

**Studien am Lipidtröpfchen-assoziierten
Drosophila melanogaster Protein CG2254**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Peter Johannes Thul

aus Köln

Düsseldorf, April 2014

aus dem Institut für Mathematische Modellierung Biologischer Systeme
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Dr. Mathias Beller

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2014

Rather than being wallflowers waiting to be asked to dance, droplets appear to be the life of the party, organellar butterflies. It will be fascinating to figure out the source of the droplets' charm in making new friends and to what ends this talent is used.

Joel M. Goodman

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Energiehomöostase	1
1.2	Die Biologie der Lipidtröpfchen.....	5
1.2.1	Der Lebenszyklus der Lipidtröpfchen.....	6
1.2.2	Die Proteine der Lipidtröpfchen.....	7
1.2.3	Der Transport von Proteinen auf Lipidtröpfchen und ihre Verankerung.....	9
1.2.4	Subpopulationen von Lipidtröpfchen.....	10
1.3	Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen.....	12
1.4	Ziele dieser Arbeit	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Chemikalien, Lösungen und Puffer	14
2.2	Plasmide.....	17
2.3	Oligonukleotide	20
2.4	Antikörper.....	22
2.5	Nährmedien	22
2.6	Zellkultur-Linien	24
2.7	Fluoreszenz-Farbstoffe	24
2.8	Fliegenlinien	25
2.9	Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	25
2.9.1	Test auf Letalität.....	25
2.10	Histologische Methoden.....	26
2.10.1	Probenvorbereitung	26
2.10.2	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung an vollständigen Embryonen	26
2.10.3	Antikörperfärbungen	26
2.10.3.1	Kolorimetrische Detektion.....	26
2.10.3.2	Fluoreszente Detektion	27
2.11	Herstellung von Präparaten von Zellkulturzellen.....	27
2.12	Mikroskopie.....	27
2.13	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.13.1	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	28
2.13.2	Gateway-System / Klonierung	28

2.13.3	Synthese von komplementärer DNA (cDNA)	29
2.13.4	Polymerase-Kettenreaktion	29
2.13.5	Mutagenese-PCR.....	29
2.13.6	Sequenzierung von DNA	30
2.14	Biochemische Methoden	30
2.14.1	Antikörper-Herstellung	30
2.14.2	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.....	30
2.14.3	Methanol/Chloroform-Proteinpräzipitation	31
2.14.4	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels <i>RC DC</i> Protein Assay	31
2.14.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.14.6	Western Blot Analyse.....	32
2.14.7	Bestimmung des Triacylglycerolgehalts	32
2.14.8	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA Assay	33
2.15	Zellkultur	34
2.15.1	Kultivierung von <i>Drosophila</i> Zellkulturlinien	34
2.15.2	Einfrieren / Auftauen von Zellen	34
2.15.3	Transiente Transfektion.....	34
2.15.4	Generierung stabil-transfizierter, polyklonaler Zelllinien.....	35
2.15.5	Populationsanalyse der EGFP-CG2254 Lokalisation	35
2.15.6	Kultivierung von Säugerzellkulturlinien.....	35
2.16	RNAi-Screen in <i>Drosophila</i> Zellkulturzellen.....	36
2.16.1	Herstellung doppelsträngiger RNA (dsRNA)	36
2.16.2	Durchführung des RNAi-Screens.....	37
2.16.3	Auswertung	38
2.17	Bioinformatik und Statistik	38
3	Ergebnisse	40
3.1	CG2254 gehört zur Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen	40
3.2	Die Lokalisation auf LD-Subpopulationen ist evolutionär konserviert.....	40
3.3	Charakterisierung der LD-Subpopulation	48
3.4	CG2254 lokalisiert ins ER und auf LDs.....	55
3.5	Struktur-Funktionsanalyse von CG2254	56
3.6	Struktur-Funktionsanalyse für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen	60
3.7	Notwendigkeit einzelner Aminosäuren für die Lokalisation von CG2254	63

3.8	Chimäre Proteine mit der LDSP-Sequenz von CG2254	66
3.9	Die Charakterisierung von CG2254 <i>in vivo</i>	69
3.9.1	Nachweis der CG2254 <i>in vivo</i> Expression.....	69
3.9.2	Funktionsanalyse von CG2254 <i>in vivo</i>	73
3.9.2.1	Funktion von CG2254 im Fettkörper.....	74
3.9.2.2	Funktion von CG2254 in der Ringdrüse.....	77
3.9.2.3	Funktion von CG2254 im Darm	83
4	Diskussion.....	86
4.1	CG2254 als annotierte SDR	86
4.2	Die Lokalisation zu LD-Subpopulation ist konserviert.....	87
4.3	CG2254 lokalisiert auf anabolisch aktiven LDs.....	88
4.4	Die LDL- und LDSP-Sequenz von CG2254 sind getrennt	91
4.5	Die Sortierung von CG2254 auf LD-Subpopulationen.....	92
4.6	Zu der <i>in vivo</i> Funktion von CG2254.....	95
4.6.1	CG2254 besitzt <i>in vivo</i> eine dynamische subzelluläre Lokalisation	96
4.6.2	CG2254 beeinflusst in der larvalen Entwicklung das Überleben und die Regulation der Energiehomöostase.....	98
4.7	Ausblick.....	102
5	Anhang	103
5.1	Daten aus dem RNAi-Screen in <i>Drosophila</i> Zellkultur	103
5.2	Struktur-Funktionsanalyse von <i>Drosophila</i> PERILIPIN 2.....	108
5.3	Ergänzende Daten zur <i>in vivo</i> Funktionsanalyse von CG2254	109
6	Zusammenfassung	115
7	Abkürzungsverzeichnis.....	117
8	Literaturverzeichnis.....	120
9	Danksagung	134
10	Eidesstattliche Erklärung.....	135

1 Einleitung

1.1 Energiehomöostase

Eines der grundlegenden Merkmale des Lebens ist die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch, die sogenannte Energiehomöostase. Dafür sind in den meisten Organismen Energiespeicher unerlässlich. Diese können überschüssige Energie sichern, um sie dann in Phasen mit erhöhtem Verbrauch oder mangelnder Nahrung wieder bereitzustellen. Gerät dieses Gleichgewicht aus der Balance, hat es für den Organismus schwerwiegende Folgen. Eine dauerhaft zu geringe Energieaufnahme führt zu Mangelerscheinungen und schließlich zum Tod. Doch auch die übermäßige Energieaufnahme ist schädlich. So berichtet die World Health Organization (WHO), dass im Jahr 2008 geschätzte 1,4 Milliarden erwachsene Menschen weltweit übergewichtig sind (*Body Mass Index* (BMI) ≥ 25) und davon 500 Millionen an Adipositas (BMI ≥ 30) leiden (WHO Fact sheet N°311: Obesity and overweight, 2013). Dies führt zu einem erhöhten Risiko für Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen oder bestimmte Krebsarten, sodass die WHO Übergewicht und Adipositas zu der fünft häufigsten Todesursache weltweit zählt (WHO, 2013). Verschiedene Faktoren können eine Adipositas begünstigen und verstärken: Genetische Veranlagung (Loos, 2012), epigenetische Effekte (Jang und Serra, 2014), der Einfluss des Darm-Mikrobioms (Tremaroli und Backhed, 2012) oder Krankheiten wie z. B. Hypothyreose (Schilddrüsenunterfunktion, Biondi, 2010). Doch das epidemische Ausmaß, welches Übergewicht und Adipositas mittlerweile erreicht haben, beruht vor allem auf der modernen Lebensweise, die durch eine zu hohe Nahrungsaufnahme bei gleichzeitig geringer Bewegung geprägt ist.

In vielzelligen Organismen wird ein komplexer Prozess benötigt, um die Energiehomöostase aufrechtzuerhalten. Energieaufnahme, -speicherung und -verwertung müssen koordiniert werden, um sich wechselnden Bedingungen wie Hunger, Nahrungsaufnahme oder Aktivität anzupassen. Im Stoffwechsel der Säuger nimmt hierbei die Leber eine zentrale Rolle ein. Sie dient als Speicher für Kohlenhydrate (als Glykogen) und für kleine Mengen an Fetten in Form von Triacylglycerolen (TAG). Die Hauptmenge des TAG wird in den Adipozyten des weißen Fettgewebes gespeichert. Dieses spezialisierte Gewebe besitzt durch das eingelagerte TAG die größten Energiereserven im Körper, die unter der Kontrolle der Hormone Glucagon und Insulin ab- oder aufgebaut werden können (Rosen und Spiegelman, 2006). Weitere Gewebe

haben wichtige Funktionen für den Energiehaushalt. Das Gehirn steuert das Essverhalten in Abhängigkeit von Signalstoffen, die es von anderen Organen bekommt. So sekretieren die Adipozyten des weißen Fettgewebes das Hormon Leptin, das auch als „Hungerhemmer“ betitelt wird, um dem Gehirn den Status der Lipidreserven zu signalisieren (Friedman, 2009). Auch der Darm ist nicht ausschließlich zur Resorption der Nährstoffe da, sondern sendet Hormone an das Gehirn. So messen Mechanosensoren im Gastrointestinaltrakt den Sättigungsgrad und signalisieren ihn dem Gehirn (Druce und Bloom, 2006). Daneben wird auch auf hormonellem Weg das Hungergefühl vermittelt. Die Ausschüttung des Hormons Ghrelin stimuliert den Appetit, während die Nahrungsaufnahme durch „Peptide YY“, „Glucagon-like peptide 1“ und „Oxyntomodulin“ inhibiert wird (Druce und Bloom, 2006). Viele Mechanismen der Energiehomöostase sind evolutionär konserviert. Daher können auch Tiere mit einem weniger komplexen Genom zur Erforschung von grundlegenden Konzepten des Metabolismus benutzt werden (Rajan und Perrimon, 2011), deren System zur Regulation des Energiehaushaltes weniger Komponenten hat als das von Säugern. In dieser Arbeit wurde dafür als Modellorganismus die Schwarzbäuchige Taufliege (*Drosophila melanogaster*, hiernach *Drosophila*) verwendet. Für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase sind bei ihr vor allem fünf Gewebe von Bedeutung (Abbildung 1): Der Fettkörper, das Gehirn, die daran angeschlossene neurosekretorische Ringdrüse, die Oenozyten und der Darm.

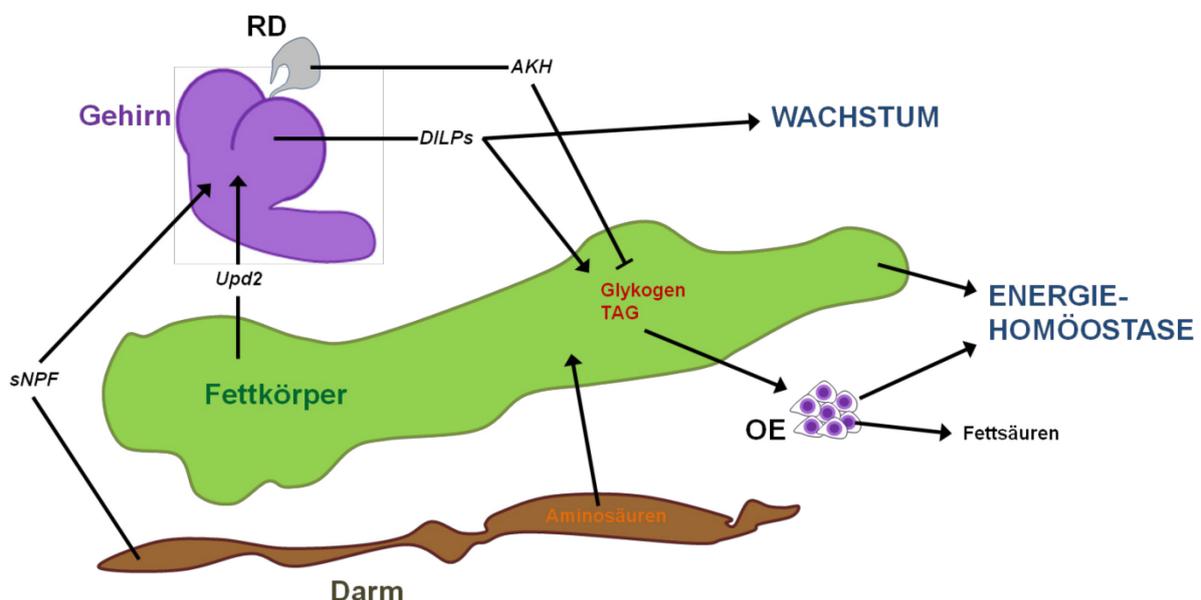


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kommunikation zwischen den Organen für die Energiehomöostase. Erläuterungen im Text. Abkürzungen: AKH = „Adipokinetische Hormone“, DILPs = „*Drosophila* insulin-like peptides“, sNPF = „short Neuropeptide F“, OE = Oenozyten, RD = Ringdrüse, TAG = Triacylglycerid, Upd2 = „Unpaired 2“. Abbildung nach Rajan und Perrimon, 2011.

Der Fettkörper ist ein einzigartiges Organ, das nur bei Insekten vorkommt (Abbildung 2). Er erfüllt Aufgaben, wie sie in Vertebraten von der Leber und den Adipozyten übernommen werden (Colombani *et al.*, 2003). Dabei spielt er eine Schlüsselrolle in der Speicherung und Bereitstellung von Energieträgern (Arrese und Soulages, 2010).

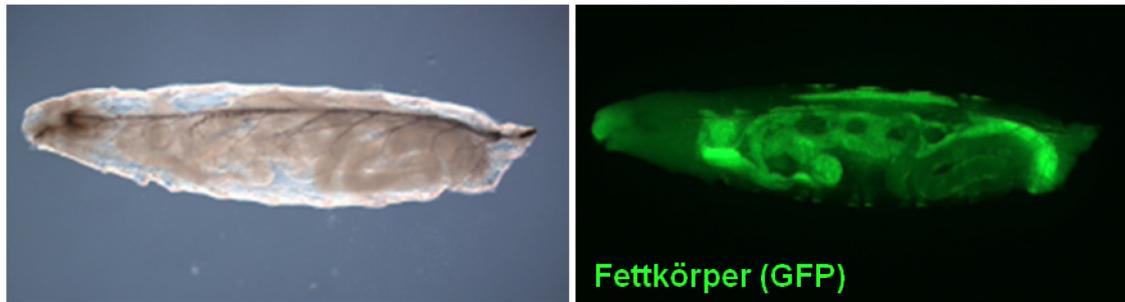


Abbildung 2: Der Fettkörper in *Drosophila* Larven. Links ist eine Durchlichtaufnahme dargestellt, rechts ist der Fettkörper durch Expression von GFP markiert. Die Abbildung stammt von S. Grönke.

Gespeichertes Glykogen wird zum Transport in Trehalose umgebaut (Thompson, 2003), während gespeichertes TAG zu Diacylglycerol (DAG) abgebaut wird, das gebunden an Lipophorin in die Hämolymphe abgegeben wird (Arrese und Soulages, 2010). Dieser Vorgang wird hauptsächlich durch zwei Peptidhormone reguliert. Zum einen sekretiert das *corpus cardiacum* (CC) in der Ringdrüse das „Adipokinetische Hormone“ (AKH) (Kim und Rulifson, 2004), zum anderen schütten die Insulin-produzierenden Zellen (IPC) des Gehirns die „*Drosophila* insulin-like peptides“ (DILPs) aus (Rulifson *et al.*, 2002b). Dabei erfüllt das AKH eine dem Glucagon der Säugetiere vergleichbare Funktion. Bei erhöhtem Energiebedarf stimuliert es im Fettkörper die Lipolyse, Glykogenolyse und Produktion von Trehalose (Kim und Rulifson, 2004). Im Gegensatz dazu ist es die Aufgabe der DILPs, nach der Nahrungsaufnahme die Synthese von Glykogen und TAG im Fettkörper zu aktivieren (Arrese und Soulages, 2010). Zwischen Gehirn und Fettkörper existiert aber auch ein Rückkopplungsmechanismus im Energiehaushalt, bei dem der Fettkörper über das Gehirn das Fressverhalten beeinflusst, indem er als Nahrungssensor fungiert. Über den Aminosäuren-Transporter „Slimfast“ kann der Fettkörper den über die Nahrung aufgenommenen Proteingehalt messen (Colombani *et al.*, 2003). Außerdem gibt er den Nährstoffstatus über das Zytokin „Unpaired 2“ (Upd2) an die IPCs weiter (Rajan und Perrimon, 2012). Upd2 ist das funktionelle Homolog des Säugerhormons Leptin. Darüber hinaus existiert ein Austausch von Fettsäuren zwischen dem Fettkörper und den Hepatozyten-ähnlichen Oenozyten (Gutierrez *et al.*, 2007). Die Oenozyten exprimieren lipidmetabolische Proteine, die Fettsäuren modifizieren, und sind besonders zu Hungerzeiten notwendig, um die vom

Fettkörper freigesetzten Fettsäuren zu verarbeiten (Gutierrez *et al.*, 2007). Der Darm in *Drosophila* kann wie der Säugetier-Darm durch die Ausschüttung von Hormonen das Fressverhalten beeinflussen, beispielsweise durch das „short Neuropeptid F“, das die Nahrungsaufnahme steigert (Lee *et al.*, 2004). Indirekt wirkt der *Drosophila*-Darm auch durch die in ihm enthaltenen Bakterien, dem sogenannten Darm-Mikrobiom, auf den Stoffwechsel ein. Dabei wird der Insulin-Signalweg des Wirts durch Metabolite der beiden Hauptvertreter dieses Mikrobioms, Bakterien der Gattung *Acetobacter* und *Lactobacillus*, moduliert (Shin *et al.*, 2011).

Der Energiehaushalt beeinflusst im starken Maße Wachstum und Entwicklung von Geweben, indem er die Zellteilung und das Überleben steuert. In der larvalen Entwicklung von Insekten spielt die Größe des Energiespeichers eine besondere Rolle, weil diese Periode die Körpergröße des adulten Tieres bestimmt. Zwei Grenzwerte sind dabei wichtig: Das Erreichen des „Minimalen lebensfähigen Gewichts“ und das Erreichen des „Kritischen Gewichts“ (Edgar, 2006). Larven, die das minimale lebensfähige Gewicht besitzen, können sich bei komplettem Nahrungsentzug zu adulten Fliegen entwickeln, die aber in ihrer Körpergröße kleiner sind (Beadle *et al.*, 1938); Larven, die das kritische Gewicht erreichen, können sich selbst bei Mangel an weiterer Nahrung ohne Zeitverzögerung verpuppen und besitzen als adulte Tiere Normalgröße (Bakker, 1959). Gesteuert wird die Länge der Larvenstadien durch die Aktivität des Insulin-Signalwegs und durch die Menge des Steroidhormons 20-Hydroxyecdysone (20E) (Edgar, 2006). Die Insulin-Signalkwirkung bestimmt die Entwicklungsrate, während durch die Sekretion des 20E aus der Prothorakaldrüse (PTG) der Übergang von Larve zur Puppe eingeleitet und somit die Dauer der larvalen Entwicklung begrenzt wird (Géminard *et al.*, 2006). Die Biosynthese von 20E in der PTG hängt dabei von der Nahrungsaufnahme ab, die ebenfalls in der PTG gemessen wird (De Moed *et al.*, 1999). Ein weiteres wichtiges Hormon für die larvale Entwicklung ist das Juvenilhormon (JH), dessen Sekretion von internen (z. B. Hormone, Genexpression) und externen (z. B. Nahrung, Länge der Photoperiode, Temperatur) Faktoren beeinflusst wird (Flatt *et al.*, 2005). Die genauen Zusammenhänge sind noch ungeklärt, doch wurde im Tabakswärmer *Manduca sexta* eine JH-vermittelte Verknüpfung des Energiehaushaltes mit der Bildung von Flügel-Imaginalscheiben entdeckt (Truman *et al.*, 2006).

1.2 Die Biologie der Lipidtröpfchen

In Zellen sind die Lipide in spezialisierten Organellen, den Lipidtröpfchen (engl. *lipid droplets*, LDs), eingelagert. Als Fettspeicher auf zellulärer Ebene spielen die zytoplasmatischen LDs somit eine prominente Rolle bei der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase. Zusätzlich werden LDs und die darin gespeicherten Lipide für eine Reihe weiterer Aufgaben verwendet, wie etwa der Membransynthese, der Proteinspeicherung oder der viralen Replikation (Übersichtsartikel Walther und Farese, 2012). Beinahe alle Zellen besitzen LDs oder sind zumindest in der Lage, sie zu bilden. Selbst in Bakterien kommen sie vor, hauptsächlich im Stamm der *Actinobacteria* (Wältermann und Steinbüchel, 2005). Die Anzahl und Größe der LDs schwankt dabei erheblich zwischen den verschiedenen Zelltypen (Walther und Farese, 2012). Während viele Zellen eher kleine LDs mit einer Größe von wenigen hundert Nanometern besitzen, füllen LDs in den Adipozyten das komplette Zytoplasma aus und erreichen so Durchmesser von bis zu 200 μm (Beller *et al.*, 2010b). In *Drosophila* Kc167-Zellkulturzellen wachsen LDs auf eine Größe von maximal 5 μm an (eigene Beobachtung). Trotz dieser Größenunterschiede besitzen LDs in allen Lebewesen denselben, evolutionär konservierten Aufbau (Beller *et al.*, 2010b): Ein hydrophober Kern aus Neutrallipiden, der vor allem Triacylglycerole (TAGs) und Sterolester (SE) enthält, ist umgeben von einer Phospholipid-Einzelschicht, an die verschiedene Proteine binden (Abbildung 3A). Diese Phospholipid-Einzelschicht macht LDs einzigartig unter den Zellorganellen, da sonst bei Biomembranen nur Doppelschichten vorkommen. Sie erst ermöglicht es, die Lipide im Kern der LDs vom wässrigen Zytosol zu trennen. Diese strukturelle Besonderheit hat zur Folge, dass sich die Biologie der LDs von denen der anderen Organellen teilweise unterscheidet, etwa in ihrer Bildung oder der Lokalisation von Proteinen auf ihre Oberfläche.

