

Bestimmung der Substrat- und Stereoselektivität von Lipasen

Diplomarbeit

Andreas Gasser

Die Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Technischen Universität Graz von
Jänner 2003 bis November 2005 unter der Betreuung von Prof. Dr. Albin Hermetter
durchgeführt.

Danksagung

Mein herzlichstes Dankeschön gilt **Prof. Dr. Albin Hermetter**, der mich mit größter Geduld und außergewöhnlichem Verständnis für meinen wohl etwas ungewöhnlichen parallelen musikalischen Werdegang durch diese Arbeit geleitet hat, mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und ein interessantes, vielschichtiges Thema bereitgestellt hat.

Ein besonderer Dank gilt auch **Dr. Dipl. Ing. Gernot Riesenhuber**, der die Substrate synthetisiert hat, die Grundlage dieser Arbeit waren, in vielen Experimenten Hand in Hand mit mir gearbeitet hat und ohne den die Ergebnisse dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Vielen herzlichen Dank an meine Arbeitsgruppe, vor allem **Ruth Birner-Grünberger** sowie **Heidrun Susani-Etzerodt, Hannes Schmidinger** und **Elfriede Zenzmaier** – und allen übrigen Mitarbeitern am Institut für Biochemie für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung und das positive Arbeitsklima.

Ein großer Dank gebührt auch meiner Freundin **Elisabeth**, die durch ihre sanfte Motivation einen nicht unwesentlichen Beitrag zur endgültigen Fertigstellung dieser Arbeit geleistet hat und natürlich **meinen Eltern**, auf die ich mich zu jeder Zeit voll und ganz verlassen konnte und denen ich diesen Abschluss zu verdanken habe.

Determination of substrate- and stereoselectivity of lipases

Summary

The elucidation of the reaction mechanisms of lipolytic enzymes also requires the determination of the substrate- and stereoselectivities of these proteins. In order to find a more straightforward alternative to the common assays using radioactive substrates, a method using chiral, pyrene-labelled substrates was developed in this study, which allows the determination of substrate- and stereoselectivity of lipases. This technique avoids the application of radioactive isotopes and as a consequence time consuming procedures. It is the basis for a simple and fast determination of lipase activity also in high throughput analysis.

On the basis of the robust and well characterized fungal *Rhizomucor miehei* lipase the fluorescent substrates were tested for their applicability to determine substrate- and stereoselectivity of lipolytic enzymes using simple thin layer chromatography.

In order to obtain quantitative results and higher throughput, the method was adapted to HPLC analysis. This version was used to analyze activities as well as the respective e.e. values of *Rhizomucor miehei* lipase, *Chromobacterium viscosum* lipase and *Candida cylindracea* cholesterol esterase. After overexpression in COS-7 cells, the selectivity and activity of the animal lipases *adipose triglyceride lipase* (ATGL), *hormone sensitive lipase* (HSL) and *monoglyceride lipase* (MGL) were measured in total cell lysates. Lipolytic activities were also determined in adipose tissue homogenates of ATGL- and HSL-deficient mice and compared to the wild type animals. The deficiency in the respective lipases correlated with the degradation patterns of the fluorescent substrates as determined by the above described method.

Bestimmung der Substrat- und Stereoselektivität von Lipasen

Zusammenfassung

Die Aufklärung des Reaktionsmechanismus lipolytischer Enzyme erfordert auch die Bestimmung der Substrat- und Stereoselektivität dieser Proteine. Um eine einfachere Alternative zu den gebräuchlichen Assays mit radioaktiven Substraten zu finden, wurde in dieser Arbeit eine Methode mit chiralen, pyrenmarkierten Substraten entwickelt, die eine Bestimmung der Substrat- und Stereoselektivität von Lipasen erlaubt. Diese Technik vermeidet den Einsatz von radioaktiven Isotopen und als Konsequenz zeitraubende Arbeitsschritte. Sie ist die Basis für eine schnelle und einfache Lipase-Aktivitätsbestimmung auch bei Hochdurchsatzanalysen.

Anhand der robusten und gut charakterisierten fungalen *Rhizomucor miehei* Lipase wurden die pyrenmarkierten Substrate auf ihre Eignung zur Substrat- und Stereoselektivitätsbestimmung lipolytischer Enzyme mittels einfacher Dünnschichtchromatographie getestet. Um eine quantitative Auswertung und einen höheren Durchsatz zu erzielen, wurde die Methode auf HPLC übertragen. Auf diese Art wurden die Aktivitäten und die *e.e.* Werte von *Rhizomucor miehei* Lipase, *Chromobacterium viscosum* Lipase sowie *Candida cylindracea* Cholesterinesterase bestimmt.

Nach Überexpression in COS-7 Zellen wurden Selektivität und Aktivität der tierischen Lipasen *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL), *Hormonsensitive Lipase* (HSL) und *Monoglyceridlipase* (MGL) aus dem Gesamtzelllysat bestimmt. Überdies wurden die Lipolyseaktivitäten von Fettgewebehomogenaten aus ATGL- bzw HSL-defizienten Mäusen mit denen des Wildtyps verglichen. Die Defizienz der entsprechenden Enzyme korrelierte mit dem Fettspaltungsmuster, das mit der oben genannten Methode bestimmt wurde.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	3
1.1 Lipasen	3
1.2 Struktur	4
1.3 Der Katalyse-Mechanismus der enzymatischen Esterhydrolyse	5
1.3.1 Grenzflächenaktivierung	6
1.4 Stereoselektivität von Lipasen	8
1.4.1 Triacylglycerol Substrate	9
1.4.2 Substratbindung	10
1.5 Fettstoffkatabolismus	12
1.6 Lipase Assays	15
2. MATERIALIEN UND METHODEN	16
2.1 Verwendete Substrate	16
2.2 Assays mit mikrobiellen Lipasen	17
2.2.1 Mikrobielle Lipasen	17
2.2.2 Herstellung der Substratemulsionen	18
2.2.3 Lipase-Assays und TLC-Analyse der Lipide	18
2.2.4 Lipase Assays und HPLC-Analyse der Lipide	19
2.2.5 HPLC System und Trennungsbedingungen	19
2.3 Assays mit humanen bzw. murinen Lipasen	21
2.3.1 Herstellung der Substratemulsion	21
2.3.2 Zellkultur	21
2.3.3 Auftauen der Zellen	22
2.3.4 Zellpassage	22
2.3.5 Frieren und Aufbewahrung der Zellen	23
2.3.6 Transiente Expression von HSL, MGL, ATGL und CGI 58 in COS-7 Zellen	23
2.3.7 Ernten der Zellen und Proteinbestimmung	23
2.3.8 β -Galactosidase Assay	24
2.3.9 COS-7 Cytosol Lipase-Assays für HPLC und TLC-Analyse	25
2.3.10 Mausfettgewebe	26
2.3.11 Mausfett Lipase-Assays für die HPLC-Analyse	26

2.4	Mausfett Lipase-Assays mit radioaktiv markierten Substraten	27
2.4.1	Durchführung der radioaktiven Lipase-Assays	27
3.	RESULTATE	29
3.1	Aktivität und Selektivität mikrobieller Lipasen	29
3.1.1	Dünnschichtchromatographische Analysen	29
3.1.2	HPLC Analysen	34
3.2	Aktivität und Selektivität humaner Lipasen	40
3.2.1	Aktivitätsbestimmung der dünschichtchromatographischen Analysen	40
3.2.2	HPLC-Analysen	44
3.3	Untersuchungen an Mausfettgewebe	49
3.3.1	ATGL knockout vs. wildtype	49
3.3.2	HSL knockout vs. wildtype	52
3.3.3	Radioaktivitäts – Assays von Lipolyseaktivitäten in Mausfettgewebe	55
4.	DISKUSSION	57
4.1	Mikrobielle Lipasen	57
4.2	Humane Lipasen	62
4.3	Untersuchungen an Mausfettgewebe	64
4.4	Conclusio	66
5.	LITERATUR	67

1. Einleitung

1.1 Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.3) sind Enzyme aus der Familie der Serin-Hydrolasen und sind in Eukaryonten und Prokaryonten weit verbreitet. Ihre natürliche Funktion ist der hydrolytische Abbau von Fettsäureestern, Mono- und Diglyceriden, Cholesterinestern etc.

In der Vergangenheit galt als Voraussetzung um ein hydrolytisches Enzym als Lipase zu klassifizieren und damit von Esterasen zu unterscheiden, die Erfüllung zweier Kriterien:

- Die Lipase besitzt ein so genanntes Lid, eine Schleife an der Oberfläche der dreidimensionalen Struktur des Enzyms. Dieses Lid bedeckt in der inaktiven Form das katalytische Zentrum des Enzyms und verhindert dadurch den Kontakt des ausgeprägt hydrophoben Bereichs rund um dieses Zentrum zu den umgebenden Wassermolekülen. Bei Annäherung des Enzyms an eine Lipid-Wasser Grenzfläche verschiebt sich der Zustand niedrigster Energie aufgrund der zunehmend hydrophoben Umgebung hin zu einer veränderten Konformation der Lipase mit geöffnetem Lid, das nun den hydrophoben Bereich freilegt und gleichzeitig die hydrophile Oberfläche des Enzyms verringert. So wird der Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum ermöglicht. Man unterscheidet zwischen offener (aktiver) und geschlossener (inaktiver) Form einer Lipase.
- Sobald Substrate der Lipasen, beispielsweise die Triacylglycerole, monomere Schichten, Micellen oder Emulsionen, d.h. Grenzflächen ausbilden, steigt die Aktivität einer Lipase rapide an. Dieses Phänomen wird als Grenzflächenaktivierung bezeichnet (1).

Allerdings stellte sich heraus, dass nicht alle Lipasen diesen beiden Kriterien entsprechen. Teilweise existieren Lipasen, die trotz Vorhandenseins einer amphiphilen Lid Domäne keine Grenzflächenaktivierung zeigen (z.B. *Pseudomonas glumae* Lipase, *Pseudomonas aeruginosa* Lipase und *Candida antarctica* Lipase). Anderen Lipasen wiederum fehlt das Lid völlig.

Lipasen werden heute allgemeiner als Carboxylesterasen bezeichnet, die die Hydrolyse langkettiger (Kettenlänge ≥ 10 Kohlenstoffatome) Acylester katalysieren (1)(2). Enzyme, die die Hydrolyse von Acylglycerolestern mit einer Kettenlänge < 10 Kohlenstoffatomen spalten, werden hingegen als

Esterasen (EC 3:1:1:1) bezeichnet. (Wobei die meisten Lipasen ebenfalls hervorragende Katalysatoren der Hydrolyse kurzkettiger Acylglycerolester darstellen.)

1.2 Struktur

Die Aminosäuresequenz der verschiedenen Lipasen erscheint im Vergleich zu anderen Enzymfamilien erstaunlich heterogen, trotzdem gehören alle in ihrer dreidimensionalen Struktur aufgeklärten Lipasen einem gemeinsamen 3D-Struktur-Typ an. Da alle Lipasen den gleichen Reaktionstyp katalysieren – die Esterhydrolyse – wird das gemeinsame Faltungsmuster als $\alpha\beta$ - *Hydrolase Faltung* bezeichnet (3).

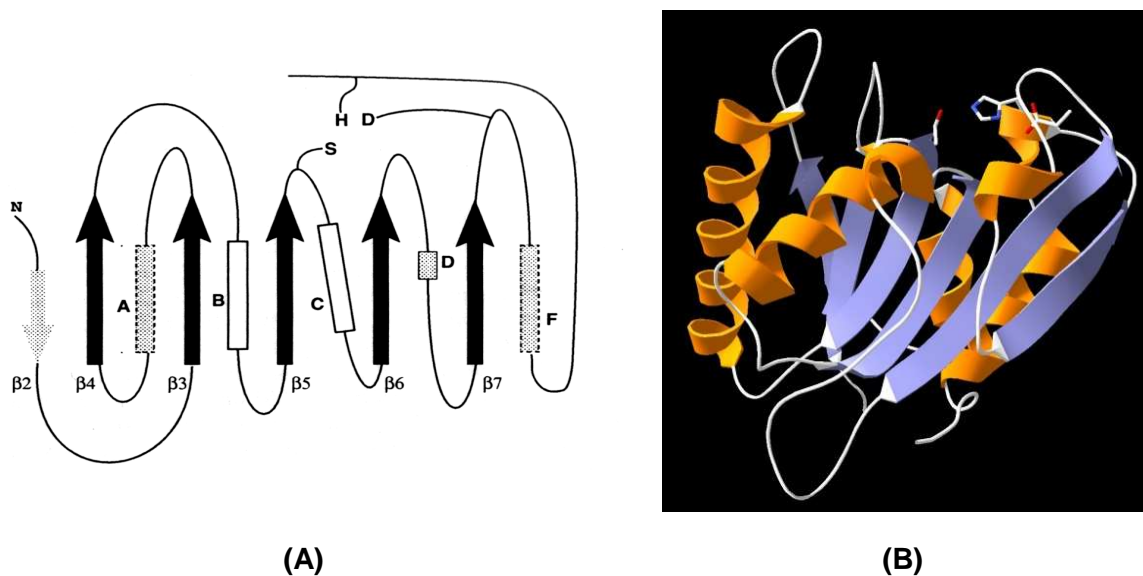


Abb. 1-1: (A) Schematische Darstellung einer typischen $\alpha\beta$ - Hydrolase Faltung (Rechtecke kennzeichnen α -Helices, Pfeile kennzeichnen β -Faltblätter); die topologischen Positionen der katalytischen Aminosäuren sind angezeigt; (B) $\alpha\beta$ - Hydrolase Faltung am Beispiel der Kristallstruktur der *Bacillus subtilis* Lipase mit 6 parallelen β -sheets, eingeschlossen von 5 α -Helices (Bildquelle: Protein Crystallography Group, Universität Gröningen, http://www.xray.chem.rug.nl/Home_g.htm)

Dieses Faltungsmuster zeichnet sich durch (meistens) acht nahezu parallel angeordnete β -Faltblätter im Zentrum der Hydrolase aus, dabei ist das zweite Faltblatt antiparallel angeordnet. Diese β -Faltblätter sind wiederum beidseitig von α -Helices umgeben. Alle $\alpha\beta$ - Hydrolasen zeigen dabei eine identische Abfolge der Strukturdomänen.

Die $\alpha\beta$ - Hydrolyse Faltung ist gemeinsames Strukturmerkmal aller bislang bekannten Lipasen, dennoch treten auch hier bestimmte strukturelle Abwandlungen auf. So besitzen zum Beispiel die Lipasen aus *Bacillus subtilis* (siehe Abb. 1-1) und *Chromobacterium viscosum* nur sechs parallel

angeordnete β -Faltblätter, die Carboxylesterase aus *Pseudomonas fluorescens* besitzt sieben β -Faltblätter und die Lipase aus *Streptomyces exfoliatus* besitzt neun antiparallel angeordnete β -Faltblätter (1).

1.3 Der Katalyse-Mechanismus der enzymatischen Esterhydrolyse

Verantwortlich für die Hydrolyse sind die drei essentiellen Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat bzw. Glutamat im katalytischen Zentrum des Enzyms. Man spricht deshalb von der katalytischen Triade. Die Anordnung dieser drei Aminosäuren innerhalb der α/β -Hydrolyse Faltung ist bei allen bekannten Lipasen gleich (siehe Abb. 1-1). Die Abfolge aus Faltblatt β_5 , Serin und der darauf folgenden α -Helix wird aufgrund der stark gebogenen Tertiärstruktur dieses Bereiches als *nucleophilic elbow* bezeichnet (4)(5).

Der Mechanismus Lipase-katalysierter Hydrolysen ist mit dem der Serinproteasen-katalysierten Proteinspaltung vergleichbar. Gelangt das Substrat ins katalytische Zentrum, wird es am Carbonyl-Kohlenstoffatom nucleophil durch die Hydroxylgruppe des katalytischen Serins angegriffen.

Das entstehende Oxyanion der ersten tetrahedralen Zwischenstufe wird durch die so genannte Oxyanion-Tasche stabilisiert, welche sich aus den Amid-Funktionen zweier Aminosäuren des Protein-Grundgerüsts bildet. Eine dieser beiden Aminosäuren befindet sich in der Sequenz direkt hinter dem katalytischen Serin, die Position der zweiten Aminosäure befindet sich am Ende des dritten β -Faltblatts.

Das katalytische Histidin verstärkt die Nucleophilie des Serins, welches beim Angriff als Protonenakzeptor fungiert. Die entstehende positive Ladung des Histidins wird durch die negative Ladung von Aspartat (oder Glutamat) über elektrostatische Wechselwirkung stabilisiert. Die Position der stabilisierenden aciden Aminosäure befindet sich im Prototyp der α/β -Hydrolase Faltung nach dem siebten β -Faltblatt und ist in der dreidimensionalen Struktur so ausgerichtet, dass eine Wasserstoff-Brückenbindung zum katalytischen Histidin ausgebildet werden kann.

In weiterer Folge kommt es zur Abspaltung von Alkohol unter Bildung einer Acylenzym-Zwischenstufe. Im Hydrolyseschritt greift nun Wasser das Acylenzym unter Ausbildung des zweiten tetrahedralen Intermediates nucleophil an. Der abschließende Schritt führt dann zur Abspaltung der Säure und zur Regeneration der freien Lipase (6).

Geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion ist die Abspaltung des Alkohols nach Ausbildung des ersten tetrahedralen Intermediates.

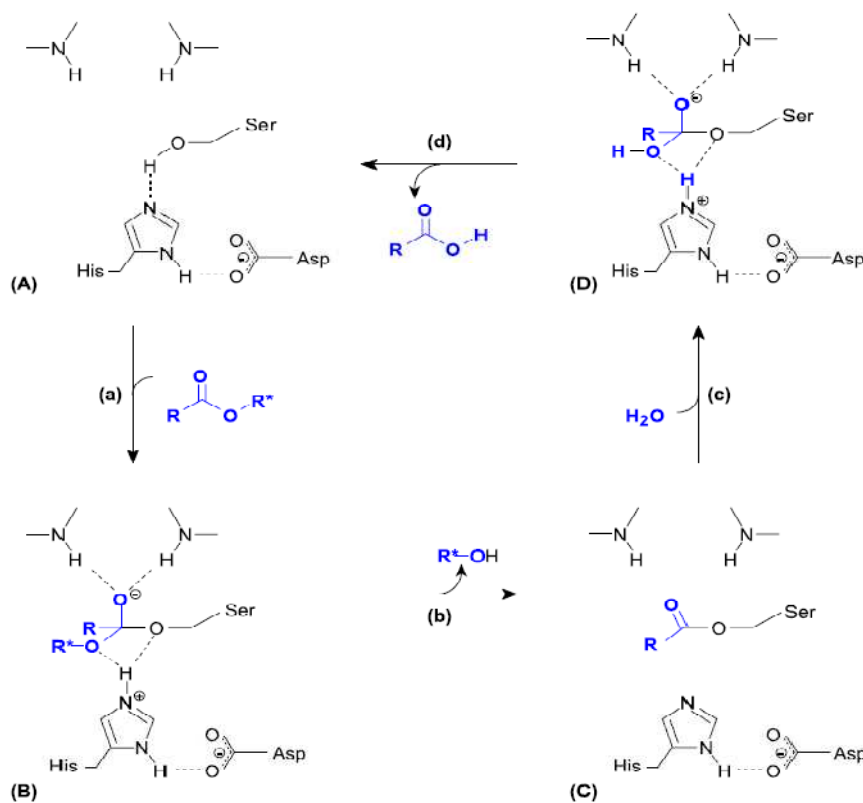


Abb. 1-2: Die Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Esters: (a) Nucleophiler Angriff der Hydroxylgruppe des Serins auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats; das Oxyanion im ersten tetrahedralen Intermediat (**B**) wird durch die Oxyanion-Bindetasche stabilisiert. (b) das katalytische Histidin überträgt ein Proton auf den abzuspaltenden Teil des Substrats; im verbleibenden Acylenzym ist die Säureseite über das Seitenketten-Sauerstoffatom des aktiven Serins verestert (**C**). (c) Das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Acylenzyms wird von einem Wasser-Molekül angegriffen; das gebildete Oxyanion des zweiten tetrahedralen Intermediats (**D**) wird analog zu (**B**) stabilisiert; (d) Das katalytische Histidin überträgt ein Proton zum Seitenketten-Sauerstoff des Serins und die Esterbindung zwischen Serin und Säure wird gebrochen; die freie Carbonsäure verlässt das Enzym und regeneriert hierdurch die Lipase (**A**); Substrat und Wasser-Molekül sind jeweils in blau dargestellt. (1)

1.3.1 Grenzflächenaktivierung

Das Phänomen der Grenzflächenaktivierung wurde bereits bei der Definition der Lipasen erwähnt und bezieht sich auf die deutliche Aktivitätssteigerung, die die meisten Lipasen bei Kontakt mit einer Lipid-Wasser Grenzfläche aufweisen (7).

Ursache dieses Phänomens ist eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur der Lipase bei Kontakt mit einer hydrophoben Grenzfläche. Anhand der überlagerten Kristallstrukturen von freier und inhibierter *Rhizomucor mihei* Lipase ist ersichtlich, dass sich nur ein helikales Sekundärstrukturelement signifikant verändert. Dieses sogenannte Lid blockiert in der inaktiven (geschlossenen) Konformation den Zugang des Substrats zum katalytischen Zentrum. In der aktiven (geöffneten) Konformation mit gebundenem Inhibitor ist aufgrund der veränderten Position der Lidstruktur der Zugang zum katalytischen Zentrum frei.

Treibende Kraft hinter dieser Konformationsänderung ist der ausgesprochen hydrophobe Bereich rund um das katalytische Zentrum des Enzyms, der bei geschlossener Konformation von der hydrophoben Innenseite des Lids abgeschirmt wird, während die hydrophile Außenseite des Lids der wässrigen Umgebung zugewandt ist. Bei Kontakt mit einer hydrophoben Grenzfläche ändert sich die energetisch günstigere räumliche Struktur des Enzyms hin zur offenen Konformation, bei der sowohl die hydrophobe Lid Innenseite, als auch der hydrophobe Bereich um das katalytische Zentrum mit der hydrophoben Grenzfläche in Kontakt treten. Dies erklärt die verminderte Enzymaktivität gegenüber Substraten in wässrigen Systemen im Vergleich zur Enzymaktivität an hydrophoben Grenzflächen.

Bei den meisten Lipasen handelt es sich bei der Lid Struktur um eine einzelne kurze α -Helix. Es sind jedoch andere Beispiele bekannt, in denen zwei Helices oder auch eine Schleife das Lid bilden.

Ein weiterer Effekt der Öffnung des Lids ist, dass in einigen Lipasen eine der beiden Aminosäuren, die die Oxyanion-Tasche bilden, erst durch diese Konformationsänderung in die geeignete Position zur Ausbildung einer Wasserstoff-Brückenbindung gebracht wird.

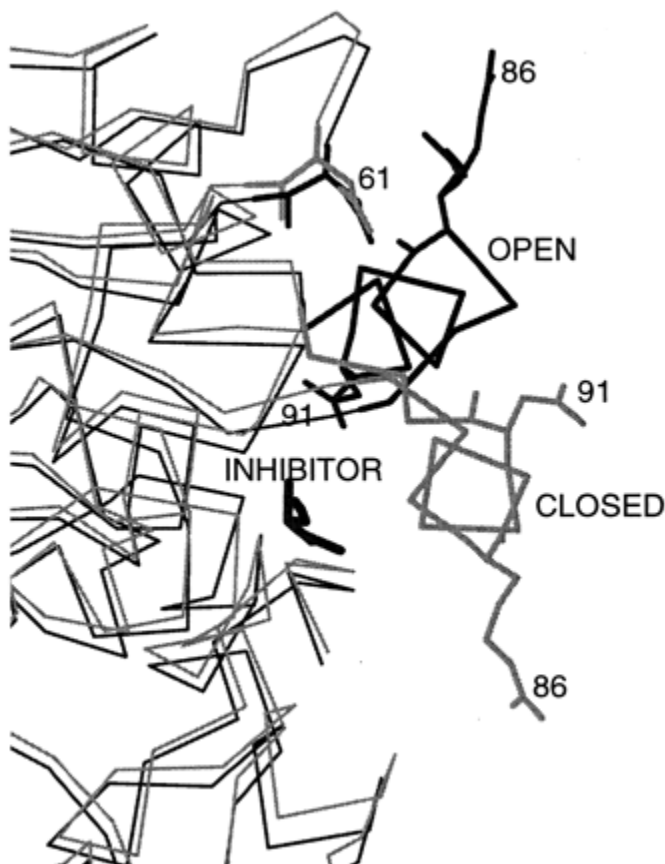


Abb. 1-3: *R. mihei* Lipase in offener (Lid in schwarz) und geschlossener (Lid in grau) Konformation. Dargestellt sind zwei überlagerte Kristallstrukturen. In der offenen Konformation ist ein Inhibitor im katalytischen Zentrum gebunden und Arg-86 ist in räumlicher Nähe zu Asp-61. (38)

1.4 Stereoselektivität von Lipasen

Lipasen zeigen gegenüber Triacylglycerol-Substraten drei Arten der Selektivität. Die Fettsäureselektivität bezieht sich auf die unterschiedliche Präferenz der Lipasen für die Umsetzung von Substraten mit langen und kurzen sowie gesättigten und ungesättigten (*cis/trans*) Fettsäuren.

Des Weiteren zeigen die Enzyme eine Regioselektivität, die sich auf die Position der aus einem Triacylglycerol freigesetzten Fettsäure bezieht. Der Großteil der Lipasen, wie zum Beispiel *Rhizopus delemar* Lipase, ist 1,3 regioselektiv, was bedeutet, dass sie nur die primären Fettsäureester eines Triacylglycerols spalten. Die einzig bekannte Lipase mit einer Selektivität für den sekundären Ester am C2 eines Glycerols ist *Candida antarctica* Lipase (8). Alle nicht unter die ersten beiden Kategorien fallenden Lipasen hydrolysieren unspezifisch alle drei Positionen eines Triacylglycerols mit vergleichbarer Geschwindigkeit (zum Beispiel *Penicillium expansum* Lipase).

Schließlich findet man eine Stereoselektivität, bei der die Lipase auch zwischen den beiden primären Positionen des Triacylglycerols unterscheidet. Von zwei möglichen enantiomeren Produkten wird im Fall einer stereoselektiven Katalyse nur ein Enantiomer bevorzugt gebildet.

Bemerkenswert ist der Umstand, dass diese Stereoselektivität nicht davon abhängig ist, ob das Ausgangssubstrat selbst chiral ist oder nicht.

Die Stereoselektivität ist also nicht zu verwechseln mit der bekannten Stereospezifität vieler Enzyme (auch Lipasen) für eines von zwei stereoisomeren Substraten, die zur Racemattrennung und Erzeugung enantiomerenreiner Produkte benutzt wird.

Vielmehr liegt die Stereoselektivität von Lipasen in der Bindung des Triacylglycerols an das chirale Enzym begründet, wobei alle Seitenketten des Substrats einbezogen werden und in Folge nur eine einzige räumliche Enzym-Substrat Konformation mit niedrigster Energie existiert. Aus dieser Konformation resultiert ein enantiomerenreines Produkt, das bevorzugt gebildet wird. Man spricht deshalb auch von Stereopräferenz.

Zusätzlich beeinflussen weitere wesentliche Faktoren die Stereoselektivität von Lipasen. Erstens ist dies die Topographie des Enzyms, also die Strukturelemente, die für die Substratbindung verantwortlich sind und deren räumliche Ausrichtung auf der Oberfläche bzw. innerhalb des Enzyms, weiters wirkt sich die Beschaffenheit der Seitenketten des Substrats aus, vor allem die Länge der Kohlenstoffketten sowie deren räumliche Ausdehnung (10) (10). (Zusätzlich haben auch die Reaktionsbedingungen *in vitro* einen entscheidenden Einfluss auf die Stereoselektivität.)

Im Fall der Stereoselektivität von Lipasen spielt also die absolute Konfiguration von (möglicherweise) chiralen Triacylglycerolen nur eine untergeordnete Rolle bei der Ausbildung der absoluten Konfiguration der Hydrolyseprodukte, beide Enantiomere stellen immer ein geeignetes Substrat dar.

1.4.1 Triacylglycerol Substrate

Triacylglycerole sind die natürlichen Substrate der Lipasen. Im Fall von zwei identischen Substituenten in *sn*-1 und *sn*-3 Position ist das Molekül prochiral (ein Molekül ist prochiral bzw. besitzt ein prochirales Zentrum, wenn es durch Veränderung eines Substituenten von einem achiralen zu einem chiralen Molekül wird), chemisch sind die beiden Positionen jedoch identisch.

