K.D. & Thummel, C.S., 2007. Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell metabolism*, 6(4), pp.257-66.
- Bartz, R., Zehmer, J.K., et al., 2007. Dynamic Activity of Lipid Droplets: Protein Phosphorylation and GTP-Mediated Protein Translocation. *Journal of Proteome Research*, pp.3256-3265.
- Bartz, R., Li, W.-H., et al., 2007. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *Journal of lipid research*, 48(4), pp.837-47.
- Beck, R. et al., 2009. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS letters*, 583(17), pp.2701-9.
- Beckendorf, S.K. & Kafatos, F.C., 1976. Differentiation in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*: characterization of the glue proteins and their developmental appearance. *Cell*, 9(3), pp.365-73.
- Belle, J. E. L., et al., 2002. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy. *NMR Biomed.*, 15: 37-44.
- Beller, M. et al., 2008. COPI Complex Is a Regulator of Lipid Homeostasis. *PLoS Biology*, 6(11).
- Beller, M. et al., 2006. Characterization of the *Drosophila* lipid droplet subproteome. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 5(6), pp.1082-94.
- Beller, M. et al., 2010. PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in *Drosophila*. *Cell metabolism*, 12(5), pp.521-32.

-
- Bharucha, K.N., 2009. Developmental Biology: Model Systems - A Series of Reviews. The Epicurean Fly: Using *Drosophila Melanogaster* to Study Metabolism. *Pediatric Research*, 65(2), pp.132-137.
- Bickel, P.E., Tansey, J.T. & Welte, M.A., 2009. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(6), pp.419-40.
- Blagitko, N. et al., 1999. γ 2-COP, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome. *Human molecular genetics*, 8(13), pp.2387-96.
- Blanchette-Mackie, E.J. et al., 1995. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *Journal of lipid research*, 36(6), pp.1211-26.
- Bolanos-Garcia, V.M. & Miguel, R.N., 2003. On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 83(1), pp.47-68.
- Bonifacino, J.S. & Glick, B.S., 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), pp.153-66.
- Boström, P. et al., 2005. Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(9), pp.1945-51.
- Boström, P. et al., 2007. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nature cell biology*, 9(11), pp.1286-93.
- Boutet, E. et al., 2009. Seipin deficiency alters fatty acid Delta9 desaturation and lipid droplet formation in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *Biochimie*, 91(6), pp.796-803.
- Brand, A.H. & Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), pp.401-15.
- Brasaemle, D.L. et al., 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 279(45), pp.46835-42.
- Brasaemle, D.L., 2007. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of lipid research*, 48(12), pp.2547-59.
- Brown, D.A., 2001. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Current biology: CB*, 11(11), pp.R446-9.
- Buszczak, M. et al., 2002. Mutations in the *midway* gene disrupt a *Drosophila* acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase. *Genetics*, 160(4), pp.1511-8.

-
- Carman, G.M. & Han, G.-S., 2009. Regulation of phospholipid synthesis in yeast. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, pp.S69-73.
- Carrasco, N., Tahara, S.M. & Patel, L., 1982. Preparation, characterization, and properties of monoclonal antibodies against the *lac* carrier protein from *Escherichia coli*. *Proteins*, 79(November), pp.6894-6898.
- Cermelli, S. et al., 2006. The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Current biology : CB*, 16(18), pp.1783-95.
- Chen, W. et al., 2009. The human lipodystrophy gene product Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2/seipin plays a key role in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 150(10), pp.4552-61.
- Cheng, J. et al., 2009. Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochemistry and cell biology*, 132(3), pp.281-91.
- Cherbas, L. & Cherbas, P., 1998. Cell Culture, 319-346. In *Drosophila: A practical Approach*, edited by D.B. Roberts. *Oxford University Press*. Oxford.
- Cherry, S. et al., 2006. COPI Activity Coupled with Fatty Acid Biosynthesis Is Required for Viral Replication. *PLoS Pathog* 2(10): e102.
- Chien, S. et al., 2002. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic acids research*, 30(1), pp.149-51.
- Chintapalli, V.R., Wang, J. & Dow, J.A., 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature genetics*, 39(6), pp.715-20.
- Davis, T.N. et al., 1986. Isolation of the yeast calmodulin gene : Calmodulin is an essential protein. *Electrophoresis*, pp.423-431.
- DiDonato, D. & Brasaemle, D.L., 2003. Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 51(6), pp.773-80.
- Demerec, M., 1994. *Biology of Drosophila*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Donaldson, J.G. et al., 1992. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(14), pp.6408-12.
- Duden, R. et al., 1991. Beta-COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to beta-adaptin. *Cell*, 64(3), pp.649-65.
- Duden, R et al., 1998. epsilon-COP is a structural component of coatamer that functions to stabilize alpha-COP. *The EMBO journal*, 17(4), pp.985-95.