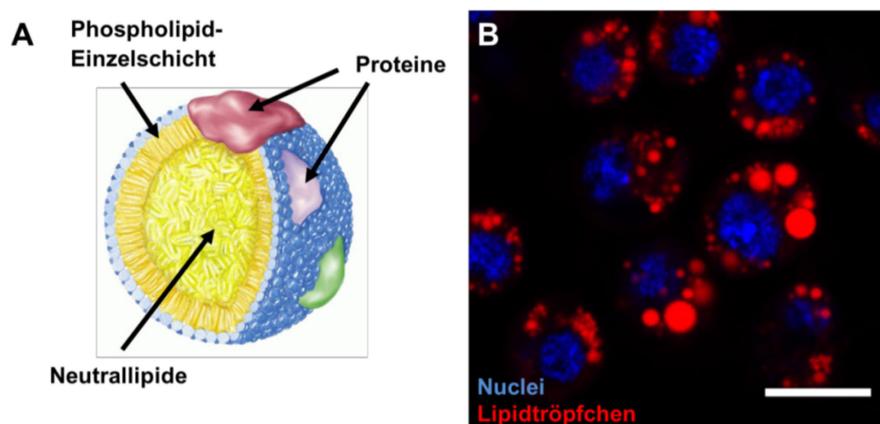


Abbildung 3: Darstellungen von LDs. (A) Schematischer Aufbau von LDs. Phospholipid-Einzelschicht (blau/gelb) umgibt einen Kern aus Neutrallipiden (gelb). An die LD-Oberfläche sind Proteine (rot, grün, violett) gebunden (Abbildung aus Beller, 2005). (B) Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von gefärbten LDs in *Drosophila* Kc167-Zellkulturzellen. Zellen wurden mit freien Fettsäuren behandelt, damit sie LDs bilden. LDs können mit spezifischen lipophilen Farbstoffen markiert werden (hier HCS LipidTOX DeepRed; DNA-Färbung mit Hoechst). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

1.2.1 Der Lebenszyklus der Lipidtröpfchen

Wenn Zellen im Organismus oder in Zellkultur einem Überschuss an freien Fettsäuren, wie z. B. Ölsäure (engl. *oleic acid*, OA), ausgesetzt sind, bilden sie LDs (Abbildung 3B). Die Bildung von LDs ist trotz oder gerade wegen ihrer einfachen Struktur noch nicht vollständig aufgeklärt. Selbst der Ort ihrer Synthese war lange Zeit unbekannt. Viele Hinweise deuten auf das endoplasmatische Retikulum (ER) als Entstehungsort hin. So befinden sich z. B. die Enzyme für die TAG-Synthese im ER (Buhman *et al.*, 2001) und kommen in der Nähe von LDs angereichert vor (Kuerschner *et al.*, 2008). Zudem sind das ER und LDs über Kontaktstellen direkt miteinander verknüpft (Wilfling *et al.*, 2013). Durch Gefrierbruch-Transmissionselektronenmikroskopie konnte des Weiteren gezeigt werden, dass LDs wie Eier in einem „Eierbecher“ von bestimmten Bereichen des ER umhüllt werden (Robenek *et al.*, 2006). Neuere Erkenntnisse von Kassan *et al.* (2013) lassen nun erkennen, dass sich LDs in Eukaryoten hauptsächlich in speziellen Mikrodomänen des ERs bilden. Für die Entstehung der LDs aus der ER-Doppelmembran existieren verschiedene Modelle. Das am meisten akzeptierte Modell beinhaltet eine „Knospung“ der LDs aus dem ER (Beller *et al.*, 2010b). Hierbei werden neusynthetisierte Fette zunächst innerhalb der ER-Membran eingelagert. Bei einer fortdauernden Fettsynthese reichern sie sich in den Mikrodomänen an (Kassan *et al.*, 2013). Dabei wölbt sich die zytosolische Hemimembran des ERs durch die Akkumulation der Lipide im Intermembranraum und wächst solange an, bis sie sich als reifes LD von der ER-Membran durch Knospung trennt. Aus biophysikalischer Sicht wird die Hypothese formuliert, dass es sich bei der LD-Bildung um einen Prozess handeln könnte, der dem Entnetzungsverhalten (engl. *dewetting*) entspricht (Thiam *et al.*, 2013). Flüssigkeiten können Oberflächen benetzen (*wetting*) und sich dabei ausbreiten oder im gegensätzlichen Vorgang entnetzen, bei dem sich Tröpfchen bilden. Bei LDs könnte dies erreicht werden, indem die Oberflächenspannung der Membran gesenkt wird. Dadurch wird es energetisch günstiger, Lipidtröpfchen zu formen (Thiam *et al.*, 2013). Um die Oberflächenspannung zu senken, kann in der Membran die Zusammensetzung der Phospholipide geändert oder Cholesterol eingelagert werden. Der Arf1/COPI-Komplex führt eine solche Modulation der Phospholipide an der LD-Membran durch (Wilfling *et al.*, 2014).

Die neu gebildeten LDs können auf verschiedene Weise an Umfang gewinnen. In *Drosophila* S2-Zellkulturzellen können nach der Zugabe von OA auf den größten LDs innerhalb der Zelle alle benötigten Enzyme für die Synthese von TAG nachgewiesen werden (Wilfling *et al.*, 2013). So kann neues TAG direkt an LDs gebildet und in deren Kern eingelagert werden. Aber auch ohne diese Enzyme können LDs wachsen. Entweder durch das Verschmelzen von

zwei LDs oder durch einen Lipidtransfer von kleinen LDs zu größeren LDs, ein Verfahren, das der Ostwald-Reifung (Ausgleich von Konzentrationsunterschieden durch Materiefluss von kleinen zu großen Kolloiden) gleicht (Thiam *et al.*, 2013). In beiden Fällen tritt eine energetisch günstige Senkung der Oberflächenspannung ein, doch die hohe Stabilität von eng aggregierten LDs lässt vermuten, dass Proteine für die Durchführung dieser Prozesse benötigt werden. Solch ein Protein ist beispielsweise das „fat-specific protein p27“ (Fsp27). Es lokalisiert an den Kontaktstellen zwischen zwei LDs und vermittelt den gerichteten Transfer der Lipide (Gong *et al.*, 2011).

Ohne Nachschub an neuen freien Fettsäuren werden die LDs wieder abgebaut. Am besten untersucht ist das in den Adipozyten von Säugern (Übersichtsartikel Lass *et al.*, 2011). Die Lipolyse läuft dort hormonell reguliert ab. Z. B. führt die Stimulation adrenerger Rezeptoren zur Phosphorylierung der „Hormonsensitiven Lipase“ (HSL) durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A und damit zur Aktivierung der HSL (Lass *et al.*, 2011). Zugleich wird auch das LD-assoziierte Protein Perilipin 1 (Plin1) phosphoryliert, das normalerweise verhindert, dass HSL auf LDs lokalisieren kann. Im phosphorylierten Zustand verliert Plin1 diese Barrierefunktion und ermöglicht damit die Lokalisation von HSL auf LDs (Sztalryd *et al.*, 2003). Der erste Schritt der Lipolyse wird bei Säugern von der „Adipose Triglyceride Lipase“ (ATGL, Zimmermann *et al.*, 2004) und in *Drosophila* vom ATGL-Homolog „Brummer“ (BMM, Grönke *et al.*, 2005) katalysiert. Die Aktivität der ATGL wird von den LD-assoziierten Proteinen „CGI-58“ und „G0/G1 Switch Protein 2“ (G0S2) gesteigert bzw. gehemmt (Lass *et al.*, 2011). Das Beispiel der ATGL-Regulation zeigt, wie bedeutend eine wechselnde Proteinkomposition für die Funktion der LDs ist.

1.2.2 Die Proteine der Lipidtröpfchen

Mit der Entdeckung von „Perilipin1“ (Plin1) als erstes LD-assoziiertes Protein und seiner Beteiligung an der Regulation der Fettspeicherung durch Greenberg *et al.* (1991) rückten LDs in den Fokus der Forschung. Um weitere LD-assoziierte Proteine zu identifizieren, die Funktionen im Lipidmetabolismus besitzen, wurden massenspektroskopische Analysen des LD-Proteoms in verschiedenen Organismen und Zelllinien durchgeführt, z. B. in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Athenstaedt *et al.*, 1999), in Fettkörpern aus *Drosophila*-Larven (Beller *et al.*, 2006) oder in CHO-K2 Zellen (Liu *et al.*, 2004). Dabei wurden erwartete Kandidaten identifiziert, wie z. B. Enzyme zum Auf- und Abbau von Fetten oder regulatorische Proteine wie z. B. die Perilipine. Aber auch andere Proteine, bei denen eine Verbindung zum Lipidmetabolismus nicht direkt ersichtlich ist, kommen auf LDs vor, wie

beispielsweise das bereits erwähnte Fsp27 oder Enzyme, die die Phospholipidzusammensetzung der LD-Membran beeinflussen wie die „Cytidin-Triphosphat:Phosphocholin-Cytidylyltransferase 1“ (CCT1, Kraemer *et al.*, 2011). Dazu gehören auch die Komponenten des Zytoskeletts, die den regulierten Transport von LDs entlang der Mikrotubuli (Welte *et al.*, 1998) oder Aktinfilamente gestatten (Bartz *et al.*, 2007). Selbst Histone, die Bestandteile des Chromatins zur Verpackung von DNA sind und deshalb normalerweise im Zellkern lokalisieren, befinden sich in *Drosophila*-Embryonen auf LDs (Li *et al.*, 2012). In diesem Fall fungieren die LDs als Speicher für die mütterlich bereitgestellten Histone, sodass ein Vorrat für eine schnelle Kernteilung vorhanden ist, ohne dass der Embryo den toxischen Eigenschaften von nicht-eingebundenen Histonen ausgesetzt ist (Li *et al.*, 2012).

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die regelmäßig bei Proteomanalysen in LD-angereicherten Fraktionen identifiziert wird, sind die kurzkettigen Dehydrogenasen/ Reduktasen (engl. *Short chain dehydrogenases/ reductase*, SDR). Bei Säugern sind es bislang 13 SDRs (u. a. Brasaemle *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2011, Beilstein *et al.*, 2013), bei *Drosophila* sieben (Beller *et al.*, 2006, Cermelli *et al.*, 2006). Von vier SDRs aus Säugern ist eine Lokalisation sowohl auf LDs als auch im ER bestätigt: „17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 11 (17 β -HSD11, Fujimoto *et al.*, 2004) und Typ 13“ (17 β -HSD13, Horiguchi *et al.*, 2008a), „Retinol Dehydrogenase 10“ (RDH10, Jiang und Napoli, 2013) und „Dehydrogenase/reductase (SDR Family) Member 3“ (DHRS3, Deisenroth *et al.*, 2011). Ihre Funktionen und wie sie mit der Lokalisation auf LDs zusammenhängen, wurden bisher kaum untersucht. 17 β -HSD11 katalysiert die Umsetzung des Testosteron-Metabolits 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol (Brereton *et al.*, 2001), doch deutet die breite Expression auch in nicht-steroidogenen Geweben darauf hin, dass die Hauptfunktion nicht im Metabolismus von Sexualhormonen liegt (Moeller und Adamski, 2009). RDH10 setzt als Enzym Retinol (Vitamin A) zu Retinal um und katalysiert damit die erste Reaktion zur Synthese von all-*trans*-Retinsäure. In COS7-Zellen wird durch eine Änderung der Lokalisation vom ER auf die LD-Oberfläche die Enzymaktivität gesteigert (Jiang und Napoli, 2013). Da DHRS3 am Abbau von all-*trans*-Retinsäure beteiligt ist (Haeseleer *et al.*, 1998), vermuten die Autoren, dass die beiden Enzyme an der retinalen Homöostase beteiligt sind. Die LDs würden hierbei für die SDRs als Depot der Substrate und Produkte dienen.

Alles in allem lässt die Vielzahl LD-assoziiierter Proteine erkennen, dass es sich bei den LDs um eine dynamische Zellorganelle handelt, die nicht nur für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase notwendig ist, sondern darüber hinaus vielfältige Aufgaben erfüllt.

1.2.3 Der Transport von Proteinen auf Lipidtröpfchen und ihre Verankerung

Die Verankerung von Proteinen an LDs unterscheidet sich gegenüber anderen Organellen in der Zelle insofern, dass die Einzelschicht-Membran keine integralen Proteine erlaubt, wie es sonst bei Doppelmembranen möglich ist. Bis jetzt sind vier Arten bekannt, wie sich Proteine an die LD-Oberfläche heften können (Abbildung 4A): Über amphipatische Helices, über eine sogenannte Haarnadelschleufe, durch eine Lipid-Verankerung oder durch Protein-Protein-Interaktionen.

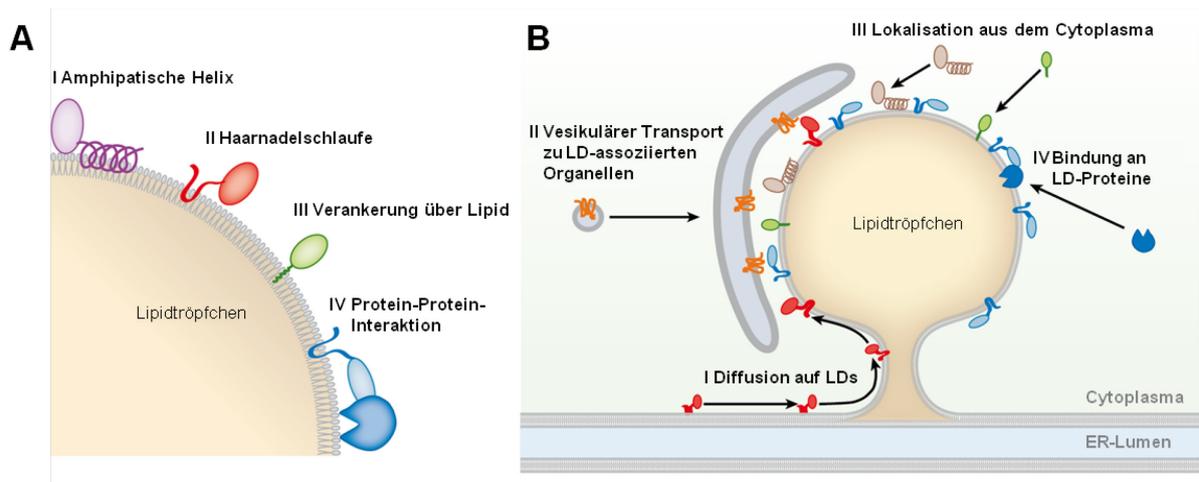


Abbildung 4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Arten, an LDs zu binden (A) und auf LDs zu gelangen (B). Abbildung übersetzt aus Walther und Farese, 2012.

Gleichzeitig gelangen LD-assoziierte Proteine auf verschiedenen Wegen dorthin (Abbildung 4B). Die erste Möglichkeit ist über das ER auf die LDs zu gelangen. Beide Organellen stehen über Brücken miteinander in Kontakt, über die sich Proteine von einer Organelle zur anderen bewegen können (Wilfling *et al.*, 2013, Abbildung 4B-I). Die Bildung dieser Brücken wird durch die Interaktion des Arf1/COPI-Komplexes mit LDs ausgelöst (Wilfling *et al.*, 2014). Für eine wachsende Anzahl von Proteinen konnte eine duale Lokalisation im ER und auf LDs demonstriert werden (z. B. Zehmer *et al.*, 2009, Thiel *et al.*, 2013, Wilfling *et al.*, 2013). Ob COPI-Vesikel auch direkt Proteine auf LDs transportieren, ist unbekannt, doch der Verlust der COPI-Funktion führt zu einer veränderten Komposition des LD-Proteoms (Beller *et al.*, 2008, Soni *et al.*, 2009). Ein Vesikel-vermittelter Transport ist daher eine weitere Möglichkeit, auf LDs gelangen (Abbildung 4B-II). Proteine, die sowohl auf LDs als auch im ER vorkommen, enthalten oft eine amphipatische Helix als Strukturelement (Abbildung 4A-I). Diese Helix besitzt auf der einen Seite vorwiegend hydrophobe und auf der anderen Seite vorwiegend polare Aminosäurereste, was einen gleichzeitigen Kontakt mit den veresterten Fettsäuren als auch mit dem Zytosol bzw. den Phosphatgruppen der

Membranlipide begünstigt. Proteine mit einer solchen Helix können so in die LD-Membran eingebettet werden. Allerdings ist noch nicht geklärt, wie die Helices die LD-Membran von anderen Membranen unterscheiden. Es wird vermutet, dass die Zusammensetzung der LD-Membranlipide dabei eine Rolle spielt, weil sie von der des ERs abweicht (Tauchi-Sato *et al.*, 2002). Die Haarnadelschleife ist ein weiteres Strukturelement zur Verankerung an LDs (Abbildung 4A-II). Sie besteht aus zwei benachbarten hydrophoben Bereichen, die durch einen sogenannten Prolinknoten (drei Proline innerhalb von zwölf Aminosäuren) getrennt sind (Abell *et al.*, 1997). Die Proline bewirken dabei eine Schlaufenbildung, über die eine Integration in die LD-Membran möglich ist. Haarnadelschleifen finden sich besonders bei den Oleosinen der Pflanzen (Abell *et al.*, 1997). Auch ohne diese speziellen Strukturelemente können Proteine an LDs binden. Posttranslationale Modifikationen ermöglichen eine stabile Verankerung von Proteinen in die LD-Membran (Abbildung 4A-III). Beispielsweise kann die kleine GTPase „Rab18“, welche den Transport von LDs reguliert, erst durch eine Prenylierung aus dem Zytosol auf LDs lokalisieren (Martin *et al.*, 2005, Abbildung 4B-III). Durch direkte Interaktionen mit anderen LD-assoziierten Proteinen können Proteine auf LDs gelangen (Abbildung 4A/B-IV). Hierzu gehört zum Beispiel die Lokalisation von HSL, die durch phosphoryliertes Plin1 vermittelt wird (Sztalryd *et al.*, 2003).

Nach einem in der Primärsequenz von LD-Proteinen kodierten Lokalisationssignal für den Transport von Proteinen zu LDs wird noch gesucht. Ein für alle LD-Proteine gültiges Motiv ist noch nicht bekannt, doch die genannten Strukturen wie hydrophobe Bereiche oder amphipatische Helices sind ein Anhaltspunkt. Bei den Proteinen „Caveolin“ und „Ancient ubiquitous protein 1“ (AUP1) sind zudem basische Aminosäuren in der Nähe der LD-Binderegion notwendig, damit sie auf LDs lokalisieren können (Ingelmo-Torres *et al.*, 2009, Stevanovic und Thiele, 2013). Doch weitere Hinweise zu einem allgemeinen LD-Lokalisationssignal fehlen. Daher ist es durchaus möglich, dass ein solches nicht existiert, sondern dass die verschiedenen Wege auf die LDs und die dortige Verankerung auch unterschiedliche Lokalisationssignale erfordern. Auch die Frage, ob die LD-Lokalisation überwiegend durch die Sequenz und Struktur der Proteine an sich bestimmt wird, oder durch *trans*-wirkende Proteine oder Proteinkomplexe muss für jede Lokalisationsweise einzeln betrachtet werden.

1.2.4 Subpopulationen von Lipidtröpfchen

Die LD-Lokalisationsmechanismen müssen dabei noch differenzieller sein, da sich LDs innerhalb einer Zelle in mehrere Subpopulationen aufteilen können (Beller *et al.*, 2010b).

2001 wurde mit einer dominant negativen Mutante von Caveolin 3 (Cav3^{DGV}) erstmals ein Protein identifiziert, das in Zellkulturzellen nur auf eine LD-Subpopulation lokalisiert (Pol *et al.*, 2001). Kurze Zeit später wurde gezeigt, dass Rab18 und Cav3^{DGV} sich gegenseitig ausschließende LD-Subpopulationen markieren (Martin *et al.*, 2005). Die Lokalisation von Rab18 auf LDs nimmt dabei unter lipolytischen Bedingungen zu, wodurch eine Verknüpfung zwischen der Protein-Lokalisation und dem metabolischen Status der LD-Subpopulationen hergestellt werden kann (Martin *et al.*, 2005). Auch für LDs, an denen anabole Prozesse stattfinden (hiernach „anabolisch aktive LDs“), konnten Marker-Proteine identifiziert werden (Wilfling *et al.*, 2013). Die beiden Proteine GPAT4 (Glycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase Isoform 4) und AGPAT3 (*sn*-1-Acylglycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase Isoform 3) katalysieren die ersten beiden Schritte in der TAG-Synthese (Abbildung 13). In *Drosophila* S2-Zellkulturzellen befinden sie sich nur auf einzelnen und den jeweils größten LDs innerhalb einer Zelle, da nur mit diesen Enzymen ein Wachstum durch neu gebildetes TAG stattfindet (Wilfling *et al.*, 2013).

Neben der Einteilung von LD-Subpopulationen im Bezug auf den metabolischen Status liegt auch eine im Bezug auf die Reifung der LDs vor. In sich differenzierenden Adipozyten lokalisieren z. B. Perilipine in Abhängigkeit von der LD-Reifung (Wolins *et al.*, 2006). Kleine, frisch gebildete LDs an den Zellrändern werden von anderen Perilipinen besetzt als die großen, älteren LDs, die für die Remobilisierung der gespeicherten Fettsäuren in fertig differenzierten Adipozyten abgebaut werden (Wolins *et al.*, 2006). Diese differenzielle Lokalisation der Perilipine tritt auch bei LD-Subpopulationen auf, die sich in ihrer Lipidzusammensetzung unterscheiden (Hsieh *et al.*, 2012). So zeigen die Perilipine Präferenzen, ob sie auf LDs mit hauptsächlich TAG oder auf LDs mit hauptsächlich Cholesterylestern lokalisieren (Hsieh *et al.*, 2012).

Die momentan vorhandenen Informationen über LD-Subpopulationen stammen überwiegend aus Zellkultur-Experimenten. Beispiele aus *in vivo* Untersuchungen sind rar und beschränken sich in Säugetieren auf die differenzielle Lokalisation von Perilipinen in pathologisch veränderten Geweben und Organen wie Fettlebern (Straub *et al.*, 2008) oder Tumoren (Straub *et al.*, 2010). Für das *Drosophila*-Protein CG2254 konnte mittels Überexpressionsstudien sowohl in Zellkulturzellen als auch im larvalen Fettkörper eine Lokalisation auf einzelnen LDs gezeigt werden (Beller *et al.*, 2006). Die biologische Bedeutung der LD-Diversifizierung auf zellulärer oder organismischer Ebene bleibt aber bis jetzt unklar und erfordert eine weitere Erforschung.