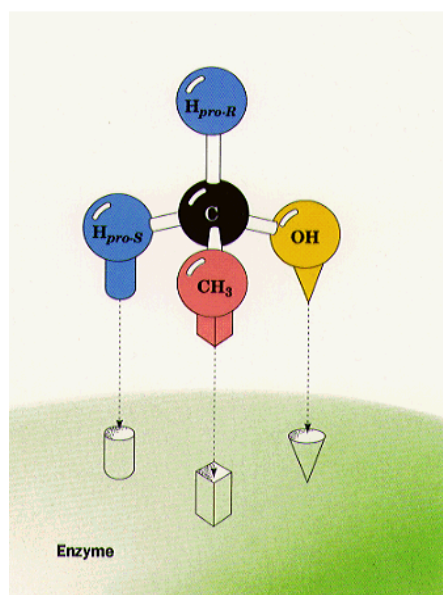


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Prochiralität anhand der theoretischen Interaktion des prochiralen Ethanols mit einem Enzym. Sind Bindebereiche für die Seitenketten des Substrats auf dem Enzym vorhanden, führt nur eine einzige räumliche Ausrichtung des Substrats zu einer erfolgreichen Bildung des Enzym/Substrat Komplexes. Es entsteht theoretisch ein enantiomerenreines Produkt.

Die beiden primären Carbonylgruppen eines Glycerolipid-Derivates sind also auch im Fall identischer Substituenten in Hinblick auf ihre Reaktionen mit asymmetrischen Strukturen (was beinahe alle biologischen Prozesse umfasst) **nicht identisch**. Dies erklärt zugleich, wie viele Lipasen zwischen diesen beiden Positionen unterscheiden. Die selektive Spaltung einer Esterbindung in *sn*-1 oder *sn*-3 Position führt zu den entsprechenden 1,2- oder 2,3-Diglyceriden.

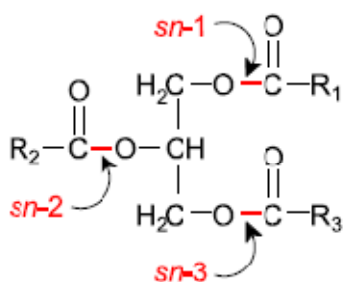


Abb. 1-5: Die *sn*-1, *sn*-2 und *sn*-3 Positionen in Triacylglycerolen; die Positionen *sn*-1 und *sn*-3 sind prochiral.

Die Stereoselektivität vieler Lipasen wurde bereits untersucht, indem man ein prochirales Substrat wie Triolein oder Trioctanin mit den Lipasen inkubierte und das entstehende Diacylglycerol durch Reaktion mit enantiomerenreinem R-(+)-Phenylethylisocyanat in ein diastereomeres Produkt überführte, das sich durch HPLC trennen lässt.

Anhand dieser Versuche konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass *Candida antarctica* B Lipase 100% Stereopräferenz für die sn-3 Position von Trioctanoin zeigt, aber mit rund 38% *ee* (enantiomeric excess) die sn-1 Position von Triolein hydrolysiert. PPL (porcine pancreas lipase) zeigt keinerlei Stereoselektivität, während *Mucor miehei* Lipase eine ausgeprägte sn-1 Präferenz gegenüber beiden Substraten aufweist (8).

In welcher Position das Triacylglycerol bevorzugt gespalten wird, hängt also stark von der eingesetzten Lipase ab. Die Möglichkeit der Variation dieser Position in Abhängigkeit der Substituenten des Substrates zeigt aber auch den deutlichen Einfluss des Substrates selbst auf die Stereoselektivität des Enzyms.

1.4.2 Substratbindung

Weitreichende kristallographische Experimente wurden von Lang und Dijkstra zur Aufklärung der Substratbindung von Lipasen durchgeführt. Sie untersuchten Inhibitor-Lipase-Komplexe, die dem ersten tetrahedralen Intermediat der Hydrolyse entsprechen (11). Dazu gehörten beispielsweise die Röntgenkristallstrukturen der humanen Pankreas Lipase und der Lipase aus *Rhizomucor miehei*, jeweils komplexiert mit einem Phosphonat-Inhibitor, sowie der Lipase aus *Candida rugosa* mit einem langkettigen Sulfonyl-Inhibitor.

Es zeigte sich, dass die Fettsäurebindestellen der Lipasen in ihrer Form und Beschaffenheit stark variieren. *C. rugosa* Lipase besitzt beispielsweise einen sogenannten hydrophoben Tunnel, der sich tief genug in das Innere des Enzyms erstreckt, um eine C-18 Fettsäurekette zu binden. Meist jedoch genügen hydrophobe Vertiefungen an der Lipasenoberfläche als Bindestellen für die Fettsäureketten des Substrats. Im Lauf der Grenzflächenaktivierung kann sogar die Bewegung des Lids zur Ausbildung von Fettsäure-Bindebereichen führen, die in der geschlossenen (inaktiven) Konformation der Lipase als Strukturelement in dieser Form gar nicht vorliegen. Folgende sekundäre Substratbindestellen werden in der Literatur beschrieben:

- *hydrophobic tunnel*
- *hydrophobic crevice*
- *hydrophobic dent*
- *hydrophobic/hydrophilic trench*

All diese Strukturelemente können vorliegen und führen aufgrund der großen Variationsmöglichkeiten ihrer Form, Ausrichtung und Kombination zur extremen Vielfalt der Substratspezifität und Stereoselektivität von Lipasen (11).

Die Stereoselektivität von Lipasen lässt sich also schematisch so erklären, dass die räumliche Anordnung der verschiedenen Substratbindestellen am Enzym, sowie deren Größe und Ausbildung für geeignete Substrate zu einer ganz bestimmten räumlichen Konformation des Enzym/Substrat Komplexes führen.

Diese Ausrichtung kann sich jedoch abhängig von den Seitenketten des Substrats ändern oder aufgrund deren sterischer Beschaffenheit (Doppelbindungen, raumfüllende Substituenten etc) gestört werden. Somit kann die Stereoselektivität des Enzyms trotz dessen unveränderlicher Topographie durch das Substrat beeinflusst werden.

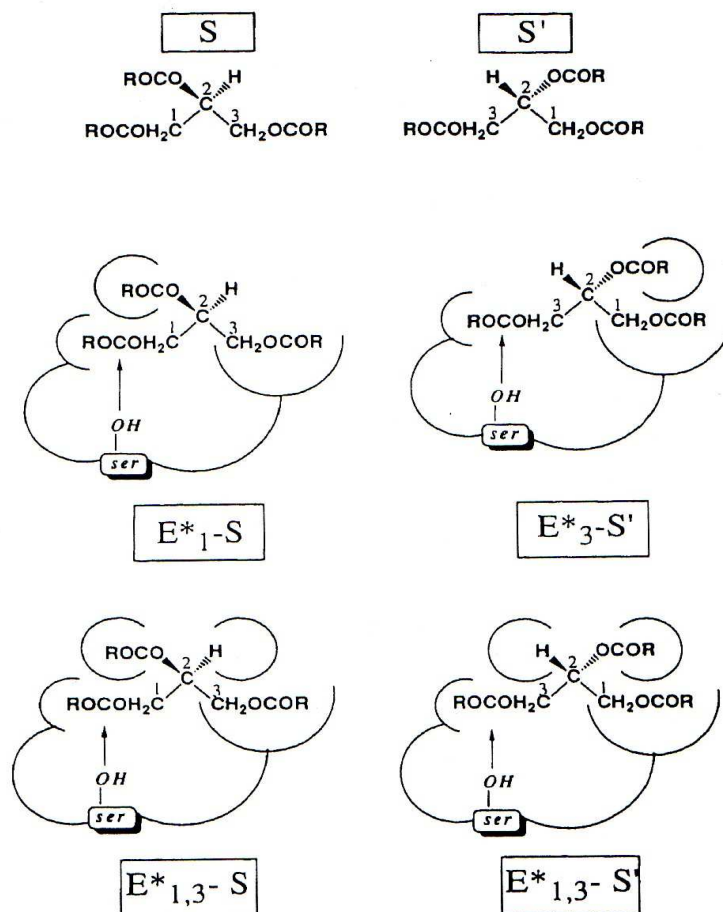


Abb. 1-6: Schematische Darstellung der möglichen Ausrichtung der Substratbindestellen in drei verschiedenen Enzymen. **S** und **S'** sind ein und dasselbe Triacylglycerolmolekül, gespiegelt in der C1-C2-C3 Ebene. Ein theoretisches Enzym mit absoluter sn-1 Stereopräferenz kann aufgrund seiner Topographie nur den E^*_{1-S} Komplex mit dem Substrat bilden, was zu Hydrolyse der sn-1 Position führt. Umgekehrt kann ein theoretisches Enzym mit absoluter sn-3 Präferenz nur den $E^*_{3-S'}$ Komplex formen. Einziger Unterschied zwischen den beiden Enzymen ist die Anordnung der Substratbindestellen. Einem Enzym, das zwischen sn-1 und sn-3 nicht unterscheidet, fehlen die notwendigen Bindestellen entweder, oder sie sind symmetrisch ausgerichtet, was zur Bildung der Komplexe $E^*_{1,3-S}$ und $E^*_{1,3-S'}$ zu gleichen Teilen und damit nicht stereoselektiver Hydrolyse führt (8).

1.5 Fettstoffkatabolismus

Triacylglycerole (TAG) stellen die effizienteste Form metabolischer Energiespeicher im Körper dar und somit auch die wichtigste Energiequelle während Hungerperioden oder erhöhtem Energiebedarf. Im Vergleich zu freien Fettsäuren zeigt TAG nur sehr geringe biologische Toxizität und ist als Speichermedium deshalb besonders gut geeignet. Um die Fettsäuren dem Metabolismus zugänglich zu machen, müssen die Fettspeicher jedoch lipolytisch mobilisiert werden. Die dabei gebildeten Fettsäuren können als Detergens wirken, weshalb der gesamte Prozess einer exakten Regulation unterworfen sein muss, die sicherstellt, dass die Freisetzung der Fettsäuren genau mit deren Stoffwechsel und Mobilisierung balanciert ist (12).

Die wichtigste Aufgabe von Fettgewebe ist also die Akkumulation von Lipiden durch Lipidsynthese in Zeiten der Überversorgung sowie deren Mobilisierung durch TAG Hydrolyse bei entsprechendem Energiebedarf.

Die Aktivierung der Lipolyse ist einer strengen hormonalen Kontrolle unterworfen und wird durch den konzertierten Einsatz verschiedener Enzyme vollzogen, wobei man bisher von der Annahme ausging, dass die gut untersuchte hormonsensitive Lipase (HSL) die Schlüsselrolle in diesem Prozess einnimmt (13) (14).

Die Regulierung der HSL ist komplex und beinhaltet mehrere Mechanismen. Catecholamine wie Adrenalin wirken als lipolytische Hormone und stimulieren den Abbau durch Phosphorylierung der HSL durch cAMP-abhängige Proteinkinase, während anti-lipolytische Hormone wie Insulin die Mobilisierung im Wesentlichen durch Senkung des cAMP Levels inhibieren. Zusätzlich sind noch weitere Rezeptoren, Signalkaskaden und Lipiddroplet assoziierte Proteine wie Perilipin an der komplexen Regulation beteiligt (15).

HSL zeigt eine breite Substratspezifität und hydrolysiert neben TAG auch Diacylglycerol, Monoacylglycerol und Cholesterinester. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass die Aktivität der HSL gegenüber Diacylglycerol (DAG) und Cholesterinester höher ist als gegenüber TAG und Monoacylglycerol (MAG) (16) (17). Trotzdem wurde bis vor kurzem angenommen, HSL sei das entscheidende Enzym für die Fettsäuremobilisierung in Adipozyten.

Diese seit über 30 Jahren herrschende Meinung wurde vor allem durch die erfolgreiche Erzeugung einer HSL -/- Maus in ein neues Licht gerückt (18) (19). HSL galt als ein Paradebeispiel für ein durch reversible Phosphorylierung hormonreguliertes Enzym, doch die Meinung über ihre tatsächliche Wirkung in der Vielzahl an Geweben, in denen HSL nachgewiesen wurde, hat sich im Licht neuer Erkenntnisse und der Aufklärung der komplexen Möglichkeiten der Phosphorylierung des Enzyms stark gewandelt (20).

Die Betrachtung des Fettgewebes von HSL $-/-$ Mäusen brachte einige unerwartete Ergebnisse. Die Mäuse litten zwar nicht unter Fettleibigkeit, männliche Mäuse waren jedoch steril aufgrund von Oligospermie. Die Fettsäurezusammensetzung in gespeicherten Triacylglycerolen unterschied sich von jener in wildtype Mäusen und legt eine Substratspezifität der HSL nahe, die bisher nicht durch Studien an gereinigter HSL erkennbar wurde (21).

Weiters sinkt in HSL $-/-$ Mäusen die Fähigkeit zur TAG Hydrolyse nach Osuga et al. (18) nur um etwa 60%, während die Fähigkeit zur Spaltung von Cholesterinestern nicht mehr nachweisbar ist (22). Trotzdem wurde in Lipolyse Untersuchungen festgestellt, dass die Catecholamin-stimulierte Freisetzung von Glycerol in Fettzellen HSL defizienter Mäuse fast völlig ausgeschaltet war, obwohl noch immer die Freisetzung von freien Fettsäuren beobachtet wurde. Dieser anscheinende Widerspruch wurde durch die Beobachtung aufgeklärt, dass HSL defiziente Fettzellen DAG anstelle von TAG akkumulieren (23) (24).

HSL defiziente Mäuse zeigten also unerwartet keine Fettleibigkeit durch irreversible Anhäufung von TAG, sondern hatten normales oder sogar reduziertes Körpergewicht im Vergleich zu Kontrollmäusen.

Dies führte zur Annahme, dass ein oder mehrere zusätzliche Enzyme für die Triacylglycerolhydrolyse verantwortlich sein müssen und mündete schließlich in der Entdeckung und Beschreibung der ATGL und ihrer ausgeprägten Substratspezifität gegenüber Triacylglycerolen (25).

ATGL ist ein 54 kD Protein mit einer bemerkenswerten strukturellen Eigenheit. In einem rund 260 Aminosäuren umfassenden Bereich der N-terminalen Region des Enzyms existiert eine "Patatin" Domäne, die eigentlich nur in Pflanzenspeicherproteinen, wie deren Prototyp Patatin in Kartoffelknollen, auftritt (26). Im Unterschied zu den meisten anderen Lipasen enthält ATGL auch keine katalytische Triade, sondern eine Diade (Ser-Asp). Das aktive Zentrum ist in der bekannten, konservierten G-X-S-X-G S Sequenz lokalisiert und das Enzym zeigt die typische α/β – Hydrolase Faltung.

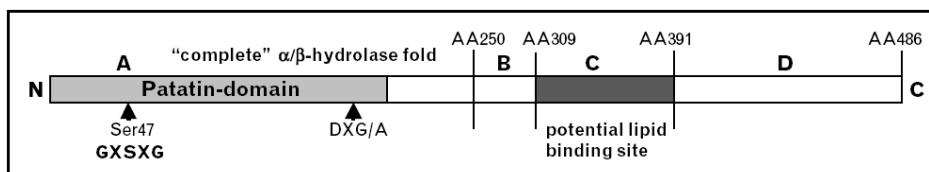


Abb. 1-7: Anordnung der funktionellen Domänen in ATGL. Abschnitt A enthält die Patatin Domäne, in der auch das wahrscheinlich aktive Serin an Position 47 im GXSXG Motiv lokalisiert ist. Abschnitt C besteht aus einer hohen Zahl an hydrophoben Aminosäuren, was auf eine mögliche Membran- bzw. Lipid-Bindestelle hinweist. Abschnitt B und D haben keine erkennbare Funktion. Dieselben Strukturmodule treten auch in Adiponutrin und GS-2-ähnlichem Protein auf. (29)

Zusätzlich wurde im Lauf eines Projekts namens Comparative Gene Identification, in dessen Rahmen 150 neue, zwischen *Caenorhabditis elegans* und Menschen konservierte Transkripte festgehalten wurden, das Protein CGI-58 entdeckt, das ebenfalls eine Rolle im Lipidstoffwechsel spielt.

CGI-58 gehört zur Esterase/Thioesterase/Lipase Unterfamilie, einer großen Gruppe von Proteinen, die als gemeinsames Strukturelement die α/β – Hydrolase Faltung aufweisen und agiert als enzymatischer Cofaktor der ATGL und erhöht deren lipolytische Aktivität bis zum 20fachen. Weiters wurde CGI-58 als ausschlaggebend für das Chanarin-Dorfman Syndrom (CDS) identifiziert, einer Erbkrankheit, bei der die Betroffenen neutrale Lipide in verschiedensten Geweben akkumulieren, was auch zur alternativen Bezeichnung "neutral lipide storage disease" (NLSD) führt (27) (28).

Neben der HSL, der eben erst kürzlich beschriebenen ATGL, die offenbar eine entscheidende Rolle im ersten Schritt der Fettsäuremobilisierung spielt (29) sowie deren Cofaktor CGI-58 existiert mit der Monoglyceridlipase (MGL) noch ein drittes für die Lipolyse wesentliches Enzym. MGL ist für den finalen Abbau von Monoacylglycerolen zu freien Fettsäuren und Glycerol verantwortlich. Die Absenz von MGL führt zur Akkumulation von toxischen Monoacylglycerolen.

MGL ist ein 33 kD Protein und zeigt neben Aktivität gegenüber primären Monoacylglycerolen auch die Fähigkeit zur Hydrolyse der sn-2 Esterbindung (30). Die physiologische Rolle der MGL ist also der Abbau der Monoacylglycerole, die im Laufe der Lipidmobilisierung gebildet werden.

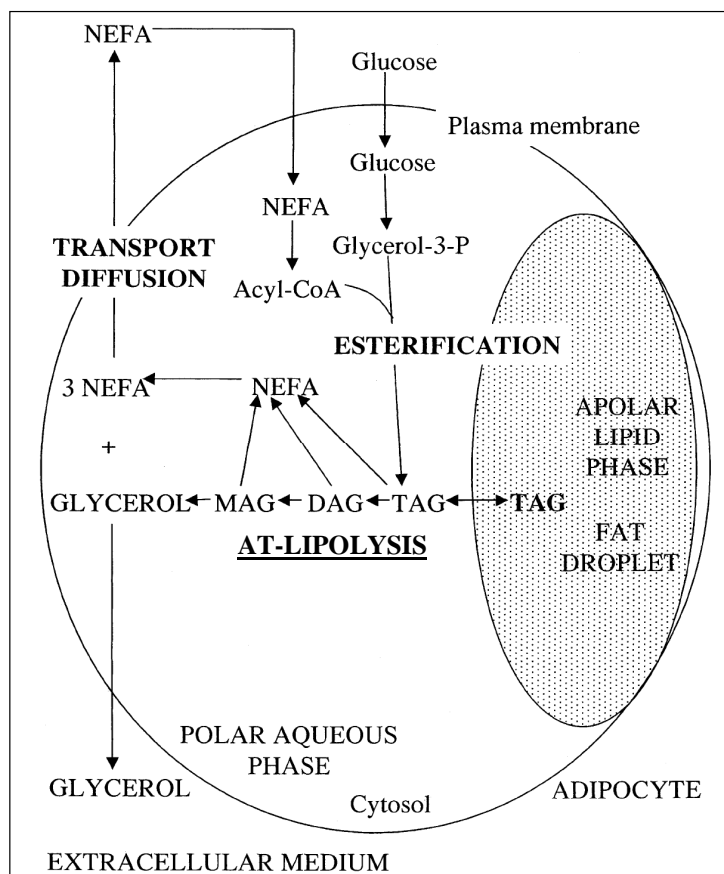


Abb. 1-8: Vereinfachtes Schema der Lipidmobilisierung und Wiederaufnahme in Lipid droplets in Fettzellen. TAG: Triacylglycerol; DAG: Diacylglycerol; MAG: Monoacylglycerol; NEFA: non-esterified fatty acid (freie Fettsäure) (37)

1.6 Lipase Assays

Aufgrund der bedeutenden Rolle, die Lipasen in verschiedensten technologischen Bereichen innehaben, existiert eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung ihrer Aktivität. Exakte Assays wie die pH-Stat Methode, Wilhelmy Plate Methode oder Oil-drop Methode benutzen ein aufwendiges Geräte-Setup. Sie erlauben zwar eine verlässliche Aktivitätsbestimmung, benötigen jedoch auch eine große Menge an Enzym (0.1 bis 1 μg pro Assay) und können nicht automatisiert werden.

Weitere Methoden basieren auf Radioaktivität, Colorimetrie oder Fluorometrie (31). Radioaktivitäts-Assays zeichnen sich durch die Möglichkeit aus, Substrate verwenden zu können, die das Enzym nicht beeinflussen und vom Enzym nicht von einem natürlichen Substrat unterschieden werden können. Diese Assays geben folglich den genauesten Aufschluss über das Aktivitäts-Verhalten des Enzyms, sind aber durch die Verwendung von Radioisotopen mit allen dazugehörigen zeitaufwändigen und kostspieligen Sicherheitsvorkehrungen verbunden.

Colorimetrische Assays nutzen eine chromophore Gruppe, die über eine hydrolysierbare Bindung an ein Substratanalog gebunden ist. Gemessen wird der Absorptionsanstieg des durch Enzymaktivität freigesetzten Chromophors. Die Fluorometrie verfolgt die Fluoreszenzintensität eines an ein Substratanalog gebundenen fluoreszierenden Markers bei einer bestimmten Wellenlänge. Sie stellt dadurch die sensitivere der beiden Methoden dar (32).

Beide spektroskopischen Methoden nutzen also ein Substrat, das chemisch modifiziert wurde und somit bis zu einem gewissen Grad das Enzym beeinflusst, seien es nun Substraterkennungsprozesse, Substratbindung, Geschwindigkeit der Hydrolyse und anderes mehr.

Ein Marker dessen Einfluss auf das Enzym gering ist und der das natürliche Verhalten von Lipid-Substraten am besten nachahmt, ist ein an die ω -Position einer Fettsäure gebundenes Pyren (33) (34). In diesem Fall ist ein unpolarer Marker an einen unpolaren Substituenten gebunden. Weiters ist die ω -Position der Fettsäure jene mit der geringsten molekularen Ordnung. Somit sollten in dieser Region perturbierende Effekte minimal sein. Ein Triacylglycerol mit einer terminal Pyren-substituierten Fettsäure wird durch die Markierung chiral. Sind diese Substratanologa also stereochemisch rein, kann zusätzlich zur Aktivitätsbestimmung anhand der erhaltenen Produkte auch die Stereoselektivität der untersuchten Lipase bestimmt werden.

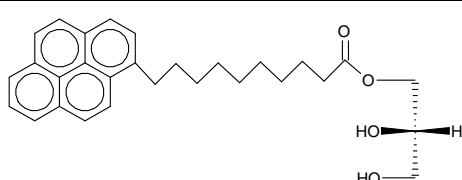
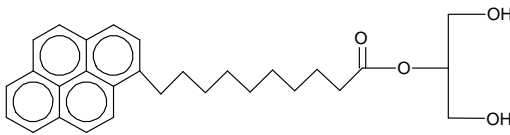
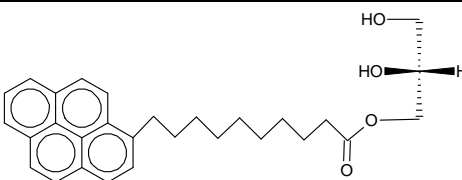
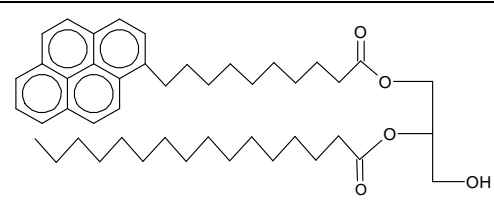
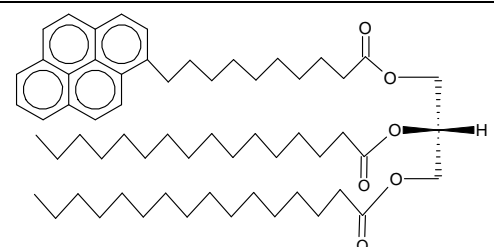
In dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit von acht verschiedenen pyrenmarkierten Substraten zur Aktivitäts- und Stereoselektivitätsbestimmung von Enzymen, sowie deren Einsatzmöglichkeit zur Lipasebestimmung in komplexen Medien wie Cytosol- und Fettgewebekomogenaten etabliert und angewandt.

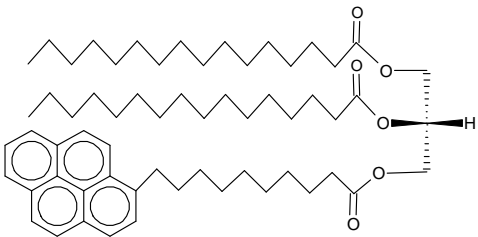
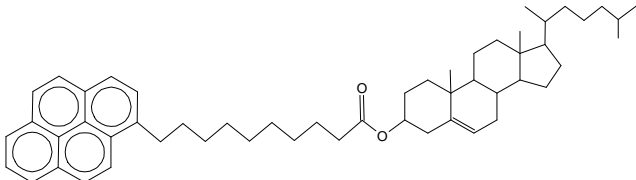
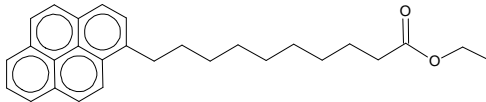
2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Substrate

Für unsere Untersuchungen setzten wir ein Set von pyrenmarkierten Substraten ein, deren Synthese von Gernot Riesenhuber wie in seiner Dissertation beschrieben (35) durchgeführt wurde. Folgende Substrate kamen zum Einsatz:

Tabelle 2-1: Übersicht über die für die Assays verwendeten, pyrenmarkierten Substrate

Substrat	Abkürzung	Molekulargewicht und Summenformel
	<i>sn</i> -1 PD-MAG	446.578 C ₂₉ H ₃₄ O ₄
	<i>sn</i> -2 PD-MAG	446.578 C ₂₉ H ₃₄ O ₄
	<i>sn</i> -3 PD-MAG	446.578 C ₂₉ H ₃₄ O ₄
	<i>rac</i> -1(3) PD-DAG	684.987 C ₄₅ H ₆₄ O ₅
	<i>sn</i> -1 PD-TAG	923.395 C ₆₁ H ₉₄ O ₆

	sn-3 PD-TAG	923.395 C ₆₁ H ₉₄ O ₆
	PD-CE	741.138 C ₅₃ H ₇₂ O ₂
	PD-EE	400.552 C ₂₈ H ₃₂ O ₂

Bei den Substraten handelte es sich in erster Linie um pyrenmarkierte Glycerolipide, die zum größten Teil enantiomerenrein synthetisiert wurden, um eventuelle Stereopräferenzen der untersuchten Enzyme sichtbar zu machen. Zusätzlich kamen Pyrendecansäureethyl- bzw. cholesterylester zum Einsatz.

2.2 Assays mit mikrobiellen Lipasen

2.2.1 Mikrobielle Lipasen

Folgende kommerziell erhältliche mikrobielle Lipasen wurden zur Entwicklung und Validierung der Methode verwendet:

***Rhizomucor miehei* Lipase** (RML), Sigma Aldrich, (Cat. No. 62291, St. Louis, MO, USA)

***Chromobacterium viscosum* Lipase** (CVL), Biocatalysts Ltd. (Cardiff, UK)

***Candida cylindracea* Cholesterol Esterase** (ccCE), Roche Diagnostics GmbH (Cat. No. 10393916001, Mannheim, Germany)

Von diesen Enzymen wurden für die Enzym-Assays Lösungen von 20ng/μL Enzym in Tris-HCl Puffer (100mM, pH 7,4) hergestellt. Da deren Aktivität jedoch schnell abnimmt, sollten sie bei 4°C im Dunkeln gelagert und innerhalb von 48h verwendet werden.

2.2.2 Herstellung der Substratemulsionen

Zur Entwicklung der Methode (proof of principle) wurden in der ersten Phase mikrobielle Lipasen eingesetzt, die gegenüber Detergenzien relativ robust sind. Für diese ersten Screenings wurden Lipid-Micellen mit Triton X-100 als Detergens hergestellt.

In einem Glas-Vial wurden 100 μ L Triton X-100 Lösung (100mM) in CHCl_3 und 20 μ L einer 10mM Lösung des jeweiligen Substrates (ebenfalls in CHCl_3) gemischt und das Chloroform wurde anschließend unter N_2 -Strom verdampft.