-
- Duden, R. et al., 1994. Yeast beta- and beta'-Coat Proteins (COP). *Yeast*, pp.24486-24495.
- Edgar, B.A., 2006. How flies get their size: genetics meets physiology. *Nature reviews. Genetics*, 7(12), pp.907-16.
- Eggers, J., 1998. Coalescence of Spheres by Surface Diffusion. *Physical Review Letters*, 80(12), pp.2634-2637.
- Elong, E.N. et al., 2011. Interaction between the Triglyceride Lipase ATGL and the Arf1 Activator GBF1. *PLoS ONE*, 6(7), p.e21889.
- Fei, W., Shui, G., et al., 2011. A Role for Phosphatidic Acid in the Formation of "Supersized" Lipid Droplets. *PLoS Genetics*, 7(7), p.e1002201.
- Fei, W. et al., 2008. Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *The Journal of cell biology*, 180(3), pp.473-82.
- Fei, W., Li, H., et al., 2011. Molecular characterization of seipin and its mutants: implications for seipin in triacylglycerol synthesis. *Journal of lipid research*, 52(12), pp.2136-47.
- Feng, Y. et al., 2003. Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), pp.6469-74.
- Fiedler, K. et al., 1996. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5280), pp.1396-9.
- Flatt, J.-P., 1995. Use and storage of carbohydrate and fat. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 952S-959S
- Franco, M. et al., 1996. Myristoylation-facilitated Binding of the G Protein ARF1 GDP to Membrane Phospholipids Is Required for Its Activation by a Soluble Nucleotide Exchange Factor. *Biochemistry*, 271(3), pp.1573-1578.
- Frank, P.G. & Marcel, Y.L., 2000. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *Journal of lipid research*, 41(6), pp.853-72.
- Fraenkel, G. & Brookes, V. J., 1953. The process by which the puparia of many species of flies become fixed to a substrate. *Biol. Bull* 105:442-449.
- Friedman, J.M., 2004. Modern science versus the stigma of obesity. *Nature medicine*, 10(6), pp.563-9.
- Futatsumori, M., 2000. Identification and Characterization of Novel Isoforms of COP I subunits. *J Biochem*, 128 (5): 793-801.
- Garg, A. & Agarwal, A., 2009. Lipodystrophies: Disorders of adipose tissue biology. *Nutrition*, 1791(6), pp.507-513.

-
- Gilbert, L.I. & Chino, H., 1974. Transport of lipids in insects. *Journal of lipid research*, 15(5), pp.439-56.
- Gloor, G.B., et al., 1993. Type I repressors of P element mobility. *Genetics*, 135(1):81-95.
- Gocze, P. M. & D. A. Freeman, 1994. Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 Leydig tumor cells. *Cytometry*, 7(2): 151-8.
- Goldberg, A.A. et al., 2009. A novel function of lipid droplets in regulating longevity. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 5), pp.1050-5.
- Granneman, J.G. et al., 2009. Functional interactions between Mldp (LSDP5) and Abhd5 in the control of intracellular lipid accumulation. *The Journal of biological chemistry*, 284(5), pp.3049-57.
- Graveley et al., 2011. The Developmental Transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 471(7339), pp.473-479.
- Greenspan, P., E. P. Mayer, et al., 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, 100(3): 965-73.
- Grieder, N.C. et al., 2008. gammaCOP is required for apical protein secretion and epithelial morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 3(9), p.e3241.
- Grieder, N.C., Kloter, U. & Gehring, W.J., 2005. Expression of COPI components during development of *Drosophila melanogaster*. *Gene expression patterns: GEP*, 6(1), pp.11-21.
- Grönke, S. et al., 2005. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell metabolism*, 1(5), pp.323-30.
- Grönke, S. et al., 2003. Control of Fat Storage by a *Drosophila* PAT Domain Protein. *Current*, 13, pp.603-606.
- Guo, Q., Vasile, E. & Krieger, M., 1994. Disruptions in Golgi structure and membrane traffic in a conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by epsilon-COP. *The Journal of cell biology*, 125(6), pp.1213-24.
- Guo, Y. et al., 2008. Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature*, 453(7195), pp.657-61.
- Haberl, V., 2011. Klonierung und biochemische Charakterisierung muriner Homologe der putativen Triglyceridhydrolase CG9186 von *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit. Graz.
- Heath, R.J. & Rock, C.O., 1998. A Conserved Histidine Is Essential for Glycerolipid Acyltransferase Catalysis. *J Bacteriol.*, 180(6): 1425-1430.
- Henneberry, A. & McMaster, C., 1999. Cloning and expression of a human choline/ethanolaminephosphotransferase: synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Society*, 298, pp.291-298.

