



Manuel Tomisser, BSc.

Expression und enzymatische Charakterisierung der humanen Carboxylesterasen 1, 2 und 3

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

Masterstudium Biochemie und Molekulare Biomedizin

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Betreuer

Assoz. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer.nat. Achim Lass

Institut für Molekulare Biowissenschaften

Karl-Franzens-Universität Graz

Graz, Mai 2015

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die bei der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

Meinem Betreuer Dr. Achim Lass gebührt großer Dank für seine Ideen und Ratschläge aber hauptsächlich für seine Geduld. Lukas Grumet, Ulrike Taschler und Sabrina Hütter möchte ich für die Erklärungen und Beantwortung vieler Fragen danken.

Univ-Prof. Dr. Rudolf Zechner danke ich für die Möglichkeit in seiner hervorragenden Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Biowissenschaften danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die heiteren Gespräche.

Der größte Dank gebührt meiner Familie, besonders meinen Eltern, welche mich immer moralisch sowie finanziell unterstützt und mir damit mein Studium erst ermöglicht haben.

Ich danke allen meinen Freunden, welche mich nach einem anstrengenden Tag abgelenkt und zerstreut haben.

Inhalt

Abstract.....	1
Zusammenfassung.....	1
Einleitung	2
Lipide.....	2
Neutrallipidstoffwechsel	2
Triglyzeride	3
Retinylester.....	5
Cholesterylester.....	6
Leber	7
Carboxylesterasen	7
Humane Carboxylesterasen 1, 2 und 3.....	9
Murine Carboxylesterasen	10
Ziel der Arbeit	10
Material	11
Methoden	17
Plasmidpräparation (Maxiprep)	17
Züchten von Zellen	18
Zellaufschluss, Proteinbestimmung und Westernblot.....	20
Aktivitätsbestimmungen	21
Statistische Methoden.....	25
Ergebnisse	26
Expression der humanen Carboxylesterasen 1, 2 und 3	26
Aktivitätsassay zum „Screening“ unterschiedlicher Substrate	27
Untersuchung der Hydrolase Aktivität von hCes1, hCes2 und hCes3 für das künstliche Substrat Para-Nitrophenylacetat	30
Bestimmung des pH- Optimums	31
Untersuchung der Proteine hCes1-3 auf Retinylesterhydrolase Aktivität.....	32
Untersuchung der hCes1-3 auf Triglyzeridhydrolase Aktivität	34
Untersuchung der hCes1-3 auf Monoglyzeridhydrolase Aktivität.....	36
Untersuchung der hCes1-3 auf Cholesterylesterhydrolase Aktivität.....	38
Diskussion.....	41
Quellen.....	45

Abstract

Carboxylesterases are primarily expressed in the liver and in the intestinal tract. Murine carboxylesterases (Ces) are known to hydrolyze among other xenobiotic substances containing ester bonds also the neutral lipid species e.g. monoglyceride. [34] So far human carboxylesterases (hCes) have not been examined if they are involved in neutral lipid metabolism. In this study hCes1, 2 and 3 as well as their murine homologs, esterase 22 (Es22 or Ces1e) and Ces5 (Ces2g) were analyzed for activities against a variety of substrates. Different neutral lipids, emulsified with phospholipids or bile salts, were used as substrates. Under certain conditions a retinylester hydrolase activity, a triglyceride hydrolase activity and a monoglyceride hydrolase activity was detected for hCes1 (CES1A3) with or without addition of detergents and/or bile salts. hCes2 (CES2A1) and hCes3 (CES3A2) were able to hydrolyze monoglyceride. Murine carboxylesterases Es22 and Ces5 hydrolyzed retinylesters, triglyceride and monoglyceride with or without addition of detergents and/or bile salts. The pH optimum of hCes1-3 was determined to be around pH 8. The high activities of hCes1 and hCes2 to hydrolyze monoglycerides may indicate their involvement in the metabolism of monoglycerides in the liver and the intestinal tract. Further studies in cellular systems or tissues are needed to examine this hypothesis.

Zusammenfassung

Carboxylesterasen sind vorwiegend in der Leber und dem Intestinaltrakt exprimiert. Für murine Carboxylesterasen (Ces) ist bekannt, dass diese neben xenobiotischen Esterverbindungen auch z.B. das Neutrallipid Monoglycerid spalten können. [34] Humane Carboxylesterasen (hCes) wurden bislang auf eine mögliche Rolle im endogenen Neutrallipidstoffwechsel nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde ein Substratspektrum für die hCes1, 2 und 3, sowie der murinen Homologen, Esterase22 (Es22 oder Ces1e) und Ces5 (Ces2g), bestimmt. Dazu wurden verschiedene Neutrallipide als Substrate, emulgiert mit Phospholipiden oder Gallensalzen, eingesetzt. Für hCes1 (CES1A3) wurden unter bestimmten Assay-Bedingungen eine Retinylesterhydrolase-Aktivität, eine Triglyzeridhydrolase-Aktivität und eine Monoglyzeridhydrolase-Aktivität in An- bzw. Abwesenheit von Detergenzien und/oder Gallensalzen festgestellt. Für hCes2 (CES2A1) und hCes3 (CES3A2) wurde eine Monoglyzeridhydrolase-Aktivität festgestellt. Für die murinen Carboxylesterasen Esterase22 und Ces5 wurden eine Retinylesterhydrolase-Aktivität, eine Triglyzeridhydrolase-Aktivität und eine Monoglyzeridhydrolase-Aktivität in Ab- bzw.

Anwesenheit von Detergenzien und/oder Gallensalzen festgestellt. Das pH-Optimum der humanen Ces1-3 wurde bei ca. pH 8 gefunden. Die besonders hohe Monoglyceridhydrolase-Aktivität von hCes1 und hCes2 lassen vermuten, dass diese Enzyme eine Rolle im Monoglyceridstoffwechsel der Leber oder dem Intestinaltrakt spielen könnten. Weitere Untersuchungen in zellulären Systemen oder Geweben sind notwendig, um dieser Fragestellung nachzugehen.

Einleitung

In der Leber werden viele Substanzen verstoffwechselt, unter anderem Neutrallipide. Die Proteine, welche Neutrallipide in den Hepatozyten der Leber abbauen, sind noch unbekannt. Durch ihre Lokalisation und hohe Expression in der Leber sind Carboxylesterasen gute Kandidaten für diese Aufgabe. In Mäusen ist bekannt, dass das Protein Triglyceridhydrolase (TGH), und zwar die murine Carboxylesterase 3, in der Lage ist Triglyceride abzubauen. [45]

Lipide

Lipide sind natürlich vorkommende hydrophobe oder amphipathische Moleküle. [1] Viele Lipide sind trotz unterschiedlicher chemischer Struktur in organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser hingegen kaum oder nicht löslich, weswegen sie oftmals in Zellorganellen oder Lipidtropfen vorkommen. [36] Ihre biologischen Funktionen sind unter anderem Speicherung von Energie, Signalübertragung und als struktureller Bestandteil von Zellmembranen. [2] Zu ihnen zählen unter anderem Sterole, Wachse, Fette, Monoglyceride, Diglyceride, Triglyceride, Phospholipide und die fettlöslichen Vitamine A, D, E und K. [1]

Man kann Lipide in Neutrallipide und polare Lipide einteilen. Zu den polaren Lipiden gehören unter anderem freie Fettsäuren und Phospholipide. Freie Fettsäuren gehören zu den Bausteinen vieler Lipide und sind wichtig als Energiespeicher, Signallipide und als Zellbausteine. Zu den Neutrallipiden zählen Wachse, Triglyceride, Cholesterylester und Retinylester. [3]

Neutrallipidstoffwechsel

Zu den Neutrallipiden zählen unter anderem Wachse, Triglyceride, Retinylester und Cholesterylester. [3]

Werden genug Neutrallipide über die Nahrung aufgenommen, dann werden überschüssige Neutrallipide in speziellen Zellen des Körpers gespeichert: Triglyzeride in Fettgewebe, Retinylester in hepatischen Stellat-Zellen usw. [4,21]

Werden keine oder ungenügend Neutrallipide durch die Nahrung aufgenommen, werden diese Speicher mobilisiert und die entsprechenden Neutrallipide über die Zirkulation dem Organismus wieder zur Verfügung gestellt.

Triglyzeride

Triglyzeride gehören zu den Neutrallipiden. Sie sind Esterverbindungen von Glycerin und freien Fettsäuren. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau und die Positionen der Esterverbindungen in einem Triglyzerid-Molekül. R1-R3 sind jeweils die Kohlenstoffketten der an das Glyzerid veresterten Fettsäuren.

Die Fettsäuren natürlich vorkommender Triglyzeride bestehen aus unverzweigten Ketten mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen. Die physikalischen Eigenschaften und das chemische Verhalten werden fast ausschließlich von den Fettsäureanteilen bestimmt. Die Zahl der Doppelbindungen, die Konfiguration und die Kettenlänge sind entscheidend für zum Beispiel Schmelztemperatur und Metabolisierung in Organismen. Ungesättigte Fettsäuren sind für den Menschen essentiell, da unser Körper keine Carbonsäuren mit Doppelbindung synthetisieren kann.

Die am häufigsten vorkommenden ungesättigten Fettsäuren in Triglyzeriden sind Ölsäure (18:1, 18 Kohlenstoffatome, 1 Doppelbindung), Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3). [36]

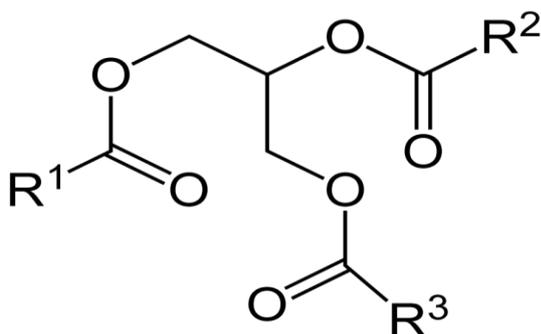


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Triglyzerids. R1, R2, R3 sind jeweils Kohlenstoffatomketten. [37]

Triglyzeride sind Hauptbestandteil der Energiespeicher. Das Fettgewebe stellt das größte Energiedepot des Körpers dar. Dort werden Triglyzeride in spezialisierten Zellen, den Adipozyten, als Lipidtropfen gespeichert. Durch die Nahrung aufgenommene Triglyzeride werden durch Chylomicronen transportiert und in der Zirkulation von Lipoprotein-Lipase

abgebaut, um peripheren Geweben Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. [15,16] Die Prozesse von Triglyzeridsynthese und Triglyzeridabbau sind stark reguliert. Wenn sie aus dem Gleichgewicht geraten, sind Übergewicht und Fettleibigkeit oder das Gegenteil, Untergewicht und Lipodystrophien die Folge. [4]

Die Lipidtropfen von Adipozyten bestehen bis zu 95% aus Triglyzeriden, aber beinhalten auch Cholesterin, Cholesterinester und Phospholipide. An der Oberfläche der Tropfen befinden sich zudem viele Proteine, welche die Lipogenese oder Lipolyse regulieren oder katalysieren. [4,5]

Die Lipolyse besteht aus drei Schritten, welche an der Grenzfläche von Zytosol und Lipidtropfen ablaufen. Der erste und zeitgleich geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird von der Adipozyten-Triglyzeridlipase (ATGL) (aber auch der Hormon-sensitiven Lipase) katalysiert und besteht darin ein Triglyzerid in ein Diglyzerid und eine freie Fettsäure zu spalten. [6] Im zweiten Schritt, welcher von der Hormon-sensitiven Lipase (HSL) katalysiert wird, wird dieses Diglyzerid in ein Monoglyzerid und eine freie Fettsäure gespalten. Die letzte Esterbindung des Monoglyzerids wird anschließend im dritten Schritt durch 2-Monoglyzeridlipase (MGL), aber auch durch HSL, gespalten. [7] Abbildung 2 zeigt den stark vereinfachten Ablauf der Lipolyse an der Oberfläche der Lipidtropfen.

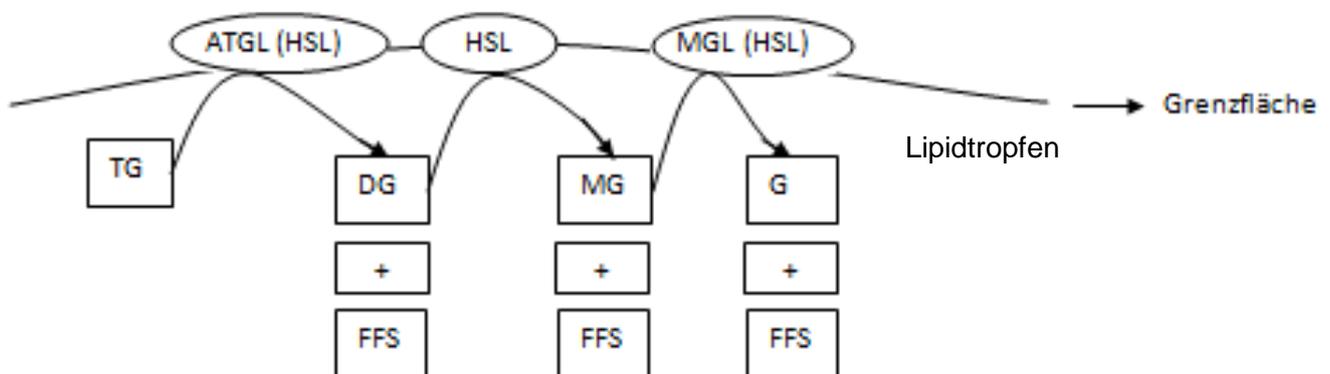


Abbildung 2: Schema der Lipolyse am Lipidtropfen. Triglyzerid wird durch ATGL und HSL in Diglyzerid und eine freie Fettsäure gespalten. Dieses Diglyzerid wird wiederum durch HSL in Monoglyzerid und eine freie Fettsäure gespalten. Das Monoglyzerid wird schließlich durch die MGL und HSL in ein Glyzerid und eine freie Fettsäure gespalten. Diese Prozesse finden an der Grenzfläche vom Lipidtropfen statt. Abkürzungen: TG: Triglyzerid, DG: Diglyzerid, MG: Monoglyzerid, G: Glyzerid, FFS: freie Fettsäure, ATGL: Adipozyten-Triglyzeridlipase, HSL: Hormon sensitive Lipase, MGL: Monoglyzeridlipase.

Retinylester

Retinylester gehören ebenfalls zu den Neutrallipiden. [3] Sie bestehen aus Retinol und einer freien Fettsäure, welche durch eine Esterbindung verbunden sind.

Vitamin A (Retinol) ist ein essentieller Nährstoff und Verantwortlich für zum Beispiel die Aufrechterhaltung des Immunsystems, Wachstum und Entwicklung. Es ist ein wichtiger Ligand für nukleäre Rezeptoren und spielt eine große Rolle beim Sehvorgang. Das Vitamin ist aufgebaut aus 4 Isopreneinheiten. Abbildung 3 zeigt die Struktur von Retinol.

Da der menschliche Körper nicht in der Lage ist Vitamin A zu produzieren, ist er darauf angewiesen, es entweder in Form von Retinol oder als Provitamin Betacarotin über die Nahrung aufzunehmen. [8,9]

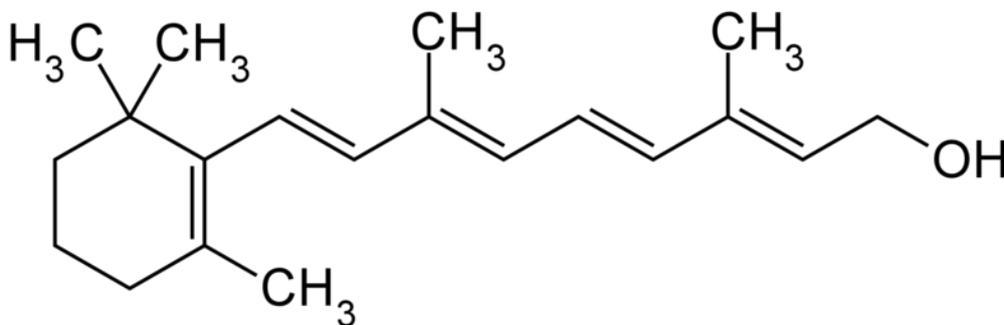


Abbildung 3: Struktur von Retinol [38]

Im Darmlumen werden Retinylester durch die Pankreatische-Triglyzerid-Lipase zu Retinol hydrolysiert [10,11], in den Enterozyten verestert [11,12,13] und in Chylomicronen verpackt. Diese werden zuerst in die Lymphe, danach in die Zirkulation sekretiert. [14] In der Zirkulation werden Triglyzeride, welche ebenfalls in Chylomicronen transportiert werden, und Teile der Retinylester mit Hilfe der Lipoprotein-Lipase abgebaut, um Fettsäuren und Retinol den peripheren Geweben zugänglich zu machen. Es entstehen dadurch Chylomicronenreste. [15,16,17] In der Leber werden retinylesterreiche Chylomicronenreste hauptsächlich von Hepatozyten aufgenommen, wo Retinylester zu Retinol hydrolysiert werden. [18,19] Dieses bindet dann entweder an das „retinol-binding-protein-4“ (RBP4), um dann in die Zirkulation sekretiert zu werden, oder es wird in hepatische Stellat-Zellen transferiert, wo es in Form von Retinylestern gespeichert wird. [20,21]

In diesen Stellat-Zellen werden ca. 80% der Vitamin A Reserven des Körpers [21] in Form von Retinylpalmitat mit Hilfe der „lecithin:retinol acyltransferase“ (LRAT) in zytosolischen Fetttröpfchen gespeichert. [12] Wenn zu wenig Vitamin A in der Nahrung vorhanden ist, werden diese Speicher mit Hilfe von Retinylesterhydrolasen (REHs) [8] wieder zu Retinol

hydrolysiert, welches gebunden an RBP4 in der Zirkulation transportiert eine konstante Versorgung der Gewebe mit Vitamin A gewährleistet. [9] In den Geweben wird das biologisch inaktive Retinol zu 11-cis-Retinaldehyd, welches als Photonenakzeptor im Sehprozess benötigt wird, oder zu Retinsäure, welche als Ligand für nukleäre Rezeptoren dient, konvertiert, oder als Retinylester gespeichert. Es wurde gezeigt, dass Esterase22 (Es22), ein Protein in den Hepatozyten von Mäusen, eine Retinylesterhydrolase-Aktivität besitzt. [8] Welche Retinylesterhydrolase Retinylester in der Leber abbaut, und ob Es22 involviert ist, ist jedoch noch unbekannt.