Das Vial mit dem verbliebenen Lipidfilm wurde mit 10ml Tris-HCl Puffer (100mM, pH 7,4) aufgefüllt und dann mit Ultraschall (Labsonic 1510, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) bei 140W ohne Kühlung mit einer 4mm Ultraschallsonde für eine Minute beschallt. Die dabei entstehenden Lipidmicellen können einige Wochen bei 4°C gelagert werden. Vor Verwendung wurden die Substrate auf 30°C erwärmt und gründlich gevortext.

2.2.3 Lipase-Assays und TLC-Analyse der Lipide

In Eppendorf Tubes wurden 100 μ L Substratemulsion (entspricht 2nmol Substrat) mit unterschiedlichen Mengen (2.5, 5.0, 25, 50 und 100 μ L) Enzym Lösung (20ng/ μ L, siehe Kap. 2.2.1) gemischt und (falls nötig) mit Tris-HCl Puffer (100mM, pH 7,4) auf 200 μ L aufgefüllt. Das Substrat wurde mit dem Enzym für 30min bei 37°C auf einem Eppendorf Thermomixer unter konstantem Schütteln inkubiert und die Reaktion schließlich durch Zusatz von 1mL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1) gestoppt. Danach wurden 20 μ L HCl (1M) zugesetzt, um die freien Fettsäuren quantitativ zur undissoziierten Säure zu verschieben.

Das erhaltene Zweiphasen System wurde für 4min kräftig gevortext und anschließend kurz bei 9000g zentrifugiert, um eine saubere Phasentrennung zu erzielen. Dabei lösen sich das Substrat sowie alle eventuell vorliegenden Abbauprodukte und Zwischenstufen in der organischen Phase, während das Enzym entweder ausfällt und als weißer Niederschlag an der Grenzfläche der beiden Phasen sichtbar wird oder gelöst in der wässrigen Phase verbleibt. Die wässrige Phase wurde zusammen mit dem eventuell vorhandenen Niederschlag quantitativ abpipettiert (Gilson pipette tips 1000, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria).

Die organische Phase wurde nochmals mit 500 μ L $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (4:1) gewaschen, gevortext und zentrifugiert und die Phasen wiederum wie oben getrennt. Das CHCl_3 der erhaltenen Probe wurde mittels N_2 -Strom entfernt und der Rückstand in 20 μ L CHCl_3 gelöst und quantitativ auf eine Kieselgel-beschichtete Aluminiumplatte aufgetragen (Silica gel 60, Cat. No. 1.05553.0001, Merck, Darmstadt, Germany). Als Laufmittel diente $\text{CHCl}_3/\text{EtAc}$ (90:10) und die erhaltenen Spots wurden mittels einer CCD Kamera (Herolab EASY System, Software WinEasy32) und einer Anregungswellenlänge von 365nm sichtbar gemacht.

2.2.4 Lipase Assays und HPLC-Analyse der Lipide

Für die HPLC Trennungen wurde im Gegensatz zu den halbquantitativen TLC Analysen eine konstante Enzymmenge (1000ng pro Ansatz), aber unterschiedlich lange Inkubationszeiten gewählt. In einem Eppendorf Tube wurden 100 μ L Substratemulsion (2nmol) mit 50 μ L Enzymlösung (20ng/ μ L) in Tris-HCl Puffer (100mM, pH 7,4) und weiteren 50 μ L Tris-HCl Puffer (100mM, pH 7,4) gemischt und wiederum für 30min bei 37°C auf einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde nach verschiedenen langen Inkubationszeiten (5, 15, 30min) durch Zusatz von 1ml CHCl₃/MeOH (2:1, HPLC rein!) gestoppt. Schließlich wurden noch 20 μ L HCl (1M) zugesetzt, um die freien Fettsäuren quantitativ zur undissoziierten Säure zu verschieben und als interner Standard wurden 20 μ L 0,1mM PD-CE in CHCl₃ zugefügt (entspricht 2nmol).

PD-CE wurde aufgrund seines definierten, gut getrennten und reproduzierbaren HPLC Peaks als interner Standard gewählt. Bei Assays mit PD-CE als Substrat hätte ein anderer interner Standard verwendet werden müssen, allerdings stellte sich heraus, das PD-CE als Substrat von den Enzymen nicht akzeptiert wurde.

Das erhaltene Zweiphasen System wurde, wie bereits beschrieben, für 4min kräftig gevortext und anschließend kurz bei 9000g zentrifugiert, um eine saubere Phasentrennung zu erzielen. Die wässrige Phase wurde quantitativ abpipettiert (Gilson pipette tips 1000, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria). Die organische Phase wurde nochmals mit 500 μ L H₂O/MeOH (4:1) gewaschen, gevortext und zentrifugiert und die Phasen wie oben getrennt. Die erhaltene Probe wurde durch eine 4mm Millex®-LG Syringe Filter Unit mit 20 μ m Porengröße filtriert und abschließend in einem 1,5mL HPLC Glas-Vial (La-Pha-Pack®, Werner Reifferscheidt GmbH, Langerwehe, Deutschland) gesammelt, um eventuell noch in der organischen Phase verbliebene Enzymaggregate und sonstige Festkörper, die die HPLC Säule verstopfen könnten, zu entfernen. Aus dieser Probe wurden 10 μ L per Autosampler in das HPLC System injiziert.

2.2.5 HPLC System und Trennungsbedingungen

Die HPLC-Apparatur bestand aus einem Waters 2695 Trennungsmodule (Waters Corporation, Milford, MA, USA) und einer ACE® C18 Säule (150 x 4,0mm) mit 3 μ m Partikeldurchmesser und 100 Å Porengröße (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland). Detektiert wurden die Analyten mittels eines Waters 2475 Multi λ Fluoreszenz-Detektors bei einer Anregungswellenlänge von 341nm und einer Emissionswellenlänge von 377nm. Gesteuert wurde das System per Computer mittels Empower™ Software (Waters).

Alle verwendeten Laufmittel waren von Carl Roth GmbH & Co KG (HPLC rein, Karlsruhe, Germany).

Als mobile Phase wurde für die ersten 4 Minuten eine Mischung aus 95% MeOH und 5% Wasser mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) verwendet, dann wurde über 2 Minuten linear auf 100% Aceton gewechselt und bis Minute 10,5 beibehalten. Anschließend wurde wieder auf die Ausgangszusammensetzung MeOH/H₂O gewechselt und 1,5 Minuten lang beibehalten, um für die nächste Injektion wieder gleiche Startbedingungen zu erhalten.

10µL Probe wurden injiziert. Ein Analysenlauf dauerte 12 Minuten bei einer Durchflussrate von 0,8mL/min. Die Probentemperatur im Probensammler betrug 15°C (bei geringerer Temperatur kommt es zu Ausfällungserscheinungen!). Die Säule wurde konstant auf 30°C gehalten.

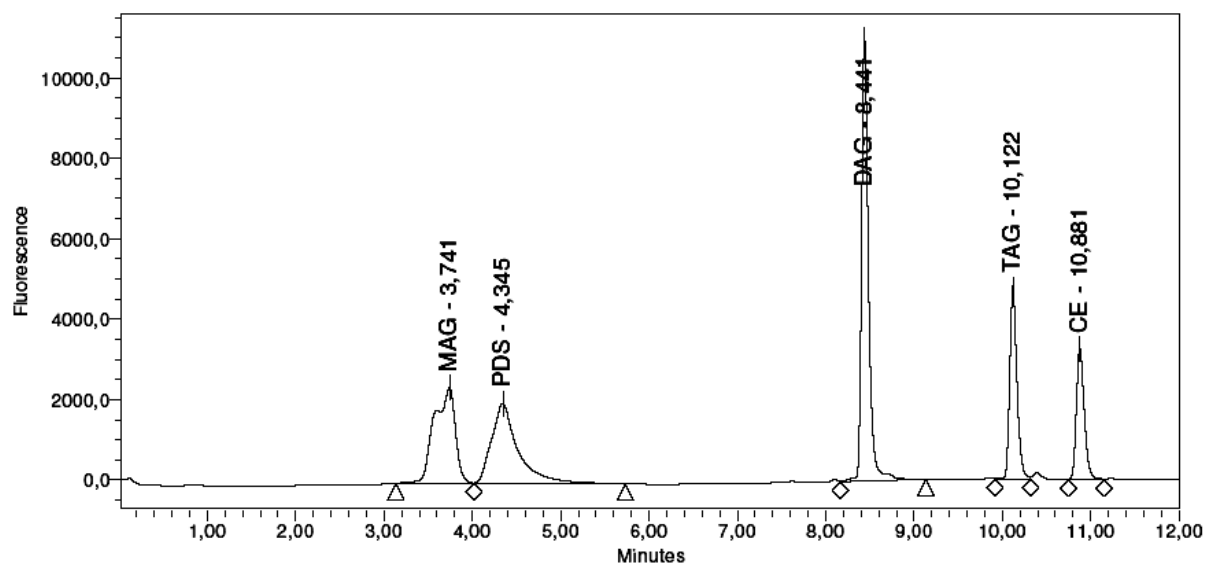


Abb. 2-1: Typisches HPLC-Chromatogramm mit den Peaks der mit PDS markierten Glycerolipide bzw. den möglichen Reaktionsprodukten nach enzymatischer Spaltung sowie dem PD-CE Peak

2.3 Assays mit humanen bzw. murinen Lipasen

2.3.1 Herstellung der Substratemulsion

Für den Einsatz mit humanen bzw. murinen Lipasen wurden die Substrate prinzipiell auf die gleiche Art und Weise hergestellt wie unter Kap. 2.2.2 beschrieben, allerdings wurde statt Triton X-100 PC/PI als Vesikelbildner verwendet. In einem Glas-Vial wurden 100 μ L einer Lösung von 10mg/mL PC/PI (3:1) in CHCl_3 und 20 μ L einer 10mM Lösung des jeweiligen Substrates (ebenfalls in CHCl_3) gemischt und das Chloroform wurde anschließend unter N_2 -Strom verdampft.

Das Vial mit dem verbliebenen Lipidfilm wurde mit 10mL Tris-HCl Puffer (100mM, pH 7,4) aufgefüllt und dann mit Ultraschall (Labsonic 1510, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) bei 140W ohne Kühlung mit einer 4mm Ultraschallsonde für eine Minute beschallt. Vor Verwendung wurden die Substrate auf 30°C erwärmt und gründlich gevortext.

Bei den Substratemulsionen, die 5% BSA enthielten, wurde der Lipidfilm nach Abdampfen des CHCl_3 mit 7,5 mL Tris-HCl Puffer aufgenommen und beschallt und anschließend mit 20% BSA Stammlösung in PBS auf 10mL aufgefüllt.

2.3.2 Zellkultur

Um die Substratspezifität und Regioselektivität von humanen Lipasen zu untersuchen, wurden die Enzyme HSL (Hormonsensitive Lipase), MGL (Monoglyceridlipase) und ATGL (Adipose Tissue Lipase) transient in COS-7 Zellen (ATCC #CRL 1651; Monkey African green kidney, SV40 transformiert; MRC Laboratory of Molecular Biology) exprimiert. Die COS-7 Zellen wurden von Rudolf Zechner (Karl-Franzens Universität Graz) zur Verfügung gestellt.

Die Plastikware für die Zellkultur kam von Sarstedt Ltd. (Leicester, UK).

Folgende Puffer, Medien und Zusätze wurden verwendet:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 1g/L Glucose, 25mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfosäure), 4mM L-Glutamin)

1x Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS ohne Calcium und Magnesium)

Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL Penicillin, 10mg/mL Streptomycin in physiologischer Salzlösung)

Trypsin/EDTA (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L EDTA in 1x PBS)
- alles von PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)

Fetales Kalbserum (fetal calf serum – FCS) von GIBCO™ (Eggenstein, Deutschland)

DMSO von Sigma (Steinheim, Deutschland)

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen und Schalen in DMEM mit 10% FCS und 100U/mL Penicillin, 100µg/L Streptomycin bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ kultiviert. Das Wachstumsmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

2.3.3 Auftauen der Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen (-70°C) wurden schnell auf 37°C erwärmt und dann sofort in 75cm² Zellkulturflaschen mit 15mL DMEM, 10% FCS und 100U/mL Penicillin/Streptomycin überführt. Das Medium wurde 24h nach der ersten Inkubation gewechselt.

2.3.4 Zellpassage

Nachdem die Zellen in den Kulturflaschen konfluent waren (Überprüfung erfolgte mikroskopisch), mussten sie zur weiteren Vermehrung gesplittet und in neue Flaschen überführt werden. Dazu wurden sie zwei Mal mit PBS gewaschen. Dann wurde der Zell-Monolayer mit Trypsin/EDTA (12mL für eine 175cm² Flasche, 6mL für 75cm² Flaschen) überschichtet und für maximal 5 Minuten auf einer Heizplatte auf 37°C erwärmt. Nach der Trypsinisierung konnten die Zellen durch leichtes Schlagen auf die Flasche vom Gefäßboden gelöst werden.

Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe desselben Volumens an Wachstumsmedium gestoppt. Schließlich wurde die erhaltene Zellsuspension in ein steriles Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 300g für 2min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem für die weitere Aufteilung geeigneten Volumen Wachstumsmedium (37°C) resuspendiert. Danach wurden die Zellen in einem Split-Verhältnis von 1:7 sofort auf neue Kulturflaschen verteilt, wo sie nach weiteren 4 Tagen wiederum Konfluenz erreichten.

2.3.5 Frieren und Aufbewahrung der Zellen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und in Wachstumsmedium mit 10% DMSO resuspendiert. In 1,5mL Screw-Cap Vials wurden Aliquots dieser Suspension, die 17,5cm² konfluenten Zell-Monolayers entsprechen, überführt und dann bei einer kontrollierten Kühlrate von -1°C pro Minute auf -70°C gekühlt (NALGENE© Cryo 1°C freezing container). Aufbewahrt wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff.

2.3.6 Transiente Expression von HSL, MGL, ATGL und CGI 58 in COS-7 Zellen

Die cDNA der vier Enzyme wurde wie von Birner-Gruenberger R. et al. (36) beschrieben erhalten. Das Klonen der cDNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA4/HisMax (Invitrogen Inc.) wurde durchgeführt im Labor von Rudolf Zechner (Karl-Franzens Universität Graz).

24 Stunden vor der Transfektion wurden die COS-7 Zellen in einem Splitverhältnis von 1:3,7 in 6-well-plates mit 2mL Wachstumsmedium unter normalen Wachstumsbedingungen überführt. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen zu ungefähr 75% konfluent.

Die Transfektion der Zellen wurde mit MetafecteneTM (Biontex Laboratories GmbH, München, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4h nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium entfernt und die Zellen weitere 48h mit frischem Wachstumsmedium inkubiert.

2.3.7 Ernten der Zellen und Proteinbestimmung

Die transfizierten Zellen wurden schließlich bei 4°C zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Gummi-Kratzer geerntet und bei 3200g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysis Puffer (PBS, 20 µg/mL Leupeptin, 2 µg/mL antipain, 1 µg/mL Pepstatin) resuspendiert und die Zellen schließlich bei Eiskühlung durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Braun Labsonic 1510, Melsungen, Germany; Sondendurchmesser: 4 mm, Leistung: 50-100 W, 2x 1 Minute). Die erhaltene Lösung wurde unter oben angeführten Bedingungen noch einmal zentrifugiert, um Kerne und Zellfragmente zu entfernen.

Der Proteingehalt des Überstandes wurde schließlich mittels Bradford-Test unter Verwendung des Bio-Rad® Protein-Assay in Mikrotiterplatten bestimmt. Zur Kalibration wurde Rinderserum Albumin verwendet.

2.3.8 β -Galactosidase Assay

Um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen, wurde ein β -Galactosidase Assay mit COS-7 Zellen durchgeführt, die zu Kontrollzwecken mit lacZ transfiziert wurden.

48h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach mit 0,5% Glutaraldehyd in PBS für 5min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde noch zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1mL X-Gal Lösung gefärbt.

(Lösung I, 900 μ L, [10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 3.3 mM K₄Fe(CN)₆·3H₂O, and 3.3 mM K₃Fe(CN)₆] und Lösung II, 100 μ L, [0.2% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranosid in N,N-dimethylformamid] wurden gemischt und auf die Zellen aufgebracht.)

Nach etwa 12h Inkubation ist die Färbung abgeschlossen. Transfizierte Zellen erscheinen nach der X-Gal Färbung blau.

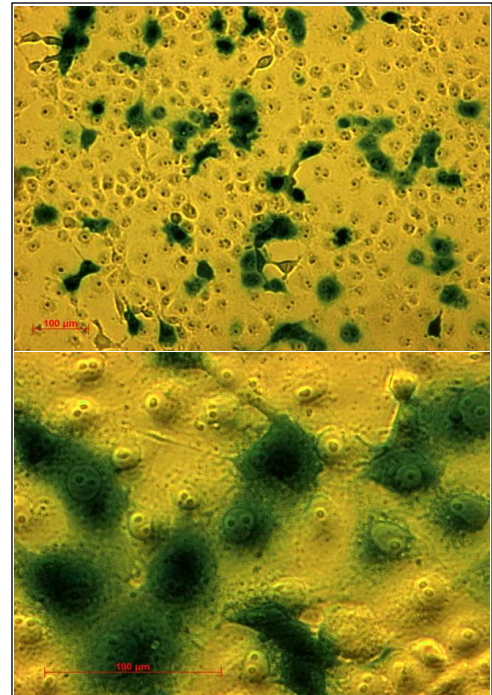


Abb. 2-2: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von COS-7 Zellen, transfiziert mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA4/HisMax, der das LacZ Gen, das für die β -Galactosidase codiert, trägt. Blaue Zellen sind erfolgreich transfiziert worden.

2.3.9 COS-7 Cytosol Lipase-Assays für HPLC und TLC-Analyse

In Eppendorf Tubes wurden 100 μL (2 nmol) der jeweiligen Substratemulsion mit einer Menge des Cytosolhomogenats gemischt, die 150 μg Gesamtprotein entspricht.

Der Proteingehalt der Cytosolpräparation (siehe Kap. 2.3.8) lag durchschnittlich zwischen 1mg/mL und 1,8mg/mL. Also wurden zwischen 80 μL und 150 μL Cytosolhomogenat für einen Assay benötigt. Um die Schwankungen im Proteingehalt kompensieren zu können, wurde das Gesamtvolumen für die Assays auf 300 μL erhöht, fehlendes Volumen wurde mit PBS aufgefüllt.

Das erhaltene Gemisch wurde für 30min bei 37°C auf einem Eppendorf Thermomixer inkubiert und die Reaktion durch Zusatz von 1mL $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1, HPLC rein!) gestoppt. Schließlich wurden noch 20 μL HCl (1M) zugesetzt, um die freien Fettsäuren quantitativ zur undissoziierten Säure zu verschieben und als interner Standard wurden 20 μL 0,1mM PD-CE in CHCl_3 zugefügt (entspricht 2nmol).

Das erhaltene Zweiphasen System wurde, wie bereits beschrieben, für 4min kräftig gevortext und anschließend kurz bei 9000g zentrifugiert, um eine saubere Phasentrennung zu erzielen. Die wässrige Phase wurde quantitativ abpipettiert (Gilson pipette tips 1000, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria). Die organische Phase wurde nochmals mit 500 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (4:1) gewaschen, gevortext und zentrifugiert und die Phasen wie oben getrennt. Die erhaltene Probe wurde durch eine 4mm Millex®-LG Syringe Filter Unit mit 20 μm Porengröße filtriert und abschließend in einem 1,5mL HPLC Glas-Vial (La-Pha-Pack®, Werner Reifferscheidt GmbH, Langerwehe, Deutschland) gesammelt, um eventuell noch in der organischen Phase verbliebene Enzymaggregate und sonstige Festkörper, die die HPLC Säule verstopfen könnten, zu entfernen. Aus dieser Probe wurden 10 μL per Autosampler in das HPLC System injiziert.

Für die ebenfalls durchgeführten TLC Analysen wurde bis zum Waschen und anschließendem Trennen des Zweiphasensystems gleich verfahren.

Danach wird das CHCl_3 im N_2 -Strom verdampft, der Rückstand in 20 μL CHCl_3 aufgenommen und quantitativ auf eine Dünnschichtchromatographie-Aluminiumplatte aufgetragen (Silica gel 60, Cat. No. 1.05553.0001, Merck, Darmstadt, Germany). Als Laufmittel diente $\text{CHCl}_3/\text{EtAc}$ (90:10) und die erhaltenen Spots wurden mittels CCD Kamera (Herolab EASY System, Software WinEasy32) bei einer Anregungswellenlänge von 365nm sichtbar gemacht.

2.3.10 Mausfettgewebe

Schließlich untersuchten wir das Fettgewebe von wildtype und knockout Mäusen, denen jeweils eines der drei Enzyme ATGL, HSL oder MGL fehlte.

Das Fettgewebe wurde von Rudolf Zechner (Karl-Franzens Universität Graz) zur Verfügung gestellt. Weißes (white adipose tissue – WAT) und braunes (brown adipose tissue – BAT) Fettgewebe von normal gefütterten Mäusen wurde in einem Tris-HCl Puffer (10mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,25M Sucrose, 20µg/mL Leupeptin, 2µg/mL antipain, 1µg/mL Pepstatin) mittels eines Homgenplus Homogenizers homogenisiert und dann bei 1000g für 5min zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellfragmente zu entfernen. Das erhaltene Homogenat wurde für die weiteren Experimente verwendet.

2.3.11 Mausfett Lipase-Assays für die HPLC-Analyse

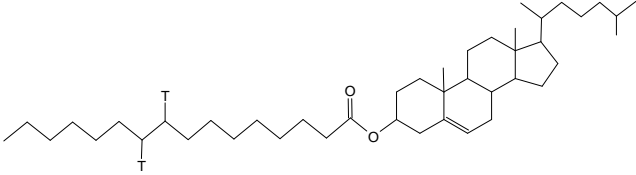
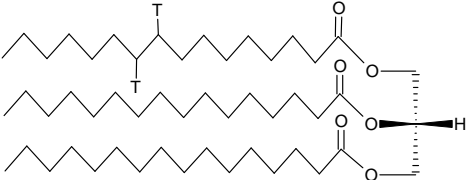
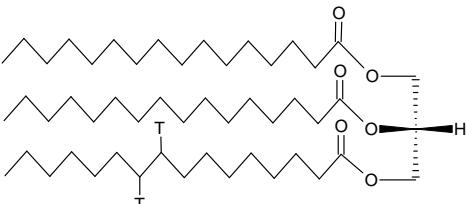
Für die Lipase-Assays wurde der Proteingehalt des Homogenats mittels Bradford-Test unter Verwendung des Bio-Rad® Protein-Assay in Mikrotiterplatten bestimmt. Zur Kalibration wurde Rinderserum Albumin verwendet.

Die restliche Durchführung entspricht exakt den COS-7 Cytosol Lipase-Assays – siehe Kap. 2.3.9.

2.4 Mausfett Lipase-Assays mit radioaktiv markierten Substraten

Die Fluoreszenzuntersuchungen an Mausfettgewebe wurden mit drei radioaktiv markierten Substraten wiederholt, um eventuelle Artefakte der Pyrenmarkierung sichtbar zu machen. Folgende Substrate kamen zum Einsatz:

Tabelle 2-2: Übersicht über die für die Lipase-Assays verwendeten, tritiummarkierten Substrate

Substrat	Abkürzung	Molekulargewicht und Summenformel	spez. Aktivität
	$^3\text{H-P-CE}$	629.087 $\text{C}_{43}\text{H}_{74}\text{T}_2\text{O}_2$	9,4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$
	<i>sn</i> -1 $^3\text{H-P-TAG}$	811.344 $\text{C}_{51}\text{H}_{96}\text{T}_2\text{O}_6$	10,6 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$
	<i>sn</i> -3 $^3\text{H-P-TAG}$	811.344 $\text{C}_{51}\text{H}_{96}\text{T}_2\text{O}_6$	11,7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$

2.4.1 Durchführung der radioaktiven Lipase-Assays

Zur Herstellung der Substratemulsion siehe Kap. 2.3.1, zur Durchführung der Lipase-Assays siehe Kap. 2.3.9. Die Trennung der Produkte erfolgte mittels TLC.

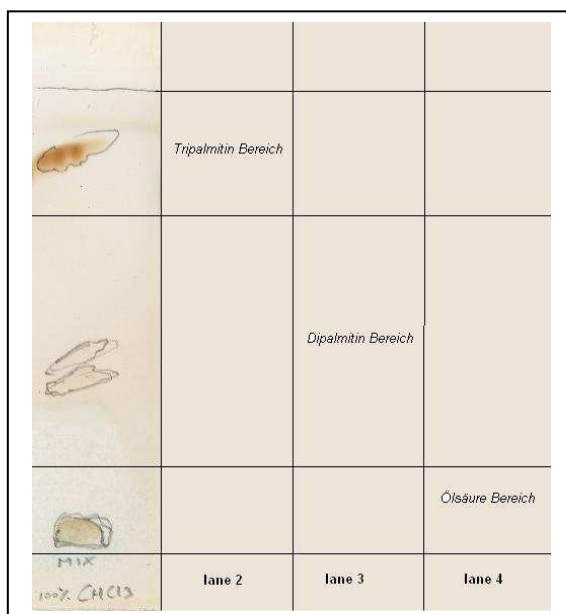
Als Referenz wurde ein Gemisch von Tripalmitin, Dipalmitin und Ölsäure mit einer Konzentration von rund $10\mu\text{mol}/\text{mL}$ jeder Substanz in CHCl_3 hergestellt. $20\mu\text{L}$ dieser Referenzlösung wurden auf die TLC-Platte aufgetragen, als Laufmittel diente CHCl_3 . Um die Fettsäure quantitativ zu deprotonieren und damit das typische "Schmier" organischer Säuren am DC zu verhindern, wurde auf jeden Startpunkt vor Beginn der Trennung noch ein Tropfen Triethylamin aufgetragen.

Die Spots der Referenzsubstanzen konnten aufgrund ihrer um den Faktor 100 höheren Konzentration in einer I₂-Kammer sichtbar gemacht werden. Aus den erhaltenen R_F-Werten konnte dann auf die Position der radioaktiven Spots geschlossen werden.



Abb. 2-3: DC zur Bestimmung der R_F-Werte von Ölsäure (lane 1), Dipalmitin (lane 2) und Tripalmitin (lane 3). Auf lane 4 wurde das Referenzgemisch mit allen drei Substanzen aufgetragen. Auf alle Startpunkte wurde vor Beginn der Trennung ein Tropfen TEA (Triethylamin) aufgetragen, Laufmittel war reines CHCl₃. Die Spots wurden mit I₂-Dampf sichtbar gemacht und danach mit Bleistift dauerhaft markiert.

Auf die DC Platten für die radioaktiven Lipase-Assays wurde eine lane für das Referenzgemisch verwendet, nach der Trennung wurden die Spots der Referenzsubstanzen in der Iodkammer sichtbar gemacht und so die Bereiche der radioaktiven Spots am DC eingegrenzt. Der Cholesterinester bewegt sich mit der Laufmittelfront und wird deshalb im selben Bereich wie das Triacylglycerol lokalisiert.



Die DC Platte wurde schließlich mit Wasser befeuchtet, die Spots abgekratzt und in Szintillations Vials mit 8mL Szintillations-Cocktail (5% H₂O) überführt. Die Vials wurden sorgfältig gevortext und schließlich am Szintillationszähler (Packard Tri-Carb 2900TR Liquid Scintillation Counter mit Quanta Smart™ Software [Protocol#4-3h_cpm.lsa]) vermessen.

Abb. 2-4: DC mit Bestimmung der radioaktiven Spotbereiche. Entsprechend den Referenzspots auf lane 1 wird das DC gerastert und der gesamte ermittelte Bereich der radioaktiven Spots auf den weiteren lanes für die Szintillationszählung abgekratzt.

3. Resultate

3.1 Aktivität und Selektivität mikrobieller Lipasen

3.1.1 Dünnschichtchromatographische Analysen

Zunächst wurde die Aktivität der bekannt robusten und aktiven *Rhizomucor miehei* Lipase (RML) gegenüber allen uns zur Verfügung stehenden Substraten bestimmt. Die Lipidtrennung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie.

Die Substratemulsionen wurden wie unter Kap. 2.2.3 beschrieben hergestellt und mit verschiedenen RML-Mengen für 30min bei 37°C inkubiert. Nach Abtrennung des Enzyms und der Extraktion der Lipide wurden die Reaktionsgemische auf TLC Platten aufgetragen und aufgetrennt.