-
- Higuchi, R. et al., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10(4):413-417.
- Hildebrandt, A., Bickmeyer, I. & Kühnlein, R.P., 2011. Reliable *Drosophila* Body Fat Quantification by a Coupled Colorimetric Assay. *PLoS ONE*, 6(9), p.e23796.
- Hishikawa, D. et al., 2008. Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp.2830-5.
- Hodges, B.D. & Wu, C.C., 2010. Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *Journal of lipid research*, 51(2), pp.262-73.
- Holm, C., 2003. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 6), pp.1120-4.
- Horn, T. & Boutros, M., 2010. E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents--2010 update. *Nucleic acids research*, 38(Web Server issue), pp.W332-9.
- Hoshizaki, D.K., 2005. Fat-cell development. *Complete Molecular Insect Science*. Vol. 2 (ed. L.I. Gilbert, K. Iatrou and S. Gill), pp.315-345. Berlin: Elsevier.
- Isabel, G. et al., 2005. AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(2), pp.R531-8.
- Jayaram, S.A. et al., 2008. COPI vesicle transport is a common requirement for tube expansion in *Drosophila*. *PloS one*, 3(4), p.e1964.
- Johnsson, N. & Varshavsky, A., 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), pp.10340-4.
- Jones, H.E. et al., 1992. Lipid composition of subcellular membranes from larvae and prepupae of *Drosophila melanogaster*. *Lipids*, 27(12), pp.984-7.
- Kennedy, E. & Weiss, S., 1956. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*, 222(1):193-214.
- Kim, S.K. & Rulifson, E.J., 2004. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. *Nature*, 431(7006):316-320.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G. & Lippincott-Schwartz, J., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of cell biology*, 116(5), pp.1071-80.

-
- Krahmer, N. et al., 2011. Phosphatidylcholine Synthesis for Lipid Droplet Expansion Is Mediated by Localized Activation of CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase. *Cell Metabolism*, 14(4), pp.504-515.
- Kuerschner, L., Moessinger, C. & Thiele, C., 2008. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*, 9(3), pp.338-52.
- Kühnlein, R.P., 2010. *Drosophila* as a lipotoxicity model organism--more than a promise? *Biochimica et biophysica acta*, 1801(3), pp.215-21.
- Kühnlein, R.P., 2011. The contribution of the *Drosophila* model to lipid droplet research. *Progress in lipid research*, 50(4), pp.348-56.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-5.
- Lands, 1958. Metabolism of glycerolipides: a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *J Biol Chem*, 231(2):883-8.
- Lane, N.J., Carter, Y.R. & Ashburner, M., 1972. Puffs and Salivary Gland Function: The Fine Structure of the Larval and Prepupal Salivary Glands of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux' Archiv. Ent. Mech. Org.*, 169: 216-238.
- Lee, G. & Park, J.H., 2004. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167(1), pp.311-23.
- Lee, M.C.S. et al., 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual review of cell and developmental biology*, 20, pp.87-123.
- Lewin, T.M., Wang, P. & Coleman, R.A., 1999. Analysis of Amino Acid Motifs Diagnostic for the sn-Glycerol-3-phosphate Acyltransferase Reaction. *Biochemistry*, 38(18):5764-71.
- Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. & Kenworthy, A., 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(6), pp.444-56.
- Lippincott-Schwartz, J. et al., 1989. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*, 56(5), pp.801-13.
- Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N. & Patterson, G.H., 2003. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature cell biology*, Suppl(September), pp.S7-14.
- Listenberger, L.L. et al., 2007. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *Journal of lipid research*, 48(12), pp.2751-61.