Cholesterylester

Cholesterylester sind ebenfalls Neutrallipide. Es sind Esterverbindungen von Cholesterin und freien Fettsäuren. Abbildung 4 zeigt die Struktur von Cholesterin. Bei Cholesterylester ist eine Fettsäure durch eine Esterbindung an das OH (in der Abbildung 4 links unten) gebunden. Cholesterin kommt als Bestandteil von Membranen in fast allen Zellen vor. Cholesterin ist die Ausgangsverbindung für Steroidhormone wie Östrogen und Testosteron, sowie die Corticoide der Nebennierenrinde. [36]

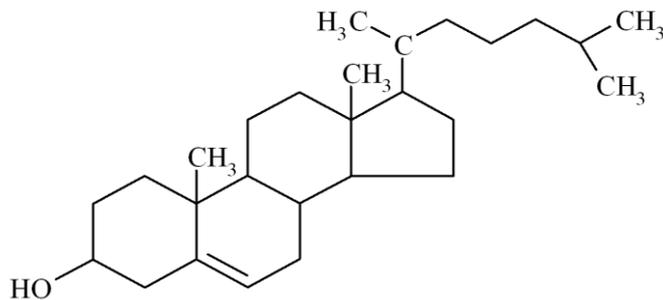


Abbildung 4: Struktur von Cholesterin [39]

Die durch die Nahrung aufgenommenen Cholesterylester werden durch die gallensalz-aktivierte Lipase im Darm zerlegt und aufgenommen. Zu 70% wird Cholesterin im Blut als Cholesterylester in Lipoproteinen transportiert. Die Synthese dieser Ester findet in High-Density Lipoproteinen (HDL) mit Hilfe von Lecithin-Cholesterin-Acyltransferasen (LCAT) statt. Durch den reversen Cholesterintransport transportieren HDLs überschüssiges Cholesterin von den Zellen zur Leber, wo dieses durch die HSL abgebaut wird. [22]

Ein erhöhter Cholesterinspiegel ist ein erheblicher Risikofaktor für Arteriosklerose und damit verbundenen Herz-Kreislaufkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall.

Leber

Viele Neutrallipide wie Retinylester und Cholesterylester werden hauptsächlich in der Leber metabolisiert.

Die Leber besteht Großteils aus Hepatozyten, welche in Strängen angeordnet sind. Zwischen ihnen liegen erweiterte Kapillare der Leber, in denen sich Kupferzellen (spezielle Makrophagen) befinden. Den Spaltraum zwischen Hepatozyten und Endothelzellen der Kapillaren, dort wo der Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten stattfindet, nennt man Disse-Raum. In ihm befinden sich hepatische Stellat-Zellen, welche als Fett- und als Vitamin A Speicher dienen. [35]

Die Leber erfüllt viele wichtige Funktionen im Körper, wie Lipidmetabolisierung in Form von Lipoproteinen und Glycogen und Speicherung von Vitaminen, wie zum Beispiel Retinol in den hepatischen Stellat-Zellen. Sie synthetisiert viele Proteine wie Albumin und Globulin. Weiters ist sie für den Abbau und die Entgiftung von vielen Substanzen zuständig, wie die Entsorgung von alten, beschädigten Erythrozyten durch Kupferzellen.

Viele Carboxylesterasen befinden sich in der Leber, wo sie bei der Metabolisierung verschiedenster Substanzen beteiligt sind. Die meisten sind dabei im Endoplasmatischen Retikulum oder dem Zytosol der Hepatozyten lokalisiert. [9,30,32]

Durch ihre Lokalisation und Aktivität sind Carboxylesterasen im Metabolismus von Neutrallipiden impliziert.

Carboxylesterasen

Carboxylesterasen sind Enzyme, welche Carboxylester mit Hilfe von Wasser in einen Alkohol und ein Carboxylat spalten. [25] Die meisten Vertreter dieser Gruppe sind Serin Hydrolasen und haben eine alpha/beta-Hydrolase-Faltung. [24,40]

Diese Hydrolasen haben ein Serin im aktiven Zentrum, welches das Substrat nukleophil angreifen kann. [41] Es ist Teil einer katalytischen Triade, bestehend aus dem nukleophilen Serin selbst, einer sauren Aminosäure wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure, sowie Histidin. [42] In Abbildung 5 ist der Aufbau der katalytischen Triade sowie der nukleophile Angriff des aktivierten Serins auf die Esterbindung dargestellt. Das aktive Zentrum selbst befindet sich inmitten einer alpha/beta-Hydrolase-Faltung, bestehend aus acht beta-Faltblättern, verbunden durch alpha-Helices. [43]

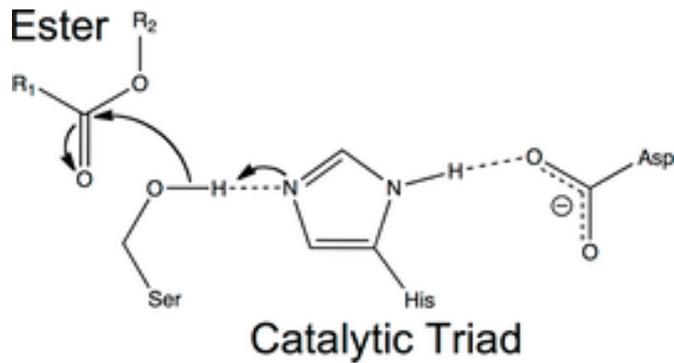


Abbildung 5: Mechanismus der Esterspaltung und Aufbau der katalytischen Triade. [44] Durch Asparagin und Histidin aktiviertes Serin greift Esterbindung nukleophil an. Ser: Serin, His: Histidin, Asp: Asparaginsäure, R1: Säurerest einer Esterverbindung zB.: Kohlenstoffkette einer freien Fettsäure, R2: Alkoholrest einer Esterverbindung zB.: Retinol oder Glycerol

Viele Carboxylesterasen sind am Abbau von Toxinen und Giften mit Ester- oder Amidbindungen (wie Kokain und Heroin) beteiligt, wobei die entstehenden Carboxylate anschließend ausgeschieden werden. Sie hydrolysieren ebenfalls Esterbindungen mit langen Fettsäuren und Thioester.

Carboxylesterasen sind in der Natur weit verbreitet. In Säugetieren findet man sie hauptsächlich in Leberzellen. [23] Im Menschen findet man in der Leber mehrheitlich zwei Isoformen (Humane Carboxylase 1 (hCes1) und Humane Carboxylase 2 (hCes2)), in menschlichen Hirnextrakten wurden hingegen vier verschiedene Formen gefunden. Auch in Plazenten und intestinalen Biopsien wurde Carboxylesteraseaktivität gemessen. [32]

Im Menschen gehören 14 verschiedene Isoformen zur Familie der humanen Carboxylesterasen. Tabelle 1 listet die Isoformen und die dafür codierenden Gene auf.

Tabelle 1: Auflistung von humanen CES codierenden Transkripten.

	Gen Name	Synonyme	Transkriptions Variante	Vorgeschlagener Name	NCBI RefSeq. Nucleotid	mRNA Länge
1	CES1	ACAT, CE-1, CEH, CES2, hCE-1, HMSE, HMSE1, PCE-1, REH, SES1, TGH	CES1 isoform 1	CES1A1	NM_001025195	2,027
2			CES1 isoform 2	CES1A2	NM_001025194	2,024
3			CES1 isoform 3	CES1A3	NM_001266	2,021
4	CES2	CE-2, iCE, PCE-2	CES2 isoform 1	CES2A1	NM_003869	4,177
5			CES2 isoform 2	CES2A2	NM_198061	3,907
6	CES3	ES31, CES6, CES8	CES3 isoform 1	CES3A1	NM_024922	3,912
7			CES3 isoform 2	CES3A2	NM_001185177	3,903
8			CES3 isoform 3	CES3A3	NM_001185176	3,196
9	CES4A	CES6, CES8, CAUXIN, CES5, CES7, HEL126	CES4A isoform 1	CES4A1	NM_173815	2,296
10			CES4A isoform 3	CES4A3	NM_001190201	2,171
11			CES4A isoform 4	CES4A4	NM_001190202	1,981
12	CES5A	CAUXIN, CES5, CES7, HEL126	CES5A isoform 1	CES5A1	NM_001143685	2,285
13			CES5A isoform 2	CES5A2	NM_145024	2,135
14			CES5A isoform 3	CES5A3	NM_001190158	2,258

Humane Carboxylesterasen 1, 2 und 3

Humane Carboxylesterase 1 (hCes1), auch bekannt als Carboxylesterase 1 (CES1) oder Serinesterase 1 (SES1) [26], findet man in allen Geweben, mit erhöhter Expression in der Leber. [27] Sie besteht aus 567 Aminosäuren und ist ca. 62,5 kDa groß. [28] Sie ist an Entgiftungsprozessen in der Leber [28] wie zum Beispiel Abbau verschiedener Drogen beteiligt. [30]

hCes1 wird, wegen seiner Rolle bei der Aktivierung und Deaktivierung verschiedener Medikamente und seiner Fähigkeit Kokain, Heroin und andere Drogen zu metabolisieren, eine therapeutische Rolle zugeschrieben. [30] Inhibiert man hCes1, durch vor allem

Organophosphatvergiftung, verringert sich die Tumorbekämpfungsaktivität von Monozyten. [29] hCes1 spielt eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse und Aktivierung des anti-influenza Wirkstoffs Oseltamivir, besser bekannt als Tamiflu. [31]

Die humane Carboxylesterase 2 (hCes2) ist ebenfalls in der Leber exprimiert, aber vor allem im Gastrointestinaltrakt. Ebenso wie hCes1 ist hCes2 an der Aktivierung und Deaktivierung von Medikamenten und dem Abbau von Giften beteiligt, hat jedoch ein anderes Substratspektrum. [33]

Die humane Carboxylesterase 3 (hCes3) lässt sich ebenfalls in der Leber nachweisen, aber auch im Darm und im Hirn. [34] Es ist für hCes3 bis jetzt keine Aktivität gegen Neutrallipide bekannt.

Murine Carboxylesterasen

Tandemduplikationen haben bei Ratten und Mäusen mehr Gene zur Genfamilie hinzugefügt, weswegen es mehrere Homologe pro humaner Carboxylesterase im Mäusegenom gibt. Die murinen Carboxylesterasen sind wie alle Carboxylesterasen in den Abbau und die Metabolisierung von Medikamenten, Giften und anderen Substanzen wie endogene Neutrallipidester involviert. [34] Dies ist für humane Carboxylesterasen nicht beschrieben.

Esterase 22 (Es22), auch bekannt als Ces1e oder Egasyn, hat 562 Aminosäuren und ist ca. 61,6 kDa groß. Sie ist hauptsächlich in der Leber exprimiert und dort nur in den Hepatozyten. Es kann β -Glucuronidase binden und hydrolysiert Retinoide. [8]

Ces2e, früher Ces5, ist in der Leber und im Interstinum exprimiert und besteht aus 560 Aminosäuren. [34]

Ziel der Arbeit

Humane Carboxylesterasen hydrolysieren ein großes Spektrum an Substraten. Ihnen wird vor allem eine Rolle in der Metabolisierung von Medikamenten und Giften zugesprochen. [34] In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche der humanen Carboxylesterasen (1-3) endogene Lipide, vor allem Glycerollipide, hydrolysieren. Weiters soll das pH-Optimum bestimmt werden. Außerdem sollen die Aktivitäten der humanen Carboxylesterasen mit jenen ihrer murinen Homologen verglichen werden. Dies wird zunächst in einem „Screening-Assay“ untersucht. Zusätzlich soll in spezifischen Aktivitätsassays Aktivitäten für Neutrallipide untersucht werden.

Material

Es wurden folgende Materialien verwendet:

Chemikalien, Lösungen, Medien, Enzyme und Puffer

Es wurden folgende Chemikalien, Lösungen, Medien, Enzyme und Puffer verwendet:

ddH ₂ O :	Fresenius Kabi (Graz, Österreich)
10% SDS Elektrophorese Trenngel:	12.3 ml ddH ₂ O, 7.5 ml 4x „lower buffer“, 9.9 ml 30 % Acrylamid, 300 µl 10% SDS, 27 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 81 µl 10% APS
SDS Elektrophorese Sammelgel:	5.9 ml ddH ₂ O, 2.5 ml 4x „upper buffer“, 1.5 ml 30% Acrylamid, 100 µl 10% SDS, 26 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 80 µl 10% APS, 15 µl 0.5% „blue Dye“
Caps Puffer:	4.42 g Caps, 200 ml Methanol, auf 2000 ml mit ddH ₂ O
Tris-Glycin Laufpuffer:	50.4 g Tris, 241.7 g Glycin, 16.7 g SDS, auf 2000 ml mit ddH ₂ O
Pierce ECL2 Western Blot Substrat:	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
„Superfix MRP X-Ray fixing Solution“:	TETENAL Europe GmbH (Norderstedt, Deutschland)
4x SDS Probenpuffer:	4 g 100% Glycerin, 4 ml 20% SDS, 1 ml 2M Tris (pH 6,8), eine Spatelspitze Bromphenolblau, 1 ml β-Mercaptoethanol, auf 10 ml mit ddH ₂ O auffüllen.
4x „Lower Buffer“:	90,86 g Tris auf 500 ml mit ddH ₂ O auffüllen und mit 1M HCl auf pH 8,8 einstellen

4x „Upper Buffer“:	30,29 g Tris auf 500 ml mit ddH ₂ O auffüllen und mit 1M HCl auf pH 6,8 einstellen
Ampicillin-Agarplatten:	10 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl, 15 g Agar, 1 ml 100 µg/µl Ampicillin, auf 1 L mit ddH ₂ O aufgefüllt
SOC Medium:	20 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 0.5 g NaCl, 2.5 ml 1 M KCl, 20 ml 1 M Glucose, auf 1 L mit H ₂ O aufgefüllt
Ampicillin LB-Flüssigmedium:	10 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl, 1 ml 100 µg/µl Ampicillin, auf 1 L mit H ₂ O aufgefüllt
Ultima Gold High Flash-point LSC-Cocktail:	Perkin Elmer (Waltham Massachusetts, USA)

Zellen

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

COS7:	American Tissue Culture Collection (Manassas, Virginia, USA)
HEK293:	American Tissue Culture Collection (Manassas, Virginia, USA)
AML12:	American Tissue Culture Collection (Manassas, Virginia, USA)
<i>E.coli</i> DH5α XL-1:	New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)

Plasmide

Folgende Vektoren (Plasmide) wurden verwendet:

HisMax C:	Life Technologies Ltd (Paisley, Großbritannien)
-----------	---

pCI-Neo:

Zur Verfügung gestellt von Prof. Richard Lehner, PhD. Department of Pediatrics, Group on Molecular and Cell Biology of Lipids
328 Heritage Medical Research Centre,
University of Alberta, Edmonton, Kanada

Standards

Folgende Standards wurden eingesetzt:

PrecisionPlus Protein Standards All Blue 250 kDa, Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien)

Sonstiges

1.5 ml Reaktionsgefäße:

Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)

15 ml Cellstar Tube:

Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

50 ml Cellstar Tube:

Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

5 ml Costar Stripette:

Corning Incorporated (Corning, New York, USA)

10 ml Costar Stripette:

Corning Incorporated (Corning, New York, USA)

25 ml Costar Stripette:

Corning Incorporated (Corning, New York, USA)

Ultratip Pipettenspitzen:

Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

5 ml Multipettenspitzen:

Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Roti-PVDF, Porengröße 0.45 µm Membranen:

Carl Roth GmbH+CO.KG (Karlsruhe, Deutschland)

Scintillationsvials klein:

Dr. F. Bertoni GesmbH (Wien, Österreich)

Amersham Hyperfilm ECL:	GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien)
96 Well Platten:	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Curix Ultra UV-G :	Agfa-Gevaert N.V. (Mortsel, Belgium)
Sempercare nitrile skin ² :	Semperit Technische Produkte GmbH, Segment Sempermed (Wien, Österreich)
Sempercare nitrile:	Semperit Technische Produkte GmbH, Segment Sempermed (Wien, Österreich)