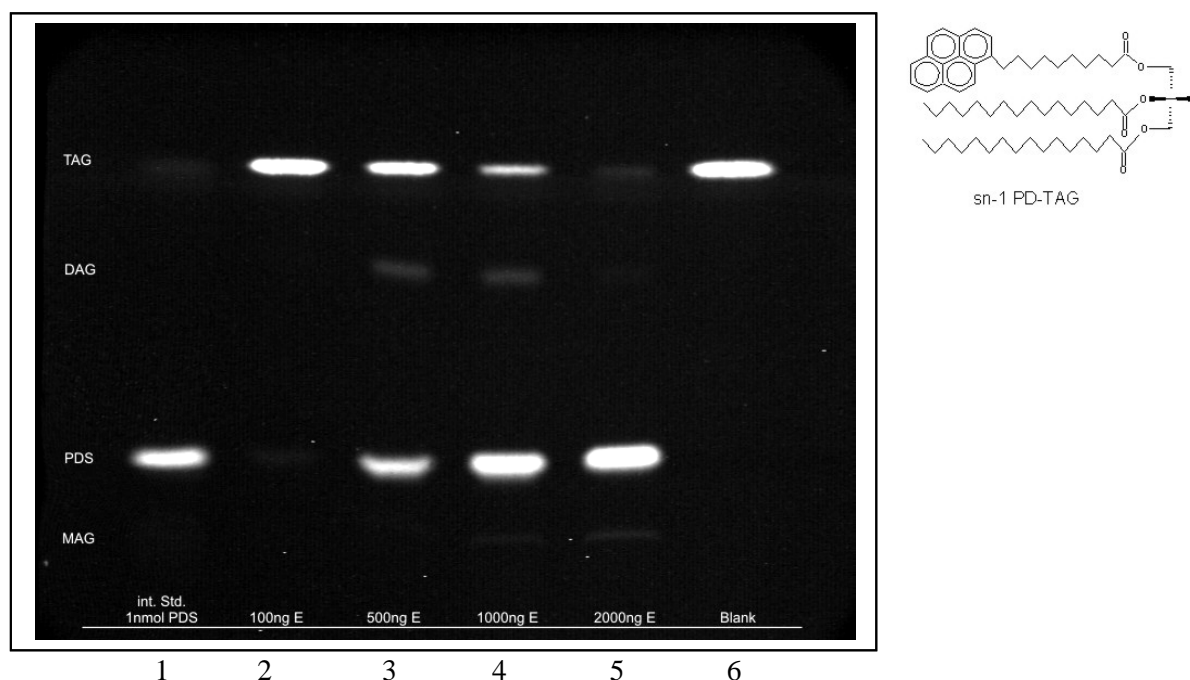


Abb. 3-1: Lipidspaltung durch RML. Substrat: sn-1 PD-TAG. Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches an Silicagel. Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{EtAc}$ (90:10)

Lane 1: 1nmol PDS als Standard

Lane 2-5: 2nmol Substrat inkubiert mit RML bei steigender Enzymmenge

Lane 6: 2nmol Substrat ohne Enzym

Das sn-1 PD-TAG wandert mit der Frontlinie des Laufmittels ganz nach oben. Bei Abspaltung der Fettsäure an Position sn-3 erwartet man die Bildung von fluoreszierendem sn-1 PD-DAG, das aufgrund seiner gegenüber dem TAG leicht erhöhten Polarität nicht ganz so weit wandert. Bei Spaltung an Position sn-1 sollte fluoreszierende ω -Pyrendecansäure entstehen. Das gleichzeitig gebildete Diacylglycerol ist in diesem Fall unmarkiert und nicht sichtbar.

Die freie Säure legt nur eine geringe Strecke zurück und wird in ihrer Polarität nur durch das Monoacylglycerol übertroffen. Wenn sn-1 PD-MAG durch eine Abspaltung der Fettsäure an Position sn-2 der Zwischenstufe sn-1 PD-DAG entstände, müsste es bei sehr kleinen R_f -Werten sichtbar sein.

Ergebnis: Bei dem hier als Substrat eingesetzten sn-1 PD-TAG wird deutlich, dass als erstes Reaktionsprodukt (bei niedrigster Enzymkonzentration) PDS sichtbar wird, was auf eine Bevorzugung der sn-1 Position durch die RML schließen lässt. (Spaltung an Position sn-3 würde zu sn-1 PD-DAG als erstem Reaktionsprodukt führen.)

Bei steigender Enzymkonzentration werden neben einer steigenden Menge an PDS auch Diacylglycerol Spots sichtbar (Spaltung des TAG an Position sn-3). Die sn-1 Präferenz des Enzyms ist also ausgeprägt, aber nicht absolut. Da Diacylglycerol ebenso ein Substrat der RML ist, wird auch dieses unter Bildung von unmarkiertem sn-2 MAG und freier Fettsäure weiter umgesetzt. Dies führt zur deutlich erkennbaren Abnahme der Intensität des PD-DAG Spots bei höchster Enzymkonzentration. Das Substrat wurde hier fast quantitativ zu sn-2 MAG und PDS bzw. Hexadecansäure umgesetzt.

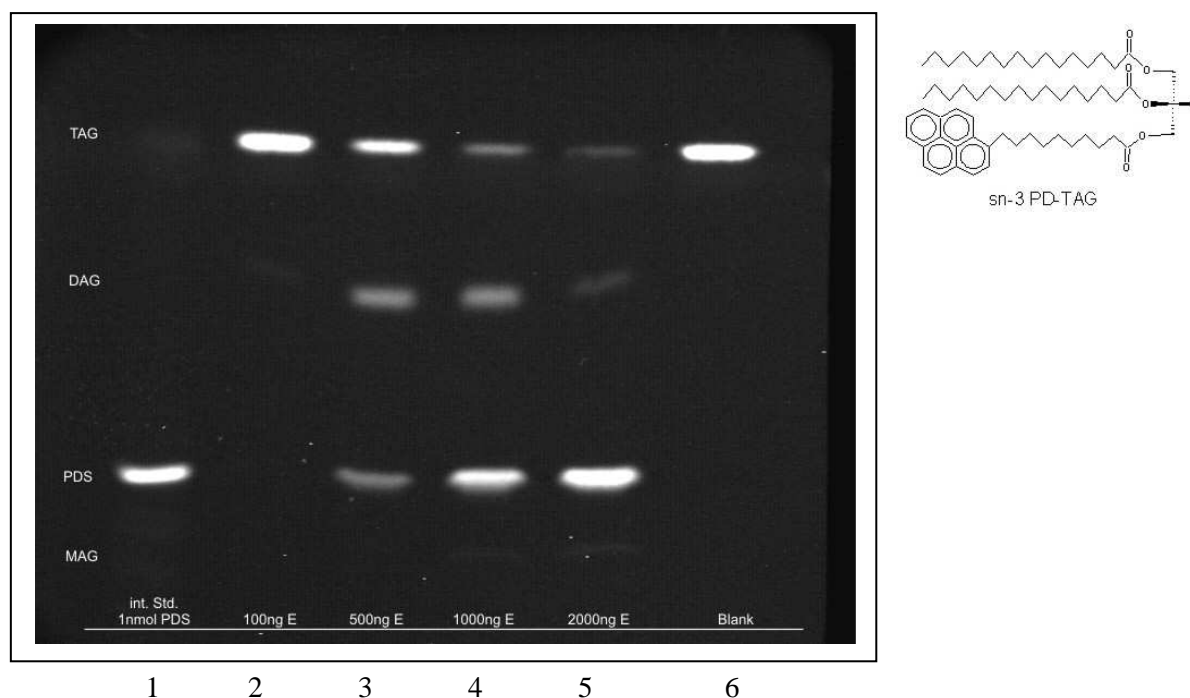


Abb. 3-2: Lipidspaltung durch RML. Substrat: sn-3 PD-TAG. Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches an Silicagel. Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{EtAc}$ (90:10)
 Lane 1: 1nmol PDS als Standard
 Lane 2-5: 2nmol Substrat inkubiert mit RML bei steigender Enzymmenge
 Lane 6: 2nmol Substrat ohne Enzym

Wird sn-3 PD-TAG als Substrat eingesetzt, erwartet man aufgrund der sn-1 Präferenz der RML nun als erstes sichtbares Produkt sn-3 PD-DAG, was aus Abb. 3-2 und Abb. 3-3 auch deutlich hervorgeht.

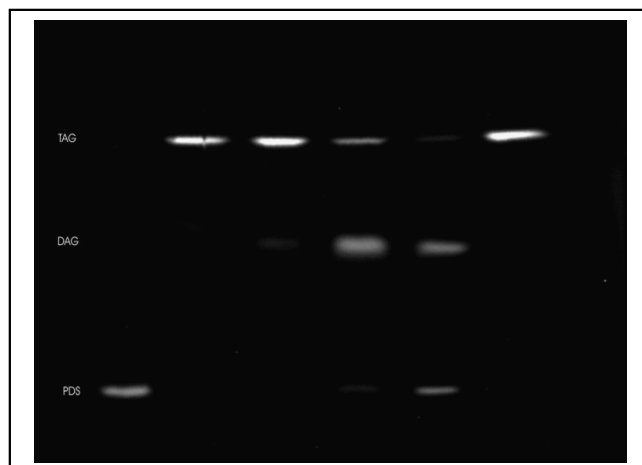
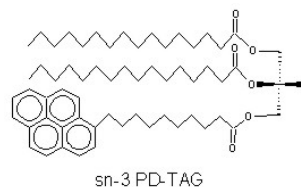


Abb. 3-3: Dünnschichtchromatographie wie in Abb. 3-2, allerdings inkubiert mit der halben Menge an RML, um das Auftauchen des ersten Produktes sn-3 PD-DAG besser sichtbar zu machen.



Da das fluoreszierende sn-3 PD-DAG wiederum als Substrat fungiert, kommt es in weiterer Folge zur Bildung von PDS, hauptsächlich durch weiteren Umsatz des im ersten Schritt entstandenen DAG, teilweise aber natürlich auch durch die unpräferenzielle Hydrolyse an der sn-3 Position des ursprünglichen Substrates.

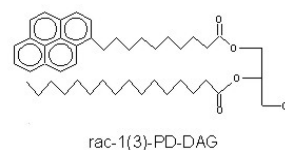
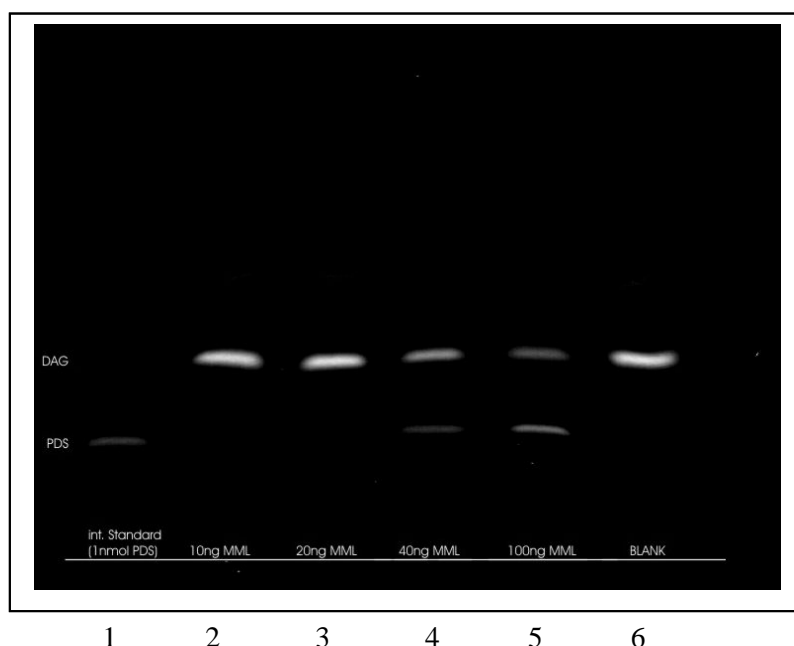


Abb. 3-4: Lipidspaltung durch RML. Substrat: *rac*-1(3) PD-DAG. Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches an Silicagel. Laufmittel:CHCl₃/EtAc (90:10)

Lane 1: 1nmol PDS als Standard

Lane 2-5: 2nmol Substrat inkubiert mit RML bei steigender Enzymmenge

Lane 6: 2nmol Substrat ohne Enzym

Die Hydrolyse von Diacylglycerol erfolgte bei deutlich niedrigerer Enzymkonzentration. Die höchste Konzentration von RML in Abb. 2-4 entspricht 100ng RML pro Ansatzvolumen (im Vergleich zu 2000ng bei den Assays mit Triacylglycerolen), wobei hier allerdings noch kein quantitativer Umsatz vorliegt. Die Hydrolyse des PD-DAG führte zu PDS als einzig sichtbarem Produkt, was bedeutet, dass keine Hydrolyse an der sn-2 Position stattfindet.

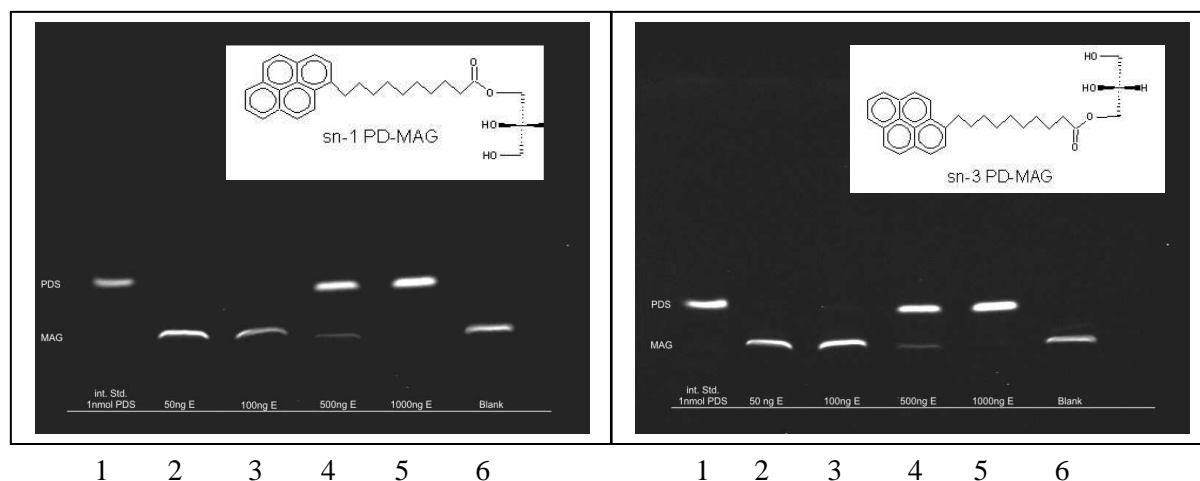


Abb. 3-5: Lipidspaltung durch RML. Substrat: sn-1 PD-MAG (links) und sn-3 PD-MAG (rechts). Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches an Silicagel. Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{EtAc}$ (90:10)
 Lane 1: 1 nmol PDS als Standard
 Lane 2-5: 2 nmol Substrat inkubiert mit RML bei steigender Enzymmenge
 Lane 6: 2 nmol Substrat ohne Enzym

sn-1 PD-MAG sowie sn-3 PD-MAG zeigen beide identische Hydrolyseschemata und benötigen ähnlich niedrige Enzymkonzentrationen wie DAG, um hydrolysiert zu werden. (Bei 1000 ng Enzym pro Ansatzvolumen ist die Hydrolyse des Substrats quantitativ.)

Zu beachten ist, dass hier der Substratspot unterhalb des Spots des Hydrolyseprodukts liegt. Hier ist PDS das einzig mögliche sichtbare Reaktionsprodukt, es können keine weiteren Aussagen über Stereo- bzw. Regiopräferenzen getroffen werden.

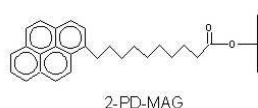
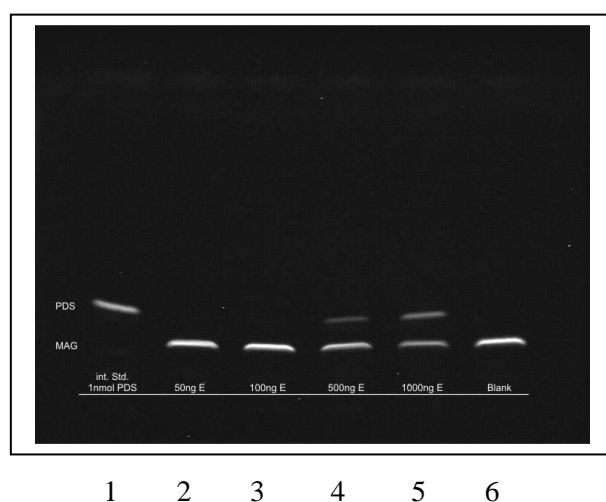


Abb. 3-6: Lipidspaltung durch RML. Substrat: sn-2 PD-MAG. Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches an Silicagel. Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{EtAc}$ (90:10)
 Lane 1: 1 nmol PDS als Standard
 Lane 2-5: 2 nmol Substrat inkubiert mit RML bei steigender Enzymmenge
 Lane 6: 2 nmol Substrat ohne Enzym

sn-2 PD-MAG wird ebenfalls hydrolysiert, im Vergleich zu den primär substituierten Glycerolen jedoch mit weit geringerer Effizienz. Solange andere Zwischenstufen als Substrat vorlagen, wurde Hydrolyse an der Position sn-2 so gut wie nicht beobachtet.

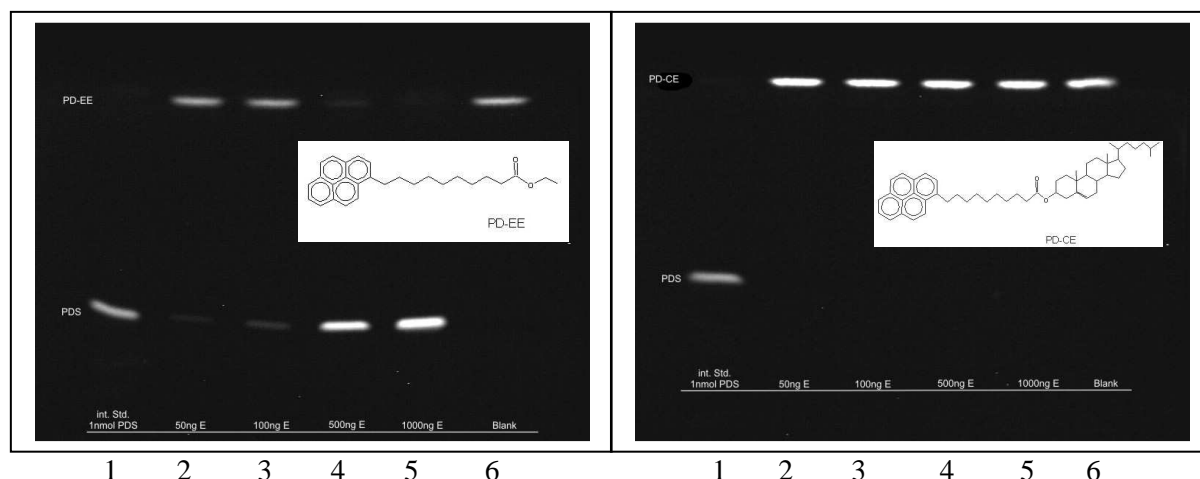


Abb. 3-7: Lipidspaltung durch RML. Substrat: PD-EE (links) und PD-CE (rechts). Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches an Silicagel. Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{EtAc}$ (90:10)

Lane 1: 1nmol PDS als Standard

Lane 2-5: 2nmol Substrat inkubiert mit RML bei steigender Enzymmenge

Lane 6: 2nmol Substrat ohne Enzym

Pyrendecansäureethylester als Substrat zeigt bei 1000ng Enzym im Ansatz quantitative Hydrolyse, der Cholesterinester jedoch wird bei keiner der eingesetzten Enzymkonzentration hydrolysiert.

Mit diesem Screening wurde gezeigt, dass unsere pyrenmarkierten Substrat-Analoga von der als Referenzenzym herangezogenen *Rhizomucor miehei* Lipase in Übereinstimmung mit den bekannten Substratpräferenzen hydrolysiert werden (abgesehen vom Cholesterinester, worauf später noch eingegangen wird) und die Möglichkeiten der Methode wurden deutlich gemacht. Weiters wurden die Größenordnungen der für eine sichtbare Hydrolyse nötigen Konzentrationen von Enzym und Substrat ermittelt.

Für die geplante quantitative Betrachtung der Umsätze eignete sich die dünnschichtchromatographische Trennung, wie eigentlich erhofft, allerdings nicht. Die Intensität der Spots wurde zwar mittels CCD Kamera bestimmt, war allerdings schon bei den PDS-Standardreihen kaum reproduzierbar und zeigte deutliche Abhängigkeit von der Größe und Form der Spots, sowie der Temperatur (Abföhnen des Laufmittels von der DC Platte z.B. verursachte extreme Intensitätsschwankungen, abhängig von der Erwärmung der Platte – nach dem Abföhnen muss die DC Platte im Dunkeln auf Raumtemperatur abkühlen). Um die Umsätze auch quantitativ bestimmen zu können, setzten wir ein HPLC Gerät mit Fluoreszenzdetektor für die Auftrennung und Quantifizierung der Lipid-Reaktionsgemische ein.

3.1.2 HPLC Analysen

Im Gegensatz zur einfach anwendbaren TLC musste als Vorbereitung für die HPLC Analyse ein HPLC Protokoll zur optimalen Trennung und Quantifizierung der Analyten entwickelt werden. Dies beinhaltet vor allem die Ermittlung der optimalen Zusammensetzung der mobilen Phase, des Gradienten und der Laufzeit.

Nachdem die Bedingungen optimiert worden sind, erlaubt die HPLC als vollautomatisierbares high throughput Verfahren allerdings die Analyse einer Vielzahl von Proben und deren exakter quantitativer Bestimmung in kürzester Zeit sowie die Auswertung einer großen Menge an Daten. Zur HPLC und den Analysebedingungen siehe Materialien und Methoden, Kap. 2.2.4 und 2.2.5.

Als erstes wurde geprüft, ob die bereits im TLC Screening ermittelte sn-1 Präferenz der RML mittels HPLC verifiziert werden kann. Zusätzlich wurden die Aktivitäten der Lipasen aus *Chromobacterium viscosum* (CVL) und der Cholesterinesterase aus *Candida cylindracea* (ccCE) an den sn-1- und sn-3 Triacylglycerolen bestimmt. Bei diesen Experimenten wurde (im Gegensatz zu den TLC Screenings) mit konstanter Enzymkonzentration und steigender Inkubationszeit gearbeitet (Kap. 2.2.4), um das eventuell vorübergehende Auftauchen von Zwischenprodukten besser verfolgen und somit exaktere Aussagen treffen zu können.

3.1.2.1 Bestimmung der Stereoselektivität von *Rhizomucor miehei* Lipase gegenüber fluoreszierendem Triacylglycerol mittels HPLC

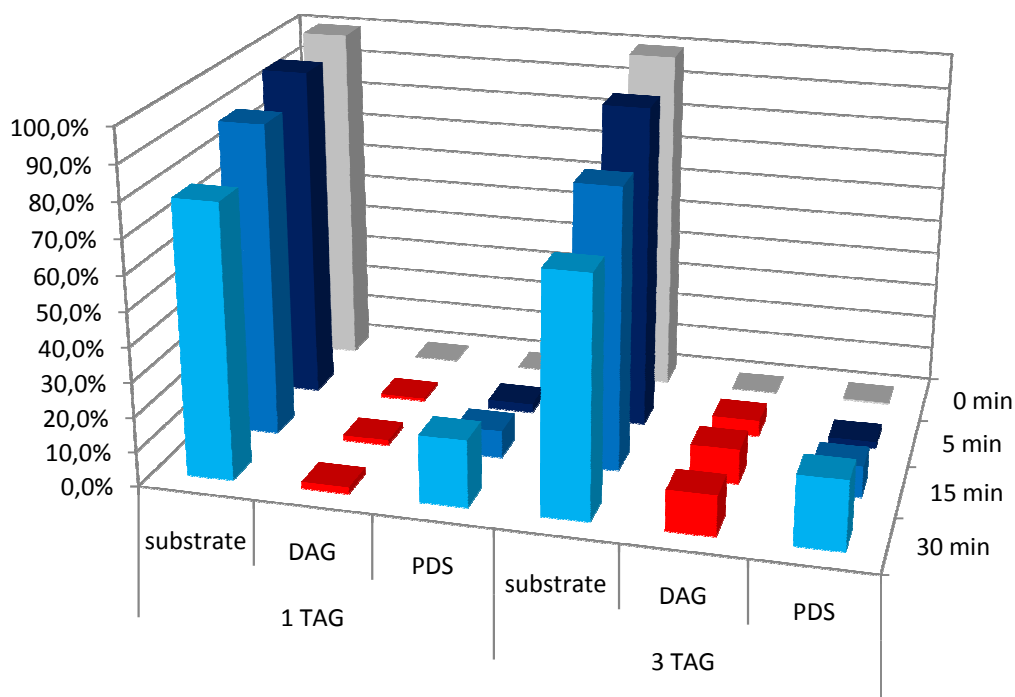


Abb. 3-8: Zeitabhängige Umsätze der Substrate sn-1 PD-TAG (links) und sn-3 PD-TAG (rechts) durch RML. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz des Reaktionsgemisches an. Das primär gebildete DAG ist rot hervorgehoben. (Durchführung: siehe Materialien und Methoden)

In jedem unserer Lipase-Assays wurden 2 nmol Substrat eingesetzt, was einer Menge von 2 nmol Pyren entspricht. Bei dieser Darstellung nutzen wir den Umstand, dass die Gesamtfluoreszenz der Probe aufgrund der unverändert bleibenden Menge an Pyren konstant ist (geringe Schwankungen der Fluoreszenz des Pyrens, abhängig von der molekularen Umgebung und damit von der jeweiligen Zwischenstufe der Hydrolyse, wurden vernachlässigt). So kann aufgrund der Verteilung der Fluoreszenz auf die verschiedenen Zwischenstufen (entspricht den verschiedenen HPLC-Fraktionen) auch direkt auf deren Menge geschlossen werden.

Im Fall von sn-1 PD-TAG als Substrat kann nach 5 min Inkubation rund 3% der Gesamtfluoreszenz auf PDS zurückgeführt werden (neben einer sehr geringen Menge PD-DAG). Nach 15 Minuten sind ca. 10% des Substrats hydrolysiert, nach der maximalen Inkubationszeit von 30 Minuten über 20%. Als fluoreszierendes Hydrolyseprodukt erhalten wir hauptsächlich PDS neben sehr wenig PD-DAG. Dies verifiziert die bereits durch die TLC ermittelte sn-1 Präferenz der RML. Hydrolyse der sn-1 Seitenkette von sn-1 PD-TAG führt zur Bildung von PDS, die wir als Hauptreaktionsprodukt erhalten. Hydrolyse der sn-3 Seitenkette führt zur Bildung von PD-DAG, dessen Auftauchen zwar beobachtet wird, dessen Anteil an der Gesamtfluoreszenz allerdings bei maximal 3% liegt.

Umgekehrt entsteht bei der Abspaltung der sn-1 Seitenkette von sn-3 PD-TAG als erstes fluoreszierendes Produkt PD-DAG, wie in Abb. 3-8 deutlich sichtbar. Nach 5 Minuten wurden rund 10% des Substrats hydrolysiert, wobei nach dieser kurzen Inkubationszeit noch kaum PDS gebildet wurde. Nach 15 Minuten sind bereits knapp 20% Substrat gespalten. Als Reaktionsprodukte liegen nun aber PD-DAG und PDS schon in fast gleicher Menge vor. PDS entsteht hier aber größtenteils nicht durch Abspaltung der sn-3 Seitenkette des Substrats, sondern durch weitere Hydrolyse des zuerst gebildeten PD-DAG. Nach 30 Minuten sind deutlich mehr als 30% des Substrats umgesetzt, die Menge an vorhandenem PD-DAG steigt jedoch nicht mehr substantiell, vielmehr liegt nun PDS als überwiegendes Hydrolyseprodukt vor.

Deutlich ist weiters die offensichtlich bessere Hydrolyserate des sn-3 PD-TAG (10% mehr Substratumsatz nach 30 Minuten). Wir führen diesen Umstand auf eine sterische Hinderung des Enzyms durch den Pyrenrest zurück, der aufgrund der sn-1 Präferenz der RML bei sn-1 PD-TAG als Substrat deutlich wird und wohl auch zur Bildung von (wenn auch nur geringen Mengen) PD-DAG bereits nach 5 Minuten Inkubationszeit führt. Das Enzym weicht also teilweise zu einem geringen Prozentsatz trotz entgegen gesetzter Präferenz auf die unsubstituierte Seitenkette aus. Bei sn-3 PD-TAG ist die bevorzugte Seitenkette unsubstituiert, was die Funktion der RML erleichtert und deshalb im Endeffekt zu einem höheren Substratumsatz bei gleicher Inkubationszeit führt.