-
- Liu, P. et al., 2007. Rab-Regulated Interaction of Early Endosomes with Lipid Droplets. *Biochim Biophys Acta*, 1773(6):784-93.
- Liu, Y., Kahn, R. & Prestegard, J., 2009. Structure and Membrane Interaction of Myristoylated ARF1. *Structure*, 17(1), pp.79-87.
- Londos, C. et al., 1999. On the control of lipolysis in adipocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 892, pp.155-68.
- Lorenz, H., Hailey, D.W. & Lippincott-Schwartz, J., 2006. Fluorescence protease protection of GFP chimeras to reveal protein topology and subcellular localization. *Nature Methods*, 3(3), pp.205-210.
- Marchler-Bauer, A. et al., 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Database*, 39(November 2010), pp.225-229.
- Marcinkiewicz, A. et al., 2006. The phosphorylation of serine 492 of Perilipin A directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *The Journal of biological chemistry*, 281(17), pp.11901-9.
- Martinez-Botas, J. et al., 2000. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr^{db/db}* mice. *Nature genetics*, 26(4), pp.474-9.
- McLauchlan, J., 2009. Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(6), pp.552-9.
- McQuilton, P., St Pierre, S.E. & Thurmond, J., 2011. FlyBase 101 - the basics of navigating FlyBase. *Nucleic acids research*, pp.1-9.
- Meyvis, T.K. et al., 1999. Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. *Pharm Res.*, 16(8):1153-62.
- Moessinger, C. et al., 2011. Human Lysophosphatidylcholine Acyltransferases 1 and 2 Are Located in Lipid Droplets Where They Catalyze the Formation of Phosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), pp.21330-21339.
- Morell, M., Ventura, S. & Avilés, F.X., 2009. Protein complementation assays: approaches for the in vivo analysis of protein interactions. *FEBS letters*, 583(11), pp.1684-91.
- Munro, S. & Pelham, H.R., 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 48(5), pp.899-907.
- Murphy, D.J., 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in lipid research*, 40(5), pp.325-438.
- Murphy, S., Martin, S. & Parton, R.G., 2010. Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens. *PloS one*, 5(12), p.e15030.

-
- Nakamura, N. et al., 2004. ADRP is dissociated from lipid droplets by ARF1-dependent mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*, 322(3), pp.957-65.
- Nakamura, N. & Fujimoto, T., 2003. Adipose differentiation-related protein has two independent domains for targeting to lipid droplets. *Science*, 306, pp.333-338.
- Nelliot, A., Bond, N. & Hoshizaki, D.K., 2006. Fat-Body Remodeling in *Drosophila melanogaster*. *Genesis*, 44(8):396-400.
- Newman, M.J. et al., 1981. Purification and Reconstitution of Functional Lactose Carrier from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, 256(22), pp.11804-11808.
- Nishino, N. et al., 2008. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *Developmental Biology*, 118(8).
- Obrig, T.G. et al., 1971. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *The Journal of biological chemistry*, 246(1), pp.174-81.
- Ohsaki, Y., Maeda, T. & Fujimoto, T., 2005. Fixation and permeabilization protocol is critical for the immunolabeling of lipid droplet proteins. *Histochemistry and cell biology*, 124(5), pp.445-52.
- Oprins, A. et al., 1993. β -COP Localizes Mainly to the *cis*-Golgi Side in Exocrine Pancreas. *Distribution*, 121(1), pp.49-59.
- Orci, L. et al., 1997. Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell*, 90(2), pp.335-49.
- Paar, M. et al., 2012. Remodeling Of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, pp.1-24.
- Palmer, D.J. et al., 1993. Binding of coatomer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *The Journal of biological chemistry*, 268(16), pp.12083-9.
- Payne, V.A. et al., 2008. The Human Lipodystrophy Gene BSCL2 / Seipin May Be Essential for Normal Adipocyte Differentiation. *Diabetes*, 57(8):2055-60.
- Phillipson, B.A. et al., 2001. Secretory Bulk Flow of Soluble Proteins Is Efficient and COPII Dependent. *Plant Cell*, 13(9):2005-20.
- Reaven, G., Abbasi, F. & McLaughlin, T., 2004. Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent progress in hormone research*, 59(Cvd), pp.207-23.
- Reiter, L.T. et al., 2001. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, pp.1114-1125.