Geräte

Es wurden folgende Geräte verwendet:

Waagen

ABJ 220-4M Analysenwaage:	Kern und Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland)
SBC52:	SelectScience (Corston, Bath, Großbritannien)

Elektrophorese:

Electrophoresis Power Supply – EPS 300:	GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien)
Electrophoresis Power Supply – EPS 600:	GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien)
MR3001 Magnetheizrührer:	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Kelheim, Deutschland)
TE22 Tank Transfer Unit:	GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien)
Mighty Small 2 SE250/SE260 Laufkammern:	Hoefer, Inc. (Holliston, Massachusetts, USA)

Zentrifugen:

Biofuge pico:	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Centrifuge 5415R:	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
CS-6 Centrifuge:	Danaher Corporation (Washington, D.C., USA)
Avanti J-26 XPI:	Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA)
Centrifuge 5810R:	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
GS-6 Centrifuge:	Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA)

Wasserbad + Thermostat:

JULABO MP:	JULABO GmbH (Seelbach, Deutschland)
------------	-------------------------------------

Thermoblock:

Thermomixer Comfort:	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
----------------------	-------------------------------------

Sczintillationszähler

Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer:	Packard Instrument Company, Inc. (Meriden, Connecticut, USA)
---	--

Absorptions- und DNA-Konzentrationsbestimmung:

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer:	peQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
DU640 Spectrometer:	Danaher Corporation (Washington, D.C., USA)
Biotrak II Platerader:	GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien)

Elektrotransformation:

Micro Pulser:	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
---------------	---

Sonicator

Sonicator S-4000: Misonix, Inc. (Farmingdale, New York, USA)

HPLC

Empower Pro: Waters (Milford, Massachusetts, USA)

Pipetten:

10 µl Pipetman Pipette: Gilson Inc. (Middleton, Wisconsin, USA)

20 µl Pipetman Pipette: Gilson Inc. (Middleton, Wisconsin, USA)

1000 µl Pipetman Pipette: Gilson Inc. (Middleton, Wisconsin, USA)

200 µl Pipette: VWR International GmbH (Wien, Österreich)

20 µl Pipette: VWR International GmbH (Wien, Österreich)

1000 µl Pipette: VWR International GmbH (Wien, Österreich)

200 µl Witope Digital: witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Deutschland)

Multipette Plus: Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Kits

NucleoBond Xtra Midi: Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

NEFA Kit: Wako Chemicals GmbH (Neuss, Deutschland)

„Free glycerol reagent“: Merck (Darmstadt, Deutschland)

Methoden

Plasmidpräparation (Maxiprep)

Zur Herstellung einer Plasmidpräparation wurde wie folgt vorgegangen:

Je 2 µl des zu amplifizierenden Plasmids wurde zu 50 µl *E.coli* DH5α XL-1 Zellen pipettiert. Die Zellen wurden mit dem Micro Pulser von Bio-Rad mit der Einstellung Ec2 elektroporiert und danach 900 µl SOC Medium hinzu pipettiert. Die Zellen wurden bei 37°C für eine Stunde im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen wurden danach unter sterilen Bedingungen auf vorgewärmte ampicillinhaltige LB-Agarplatten mittels Drigalskispattel ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Fünf ml ampicillinhaltiges LB-Medium wurde mit einer Kolonie der Bakterien beimpft und für 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden 2 ml dieser Kultur in einen 2 L Kolben mit 250 ml ampicillinhaltigem LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Für die Plasmidpräparation wurde anschließend das „NucleoBond Xtra Midi“ Kit verwendet.

Die Kultur wurde bei 6.000 x g bei 4°C 15 Minuten abzentrifugiert, das Pellet in 8 ml „Buffer RES“ resuspendiert und 8 ml „Buffer LYS“ hinzupipettiert. Die blau gefärbte Suspension wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert und die Säule sowie der Säulenfilter währenddessen mit 12 ml „Buffer EQU“ equilibriert. Die Suspension wurde danach mit 8 ml „Buffer NEU“ versetzt, damit entfärbt und anschließend auf die Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule und der Säulenfilter mit 5 ml „Buffer EQU“ gewaschen, der Säulenfilter verworfen und die Säule mit 8 ml „Buffer WASH“ erneut gewaschen. Die Plasmide wurden mit 5 ml „Buffer ELU“ eluiert, mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und 30 Minuten bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 15 Minuten bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl ddH₂O aufgenommen und die Konzentration mittels NanoDrop Spectrometer bestimmt. Abschließend wurden die Plasmide auf eine Konzentration von 2 µg/µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

Züchten von Zellen

Auftauen von Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen wurden kurz bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 7 ml der Zelllinie entsprechendem Medium überführt. Die Zellsuspension wurde danach 3 Minuten bei 1.200 x rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Medium resuspendiert, vollständig in eine 175 cm² Flasche überführt und 15 ml vorgewärmtes Medium hinzupipettiert. Anschließend wurden die Zellen unter Standard-Bedingungen bei 37°C, 7% CO₂ Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Splitten von Zellen

Bei einer Konfluenz von ca. 95% wurden die Zellen gesplittet. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml 1xPBS Puffer gewaschen. Dazu wurde der Puffer in die Flasche pipettiert, die Flasche langsam geschwenkt, sodass alle Zellen benetzt wurden und der Puffer anschließend wieder abgesaugt. Danach wurden die Zellen 3 Minuten in 3 ml 0,05% Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Durch Klopfen wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und in 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt und bei 1.200 x rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und ein Teil davon (je nach Splitverhältnis: 2,5 ml für 1:4, 2 ml für 1:5 und 1,6 ml für 1:6) in eine mit 15 ml Medium gefüllte 175 cm² Flasche überführt. Der Rest wurde verworfen. Die Flasche mit den Zellen wurde unter Standard-Bedingungen inkubiert.

Aussäen von Zellen

Einhundert µl der Zellsuspension werden in 9,9 ml CASY-ton Lösung verdünnt und anschließend mit dem CASY Zellzählsystem gezählt und das Splitverhältnis errechnet.

Die AML12 Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Dafür wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt und auf eine Zählkammer aufgetragen. Die Zellen innerhalb des Rasters wurden unter einem Mikroskop gezählt und mit $2 \cdot 10^4$ multipliziert um die Zellzahl/ml zu ermitteln.

In 10 cm Petrischalen wurde 5 ml Medium vorgelegt und 1.000.000 Zellen ausgesät bzw. in 6-Well Platten wurde pro Well je 2 ml Medium vorgelegt und 150.000 Zellen ausgesät. Hierfür wurde mit der zuvor bestimmten Zellzahl/ml das Volumen an Zellsuspension bestimmt, welche die entsprechende Menge Zellen beinhaltet. Dieses Volumen wurde

anschließend in das bereits vorgelegt Medium pipettiert. Die ausgesäten Zellen wurden unter Standard-Bedingungen inkubiert.

Transfektieren von Zellen

Pro 10 cm Petrischale wurden 600 µl Minimalmedium (-/- = ohne fetales Rinderserum und ohne Penicillin/Streptomycin) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 6 µg Plasmid und 30 µl Metafectene gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Vollmedium auf den zu infizierenden Zellen mit 3 ml Minimalmedium ersetzt. Nach der Inkubation wurde die Transfektionsmischung im Minimalmedium auf die Zellen pipettiert und 4 Stunden unter Standard-Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Minimalmedium entfernt und durch 5 ml Vollmedium ersetzt.

Pro Well einer 6-Well Platte wurde 300 µl Minimalmedium (-/-) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 µg Plasmid und 5 µl Metafectene gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Vollmedium auf den zu infizierenden Zellen durch 400 µl Minimalmedium ersetzt. Nach der Inkubation wurde die Transfektionsmischung in das Minimalmedium auf den Zellen pipettiert und 4 Stunden unter Standard-Bedingungen inkubiert. Danach wurde das Minimalmedium entfernt und durch 2 ml Vollmedium ersetzt.

Anschließend wurden die Zellen über Nacht (bei HEK293 Zellen wegen ihres schnellen Wachstums) beziehungsweise zwei Tage (bei allen anderen Zelllinien) unter Standard-Bedingungen kultiviert und dann die Zellen geerntet.

Ernten von Zellen

Zwei Tage (bei HEK293 Zellen bereits nach einem Tag) nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet.

Für das Herstellen von Lysaten für Aktivitätsbestimmungen wurden Zellen von zwei 10 cm Petrischalen vereint. Hierfür wurden die Zellen zuerst mit 3 ml 1xPBS Puffer gewaschen. Danach wurden 2 ml 1xPBS Puffer auf die Zellen pipettiert und diese mit einem Zellschaber vom Boden der Schale gelöst. Die Zellen wurden anschließend in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt und bei 1.200 x rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 400 µl HSL-Puffer resuspendiert.

Zellen aus 6-Well Platten wurden zur Überprüfung der Expression mittels Westernblot direkt in 1xSDS Puffer aufgenommen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 ml 1xPBS Puffer pro Well gewaschen. Danach wurden 200 µl 1xSDS Puffer pro Well pipettiert. Durch Schaben mit einer Pipettenspitze wurden die Zellen gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Zellaufschluss, Proteinbestimmung und Westernblot

Zellaufschluss

Die Zellsuspension (in HSL-Puffer) wurde durch Beschallen für 2 mal 8 Sekunden bei Amplitude 2 aufgeschlossen und anschließend für 5 Minuten bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Mit 1xSDS Puffer geerntete Zellen wurden bereits durch den Puffer aufgeschlossen und mussten für das Auftragen auf ein SDS Gel nur noch erhitzt werden.

Proteinbestimmung mit „Bio-Rad Protein Assay“

Zehn µl der aufgeschlossenen Zelllysate wurden mit 190 µl beziehungsweise mit 390 µl HSL-Puffer verdünnt. Es wurde eine Standardreihe mit einer BSA Konzentration von 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml und 0 µg/ml in HSL Puffer hergestellt. Das Bio-Rad Farbstoff-Konzentrat wurde 1+4 mit ddH₂O verdünnt. Zwanzig µl der Proben wurden mit 200 µl Farbstoffreagenz in einem Well einer 96-Well Mikrotiterplatte gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 620 nm mittels Plattenphotometer vermessen und die Konzentration der Proben durch die Absorptionen der Standardreihe berechnet. Danach wurden die Lysate mit HSL-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml gebracht.

Westernblot zur Analyse der Proteinexpression

Fünf µl der Lysate wurden mit 5 µl 4xSDS Puffer und 15 µl ddH₂O gemischt und für 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Die mit 1xSDS Puffer geernteten Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

Anschließend wurden je 20 µl pro Probe auf ein 10%iges SDS Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Standard dienten 5 µl „Precision Plus Protein Standard“. Das Gel wurde für 75 Minuten bei 20 mA pro Gel in einer Elektrophoresekammer entwickelt. Danach wurden die aufgetrennten Proteine für eine Stunde bei 200 mA auf eine PVDF Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 20 ml 10% Milchpulver in 1x TST oder in 2.5% Casein in 1xTST (wenn primärer Antikörper in Milchpulver gelöst war dann Milchpulver, wenn primärer Antikörper in Casein gelöst war dann Casein) auf einer Schüttelplattform inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit 20 ml primärem Antikörper (siehe Tabelle 2) für 1 Stunde auf einer Schüttelplattform inkubiert. Danach wurden die Primärantikörperlösungen entfernt und für weitere Verwendungen bei -20°C gelagert. Die Membran wurde 3-mal für je 10 Minuten mit jeweils 20 ml 1xTST gewaschen.

Dazu wurde die Membran in je 20 ml 1xTST Lösung für 10 Minuten auf der Schüttelplattform inkubiert und die TST Lösung anschließend verworfen.

Die sekundären Antikörperlösungen (siehe Tabelle 2) wurden frisch hergestellt. Nach 3 Waschschritten wurde die Membran mit 10 ml Sekundärantikörperlösung versetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplattform inkubiert. Danach wurde die Membran wieder 3-Mal für je 10 Minuten mit jeweils 20 ml 1xTST gewaschen. Die Sekundärantikörperlösungen wurden verworfen. Die Membran wurde danach mit „Pierce ECL2 Western Blotting Substrate“ benetzt und die Signale in einer Dunkelkammer durch Auflegen eines Röntgenfilms für 2 Sekunden bis 30 Minuten detektiert. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt und mittels „Superfix MRP X-Ray fixing solution“ fixiert.

Gegebenenfalls wurde die Membran in 20 ml „Stripping Puffer“ mit 140 µl β-Mercaptoethanol für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde diese 3-Mal für 10 Minuten in 1xTST gewaschen. Danach wurde diese über Nacht in 10%iger Milchpulverlösung in 1xTST oder in 2.5% Caseinlösung in 1xTST bei 4°C auf einer Schüttelplattform inkubiert, um freie Membranstellen zu „blockieren“. Am nächsten Tag wurde diese mit entsprechenden primären und sekundären Antikörpern inkubiert.

Tabelle 2: Auflistung von primären und dazugehörigen sekundären Antikörpern abhängig vom verwendeten „Label“ des Fusionsproteins

„Label“	Primärer Antikörper	Verdünnung des primären AKs	Sekundärer Antikörper	Verdünnung des sekundären Antikörpers
n-term His	Anti-n-term His	1:5.000	Anti - Mouse	1:10.000
GFP	Anti – GFP	1:5.000	Anti - Goat	1:10.000
Es22	Anti – Es22	1:5.000	Anti - Rabbit	1:10.000

Aktivitätsbestimmungen

Screening Assay

Als Substrate wurden folgende Verbindungen verwendet:

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol) (ammonium salt) , 1',3'-bis[1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho]-sn-glycerol (sodium salt), sn-[2,3-dioleoyl]-glycerol-1-phospho-sn-1'-[2',3'-dioleoyl]-glycerol (ammonium salt), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-

arachidonoyl (ammonium salt), 1-(1Z-octadecenyl)-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine, 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt), 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt), L- α -lysophosphatidylinositol (Liver, Bovine) (sodium salt), sn-(3-oleoyl-2-hydroxy)-glycerol-1-phospho-sn-1'-(3'-oleoyl-2'-hydroxy)-glycerol (ammonium salt) , sn-(3-oleoyl-2-hydroxy)-glycerol-1-phospho-sn-1'-(3'-oleoyl-2'-hydroxy)-glycerol (ammonium salt), Methyl-palmitate, Ethyl-palmitate, 2-propyl palmitate, 1-Butyl palmitate, 1-(9Z-octadecenoyl)-rac-glycerol, 1-2-dioleoyl-sn-glycerol, 1,2,3-(9Z-octadecenoyl)-glycerol, Glyceryl trioctanoate, retinyl palmitate, cholest-5-en-3 β -yl octadecanoate, Arachidyl laurate, 1,2-diacyl-3-O- β -D-galactosyl-sn-glycerol, 1-O-hexadecyl-2-O-methyl-sn-glycerol (PMG), 1-oleoyl-N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosine

Je 10 μ g Protein der Zellysate wurden pro Reaktionskuppe einer 96 Well Platte pipettiert und 15 μ l Assaypuffer (bestehend aus 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 5 mM Chaps, und 2,5 BSA, bezogen auf Endkonzentration), 5 μ l 500 mM BTP Puffer pH 8 und 15 μ l ddH₂O hinzu pipettiert. Danach wurden 10 μ l des Substrates hinzu pipettiert und für anschließend 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Menge an freien Fettsäuren wurde mittels NEFA Kit bestimmt. Dies erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Retinylesterhydrolase-Assay (REHA)

Als Substrat wurde 300 μ M Retinylpalmitat, emulgiert in 300 μ M PC, verwendet. Das entsprechende Volumen der Retinylpalmitat-Lösung wurde zusammen mit dem entsprechenden Volumen der PC-Lösung unter einem Stickstoffstrom eingedampft und in einem entsprechenden Volumen 100 mM Tris/Maleat Puffer pH 8 (mit und ohne 30 mM Chaps) aufgenommen. Diese Substratmischung wurde 2 mal 15 Sekunden mit Amplitude 2 mit dem Sonicator S-4000 beschallt. Danach wurden 2% BSA hinzugefügt.

Achzig μ g Protein wurde in Form von Lysaten in 2 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt, mit ddH₂O auf 100 μ l verdünnt und anschließend 100 μ l Substratmischung hinzu pipettiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 1 ml n-Hexan gestoppt. Unmittelbar danach wurde als interner Standard 100 pM Retinylacetat in Methanol hinzu pipettiert. Achthundert μ l der organischen Phase wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und im Stickstoffstrom eingedampft. Die verbliebenen Lipide wurden in einer 3:1 Mischung von Methanol und Chloroform resuspendiert und mittels HPLC analysiert. Durch

den internen Standard konnte das freigesetzte Retinol pro Stunde und mg Protein berechnet werden.

Monoglyzeridhydrolase-Assay

Als Substrat wurde 1 mM 1(3)- rac-OG verwendet. Das entsprechende Volumen in Toluol gelöstes Substrat wurde unter Stickstoffstrom eingedampft und in einem entsprechenden Volumen Puffer, welcher entweder 30 mM CHAPS, 5 mM Cholat oder 1 mM BSA enthielt, gelöst. Als Puffer wurde Tris/Malat pH 8 verwendet. Diese Substratmischung wurde 2-Mal 15 Sekunden mit Amplitude 2 mit dem Sonicator S-4000 beschallt. Danach wurde BSA dem Substrat hinzugefügt.