1.3 Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen

Wie zuvor dargestellt, werden SDRs in LD-Proteomen häufig identifiziert, so auch das in dieser Arbeit untersuchte *Drosophila* Proteins CG2254. SDRs sind NADP(H)-abhängige Enzyme und bilden eine große, heterogene Proteinfamilie mit bislang über 160.000 Mitgliedern in der Uniprot-Proteindatenbank (Persson und Kallberg, 2013). Allein im menschlichen Genom befinden sich mindestens 71 Gene, die für SDRs kodieren (Kavanagha *et al.*, 2008). SDRs katalysieren eine Vielzahl verschiedener Reaktionen, die den Metabolismus von Fetten, Aminosäuren, Zuckern, Hormonen und Xenobiotika betreffen und ein breites Spektrum an Substraten umfassen (Persson *et al.*, 2008). Die Sequenzidentität unter SDRs ist mit 20-30% nur niedrig, doch werden SDRs durch eine ähnliche Tertiärstruktur vereint (Kallberg *et al.*, 2010). Die meisten SDRs bestehen aus 250-350 Aminosäuren, oft mit *N*- oder *C*-terminalen Verlängerungen, die Transmembrandomänen oder Signalpeptide zur Protein-Lokalisation enthalten (Oppermann *et al.*, 2003). Zentrales Element aller SDRs ist eine *N*-terminal gelegene Rossmann-Proteinfaltung, die zur Bindung des Kosubstrats NAD(P) benötigt wird (Persson *et al.*, 1995). In diesem stärker konservierten Bereich befindet sich das glycinreiche GX₃GXG-Motiv als Teil der Nukleotid-Binderegion sowie das aktive Zentrum mit der katalytisch wichtigen Triade aus Serin, Tyrosin und Lysin (Filling *et al.*, 2002). Auf Basis dieser Motive lassen sich die SDRs in weitere Klassen („classical“, „extended“, „intermediate“, „divergent“ und „complex“) einteilen, wobei die meisten zu den „classical“ SDRs gehören, gefolgt von „extended“ (Kallberg *et al.*, 2010). Die Substratspezifität des Enzyms wird durch das *C*-terminale Ende bestimmt, das nicht nur in der Sekundär-, sondern auch in der Tertiärstruktur variabler ausfällt (Oppermann *et al.*, 2003). Eine Bestimmung des Substrats nur auf Basis der Sequenz ist deshalb nicht möglich (Oppermann *et al.*, 2003).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Bei der Analyse des LD-Proteoms von Fettkörpern aus *Drosophila* L3-Larven wurde das als SDR annotierte Protein CG2254 identifiziert (Beller *et al.*, 2006). Wird CG2254 als EGFP-Fusionsprotein in Zellkulturzellen oder im Fettkörper exprimiert, lokalisiert es nicht auf allen LDs, sondern nur auf einer LD-Subpopulation (Beller *et al.*, 2006). Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es nun, anhand von CG2254 dieses für LD-assoziierte Proteine ungewöhnliche Lokalisationsmuster zu untersuchen. Aufgrund der geringen Anzahl von Publikationen über LD-Subpopulationen sollte zunächst geklärt werden, ob und wie eine solche Lokalisation von CG2254 und sequenzähnlichen Proteinen aus anderen Spezies in *Drosophila*- und Säuger-Zellkulturzellen evolutionär konserviert ist. Mit Hilfe von CG2254 als Marker sollten die LD-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Entstehung und Funktion charakterisiert werden. Ein Hauptaugenmerk lag hierbei auf Untersuchungen der Lokalisationsmechanismen von Proteinen auf LDs. So sollte z. B. anhand einer Struktur-Funktionsanalyse von CG2254 bestimmt werden, welche Bereiche oder Motive für eine Lokalisation auf LD-Subpopulationen notwendig und ausreichend sind.

In vivo sollte des Weiteren analysiert werden, ob LD-Subpopulationen auch im Organismus vorkommen und welche Bedeutung das auf ihnen lokalisierte CG2254-Protein hat. Dazu sollte zunächst die Expression und subzelluläre Lokalisation des endogenen CG2254-Proteins untersucht werden, um so möglicherweise LD-Subpopulationen auch *in vivo* nachweisen zu können. Funktionen des Proteins sollten mit gezielten Änderungen der Proteinmenge durch Überexpression und RNAi analysiert werden. Mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit sollten die Grundlagen für Untersuchungen an Proteinen auf LD-Subpopulationen *in vivo* geschaffen werden, auf die zukünftige Studien aufbauen können. Zugleich sollte mit der Charakterisierung von CG2254 ein Marker entwickelt werden, der diese Studien zur Funktion von LD-Subpopulationen ermöglicht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

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

AppliChem (Darmstadt), Becton Dickinson and Company (Le Pont de Claix, Frankreich), Biomol (Hamburg), Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Carl Roth (Karlsruhe), Carlo Erba Reagents (Chaussée du Vexin, Frankreich), Grüssing (Filsum), Invitrogen (Carlsbad, USA), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), VWR International (Darmstadt)

Sämtliche Lösungen wurden mit vollentsalztem oder destilliertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert.

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Roche Diagnostics (Mannheim), Fermentas/Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Ipswich, USA), Promega (Madison, USA), Finnzymes/Thermo Fisher Scientific, (Espoo, Finnland)

APS, 10%	1 g Ammonium-Peroxidsulfat, auf 10 ml mit H ₂ O auffüllen
BBT, 10x, 1l	10 mM Tris 55 mM NaCl 40 mM KCl 7 mM MgCl ₂ 20 mM Glucose 50 mM Saccharose 0,1% BSA (frisch hinzufügen) 0,1% TWEEN-20 (frisch hinzufügen) pH 6,95
Dechlorionierungslösung	50% Klorix (Colgate-Palmolive, New York, USA) in H ₂ O

Material und Methoden

FBB	10 mM HEPES pH 7,6 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 1 Tablette „cOmplete, EDTA free“ (Protease Inhibitor Cocktail) (Roche Diagnostics, Mannheim) auf 50 ml FBB
Hybe	50% Formamid 5x SSC 5 µl/ml Heparin 5 mg/ml Torula yeast RNA 0,1% TWEEN-20 pH 6,7
Hybe B	50% Formamid 5x SSC
Lämmli-SDS-Laufpuffer, 10x, 1 l	30,3 g Tris/HCl 144 g Glyzin 1% SDS
Mowiol++	12 g Glycerol 4,8 g Mowiol 40-88 12 ml H ₂ O 24 ml 0,2 M Tris/HCl (pH 8,5) 2,5 mg DABCO/ml Mowiol 2 mg Gallate/ml (bis zu 8% (w/v))
PBS, 10x, 1 l	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ HPO ₄ pH 7,4
PBT-Puffer	1x PBS 0,1% TWEEN-20
RNA-Fix, 1 l	100 ml 10x PBS 100 ml 0,5 M EGTA (pH 8,0) 100 g Paraformaldehyd auf 1 l mit H ₂ O auffüllen pH-Wert 7,0

Material und Methoden

SDS-Proteinprobenpuffer, 5x	250 mM Tris/HCl pH 6,8 500 mM DTT 10% SDS 5 ml Glycerol 0,5% Bromphenolblau mit H ₂ O auf 10 ml auffüllen
SDS-Sammelgel, 2 ml	1,4 ml H ₂ O 0,33 ml Acrylamid-Mix (Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)) 0,25 ml 1 M Tris, pH 6,8 0,02 ml 10 % SDS 0,02 ml 10 % APS 0,002 ml TEMED
SDS-Trenngel, 10%, 10 ml	4 ml H ₂ O 3,3 ml Acrylamid-Mix (Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)) 2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS 0,1 ml 10 % APS 0,004 ml TEMED
SSC-Puffer, 20x, 1 l	175,32 g NaCl 88,23 g Natriumcitrat pH 7,0
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 0,5 mM EDTA, pH 8,0
Tobwin-Transferpuffer für Western Blot, 10x, 1 l	30,3 g Tris/HCl 144 g Glycin Vor der Verwendung zu der einfach verdünnten Lösung 20 % Methanol zugeben.

2.2 Plasmide

Für die Klonierungen wurde das Gateway-Rekombination-Klonierungssystem (Invitrogen, Carlsbad, USA, s. 2.13.2) benutzt. Tabelle 1 listet die verwendeten „Donor“- und „Destination“-Vektoren auf.

Tabelle 1: Vektoren für das Gateway-System

Vektorname	ID	Beschreibung	Referenz
pENTR/D-TOPO	153	„Donor“-Vektor im Gateway Rekombinationssystem	Ursprünglich von Invitrogen; modifiziert für Ligation über die Schnittstellen <i>NotI/AscI</i>
pTGW	150	„Destination“-Vektor im Gateway Rekombinations-System; <i>Drosophila</i> Expressionsvektor unter Gal4/UAS Kontrolle; Fusion mit <i>N</i> -terminalem EGFP	T. Murphy/DGRC
pUbiP-TdT-rfA	160	„Destination“-Vektor im Gateway Rekombinations-System; <i>Drosophila</i> Expressionsvektor unter Ubiquitin-Promotorkontrolle; Fusion mit <i>N</i> -terminalem TdT	A. Herzig, Abteilung H. Jäckle, MPIIbpc Göttingen
pUbiP-EGFP-rfA	151	„Destination“-Vektor im Gateway Rekombinations-System; <i>Drosophila</i> Expressionsvektor unter Ubiquitin-Promotorkontrolle; Fusion mit <i>N</i> -terminalem EGFP	A. Herzig, Abteilung H. Jäckle, MPIIbpc Göttingen
pH-YFP-N	212	„Destination“-Vektor im Gateway Rekombinations-System; Säuger- Expressionsvektor; Fusion mit <i>N</i> -terminalem YFP	Abteilung S. Hell, MPIIbpc Göttingen

Mit dem Entry-Klon von CG2254 wurden durch Rekombinationen vier verschiedene Vektoren für die Expression von Fusionsproteinen hergestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Plasmide mit CG2254

Vektorname	ID	Beschreibung	Referenz
pENTR-CG2254	89	ORF von CG2254 wurde vom EST RH47744 per PCR amplifiziert und mit <i>NotI/AscI</i> in pENTR/D-TOPO kloniert; Aminosäurenaustausch an Position 13 von N zu K	Beller <i>et al.</i> , 2006
pTGW-CG2254	91	Erhalten durch Gateway Rekombinationsreaktion von pENTR-CG2254 mit pTGW	Beller <i>et al.</i> , 2006
pUbi-EGFP-CG2254	90	Erhalten durch Gateway Rekombinationsreaktion von pENTR-CG2254 mit pUbiP-EGFP-rfA	Diese Arbeit
pH-YFP-CG2254	276	Erhalten durch Gateway Rekombinationsreaktion von pENTR-CG2254 mit pH-YFP-N	Diese Arbeit
pUbi-TdT-CG2254	114	Erhalten durch Gateway Rekombinationsreaktion von pENTR-CG2254 mit pUbiP-TdT-rfA	Beller <i>et al.</i> , 2006

In dieser Arbeit wurden für eine Struktur-Funktionsanalyse durch gezielte Mutagenese-PCR mit den Vektoren pENTR-CG2254 und pENTR-PLIN2 (Beller *et al.*, 2006) Deletions- und Punktmutationen hergestellt (s. 2.13.5). Mit Hilfe des Gateway-Systems (2.13.2) wurden diese Konstrukte in die Destinationsvektoren pTGW und pUbiP-EGFP-rfA rekombiniert und anschließend kloniert. Tabelle 3 listet die Entry- und jeweiligen Expressionsvektoren auf.

Tabelle 3: Vektoren der Struktur-Funktionsanalyse

Entry-Vektor	ID	Mutation	Expressionsvektor	ID
pENTR-CG2254 N	213	CG2254 aa1-48	pTGW-CG2254 N	214
pENTR-CG2254 C	221	CG2254 aa239-320	pTGW-CG2254 C	222
pENTR-CG2254 NM	215	CG2254 aa1-238	pTGW-CG2254 NM	216
pENTR-CG2254 MC	219	CG2254 aa49-320	pTGW-CG2254 MC	220
pENTR-CG2254 delta1-20	250	CG2254 aa21-320	pTGW-CG2254 delta1-20	251
pENTR-CG2254 21-48	299	CG2254 aa21-48	pUbi-CG2254 21-48	300
pENTR-CG2254 1-120	256	CG2254 aa1-120	pTGW-CG2254 1-120	257
pENTR-CG2254 1-90	254	CG2254 aa1-90	pTGW-CG2254 1-90	255
pENTR-CG2254 1-60	252	CG2254 aa1-60	pTGW-CG2254 1-60	253
pENTR-CG2254 aa1-73	362	CG2254 aa1-73	pUbi-CG2254 aa1-73	363
pENTR-CG2254 aa1-82	364	CG2254 aa1-82	pUbi-CG2254 aa1-82	365
pENTR-CG2254 delta49-90	403	CG2254 Δ49-90	pUbi-GFP CG2254 delta49-90	404
pENTR-CG2254 delta49-238	407	CG2254 Δ 49-238	pUbi-CG2254 delta49-238	408
pENTR-CG2254 1-48::91-120	429	CG2254 aa1-48::91-120	pUbi-CG2254 1-48::91-120	430
pENTR-CG2254 D28V K35I	491	Punktmutationen CG2254 aa1-90 D28V / K35I	pUbi-GFP CG2254 D28V K35I	492
pENTR-CG2254 1-90 T84A	421	Punktmutation CG2254 aa1-90 T84A	pUbi-CG2254 1-90 T84A	425
pENTR-CG2254 1-90 C87G	526	Punktmutation CG2254 aa1-90 C87G	pUbi-CG2254 1-90 C87G	527
pENTR-CG2254 1-90 W88G	422	Punktmutation CG2254 aa1-90 W88G	pUbi-CG2254 1-90 W88G	426
pENTR-CG2254 1-90 D89A	423	Punktmutation CG2254 aa1-90 D89A	pUbi-CG2254 1-90 D89A	427
pENTR Plin2 N	192	PLIN2 aa1-152	pTGW Plin2 N	193
pENTR Plin2 NM	194	PLIN2 aa1-230	pTGW Plin2 NM	195
pENTR Plin2 MC	196	PLIN2 aa140-352	pTGW Plin2 MC	197
pENTR Plin2 C	198	PLIN2 aa231-352	pTGW Plin2 C	199
pENTR Plin2 M	200	PLIN2 aa140-230	pTGW Plin2 M	201
pENTR Plin2 140-230	259	PLIN2 aa140-230	pTGW Plin2 140-230	260
pENTR Plin2 140-180	293	PLIN2 aa140-180	pUbi Plin2 140-180	294
pENTR Plin2 1-120	311	PLIN2 aa1-120	pUbi Plin2 1-120	312

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *CG2254* verwandte Gene aus verschiedenen Spezies mittels PCR amplifiziert. Die dabei eingesetzten Oligonukleotide enthielten *NotI/AscI*-Schnittstellen, wodurch eine Ligation und Klonierung im modifizierten pENTR/D-TOPO ermöglicht wurde. Anschließend wurden diese Vektoren im Gateway-System verwendet.

Tabelle 4: Vektoren mit *CG2254* verwandten Proteinen

Entry-Vektorname	ID	Beschreibung	Expressionsvektor	ID
pENTR-17b-HSD-type11	468	ORF von <i>17β-HSD-type11</i> wurde mit cDNA aus 3T3-Zellen per PCR amplifiziert	pUbi-EGFP-17b-HSD-type11 pH-YFP-17b-HSD-type11	476 477
pENTR-DHRS3	466	ORF von <i>DHRS3</i> wurde mit cDNA aus 3T3-Zellen per PCR amplifiziert	pUbi-EGFP-DHRS3 pH-YFP-DHRS3	472 473
pENTR-DHS4	465	ORF von <i>DHS-4</i> wurde mit <i>C. elegans</i> N2 cDNA per PCR amplifiziert	pUbi-EGFP-DHS4 pH-YFP-DHS4	470 471
pENTR-ERD2	469	ORF von <i>ERD-2</i> wurde mit larvaler <i>A. mellifera</i> cDNA per PCR amplifiziert	pUbi-EGFP-ERD2-like(2) pH-YFP-ERD2-like(2)	478 479
pENTR-RDH10	467	ORF von <i>RDH10</i> wurde mit cDNA aus 3T3-Zellen per PCR amplifiziert	pUbi-EGFP-RDH10 pH-YFP-RDH10	474 475

Tabelle 5: Verwendete Vektoren für die Erstellung von chimären Proteinen

Vektorname	ID	Beschreibung	Referenz	Expressionsvektor	ID
pENTR-PLIN2	74	ORF von <i>PLIN2</i> wurde vom EST RE58939 per PCR amplifiziert und mit <i>NotI/AscI</i> in pENTR/D-TOPO kloniert	Beller <i>et al.</i> , 2006		
pENTR-CG9186	15	ORF von <i>CG9186</i> wurde vom EST LP01162 per PCR amplifiziert und mit <i>NotI/AscI</i> in pENTR/D-TOPO kloniert	Y. Zhao, 2007		
pENTR-CG9186 w/o stop	321	ORF von <i>CG9186</i> wurde vom Vektor #15 per PCR ohne Stoppcodon amplifiziert und mit <i>NotI/AscI</i> in pENTR/D-TOPO kloniert	Diese Arbeit		
pENTR-PLIN2::CG2254 49-90	319	Die Sequenz von <i>CG2254aa49-90</i> wurde mit PCR amplifiziert und über die <i>AscI</i> Schnittstelle im pENTR-PLIN2 kloniert	Diese Arbeit	pUbi-GFP GPLIN2::CG2254 49-90	320
pENTR-PAT-CG2254 aa49-90	484	Die Sequenz von <i>CG2254aa49-90</i> wurde mit PCR amplifiziert und über die <i>AscI</i> Schnittstelle im pENTR-PLIN2aa1-152 kloniert	Diese Arbeit	pUbi-GFP PAT-CG2254 aa49-90	485
pENTR-CG9816::2254aa49-90	338	Die Sequenz von <i>CG2254aa49-90</i> wurde mit PCR amplifiziert und über die <i>AscI</i> Schnittstelle im pENTR-CG9186 w/o stop kloniert	Diese Arbeit	pUbiP-GFP CG9816::2254aa49-90	339
pENTR-CG91861-195::CG2254 49-90	317	Die Sequenz von <i>CG2254aa49-90</i> wurde mit PCR amplifiziert und über <i>BglII/AscI</i> Schnittstellen im pENTR-CG9186 eingesetzt	Diese Arbeit	pUbi-GFP CG9186 1-195::CG2254 49-90	318

Tabelle 6: Weitere Plasmide

Vektorname	ID	Beschreibung	Referenz
pAct-Gal4	158	<i>Drosophila</i> Expressionsvektor; Expression von GAL4 unter Actin-Promotorkontrolle	P. Müller, Abteilung H. Jäckle, MPIbpc Göttingen
pCoBlast	188	Vektor zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien auf Basis von Blastocidin-Selektion	Invitrogen
pA-cherry-W-GPAT4	410	<i>Drosophila</i> Expressionsvektor für die Expression von mCherry-markiertem GPAT4	Wilfling <i>et al.</i> , 2013

Vektorname	ID	Beschreibung	Referenz
pA-cherry-W-DGAT2	411	<i>Drosophila</i> Expressionsvektor für die Expression von mCherry-markiertem DGAT2	Wilfling <i>et al.</i> , 2013
pA-GFP-W-sec61β	409	<i>Drosophila</i> Expressionsvektor für die Expression von GFP-markiertem sec61β	Wilfling <i>et al.</i> , 2013

2.3 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligo-nukleotide	Sequenz 5'-3'	Verwendung
Vector_Stop_for	PHO- TAGGGGCGCGCCGACCCAGC	Mutagenese-PCR für C-terminale Deletionen
Vector_Start_re	PHO- CATGGTGGCGGCCGCGGAGC	Mutagenese-PCR für N-terminale Deletionen
2254_D28V_K35I_r	GCATCACGATGaCAACCACCAG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 D28V K35I
2254_D28V_K35I_f	PHO- TGATCGTCA ^t ATTCTGGCTCGC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 D28V K35I
CG2254_T84A	GACATCCCAGCAGAGAATGGcGG CGCC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 1-90 T84A
2254 C87G rev	PHO- GCCCAGCTTGCGTACTGCAG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 aa1-90 C87G
2254 C87G fwd	PHO- GCCACCATTCTCgGCTGGGATG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 aa1-90 C87G
CG2254_W88G	GACATCCCcGCAGAGAATGGTG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 aa1-90 W88G
CG2254_D89A	GACAgCCCAGCAGAGAATGGTG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 aa1-90 D89A
CG2254_Nterm_rev	PHO- GAAAAGTCCAACGATAGCTTCCG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 N
CG2254_Mitte_re	GGTAGTCAGCTTGACGTTGTTTC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 NM
CG2254_Mitte_for	PHO- CGCGCGCCGCCGCTCGATGATG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 MC
CG2254_Cterm_for	PHO- ATATATCCGTATATGATCGATACG GGTC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 C
CG2254_AA21_for	CTCCGCGGCCGCCACCAACATTG TCCTGCTGG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 delta1-20
CG2254_A120_rev	GCTAGGCGCGCCCTACTCGCGC TTGGTCACATTG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 1-120
CG2254_AA90_rev	GCTAGGCGCGCCCTAGACATCC CAGCAGAGAATG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 1-90
CG2254_AA82_rev	GCCCAGCTTGCGTACTGCAGTG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 aa1-82
CG2254_AA73_rev	TGCCATCTCCTTGCCCATGCCG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 aa1-73
CG2254_AA60_rev	GCTAGGCGCGCCCTACACCTTGC CATTGACATC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 1-60
CG2254 91 fwd	AATGAGCAGACCAATAACCAGAC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR-CG2254 1-48::91-120