Die Pyrenmarkierung erweist sich also zwar im Lipidverbund als elegante Markierung, da sie die physikalischen Eigenschaften der Glycerolipide kaum stört, allerdings kann deshalb eine Beeinflussung der Lipid-Enzym-Wechselwirkung durch Pyren als Fluoreszenzmarker keinesfalls ausgeschlossen werden.

3.1.2.2 Bestimmung der Stereoselektivität von *Chromobacterium viscosum* Lipase gegenüber fluoreszierendem Triacylglycerol mittels HPLC

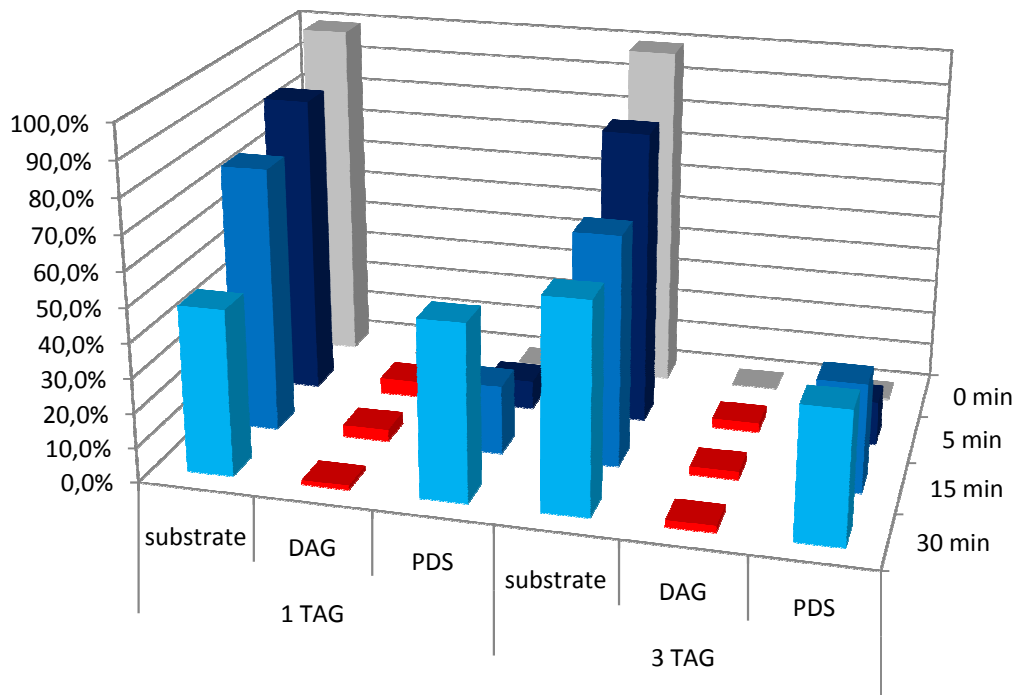


Abb. 3-9: Zeitabhängige Umsätze der Substrate sn-1 PD-TAG (links) und sn-3 PD-TAG (rechts) durch CVL. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz des Reaktionsgemisches an. Das primär gebildete DAG ist rot hervorgehoben. (Durchführung: siehe Materialien und Methoden)

Die Spaltung von sn-1 bzw. sn-3 PD-TAG durch die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (CVL) ergibt ein anderes Bild. Augenscheinlich ist vor allem die im Vergleich zur RML deutlich höhere Aktivität der CVL gegenüber den eingesetzten Substraten, vor allem dem sn-1 PD-TAG. Wir schließen daraus auf eine sn-3 Präferenz der CVL, die allerdings nicht sehr deutlich ausgeprägt zu sein scheint. (Ist die bevorzugte Seitenkette markiert, wird herabgesetzte Aktivität beobachtet.)

Bei sn-1 PD-TAG als Substrat überwiegt PDS bereits nach 5 Minuten als fluoreszierendes Hydrolyseprodukt, was bei deutlicher sn-3 Präferenz nicht der Fall sein sollte. Nicht restlos geklärt werden kann allerdings, ob die PDS aus einer weiteren, schnelleren Hydrolyse des DAG stammt oder durch Spaltung der sn-1 Seitenkette des Substrats. Das zu Beginn entstehende PD-DAG ist, analog zur RML, wiederum Substrat der CVL und wird deutlich sichtbar im Lauf der Inkubation ebenfalls weiter hydrolysiert. Nach 30 Minuten ist mehr als die Hälfte des Substrats umgesetzt.

sn-3 PD-TAG zeigt nach 5 Minuten etwa gleich viel Umsatz wie das sn-1 Substrat, allerdings wird, wie bei einer sn-3 Präferenz erwartet, von Beginn an weniger PD-DAG und mehr PDS gebildet. Die Hydrolysegeschwindigkeit scheint sich mit Fortschreiten der Reaktion allerdings zu verlangsamen,

was wahrscheinlich auf eine Pyrenmarker/Enzym Wechselwirkung zurückgeführt werden kann. Der Umsatz nach 30min liegt bei 40% Substrat. Die PD-DAG Konzentration bleibt im Unterschied zur PD-DAG Bildung aus dem sn-1 Substrat während der gesamten Inkubationszeit auf zwar geringem aber annähernd konstantem Level. Möglicherweise ist das durch Hydrolyse der eigentlich unbevorzugten sn-1 Seitenkette entstehende sn-3 PD-DAG ein schlechteres Substrat der CVL als das Diacylglycerol, das bei Spaltung der "richtigen" sn-3 Seitenkette des ursprünglichen Substrats entsteht.

3.1.2.3 Bestimmung der Stereoselektivität von Cholesterol Esterase aus *Candida cylindracea* gegenüber fluoreszierendem Triacylglycerol mittels HPLC

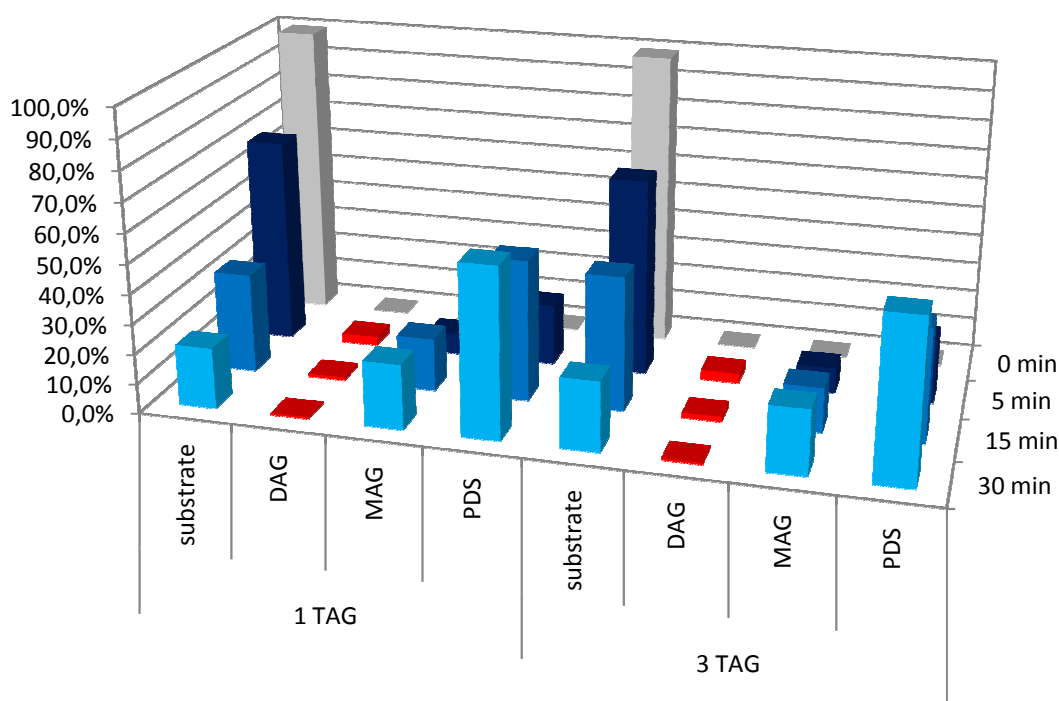


Abb. 3-10: Zeitabhängige Umsätze der Substrate sn-1 PD-TAG (links) und sn-3 PD-TAG (rechts) durch ccCE. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz des Reaktionsgemisches an. Das primär gebildete DAG ist rot hervorgehoben. (Durchführung: siehe Materialien und Methoden)

Als weiteres mikrobielles Enzym wurden die Aktivitäten der Cholesterol Esterase aus *candida cylindracea* untersucht. Die Cholesterolesterase zeigt bei den Triacylglycerolen keine Stereopräferenzen. Die Hydrolyseschemata der beiden TAG-Substrate sind annähernd gleich.

Erstaunlich ist die Effizienz der Hydrolyse mit beinahe 80% Umsatz des eingesetzten Substrates nach 30 Minuten sowie die Bildung von größeren Mengen von fluoreszierendem Monoacylglycerol. ccCE katalysiert also auch die Hydrolyse der sn-2 Esterbindung, was bei RML und CVL nicht vorkommt. Offensichtlich liegen große Unterschiede in der Geometrie der Substratbindetasche von

Cholesterolesterase und den Lipasen vor, was sich nicht nur in unterschiedlicher Stereoselektivität sondern auch Regioselektivität zeigt. PD-CE wurde von der Cholesterolesterase nicht hydrolysiert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Trennung und Quantifizierung der Hydrolyseprodukte unserer Substrate mittels HPLC ausgezeichnet funktioniert. Aufgrund der erhaltenen Hydrolyseschemata und deren korrekter Interpretation können im Verhältnis zur relativ einfachen Versuchsanordnung erstaunlich detaillierte Aussagen über Substrat-, Regio- und Stereopräferenzen der interessierenden Enzyme gemacht werden, sofern diese in gereinigter Form und genügender Menge zur Verfügung stehen (siehe dazu vor allem Kap. 4.1). Durch Einsatz eines größeren Sets an pyrenmarkierten Substraten könnte auf diese Weise die Aktivität von noch nicht beschriebenen lipolytischen Enzymen auf einfache und effiziente Weise aufgeklärt werden.

3.2 Aktivität und Selektivität humaner Lipasen

Nachdem die Methode der fluoreszenten Aktivitäts-Assays von Lipasen mittels pyrenmarkierter Substrate und mikrobieller Lipasen auf HPLC-Basis etabliert wurde, war der nächste Schritt die Anwendung der Methode auf die Aktivitätsbestimmung der drei humanen Lipasen *Adipose Tissue Glycerole Lipase* (ATGL), *Hormonsensitive Lipase* (HSL) und *Monoglyceridlipase* (MGL).

Alle drei Enzyme wurden in COS-7 Zellen überexprimiert (siehe Kap. 2.3.6) und die Assays wurden direkt mit dem erhaltenen Cytosolhomogenat als Enzymquelle durchgeführt (siehe Kap. 2.3.9).

3.2.1 Aktivitätsbestimmung der dünschichtchromatographischen Analysen

Im ersten Schritt erfolgte wiederum ein TLC Screening um einen schnellen Überblick über die Anwendbarkeit der Methode auf ein Cytosolhomogenat mit hoher Backgroundaktivität und die weit empfindlicheren humanen Lipasen zu erhalten. Die Substratvesikel wurden für diese Assays nicht mit Triton X-100 sondern PC/PI hergestellt (siehe Kap. 2.3.1)

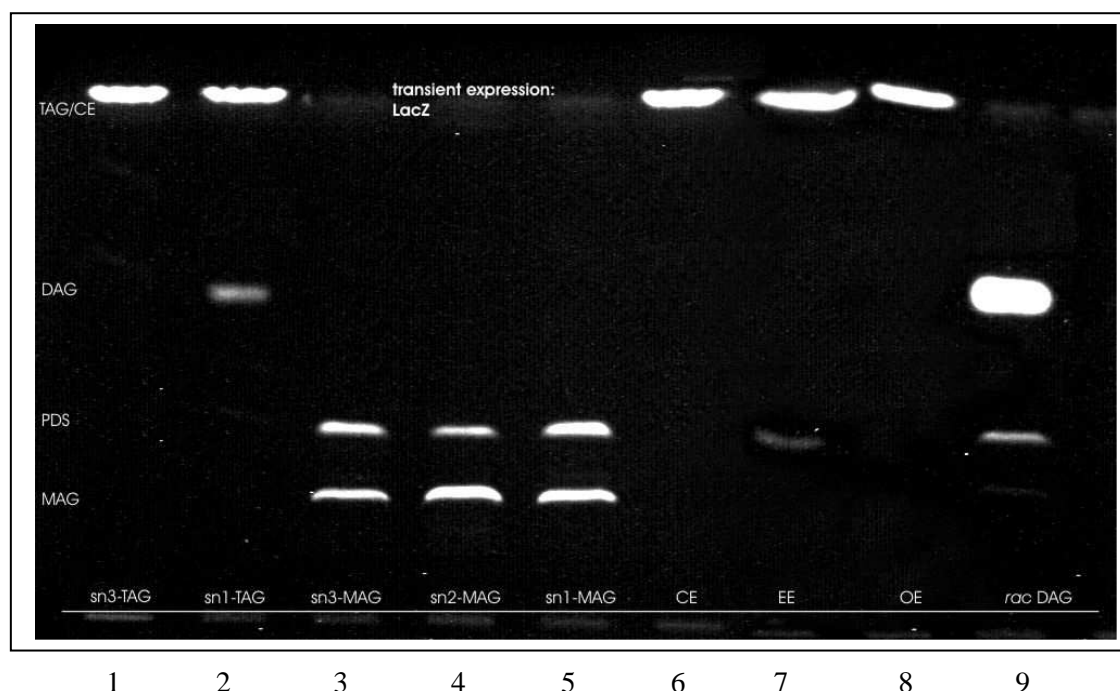


Abb. 3-11: Lipolytische Backgroundaktivität des Cytosols LacZ transfizierter Zellen. Substrate: sn-3 PD-TAG, sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-MAG, sn-2 PD-MAG, sn-1 PD-MAG, PD-CE, PD-EE, PD-OE, sn-1(3) *rac* PD-DAG. Durchführung siehe Materialien und Methoden.

Das Cytosol der COS-7 Zellen zeigt gegenüber sn-3 PD-TAG kaum lipolytische Aktivität, spaltet jedoch sn-1 PD-TAG zu sn-1 PD-DAG. Offensichtlich zeigt die verantwortliche unbekannte Enzymkomponente eine sn-3 Präferenz, die möglicherweise durch den Pyrenmarker inhibiert wird.

Die primären Monoacylglycerole werden sehr effizient hydrolysiert. Die Aktivität gegenüber dem sn-2 PD-MAG ist etwas herabgesetzt. Der markierte Cholesterinester wird, wie bereits bei den mikrobiellen Lipasen beobachtet, nicht hydrolysiert. Pyrendecansäure-Ethylester und Octylester werden in geringem Umfang gespalten. Die Aktivität gegenüber *rac-1(3)* PD-DAG ist ebenfalls erkennbar. Interessanterweise wird neben PDS auch fluoreszierendes Monoacylglycerol gebildet, was eine Spaltung an Position sn-2 bedeutet, die normalerweise kaum beobachtet wird und möglicherweise wieder eine vom Marker beeinflusste Ausweichreaktion darstellt.

All diese Aktivitäten müssen bei der Interpretation der Aktivitäten der in COS7-Zellen überexprimierten humanen Lipasen berücksichtigt werden.

ATGL

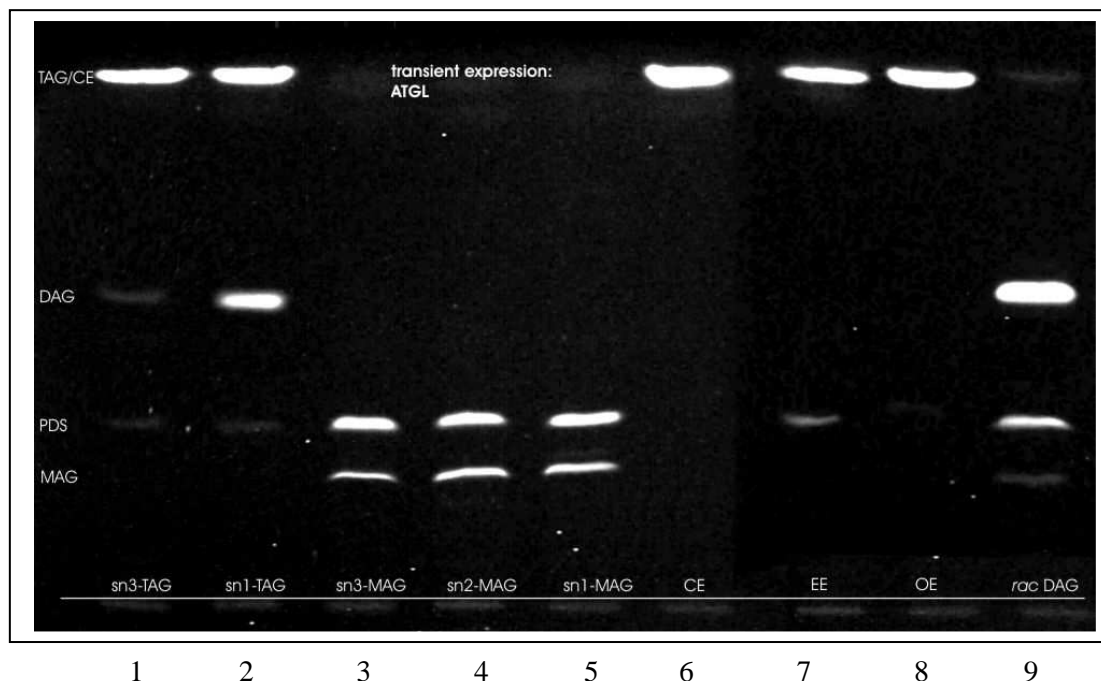


Abb. 3-12: Lipidspaltung durch überexprimierte ATGL. Substrate: sn-3 PD-TAG, sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-MAG, sn-2 PD-MAG, sn-1 PD-MAG, PD-CE, PD-EE, PD-OE, sn-1(3) *rac* PD-DAG. Durchführung siehe Materialien und Methoden.

ATGL zeigt im Unterschied zum Blank auch sehr geringe Aktivität gegenüber sn-3 PD-TAG, wobei etwas mehr fluoreszierendes PD-DAG als PDS gebildet wird. Eine leichte Tendenz zur sn-1 Präferenz scheint vorzuliegen, wir erwarten uns aber eine deutlichere Aussage aus den HPLC Daten.

sn-1 PD-TAG wird mit sichtbar höherer Effizienz als in der Vergleichsprobe hydrolysiert, wobei nun neben sn-3 PD-DAG auch PDS entsteht. Diese PDS stammt entweder aus sn-1 Hydrolyse des ursprünglichen Substrats, was die bereits vermutete sn-1 Präferenz unterstreichen würde, kann allerdings auch aus Hydrolyse des PD-DAG stammen.

Die Aktivität gegenüber den Monoacylglycerolen ist im Vergleich zum Blank nur geringfügig erhöht. Wiederum sieht man keine PD-CE Hydrolyse, während Pyrendecansäure-Ethylester und Octylester in Gegenwart von ATGL besser hydrolysiert werden als in der Blindprobe. Das racemische Diacylglycerol zeigt ebenfalls einen erhöhten Hydrolyselevel, einhergehend mit der bereits im Blindwert beobachteten Bildung von terminal substituiertem MAG.

Aus diesem Vorversuch ergibt sich, dass für die weiteren Untersuchungen an ATGL sinnvollerweise sn-1 sowie sn-3 PD-TAG und *rac*-1(3) PD-DAG als Substrat verwendet werden, da diese Substrate mit ATGL die deutlichsten Unterschiede zur Backgroundaktivität zeigen.

HSL

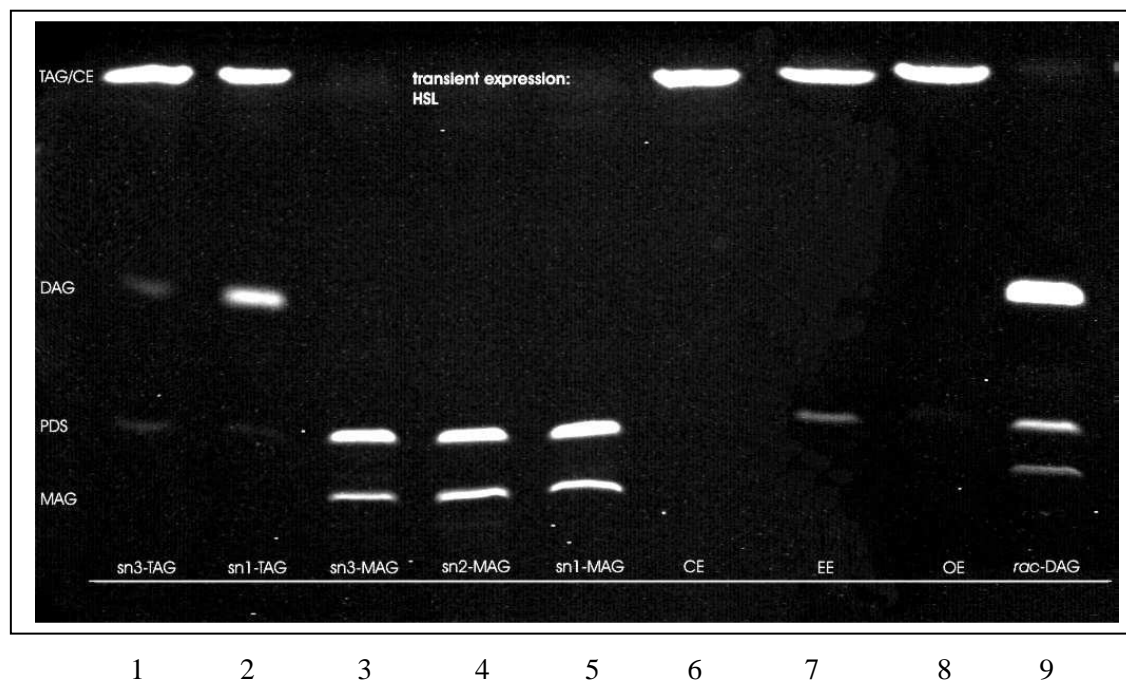


Abb. 3-13: Lipidspaltung durch überexprimierte HSL. Substrate: sn-3 PD-TAG, sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-MAG, sn-2 PD-MAG, sn-1 PD-MAG, PD-CE, PD-EE, PD-OE, sn-1(3) *rac* PD-DAG. Durchführung siehe Materialien und Methoden.

Die TLC-Analyse der Lipidspaltung durch überexprimierte HSL zeigte ein annähernd identes Bild wie bei der ATGL. sn-1 PD-TAG wird gegenüber dem sn-3 Isomer bevorzugt gespalten. Die DAG Aktivität ist etwas erhöht.

MGL

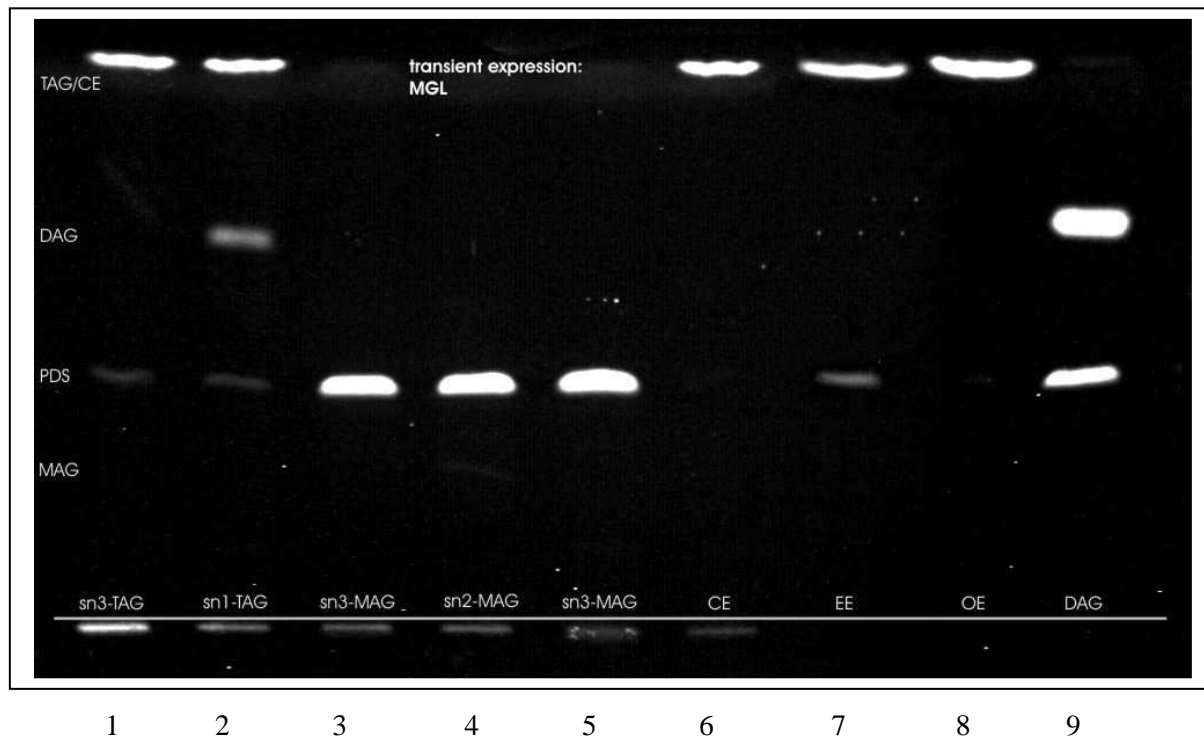


Abb. 3-14: Lipidspaltung durch überexprimierte MGL. Substrate: sn-3 PD-TAG, sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-MAG, sn-2 PD-MAG, sn-1 PD-MAG, PD-CE, PD-EE, PD-OE, sn-1(3) *rac* PD-DAG. Durchführung siehe Materialien und Methoden.

Mit dem MGL hältigen Cytosol konnte ein vollständiger Umsatz der Monoacylglycerol Substrate beobachtet werden. Die MGL Expression ist offenbar sehr effizient. Eine ausgeprägte DAG Aktivität konnte ebenfalls beobachtet werden.

Nachdem wir uns einen Überblick über die Aktivität der überexprimierten tierischen Lipolyseenzyme mittels TLC-Assays gebildet hatten, wiederholten wir die Versuche mit den Schlusselsubstraten sn-1 und sn-3 PD-TAG und *rac*-1(3) PD-DAG für die Enzyme ATGL und HSL. Weiters wurde der Einfluss des möglichen ATGL Aktivators CGI-58 auf dieses Enzym untersucht und der Effekt von BSA als Fettsaurefanger auf die HSL-Aktivität gemessen. PD-MAG wurde als Substrat für die MGL-Bestimmung eingesetzt.

In allen diesen Fällen wurde die Zusammensetzung der Reaktionsgemische mittels HPLC-Lipid-Analyse bestimmt.