Zwanzig µg Zelllysateprotein wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt und 100 µl Substratmischung hinzu pipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl CHCl₃ gestoppt. Nach 2 minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g wurde 50 µl der wässrigen Phase mit 200 µl „Glycerol Reagent“ in einem Well einer 96-Well Mikrotiterplatte gemischt. Es wurde eine Standardreihe mit einer Glycerolkonzentration von 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 63 µg/ml, 31 µg/ml und 0 µg/ml in ddH₂O hergestellt und davon jeweils 50 µl jeder Verdünnung mit 200 µl „Glycerol Reagent“ in ein Well pipettiert. Es wurde anschließend für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm im Plattenphotometer vermessen und die freigesetzte Glycerolmenge pro Stunde und eingesetzter Lysatmenge berechnet.

Triglyzeridhydrolase-Assay

Als Substrat wurde 0,3 mM Triolein als Substrat verwendet. Das entsprechende Volumen Triolein wurde mit 0,5 µCi ³H radioaktiv-markiertem Triolein und PC/PI (3:1) unter Stickstoffstrom eingedampft. Anschließend wurde das Substrat mit entsprechendem Volumen 100 mM Tris pH 8 resuspendiert und beschallt. (siehe Schweiger et al. 2014 [8])

Achzig µg Zelllysateprotein wurde in Assayröhrchen vorgelegt und mit HSL Puffer auf 100 µl eingestellt. Zu diesen 100 µl wurde 100 µl Substrat pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde danach mit 3,25 ml MeOH/CHCl₃/nHeptan (10/9/7) gestoppt und 1 ml 0,1 M K₂CO₃ pH 10,5 (mit Borsäure) hinzu pipettiert. Nach 2-Mal 5 Sekunden vortexen wurden die Proben 10 Minuten bei 2500 x rpm zentrifugiert.

Zwei ml Scintillationscocktail wurden in Scintillationsvials vorgelegt und 200 µl aus der wässrigen Phase der Proben hinzu pipettiert. Zehn µl der Substrate wurden ebenfalls in Scintillationsvials pipettiert. Danach wurde die radioaktive Strahlung mittels Scintillationszählung gemessen und daraus die freigesetzten Fettsäuren pro Stunde und eingesetzter Menge Protein mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{(cpm\ Probe - cpm\ Blank) \times (V1/V2)}{(cpm\ Substrat / nmol\ FA) \times mg\ Protein \times 0,715 \times t} = nmol\ FA/mg\ Protein/h$$

- Cpm = „counts per minute“, gemessene Strahlung
- V1/V2 = Gesamtvolumen der wässrigen Phase / Volumen das vermessen wurde (2,45 / 0,2 = 12,25)
- nmol FA = 90 nmol/100µl bei 0,3 mM Triolein
- mg Protein = eingesetzte Menge an Protein in mg
- t = Inkubationszeit
- 0,715 = Extraktionskoeffizient

Cholesterylesterhydrolase-Assay

Als Substrat wurde 0,45 mM Cholesteryloleat (davon 10 µCi ¹⁴C markiertes Cholesteryloleat) verwendet. Das Substrat wurde mit PC/PI (3:1) gemischt und anschließend im Stickstoffstrom eingedampft. Nach Resuspension in 100 mM Tris-HCl pH 8 Puffer wurde das Substrat für 10 Sekunden bei Amp 2 beschallt und danach 2% fettsäurefreies BSA hinzu pipettiert. Danach wurde das Substrat aufgeteilt und zu einer Hälfte H₂O und der anderen 30 mM CHAPS hinzu pipettiert.

Achzig µg Zelllysateprotein wurde in Assayröhrchen vorgelegt und mit HSL-Puffer auf 100 µl eingestellt. Zu diesen 100 µl wurde 100 µl Substratmischung pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde danach mit 3,25 ml MeOH/CHCl₃/n-Heptan (10/9/7) gestoppt und 1 ml 0,1 M K₂CO₃ pH 10,5 (mit Borsäure) zugegeben. Nach 2-Mal 5 Sekunden vortexen wurden die Proben 10 Minuten bei 2500 x rpm zentrifugiert.

Zwei ml Scintillationscocktail wurde in Scintillationsvials vorgelegt und 200 µl aus der wässrigen Phase der Proben hinzu pipettiert. Zehn µl der Substrate wurden ebenfalls in Scintillationsvials pipettiert. Danach wurde die radioaktive Strahlung mittels Scintillationszählung gemessen und die freigesetzten Fettsäuren pro Stunde und eingesetzter Menge Enzym mit Hilfe derselben Formel wie beim Triglyzeridhydrolaseassay berechnet. Statt 90 nmol FA/100 µl Substrat wurde jedoch 45 nmol FA/100 µl Substrat eingesetzt.

p-Nitrophenylacetat-Assay

Als Substrat wurde 3 mM p-Nitrophenylacetat verwendet. Das entsprechende Volumen wurde in Puffer mit gewünschtem pH Wert aufgenommen.

Zehn µg Protein wurde als Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt und 100 µl Substratmischung hinzupipettiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 650 µl einer Lösung bestehend aus Chloroform, Methanol und n-Heptan (9:10:7) gestoppt. Nach 5 Sekunden vortexen wurde für 5 Minuten bei 14.000 x rpm zentrifugiert und 200 µl des Überstandes in einer Mikrotiterplatte bei 405 nm im Plattenphotometer vermessen. Die Konzentration wurde mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet, wobei als Extinktionskoeffizient $E_{405} = 12.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und als Schichtdicke 6 mm angenommen wurde.

Statistische Methoden

Daten sind als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Statistische Unterschiede wurden mittels Student *t*-Test ermittelt. Folgende Signifikanzniveaus wurden verwendet:

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Ergebnisse

Expression der humanen Carboxylesterasen 1, 2 und 3

Um die enzymatischen Aktivitäten verschiedener Proteine untersuchen zu können, wurden diese zunächst in Säugerzellen exprimiert. Die Proteine Es22, hCes1 (Isoform 3), HSL, LacZ und Ces2e waren in den HisMaxC Vektor kloniert. Die Proteine hCes2 (Isoform 1), hCes3 (Isoform 2) und Ces2g waren mit einem Flag Tag versehen und in den pCI-Neo Vektor kloniert.

Um eine Expression der gewünschten Proteine zu erreichen, wurden HEK293 bzw. Cos7 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfektiert und die Expression anschließend mit Hilfe von Westernblots überprüft. Abbildung 6 zeigt einen repräsentativen Westernblot für die Expression der Proteine LacZ, HSL hCes1 und Es22. Abbildung 7 zeigt hingegen einen repräsentativen Westernblot für die Expression der Proteine Ces5 (Ces2e), hCes2, hCes3 und Ces2g. Man erkennt in beiden Abbildungen, dass die Banden für die Proteine auf entsprechender Höhe (LacZ: 123 kDa, HSL: 90 kDa, hCes1: 67 kDa, Es22 67 kDa) zu sehen waren und dass die Expression vergleichbar stark war. Letzteres ist wichtig für den späteren Vergleich von Aktivitäten in den Lysaten.

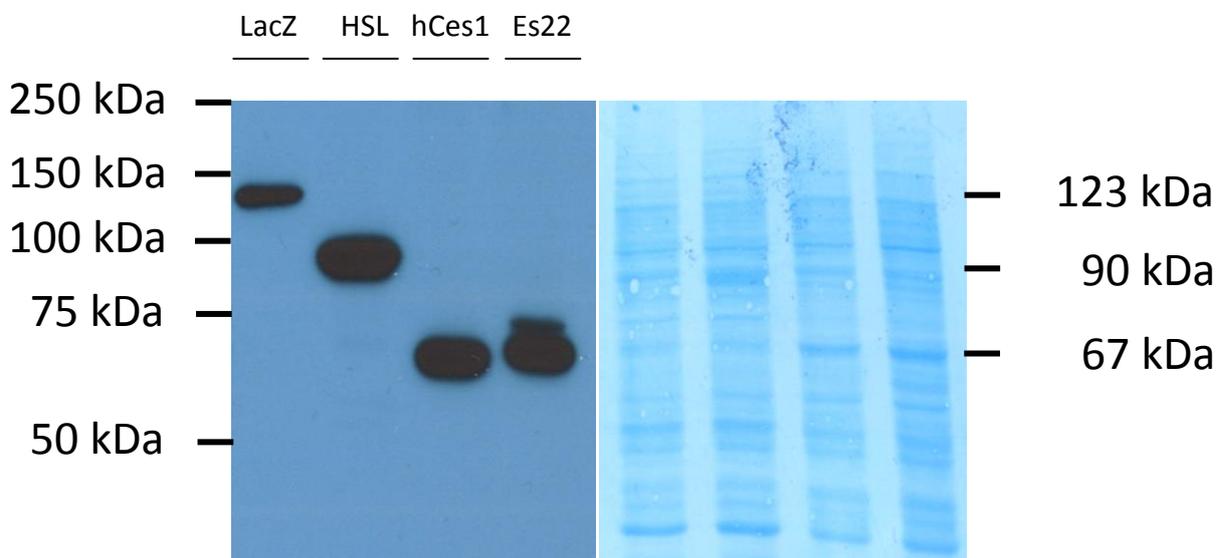


Abbildung 6: Westernblot zur Überprüfung der Expression von LacZ, HSL, hCes1 und Es22 (Ces1e). COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10 µg jeder Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Westernblot, unter Verwendung von Anti-His-Antikörper als primärer Antikörper und HRP markierten Anti-Maus-Antikörper als sekundären Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle wurde eine Coomassie Färbung durchgeführt. Als Proteinstandard wurde der „Precision Plus Protein Standard“ verwendet. Molekulargewichte der Proteine: LacZ: 123 kDa, HSL: 90 kDa, hCes1: 67 kDa, Es22 67 kDa.

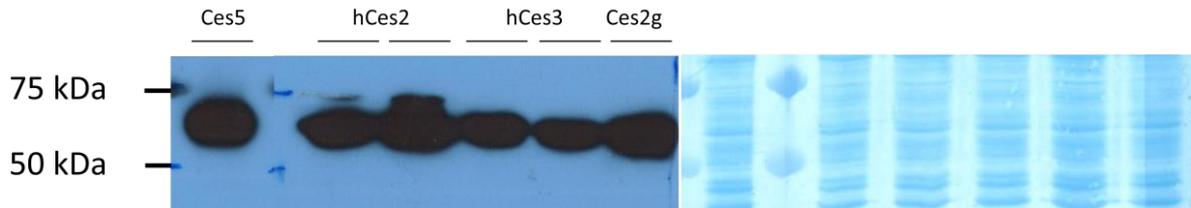


Abbildung 7: Westernblot zur Überprüfung der Proteinexpression von Ces5, hCes2, hCes3 und Ces2g.

COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10 µg jeder Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Westernblot, unter Verwendung von HRP markiertem Anti-Flag-Antikörper (bei hCes2, hCes3 und Ces2g), analysiert. Bei Ces5 (Ces2e) wurde Anti-His- Antikörper als primärer Antikörper und HRP markierter Anti-Maus-Antikörper als sekundären Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle wurde eine Coomassie Färbung durchgeführt. Als Proteinstandard wurde der „Precision Plus Protein Standard“ verwendet. Molekulargewichte der Proteine: Ces5: 67 kDa, hCes2: 67 kDa, hCes3: 67 kDa, Ces2g 67 kDa

Aktivitätsassay zum „Screening“ unterschiedlicher Substrate

Zunächst wurden die Aktivitäten der verschiedenen Enzyme mit einem „Screening Assay“ analysiert, um einen Überblick über die Aktivitäten der einzelnen Proteine zu erhalten. Als Substrate wurden 34 verschiedene natürliche Esterverbindungen verwendet (siehe Methoden). Dafür wurden die Lysate mit einem Assaypuffer (pH 8) und verschiedenen Substraten gemischt und auf einer 96 Well Platte bei 37°C inkubiert. Die freigesetzten Fettsäuren wurden mit Hilfe eines NEFA Kits bestimmt. Abbildung 8 zeigt die hydrolytischen Aktivitäten der Lysate, die LacZ (Negativkontrolle), hCes2, hCes3, Ces2g und Ces5 (Ces2e) enthielten. Abbildung 9 zeigt die hydrolytischen Aktivitäten der Lysate, die LacZ (Negativkontrolle), hCes1 und Es22 (Ces1e) enthielten.

Im Vergleich zur Kontrolle LacZ zeigten hCes2, Ces2g und Ces 5 erhöhte Hydrolyseaktivitäten für das Substrat PC-8 (1,2-octanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). hCes 2 und Es22 zeigten Aktivitäten für das Substrat MO (1-(9Z-octadecenoyl)-rac-glycerol).

Ces2g zeigte eine Aktivität für LPI (L- α -lysophosphatidylinositol), hCes3 zeigte eine Aktivität für RE (Retinylpalmitat) und Ces 5 eine Aktivität für O-Ac-Cer (1-oleoyl-N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosine)

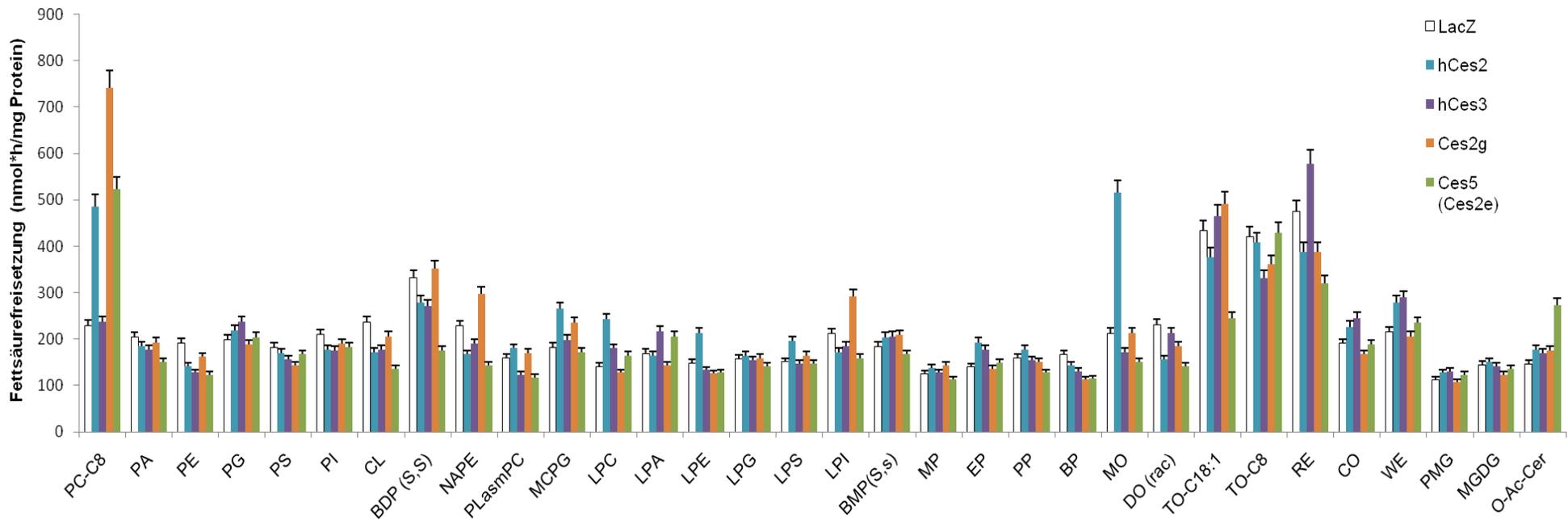


Abbildung 8: Ergebnisse der Screening Assays von hCes2, hCes3, Ces2g und Ces5 (Ces2e). COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Zellysate (40 µg Protein) wurden im Assaypuffer mit dem Substrat für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend die freien Fettsäuren mittels NEFA Kit bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte + Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. Es wurden folgende Substrate verwendet: PC-C8: 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PA: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt), PE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, PG: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), PS: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt), PI: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol) (ammonium salt), CL: 1',3'-bis[1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho]-sn-glycerol (sodium salt), BDP: sn-[2,3-dioleoyl]-glycerol-1-phospho-sn-1'-[2',3'-dioleoyl]-glycerol (ammonium salt), NAPE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-arachidonoyl (ammonium salt), PLasmPC: 1-(1Z-octadecenyl)-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, MCPG: 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), MCPC: 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, LPC: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine, LPA: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt), LPE: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, LPG: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), LPS: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt), LPI: L- α -lysophosphatidylinositol (Liver, Bovine) (sodium salt), BMP(s,s): sn-(3-oleoyl-2-hydroxy)-glycerol-1-phospho-sn-1'-(3'-oleoyl-2'-hydroxy)-glycerol (ammonium salt), BMP(r,r): sn-(3-oleoyl-2-hydroxy)-glycerol-1-phospho-sn-1'-(3'-oleoyl-2'-hydroxy)-glycerol (ammonium salt), MP: Methyl-palmitate, EP: Ethyl-palmitate, PP: 2-propyl palmitate, BP: 1-Butyl palmitate, MO: 1-(9Z-octadecenoyl)-rac-glycerol, DO (rac): 1-2-dioleoyl-sn-glycerol, TO-C18:1: 1,2,3-(9Z-octadecenoyl)-glycerol, TO-C8: Glyceryl trioctanoate, RE: retinyl palmitate, CO: cholest-5-en-3 β -yl octadecanoate, WE: Arachidyl laurate, MGDG: 1,2-diacyl-3-O- β -D-galactosyl-sn-glycerol, PMG: 1-O-hexadecyl-2-O-methyl-sn-glycerol (PMG), O-Ac-Cer: 1-oleoyl-N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosine

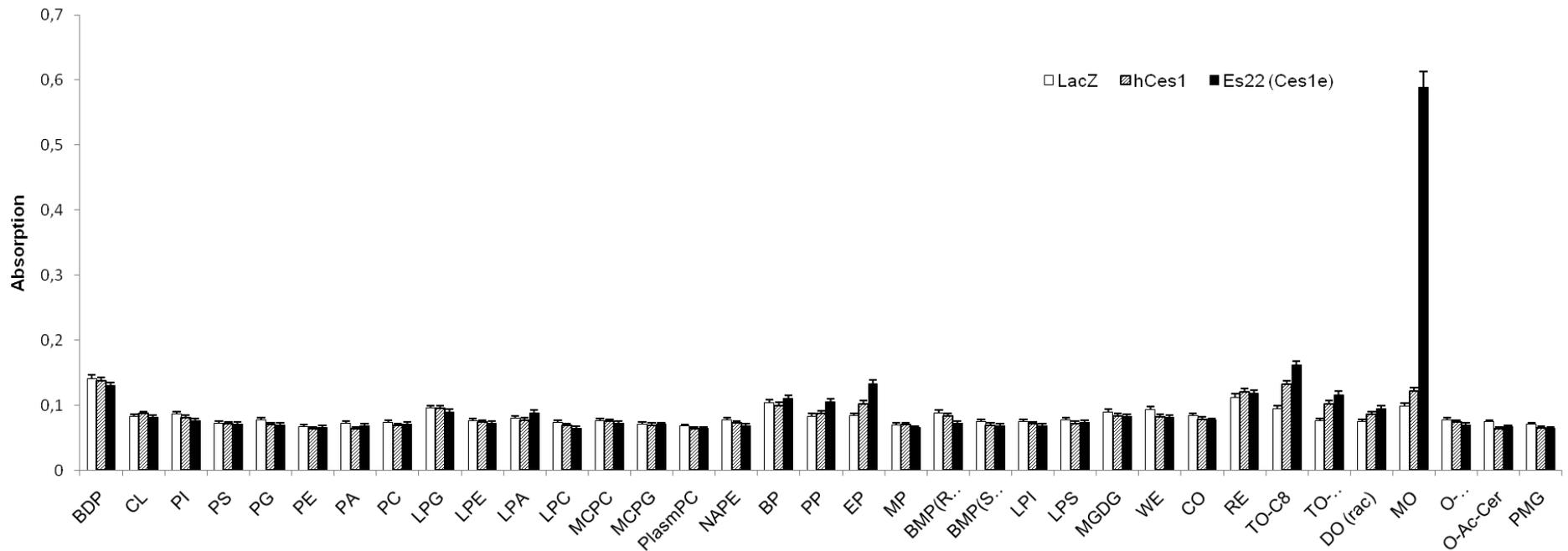


Abbildung 9: Ergebnisse der Screening Assays von hCes1 und Es22 (Ces1e). COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfiziert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Zelllysate (40 µg Protein) wurden im Assaypuffer mit dem Substrat für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend die freien Fettsäuren mittels NEFA Kit bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte + Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. Es wurden folgende Substrate verwendet: PC-C8: 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PA: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt), PE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, PG: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), PS: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt), PI: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol) (ammonium salt), CL: 1',3'-bis[1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho]-sn-glycerol (sodium salt), BDP: sn-[2,3-dioleoyl]-glycerol-1-phospho-sn-1'-[2',3'-dioleoyl]-glycerol (ammonium salt), NAPE: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-arachidonoyl (ammonium salt), PLasmPC: 1-(1Z-octadecenyl)-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, MCPG: 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), MCPC: 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, LPC: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine, LPA: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt), LPE: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, LPG: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), LPS: 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt), LPI: L- α -lysophosphatidylinositol (Liver, Bovine) (sodium salt), BMP(s,s): sn-(3-oleoyl-2-hydroxy)-glycerol-1-phospho-sn-1'-(3'-oleoyl-2'-hydroxy)-glycerol (ammonium salt), BMP(r,r): sn-(3-oleoyl-2-hydroxy)-glycerol-1-phospho-sn-1'-(3'-oleoyl-2'-hydroxy)-glycerol (ammonium salt), MP: Methyl-palmitate, EP: Ethyl-palmitate, PP: 2-propyl palmitate, BP: 1-Butyl palmitate, MO: 1-(9Z-octadecenoyl)-rac-glycerol, DO (rac): 1-2-dioleoyl-sn-glycerol, TO-C18: 1,2,3-(9Z-octadecenoyl)-glycerol, TO-C8: Glyceryl trioctanoate, RE: retinyl palmitate, CO: cholest-5-en-3 β -yl octadecanoate, WE: Arachidyl laurate, MGDG: 1,2-diacyl-3-O- β -D-galactosyl-sn-glycerol, PMG: 1-O-hexadecyl-2-O-methyl-sn-glycerol (PMG), O-Ac-Cer: 1-oleoyl-N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosine

Untersuchung der Hydrolase Aktivität von hCes1, hCes2 und hCes3 für das künstliche Substrat Para-Nitrophenylacetat

p-Nitrophenylacetat ist eine kurzkettige, gut lösliche Esterverbindung, die von vielen Esterhydrolasen gespalten wird. Um die Hydrolaseaktivität von hCes1-3 zu untersuchen, wurden wiederum Zelllysate (10 µg Protein) in Tris pH 8 Puffer mit p-Nitrophenylacetat als Substrat inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm bestimmt und daraus die Aktivität berechnet. Abbildung 10 zeigt die Aktivitäten von Zelllysaten, die verschiedene Carboxylasen enthielten, bei pH 8 und einmal in Abwesenheit und einmal in Anwesenheit von Chaps. Abbildung 11 zeigt die Aktivitäten von Zelllysaten, die LacZ (Negativkontrolle), hCes1 und Es22 enthielten, einmal mit Chaps, einmal mit Cholat und einmal ohne Detergenz. Man erkennt in beiden Abbildungen, dass jedes Protein außer hCes3 eine erhöhte Aktivität bei pH 8 im Vergleich zu LacZ besaß. Die höchste Aktivität hatte hCes1 mit einer Aktivität von 20.000 bis 25.000 nmol*h/mg Protein unabhängig von der Anwesenheit von Chaps. HSL zeigte nur eine Aktivität in Abwesenheit von Chaps. hCes2 und Ces5 zeigten jeweils eine Aktivität von ca. 6.000 nmol*h/mg Protein.

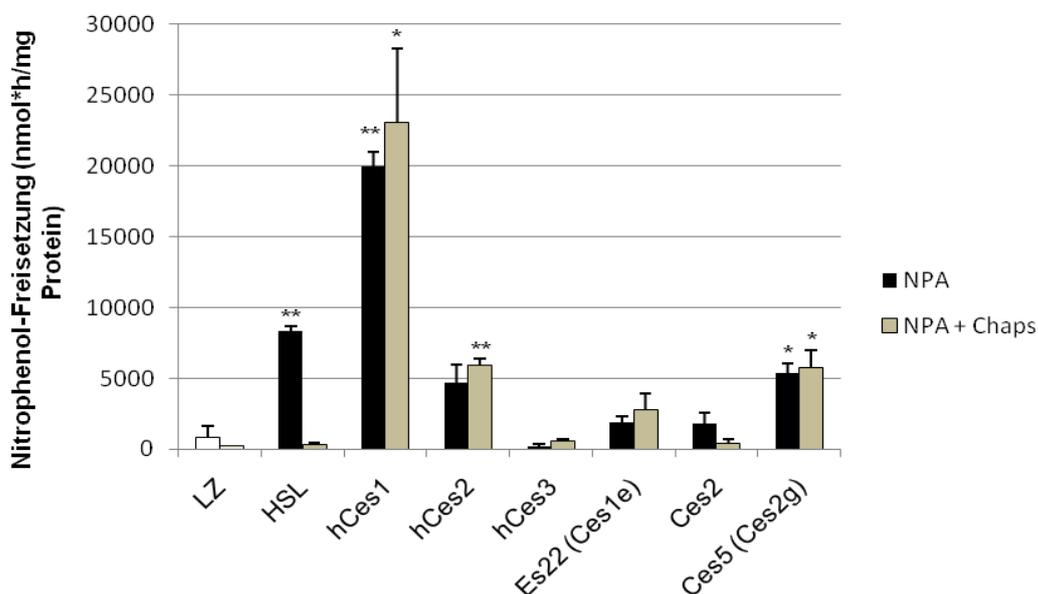


Abbildung 10: para-Nitrophenylacetat-Hydrolase Aktivitätsbestimmung. COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfiziert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 10 µg Protein eingesetzt und mit Tris Puffer pH 8 sowie 1 mM p-Nitrophenylacetat als Substrat vermischt. Nach der Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt. Das freigewordene p-Nitrophenol wurde im Plattenphotometer bei 405 nm vermessen und anschließend mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes berechnet. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001

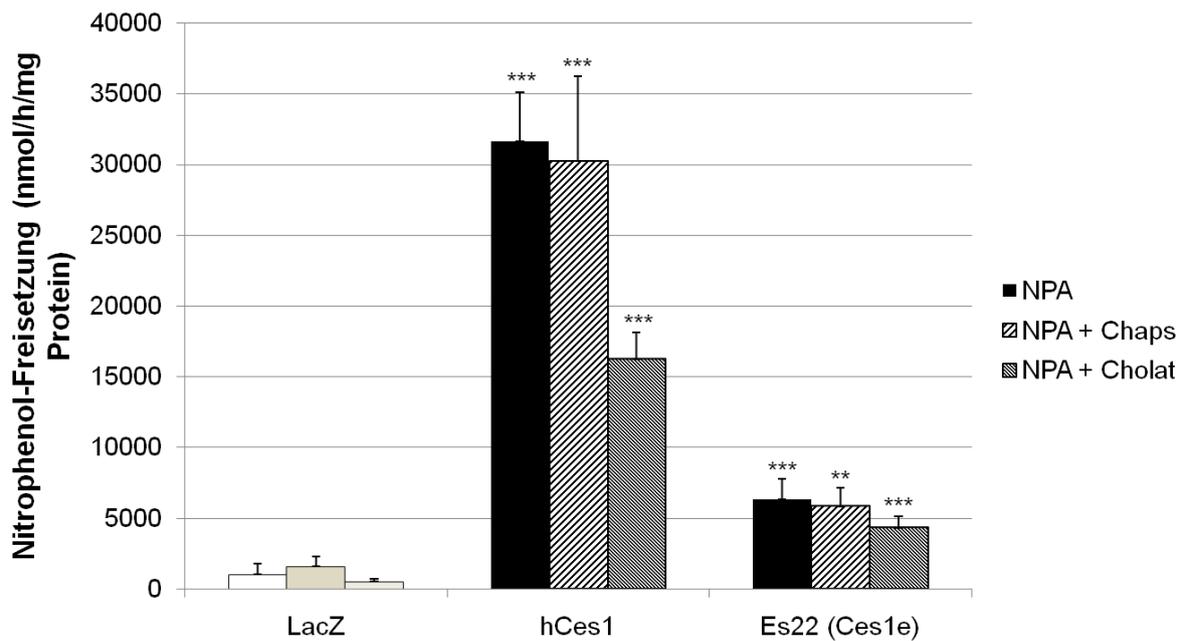


Abbildung 11: para-Nitrophenylacetathydrolase Aktivitätsbestimmung von hCes1 und Es22 (Ces1e). COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 10 µg Protein eingesetzt und mit Tris Puffer pH 8 sowie 1 mM p-Nitrophenylacetat als Substrat vermischt. Nach der Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt. Das freigewordene p-Nitrophenol wurde im Plattenphotometer bei 405 nm vermessen und anschließend mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes berechnet. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Bestimmung des pH- Optimums

Um das pH Optimum der Proteine hCes1-3 zu bestimmen, wurde ein p-Nitrophenylacetat-Hydrolase Assay mit verschiedenen Puffern und pH Werten durchgeführt. Die entstehenden Puffereffekte wurden anschließend herausgerechnet, in dem bei den pH Werten des Pufferwechsels die Aktivität in beiden Puffern gemessen und anschließend der durch den Puffer entstehende Unterschied von den Werten abgezogen bzw. hinzugefügt wurde. Abbildung 12 zeigt die Kurven für die Lysate, die LacZ (Negativkontrolle), hCes1, hCes2, hCes3, Ces5 (Ces2e) und Ces2g enthielten. In der Abbildung ist zu erkennen, das hCes1, hCes2 und Ces5 ein pH Optimum um ca. pH 8 aufwiesen. Das Protein hCes3 zeigte bei keinem der pH Werte eine Aktivität, weswegen kein Optimum ermittelt werden konnte.

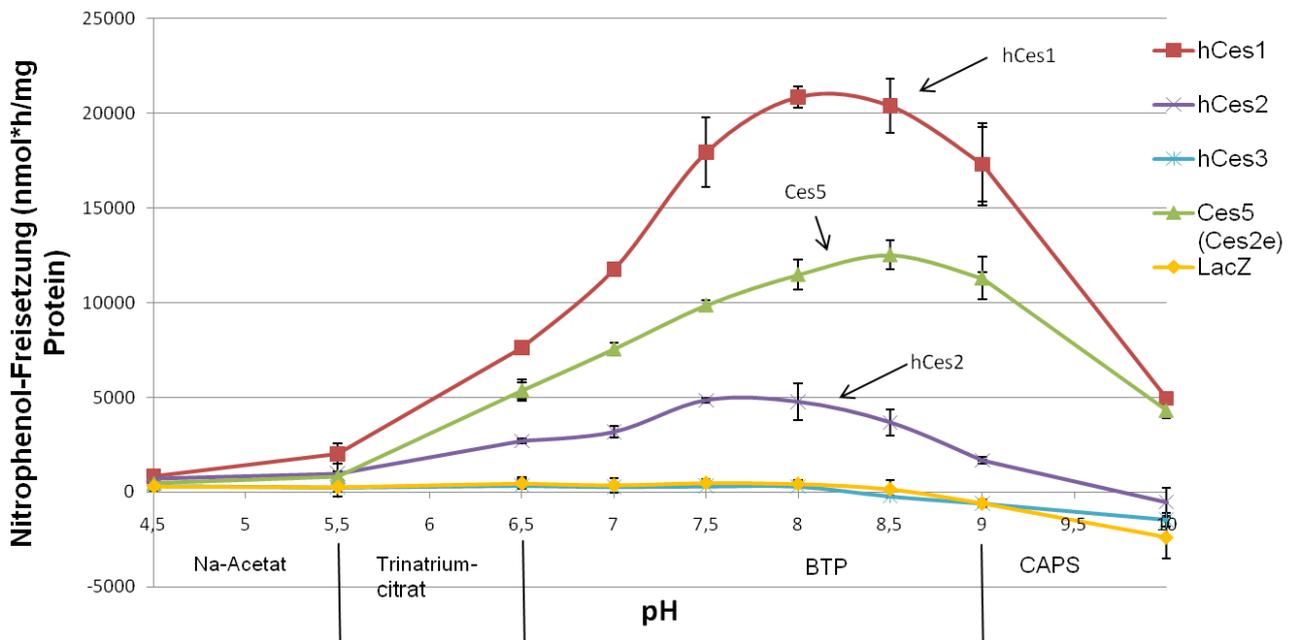


Abbildung 12: Bestimmung des pH-Optimums mittels para-Nitrophenylacetathydrolase Aktivitätsbestimmung. COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 10 µg Zelllysate-Protein eingesetzt und mit Puffern verschiedener pH Werte sowie 1 mM p-Nitrophenylacetat als Substrat vermischt. Nach der Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt. Das freigewordene p-Nitrophenol wurde im Plattenphotometer bei 405 nm gemessen und anschließend mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes berechnet. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrolle wurden Lysate, die LacZ (Negativkontrolle) enthielten verwendet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Untersuchung der Proteine hCes1-3 auf Retinylesterhydrolase Aktivität

Um zu untersuchen, ob humane Carboxylesterasen eine Retinylesterhydrolase Aktivität aufweisen, wurde ein Retinylesterhydrolase Assay durchgeführt. Dazu wurden Zelllysate mit Retinylpalmitat als Substrat inkubiert und die Freisetzung von Retinol mittels HPLC gemessen. Abbildung 13 zeigt die Aktivitäten der verschiedenen Carboxylesterasen bei pH 8 in Ab- bzw. Anwesenheit von Chaps. Abbildung 14 zeigt die Aktivitäten von LacZ (Negativkontrolle), hCes1 und Es22, für Retinylester als Substrat, entweder mit PC, PC+Chaps (Chaps) oder PC+Cholat (Cholat) emulgiert.

In Anwesenheit von PC, wiesen im Vergleich zur Kontrolle (=LacZ) Zelllysate die HSL enthielten eine höhere Retinylesterhydrolase Aktivität auf. Nach Inkubation von Zelllysaten mit einem Substrat, welches neben PC auch Chaps enthielt, wiesen Lysate, die Es22 (Ces1e) oder Ces5 (Ces2e) enthielte, erhöhte Aktivität auf (ca. 2.500 bzw. 3.500 pmol*h/mg

Protein). Alle anderen Carboxylesterase enthaltenden Lysate wiesen keine erhöhte Retinylesterhydrolase Aktivitäten auf.