Oligo-nukleotide	Sequenz 5'-3'	Verwendung
CG2254_49-90_fw	GGGCGCGCCCGCGCGCCGC	Klonierung der LDSP-Sequenz an PLIN2
CG2254 an Plin2	aatttGGCGCGCCCGCGCGCCGC GCTC	Klonierung der LDSP-Sequenz an PLIN2aa1-153
9186_noStop_Asc	AATTTGGCGCGCCCAACAGTCT GTG	ORF Vervielfältigung von CG9186 ohne Stoppcodon
CG2254 an CG9186	aatttAGATCTACTTCCGCGCGCCG CCGCTC	Klonierung der LDSP-Sequenz an CG9185aa1-195 über BglII
17b-HSD-XI_rev	gcaaggcgcgccTCACTTGTCTTTGTA CCCAACAAC	ORF Vervielfältigung von 17beta HSD type11 aus <i>M. musculus</i>
17b-HSD-XI_fwd	gcaagcgccgcccaccATGAAGTATCT TCTTGACTTGATC	ORF Vervielfältigung von 17beta HSD type11 aus <i>M. musculus</i>
DHS-4_rev	gcaaggcgcgccCTATTTGTGGAATC TTCCAAG	ORF Vervielfältigung von DHS-4 aus <i>C. elegans</i>
DHS-4_fwd	gcaagcgccgcccaccATGTTTCGATAT TATTCTAGAAATTG	ORF Vervielfältigung von DHS-4 aus <i>C. elegans</i>
DHRS3_rev	gcaaggcgcgccCTATGTCTCCCT TAAAGG	ORF Vervielfältigung von DHRS3 aus <i>M. musculus</i>
DHRS3_fwd	gcaagcgccgcccaccATGGTGTGGAA ATGGCTGG	ORF Vervielfältigung von DHRS3 aus <i>M. musculus</i>
RDH10_rev	gcaaggcgcgccTTAGATTCCATTTTT TGCTTCATTG	ORF Vervielfältigung von RDH10 aus <i>M. musculus</i>
RDH10_fwd	gcaagcgccgcccaccATGAACATCGT AGTGGAGTTC	ORF Vervielfältigung von RDH10 aus <i>M. musculus</i>
RDH_bee_2_rev	gcaaggcgcgccTCATCCAAAGTCAA CACCGG	ORF Vervielfältigung von ERD-2 aus <i>A. mellifera</i>
RDH_bee_2_fwd	gcaagcgccgcccaccATGAAGAATTT GAGAAGAAAACC	ORF Vervielfältigung von ERD-2 aus <i>A. mellifera</i>
mdy_fwd	taatacgtactactataggGGAGTTTTG AATGGAGGTGAA	Generierung von Vorlagen für die dsRNA Herstellung von <i>midway (mdy)</i>
mdy_rev	taatacgtactactataggGGAGTTTTG AATGGAGGTGAA	Generierung von Vorlagen für die dsRNA Herstellung von <i>midway (mdy)</i>
DRSC30905_R	gtaatacgtactactataggGCGACCCAG CTATTCAAAA	Generierung von Vorlagen für die dsRNA Herstellung von <i>thread (th)</i> , DRSC Amplicon-Nummer 30905
DRSC30905_S	gtaatacgtactactataggTATCGTAGCT TATTGGCGGC	Generierung von Vorlagen für die dsRNA Herstellung von <i>thread (th)</i> , DRSC Amplicon-Nummer 30905
Plin2_Nterm_rev	PHO- AGCTGCCTTGAACCTGACGACG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR Plin2 N
Plin2_Mitte_rev	AACTGGCATGTCATTTTCAGAAC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR Plin2 NM
Plin2_Mitte_for	PHO- AAGGGCATCGATAAGCTTGAG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR Plin2 M
Plin2_Cterm_for	PHO- CCCGCCAGCGAGGATCCAGTC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR Plin2 C
Plin2_AA180_rev	PHO-AGC CAG ACT GCC GTA CTG GG	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR Plin2 140-180
Plin2_AA140_for	PHO-CAG CCC CAT CTG GAG CGC GTC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR Plin2 140-230 und 140-180
PLIN2 1-120 rev	TTA AAG GGC GCG CCCG ATG ATC GGC GCC TTT AC	Mutagenese-PCR für Entry-Vektor pENTR Plin2 1-120

2.4 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Referenz
Meerschweinchen α CG2254 #1 (aufgereinigt, Konz. 0,28 μ g/ μ l)	1:2000 (Western Blot) 4 μ g/ml (Immunohistochemie)	Diese Arbeit (siehe 2.14.1)
Meerschweinchen α CG2254 #2 (aufgereinigt, Konz. 0,23 μ g/ μ l)	1:2000 (Western Blot) 0,1 und 4 μ g/ml (Immunohistochemie)	Diese Arbeit (siehe 2.14.1)
Kaninchen α PLIN2	1:3000	Grönke <i>et al.</i> , 2003
Ziege α ADH/dG20	1:250	Santa Cruz Biotech, Dallas, USA
Maus α Actin(JLA20)	1:500	Developmental Studies Hybridoma Bank
α Meerschweinchen HRP gekoppelt	1:10000	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
α Kaninchen HRP gekoppelt	1:40000	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
α Ziege HRP gekoppelt	1:40000	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
α Maus HRP gekoppelt	1:40000	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
α DIG mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt	1:2000	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
α Kaninchen mit Alexa568 gekoppelt	1:500	Invitrogen, Carlsbad, USA
α Meerschweinchen biotinyliert	1:500	Biomol, Hamburg

2.5 Nährmedien

Apfelsaft-Agarplatten (auf 3 l H₂O)

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

Fliegen-Futtermischung

Die komplexen Mais-Soja-Zuckerrübensirup-Futtermischungen unterscheiden sich in den Mengen der einzelnen Zutaten zwischen den Rezepten der AG Klein an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und der AG Jäckle am MPIbpc Göttingen (Tabelle 9). Bei den Versuchen mit einer quantitativen Messung (Überlebensrate und TAG-Assay) wurden die Larven und Fliegen auf Futter gehalten, das nach dem Protokoll der AG Klein hergestellt wurde.

Tabelle 9: Inhaltsangabe für komplexes Fliegenfutter (für 100 ml)

	AG Klein	AG Jäckle
Agar	0,5 g	0,624 g
Maisschrot	7,1 g	8 g
Sojamehl	0,95 g	1 g
Trockenhefe	1,68 g	1,8 g
Rübensirup	4 g	2,2 g
Malzextrakt	4,5 g	8 g
Nipagin (10% in EtHO)	1,5 ml	1,5 ml
Propionsäure	0,45 ml	0,63 ml

LB-Medium (auf 1 l H₂O)

- 10 g Bacto-Trypton
- 5 g Bacto-Hefe Extrakt
- 10 g NaCl
- (15g Agar für LB-Agarplatten)

Ölsäure-Lösung

- 2,8 g BSA (fettsäurefrei)
 - 20 ml 0,1 M Tris, pH 8,0
 - 78 µl Ölsäure (Calbiochem/Merck, Darmstadt)
- Bei 37 °C für 1 h inkubieren, mit einem sterilen Filter (0,22 µm) in ein Gefäß abfüllen und bei 4 °C lagern.
- ⇒ Die Zugabe von 32 µl/ml Medium ergibt eine Konzentration von 400 µM.

Schneider's *Drosophila* Kompletmedium (Schneider's Medium)

- 450 ml Schneider's *Drosophila* Medium (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA, und PAN-Biotech, Aidenbach)
- 50 ml hitzeinaktiviertes (30 min bei 56 °C) fötales Kälberserum („Gold“ von PAA Laboratories; Pasching, Österreich, oder „South Africa“ von PAN-Biotech, Aidenbach)
- 100 I.U. Penicillin (Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA).
- 100 µg/ml Streptomycin (Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA)

Für die Kultivierung von stabil-transfizierten Zellen zusätzlich:

- 10 µg/ml Blasticidin-S HCl (Invitrogen, Carlsbad, USA und AppliChem, Darmstadt)

Für die Kultivierung der ML-DmBG3-c2-Zelllinie zusätzlich:

- 100 µg/ml Insulin solution human (Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.6 Zellkultur-Linien

Tabelle 10: Verwendete Zellkultur-Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz	Erhalten von
Kc167	embryonale Zelllinie aus <i>D. melanogaster</i> mit Plasmatozyten-ähnlichem Expressionsmuster	Echalier und Ohanessian, 1969, Cherbas <i>et al.</i> , 2011	M. Beller (Zelllinie aus Harvard)
ML-DmBG3-c2	L3 larvale Zellen aus <i>D. melanogaster</i> mit neuronalen Charakteristika	Ui <i>et al.</i> , 1994	M. Beller (Zelllinie vom DGRC)
HeLa	menschliche Zelllinie, ursprünglich aus einem Zervixkarzinom	Scherer <i>et al.</i> , 1953	K. Tschapalda
MDCK	Nierenzellen aus <i>Canis familiaris</i>	Gaush <i>et al.</i> , 1966	K. Tschapalda
AML12	Hepatozyten aus <i>Mus musculus</i>	Wu <i>et al.</i> , 1994	K. Tschapalda
COS7	Nierenzellen aus <i>Cercopithecus aethiops</i>	Gluzman, 1981	K. Tschapalda
HEK-293	Menschliche embryonale Nierenzellen	Graham <i>et al.</i> , 1977	Abteilung R. Jahn, MPIbpc Göttingen
CHO	Zellen aus den Eierstöcken von <i>Cricetulus griseus</i>	Puck <i>et al.</i> , 1958	C. Sztalryd

2.7 Fluoreszenz-Farbstoffe

Angegeben sind die Wellenlänge für die Anregung und ein beispielhafter Bereich für die Detektion der Emission. Dieser ist variabel und hängt von den weiteren verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffen ab.

BODIPY 493/503 (Life Technologies, Carlsbad, USA)

Verdünnung 1:2000 bei Färbungen von Zellkulturzellen.

Anregung: 488 nm, detektierter Emissionsbereich: 493-598 nm

HCS LipidTOX DeepRed neutral lipid stain (Life Technologies, Carlsbad, USA)

Verdünnung 1:250 bei Färbungen von Zellkulturzellen, 1:500 bei larvalem Gewebe.

Anregung: 633 nm, detektierter Emissionsbereich: 638-759 nm

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Life Technologies, Carlsbad, USA)

Verdünnung 1:500 zum Färben von DNA

Anregung: 405 nm, detektierter Emissionsbereich: 410-514 nm

Hoechst33258/Bisbenzimid (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Verdünnung 1:500 (Stockkonzentration: 1 mg/ml)

Anregung: 405 nm, detektierter Emissionsbereich: 410-496 nm

2.8 Fliegenlinien

Tabelle 11: Verwendete Fliegenlinien

Bezeichnung	MBD-Nr.	Genotyp	Referenz
UAS-CG2254-GFP	190	w^* ; $P\{w[+mC]UAS-CG2254:EGFP\}/CyO$	Beller <i>et al.</i> , 2006
CG2254 RNAi-Linie 1 (HMS01622)	121	$y[1] sc^* v[1]; P\{y[+t7.7] [+t1.8]=TRiP.HMS01622\}attP2$	Bloomington Drosophila Stock Center (B136731)
CG2254 RNAi-Linie 2 (VDRC 101149)	191	$y[1] w[1118]; P\{KK105040\}VIE-260B$	VDRC (Dietzl <i>et al.</i> , 2007)
CG2254 RNAi-Linie 3 (VDRC 5470)	192	$w[1118]; ; P\{GD3278\}v5470$	VDRC (Dietzl <i>et al.</i> , 2007)
TRiP Kontrolllinie	261	$y[1] v[1]; P\{y[+t7.7]=CaryP\}attP2$	Bloomington Drosophila Stock Center (B136303)
VDRC[1118] Kontrolllinie	185	$w[1118]$	VDRC (Dietzl <i>et al.</i> , 2007)
Fettkörper-Gal4	59	w^* ; $P\{w[+mW.hs]=GawB\}FB+SNS$	Grönke <i>et al.</i> , 2003
Di-11	228	10,8 kb des <i>hmgcr</i> Promotors regulieren die Expression von Gal4, der Stock ist homozygot letal. Das Allel wird über das <i>Ser</i> -Balancierchromosom mit Actin-GFP und <i>Tb</i> stabilisiert.	Belgacem und Martin, 2007
Di-3	229	3,8 kb des <i>hmgcr</i> Promotors regulieren die Expression von Gal4. Das Allel wird über ein <i>Ser</i> -Balancierchromosom mit Actin-GFP und <i>Tb</i> stabilisiert.	Belgacem und Martin, 2007
2-286-Gal4	227	$y^*? w^*?; ; 2-286-GAL4\{w+\}/TM6$	Timmons <i>et al.</i> , 1997
Feb36-Gal4	117	w^* ; $Feb36-GAL4\{w\}$	Siegmund und Korge, 2001, Thummel, 2010
NPC1b-Gal4	58	0,9 kb des <i>NPC1b</i> Promotors regulieren die Expression von Gal4. Insertion auf dem X-Chromosom, für den Test auf Letalität stabilisiert über Balancierchromosom FM6.	Voght <i>et al.</i> , 2007

2.9 Haltung von *Drosophila melanogaster*

Die Fliegenstämme wurden nach Standardmethoden (Ashburner, 1989) in Kunststoffröhrchen auf einer komplexen Mais-Soja-Zuckerrübensirup-Futtermischung (2.5) bei 18 °C oder 25 °C mit 20-30 % Luftfeuchtigkeit und einem 12 h Tag-/Nacht-Rhythmus gehalten. Bei den Experimenten wurden die Fliegen zum Teil bei 29 °C in einem Inkubator ohne Luftfeuchtigkeitsregulation und ohne Tag-/Nachtrhythmus gehalten.

2.9.1 Test auf Letalität

Zum Testen der Letalität während der Entwicklung wurden Kreuzungen mit entweder heterozygoter Gal4-Aktivatorlinie oder heterozygoter UAS-Linie angesetzt. Die Versuche wurden entweder bei 25 °C unter Standardbedingungen oder bei 29 °C in einem Inkubator durchgeführt. Die Nachkommen, die ein Balancierchromosom besitzen oder das UAS-Konstrukt aktiviert haben, wurden gezählt und miteinander in Bezug gesetzt. Dabei schlüpfen bei 29 °C die ersten adulten Tiere nach frühestens neun Tagen. Die Versuche wurden spätestens nach 18 Tagen beendet, sodass das Mitzählen von Tieren aus der F₂-Generation ausgeschlossen wurde.

2.10 Histologische Methoden

2.10.1 Probenvorbereitung

Embryonen wurden nach der Methode von Wilson *et al.* (1995) mit Paraformaldehyd und Methanol fixiert. Für die Antikörperfärbungen von larvalen Fettkörpern und Därmen wurden Larven im L3-Stadium in PBS seziiert und die freigelegten Organe bis zur Fixierung in eiskaltem PBS aufbewahrt. Die Fixierung erfolgte für 20 min in mit PBS 1:1 verdünntem RNAsfix. Anschließend wurden die Gewebe für 30 min mit 0,1% Triton-X100 in PBS permeabilisiert, gefolgt von drei Waschgängen mit PBS für jeweils 15 min.

2.10.2 RNA *in situ* Hybridisierung an vollständigen Embryonen

Die Digoxigenin (DIG)-markierten *antisense* RNA-Proben von *CG2254* wurden mittels *in vitro* Transkription mit einer T3-Polymerase hergestellt. Als Vorlage diente der *CG2254* EST-Klon RH47744 (Stapleton *et al.*, 2002), der zuvor mit *Xho*I linearisiert wurde. Die Erstellung der *sense* RNA-Proben zur Kontrolle erfolgte analog mit einer T7-Polymerase und *Bam*HI-linearisiertem Vektor. Die RNA *in situ* Hybridisierung an vollständigen Embryonen fand wie in Wilson *et al.* (1995) beschrieben statt. Die Embryonen wurden mit gegen DIG gerichteten Antikörpern inkubiert, die mit einer Alkalischen Phosphatase (Roche Applied Science, Mannheim) gekoppelt waren. Anschließend erfolgte die Detektion durch eine Inkubation mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat. Die Reaktion wurde durch einen Überschuss an PBS gestoppt, sobald eine deutliche Färbung unter dem Binokular zu sehen war. Nach dem Dehydrieren wurden die Embryonen in Canada-Balsam eingebettet.

2.10.3 Antikörperfärbungen

2.10.3.1 Kolorimetrische Detektion

Die fixierten und rehydrierten Embryonen wurden mit Antikörpern gegen *CG2254* (0,1 µg/ml) in BBT über Nacht inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein biotinylierter Ziegen-Antikörper gegen Meerschweinchen eingesetzt. Zur Detektion und Signalverstärkung wurde das VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Labs, Burlingame, USA) nach Herstellerangaben benutzt. Die Embryonen wurden anschließend dehydriert und in Canada Balsam eingebettet.

Die fixierten Därme wurden mit 2% Ziegenserum in BBT blockiert und mit Antikörpern gegen *CG2254* in BBT (0,1 µg/ml) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschgängen mit BBT wurden endogene Peroxidasen durch einen Überschuss an H₂O₂ (0,3% in BBT) für 10 min gequenchet. Nach weiteren Waschschritten und einer weiteren Blockierung fand die

Inkubation mit einem biotinylierten Ziege Antikörper gegen Meerschweinchen (präabsorbiert mit w Embryonen, Verdünnung 1:500, Biomol, Hamburg) für 2 h statt. Anschließend wurden die Proben für 30 min mit Neutravidin, das mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (Verdünnung 1:500, Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA), inkubiert. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte durch eine Peroxidase-katalysierte Oxidation von DAB (42 life sciences, Bremerhaven, Verwendung nach Herstellerangaben). Die Reaktion wurde durch einen Überschuss an Pufferlösung gestoppt, sobald eine deutliche Braunfärbung unter dem Binokular zu sehen war. Die Gewebe wurden in Mowiol++ eingebettet.

2.10.3.2 Fluoreszente Detektion

Die fixierten Fettkörper wurden mit 2% Ziegenserum in BBT blockiert und über Nacht mit Antikörpern gegen CG2254 in BTT (4 μ g/ml) inkubiert. Nach drei Waschgängen mit PBS und einer weiteren Blockierung fand die Inkubation mit dem Zweitantikörper Ziege α Meerschweinchen gekoppelt mit Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 1 h statt. Im dritten Waschgang erfolgte die Färbung der LDs mit HCS LipidTOX DeepRed (1:500, Molecular Probes/Life Technologies, Carlsbad, USA). Die Gewebe wurden in Mowiol++ eingebettet und bei 4 °C bis zum Mikroskopieren gelagert.

2.11 Herstellung von Präparaten von Zellkulturzellen

Transfizierte Zellen wurden in den Wells durch Pipettieren vom Boden gelöst und je nach Dichte der Zellsuspension wurden 300-500 μ l auf ein Deckglas transferiert. Nach mindestens 30-minütigem Adhären der Zellen wurden sie für 10 min mit 300 μ l mit PBS 1:1 verdünntem RNAfix fixiert. Die Fixierlösung wurde gegen PBS ausgetauscht und danach erfolgte zweimaliges Waschen mit 500 μ l PBS für 5 min. Der nun anschließende Färbeschritt mit 250 μ l Fluoreszenz-Farbstoffen in PBS (s. 2.7) dauerte 30 min. Dabei sollte vorher möglichst viel PBS von den Deckgläsern entfernt werden. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in Mowiol++ eingebettet und bei 4 °C bis zum Mikroskopieren gelagert.

2.12 Mikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen von fixierten Embryonen (Abbildung 30A-F und Abbildung 31) wurden mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) angefertigt. Bilder von fixierten Därmen aus L3-Larven (Abbildung 32) wurden an einem Zeiss Axioskop mot 2 und der Software Axiovision v4.6 (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) gemacht. Für die

Lebendaufnahmen von larvalen Därmen (Abbildung 41) wurde ein Zeiss Axio Imager.M2 mit AxioCam MRm und der Software Axiovision v4.8 (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) verwendet.

Für die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen wurden die Mikroskope Leica TCS SP2 mit Leica LAS AF Software (Leica Camera, Solms) sowie Zeiss LSM780 mit Zeiss ZEN 2011 Software (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) verwendet. Bei den Aufnahmen von Z-Stapeln für die Erstellung von Maximum Intensitätsprojektionen wurde als Abstand zwischen den Konfokalebene standardmäßig 500 nm gewählt.

Zeitliche Serienaufnahmen von lebenden Zellen (Abbildung 17) wurden mit einem UltraVIEW VoX Spinning Disk Konfokalmikroskop (PerkinElmer, Waltham, USA) mit einer Hamamatsu C9100-50 Kamera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) und der Software Volocity v5.3.1 (PerkinElmer, Waltham, USA) am European Neuroscience Institute (ENI) in Göttingen angefertigt. Dabei wurde alle 10 s ein Z-Stapel mit 400 nm Abstand zwischen den Konfokalebene aufgenommen.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Von den *E. coli* Stämme DH5a, TOP10 sowie ccdB Survival 2 (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden basierend auf dem Protokoll von Sambrook und Russell (2006) mit CaCl₂ chemisch kompetente Zellen hergestellt. Für die Transformation wurden 100 ül Zellsuspension eingesetzt. Zunächst inkubierten die Zellen mit dem Plasmid für 30 min auf Eis. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42 oC für 30s mit anschließender Regenerationsphase in LB-Medium für 30 min, bevor die Zellen auf LB-Agarplatten ausgestrichen wurden.

2.13.2 Gateway-System / Klonierung

Für die Herstellung und Klonierung von Expressionsvektoren wurde das Gateway-System von Invitrogen verwendet. PCR-amplifizierte ORFs wurden über angehängte *NotI* und *AscI* Schnittstellen in den Entry-Vektor pENTR (Invitrogen, Carlsbad, USA) ligiert und anschließend kloniert. Die folgende LR Rekombinations-Reaktion wurde mit dem „Gateway LR Clonase II enzyme mix“-Kit der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die benutzten Zielvektoren sind in Tabelle 1 aufgelistet.

2.13.3 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Zur Gewinnung von cDNA aus *A. mellifera* und *C. elegans* wurde zunächst die RNA mit dem „Qiagen RNeasy Mini Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden) aus den Tieren isoliert. Dazu wurden vier *A. mellifera* Larven bzw. 50 µl *C. elegans* N2 Würmer mit einer Edelstahlkugel in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in 1 ml RLT Puffer in einer BIO101/Savant FastPrep FP120 Cell disruptor Rüttelzentrifuge (Qbiogene, Illkirch, Frankreich) für 20 s homogenisiert. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte nach Standardprotokoll gemäß Herstellerangaben. Ein DNA-Verdau fand nicht statt und die RNA wurde mit zweimal 30 µl Elutionspuffer eluiert.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem „High Capacity mRNA-to-cDNA Mix“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die reverse Transkriptase-Reaktion mit diesem Mix wurden 750 ng RNA eingesetzt.

2.13.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) wurde verwendet, um DNA für Klonierungen zu vervielfältigen, um Punkt- und Deletionsmutationen herzustellen und um DNA-Vorlagen für die *in vitro* Transkription von dsRNA zu generieren (siehe 2.16.1).