3.2.2 HPLC-Analysen

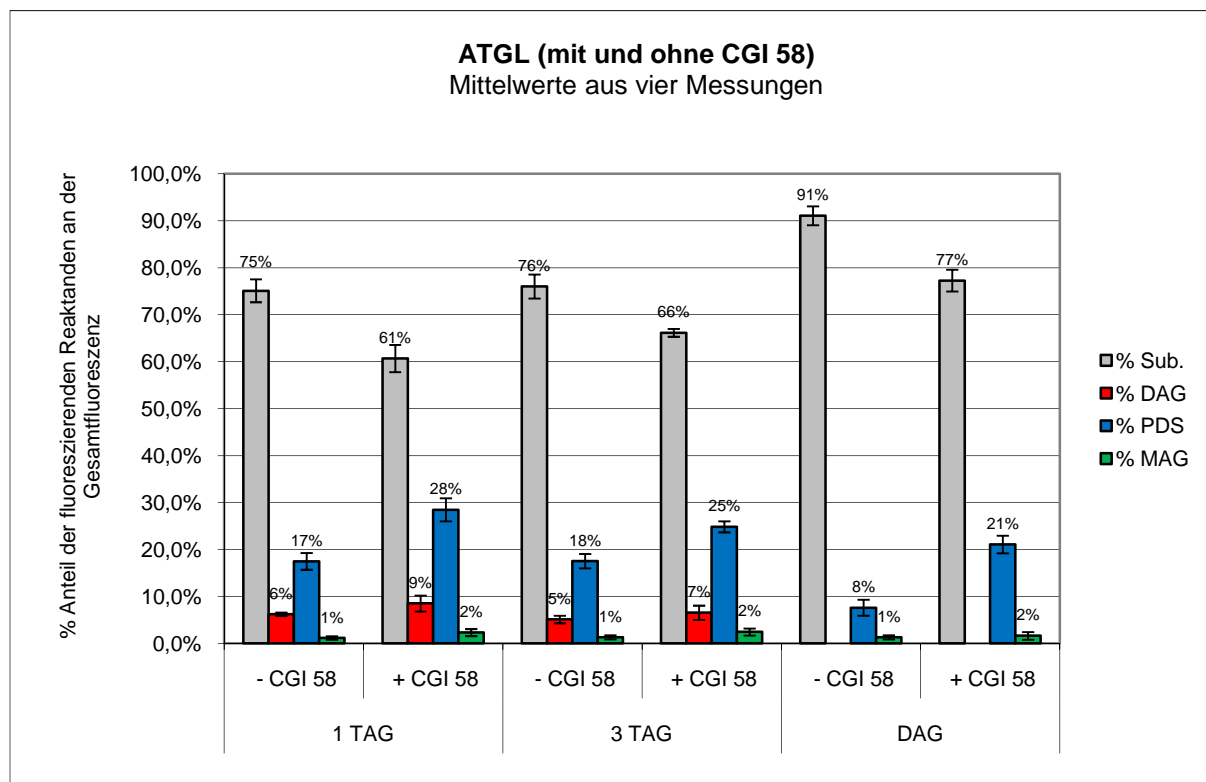


Abb. 3-15: Effekt von CGI-58 auf die Lipidspaltung durch überexprimierter ATGL. Substrate: sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-TAG, *rac* 1(3) PD-DAG. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz der Probe an. Die Cytosolaktivität der LacZ COS-7 Zellen wurde als Blindwert subtrahiert. Durchführung: siehe Materialien und Methoden.

Bei der Darstellung in Abb. 3-15 (wie bei allen folgenden) wurde die lipolytische Aktivität des Cytosols der mit LacZ transfizierten COS-7 Zellen – die zuvor ebenfalls mittels HPLC quantifiziert wurde - als Blindwert subtrahiert. Die dargestellte Aktivität sollte also größtenteils alleine auf das überexprimierte Enzym zurückzuführen sein.

Im Fall der ATGL wird eine deutliche Aktivität gegenüber beiden TAG Substraten sichtbar, die durch Anwesenheit von CGI-58 erhöht wird. Generell scheint sn-1 PD-TAG als Substrat besser hydrolysiert zu werden, als das sn-3 Enantiomer. Im Vergleich zu den mikrobiellen Lipasen ist der Unterschied allerdings wenig signifikant und auch die Verteilung der Fluoreszenz auf die beiden möglichen Hydrolyseprodukte PD-DAG und PDS gibt keinen weiteren Aufschluss über eine eventuelle Stereopräferenz.

Der Einfluss der breiten Backgroundaktivität kann wegen des durch ATGL Hydrolyse verschobenen Substratangebots (TAG → DAG) auch nach Subtraktion nicht gänzlich vernachlässigt werden (belegt durch das Auftauchen von fluoreszierenden MAG's, die nicht durch ATGL gebildet werden sollten; diese kommen aus der Untergrundaktivität und werden durch sn-2 Hydrolyse des Hydrolyseproduktes

Diacylglycerol gebildet). Daher ist eine Bestimmung der Stereopräferenz der ATGL direkt aus dem Cytosol nicht möglich.

Kürzere Inkubationszeiten führen infolge geringer Signalintensitäten zu Signifikanzverlust gegenüber dem Background und liefern keine abweichenden Ergebnisse.

Auch PD-DAG wird durch ATGL hydrolysiert, allerdings in geringerem Umfang. CGI-58 bewirkt auch mit diesem Substrat eine Erhöhung der Aktivität. Nimmt man die Menge der entstandenen PDS als Maß für die Aktivität, so bewirkt CGI-58 bei den TAG's eine Steigerung um mehr als ein Drittel der normalen Aktivität, wohingegen bei DAG als Substrat mit CGI-58 beinahe dreimal soviel PDS entsteht. Dieser große Sprung könnte ein Hinweis auf eine Funktion des CGI-58 als Regulator des DAG Spiegels im Cytosol sein.

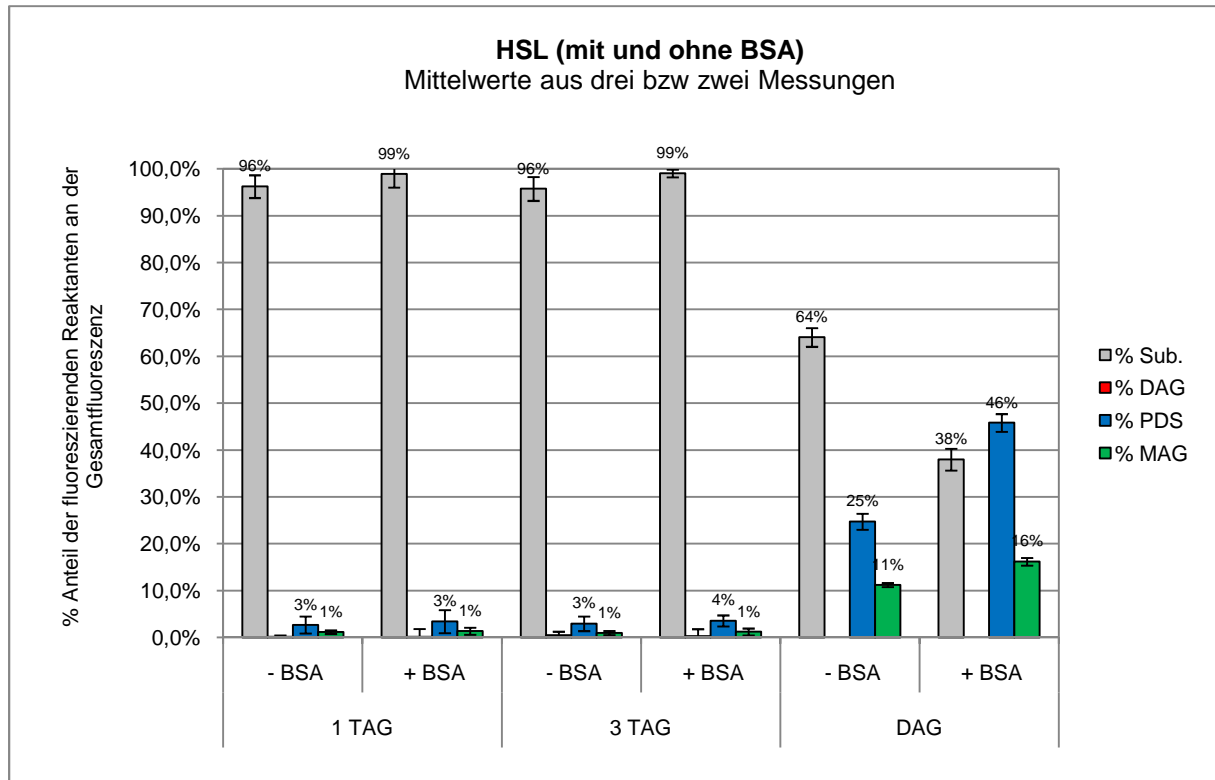


Abb. 3-16: Effekt von Albumin auf die Lipidspaltung durch überexprimierter HSL. Substrate: sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-TAG, *rac* 1(3) PD-DAG. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz der Probe an. Die Cytosolaktivität der LacZ COS-7 Zellen wurde als Blindwert subtrahiert. Durchführung: siehe Materialien und Methoden.

HSL in COS-7 Zelllysaten zeigt nach Subtraktion des Blindwerts nur mehr sehr geringe Aktivität gegenüber den Triacylglycerolen. Durch BSA lässt sich die Hydrolyserate kaum steigern.

Das Diacylglycerol wird jedoch bereits ohne BSA zu über einem Drittel hydrolysiert. Zusatz von BSA erhöht diesen Wert auf beinahe zwei Drittel. Größere Mengen an freien Fettsäuren haben offensichtlich eine zunehmend inhibierende Wirkung auf HSL. BSA als Akzeptor freier Fettsäuren verschiebt das Gleichgewicht, indem es dem Reaktionsgemisch die Fettsäuren entzieht und bewirkt somit eine Aktivitätssteigerung.

Als Reaktionsprodukt entstehen neben dem durch Spaltung der primären, markierten Seitenkette gebildeten PDS auch größere Mengen an fluoreszierendem MAG. HSL ist also gegenüber der generell unfavorisierten sn2 Position das bisher aktivste der von uns untersuchten Enzyme.

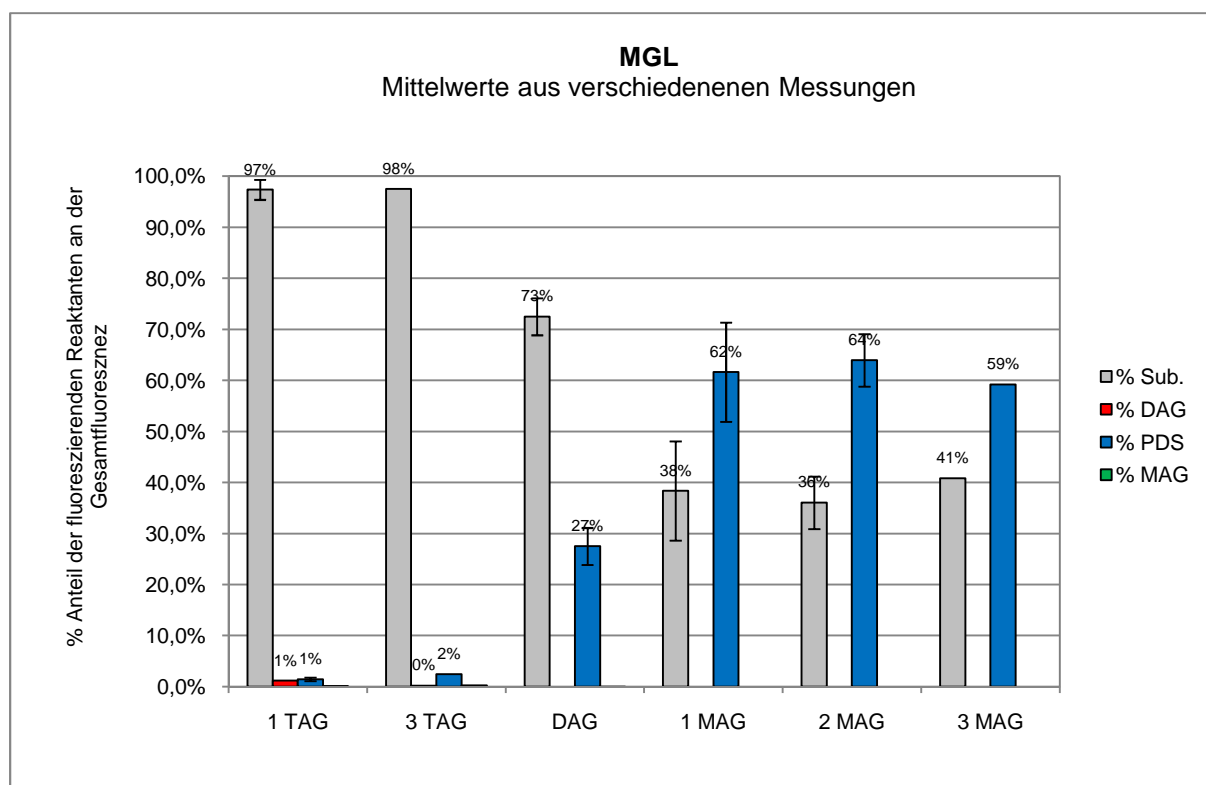


Abb. 3-17: Lipidspaltung durch überexprimierter MGL. Substrate: sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-TAG, *rac* 1(3) PD-DAG. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz der Probe an. Die Cytosolaktivität der LacZ COS-7 Zellen wurde als Blindwert subtrahiert. Durchführung: siehe Materialien und Methoden.

MGL zeigt wie erwartet nur keine Triacylglycerolhydrolyse. Die Hydrolyserate von PD-DAG ist aber hoch und führt, im Gegensatz zur DAG Hydrolyse durch HSL, zu PDS als einzigem Produkt. Die möglicherweise durch sn-2 Spaltung gebildeten, fluoreszierenden Monoacylglycerole werden als bevorzugtes Substrat offenbar sofort weiter hydrolysiert und sind somit nie sichtbar.

Wurden Monoacylglycerole als Substrat eingesetzt, musste die Inkubationszeit auf 10 Minuten verkürzt werden, um vollständige Substratumwandlung zu vermeiden. Die Ergebnisse zeigten eine sehr große Schwankungsbreite, sehr wahrscheinlich bedingt durch die unterschiedliche Expression des Enzyms in verschiedenen Ansätzen. Wir konnten also kein MAG-Isomer als bevorzugtes Substrat identifizieren. Möglicherweise hydrolysiert MGL in unselektiver Weise alle MAG's mit ähnlicher Geschwindigkeit.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Übertragung der Assays von gereinigten, mikrobiellen Lipasen auf das viel komplexere System von überexprimierten humanen Lipasen in einer Matrix mit zusätzlicher hydrolytischer Aktivität zwar prinzipiell erfolgreich war, der Interpretationsspielraum der Ergebnisse allerdings durch die zahlreichen unabwägbaren Einflüsse des Backgrounds deutlich eingeschränkt ist.

Dies beginnt bei der nicht exakt reproduzierbaren Transfektionsrate und setzt sich über die gesamte Cytosolpräparation fort. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes ist als Orientierungspunkt natürlich unerlässlich, in seiner Aussagekraft über das uns interessierende Enzym allerdings nicht relevant. Trotzdem war es möglich, die tendenziellen Substratpräferenzen der überexprimierten Enzyme zu bestimmen.

3.3 Untersuchungen an Mausfettgewebe

Nachdem wir gezeigt haben, dass mit unserer Methode die Aktivität von überexprimierten Enzymen direkt aus einer Cytosolpräparation nachgewiesen werden kann, wurde im letzten Schritt das Fettgewebe von Mäusen untersucht, denen jeweils eines der drei Gene fehlte, die für die drei von uns betrachteten lipolytischen Enzyme ATGL, HSL und MGL codieren.

Die Fragestellung lautete, wie sich mit Hilfe unserer Lipase-Assays die Aktivitäten dieser Enzyme in den jeweiligen knockout Mäusen von denen der Wildtyp Maus unterscheiden lassen. Zusätzlich sollte anhand der Untersuchung die allgemeinen lipolytischen Aktivitäten in braunem (brown adipose tissue, BAT) und weißem (white adipose tissue, WAT) Mausfettgewebe charakterisiert werden.

3.3.1 ATGL knockout vs. wildtype

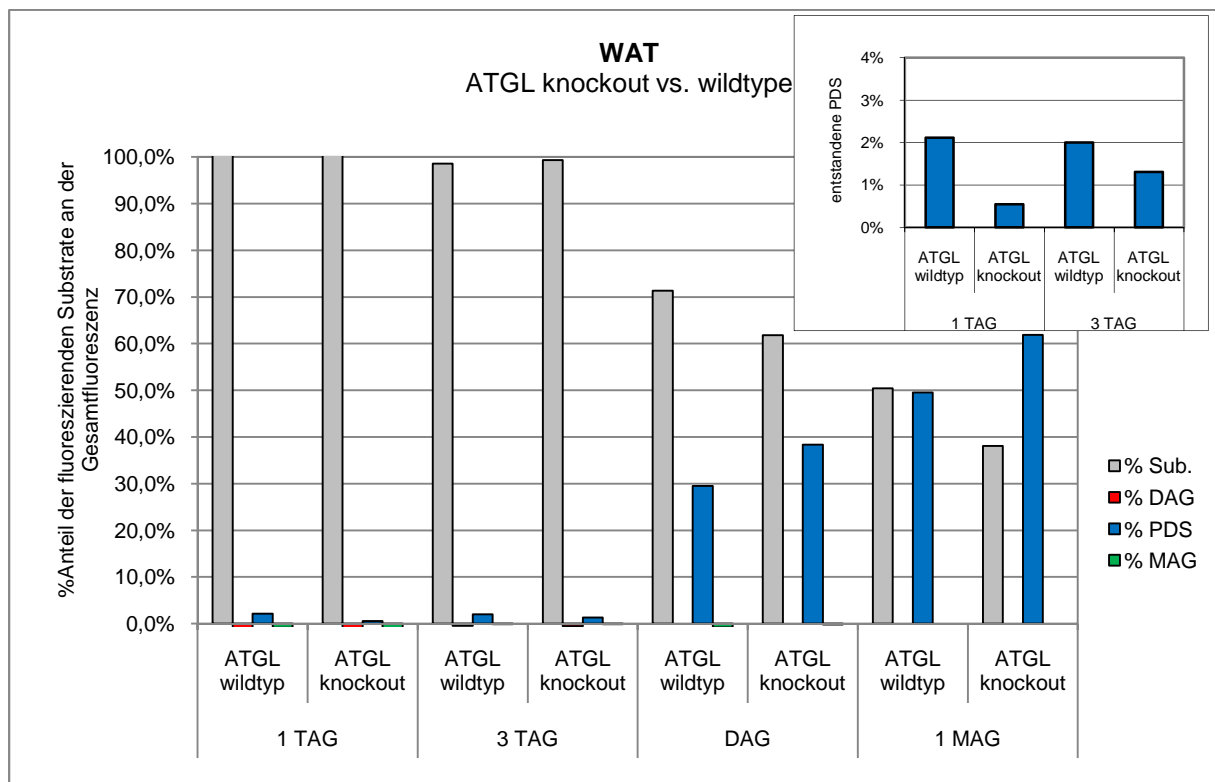


Abb. 3-18: Lipidspaltung durch WAT Homogenate aus ATGL-knockout und Wildtyp Mäusen. Substrate: sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-TAG, *rac* PD-DAG, sn-1 PD-MAG. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz der Probe an. Im kleinen Diagramm rechts oben ist die Menge der entstandene PDS beim Triacylglycerolabbau vergrößert dargestellt. Durchführung: siehe Materialien und Methoden.

Prinzipiell lag die lipolytische Aktivität des uns zur Verfügung gestellten Fettgewebes sehr deutlich unter jener der von uns untersuchten COS-7 Zellen. Trotzdem wurden gewisse Tendenzen deutlich.

Die Triacylglycerolhydrolyseaktivität im weißen Fettgewebe des Wildtyps ist im Vergleich zur ATGL knockout Maus höher, was vor allem aus der Betrachtung der entstanden PDS hervorgeht. Da wir allerdings gegenüber TAG generell nur sehr geringe Aktivität messen konnten, bewegen wir uns sehr knapp an der Signifikanzgrenze, vor allem was die absoluten Werte betrifft. Trotzdem kann durch eine vergleichende Betrachtung gesagt werden, dass zumindest etwa 50% der Aktivität gegenüber TAG in Fettzellen des weißen Fettgewebes der ATGL zugeordnet werden können.

Tabelle 3-1: Vergleich der aus TAG Hydrolyse entstandenen PDS zwischen ATGL knockout und wildtype Maus in weißem Fettgewebe.

Substrat	PDS gebildet wildtype : knockout	Anteil der ATGL an der TAG Hydrolyse	Mittelwert
sn-1 TAG	2,1% : 0,5%	76%	55,6%
sn-3 TAG	2,0% : 1,3%	35%	

Deutlicher wird der Unterschied, wenn *rac-1(3)* PD-DAG als Substrat umgesetzt wurde. Dieses wird vom Fettgewebe der wildtype Maus innerhalb von dreißig Minuten zu fast 30% hydrolysiert. Im Fall der ATGL knockout Maus erhöht sich diese Rate um annähernd weitere 10% und zeigt somit einen deutlich signifikanten Unterschied.

Bereits die Experimente mit überexprimierten Enzymen sowie die Experimente mit Fettgewebe zeigen klar, dass ATGL selbst nur wenig DAG Aktivität besitzt, sehr wohl aber die beiden Enzyme MGL und HSL. Fehlt ATGL, kann dieser Defekt durch vermehrte Expression der beiden anderen lipolytischen Enzyme offenbar bis zu einem gewissen Grad ausgeglichen werden, was dann in einer erhöhten Aktivität gegenüber deren präferierten Substraten im Fettgewebe zum Ausdruck kommt.

Die gleiche Tendenz ist auch beim Monoacylglycerol sichtbar, das von der ATGL-knockout Maus in höherem Umfang hydrolysiert wird, als es bei der wildtype Maus der Fall ist.

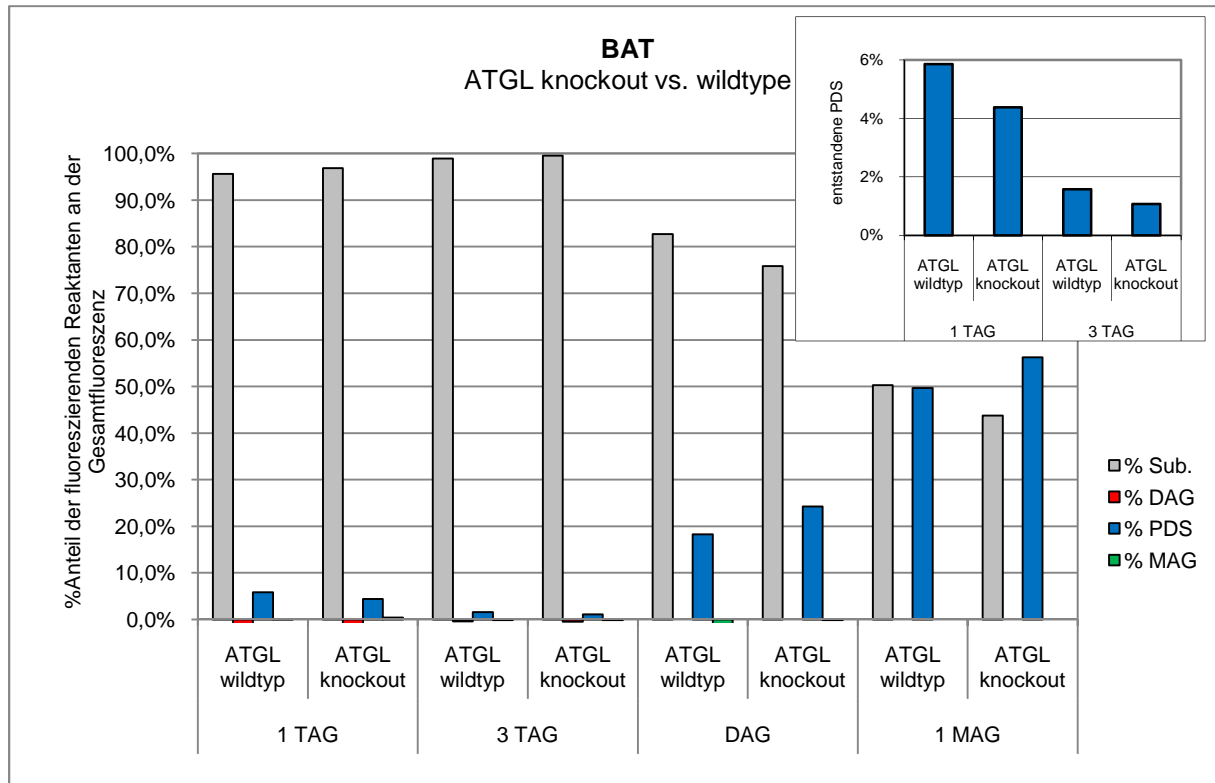


Abb. 3-19: Lipidspaltung durch BAT Homogenate aus ATGL-knockout und Wildtyp Mäusen. Substrate: sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-TAG, *rac* PD-DAG, sn-1 PD-MAG. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz der Probe an. Im kleinen Diagramm rechts oben ist die Menge der entstandene PDS beim Triacylglycerolabbau vergrößert dargestellt. Durchführung: siehe Materialien und Methoden.

Das braune Fettgewebe zeigt ähnliche Unterschiede. Die Aktivität gegenüber den Triacylglycerolen ist allerdings generell höher als im weißen Fettgewebe. Wiederum sinkt die Fähigkeit zur TAG Hydrolyse bei der ATGL knockout Maus, wenn auch nicht im selben Umfang wie im WAT, während gleichzeitig die Aktivität gegenüber DAG und MAG zunimmt. Fehlende ATGL im weißen Fettgewebe (WAT) bewirkt einen deutlicher reduzierenden Effekt auf die Lipolyseaktivität, während das Enzym im braunen Fettgewebe (BAT) offenbar eine weniger wichtige Rolle spielt. Der Anteil an der TAG Hydrolyse liegt hier bei weniger als 30%. Umgekehrt kann darauf geschlossen werden, dass im braunen Fettgewebe HSL das wichtigere Enzym für die Fettsäuremobilisierung ist, in Einklang mit den Ergebnissen von Osuga et al. (18), die für eine HSL $-/-$ Maus eine 1,65fache Zunahme des braunen Fettgewebes feststellen, während das weiße Fettgewebe konstant bleibt.

Tabelle 3-2: Vergleich der aus TAG Hydrolyse entstandenen PDS zwischen ATGL knockout und wildtype Maus in braunem Fettgewebe.

Substrat	PDS gebildet wildtype : knockout	Anteil der ATGL an der TAG Hydrolyse	Mittelwert
sn-1 TAG	5,9% : 4,4%	25%	28,3%
sn-3 TAG	1,6% : 1,1%	31%	

3.3.2 HSL knockout vs. wildtype

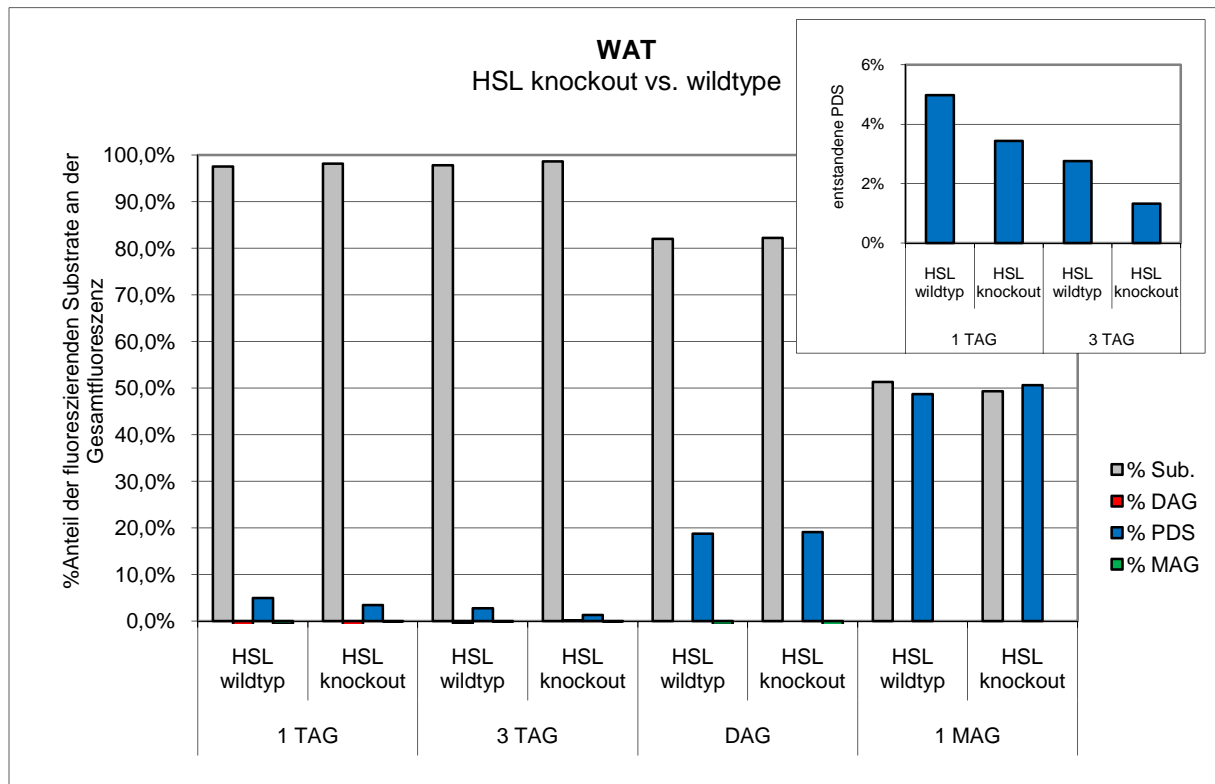


Abb. 3-20: Lipidspaltung durch WAT Homogenate aus HSL-knockout und Wildtyp Mäusen. Substrate: sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-TAG, *rac* PD-DAG, sn-1 PD-MAG. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz der Probe an. Im kleinen Diagramm rechts oben ist die Menge der entstandene PDS beim Triacylglycerolabbau vergrößert dargestellt. Durchführung: siehe Materialien und Methoden.