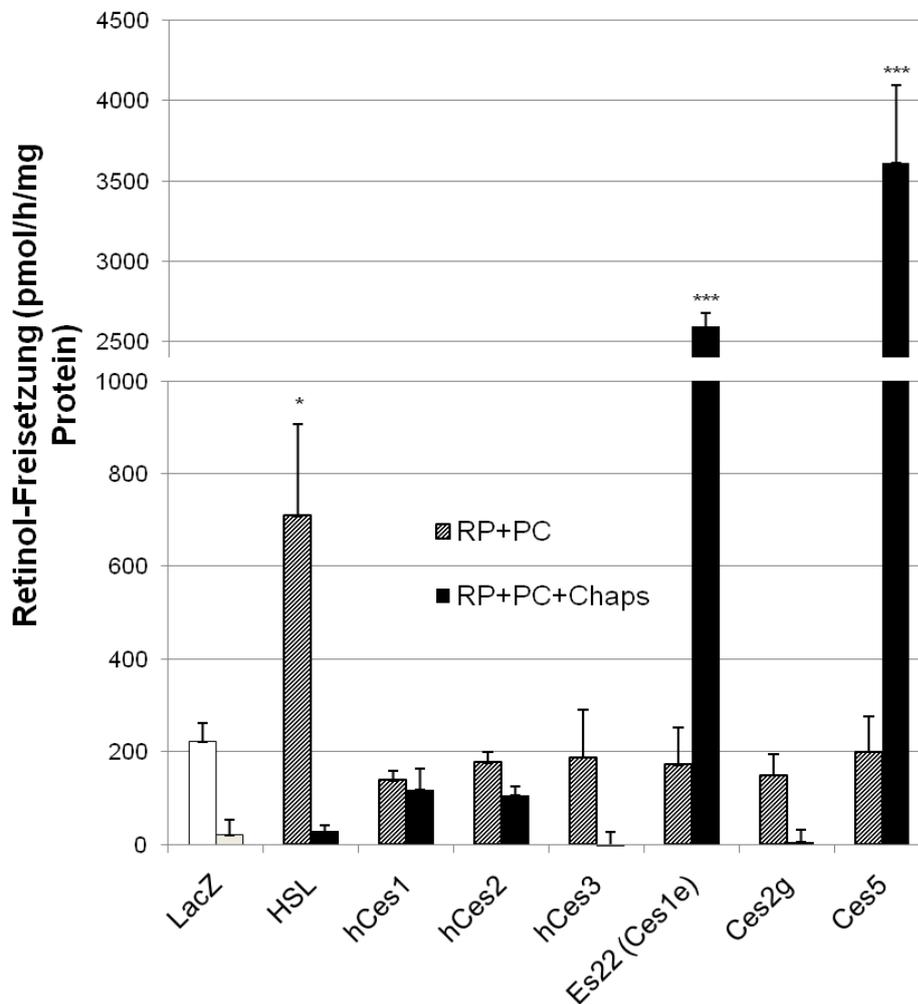


Abbildung 13: Retinylpalmitat-Hydrolase Aktivitätsbestimmung. COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 80 µg Zelllysate-Protein eingesetzt und mit Tris Puffer pH 8 sowie mit Retinylpalmitat als Substrat vermischt. Nach der Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit Hexan gestoppt. Nach Hinzufügen von Retinylacetat als interner Standard wurde die organische Phase abgehoben und eingedampft. Die Lipide wurden in Methanol/Chloroform resuspendiert und mittels HPLC analysiert. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

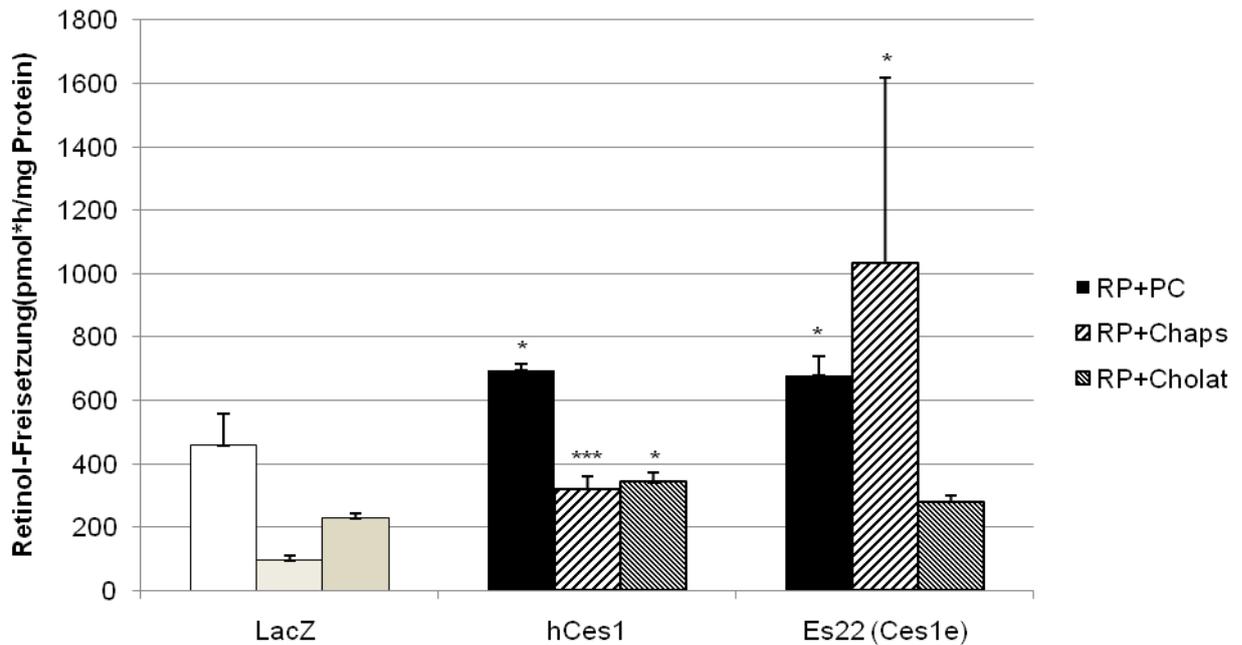


Abbildung 14: Retinylpalmitathydrolase Aktivitätsbestimmung von hCes1 und Es22 (Ces1e). COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 80 µg Zelllysate-Protein eingesetzt und mit Tris Puffer pH 8 sowie mit Retinylpalmitat als Substrat vermischt. Nach der Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit Hexan gestoppt. Nach Hinzuzufügen von Retinylacetat als interner Standard wurde die organische Phase abgehoben und eingedampft. Die Lipide wurden in Methanol/Chloroform resuspendiert und mittels HPLC analysiert. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Untersuchung der hCes1-3 auf Triglyzeridhydrolase Aktivität

Um zu untersuchen, ob die humanen Carboxylasen eine Triglyzeridhydrolase Aktivität aufweisen, wurde ein radioaktiver Triglyzeridhydrolase Aktivitätsassay durchgeführt.

Dazu wurden wiederum Zelllysate, die die Proteine hCes 1-3 enthielten, mit Triolein + PC als Substrat inkubiert und die Freisetzung der radioaktiv-markierten Fettsäuren mittels Sczintillationszählung bestimmt.

Abbildung 15 zeigt die Aktivitäten der verschiedenen Carboxylesterasen bei pH 8 in Ab- und Anwesenheit von Chaps. Mit Triolein + PC als Substrat zeigten neben der Positivkontrolle HSL auch Ces5 (Ces2e) eine signifikant erhöhte Aktivität im Vergleich zu LacZ. Nach Zugabe von Chaps zum Substrat, wiesen Lysate, die Es22 (Ces1e) oder Ces5 (Ces2e) enthielten, im Vergleich zu LacZ erhöhte Aktivitäten auf.

Abbildung 16 zeigt die Aktivitäten von Zelllysaten, die LacZ (Negativkontrolle), hCes1 und Es22 enthielten und die mit Triolein als Substrat emulgiert mit PC/PI oder mit PC/PI und Chaps oder Cholat als Detergenz inkubiert wurden. Die Aktivität von Es22 (Ces1e) war nur in Anwesenheit von Chaps signifikant erhöht. hCes1 zeigt hier in Anwesenheit von Chaps und auch ohne Detergenz eine signifikante Aktivität, nicht jedoch bei Zugabe von Cholat.

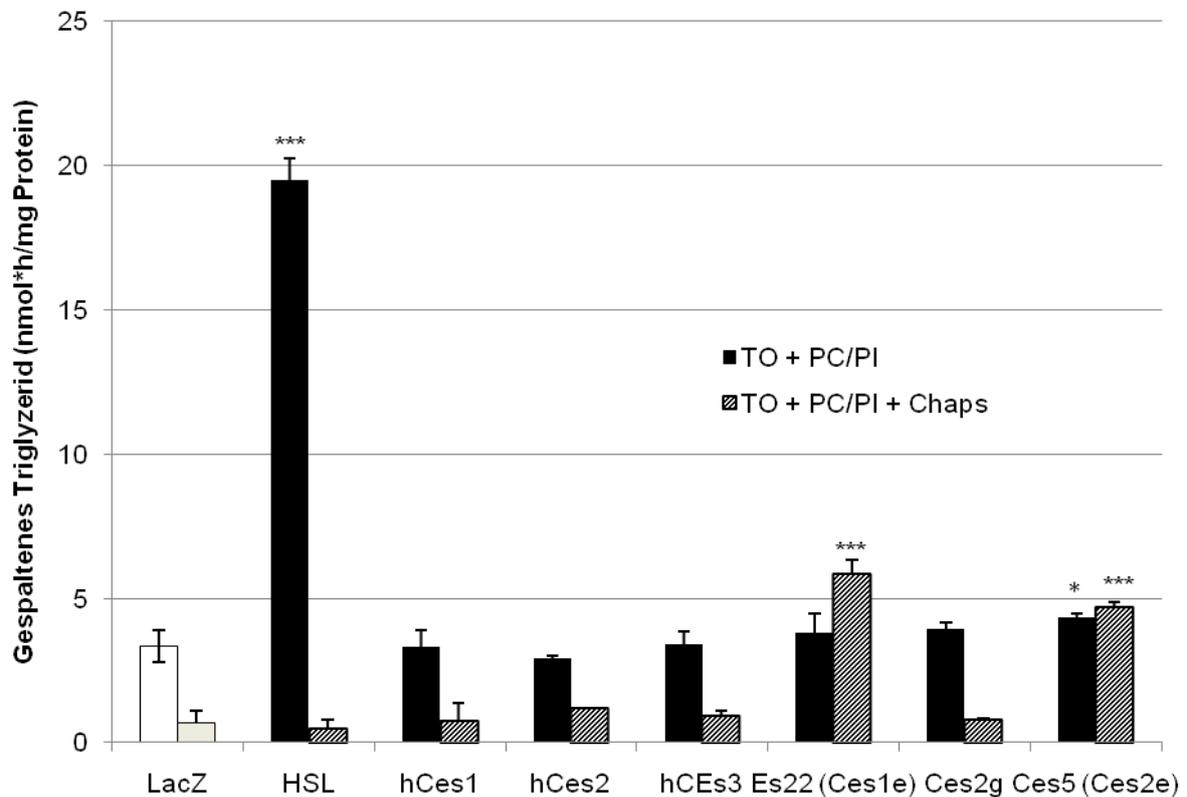


Abbildung 15: Trioleinhydrolase Aktivitätsbestimmung. COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 80 µg Zelllysate-Protein eingesetzt und mit radioaktiv markiertem Triolein als Substrat eine Stunde inkubiert. Nach Stoppen mit MeOH/CHCl₃/nHeptan wurde ein Teil der wässrigen Phase mit Sczintillationscocktail vermischt und die radioaktive Strahlung gemessen. Die freigesetzten Fettsäuren wurden danach berechnet. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = p<0,05 , ** = p<0,01, *** = p<0,001

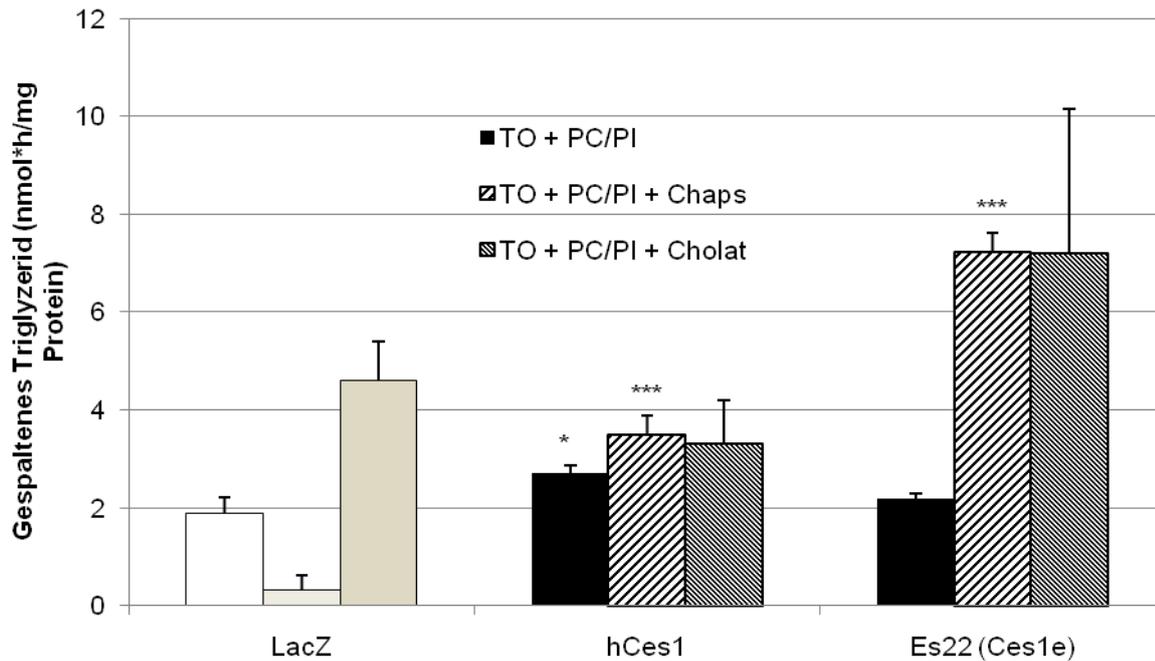


Abbildung 16: Trioleinhydrolase Aktivitätsbestimmung von hCes1 und Es22 (Ces1e). COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 80 µg Zelllysate-Protein eingesetzt und mit radioaktiv markiertem Triolein als Substrat eine Stunde inkubiert. Nach Stoppen mit MeOH/CHCl₃/nHeptan wurde ein Teil der wässrigen Phase mit Sczintillationscocktail vermischt und die radioaktive Strahlung gemessen. Die freigesetzten Fettsäuren wurden danach berechnet. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = p<0,05 , ** = p<0,01, *** = p<0,001

Untersuchung der hCes1-3 auf Monoglyzeridhydrolase Aktivität

In den Screening Assays wurde eine Monoglyzeridhydrolase Aktivität von Es22 (Ces1e) und hCes2 beobachtet. Um diese Aktivitäten in einem spezifischen Assay zu untersuchen, wurde ein Monoglyzeridhydrolase-Assay durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Zelllysate mit 100 µl Monolein das Substrat inkubiert und anschließend die Menge des freigesetzten Glycerols enzymatisch bestimmt. Anhand der freigesetzten Menge an Glycerol wurde die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet.

Abbildung 17 zeigt die Aktivitäten der verschiedenen Carboxylesterasen bei pH 8 unter Verwendung von zwei verschiedenen Puffern (BTP und Tris). Man erkennt signifikant erhöhte Aktivitäten sowohl bei Lysaten mit hCes1, hCes2 als auch bei Es22 (Ces1e) in beiden Puffersystemen im Vergleich zu LacZ.