-
- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G.R., 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76(7), pp.3116-3120.
- Riechmann, V. et al., 1998. The genetic control of the distinction between fat body and gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development*, 125(4), pp.713-23.
- Rikhy, R., Ramaswami, M. & Krishnan, K.S., 2003. A temperature-sensitive allele of *Drosophila sesB* reveals acute functions for the mitochondrial adenine nucleotide translocase in synaptic transmission and dynamin regulation. *Genetics*, 165(3), pp.1243-53.
- Robenek, H. et al., 2006. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *Journal of cell science*, 119(Pt 20), pp.4215-24.
- Rothman, J.E. & Wieland, F.T., 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*, 272(5259), pp.227-34.
- Saiki, R.K. et al., 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- Schlegel, A. & Stainier, D.Y.R., 2007. Lessons from "lower" organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS genetics*, 3(11), p.e199.
- Segrest, J.P. et al., 2001. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *Journal Of Lipid Research*, 42.
- Serafini, T. et al., 1991. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, 67(2), pp.239-53.
- Shindou, H. & Shimizu, T., 2009. Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *The Journal of biological chemistry*, 284(1), pp.1-5.
- Siloto, R.M.P. et al., 2006. The Accumulation of Oleosins Determines the Size of Seed Oilbodies in Arabidopsis. *Chemical Analysis*, 18(August), pp.1961-1974.
- Smith, P.K. et al., 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.*, 150(1):76-85.
- Soni, K.G. et al., 2009. Coatomer-dependent protein delivery to lipid droplets. *Journal of cell science*, 122(Pt 11), pp.1834-41.
- Spradling, A.C. & Rubin, G.M., 1982. Transposition of Cloned P Elements into *Drosophila* Germ Line Chromosomes. *Science*, 218(4570):341-7.

-
- Stone, S.J. et al., 2009. The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 284(8), pp.5352-61.
- Szymanski, K.M. et al., 2007. The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), pp.20890-5.
- Takashima, K. et al., 2011. GBF1-Arf-COPI-ArfGAP-mediated Golgi-to-ER transport involved in regulation of lipid homeostasis. *Cell structure and function*, 36(2), pp.223-35.
- Tanigawa, G. et al., 1993. Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *The Journal of cell biology*, 123(6 Pt 1), pp.1365-71.
- Tansey, J.T. et al., 2001. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), pp.6494-9.
- Tauchi-Sato, K. et al., 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *The Journal of biological chemistry*, 277(46), pp.44507-12.
- Tautz, D. & Pfeifle, C., 1989. A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98, 81-5.
- Terhzaz, S. et al., 2010. Mislocalization of mitochondria and compromised renal function and oxidative stress resistance in *Drosophila* SesB mutants. *Physiological genomics*, 41(1), pp.33-41.
- Thiel, K., 2008. Charakterisierung von lipid droplet-Regulatoren der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit. Göttingen.
- Thiele, C. & Spandl, J., 2008. Cell biology of lipid droplets. *Current opinion in cell biology*, 20(4), pp.378-85.
- Tian, Y. et al., 2011. Tissue-autonomous function of *Drosophila* seipin in preventing ectopic lipid droplet formation. *PLoS genetics*, 7(4), p.e1001364.
- Tissieres, A., Mitchell, H.K., Tracy, U., 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 84:389-398.
- Tomancak, P. et al., 2007. Global analysis of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome biology*, 8(7), p.R145.

-
- Tomancak, P. et al., 2002. Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome biology*, 3(12), p.RESEARCH0088.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Biotechnology*, 24:145-9.
- Valenzuela, J.G. et al., 2003. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33, pp.717-732.
- Van der Horst, D.J., 2003. Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(2), pp.217-226.
- Van der Meer-Janssen, Y.P.M. et al., 2010. Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Progress in lipid research*, 49(1), pp.1-26.
- Vance, J.E. & Vance, D.E., 2004. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 82(1), pp.113-128.
- Voelker, R.A., Wisely, G.B. & Searles, L.L., 1984. Frequent Imprecise Excision among Reversions of a *P* Element-Caused Lethal Mutation in *Drosophila*. *Genetics*, 107(2):279-94.
- Walther, T.C. & Farese, R.V., 2009. The life of lipid droplets. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(6), pp.459-66.
- Wang, C.-W. & Lee, S.-C., 2012. The ubiquitin-like (UBX)-domain-containing protein Ubx2/Ubx8 regulates lipid droplet homeostasis. *Journal of cell science*.
- Wang, H. et al., 2010. Altered Lipid Droplet Dynamics in Hepatocytes Lacking Triacylglycerol Hydrolase Expression. *Molecular Biology of the Cell*, 21, pp.1991-2000.
- Wegmann, D. et al., 2004. Novel Isotypic γ/ζ Subunits Reveal Three Coatmer Complexes in Mammals. *Society*, 24(3), pp.1070-1080.
- Welte, M. a et al., 2005. Regulation of lipid-droplet transport by the perilipin homolog LSD2. *Current biology: CB*, 15(14), pp.1266-75.
- Wessel, D. & Flügge, U.I., 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry*, 138(1), pp.141-3.
- Wieland, F.T. et al., 1987. The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell*, 50(2), pp.289-300.