Standardmäßig wurden für die PCR 1 Unit Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 µl cDNA als Vorlage, 1 µM der jeweiligen Primer und jeweils 0,5 µM Desoxy-Nukleotide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und sind in Tabelle 7 aufgelistet. Ein beispielhaftes Protokoll für eine PCR lautet wie folgt:

98 °C 1min initiale Denaturierung

35 Zyklen:

98 °C 15 s Denaturierung

57 °C 30 s Primer-Hybridisierung; abhängig von der Schmelztemperatur des Primerpaares

72 °C 1 min Elongation; abhängig von der erwarteten Größe des DNA-Fragments

Finale Elongation:

72 °C 10 min

2.13.5 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR ist eine Modifikation der klassischen PCR, die es erlaubt, zielgerichtete Punkt- und Deletionsmutationen in die untersuchten Gene einzuführen. Sie unterscheidet sich darin, dass als Vorlage ringförmige DNA dient und dass die Primer an benachbarten Stellen

(bei Deletionen an beiden Seiten des zu entfernenden Bereiches) binden. Wenigstens einer der beiden Primer muss am 5'-Ende eine Phosphatgruppe besitzen. Die Mutagenese-PCR wurde hier entweder mit dem Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Finnzymes/Thermo Fisher Scientific, Espoo, Finnland) nach Herstellerangaben durchgeführt oder wie in 2.13.4 beschrieben. Dabei reichten 50-100 pg Plasmid-DNA mit dem untersuchten Gen als Vorlage aus. Im Anschluss an die PCR wurden 10 µl des Ansatzes für eine Ligationsreaktion eingesetzt und dann komplett in *E. coli* Zellen transformiert (s. 2.13.1).

2.13.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen der rekombinanten Plasmid-DNA erfolgte auf beiden Strängen und wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Für die standardmäßige Sequenzierung von Genen im pENTR-Vektor wurden die von der Firma bereitgestellten Primer „M13 uni (-21)“ (Sequenzierung beginnend vor dem 5'-Ende des Gens) und „M13 rev (-29)“ (Sequenzierung beginnend hinter dem 3'-Ende des Gens) verwendet.

2.14 Biochemische Methoden

2.14.1 Antikörper-Herstellung

Peptid Antikörper gegen CG2254 wurden von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH (Heidelberg) hergestellt. Dazu wurden Meerschweinchen mit Peptiden immunisiert, die entweder die Aminosäuresequenz von CG2254 3-19 (VTQSADNGSNANSNDI) oder 90-118 (VNEQTNNQTVKEIKNNGGK) enthielten. Die gewonnenen Antikörper wurden aus den Seren über Peptid-Säulen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Der zweite Antikörper zeigte eine höhere Spezifität und wurde bis auf das in Abbildung 31 gezeigte Experiment in allen Versuchen verwendet.

2.14.2 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation wurde genutzt, um eine Fraktionierung der subzellulären Zellbestandteile zu erhalten und LDs damit zu separieren. Sie erfolgte nach dem Protokoll von Grönke *et al.* (2003). Für den Gradienten wurden 30 Fettkörper von wandernden L3 *w* Larven in PBS präpariert und in 100 µl kalten Fettkörper-Puffer (FBB: 10 mM HEPES pH 7,6, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA und 1 mM DTT) mit Proteaseinhibitoren (cOmplete, EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim) überführt. Die Fettkörper-Zellen wurden in einem Bioruptor Plus (Diagenode, Lüttich, Belgien) für 5 min

auf der Einstellung „low“ aufgebrochen. Zellkerne und -trümmer wurden durch Zentrifugation bei 3500 rpm für 8 min entfernt. Der Überstand wurde mit FBB auf 3 ml aufgefüllt und mit 3 ml 1,08 M Saccharose gelöst in FBB vermischt. Die Mischung wurde dann in ein 12 ml SW41 Polyallomer Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckman Coulter, Brea, USA) überführt. Anschließend wurde sie mit jeweils 2 ml von 0,27 M Saccharose-Lösung, 0,135 M Saccharose-Lösung und FBB alleine überschichtet. Die Gradienten wurden 1 h 45 min bei 30.000 rpm und 4 °C in einem Beckman SW41-Ti Rotor zentrifugiert. Nach dem Lauf wurden acht 1,5 ml Fraktionen von oben nach unten abgenommen, wobei sich die LDs aufgrund ihrer geringen Dichte ganz oben befanden. Das mikrosomale Pellet wurde direkt mit 2x SDS-Proteinprobenpuffer aufgenommen, während die Fraktionen zunächst nach der Methanol/Chloroform-Methode (2.14.3) präzipitiert und delipidiert wurden. Anschließend wurde das entstandene Pellet in 2x SDS-Proteinprobenpuffer aufgenommen.

2.14.3 Methanol/Chloroform-Proteinpräzipitation

Proteine wurden nach der Methanol/Chloroform-Methode (Wessel und Flügge, 1984) präzipitiert, die eine Proteinfällung auch in der Anwesenheit von Detergenzien und Lipiden ermöglicht. Dabei wurden 100 µl der Proteinlösung mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform vermischt. Durch die Zugabe von 300 µl Wasser entstand eine Phasentrennung. Nach der Zentrifugation bei 13.000 rpm für 3 min befanden sich die Proteine in der Interphase zwischen der unteren organischen Phase und der oberen wässrigen Phase. Die wässrige Phase wurde entfernt. Durch die Zugabe von 400 µl Methanol und die anschließende Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min fielen die Proteine aus und akkumulierten als Pellet. Der Überstand wurde entfernt und das Protein-Pellet in einer Savant SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) getrocknet. Das Protein-Pellet wurde in 50 µl (farblosen) 2x Proteinprobenpuffer/PBS resuspendiert.

2.14.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels RC DC Protein Assay

Die Messung der Konzentration von den gefällten und resuspendierten Proteinen erfolgte mit dem RC DC Protein Assay von Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA). Da dabei eine weitere Fällung der Proteine stattfindet, lassen sich damit auch Konzentrationen von Proteinen in Lösungen mit Detergenzien bestimmen. Die Durchführung erfolgte nach dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll „Microfuge Tube Assay Protocol (1.5 ml)“ mit einem zusätzlichen zweiten Waschschrift.

2.14.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Standardprotokoll (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dafür wurde das Bio-Rad Mini-PROTEAN 2 Gelsystem (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) benutzt.

2.14.6 Western Blot Analyse

Die Western Blot-Analyse basierte auf Standardprotokollen (Towbin *et al.*, 1979). Nach der SDS-PAGE erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine bei 150 mA pro Gel für 1 h entweder auf eine Nitrocellulose-Membran (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) oder eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran (Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Die Blockierung der unbesetzten Bindestellen auf den Membranen fand in 5% BSA oder Milchpulver in PBT über Nacht bei 4 °C statt. Die Membranen inkubierten für 2 h bei RT mit dem Primärantikörper, der in 2,5% BSA oder Milchpulver in PBT verdünnt wurde. Die verwendeten Antikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Inkubation der sekundären Antikörper, verdünnt in 2,5% BSA oder Milchpulver in PBT, erfolgte für 30 min bei RT. Diese waren mit HRP gekoppelt. Für die Visualisierung der Proteinbanden wurde das „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“ oder das „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“ Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) benutzt. Das dabei entstehende chemilumineszente Signal wurde von einem mit einer CCD-Kamera ausgestatteten LAS-1000plus System (Fujifilm, Tokio, Japan) oder mit einem ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles, Großbritannien) aufgenommen. Zur mehrmaligen Verwendung der Membran wurden die gebundenen Antikörper mit „Restore Western Blot Stripping Buffer“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) entfernt.

2.14.7 Bestimmung des Triacylglycerolgehalts

Der Gehalt an Triacylglycerol (inklusive Monoacylglycerol, Diacylglycerol und Glycerol) wurde mit der „Infinity Triglycerides Reagent“ Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wie beschrieben (Hildebrandt *et al.*, 2011) bestimmt. Dabei wurden zunächst die Fettsäuren mit Hilfe von Lipasen vom Glycerol entfernt. In den nächsten Schritten fanden eine Phosphorylierung und eine Oxidation des Glycerols statt, bei der H₂O₂ entstand. Durch das H₂O₂ wurde eine enzymgekoppelte Farbreaktion ausgelöst, die in ihrer Stärke proportional zur Menge an Glycerol ausfiel. Die Messung nach dieser Methode wurde sowohl mit *Drosophila* Larven und Fliegen als auch mit Zellkulturzellen durchgeführt.

Zur Durchführung wurden fünf L3-Larven oder sechs bis acht adulte Fliegenmännchen in 0,05% TWEEN-20 mit einer Edelstahlkugel in einer BIO101/Savant FastPrep FP120 Cell disruptor Rüttelzentrifuge (Qbiogene, Illkirch, Frankreich) für 20 s homogenisiert. Die entstandenen Homogenate wurden für 5 min bei 70 °C zur Inaktivierung von Enzymen inkubiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 min abgetrennt. 500 µl des Überstandes wurden für weitere 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Messung fand in einer 96-Well Platte mit 50 µl des Überstandes und 200 µl der Infinity-Reagenz statt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C erfolgte die Messung des Signals bei 510 nm an einem Synergy Mx Mikrotiter-Plattenlesegerät (BioTek Germany, Bad Friedrichshall). Mit Hilfe einer anhand von definierten Glycerolmengen erstellten Standardkurve wurden die Messwerte umgerechnet und auf den Proteingehalt normalisiert, der parallel mit einem BCA-Assay (2.14.8) bestimmt wurde.

Für die Messung mit Zellkulturzellen wurden Zellen aus einem Well einer 6-Well Platte eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend erfolgte die Extraktion der Lipide durch die zweimalige Zugabe einer Hexan/Isopropanol-Mischung (3:2). Die Extrakte wurden unter einem N₂-Strom getrocknet und die Lipide in 200 µl 0,5% Triton X-100 wieder gelöst. Um die Lipide zu solubilisieren, wurde die Lösung für 5 min mit Ultraschall in einem Bioruptor (Diagenode, Lüttich, Belgien) behandelt. 20 µl wurden für die Messung wie oben beschrieben eingesetzt.

2.14.8 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA Assay

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Bicinchoninsäure (engl. *bicinchoninic acid*, BCA) geht auf die von Smith entwickelte Methode zurück (Smith *et al.*, 1985). Hier erfolgte die Messung des Proteingehalts von Larven und adulten Fliegen mit dem „Pierce BCA Protein Assay Kit“ (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) und wurde parallel zum TAG-Assay durchgeführt, um die Werte zu normalisieren. 50 µl von den Homogenaten wurden in eine 96-Well Platte überführt und mit 200 µl BCA-Reagenz vermischt. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C erfolgte die Messung des Signals bei 562 nm an einem Synergy Mx Mikrotiter-Plattenlesegerät (BioTek Germany, Bad Friedrichshall). Mit definierten Mengen an Serum Albumin wurde eine Standardkurve erstellt und der Proteingehalt anhand der Absorption bestimmt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellkultur-Zellextrakten wurde das Pellet nach der Hexan/Isopropanol-Extraktion getrocknet und für 3 h in 1 ml 0,1% SDS/0,3 M NaOH aufgelöst. 20 µl wurden für die oben beschriebene Messung eingesetzt.

2.15 Zellkultur

2.15.1 Kultivierung von *Drosophila* Zellkulturlinien

Die verwendeten *Drosophila* Zellkultur-Zelllinien (siehe Tabelle 10) wurden in 25 oder 75 cm² Zellkulturflaschen mit belüfteter Filterkappe bei 25 °C ohne zusätzliche CO₂-Zugabe in einem Inkubator kultiviert. Als Nährmedium wurde Schneider's Medium mit den entsprechenden Zusätzen wie unter 2.5 beschrieben verwendet.

2.15.2 Einfrieren / Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren und Auftauen von *Drosophila* Zellkulturzellen wurden die Protokolle vom *Drosophila* RNAi Screening Center übernommen (DRSC, <http://www.flyrnai.org/DRSC-PRC.html>). Zum Einfrieren wurden Zellen bis zum Erreichen von 100% Konfluenz (entspricht einer Konzentration von ca. $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml) wachsen gelassen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 8 ml fötalem Kälberserum mit 10% DMSO resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt und in einer Styroporbox bei -80 °C langsam eingefroren. Für eine dauerhafte Aufbewahrung wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

Der Auftauprozess der Zellen erfolgte rasch. Die aufgetauten Zellen wurden in 5 ml kompletten Schneiders Medium in 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Schneider's Medium resuspendiert und die Zellsuspension wurde in 25 cm²-Zellkulturflaschen ausplattiert.

2.15.3 Transiente Transfektion

Für eine transiente Transfektion von *Drosophila* Zellkulturzellen mit einem oder mehreren Expressionsvektoren wurden konfluent wachsende Zellen auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml verdünnt und 1 ml der Zellsuspension wurde in eine 12-Well Platte ausplattiert. Nach mindestens vier Stunden, besser aber am nächsten Tag, wurden die Zellen mit der „Qiagen Effectene Transfection Reagent“-Reagenz (Qiagen GmbH, Hilden) transfiziert. Dafür wurden jeweils 150-300 ng des Expressionsplasmids in insgesamt 72,6 µl EC Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 2,4 µl Enhancer und anschließenden Mischen erfolgte eine fünf-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden 3 µl Effectene Reagenz hinzugefügt, mit einem Vortexer durchmischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im letzten Schritt wurden 150 µl der Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. In der Regel wuchsen die Zellen, wenn nicht anders angegeben, für 72 h, bevor sie in den Experimenten verwendet wurden. Alternativ zur

Transfektion mit „Qiagen Effectene Transfection Reagent“ wurde auch „FuGENE 6“ (Promega, Madison, USA) zur Transfektion nach Herstellerangaben (FuGENE 6 Reagenz zu DNA Verhältnis von 4:1) durchgeführt.

2.15.4 Generierung stabil-transfizierter, polyklonaler Zelllinien

Die Generierung stabil-transfizierter, polyklonaler Zelllinien basiert auf der transienten Transfektion, nur dass zusätzlich ein Selektionsvektor kotransfiziert wird. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in 5 ml Schneiders kompletten Medium in eine 25 cm² Flasche ausplattiert. Nach 20 h wurde eine Transfektion mit 2 µg des Expressionsvektors und 50 ng des Selektionsvektors pCoBlast, der den transfizierten Zellen eine Resistenz gegenüber Blasticidin verleiht, durchgeführt. Die Transfektion erfolgte mit der „Qiagen Effectene Transfection Reagent“-Reagenz nach den gleichen Abläufen wie in 2.15.3 mit den Volumina 140 µL EC Puffer, 16 µL Enhancer, und 20 µL Effectene. Im letzten Schritt wurde die Transfektionslösung zusammen mit 840 µL Kompletmedium auf die Zellen gegeben und drei Tage lang inkubiert. Die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen wurde mit 30 µg/ml Blasticidin in Schneider's komplettem Medium durchgeführt. Die Erhaltung der stabilen Transfektion erfolgte bei einer Konzentration von 10 µg/ml Blasticidin.

2.15.5 Populationsanalyse der EGFP-CG2254 Lokalisation

Für die Populationsanalyse wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen (Konz. 3×10^5 Zellen/ml) in 500 µl Schneider's Medium in eine 8-Well-Kammer auf Deckglas, das die Aufnahmen von lebenden Zellen mit einem inversen Mikroskop ermöglicht, ausgesät und mit 800 µM OA behandelt. Zu den verschiedenen Zeitpunkten (4, 24, 48 und 72 h) wurden 400 µl Medium entfernt und die Zellen für 10 min in 500 µl mit PBS 1:1 verdünnten RNAfix fixiert. Die Wasch- und Färbeschritte waren die gleichen wie oben beschrieben. Als Volumina für das Waschen wurden 500 µl eingesetzt, zum Färben 200 µl. Bis zum Mikroskopieren wurden die Präparate bei 4 °C mit PBS bedeckt gelagert. Die Analyse der Bilddaten erfolgte wie unter 2.17 beschrieben.

2.15.6 Kultivierung von Säugerzellkulturlinien

Die Zellkulturlinien HeLa, COS7 und MDCK wurden in DMEM Medium mit 4.5% Glucose (PAN-Biotech, Aidenbach), 10% fötalem Kälberserum, 1% nicht essentiellen Aminosäuren (PAN-Biotech, Aidenbach), 1 % Natriumpyruvat (PAN-Biotech, Aidenbach) und 1% Streptomycin/Penicillin (PAN-Biotech, Aidenbach) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Kultivierung der Zellkulturlinie AML12 erfolgte in einer 1:1 Mischung aus Dulbecco's

modifizierten Eagle's Medium und Ham's F12 Medium (PAN-Biotech, Aidenbach), angereichert mit 0,005 mg/ml Insulin, 0,005 mg/ml Transferrin, 5 ng/ml Selen, 40 ng/ml Dexamethason, 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech, Aidenbach) bei 37 °C und 5% CO₂. Die Zellen wurden mit „Promega FuGENE6“ (Promega, Madison, USA) gemäß Herstellerangaben transient transfiziert. Die Expression des transgenen Proteins erfolgte für 24 h, bevor die Zellen fixiert und gefärbt wurden.

2.16 RNAi-Screen in *Drosophila* Zellkulturzellen

2.16.1 Herstellung doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Für den RNAi-Screen wurde zur Kontrolle der Effektivität der RNAi dsRNA von *thread* (*th*, DRSC-Nummer 30905) und *midway* (*mdy*, Design der dsRNA mit dem Programm E-RNAi (Horn und Boutros, 2010)) hergestellt. Das Protein Thread verhindert Apoptose, durch den Verlust stirbt die Zelle (Lisi *et al.*, 2000). Midway ist eine Diacylglycerol O-acyltransferase, ohne sie kann die Zelle weniger TAG bilden (Buszczak *et al.*, 2002). Die dsRNA wurde durch *in vitro* Transkription hergestellt. Dafür mussten per PCR Vorlagen von dem Transkript mit flankierenden T7-RNA-Polymerase-Bindestellen amplifiziert werden. Durch die langen Überhänge für die Bindestellen und dem relativ kleinen zur Vorlage komplementären Bereich der Nukleotide weicht das Protokoll von dem unter 2.13.4 beschriebenen ab. Im Ansatz wurden als Vorlage genomische DNA und als DNA-Polymerase 2,5 U DreamTaq (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingesetzt. Die Primerpaare sind in Tabelle 7 gelistet. Das PCR-Programm sah wie folgt aus:

94 °C	5 min	
94 °C	30 s	
57 °C	30 s	3 Zyklen
72 °C	90 s	
94 °C	30 s	10 Zyklen; pro Zyklus steigt die
57 °C	30 s	Hybridisierungstemperatur für
72 °C	90 s	die Primer um +1,5 °C auf 72 °C
94 °C	30 s	35 Zyklen
72 °C	90 s	
72 °C	10 min	

Die *in vitro* Transkriptionen wurden wie folgt angesetzt:

10 µl	PCR-Produkt
5 µl	100 mM DTT
10 µl	10 mM NTP-mix (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
0,5 µl	RiboLock Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
10 µl	5x Transkriptionspuffer
60 U	T7 RNA-Polymerase (Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
11,5µl	H ₂ O

Der Ansatz inkubierte für 16 h bei 37°C. Danach wurde die DNA-Vorlagen mit DNase verdaut und die gewonnene RNA mit dem „Qiagen RNeasy Mini Kit“ (Qiagen GmbH) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.16.2 Durchführung des RNAi-Screens

Für die Durchführung des RNAi-Screens wurde die „*Drosophila* Kinase/Phosphatase RNAi Sub-Library“ (DRSC KP) vom *Drosophila* RNAi Screening Center (DRSC, Harvard Medical School, <http://www.flyrnai.org/DRSC-SUB.html>) verwendet. Sie umfasst 563 Gene mit jeweils durchschnittlich drei unterschiedlichen dsRNAs pro Gen (~250 ng) in 384-Well Mikrotiter-Platten (schwarz, Mikroskopqualität, Verdunstungsbarriere, von Aurora Biotechnologies). Neben den Nullkontrollen (Wells ohne dsRNA bzw. mit dsRNA von *lacZ*) wurden als Kontrollen pro Platte mit der größtmöglichen Menge an dsRNA jeweils zwei Wells von *th* (750 ng) und sechs Wells mit *mdy* (650 ng) beladen. Bis zur Benutzung wurden die Platten bei -80 °C gelagert.

Die RNAi erfolgte anhand des „*Bathing*“-Protokoll, bei der die Zellen in serumfreiem Medium die dsRNA aufnehmen (DRSC, <http://www.flyrnai.org/DRSC-PRR.html>). Für den Screen wurden in jedes Well 7500 polyklonale Kc167-Zellen mit stabiler pUbiP-Plin2-EGFP Transfektion in 10 µl serumfreiem Schneider's Medium mit einem Titertek MAP-C (Berthold, Pforzheim) zu der dsRNA in 384-Well Platten dispensiert. Die Platten mit den Zellen wurden für 2 min mit 800 rpm/ 90 rcf bei Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R/ Rotor A -2-MTP) und inkubierten dann in einer feuchten Kammer im Inkubator bei 25 °C für 45 min. Danach wurden 40 µl Schneider's komplettes Medium mit zusätzlich 10 µg/ml Blasticidin mit dem Titertek MAP-C zu den Zellen gegeben, erneut abzentrifugiert und mit selbstklebender Aluminiumfolie 80/140mm (#676090, Greiner Bio-one) abgedeckt. Die Zellen inkubierten für vier Tage in einer feuchten Kammer bei 25 °C. Nach der Abzentrifugation der Platten wurde Ölsäure (Endkonzentration 800 µM) in 20 µl Schneider's Medium mit FBS und Blasticidin mit dem Titertek MAP-C in die Wells gegeben.

Als Kontrolle für eine geringe und erhöhte TAG-Speicherung wurde jeweils in die ersten beiden Spalten keine OA hinzugefügt und in sechs Wells OA für eine Endkonzentration von 1200 μM . Die Platten wurden wieder abzentrifugiert und mit selbstklebender Aluminiumfolie abgedeckt. Für weitere 24 h inkubierten die Zellen bei 25 °C in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Platten abzentrifugiert und das Medium mit dem Titertek MAP-C entfernt. Die Fixierung mit 3,4% Paraformaldehyd in PBS und die Färbung mit Hoechst33258 (1:500) erfolgte gleichzeitig. Dazu wurden 50 μl der Lösung mit dem Titertek MAP-C in die Wells hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten mit Aluminium-Klebeband abgedeckt und bei 4 °C gelagert. Vor dem Mikroskopieren wurde mit BODIPY 493/503 nachgefärbt. Die Aufnahmen wurden an einem automatischen BD Pathway 855 Mikroskop (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) am MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden erstellt.

2.16.3 Auswertung

Die Segmentierung der Bilder erfolgte mit der Software CellProfiler v2.0 (Carpenter *et al.*, 2006). Nuclei und LDs wurden anhand ihrer Färbungen mit Hoechst bzw. BODIPY identifiziert. Die Zellgrenzen wurden anhand der schwächeren zytoplasmatischen Hoechst-Färbung definiert und um zusätzliche sechs Pixel nach außen erweitert. Das Programm berechnete die Größen der segmentierten Flächen und kalkulierte für die Einzelzell-Analyse von den LDs die Anzahl der Nachbarn und Abstände zu einander.