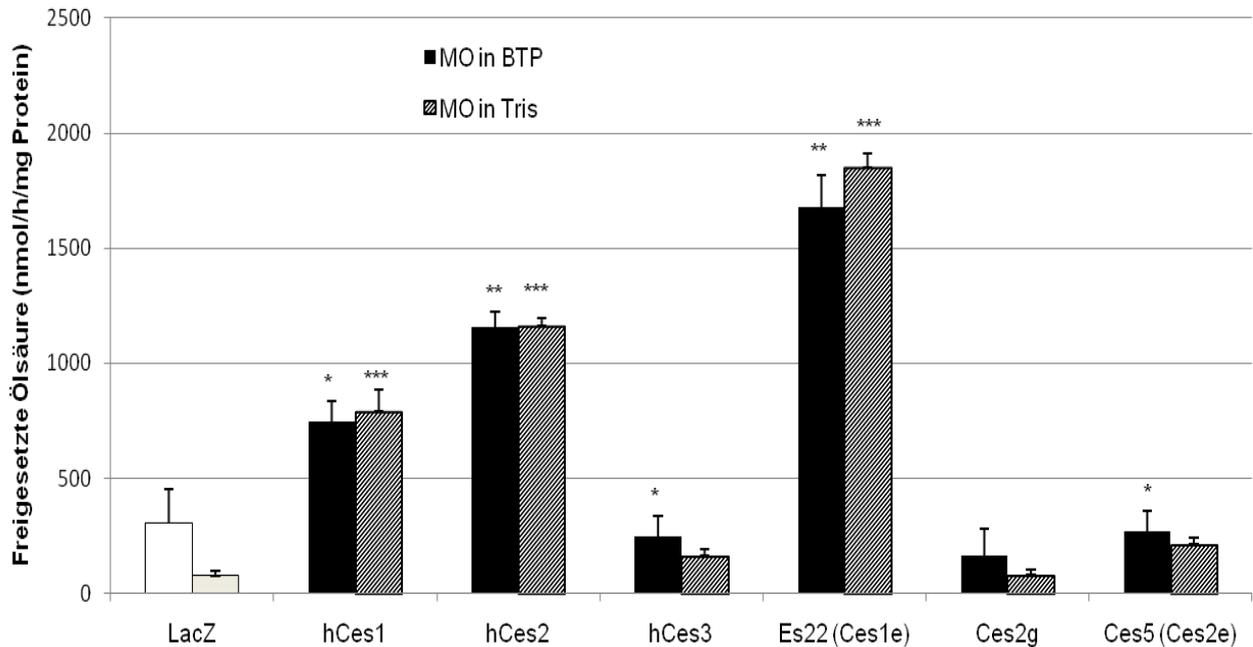


Abbildung 17: Monoglyzeridhydrolase Aktivitätsbestimmung. COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 10 µg Zelllysate-Protein eingesetzt und mit 1,3-rac Monolein als Substrat für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Chloroform wurde der freie Glycerolgehalt eines Teiles der wässrigen Phase bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Abbildung 18 zeigt die Aktivitäten von den Zelllysaten, die LacZ (Negativkontrolle), hCes1 und Es22 enthielten und zwar einmal in Anwesenheit von Chaps, einmal von Cholat und einmal ohne Detergenz. Lysate, die Es22 enthielten, wiesen unter allen Bedingungen, Zelllysate die hCes1 enthielten, wiesen nur in Anwesenheit einer der Detergenzien im Vergleich zu LacZ erhöhte Aktivitäten auf.

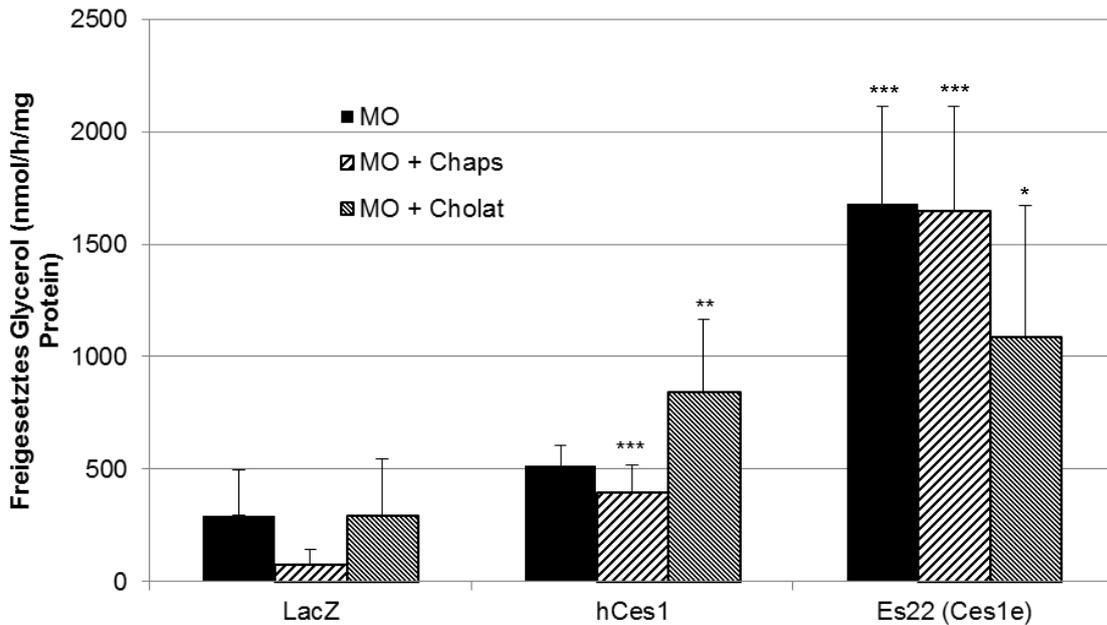


Abbildung 18: Monoglyceridhydrolase Aktivitätsbestimmung von hCes1 und Es22 (Ces1e). COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfiziert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 10 µg Zelllysate-Protein eingesetzt und zusammen mit 1,3-rac Monolein als Substrat für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Chloroform wurde der freie Glycerolgehalt eines Teiles der wässrigen Phase bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Untersuchung der hCes1-3 auf Cholesterylesterhydrolase Aktivität

Die Cholesterylesterhydrolase Aktivität wurde mit Zelllysaten, die LacZ, HSL, hCes1, hCes2, hCes3, Es22 oder Ces5 enthielten, und Cholesteryloleat emulgiert mit PC/PI als Substrat untersucht. Nach der Reaktion wurde die Freisetzung von radioaktiv markierten Fettsäuren mittels Scintillationszählung bestimmt.

Abbildung 19 zeigt die Cholesterylesterhydrolase Aktivitäten der verschiedenen Carboxylesterasen bei pH 8 in Ab- und Anwesenheit von Chaps. Abbildung 20 zeigt die Cholesterylester-Hydrolase Aktivitäten von den Zelllysaten, die LacZ (Negativkontrolle), hCes1 und Es22 enthielten und zwar einmal in Anwesenheit von Chaps und einmal in Abwesenheit eines Detergenz. Außer der Positivkontrolle (HSL) zeigte kein Zelllysate eine signifikant erhöhte Aktivität im Vergleich zu LacZ. Folglich wiesen keine der humanen Carboxylesterasen eine Cholesterylesterhydrolase Aktivität auf.

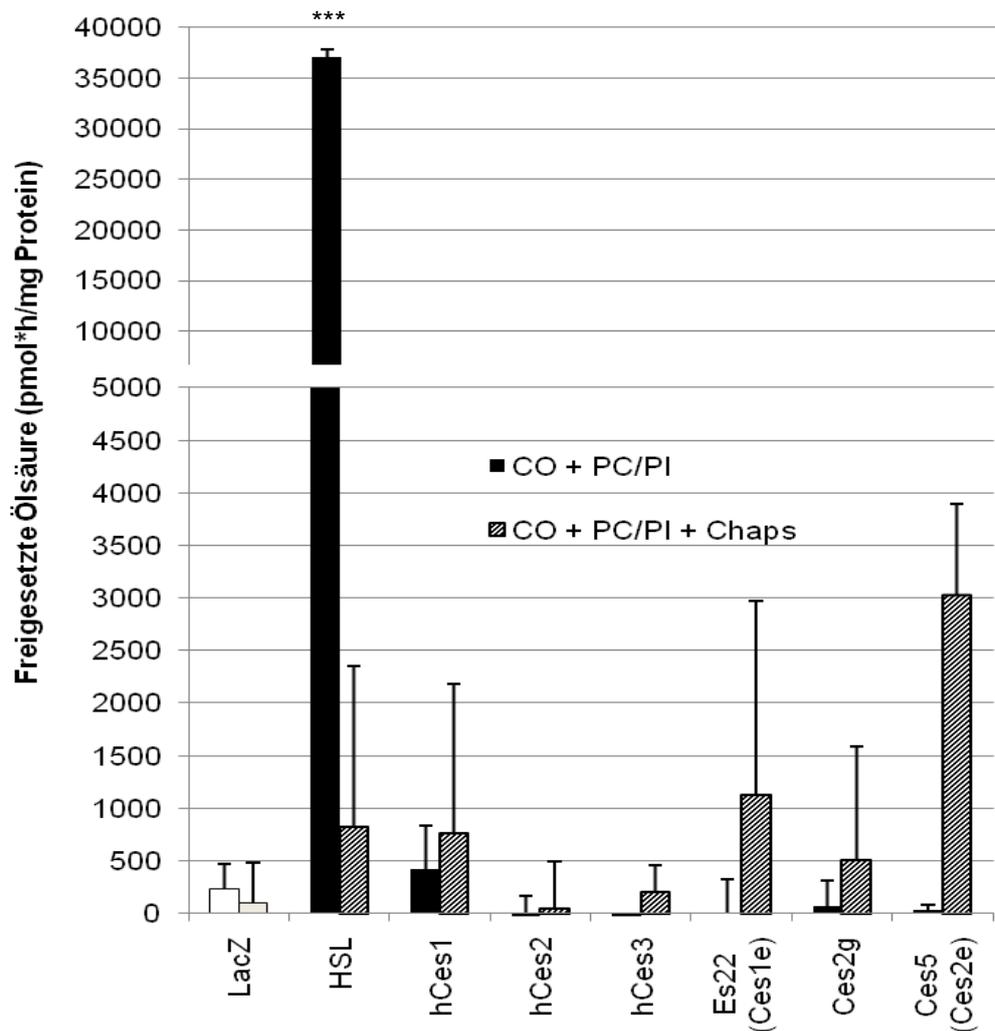


Abbildung 19: Cholesterylesterhydrolase Aktivitätsbestimmung. COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 80 µg Zelllysate-Protein eingesetzt und mit Cholesteryloleat emulgiert mit PC/PI als Substrat eine Stunde inkubiert. Nach Stoppen mit MeOH/CHCl₃/nHeptan wurde ein Teil der wässrigen Phase mit Sczintillationscocktail vermischt und die radioaktive Strahlung gemessen. Die freigesetzten Fettsäuren wurden danach berechnet. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = p<0,05 , ** = p<0,01, *** = p<0,001

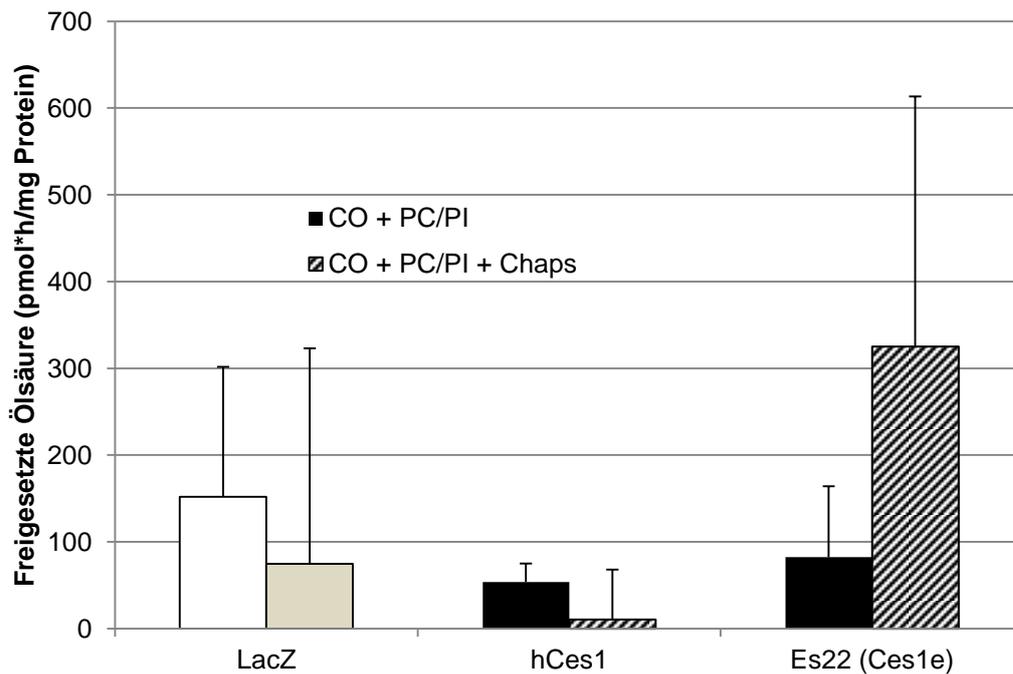


Abbildung 20: Cholesterylesterhydrolase Aktivitätsbestimmung von hCes1 und Es22 (Ces1e). COS7 Zellen wurden mit entsprechender Plasmid-DNA transfektiert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, in HSL Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 80 µg Zelllysate-Protein eingesetzt und mit Cholesteryloleat emulgiert mit PC/PI als Substrat eine Stunde inkubiert. Nach Stoppen mit MeOH/CHCl₃/nHeptan wurde ein Teil der wässrigen Phase mit Sczintillationscocktail vermischt und die radioaktive Strahlung gemessen. Die freigesetzten Fettsäuren wurden danach berechnet. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Als Kontrollen wurden LacZ (Negativkontrolle) und HSL (Positivkontrolle) Lysate aus Cos7 Zellen verwendet. * = p<0,05 , ** = p<0,01, *** = p<0,001

Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche humanen Carboxylesterasen (1-3) endogene Lipidester hydrolysieren. Weiters sollte das pH-Optimum bestimmt werden. Die Aktivitäten der humanen Carboxylesterasen sollten mit jener muriner Homologe verglichen werden. Für hCes1 (CES1A3) wurde eine erhöhte Retinylesterhydrolase-Aktivität, emulgiert mit PC in Ab- und Anwesenheit von Detergenzien, eine erhöhte Triglyzeridhydrolase-Aktivität, emulgiert mit PC/PI in An- und Abwesenheit von Chaps, und eine erhöhte Monoglyzeridhydrolase-Aktivität, in Anwesenheit von Chaps und Cholat, festgestellt. Für hCes2 (CES2A1) wurde eine erhöhte Monoglyzeridhydrolase-Aktivität mit den Puffern Tris und BTP festgestellt. Für hCes3 (CES3A2) wurde eine erhöhte Monoglyzeridhydrolase-Aktivität mit BTP gefunden. Für Es22 wurde eine erhöhte Retinylesterhydrolase-Aktivität, emulgiert mit PC in Ab- und Anwesenheit von Detergenzien, eine erhöhte Triglyzeridhydrolase-Aktivität, emulgiert mit PC/PI in Anwesenheit von Chaps, und eine erhöhte Monoglyzeridhydrolase-Aktivität, in An- und Abwesenheit von Chaps und Cholat, festgestellt. Für Ces5 wurde eine erhöhte Retinylesterhydrolase-Aktivität, emulgiert mit PC in Anwesenheit von Chaps, eine erhöhte Triglyzeridhydrolase-Aktivität, emulgiert mit PC/PI in An- und Abwesenheit von Chaps, und eine erhöhte Monoglyzeridhydrolase-Aktivität mit dem Puffer BTP gefunden. Das pH-Optimum der Carboxylesterasen (1-3) wurde bei ca. pH 8 gefunden. Im „Substrat-Screening Assay“ zeigten außerdem hCes2, und die murinen Proteine Ces2g und Ces5 erhöhte Hydrolyseaktivitäten für das Substrat PC-8 (1,2-octanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Ces2g zeigte eine Aktivität für LPI (L- α -lysophosphatidylinositol), hCes3 zeigte eine Aktivität für RE (Retinylpalmitat, dies konnte im spezifischen Retinylesterhydrolase-Assay nicht bestätigt werden) und Ces5 eine Aktivität für O-Ac-Cer (1-oleoyl-N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosine).

Für alle Versuche wurden rekombinante Proteine verwendet, welche in Säugerzellen exprimiert wurden. Diese Zelllysate wurden anschließend für die Aktivitätsassays verwendet. Um die Aktivitäten der Proteine vergleichen zu können, musste eine vergleichbare Expression der rekombinanten Proteine erreicht werden. Dies wurde durch Proteinbestimmung mittels „Bio-Rad Proteinassay“ und Westernblots überprüft. Bei der Proteinbestimmung wurde die Gesamtproteinmenge im Zelllysate bestimmt. Mit Hilfe des Westernblots wurde überprüft, ob eine vergleichbare Expression der rekombinanten Proteine vorhanden war. Da hierbei nur ähnliche Größe und Färbung überprüft wurden und nicht die Schwärzung densitometrisch ausgewertet wurde, können geringe Unterschiede in der Expression nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte unter anderem geringe Unterschiede bei experimentellen Wiederholungen verursachen. Für genauere Bestimmungen hätten die

Proteine z.B. gereinigt werden können. Da für diese Arbeit nur die relativen Aktivitäten bestimmt werden sollten, welche die Enzyme im Vergleich mit einer Negativkontrolle (LacZ) aufwiesen und nicht die absoluten Aktivitäten notwendig waren, wurde auf die aufwendige Reinigung verzichtet. Zudem führt eine Aufreinigung eines Proteins oftmals zu dessen Inaktivierung und eine heterologe Expression oftmals zur Bildung von unlöslichen, inaktiven Protein. Daher wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet.

Die Expression wurde in Nierenzellen von Menschen und Affen durchgeführt. Da die untersuchten Proteine hauptsächlich in der Leber exprimiert werden und auch andere Proteine oftmals gewebsspezifisch exprimiert werden, könnten in den untersuchten Zelllysaten bestimmte Proteininteraktionen gefehlt haben. Dazu hätten die Proteine z. B. in Leberzellen/Hepatozyten exprimiert werden müssen. Umgekehrt würden bei gereinigten Proteinen prinzipiell interagierende Proteine fehlen. Für eine Untersuchung, ob interagierende Proteine notwendig sind, hätten die Assays mit gereinigten Enzymen oder mit Lysaten verschiedener Zelltypen durchgeführt werden können.