-
- Wolins, N.E., Quaynor, B.K., et al., 2006. OP9 mouse stromal cells rapidly differentiate into adipocytes: characterization of a useful new model of adipogenesis. *Journal of lipid research*, 47(2), pp.450-60.
- Wolins, N.E. et al., 2005. S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 280(19), pp.19146-55.
- Wolins, N.E., Brasaemle, D.L. & Bickel, P.E., 2006. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS letters*, 580(23), pp.5484-91.
- Wolinski, H. et al., 2011. A role for seipin in lipid droplet dynamics and inheritance in yeast. *Journal of cell science*, 124(Pt 22), pp.3894-904.
- Wu, C.C. et al., 2000. Proteomics reveal a link between the endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells. *Electrophoresis*, 21(16), pp.3470-82.
- Yamashita, A. et al., 2007. Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1. *Biochimica et biophysica acta*, 1771(9), pp.1202-15.
- Yen, C.-L.E. et al., 2008. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of lipid research*, 49(11), pp.2283-301.
- Zehmer, J.K. et al., 2009. Targeting sequences of UBXD8 and AAM-B reveal that the ER has a direct role in the emergence and regression of lipid droplets. *Journal of cell science*, 122(Pt 20), pp.3694-702.
- Zhao, Y., 2007. Analysis and Characterization of *Drosophila* lipid droplet-associated proteins. Master's Thesis. Göttingen.
- Zimmermann, R. et al., 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306(5700), pp.1383-6.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K. & Daum, G., 2000. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1469(2), pp.101-20.

8. Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Mathias Beller für seine äußerst kompetente Betreuung, seine uneingeschränkte Unterstützung und die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Herbert Jäckle für die Aufnahme in seine Abteilung, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die Übernahme des Referats.

Jun. Prof. Dr. Gregor Bucher danke ich für Übernahme des Korreferats und für die Anregungen während meiner Fortschrittsberichte.

Prof. Dr. Reinhard Schuh, Prof. Dr. Ernst A. Wimmer, Prof. Dr. Andreas Wodarz und Prof. Dr. Stefan Jakobs danke ich, dass sie sich als Mitglieder meiner Prüfungskommission zur Verfügung gestellt haben.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank gilt hierbei Dr. Ralf Pflanz und Dr. Alf Herzig für Hilfestellungen bei Fragen rund um die Mikroskopie bzw. Klonierungen, Tinö für die Durchsicht meiner Dissertation, Iris und Kaddie, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, allen Leuten der alltäglichen Kaffeerrunden und der Mottotage für die lustigen Zeiten zwischendurch.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Freund und meiner Oma für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Verständnis, insbesondere während der letzten Tage meiner Schreibphase.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden für die Unterstützung und die nette Abwechslung zwischendurch bedanken.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katharina Thiel
 Geburtsdatum: 11.01.1983
 Geburtsort: Göttingen (Niedersachsen)
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Promotion

seit 02/2008 Dissertation am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. Herbert Jäckle), Projektgruppe "Lipid Droplet Biology" (Dr. Mathias Beller)

Tagungsbeiträge

Workshop "Molecular Mechanisms of Development and Differentiation" 2011, Schloss Ringberg, Kreuth
 17th Regional *Drosophila* Meeting 2011, Marburg
 16th Regional *Drosophila* Meeting 2010, Göttingen

Veröffentlichungen

Beller M., **Thiel K.**, Thul P. J. und Jäckle H.: Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus. FEBS Letters, 2010

Hochschulausbildung

02/2008	Abschluss Diplom-Biologin, Georg-August-Universität Göttingen
05/2007 - 01/2008	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. Herbert Jäckle), Projektgruppe "Lipid droplet biology" (Dr. Mathias Beller) Thema: "Charakterisierung von lipid droplet-Regulatoren der Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i> "
05/2007	Diplomprüfungen (Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie, Pharmakologie)
10/2004	Vordiplom (Botanik, Mikrobiologie, Chemie, Physik)
10/2002 - 02/2008	Studium der Biologie, Georg-August-Universität Göttingen

Schulbildung

06/2002	Abitur am Felix-Klein-Gymnasium, Göttingen
06/1989	Einschulung Egelsbergschule, Göttingen