Für die Datenanalyse der segmentierten Bilder wurde KNIME v2.6.x (Konstanz Information Miner, Stoter *et al.*, 2013) mit der Erweiterung „HCS Tools“ (MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) verwendet. Um einen Vergleich zwischen den Platten zu ermöglichen, wurde eine Z-Transformation durchgeführt. Sie berechnet sich nach der Formel: $z = \frac{x-\mu}{\sigma}$, wobei x dem Datenpunkt, μ dem Durchschnittswert der Vergleichspopulation (hier: Wells ohne dsRNA) und σ der Standardabweichung der Vergleichspopulation entspricht. Als Treffer wurden diejenigen Gene gewertet, bei denen mindestens die Hälfte der verwendeten dsRNAs einen Z-Wert größer als 2,5 oder kleiner als -1,8 hatten.

2.17 Bioinformatik und Statistik

Die FlyBase-Datenbank (flybase.org, Pierre *et al.*, 2014) wurde als Quelle für genetische und molekulare Daten von CG2254 benutzt. Ebenfalls von der FlyBase-Datenbank wurden die Hochdurchsatz-Transkriptionsdaten bezogen, die dort integriert sind (Gelbart und Emmert, 2013) und auf die Daten von FlyAtlas (<http://flyatlas.org/>, Chintapalli *et al.*, 2010) und

modENCODE (<http://www.modencode.org/celniker/>, Graveley *et al.*, 2011) zurückgehen. Expressionsdaten durch *in situ* Färbungen stammen vom Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP, <http://www.fruitfly.org/>, Tomancak *et al.*, 2002). Für die Suche von CG2254 Orthologen wurde der BLAST-Algorithmus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul *et al.*, 1990) benutzt. Die Generierung des phylogenetischen Baumes (Abbildung 5) erfolgte mit dem Online-Programm Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/>, Dereeper *et al.*, 2008), in das auch „ClustalW“ für das Sequenzalignment integriert ist. Als Vorhersage-Programme für die Sekundärstruktur von CG2254 wurden die Online-Programme GOR IV (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html, Garnier *et al.*, 1996), HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>, Tusnady und Simon, 2001) und TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, Krogh *et al.*, 2001) eingesetzt. Für die Vorhersage möglicher amphipatischer Membrananker wurde das Online-Programm AMPHIPASEEK (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_amphipaseek.html, Sapay *et al.*, 2006) benutzt. Die Analyse möglicher Ubiquitinierungsstellen wurde mit UbPred durchgeführt (<http://www.ubpred.org/>, Radivojac *et al.*, 2010). Die Bildbearbeitung der Aufnahmen erfolgte entweder mit der jeweiligen Mikroskopsoftware oder mit ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Die Segmentierungen von mikroskopischen Bildern wurden mit der Software CellProfiler v2.0 (Carpenter *et al.*, 2006) durchgeführt, die anschließende Datenauswertung erfolgte mit KNIME v2.6.x (Konstanz Information Miner, Stoter *et al.*, 2013). Die Berechnung der statistischen Signifikanz von Vergleichen zweier Stichproben wurde mit einem ungepaarten t-Test mit zweiseitiger Verteilung von Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt. Die unterschiedlichen p-Werte werden durch Asterisken symbolisiert: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ n.s. $p > 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 CG2254 gehört zur Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen

Das *Drosophila* Protein CG2254 wurde von Beller *et al.* (2006) bei der Analyse des LD-Proteoms larvaler Fettkörper identifiziert. Anhand von Expressionsstudien mit EGFP-markiertem CG2254 in *Drosophila* Kc167-Zellen und larvalen Fettkörpern konnte die LD-Lokalisation bestätigt werden (Beller *et al.*, 2006). Im Rahmen der *Drosophila* Genom Annotation (Flybase.org) wurde CG2254 zur Proteinfamilie der SDRs zugeordnet. Es besitzt die für SDRs typische Rossmann-NAD⁺-Bindedomäne (Kallberg *et al.*, 2010) im Bereich der Aminosäuren 60-290, in der auch das für SDRs kennzeichnende glycinreiche Motiv zur Kosubstrat-Bindung (TGTGHGMG, aa64-71) enthalten ist. Diese Charakteristika ordnen CG2254 den klassischen SDRs zu (Kallberg *et al.*, 2010). Daneben besitzt CG2254 *N*-terminal zwischen den Aminosäuren 21-48 eine hydrophobe Region, die laut der Vorhersageprogramme GOR IV (Garnier *et al.*, 1996), HMMTOP (Tusnady und Simon, 2001) und TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001) eine Transmembran-Domäne (TMD) enthalten könnte. Dem Programm AMPHIPASEEK nach bilden in dieser vorhergesagten TMD die Aminosäuren 31-42 einen amphipatischen Anker aus, mit dessen Hilfe das CG2254-Protein monotopisch in Membranen eingebettet werden könnte (Sapay *et al.*, 2006). Außergewöhnlich für eine SDR ist jedoch das besondere Lokalisationsmuster von EGFP-markiertem CG2254: Im Gegensatz zu der Mehrheit der bekannten LD-assoziierten Proteine lokalisiert es nicht auf allen LDs, sondern nur auf einzelnen LDs und markiert dadurch innerhalb der Zelle verschiedene LD-Subpopulationen.

3.2 Die Lokalisation auf LD-Subpopulationen ist evolutionär konserviert

Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, ob noch weitere SDR-Proteine existieren, die auf LD-Subpopulationen lokalisieren, oder ob CG2254 eine Ausnahme bildet. Dazu wurden mit CG2254 und den bisher in LD-Proteomen von Säugern (u. a. Brasaemle *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2011, Ding *et al.*, 2012, Larsson *et al.*, 2012, Beilstein *et al.*, 2013) identifizierten Dehydrogenasen ein phylogenetischer Baum erstellt (Abbildung 5), um die Verwandtschaftsbeziehungen zu klären. Zusätzlich enthält der Baum mit „Epidermal Retinol Dehydrogenase 2-like“ (ERD-2) aus der Westlichen Honigbiene *Apis mellifera* und „Dehydrogenase/reductase (SDR Family) Member 3“ (DHRS3) aus dem Fadenwurm

Caenorhabditis elegans zwei weitere SDRs, die aus Invertebraten stammen (Erklärung weiter unten). Diese beiden Proteine besitzen die höchste Sequenzhomologie zu CG2254. Die nachfolgenden drei Proteine „17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 11“ (17 β -HSD11), „Retinol Dehydrogenase 10“ (RDH10) und „Dehydrogenase/reductase (SDR Family) Member 3“ (DHRS3) gehören wie CG2254 zu den SDRs. Bei diesen drei Proteinen wurde bereits durch weitere Experimente eine Lokalisation auf LDs bestätigt (Fujimoto *et al.*, 2004, Jiang und Napoli, 2013, und Deisenroth *et al.*, 2011). Aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie zu CG2254 und ihrer bestätigten LD-Lokalisation wurden diese drei Proteine für die Untersuchung der evolutionären Konservierung der Lokalisation auf LD-Subpopulationen verwendet. Darüber hinaus wurden auch die bereits erwähnten ERD-2 und DHS-4 für die Studie miteinbezogen, obwohl für beide noch keine LD-Lokalisation nachgewiesen wurde. Das Bienenprotein ERD-2 wurde verwendet, weil eine Lokalisation auf LD-Subpopulationen spezifisch für die Klasse der *Insecta* sein könnte. *A. mellifera* gehört zur Ordnung der *Hymenoptera* und ist nah verwandt zur Ordnung der *Diptera*, zu der *Drosophila* gehört. ERD-2 besitzt von den hier untersuchten SDRs die höchste Sequenzübereinstimmung zu CG2254. Ein weiteres Protein von *A. mellifera* zeigte eine noch höhere Übereinstimmung zu CG2254, dieses konnte jedoch nicht kloniert werden, obwohl cDNA sowohl aus larvalen als auch adulten Bienen eingesetzt wurde. Mit dem *C. elegans* Protein DHS-4, das als CG2254-Ortholog vorausgesagt wird (flybase.org), wurde eine weitere SDR aus einem Invertebraten untersucht und somit die Analyse um eine zusätzliche Spezies erweitert.

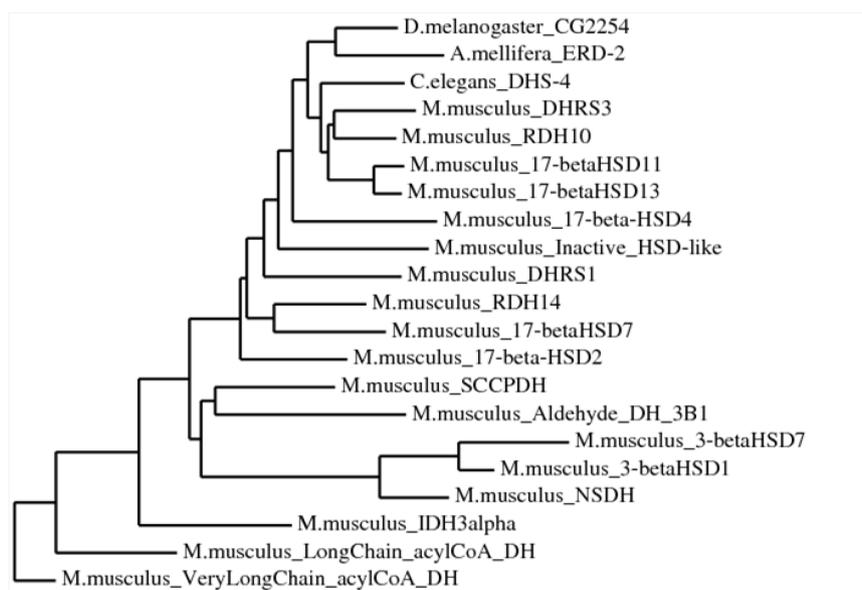


Abbildung 5: Phylogenetischer Baum mit ausgewählten Dehydrogenasen. Für die Erstellung des phylogenetischen Baums wurde neben der Proteinsequenz von CG2254 die Sequenzen von in LD-Proteomen identifizierten Säugerdehydrogenasen aus *M. musculus* sowie zwei SDRs aus *C. elegans* und *A. mellifera* verwendet. Die Berechnung der Verwandtschaftsbeziehungen erfolgte nach dem Neighbor-Joining-Algorithmus mit Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008).

Zunächst wurden die CG2254-verwandten Proteine als EGFP-Fusionsprotein in der *Drosophila* Zelllinie Kc167 exprimiert, da dort durch EGFP-CG2254 das Vorhandensein von LD-Subpopulationen bereits gezeigt werden konnte (Abbildung 6). Vier der fünf Proteine (17 β -HSD11, RDH10, DHRS3 und ERD-2) lokalisieren vergleichbar wie CG2254 (Abbildung 6A-C) auf LD-Subpopulationen: die größten LDs innerhalb der Zelle sind mit den Fusionsproteinen bedeckt, nicht aber die kleineren LDs. Nur DHS-4 (Abbildung 6P-R) lokalisiert auf allen LDs. Damit lässt sich sagen, dass neben CG2254 noch weitere SDRs auf LD-Subpopulationen lokalisieren, wenngleich diese Lokalisation nicht für alle SDRs gefunden werden kann.

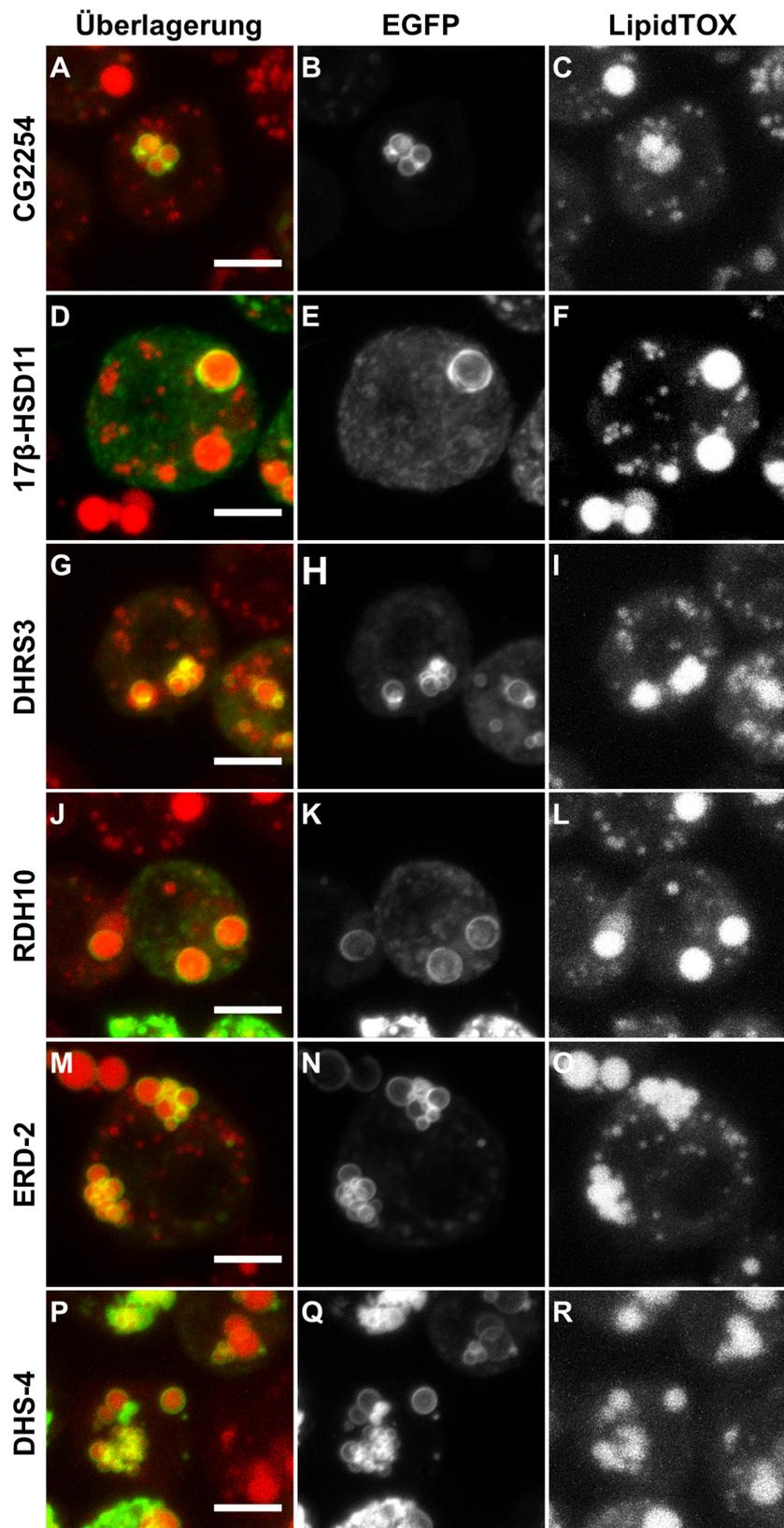


Abbildung 6: Lokalisation von EGFP-markiertem CG2254 und verwandten Proteinen in Kc167-Zellen. Kc167-Zellen wurden für die Expression von EGFP-markiertem CG2254 und verwandten Proteinen transient transfiziert und über Nacht mit 800 μ M OA behandelt. Die Gegenfärbung der LDs erfolgte mit HCS LipidTOX DeepRed. 17 β -HSD11 (D-F), DHRS3 (G-I), RDH10 (J-L) und ERD-2 (M-O) lokalisieren auf LD-Subpopulationen, DHS-4 (P-R) auf allen LDs. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

Aufgrund der Eigenschaft, dass die untersuchten Säugerproteine die Fähigkeit besitzen, in Fliegenzellen auf LD-Subpopulationen zu lokalisieren, ist es möglich, dass sie dies auch in Säugerzellen tun. Bis jetzt wurde das für SDRs nicht beschrieben und auch die untersuchten SDRs aus der Maus wurden mit einer generellen LD-Lokalisation beschrieben (Horiguchi *et al.*, 2008b Jiang und Napoli, 2013 und Deisenroth *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wurde zunächst die Lokalisation von YFP-CG2254 in humanen HeLa-Zellen untersucht (Abbildung 7). Um die Abhängigkeit der LD-Subpopulationen von der LD-Anzahl und -Größe zu testen, wurden verschiedene OA-Konzentrationen eingesetzt. Ohne die Zugabe von OA existieren nur wenige, sehr kleine LDs in den HeLa-Zellen und YFP-CG2254 ist in retikulären Strukturen und kleinen, punktförmigen Aggregaten in der Zelle verteilt (Abbildung 7A-D). Bei den niedrigeren OA-Konzentrationen von 100 bzw. 200 μM (Abbildung 7E-P) lokalisiert YFP-CG2254 auf LD-Subpopulationen. In dem vergrößerten Bildausschnitt (Abbildung 7I-L) ist zu erkennen, dass sich YFP-CG2254 auf den größeren LDs befindet und nicht auf den kleineren, selbst wenn die Größenunterschiede zwischen den einzelnen LDs kleiner sind als in den Kc167-Zellen. Bei 800 μM OA sind die LDs insgesamt größer und beinahe alle von YFP-CG2254 umgeben (Abbildung 7Q-T).

Da in HeLa-Zellen eine Lokalisation von YFP-CG2254 auf LD-Subpopulationen nachgewiesen werden konnte, wurden auch die Lokalisationen der CG2254-verwandten Proteine in dieser Säugerzelllinie untersucht (Abbildung 8). Auch die YFP-markierten 17 β -HSD11, RDH10, DHRS3 und ERD-2 lokalisieren in mit 200 μM OA behandelten HeLa-Zellen auf LD-Subpopulationen. Nur YFP-DHS-4 (Abbildung 8Q-T) befindet sich wie schon in den Kc167-Zellen auf allen LDs. Damit zeigen die Ergebnisse, dass auch in Säugerzellen unterschiedliche LD-Subpopulationen vorkommen und die Lokalisation zu diesen LD-Subpopulationen evolutionär konserviert ist.

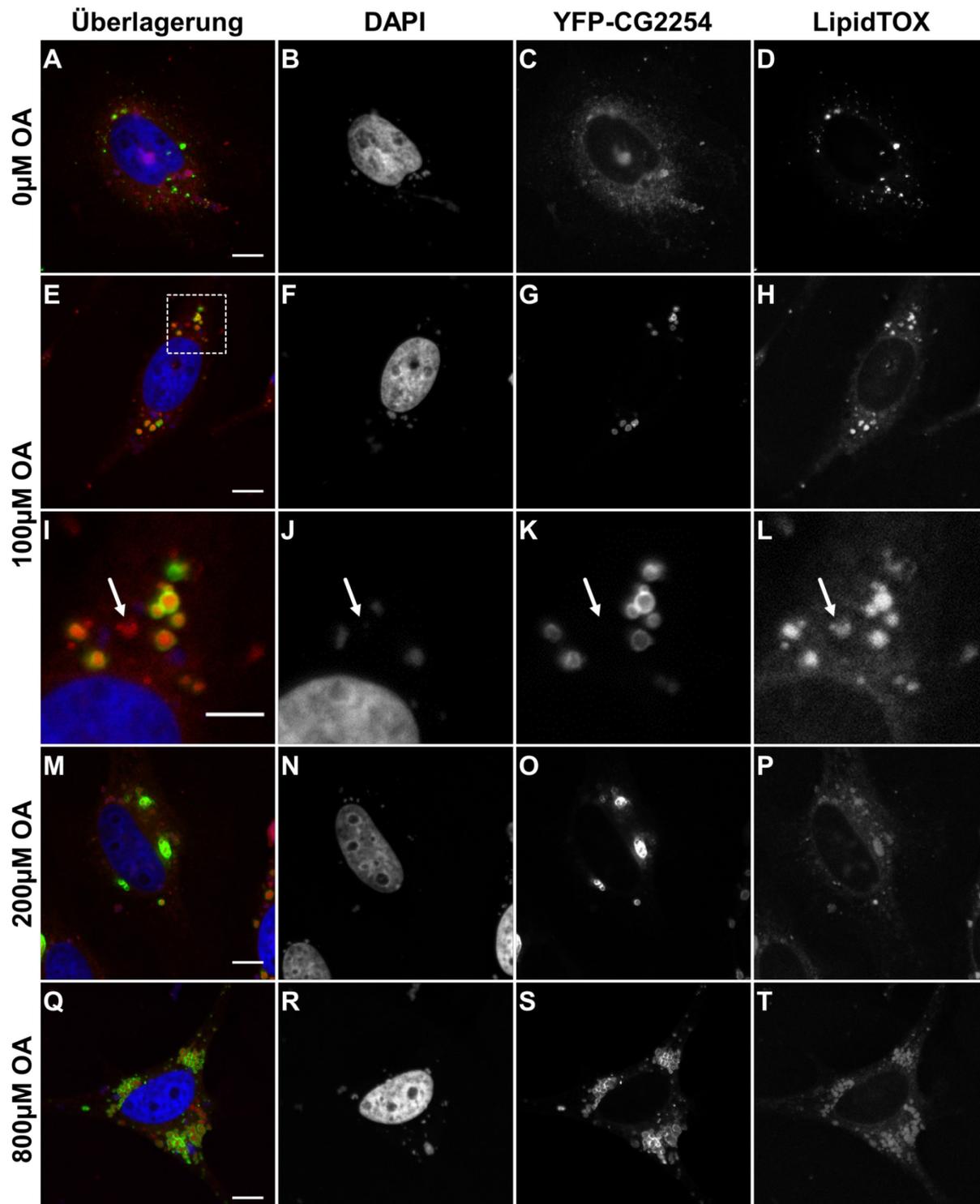


Abbildung 7: Die Lokalisation von YFP-CG2254 in HeLa-Zellen. YFP-CG2254 wurde in humanen HeLa-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen OA-Konzentrationen über Nacht inkubiert: 0 μM (A-D), 100 μM (E-L), 200 μM (M-P) und 800 μM (Q-T). Die Gegenfärbung des Kerns erfolgte mit DAPI, die der LDs mit HCS LipidTOX DeepRed. Das weiße Quadrat in (E) markiert den Ausschnitt, der in I vergrößert dargestellt wird. Der Pfeil deutet auf LDs ohne YFP-CG2254 Lokalisation. Die Bilder zeigen die Aufnahme einer einzelnen Fokalebene und wurden von fixierten Zellen mit einem Zeiss LSM780 erstellt. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm .

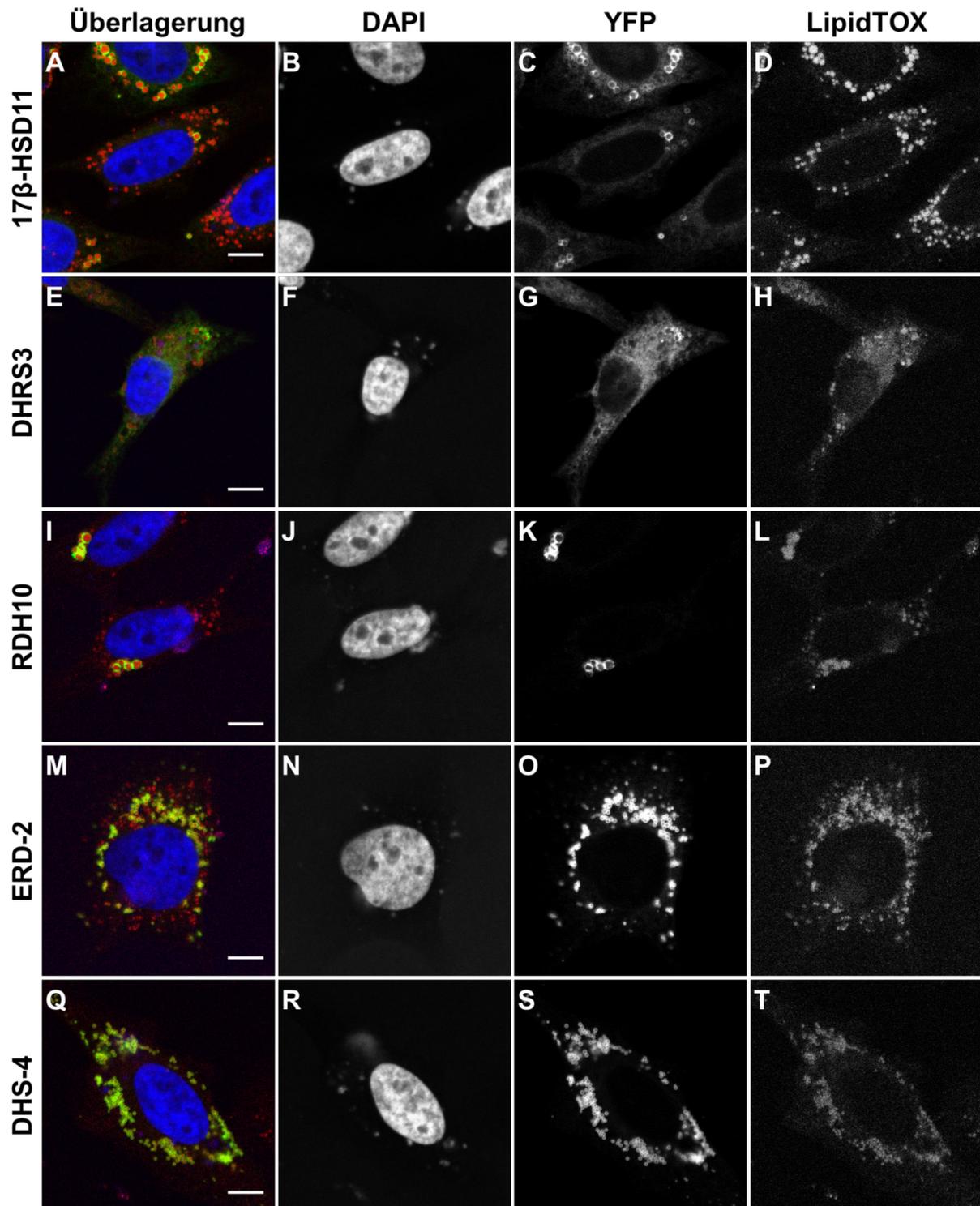


Abbildung 8: CG2254-verwandte Proteine lokalisieren in HeLa-Zellen auf LDs. CG2254-verwandte Proteine wurden mit YFP-Markierung in HeLa-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden über Nacht mit 200 μ M OA inkubiert. Die Gegenfärbung des Kerns erfolgte mit DAPI, die der LDs mit HCS LipidTOX DeepRed. 17 β -HSD11 (A-D), DHRS3 (E-H), RDH10 (I-L) und ERD-2 (M-P) lokalisieren auf LD-Subpopulationen, DHS-4 (Q-T) auf allen LDs. Die Bilder zeigen eine einzelne Fokalebene und wurden von fixierten Zellen mit einem Zeiss LSM780 erstellt. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m.

Die hier verwendeten HeLa-Zellen stammen ursprünglich von einem Zervixkarzinom. Da es sich dabei um ein krankhaftes Gewebe handelt, könnte es sich bei der beobachteten Lokalisation um eine Besonderheit handeln. Um einen solchen Fall auszuschließen, wurde YFP-CG2254 daher in weiteren Säuger-Zellkulturzellen exprimiert. Die verwendeten Zelllinien unterscheiden sich in ihrer Ursprungsspezies und ihrem Ursprungsgewebe, wodurch sich auch Informationen über die evolutionäre Konservierung der LD-Lokalisation gewinnen lassen. In AML12 (Hepatozyten aus *Mus musculus*), COS7 (Nierenzellen aus *Cercopithecus aethiops*) und MDCK-Zellen (Nierenzellen aus *Canis familiaris*) lokalisiert YFP-CG2254 auf LDs (Abbildung 9). Bei allen drei Zelllinien zeigt sich im vergrößerten Bildausschnitt, dass YFP-CG2254 auf den größeren LDs stärker vorhanden ist als auf den kleinen LDs (D, E und F). Dagegen deuten präliminäre Daten aus HEK-293 (Embryonale Nierenzellen aus *Homo sapiens*) und CHO-Zellen (Ovarienzellen aus *Cricetulus griseus*) auf eine LD-Lokalisation auf allen LDs hin (ohne Abbildung). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Lokalisation von CG2254 auf LD-Subpopulationen evolutionär konserviert ist, aber von der OA-Konzentration und dem Zelltyp abhängig ist.

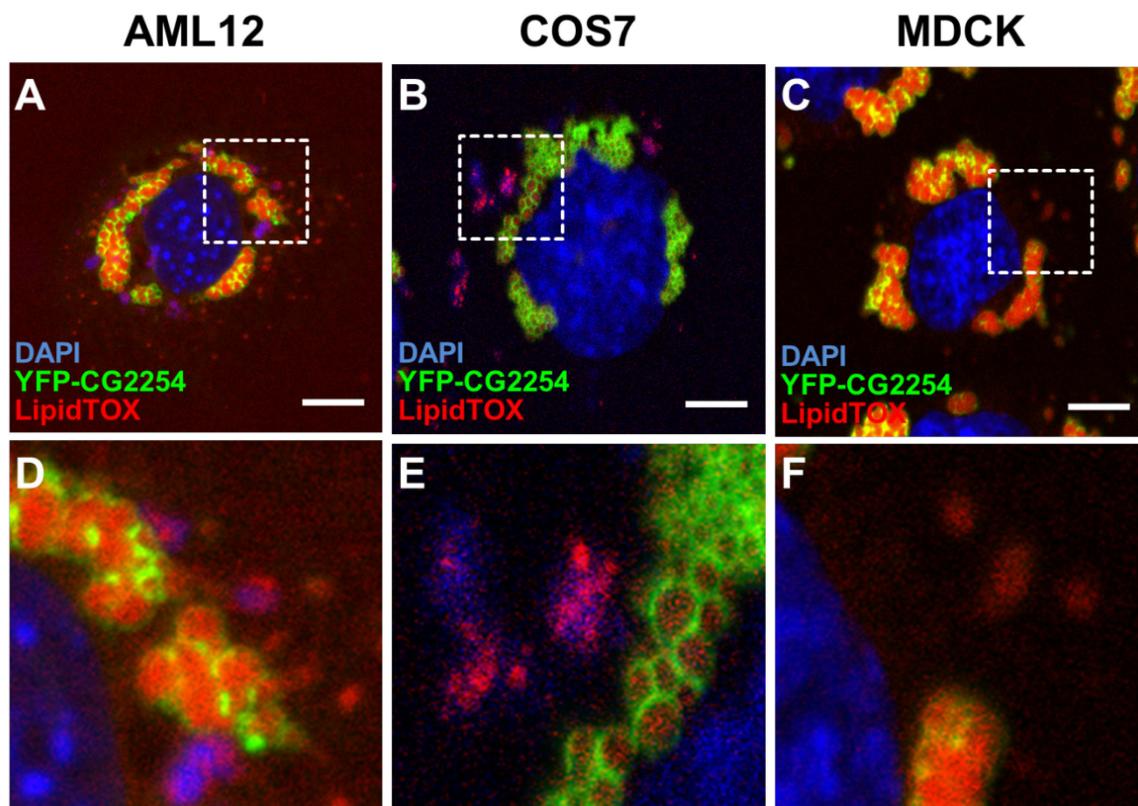


Abbildung 9: Lokalisation von YFP-CG2254 in Säuger-Zellkulturzellen. YFP-CG2254 wurde transient in AML12 (A und D), COS7 (B und E) und MDCK (C und F) exprimiert. Die Zelllinien wurden über Nacht mit unterschiedlichen OA-Konzentrationen behandelt (AML12: 100 μM , COS7: 200 μM und MDCK: 800 μM), fixiert und Nuclei mit DAPI und LDs mit HCS LipidTOX DeepRed gegengefärbt. Das weiße Quadrat gibt den vergrößerten Bildausschnitt an. Die Bilder zeigen die Aufnahme einer einzelnen Fokalebene und wurden von fixierten Zellen mit einem Zeiss LSM780 erstellt. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm .

3.3 Charakterisierung der LD-Subpopulation

Bisher sind nur wenige Charakteristika von LD-Subpopulationen bekannt. So sind z. B. Unterschiede in der Protein- und Lipidzusammensetzung der LDs beschrieben (Wolins *et al.*, 2006 bzw. Hsieh *et al.*, 2012). In dem folgenden Abschnitt soll die LD-Subpopulation näher charakterisiert werden, die von CG2254 markiert wird.

Eine der ersten Fragen lautete, zu welchem Zeitpunkt die LD-Subpopulationen entstehen. Wolins *et al.* (2006) zeigten in sich differenzierenden Adipozyten, dass die Lokalisation von PERILIPINEN zu bestimmten LD-Subpopulationen von der LD-Reifung. Ob dies auch auf CG2254 zutrifft, wurde mit Kc167-Zellen untersucht, die stabil EGFP-CG2254 exprimieren. Unbehandelte Kc167-Zellen haben zu Beginn keine bis wenige kleine LDs (Abbildung 10A-C). Durch die Zugabe von 400 μ M OA wird die LD-Biogenese aktiviert. Bereits nach einer halben Stunde sind LDs und eine Lokalisation von EGFP-CG2254 auf einer LD-Subpopulation erkennbar (Abbildung 10D-F). Im Verlauf von sechs Stunden nimmt die Zahl der LDs ab, aber ihre Größe zu (Abbildung 10 G-I). EGFP-CG2254 ist auch jetzt auf LD-Subpopulationen lokalisiert. Nach sechs Stunden wurde das Medium gegen Medium ohne OA ausgetauscht, um eine Remobilisierung der LDs zu erreichen. Ohne die zusätzlichen freien Fettsäuren aus dem Medium beginnen die Zellen vermehrt ihre in den LDs gespeicherten Fette abzubauen und zu verwerten. Aber auch während dieser Remobilierungsphase befindet sich EGFP-CG2254 nach 24 h und nach 48 h auf LD-Subpopulation (Abbildung 10M-R). Daher befindet sich EGFP-CG2254 unabhängig von einem bestimmten zeitlichen Stadium des LD-Lebenszyklus zu jedem Zeitpunkt auf LD-Subpopulationen.

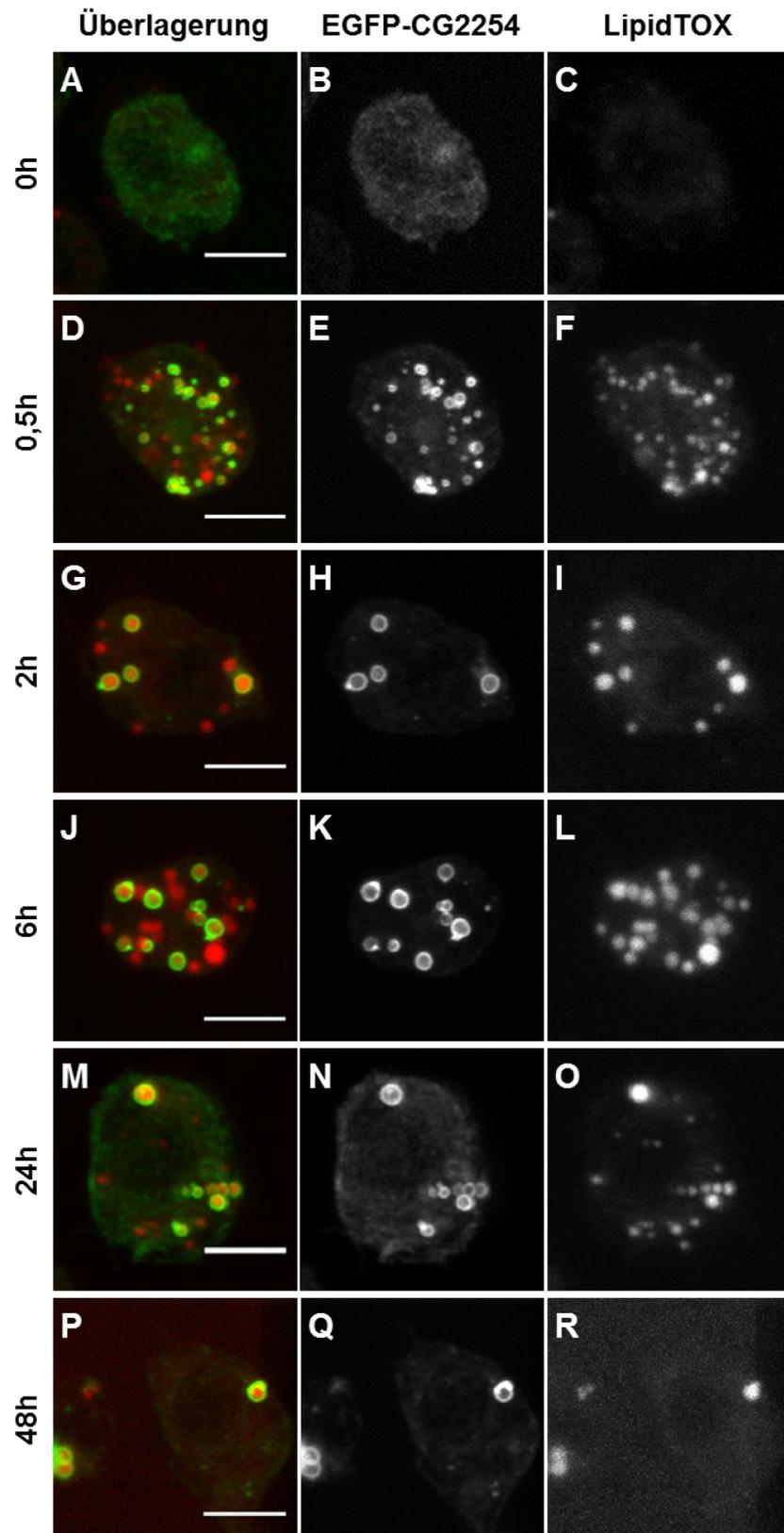


Abbildung 10: EGFP-CG2254 Lokalisation während des Lebenszyklus von LDs. Polyklonale Kc167-Zellen mit stabiler EGFP-CG2254 Expression wurden für sechs Stunden mit 400 μM OA behandelt, um die LD-Biogenese zu induzieren. Danach wurde das Medium gegen Medium ohne OA ausgetauscht, um die Remobilisierung einzuleiten. Zu den Zeitpunkten 0 h (A-C), 0,5 h (D-F), 2 h (G-I), 6 h (J-L), 24 h (M-O) und 48 h (P-R) wurden Zellproben entnommen, fixiert, und mit HCS LipidTOX DeepRed gegengefärbt. Zu allen Zeitpunkten befindet sich EGFP-CG2254 auf LD-Subpopulationen. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Leica TCS SP2 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm .

Auf den Aufnahmen mit EGFP-markiertem CG2254 und verwandten SDRs in Kc167-Zellen befinden sich die Fusionsproteine oft auf den jeweils größten LDs innerhalb der Zelle (Abbildung 6). Zunächst war es daher das Ziel, diese Annahme zu bestätigen und gleichzeitig erste Erkenntnisse über LD-Subpopulationen und ihre Entstehungsdynamik zu gewinnen. Um LD-Lokalisation von CG2254 mit der LD-Größe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der OA-Zugabe zu quantifizieren, wurde eine computergestützte Analyse von Aufnahmen mit EGFP-CG2254 exprimierenden Kc167-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Bilder im ersten Schritt mit der Software Cellprofiler (Carpenter *et al.*, 2006) segmentiert. Die Abbildung 11 zeigt ein Beispiel für eine solche Segmentierung einer Mikroskopaufnahme.

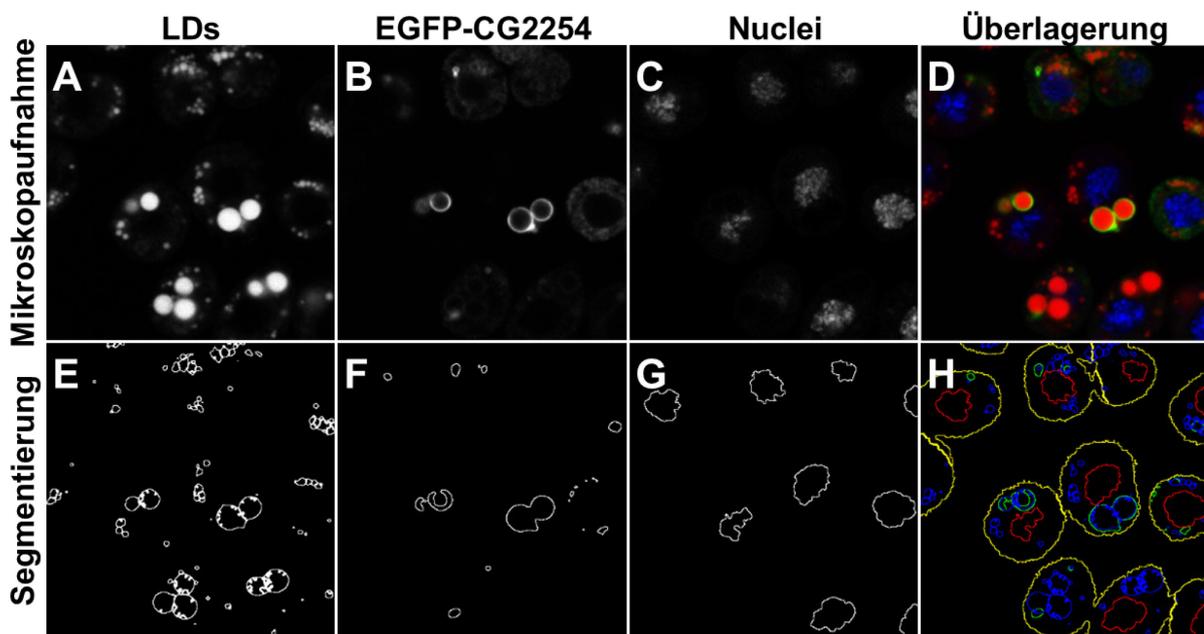


Abbildung 11: Computerbasierte Segmentierung von Mikroskopaufnahmen. Kc167-Zellen mit stabiler EGFP-CG2254 Expression wurden mit 800 μ M OA behandelt und nach 72 h fixiert und gefärbt. Die Mikroskopaufnahmen wurden mit einem Zeiss LSM780 erstellt (obere Reihe, A-D). Anschließend erfolgte eine Segmentierung der Kanäle basierend auf der Helligkeit des Signals (untere Reihe, E-H). Für die Bestimmung der Zellgrenzen (gelbe Linien in H) wurde das schwache, zytoplasmatische Signal der Nuclei-Färbung durch Hoechst verwendet. Die Aufnahme wurde mit einem Zeiss LSM780 erstellt.

Für die Auswertung der Segmentierungsdaten wurde eine Einzelzell-Analyse durchgeführt. Bei dieser fortgeschrittenen Art der Analyse wird jede Zelle innerhalb eines Wells einzeln betrachtet, anstatt den Durchschnittswert von allen Zellen zur Kalkulation zu verwenden. Im Fall der EGFP-CG2254 Lokalisation war die Einzelzell-Analyse nötig, weil die untersuchten Zellen Teil einer polyklonalen Zelllinie sind. Kc167-Zellen mit stabiler EGFP-CG2254 Expression unterscheiden sich zufällig in ihrer Genexpression oder den in ihr enthaltenen Proteinen oder Metaboliten, was die Reaktion auf OA beeinflussen kann. Auch die Stärke der transgenen Expression variiert zwischen den einzelnen Zellen und könnte sich so auf die

Lokalisation auswirken. Dadurch könnten Phänotypen verborgen bleiben, wenn nicht auch (Sub-)Populationen einzeln betrachtet werden.

Bei der Analyse der Aufnahmen zeigte sich, dass die LDs der beiden Subpopulationen, LDs ohne bzw. mit EGFP-CG2254, zu Beginn (4 h) eine vergleichbare Größen besitzen (Abbildung 12A). Insgesamt sind die LDs im Hinblick auf ihren Durchmesser homogen. Bereits nach 24 h lässt sich aber eine Auftrennung erkennen (Abbildung 12B): Die Subpopulation mit EGFP-CG2254 enthält die größeren LDs. Dieser Trend verstärkt sich nach 48 h (Abbildung 12C) und 72 h (Abbildung 12D). Die Mehrheit der anderen LDs ist aber schon kleiner geworden im Vergleich zum Zeitpunkt nach 4 h. Somit konnte bestätigt werden, dass EGFP-CG2254 auf die größeren LDs der Zelle lokalisiert. Daneben lieferte die Populationsanalyse auch Informationen über die Fettspeicherung. Mit 800 μ M OA nimmt die Gesamtfläche aller LDs im Bezug zur Zellkernfläche im Verlauf von 72 h immer weiter zu, was auf einen Ausbau der TAG-Speicher hinweist (Abbildung 12E).