Bei der Untersuchung von weißem Fettgewebe der HSL knockout Maus wurde deutlich, dass hier wie zu erwarten weit weniger Unterschiede zum wildtype bei der TAG Hydrolyse feststellbar war, als bei der ATGL knockout Maus. Im Fettgewebe der knockout Mäuse sinkt die Fähigkeit zur Triacylglycerolhydrolyse, die Aktivität gegenüber DAG bleibt jedoch fast gleich (leicht verringert), dasselbe gilt für MAG (leicht erhöht). Fehlende HSL beeinflusst die lipolytische Aktivität des weißen Fettgewebes also offenbar nur in geringem Umfang - zumindest was die Spaltung von Glycerolipiden betrifft - und führt nur zu geringer Kompensation über die Expression der anderer Enzyme.

Tabelle 3-3: Vergleich der aus TAG Hydrolyse entstandenen PDS zwischen HSL knockout und wildtype Maus in weißem Fettgewebe.

Substrat	PDS gebildet	Anteil der HSL an der	Mittelwert
	wildtype : knockout	TAG Hydrolyse	
sn-1 TAG	5,0% : 3,4%	32%	24,8%
sn-3 TAG	3,4% : 2,8%	18%	

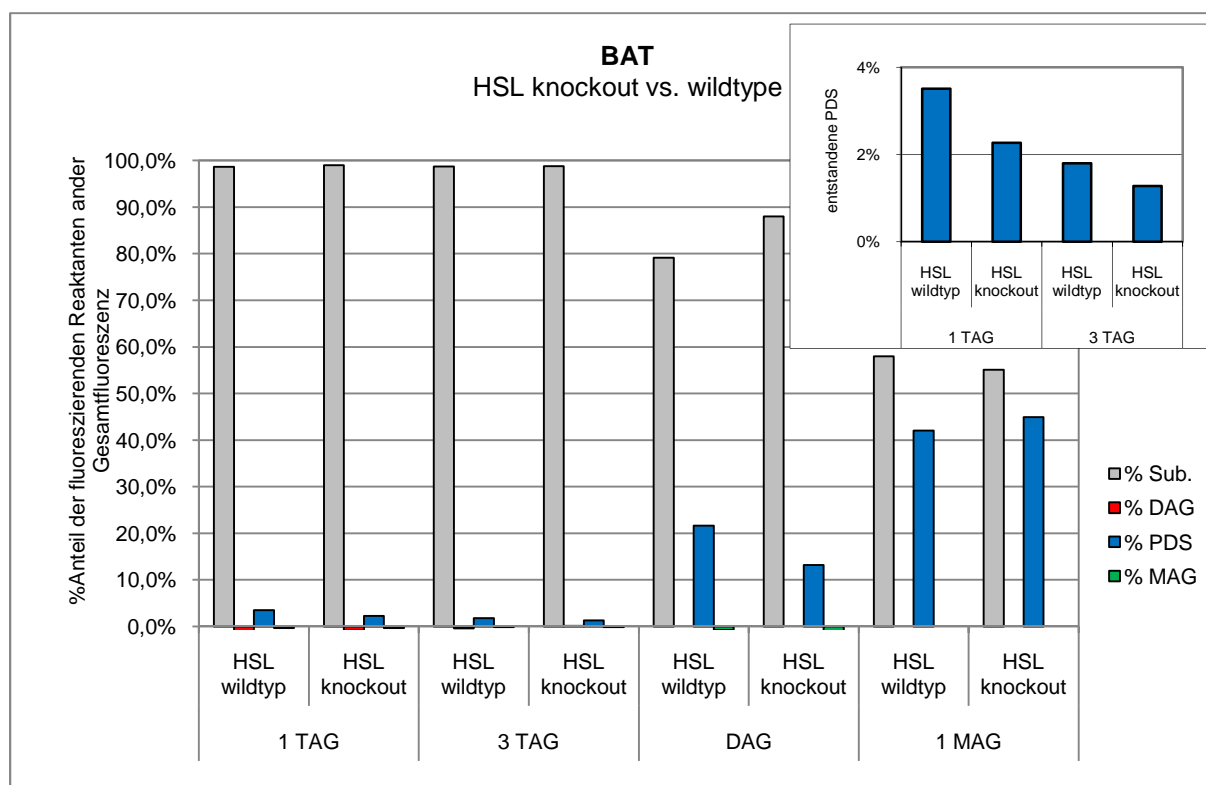


Abb. 3-21: Lipidspaltung durch BAT Homogenate aus HSL-knockout und Wildtyp Mäusen. Substrate: sn-1 PD-TAG, sn-3 PD-TAG, *rac* PD-DAG, sn-1 PD-MAG. Die Balken zeigen den Prozentsatz der fluoreszierenden Spezies im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz der Probe an. Im kleinen Diagramm rechts oben ist die Menge der entstandene PDS beim Triacylglycerolabbau vergrößert dargestellt. Durchführung: siehe Materialien und Methoden.

Braunes Fettgewebe zeigt deutlichere Auswirkungen als weißes, wenn HSL fehlt. Bei HSL-knockout Mäusen sinkt die DAG Hydrolyse um knapp 10%, die MAG Hydrolyse steigt leicht an und auch der Abfall der TAG Hydrolyse ist deutlicher als im weißen Fettgewebe sichtbar.

Tabelle 3-4: Vergleich der aus TAG Hydrolyse entstandenen PDS zwischen HSL knockout und wildtype Maus in braunem Fettgewebe.

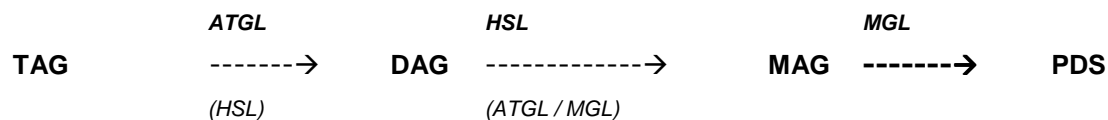
Substrat	PDS gebildet	Anteil der HSL an der	Mittelwert
	wildtype : knockout	TAG Hydrolyse	
sn-1 TAG	3,5% : 2,3%	34%	31,0%
sn-3 TAG	1,8% : 1,3%	28%	

Anhand des DAG Hydrolyse-Levels wird das Fehlen der HSL am besten sichtbar. Im WAT und BAT der ATGL knockout Mäuse stieg im Vergleich zum Wildtyp die DAG Hydrolyse um rund 25% an. Im braunen Fettgewebe der HSL knockout Maus fiel die DAG Hydrolyse um beinahe 40% ab.

Diese Daten weisen auf ein Regulationssystem hin, das fehlende ATGL durch andere Enzyme, eventuell vermehrte HSL Expression, zu kompensieren versucht, was im Fall der ATGL knockout Mäuse in erster Linie durch erhöhte DAG Hydrolyse sichtbar wird. Allerdings ist offensichtlich die Aufrechterhaltung eines angemessenen Triacylglycerolhydrolyse-Niveaus eine treibende Kraft. Diese Kapazität geht im Falle der ATGL- und HSL-knockout Mäuse zurück, es liegt also kein eindeutiger Hinweis darauf vor, dass ATGL alleine die Triacylglycerolhydrolyse bewerkstelligt. Vielmehr scheint es sich um ein Zusammenspiel zwischen ATGL, HSL und anderen Enzymen zu handeln, wobei ATGL allerdings als primäres TAG-hydrolysierendes Enzym vor allem im weißen Fettgewebe fungiert.

Die primäre Aufgabe der HSL ist also nicht die Triacylglycerolhydrolyse, obwohl das Enzym auch daran beteiligt ist. Auf das Diacylglycerol-Level wirkt sich fehlende HSL weit stärker aus. Die in der Literatur (18) beschriebene Cholesterinesterase Funktion von HSL konnte leider mit pyrenmarkiertem Cholesterinester nicht bestimmt werden, da dieser von keinem der von uns untersuchten Enzyme gespalten werden konnte. (Assays mit radioaktiv markiertem CE wurden zur Klärung durchgeführt – siehe 3.4.3 Radio Assays und Diskussion.)

Aus den erhaltenen Daten der Untersuchung von Mausfettgewebe mit pyrenmarkierten Substraten wurden folgende Schritte der Fettsäuremobilisierung und an den jeweiligen Umsetzungen hauptsächlich beteiligte Enzyme abgeleitet:



3.3.3 Radioaktivitäts-Assays von Lipolyseaktivitäten in Mausfettgewebe

Um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und eventuelle Artefakte der Pyrenmarkierung der Substrate zu identifizieren, wurden die Lipase-Assays von Mausfettgewebsenzymen mit radioaktiv markierten Substraten wiederholt. Verwendet wurden die tritiummarkierten Substrate *sn*-1 ^3H -P-TAG, *sn*-3 ^3H -P-TAG sowie ^3H -P-CE (siehe Kap. 2.4 und Tab. 2-2). Vor allem auf den Cholesterinester wurde Augenmerk gelegt, da er pyrenmarkiert in keinem der vorangegangenen Assays umgesetzt werden konnte.

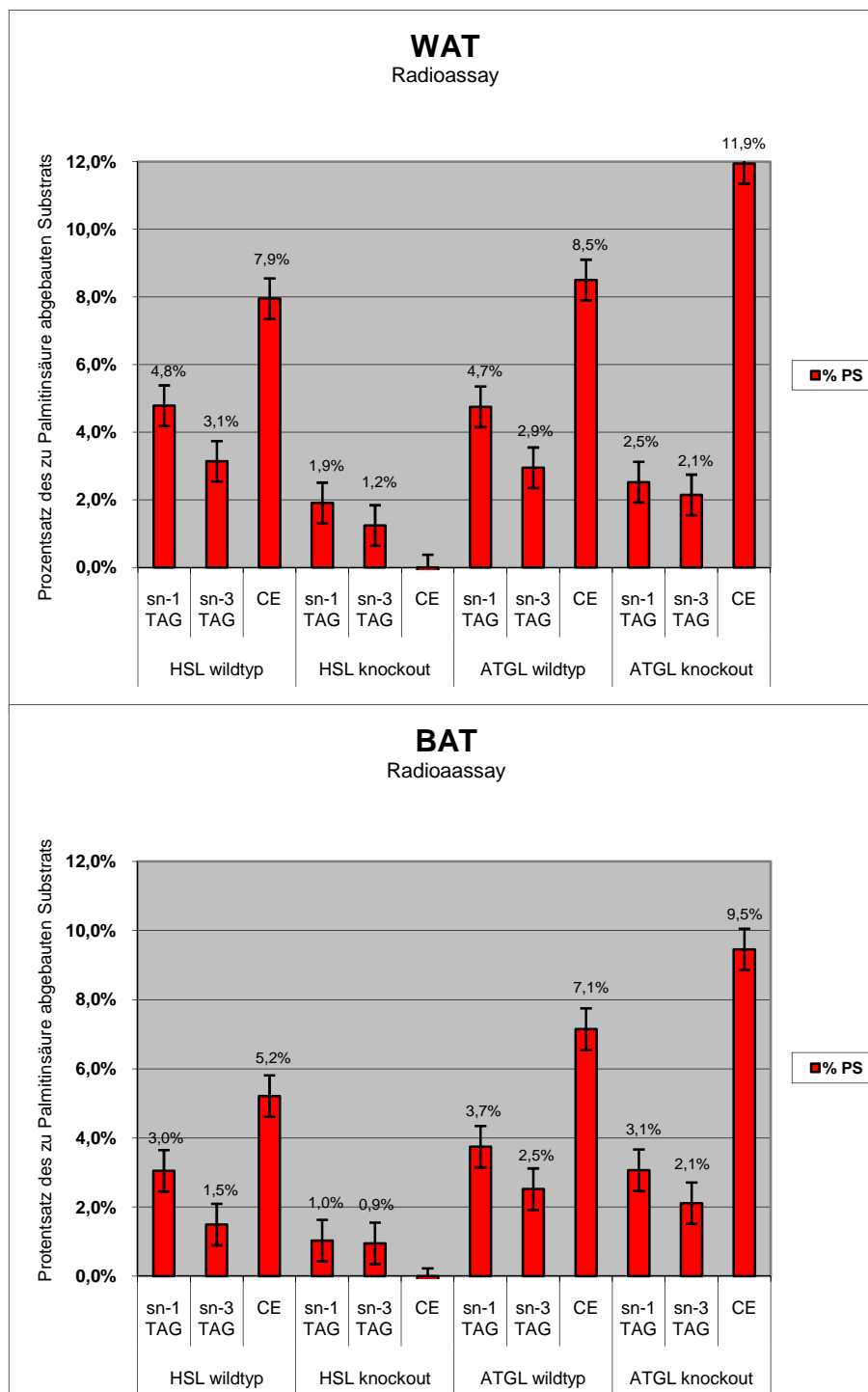


Abb. 3-22: Umsatz der Substrate *sn*-1 ^3H -P-TAG, *sn*-3 ^3H -P-TAG sowie ^3H -P-CE mit WAT-Homogenaten von wildtype und HSL bzw. ATGL knockout Mäusen. Die Balken zeigen den Prozentsatz der gebildeten radioaktiven Palmitinsäure im Verhältnis zur Gesamtradioaktivität der Probe an. Auf die Darstellung des Substrats wurde verzichtet. Darüber hinaus waren keine weiteren radioaktiven Spezies vorhanden.

Abb. 3-23: Umsatz der Substrate *sn*-1 ^3H -P-TAG, *sn*-3 ^3H -P-TAG sowie ^3H -P-CE mit BAT-Homogenaten von wildtype und HSL bzw. ATGL knockout Mäusen. Die Balken zeigen den Prozentsatz der gebildeten radioaktiven Palmitinsäure im Verhältnis zur Gesamtradioaktivität der Probe an. Auf die Darstellung des Substrats wurde verzichtet. Darüber hinaus waren keine weiteren radioaktiven Spezies vorhanden.

Die Ergebnisse, die mit den radioaktiven Triacylglycerolsubstraten erhalten wurden, sind in ihren Tendenzen in völliger Übereinstimmung mit den Daten, die für die pyrenmarkierten Substrate gefunden wurden. Die Aktivitäten gegenüber den radioaktiven TAG's erscheinen im Vergleich zu den PD-TAG's erhöht, was den Einfluss des sterisch raumfüllenden Pyrenmoleküls weiter bestätigt, bis zu einem gewissen Grad aber auch an der individuellen Qualität der Gewebekomponente liegen kann.

Nicht geklärt ist die unterschiedliche Aktivität gegenüber sn-1 bzw. sn-3 markiertem TAG bezogen auf den Gesamtumsatz des Substrats, die im Fall einer radioaktiven Markierung nicht auftauchen sollte.

Offensichtlichster Unterschied zu den pyrenmarkierten Substraten ist die Hydrolyse des Cholesterinesters. Der pyrenmarkierte CE zeigte in keinem der durchgeführten Versuche einen messbaren Umsatz und wurde in den bisher angeführten Diagrammen deshalb nicht dargestellt.

Radioaktiv-markierter CE hingegen zeigte deutlichen Umsatz im Fettgewebe der wildtype Mäuse. Im Fall der HSL-knockout Mäuse ging die Hydrolyse auf null zurück, bei den ATGL knockout Mäusen steigerte sich die Hydrolyserate deutlich um über 20% in Einklang mit der Steigerung der DAG Hydrolyse im WAT und BAT ATGL defizienter Mäuse um etwa 25%.

Daraus ist zu schließen, dass HSL das **einzige** Enzym im Fettgewebe ist, das Cholesterinester hydrolysiert. Die Steigerung der CE Hydrolyse bei der ATGL knockout Maus steht im Einklang mit der Annahme einer überhöhten HSL Expression zur Kompensation fehlender ATGL Aktivität und bestätigt damit die Schlüsse, die bereits gezogen wurden.

Tabelle 3-5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mausfettgewebeuntersuchung. Die prozentuellen Veränderungen der Hydrolyserate der Pyrensubstrate in knockout Mäusen gegenüber den wildtype Mäusen sind dargestellt.

Hydrolyse-Level des Substrats	WAT		BAT	
	ATGL knockout (gegenüber wildtype)	HSL knockout (gegenüber wildtype)	ATGL knockout (gegenüber wildtype)	HSL knockout (gegenüber wildtype)
TAG	- 55,6%	- 24,8%	- 28,3%	- 31,0%
DAG	+ 23,0%	+ 1,6%**	+ 24,4%	- 38,9%
MAG	+ 19,9%	+ 3,9%	+ 11,7%	+ 6,4%
CE*	+ 28,6%	- 100%	+ 25,3	- 100%

* Daten aus dem radio-Assay

** Die DAG Hydrolyse sollte eigentlich sinken, möglicherweise handelt es sich um einen Messfehler

4. Diskussion

4.1 Mikrobielle Lipasen

Im ersten Teil der Arbeit geht es um die Möglichkeit, die Stereoselektivität von Lipasen anhand der von uns synthetisierten pyrenmarkierten Substrate sn-1 TAG und sn-3 TAG zu bestimmen. Wir konnten zeigen, dass der Umsatz der Substrate mit einem isolierten und gereinigten Enzym anhand des Musters der Hydrolyseprodukte Rückschlüsse auf die Stereoselektivität erlaubt.

Die Interpretation der Ergebnisse ist allerdings komplex und es müssen verschiedene Einflüsse, von denen manche nicht auf den ersten Blick ersichtlich sind, in Betracht gezogen werden. Folgende wesentliche Faktoren müssen bei der Analyse der Stereopräferenz berücksichtigt werden:

I) Geschwindigkeit und Ausmaß der Bildung von fluoreszierendem Diacylglycerol

Lipasen spalten meistens nur die primären Esterbindungen eines Triacylglycerols. Je nach Stereopräferenz und Ort der Markierung (sn-1 oder sn-3) entsteht somit im ersten Hydrolyseschritt fluoreszierendes DAG oder fluoreszierende PDS und das Verhältnis der beiden Hydrolyseprodukte zueinander spiegelt die Stereopräferenz des Enzyms wider.

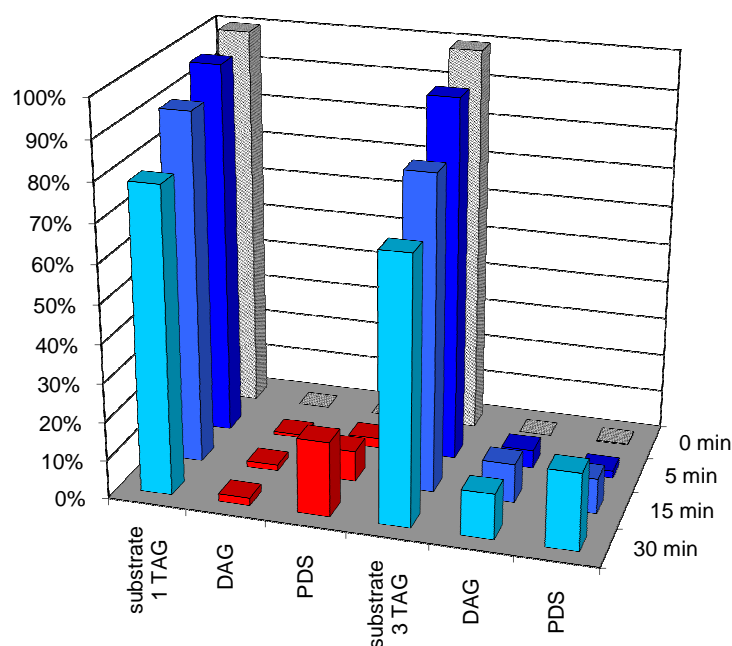


Abb. 4-1: Zeitabhängiger Umsatz der Substrate sn-1 PD-TAG (links) und sn-3 PD-TAG (rechts) mit RML. Das Verhältnis DAG/PDS wurde für das sn-1 Substrat rot hervorgehoben.

II) Sterischer Einfluss des Markers

Die Hydrolyse der markierten Seitenkette kann durch den Pyrenrest je nach Lipase und Geometrie der Bindetasche unterschiedlich stark oder schwach behindert sein. Dies kann zu einer verminderten bzw. überhöhten Einschätzung der Stereopräferenz des betreffenden Enzyms führen. Zusätzlich bewirkt dieser Effekt aber auch einen höheren Gesamtumsatz des Substrats, bei dem die präferierte Seitenkette unmarkiert ist und zeigt so die Stereopräferenz des Enzyms an.

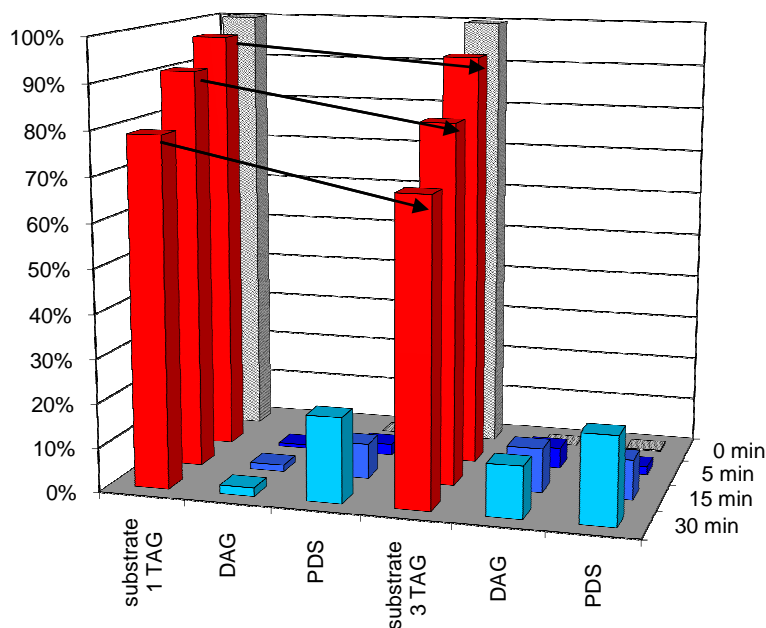


Abb. 4-2: Zeitabhängiger Umsatz der Substrate sn-1 PD-TAG (links) und sn-3 PD-TAG (rechts) mit RML. Die unterschiedlichen Gesamtumsätze bei gleicher Inkubationszeit sind rot hervorgehoben. (Die sn-1 Position wird präferiert und in unmarkierter Form schneller hydrolysiert.)

III) Das erste Hydrolyseprodukt ist selbst wiederum ein Substrat

Das im ersten Schritt der Hydrolyse erzeugte Diacylglycerol stellt ebenso ein Substrat der Lipase dar wie das Ausgangssubstrat. Führt man sich den Mechanismus der Lipidspaltung vor Augen, erfordern der Schritt der Grenzflächenaktivierung und das "Herauslösen" eines Triacylglycerolmoleküls aus dem Partikelverbund eine gewisse Zeit, wohingegen das Diacylglycerol besser zur weiteren Hydrolyse zur Verfügung steht, da die gesamte Grenzfläche heterogener wird. Dies kann zu einer gegenüber dem ursprünglichen Substrat erhöhten Hydrolysegeschwindigkeit von DAG führen, was die erhaltenen Ergebnisse entscheidend verändern kann und zu einem verfälschten Verhältnis von DAG zu PDS führt. Je kürzer die Inkubationszeit, desto geringer die Abweichung, da zu Beginn der Hydrolyse von TAG noch kein DAG als Konkurrenzsubstrat vorliegt (allerdings bedingen kurze Inkubationszeiten auch wenig Hydrolyseprodukt und erschweren so wiederum eine exakte Bestimmung des Verhältnisses DAG/PDS).

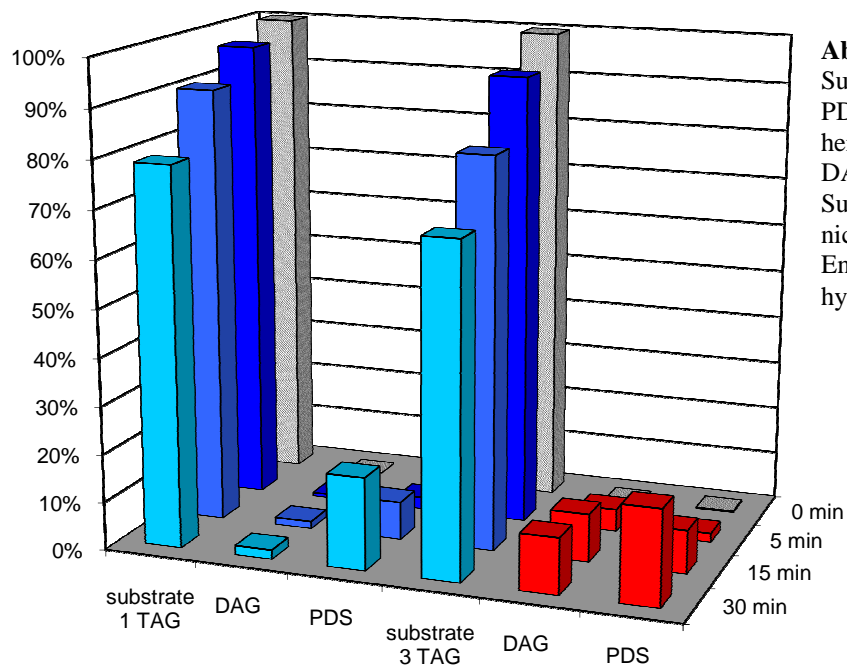


Abb. 4-3: Zeitabhängiger Umsatz der Substrate sn-1 PD-TAG (links) und sn-3 PD-TAG (rechts) mit RML. Rot hervorgehoben sind das entstehende DAG und PDS bei sn-3 TAG als Substrat. Die DAG Konzentration nimmt nicht linear zu, da es selbst Substrat des Enzyms ist und weiter zu PDS hydrolysiert wird.

Die Bestimmung des *enantiomeric excess* erfolgt nach der Formel:

$$e.e. = \frac{m_1 - m_2}{m_1 + m_2} \cdot 100\% \quad \text{Formel (1)}$$

mit m_1 : Masse des Enantiomers im Überschuss, m_2 : Masse des Enantiomers im Unterschuss

Die Menge an PDS entspricht näherungsweise der Menge an unmarkiertem DAG (eines der beiden gebildeten Enantiomere). So ergibt sich für sn-1 TAG als Substrat folgendes Bild:

Tabelle 4-1: Berechnung des *ee* für RML nach Formel (1)

Zeit		0 min	5 min	15 min	30 min
1 TAG	Substrat	100,00%	96,70%	90,60%	78,80%
	DAG	0,00%	0,80%	1,50%	2,00%
	PDS	0,00%	2,50%	7,90%	19,30%
<i>ee</i>			51,52%	68,09%	81,22%

Die aus dem Verhältnis DAG/PDS erhaltenen *ee* Werte sind jedoch wie oben dargestellt durch die sterische Hinderung bedingt durch den Marker (hier vor allem zu Beginn der Hydrolyse deutlich) sowie die weitere Hydrolyse des DAG (im späteren Reaktionsverlauf) verfälscht.

Eine verlässlichere Aussage lässt sich durch die vergleichende Betrachtung beider Hydrolyseschemata (sn-1 TAG und sn-3 TAG) erzielen. Hierbei gleichen sich die entgegengesetzten Effekte bis zu einem gewissen Grad aus. Die unterschiedliche Hydrolyserate der beiden Substrate wurde vernachlässigt. Folgende Formel wurde zur Berechnung des *ee* verwendet:

$$e.e. = \frac{c[DA G_1] - c[DA G_2]}{c[DA G_1] + c[DA G_2]} \cdot 100\% \quad \text{Formel (2)}$$

mit $c[DA G_1]$: Menge des DAG bei Hydrolyse des Substrats mit unmarkierter präferierter Seitenkette,
 $c[DA G_2]$: Menge des DAG bei Hydrolyse des Substrats mit markierter präferierter Seitenkette

Tabelle 4-2: Berechnung des *ee* für RML nach Formel (2)

Zeit		0 min	5 min	15 min	30 min
1 TAG	Substrat	100,0%	96,7%	90,6%	78,8%
	DAG	0,0%	0,8%	1,5%	2,0%
	PDS	0,0%	2,5%	7,9%	19,3%
3 TAG	Substrat	99,7%	93,4%	81,0%	68,4%
	DAG	0,0%	4,7%	10,0%	11,7%
	PDS	0,3%	1,9%	9,0%	19,8%
<i>ee</i>			70,9%	73,9%	70,8%

Aus diesen Daten ergibt sich für *Rhizomucor miehei* Lipase eine sn-1 Stereopräferenz (für pyrenmarkiertes Triacylglycerol als Substrat), die zu einem über den zeitlichen Reaktionsverlauf annähernd konstanten *ee* von rund **71,9%** des an Position sn-1 hydrolysierten Diacylglycerols führt. Rogalska et al (8) finden für dasselbe Enzym und Triolein als Substrat bei 3% Substratumsatz 76,1% und bei 6% Substratumsatz 76,3% sn-1 Stereopräferenz.