Eine große Rolle bei der Beurteilung der Ergebnisse spielen die Assay-Bedingungen. Ein Großteil der Assays wurde bei pH 8 mit Tris/Malat Puffer durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die verwendeten Proteine ein pH Optimum um diesen pH Wert haben. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse jedoch auch, dass bei anderen pH Werten die Aktivität geringer war. Ces5 hatte sein pH Optimum eher bei 8,5 während hCes1 und hCes2 ihr Maximum bei ca. pH 8 hatten. Abbildung 21 zeigt das pH Optimum von Es22 (Ces1e). [8] Das Optimum liegt hier knapp unter pH 8.

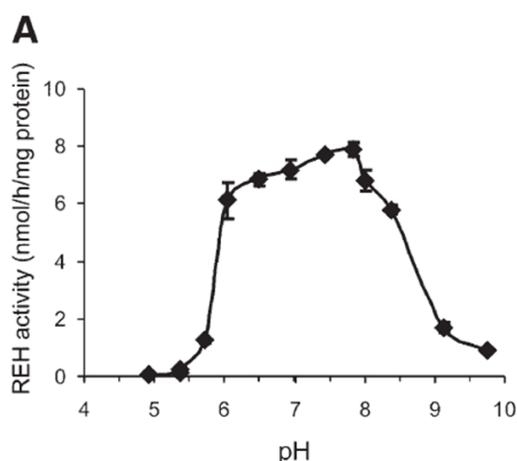


Abbildung 21: pH-Optimum von Es22. R. Schreiber, U. Taschler, H. Wolinski, A. Seper, S.N. Tamegger, M. Graf, S.D. Kohlwein, G. Hämmerle, R. Zimmermann, R. Zechner und A.Lass. Esterase 22 and beta-glucuronidase hydrolyze retinoids in mouse liver. *J. Lipid Res.* 2009 50:2514-2523

Um die Aktivität der Proteine vergleichen zu können und Effekte durch unterschiedliche pH Werte ausschließen zu können, wurden alle Versuche mit dem gleichen pH Wert (pH 8) durchgeführt.

Den Effekt von verschiedenen Puffern wurde im Monoglyzerid-Assay gezeigt. Proteine hatten unterschiedliche Aktivitäten je nachdem, ob die Assays in Tris oder BTP Puffer desselben pH Wertes durchgeführt wurden. Für alle weiteren Assays wurde ein 100 mM Tris/Malat Puffer verwendet, um die Aktivitäten vergleichen zu können.

Es wurden das Gallensalz Na-Cholat und das künstliche Chaps verwendet, um zu untersuchen, ob die Aktivitäten an die Anwesenheit von Detergenzien oder Gallensalzen gekoppelt ist. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass unterschiedlich hohe Detergenzienkonzentrationen erheblichen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme haben. Um die unterschiedlichen Enzyme vergleichen zu können, wurde in jedem Versuch dieselbe Konzentration an Cholat beziehungsweise Chaps verwendet. Hohe Detergenzienkonzentration verringerte die Aktivität der Proteine, vermutlich durch veränderte Substratpräsentation.

Je nachdem wie das Substrat präsentiert wird, verändert sich die Aktivität der Proteine. Während manche Substrate bei Beschallung selbst Mizellen bilden, benötigen andere Substanzen wie Phosphatidylcholin oder Phosphatidylinositol, um in Mizellen vorzuliegen. Da Carboxylesterasen vermutlich eine Rolle im Lipidstoffwechsel haben, kann angenommen werden, dass für eine Aktivität das Substrat in Form von Mizellen vorhanden sein sollte. Die Beschallung erfolgte für alle Assays unter den gleichen Bedingungen, um die Mizellengröße und Anzahl für alle Proteine vergleichbar zu halten. Die Verwendung von verschiedenen Detergenzien verändert die Mizellengröße und Oberfläche und damit die Substratpräsentation.

Die dargestellten Aktivitäten sind die Mittelwerte von mehreren Aktivitätsassays. Jede Abbildung repräsentiert eine Mehrfachbestimmung von $n =$ mindestens 3, meist mehr. Die unterschiedlichen Signifikanzen der Aktivität des gleichen Proteins in unterschiedlichen Abbildungen kommen vermutlich durch leichte Expressionsschwankungen beziehungsweise durch leicht veränderte Substratpräsentation zustande. Dies führt bei manchen Proteinen dazu, dass diese in einem Experiment eine signifikante Aktivität aufwiesen und in einem anderen nicht. Die teilweise hohen Standardabweichungen entstanden unter anderem möglicherweise aus denselben Gründen.

Der „Substrat-Screening Assay“ wurde dazu benutzt, einen prinzipiellen Aktivitätstest auf verschiedene Substrate durchzuführen. Da es sich bei den Ergebnissen nur um Doppelbestimmungen handelte, wurde die Standardabweichung über alle Ergebnisse gemittelt. Die Aktivitäten, welche im „Substrat-Screening Assay“ beobachtet wurden, könnten durch die kleine Probennummer auch irrtümlich aufgetreten sein.

Humane Carboxylesterase 1 (hCes1) wird in allen Geweben exprimiert, jedoch besonders stark in der Leber. [27] hCes2 wird ebenfalls in der Leber, aber auch im Gastrointestinaltrakt exprimiert. [33] hCes3 wiederum findet man ebenfalls in der Leber, aber auch im Darm und im Hirn. [34] Alle drei sind dabei im Endoplasmatischen Retikulum oder dem Zytosol lokalisiert. [9,30,32]. Die verschiedenen Aktivitäten, welche in dieser Arbeit gefunden wurden, sowie die Lokalisation der Proteine lassen auf eine Beteiligung der Carboxylesterasen auf den Neutrallipidstoffwechsel schließen. Um eine mögliche Rolle von humanen Carboxylesterasen im Neutrallipidstoffwechsel zu verstehen, ist die Untersuchung der genauen physiologischen Rolle der Carboxylesterasen notwendig. Durch ihre Rolle in der Aktivierung und Deaktivierung von Medikamenten und Drogen haben sie auch eine wichtige therapeutische Rolle. [30,31,33] hCes1 beziehungsweise Es22 könnten durch eine erhöhte Retinylesterhydrolase-Aktivität im Vitamin A Stoffwechsel beteiligt sein.

Beim Vergleich der humanen Carboxylesterasen mit ihren murinen Homologen wurden Unterschiede im Substratspektrum gefunden. hCes1 und sein Homolog Es22 wiesen ein sehr ähnliches Substratspektrum auf. Nur die Höhe der Aktivität und die Detergenzabhängigkeit variierten. hCes2 und sein Homolog Ces5 wiesen allerdings ein sehr unterschiedliches Substratspektrum auf. Ces5 war in der Lage Retinylester, 1-oleoyl-N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosine sowie Triglyzeride zu spalten, hCes2 nicht. Beide konnten Monoglyzeride und 1,2-octanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine hydrolysieren.

Durch ihre signifikante Monoglyzeridhydrolase-Aktivität könnten die humanen Carboxylesterasen 1 und 2 eine wichtige Rolle im Monoglyzeridstoffwechsel der Leber oder des Intestinaltrakts spielen. Die leicht erhöhte Aktivität von hCes1 in Anwesenheit von Cholat deutet auf eine Rolle im Intestinum.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass humane Carboxylesterasen Neutrallipid-Hydrolaseaktivitäten besitzen und durch ihre Lokalisation in der Leber vermutlich am Neutrallipidstoffwechsel der Leber beteiligt sind. Eine genauere Untersuchung ihrer physiologischen Rolle ist notwendig, um ihre mögliche Rolle im Neutrallipidstoffwechsel zu untersuchen.

Quellen

1. Fahy E, Subramaniam S, Murphy R, Nishijima M, Raetz C, Shimizu T, Spener F, Van Meer G, Wakelam M and Dennis E.A (2009). "Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids". *Journal of Lipid Research* 50 (Supplement): S9–S14. doi:10.1194/jlr.R800095-JLR200. PMC 2674711. PMID 19098281
2. Subramaniam S, Fahy E, Gupta S, Sud M, Byrnes RW, Cotter D, Dinasarapu AR and Maurya MR (2011). "Bioinformatics and Systems Biology of the Lipidome". *Chemical Reviews* 111 (10): 6452–6490. doi:10.1021/cr200295k. PMC 3383319. PMID 21939287.
3. Quantitative Profiling of Major Neutral Lipid Classes in Human Meibum by Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry
Jianzhong Chen, Kari B. Green, Kelly K. Nichols
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 August; 54(8): 5730–5753. Published online 2013 August 23. doi: 10.1167/iovs.12-10317
4. *J Lipid Res.* 2009 Jan;50(1):3-21. doi: 10.1194/jlr.R800031-JLR200. Epub 2008 Oct 23. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. Zechner R1, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A.
5. Londos, C., D. L. Brasaemle, C. J. Schultz, J.P.Segrest, and A.R. Kimmel. 1999 Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol* 10:51-8
6. Zimmermann, R., J. G. Strauss, G. Hämmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter, and R. Zechner. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-6.
7. Gibbons, G. F., K. Islam, and R. J. Pease. 2000. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* 1483:37-57.

8. R. Schreiber, U. Taschler, H. Wolinski, A. Seper, S. N. Tamegger, M. Graf, S. D. Kohlwein, G. Haemmerle, R. Zimmermann, R. Zechner, and A. Lass. Esterase 22 and beta-glucuronidase hydrolyze retinoids in mouse liver. *J. Lipid Res.* 2009. 50: 2514–2523.
9. R. Schreiber, U. Taschler, K. Preiss-Landl, N. Wongsirirotj, R. Zimmermann, A. Lass. Retinyl ester hydrolases and their roles in vitamin A homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821 (2012), pp. 113–123
10. van Bennekum , A. M. , E. A. Fisher , W. S. Blaner , and E. H. Harrison . 2000 . Hydrolysis of retinyl esters by pancreatic triglyceride lipase. *Biochemistry* . 39 : 4900 – 4906 .
11. Ruiz , A. , A. Winston , Y. H. Lim , B. A. Gilbert , R. R. Rando , and D. Bok . 1999 . Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 274 : 3834 – 3841 .
12. MacDonald , P. N. , and D. E. Ong . 1988 . A lecithin:retinol acyltransferase activity in human and rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156 : 157 – 163 .
13. MacDonald , P. N. , and D. E. Ong . 1988 . Evidence for a lecithinretinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J. Biol. Chem.* 263 : 12478 – 12482 .
14. Vogel , S. , M. V. Gamble , and W. S. Blaner . 1999 Biosynthesis, absorption and transport of retinoids. In *Handbook of Experimental Pharmacology. Retinoids.* Nau, H. and Blaner, W. S., editors. Springer Verlag Publishing, Heidelberg. 31–95.
15. G. Wolf, Uptake of retinoids by adipose tissue, *Nutr. Rev.* 52 (1994) 356–358.
16. W.S. Blaner, J.C. Obunike, S.B. Kurlandsky, M. al-Haideri, R. Piantedosi, R.J. Deckelbaum, I.J. Goldberg, Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 16559–16565.

17. A.M. van Bennekum, Y. Kako, P.H. Weinstock, E.H. Harrison, R.J. Deckelbaum, I.J. Goldberg, W.S. Blaner, Lipoprotein lipase expression level influences tissue clearance of chylomicron retinyl ester, *J. Lipid Res.* 40 (1999) 565–574.
18. S. Kudo, The morphology of release of vitamin A-containing lipid droplets by hepatocytes in rat liver, *Anat. Rec.* 225 (1989) 11–20.
19. R.J. Havel, Chylomicron remnants: hepatic receptors and metabolism, *Curr. Opin. Lipidol.* 6 (1995) 312–316.
20. Ronne , H. , C. Ocklind , K. Wiman , L. Rask , B. Obrink , and P. A. Peterson . 1983 . Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin a on the secretion of the retinolbinding protein. *J. Cell Biol.* 96 : 907 – 910 .
21. Blomhoff , R. , K. Holte , L. Naess , and T. Berg . 1984 . Newly administered [3H]retinol is transferred from hepatocytes to stellate cells in liver for storage. *Exp. Cell Res.* 150 : 186 – 193 .
22. Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Harold Anthony Harper, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell (Hrsg.): *Harper's illustrated biochemistry*. 26th ed. McGraw-Hill Professional, 2003. ISBN 0-07-138901-6 S. 205.
23. Augusteyn RC, de Jersey J, Webb EC, Zerner B (1969). "On the homology of the active-site peptides of liver carboxylesterases". *Biochim. Biophys. Acta.* 171 (1): 128–37. doi:10.1016/0005-2744(69)90112-0. PMID 4884138.
24. Mentlein, R., Schumann, M. and Heymann, E. Comparative chemical and immunological characterization of five lipolytic enzymes (carboxylesterases) from rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 234 (1984) 612-621. [PMID: 6208846]
25. Aranda, Juan; Cerqueira, N. M. F. S. A.; Fernandes, P.A.; Roca, M.; Tuñon, I.; Ramos, M. J. (2014). "The Catalytic Mechanism of Carboxylesterases. A Computational Study.". *Biochemistry* 53 (36): 5820–5829. doi:10.1021/bi500934j.

26. Zschunke F, Salmassi A, Kreipe H, Buck F, Parwaresch MR, Radzun HJ (Aug 1991). "cDNA cloning and characterization of human monocyte/macrophage serine esterase-1". *Blood* 78 (2): 506–12. PMID 2070086.
27. Imai T (Jun 2006). "Human Carboxylesterase Isozymes: Catalytic Properties and Rational Drug Design". *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21 (3): 173–185. doi:10.2133/dmpk.21.173. PMID 16858120.
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1066> am 12.10.2014
29. Markey GM (Feb 2011). "Carboxylesterase 1 (Ces1): from monocyte marker to major player". *J Clin Pathol* 64 (2): 107–9. doi:10.1136/jcp.2010.084657. PMID 21177752.
30. Redinbo MR, Bencharit S, Potter PM (Jun 2003). "Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery". *Biochem Soc Trans* 31 (Pt 3): 620–4. doi:10.1042/bst0310620. PMID 12773168.
31. Boonyuen U, Promnares K, Junkree S, Day NP, Imwong M. Efficient in vitro refolding and functional characterization of recombinant human liver carboxylesterase (CES1) expressed in *E. coli*. *Protein Expr Purif.* 2015 Mar;107:68-75. doi: 10.1016/j.pep.2014.11.006. Epub 2014 Nov 21.
32. Guang Xu, Wanghai Zhang, Margaret K. Ma, and Howard L. McLeod Regular Articles - Molecular Oncology, Markers, Clinical Correlates: Human Carboxylesterase 2 Is Commonly Expressed in Tumor Tissue and Is Correlated with Activation of Irinotecan. *Clin Cancer Res* August 2002 8:2605-2611
33. Chengliang Zhang, Yanjiao Xu, Qiaoni Zhong, Xiping Li, Ping Gao, Chengyang Feng, Qian Chu, Yuan Chen, and Dong Liu,* In Vitro Evaluation of the Inhibitory Potential of Pharmaceutical Excipients on Human Carboxylesterase 1A and 2 *PLoS One.* 2014; 9(4): e93819. Published online Apr 3, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0093819 PMID: 24748144

34. Maltais LJ. Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 2010;21(9-10):427-441. doi:10.1007/s00335-010-9284-4.
35. Renate Lüllmann-Rauch: Taschenlehrbuch Histologie. Thieme, Stuttgart 2006
36. Bernd Löwe: Biochemie. C.C.Buchner, Bamberg 1989
37. http://de.wikipedia.org/wiki/Triglyceride#mediaviewer/File:Fat_structural_formulae.png Datum 12.10.2014
38. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Retinol.png> Datum 22.12.2014
39. <http://blogs.dnalc.org/wp-content/uploads/2012/04/cholesterol.png> Datum 12.01.2015
40. Simon GM, Cravatt BF. Activity-based Proteomics of Enzyme Superfamilies: Serine Hydrolases as a Case Study. *The Journal of Biological Chemistry* 2010;285(15):11051-11055. doi:10.1074/jbc.R109.097600.
41. Kaschani F, Gu C, Niessen S, Hoover H, Cravatt BF, van der Hoorn RAL. Diversity of Serine Hydrolase Activities of Unchallenged and Botrytis-infected *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 2009;8(5):1082-1093. doi:10.1074/mcp.M800494-MCP200.
42. Dodson, G; Wlodawer, A (September 1998). "Catalytic triads and their relatives.". *Trends in Biochemical Sciences* 23 (9): 347–52. doi:10.1016/S0968-0004(98)01254-7. PMID 9787641.
43. Ollis DL1, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, et al. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 1992 Apr;5(3):197-211.
44. http://deanlab.umn.edu/_Media/slide2_med.png von <http://deanlab.umn.edu/projects/evolution-of-enzyme-catalys.html> Datum 10.01.2015

45. Gilham D, Alam M, Gao W, Vance DE, Lehner R Triacylglycerol hydrolase is localized to the endoplasmic reticulum by an unusual retrieval sequence where it participates in VLDL assembly without utilizing VLDL lipids as substrates. *Mol Biol Cell*. 2005;16:984–996