Für *Chromobacterium viscosum* Lipase wird die Auswertung schwieriger, da die Formel nur das entstehende Diacylglycerol berücksichtigt und im Verlauf der Inkubation mit CVL die größere Menge an gebildetem DAG zu Beginn der Reaktion bei sn-1 TAG als Substrat beobachtet wird, dieses im Verlauf der Reaktion aber selbst deutlich hydrolysiert wird (das erste Hydrolyseprodukt des TAG Abbaus ist DAG, das wiederum Substrat ist, siehe oben).

Tabelle 4-3: Berechnung des *ee* für CVL nach Formel (2)

Zeit		0 min	5 min	15 min	30 min
1 TAG	Substrat	99,8%	87,1%	76,7%	47,9%
	DAG	0,0%	4,6%	3,4%	1,3%
	PDA	0,2%	8,3%	20,0%	50,8%
3 TAG	Substrat	99,6%	84,8%	66,4%	60,2%
	DAG	0,0%	2,7%	2,3%	2,0%
	PDA	0,4%	12,5%	31,3%	37,8%
<i>ee</i>			25,8%	19,0%	-21,7%

Wenn man das DAG Verhältnis nach 30 Minuten jedoch außer Acht lässt und die Gewichtung auf den Beginn der Reaktion legt, bei dem die DAG Hydrolyse noch wenig Einfluß hat, ergibt sich für *Chromobacterium viscosum* Lipase eine sn-3 Stereopräferenz (für pyrenmarkiertes Triacylglycerol als Substrat), die zu einem *ee* von rund **22,4%** des an Position sn-3 hydrolysierten Diacylglycerols führt. Rogalska et al (8) finden für dasselbe Enzym und Triolein als Substrat bei 3% Substratumsatz 21,5% und bei 6% Substratumsatz 25,1% sn-3 Stereopräferenz.

Tabelle 4-4: Vergleich unserer Ergebnisse zur Stereopräferenz von CVL und RML mit jenen von Rogalska et al. gemessen bei Umsatz % mit Triolein als Substrat (7).

	unser Ergebnis	Rogalska (3%)	Rogalska (6%)
RML	71,9% sn-1	76,1% sn-1	76,3% sn-1
CVL	22,4% sn-3	21,5% sn-3	25,1% sn-3

Die Bestimmung der Stereoselektivität von Lipasen ist also aufgrund der dynamischen Ausprägung des Effekts an sich ein Unterfangen, bei dem eine Vielzahl von Variablen berücksichtigt werden muss. Einflüsse wie Substratbeschaffenheit, Lösungsmittel, Temperatur usw. können Stereopräferenzen nicht nur verschwinden lassen, sondern sie in manchen Fällen sogar umkehren.

Nichtsdestotrotz ist das Wissen um die Stereopräferenz ein bedeutender Schlüssel zum Verständnis gewisser physiologischer Prozesse. Unsere Methode erlaubt eine schnell und praktisch durchführbare Bestimmung der Stereopräferenz mittels DC sowie eine genauer quantifizierbare Untersuchung mittels HPLC, die sich unter Verwendung des immer selben Prinzips auf verschiedenste Situationen und Substrate ausweiten lässt. Man muss sich allerdings ständig im Klaren darüber sein, dass der verwendete Pyrenmarker in den fluoreszierenden Substraten bis zu einem gewissen Grad auch immer einen Einfluss auf den Enzym/Substrat Komplex hat und kein exaktes Abbild der natürlichen Situation geben kann. Wir sehen diesen Effekt vor allem in einer Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit im Fall einer markierten präferierten Seitenkette und einer damit einhergehenden "Ausweichreaktionen" des Enzyms, die ohne Marker nicht in diesem Ausmaß stattfinden würden.

Der Vergleich mit Daten, die mit radioaktiven Substraten erhalten wurden, zeigt allerdings, dass die Absolutaktivitäten unterschiedlich sind, die Stereopräferenzen tendenziell jedoch gleich gefunden werden.

Des Weiteren übt der Fluoreszenzmarker natürlich auch Einfluss auf die Packung der Moleküle in den Lipidpartikeln und die generelle Zugänglichkeit des Substrats für das Enzym aus. Dieser Effekt wurde vor allem bei dem Versuch deutlich, unsere Ergebnisse mit tritiummarkierten Tripalmitin als natürlichem Substrat zu verifizieren. Es zeigte sich, dass das völlig gesättigte Substrat offensichtlich deutlich langsamer als das fluoreszenzmarkierte hydrolysiert wurde und aufgrund des langsamen ersten Reaktionsschrittes die weitere Hydrolyse des ersten Zwischenprodukts die bevorzugte Reaktion war. Somit konnte leider kein direkter Vergleich zwischen radioaktiv- und pyrenmarkierten Substraten unter exakt gleichen Reaktionsbedingungen gezogen werden.

Trotzdem kann unter Berücksichtigung der bereits bekannten Stereopräferenzen der von uns untersuchten Lipasen gesagt werden, dass die Methode die Tendenz eines Enzyms zu einer Stereopräferenz deutlich wiedergibt und auch die exakte Quantifizierung der Stereopräferenz trotz der vielen weiteren Einflüsse (abgesehen vom Marker) möglich ist und sich mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen relativ gut deckt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Möglichkeiten unserer Methode, ihre Geschwindigkeit und Einfachheit sie zum bis dato besten Werkzeug zur unkomplizierten Bestimmung von Stereopräferenzen von Lipasen machen.

4.2 Humane Lipasen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Anwendbarkeit unseres Substratssets zur Bestimmung der Selektivitäten der humanen Lipasen ATGL, HSL und MGL untersucht, die in COS-7 Zellen überexprimiert wurden. Ausgehend von der Annahme, dass das Cytosol dieser Zellen jeweils inkubiert mit einem der Substrate in Summe ein komplexes Hydrolyseschema zeigt, dass sich bei Vorhandensein einer zusätzlichen humanen Lipase ganz spezifisch verändern sollte, lag unser Hauptaugenmerk auf der Interpretation dieser Abweichungen und deren

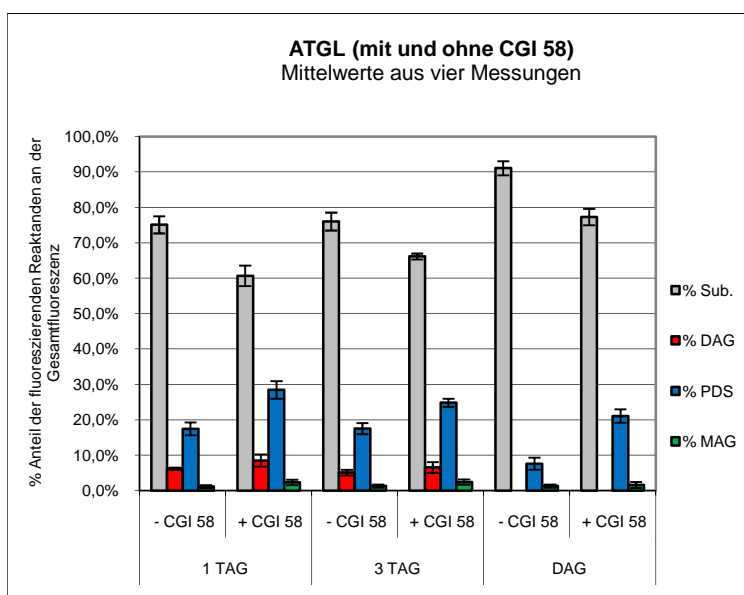


Abb. 4-4: Verkleinerte Darstellung von Abb. 3-15 (siehe Resultate)

Aussagekraft bezüglich der Eigenschaften des betreffenden Enzyms. Wir konnten zeigen, dass überexprimierte ATGL eine deutliche Aktivität gegenüber Triacylglycerol besitzt (siehe Abb. 3-15). In Gegenwart von CGI-58 wird zusätzlich eine Aktivitätssteigerung sichtbar.

Überexprimierte ATGL konnte also zweifelsfrei als Triacylglycerol hydrolysierende Lipase identifiziert werden. Im Gegensatz dazu zeigte überexprimierte HSL nur eine relativ geringe Aktivität gegenüber Triacylglycerolen, allerdings eine ausgeprägte Fähigkeit zur Hydrolyse von DAG.

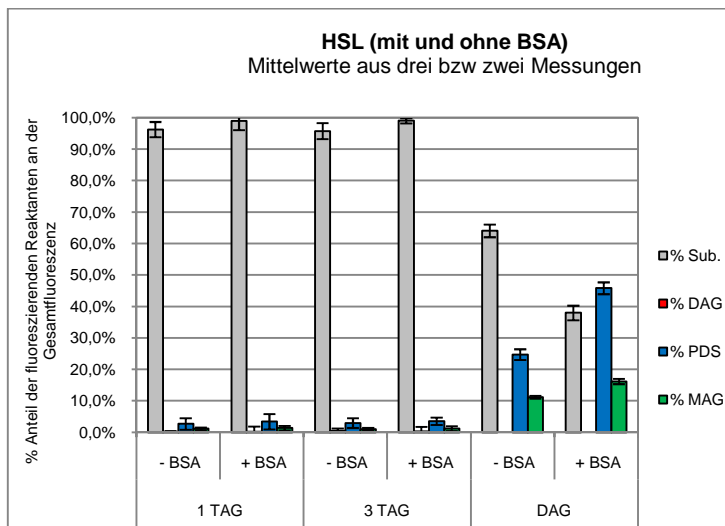


Abb. 4-5: Verkleinerte Darstellung von Abb. 3-16 (siehe Resultate)

Eine Bestimmung des ee-Werts für HSL ist angesichts der minimalen Hydrolyse der TAG Substrate nicht sinnvoll. Ausgehend von unseren Daten ist HSL vielmehr für die Hydrolyse von Diacylglycerolen verantwortlich (16). Als Reaktionsprodukte werden PDS und MAG gebildet, woraus abzuleiten ist, dass HSL auch in der Lage ist, die sn-2 Position eines Acylglycerols zu hydrolysieren.

Ob diese Reaktion tatsächlich in diesem Umfang stattfindet oder durch den Marker induziert wird, indem er durch seine sterische Ausdehnung eine prinzipiell unfavorisierte Reaktion begünstigt, bleibt zu klären.

Schließlich wurde MGL als letztes Enzym in der Kaskade der vollständigen Mobilisierung der Fettsäuren aus Triacylglycerolen betrachtet (16). Wie erwartet zeigte sich kaum Aktivität gegenüber TAG. Diacylglycerol wird bereits sehr effektiv gespalten. An den Monoacylglycerolen war die Aktivität so hoch, dass nur eine Verkürzung der Inkubationszeit um zwei Drittel im Vergleich zu den anderen Enzymen eine quantitative Umsetzung des Substrats verhinderte. Sehr auffällig war hier die hohe Schwankungsbreite

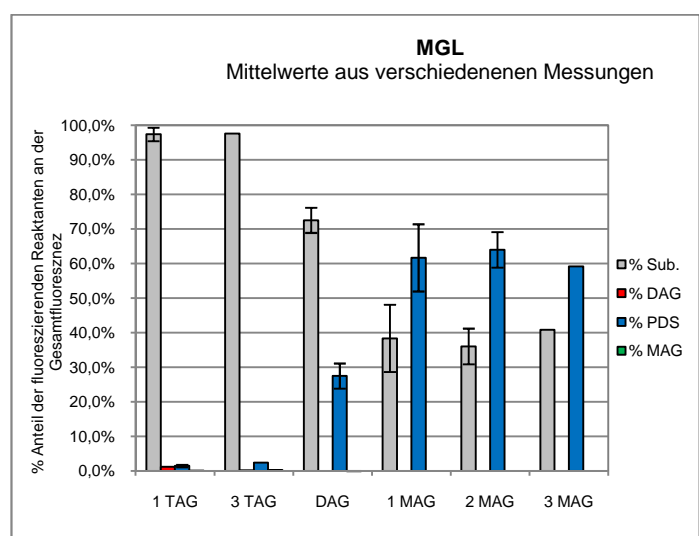


Abb. 4-6: Verkleinerte Darstellung von Abb. 3-17 (siehe Resultate)

der Ergebnisse, die, wie bereits angesprochen, sehr wahrscheinlich auf die variable Menge an aktivem Enzym in der Cytosolpräparation zurückzuführen ist und bei MGL als aktivstem Enzym am deutlichsten zutage tritt.

4.3 Untersuchungen an Mausfettgewebe

Im dritten Teil der Arbeit sollten auf Basis der vorangegangenen Versuche die Aktivitätsbeiträge von ATGL und HSL bei der Lipidhydrolyse im Fettgewebe von wildtype bzw. knockout Mäusen dokumentiert werden.

Dabei legten wir vor allem Augenmerk auf die beschriebene Aufrechterhaltung der TAG Hydrolysefähigkeit sowie die DAG Akkumulation in HSL defizienten Mäusen. Unter der Annahme, dass fehlende ATGL die Triacylglycerolhydrolyse und fehlende HSL die Spaltung von Diacylglycerol einschränken würde, untersuchten wir weißes und braunes Fettgewebekomogenat, um diese Effekte sichtbar zu machen.

Unsere Ergebnisse deckten sich in allen wesentlichen Punkten mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen und führten auch zu neuen, bislang nicht dokumentierten Schlussfolgerungen. Folgende Fakten wurden erhoben:

- ATGL ist hauptverantwortlich für die Triacylglycerolhydrolyse. Im Unterschied zu Osuga et al. (18) messen wir nur einen Rückgang von etwa 30% (verglichen mit 60%) der TAG Hydrolyse in WAT und BAT von HSL defizienten Mäusen. Fehlende ATGL führt hingegen zu einer Abnahme von über 50% im weißen Fettgewebe, im braunen Fettgewebe wirkt sich die Absenz von ATGL nicht so schwerwiegend aus (etwa um 30% verminderte TAG Hydrolyse).
- HSL zeigt die deutlichste Aktivität der drei betrachteten Enzyme (ATGL, HSL, MGL) gegenüber Diacylglycerolen. Der Rückgang der DAG Hydrolyse im braunen Fettgewebe HSL defizienter Mäuse beträgt beinahe 40%, ATGL knockout Mäuse zeigen einen starken Anstieg des DAG Hydrolyse Levels, den wir auf eine Kompensation der fehlenden ATGL unter anderem durch vermehrte HSL Expression zurückführen.
- HSL ist das einzige Enzym im Fettgewebe von Mäusen, das eine Cholesterolesterasefunktion besitzt. HSL knockout Mäuse verlieren die Fähigkeit zur Spaltung von Cholesterinestern vollständig. Eine Pyrenmarkierung der Fettsäure von

Cholesterinestern ist jedoch kein geeignetes Mittel zur Untersuchung der CE Hydrolyse durch Lipasen. Dies wurde erst durch radioaktiv markierten CE gezeigt. Bei Verwendung dieses Substrats wurde sehr wohl die bekannte Cholesterinesterase-Aktivität gefunden.

Die Hydrolyserate von Cholesterinestern steigt bei ATGL $-/-$ Mäusen an. Da HSL das einzige Enzym mit Aktivität gegenüber CE ist, verursacht ATGL Defizienz also definitiv eine Steigerung der HSL Expression. Die Mechanismen dieser Regulation sind noch zu klären.

Anhand dieser Ergebnisse und der vorhergehenden Untersuchungen kann man folgendes Schema der hydrolytischen Aktivität der Lipasen im Fettgewebe formulieren:

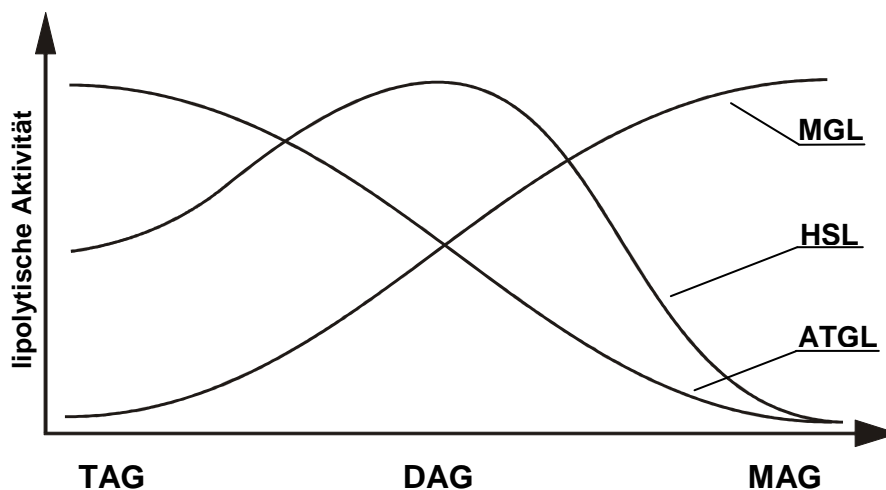


Abb. 4-7: Schematische Darstellung der relativen Aktivität der Lipasen im Fettgewebe gegenüber den möglichen Substraten.

Das primär für die Degradation von Triacylglycerolen verantwortliche Enzym ist ATGL. Auch HSL kann diese Funktion übernehmen, zeigt aber ihre ausgeprägteste Aktivität gegenüber Diacylglycerolen. Diese wiederum können, wenn auch nicht mit derselben Geschwindigkeit, auch von ATGL und MGL gespalten werden.

Schließlich ist MGL für die Hydrolyse der in der Zelle toxisch wirkenden Monoacylglycerole verantwortlich. Wohl auch aus diesem Grund ist MGL das aktivste Enzym mit der schnellsten Hydrolyserate in dieser Kaskade.

Die abschließende Untersuchung des Mausfettgewebes mittels radioaktiv markierten Substraten wurde auch durchgeführt, um zu klären, warum der pyrenmarkierte Cholesterinester von keinem unserer Enzyme hydrolysiert werden konnte. Die Vermutung, dass die sterisch raumfüllenden Gruppen auf beiden Seiten der Esterfunktion (Cholesterin und Pyren) eine Hydrolyse verhindern, wurde erhärtet, da der radioaktiv markierte CE die höchste Hydrolyserate aller Substrate aufwies (katalysiert durch HSL). Zusätzlich zeigte sich, dass im Fall der HSL knockout Maus keinerlei CE Hydrolyse sichtbar ist, während im Fall der ATGL knockout Maus die CE Hydrolyse stark erhöht wird. Dies stützt noch einmal die Annahme einer vermehrten HSL Expression zur Kompensation der fehlenden ATGL in der ATGL knockout Maus und zeigt auch, dass HSL offensichtlich **die** Cholesterinesterase im Fettgewebe von Mäusen ist (siehe oben).

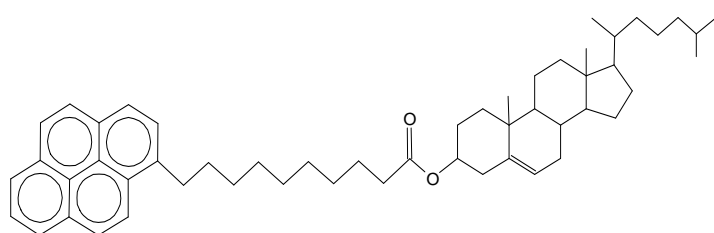


Abb. 4-8: PD-CE. Auf beiden Seiten des Moleküls finden sich große Substituenten, die eine enzymatische Hydrolyse des Esters verhindern. Wahrscheinlichste Ursache ist, dass die Esterfunktion aufgrund der Geometrie der Bindetaschen der Lipasen nicht an das aktive Zentrum herangeführt werden kann.

4.4 Conclusio

Die Verwendung von pyrenmarkierten Substraten zur Aufklärung der Substrat-, Regio- und Stereoselektivität von Lipasen erweist sich als äußerst wirkungsvolle und vielfältig einsetzbare Methode. In Hinblick auf die experimentellen und zeitlichen Erfordernisse, die Möglichkeit, die Methode als high-throughput-Verfahren zu etablieren, sowie die weitreichenden Interpretationsmöglichkeiten und Rückschlüsse, die die gewonnenen Daten ermöglichen, stellt sie ein universelles Tool zur Klärung verschiedenster Fragestellungen im weiten Feld der Biochemie der Lipasen dar.

Wir konnten den zeitlichen Verlauf der Hydrolyse eines Substrats darstellen, konnten Stereoselektivitäten und die dazugehörigen *ee* Werte ermitteln, aber auch in komplexen biologischen Matrices mit generell hoher lipolytischer Background Aktivität die Wirkung und Funktion einzelner Enzyme verfolgen und messbar machen.

Vor allem letzteres scheint ein sehr zukunftsträchtiges Gebiet für weitere Forschung zu sein. Sehr interessant war die Beobachtung eines offensichtlichen Regulationsmechanismus, der eine verstärkte Expression von HSL in ATGL $-/-$ Mäusen bewirkt. Das Wissen um die Zusammenhänge zwischen diesen beiden Enzymen und die Aufklärung des Mechanismus ihrer Ausbalancierung ist wohl für das

tieferegehende Verständnis der Fettsäuremobilisierung unumgänglich. Verfeinerungen der Assays, sowie der Cytosol- bzw. Gewebepreparationen lassen bestimmt tiefere Einblicke in die Lipolyse zu, als sie im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden und auch *in vivo* Applikationen der Substrate könnten in Zukunft sehr detaillierte Einblicke in den Fettstoffkatabolismus gewähren und das faszinierende Zusammenspiel der Enzyme, die ihn bewerkstelligen, sichtbar machen.

5. Literatur

- (1) Schulz T. (2001) Molekulare Grundlagen der Stereoselektivität Lipase-katalysierter Umsetzungen. Dissertation, Universität Stuttgart
- (2) Davranov K., Khalameizer V.B. (1997) Current state of the study of microbial lipases. Chemistry of natural compounds, 33, n^o2, 113-126
- (3) Schrag J.D., Cygler B. (1997) Lipases and alpha/beta hydrolase fold. Methods Enzymol., 284, 85-107
- (4) Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Turkenburg J.P., Christiansen L., Høge-Jensen B., Nørskov L. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. Nature, 343, 767-770
- (5) Wooley, P. and S. Peterson (1994) Lipases: their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press.
- (6) Kraut J. (1997) Serine Proteases: structure and mechanism of catalysis. Annu. Rev. Biochem., 46, 331-358
- (7) Derewenda U., Brzozowski A.M., Lawson D.M., Derewenda Z.S. (1992) Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. Biochemistry, 31, 1532-1541
- (8) Rogalska E., Cudrey C., Ferrato F., Verger R. (1993) Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. Chirality, 5, 24-30
- (9) Muralidhar R.V., Chirumamilla R.R., Marchant R., Ramachandran V.N., Ward O.P., Nigam P. (2002) Understanding lipase stereoselectivity. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18, 2, 81-97
- (10) Kovac A., Scheib H., Pleiss J., Schmid R.D., Paltauf F. (2000) Molecular basis of lipase stereoselectivity. European Journal of Lipid Science and Technology, 102, 61-77
- (11) Lang D.A., Dijkstra B.W. (1998) Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases. Chem. Phys. Lipids, 93, 115-122

-
- (12) Gibbons G.F., Islam K., Pease R.J. (2000) Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochem. Biophys. Acta*, 1483, 37-57
- (13) Holm C. (2003) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.*, 31(Pt 6), 1120-1124
- (14) Frederikson G., Tornquist H., Belfrage P. (1986) Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochem. Biophys. Acta*, 876, 288-293
- (15) Holm C., Osterlund T., Laurell H., Contreras J.A. (2000) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu. Rev. Nutr.*, 20, 365-393
- (16) Haemmerle G., Zimmermann R., Zechner R. (2003) Letting lipids go: hormone-sensitive lipase. *Current Opinion in Lipidology*, 14, 289-297
- (17) Belfrage P., Jergil B., Stralfors P., Tornqvist H. (1977) Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue: Identification and some properties of the enzyme protein. *FEBS Letters*, 75, 259-264
- (18) Osuga J., Ishibashi S., Oka T., Yagyu H., Tozawa R., Fujimoto A., Shionoiri F., Yahagi N., Kraemer F.B., Tsutsumi O., Yamada N. (2000) Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *PNAS*, 97, 787-792
- (19) Saltiel A.R. (2000) Another hormone-sensitive triglyceride lipase in fat cells? *PNAS*, 97, 535-537
- (20) Yeaman S.J. (2004) Hormone-sensitive lipase – new roles for an old enzyme. *Biochemical Journal*, 379, 11-22
- (21) Raclot T., Holm C., Langin D. (2001) Fatty acid specificity of hormone-sensitive lipase: Implications in the selective hydrolysis of triacylglycerols. *J. Lipid Res.* 42, 2049–2057
- (22) Wang S.P., Laurin N., Himms Hagen J., Rudnicki M.A., Levy E., Robert M.F., Pan L., Oligny L., Mitchell G.A. (2001) The adipose tissue phenotype of hormone sensitive lipase deficiency in mice. *Obes. Res.*, 9, 119-128
- (23) Haemmerle G., Zimmermann R., Hayn M., Theussl C., Waeg G., Wagner E., Sattler W., Magin T.M., Zechner R. (2002) Hormon-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation on adipose tissue, muscle and testis. *J. Biol. Chem.*, 277, 4806-4815
- (24) Zimmermann R., Haemmerle G., Wagner E.M., Strauss J.G., Kratky D., Zechner R. (2003) Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase deficient white adipose tissue. *J. Lipid Res.*, 44, 2089-2099
- (25) Zimmermann R., Strauss J.G., Haemmerle G., Schoiswohl G., Birner-Gruenberger R., Riederer M., Lass A., Neuberger G., Eisenhaber F., Hermetter A., Zechner R. (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306, 1383-1386.
- (26) Shewry P.R. (2003) Tuber Storage Proteins. *Ann. Bot.*, 91, 755-769
- (27) Lass A., Zimmermann R., Haemmerle G., Riederer M., Schoiswohl G., Schweiger M., Kienesberger P., Strauss J.G., Gorkiewicz G., Zechner R. (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism*, 3, 309-319
-

-
- (28) Yamaguchi T., Omatsu N., Matsushita S., Osumi T. (2004) CGI-58 Interacts with Perilipin and Is Localized to Lipid Droplets: Possible involvement of CGI-58 mislocalization in chnarin-dorfman syndrome. *J. Biol. Chem.*, 279, 30490-30497
- (29) Zechner, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R. (2005) Lipolysis: pathway under construction. *Current Opinion in Lipidology*, 16, 333-340.
- (30) Fredrikson G., Tornqvist H., Belfrage P. (1986) Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta* 876, 288–293
- (31) Gupta R., Rathi P., Gupta N., Bradoo S. (2003) Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 63-71
- (32) Duque M., Graupner M., Stütz H., Wicher I., Zechner R., Paltauf F., Hermetter A. (1996) New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J. Lipid Res.*, 37, 868-876
- (33) Sunamoto J., Kondo H., Nomura T., Okamoto H. (1980) Liposomal Membranes. 2. Synthesis of a Novel Pyrene-Labeled Lecithin and Structural Studies on Liposomal Bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 102, 1146-1152
- (34) Oskolkova O.V., Shvets V.I., Hermetter A., Paltauf F. (1999) Synthesis and intermembrane transfer of pyrene-labelled liponucleotides: ceramide phosphothymidines. *Chemistry and Physics of Lipids*, 99, 73-86
- (35) Riesenhuber G. (2005) Development of novel fluorescent substrates for high-throughput lipase assays. Dissertation, Technische Universität Graz
- (36) Birner-Gruenberger R., Susani-Etzerodt H., Waldhuber M., Riesenhuber G., Schmidinger H., Rechberger G., Kollroser M., Strauss J.G., Lass A., Zimmermann R., et al. (2005) The lipolytic proteome of mouse adipose tissue. *Mol Cell Proteomics*, 4, 1710-1717
- (37) Raclot, T. (2003) Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 42, 257-288
- (38) Wade R., Gabdouliline R., Lüdemann S., Lounnas V. (1998) Electrostatic steering and ionic tethering in enzyme-ligand binding: Insights from simulations. *PNAS*, 95, 5942-5949