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Einzelzell-Analyse von LDs in Kc167-Zellen durchführbar ist und dass es gleichzeitig mit ihr auch möglich ist, Lokalisationen von Proteinen auf LDs nachzuweisen. Im nächsten Schritt sollte die Methode erweitert werden, sodass sie im Rahmen eines RNAi-Screens eingesetzt werden kann. Durch die gezielte Herunterregulierung einzelner Gene könnte so überprüft werden, ob diese Gene für die LD-Biologie wichtig sind und ob sie LD-Subpopulationen verändern können. Darüber hinaus ließen sich auf diesem Wege auch Kandidaten identifizieren, die die Lokalisation von CG2254 (und vielleicht weiteren Proteinen) beeinflussen, um so die Lokalisationsmechanismen auf LDs besser zu verstehen. Für einen Vorversuch wurde ein kleiner RNAi-Screen in *Drosophila* Zellkulturzellen (siehe 2.16) mit der „*Drosophila* Kinase/Phosphatase RNAi Sub-Library“ des „*Drosophila* RNAi Screening Centers“ (DRSC) durchgeführt. Sie umfasst 563 Gene, die Kinasen und Phosphatasen kodieren. Auf Lokalisationsänderungen wurde hierbei noch nicht untersucht, sondern die Analyse erfolgte nur in Hinblick auf LD-Phänotypen wie z. B. Größe, Anzahl oder Aggregationen der LDs. Eine Übersicht der Gene, die bei RNAi einen Phänotypen verursachten, ist im Anhang unter Tabelle 14 zu finden. Obwohl die Phänotypen (Beispiele im Anhang unter Abbildung 48) der Kandidaten noch bestätigt werden müssen, verdeutlichen die Ergebnisse, dass Kinasen und Phosphatasen an der LD-Biologie beteiligt sind und dass die Methode der Einzelzellanalyse auch für größere Screens einsetzbar ist. Dies kann notwendig sein, da bei zwei Genen nur durch die Einzelzellanalyse ein Phänotyp identifiziert wurde.

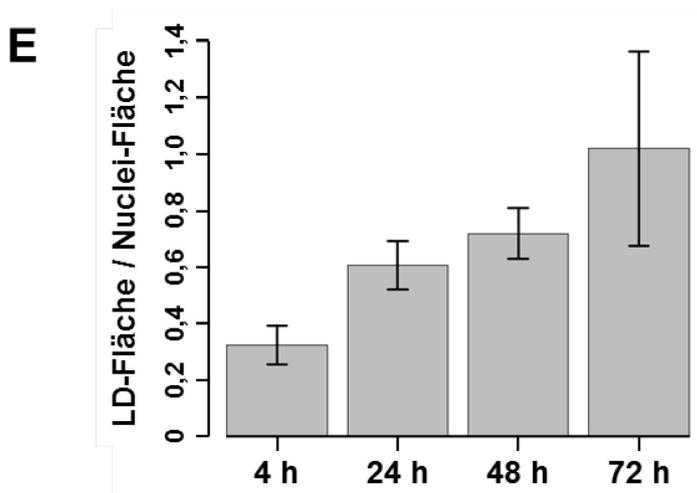
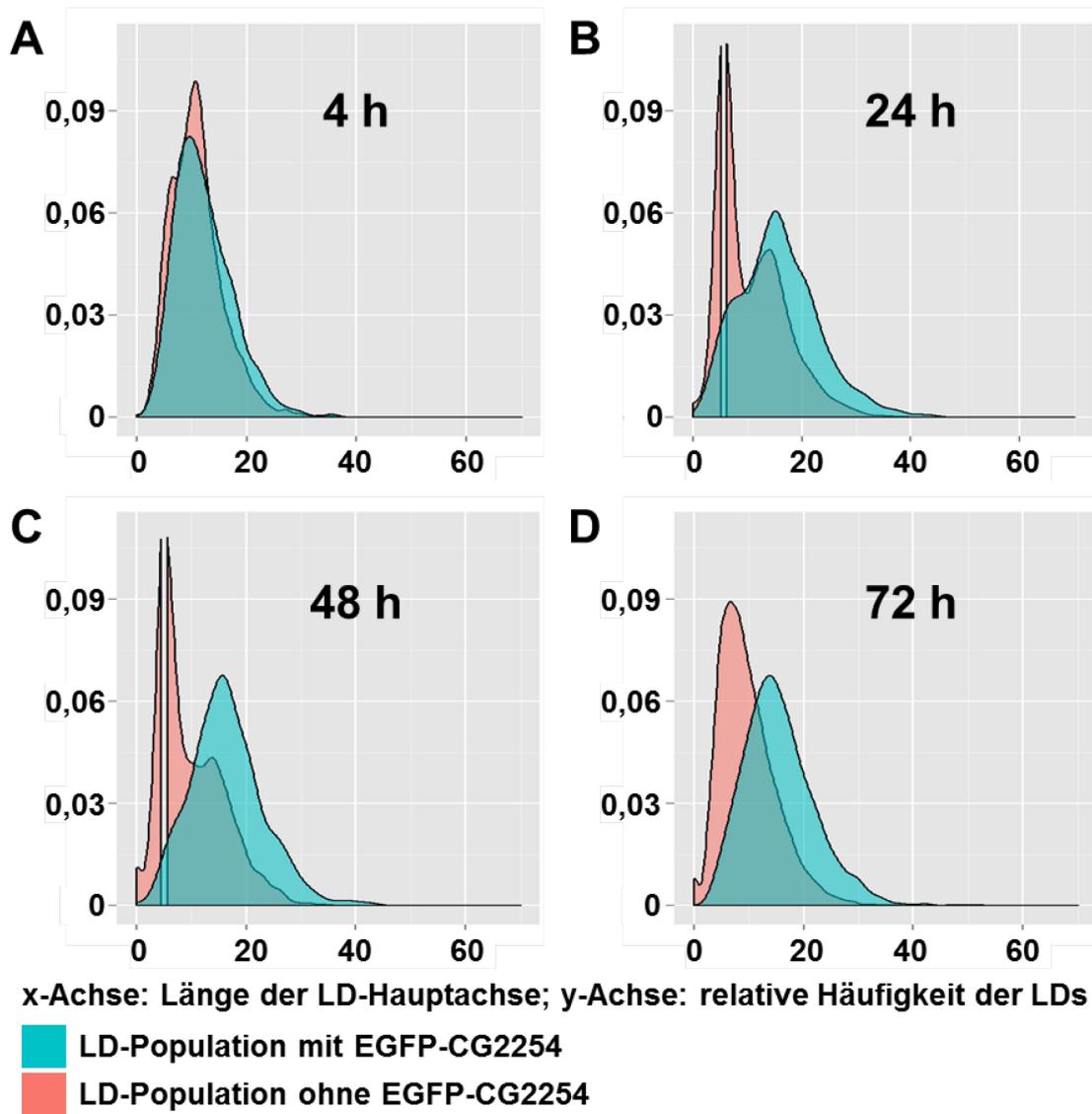


Abbildung 12: Dynamik der LD-Subpopulationen. (A-D) Abgebildet sind die Populationsdichten von LDs mit EGFP-CG2254 auf ihrer Oberfläche (blau) und ohne (rot) zu den Zeitpunkten 4 h (A), 24 h (B), 48 h (C) und 72 h (D) basierend auf der LD-Größe. Nach 24 h sind die beiden Subpopulationen voneinander trennbar. (E) Das Verhältnis der LD-Fläche zur Nuclei-Fläche nimmt während der 72-stündigen Behandlung mit OA zu.

Neben der Diversifikation von LDs anhand unterschiedlicher Stadien der LD-Reifung unterscheiden sich LDs auch auf Basis ihres metabolischen Zustandes wie es von Martin *et al.* (2005) und Wilfling *et al.* (2013) gezeigt wurde. Bei Wilfling *et al.* (2013) markieren die Proteine GPAT4 und AGPAT3 in *Drosophila* S2-Zellkulturzellen anabolisch aktive LDs. Wie das Schaubild (Abbildung 13) zeigt, katalysieren beide Enzyme die ersten beiden Schritte der *de novo* TAG-Synthese. Nur an den LDs, auf denen sich GPAT4 und AGPAT3 befinden, kann die komplette Synthese von Glycerol-3-Phosphat zu TAG ablaufen.

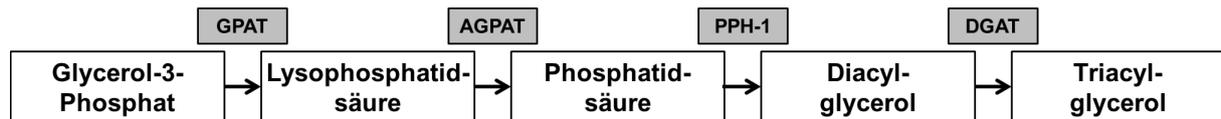


Abbildung 13: Schematische Darstellung der TAG-Synthese. Dargestellt ist der Syntheseweg von Glycerol-3-Phosphat zu Triacylglycerol sowie die daran beteiligten Enzyme. GPAT=Glycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase, AGPAT=*sn*-1-Acylglycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase, PPH-1=Phosphatidat-Phosphatase, DGAT=Diacylglycerol-O-Acyltransferase.

Dadurch nimmt die Größe dieser LDs gegenüber den anderen LDs zu, sodass es in den Zellen eine LD-Subpopulation mit vielen kleinen LDs und eine LD-Subpopulation mit wenigen großen LDs gibt, auf denen sich GPAT4 und AGPAT3 befinden. Dem gegenübergestellt ist DGAT2, das zwar auch an der TAG-Synthese beteiligt ist, aber nur den letzten Schritt katalysiert und daher auch die Funktion der Wiederveresterung freier Fettsäuren übernimmt. Es lokalisiert auf allen LDs. Da das Lokalisationsmuster von mCherry-GPAT4 dem von EGFP-CG2254 entspricht, wurde untersucht, ob EGFP-CG2254 mit diesem Protein kolokalisiert und es sich damit auch nur auf wachsenden LDs befindet. Dazu wurde in Kc167-Zellen EGFP-CG2254 zusammen mit mCherry-GPAT4 bzw. mCherry-DGAT2 exprimiert und mit OA behandelt. EGFP-CG2254 kolokalisiert mit mCherry-GPAT4 auf LD-Subpopulationen (Abbildung 14A) und markiert somit wachsende, anabolisch aktive LDs. Auch mit mCherry-DGAT2 konnte eine Kolokalisation gefunden werden (Abbildung 14B), doch ist die Lokalisation von mCherry-DGAT2 auf LDs mit EGFP-CG2254 schwächer.

Da CG2254 auf wachsenden LDs lokalisiert, stellte sich als nächstes die Frage, ob es auch auf „schrumpfende“, d.h. katabolisch-aktive, LDs lokalisieren kann. Um dies zu überprüfen, wurden Kc167-Zellen zunächst mit OA behandelt, damit LD-Bildung induziert wird, um anschließend den Abbau der LDs mit ölsäurefreiem Medium einzuleiten. Danach erst wurde EGFP-CG2254 exprimiert. Darüber hinaus wurde TriacsinC (Igal *et al.*, 1997) hinzugefügt, ein Inhibitor der langkettigen Fettsäure-Synthase, der die Wiederveresterung der freigebliebenen Fettsäure verhindert. Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, lokalisiert EGFP-CG2254 unter diesen Bedingungen nicht auf LDs, sondern in Strukturen, die dem ER ähnlich sind

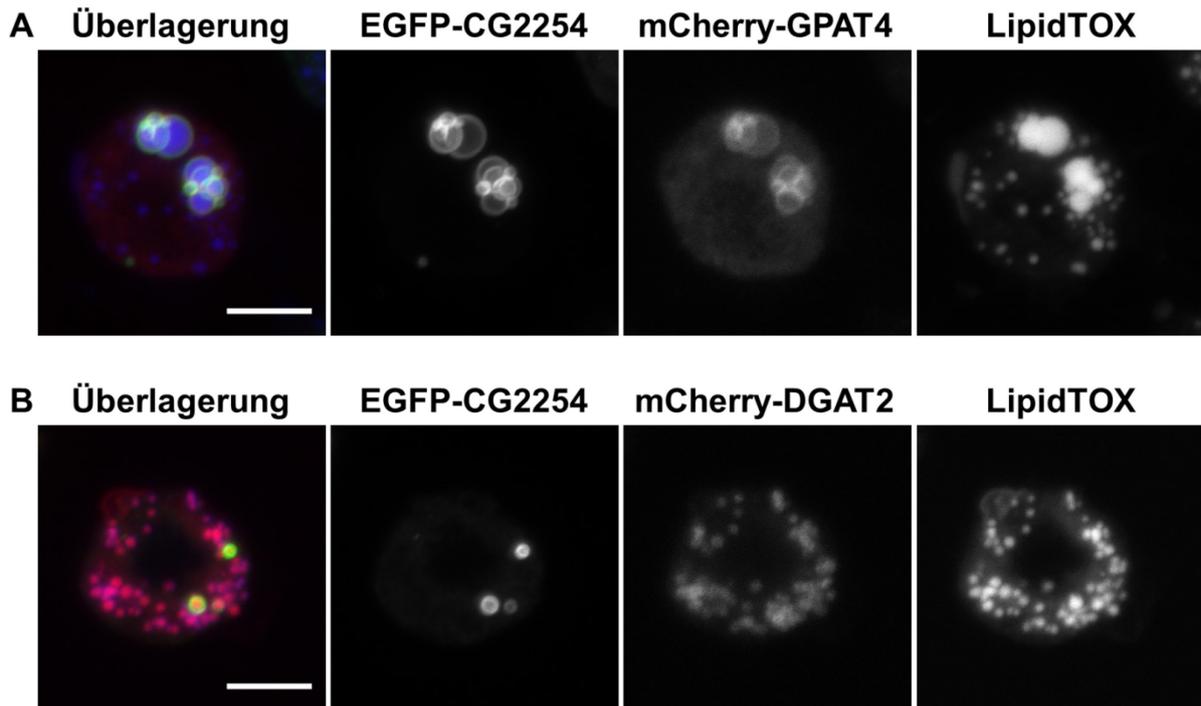


Abbildung 14: EGFP-CG2254 markiert anabolisch aktive LDs. Kc167-Zellen wurden mit EGFP-CG2254 und mCherry-GPAT4 bzw. mCherry-DGAT2 transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für mit 800 μM OA behandelt, bevor sie nach weiteren zwei Tagen fixiert und mit HCS LipidTOX DeepRed gefärbt wurden. (A) EGFP-CG2254 kolokalisiert mit mCherry-GPAT4 auf der gleichen LD-Subpopulation, (B) während die Kolokalisation mit mCherry-DGAT2 nur auf einzelnen LDs stattfindet. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm .

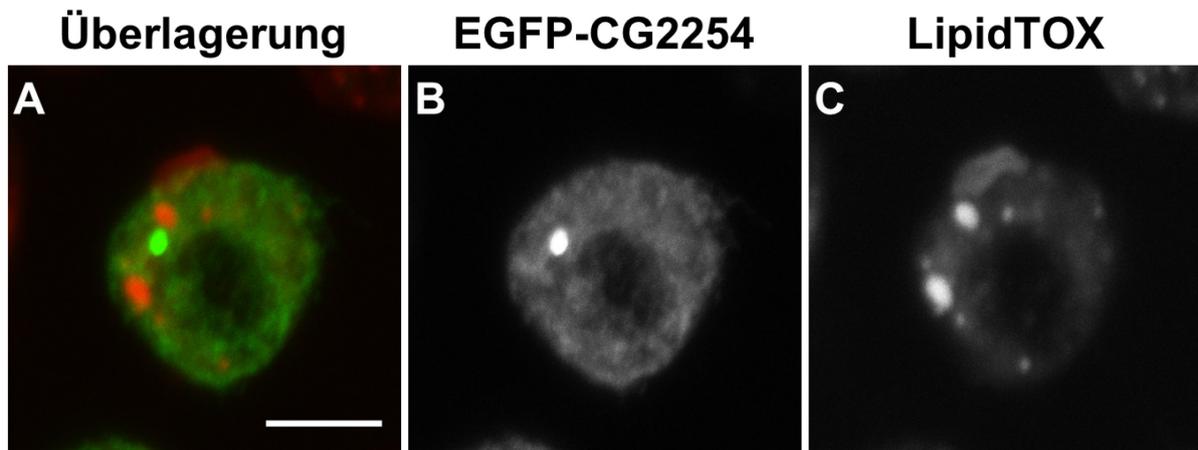


Abbildung 15: EGFP-CG2254 lokalisiert nicht auf katabolisch aktive LDs. Kc167-Zellen wurden mit 800 μM OA für 24 h behandelt. Das Medium wurde anschließend gegen Medium ohne OA ausgetauscht und zusätzlich wurde TriacsinC (Endkonzentration 5 μM) zugefügt. Dann erst fand die transiente Transfektion der Zellen für die EGFP-CG2254 Expression statt. Nach weiteren 24 h Stunden wurden die Zellen fixiert und die LDs mit HCS LipidTOX DeepRed gefärbt. Es besteht keine Kolokalisation von EGFP-CG2254 und LDs. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm .

3.4 CG2254 lokalisiert ins ER und auf LDs

In den Kc167-Zellen, in denen EGFP-CG2254 nicht auf LDs lokalisieren kann, weil sie abwesend oder katabolisch aktiv sind, lokalisiert das Protein in retikulären Strukturen wie es für das ER typisch ist (Abbildung 10A und Abbildung 15A). Zudem werden immer mehr LD-assoziierte Proteine identifiziert, die sowohl in die ER-Membran als auch auf LDs lokalisieren (z. B. Wilfling *et al.*, 2013). Um zu überprüfen, ob CG2254 auch eine duale Lokalisation ins ER und auf LDs besitzt, wurde das Fusionsprotein aus CG2254 und dem rot-fluoreszenten Tdimer2 (TdT) zusammen mit dem GFP-markierten ER-Protein sec61 β (Wilfling *et al.*, 2013) in Kc167-Zellen exprimiert. Eine Kolokalisation der beiden Proteine würde darauf hindeuten, dass CG2254 auch im ER vorhanden ist. Kc167-Zellen ohne die Zugabe von Ölsäure enthalten keine LDs (Abbildung 16D). In diesem Fall kolokalisiert TdT-CG2254 mit sec61 β -GFP und damit im ER (Abbildung 16A-C). Durch das Zufügen von 400 μ M OA zu den Zellen bilden diese LDs, auf deren Oberfläche sich TdT-CG2254 befindet. Gleichzeitig kolokalisiert es schwächer mit sec61 β -GFP (Abbildung 16E-H). Daraus lässt sich schließen, dass CG2254 eine duale Lokalisation besitzt: In der Abwesenheit von LDs lokalisiert es im ER und nach der LD-Induktion auf diesen.

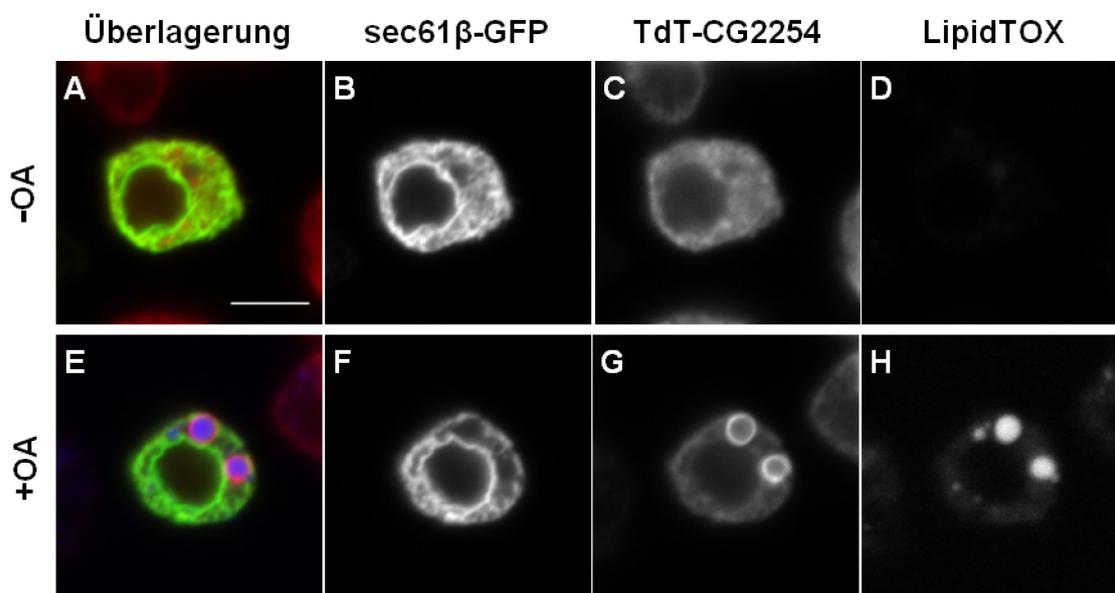


Abbildung 16: Duale Lokalisations von TdT-CG2254 ins ER und auf LDs. Kc167-Zellen wurden transient mit sec61 β -GFP und TdT-CG2254 transfiziert und über Nacht mit 400 μ M OA inkubiert. Fixierte Zellen wurden mit HCS LipidTOX DeepRed gegengefärbt. Ohne die Zugabe von OA ist kein HCS LipidTOX DeepRed Signal vorhanden (D). Der ER-Marker sec61 β -GFP (B) und TdT-CG2254 (C) kolokalisieren, wie die Überlagerung der Kanäle zeigt (A). Durch die Zugabe von OA entstehen LDs (H). Die Überlagerung (E) macht deutlich, dass TdT-CG2254 (G) nun auf die LDs lokalisiert und weniger ins ER wie die schwache Kolokalisation mit sec61 β -GFP zeigt. Die Bilder zeigen Aufnahmen einer Fokalebene, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

In Abbildung 10 wurde gezeigt, dass sich EGFP-CG2254 schon 30 Minuten nach der Zugabe von OA auf LDs befindet. Mit Hilfe von Serienaufnahmen lebender Zellen sollte der Zeitraum genauer verfolgt werden, in der die Lokalisationsänderung von EGFP-CG2254 stattfindet. In Abbildung 17 sind vier Einzelaufnahmen aus einer 30 minütigen Serienaufnahme von Kc167-Zellen mit EGFP-CG2254 Expression nach der Zugabe von OA gezeigt. Zu Beginn (Abbildung 17A) ist nur in wenigen Zellen ein EGFP-CG2254-Signal zu sehen. Das vorhandene Signal entspricht dem retikulären Muster des ERs. Innerhalb von 10 bis 20 Minuten nach OA Zugabe (Abbildung 17B und C) bilden sich in den Zellen punktförmige Aggregate, bei denen es sich um EGFP-CG2254 auf wahrscheinlich neugeformten LDs handelt. Nach 30 Minuten (Abbildung 17D) nimmt die Anzahl der Aggregate kaum mehr zu, dafür sind sie in ihrer Größe gewachsen. EGFP-CG2254 lokalisiert demnach schon früh auf LDs, vielleicht schon während der ersten Momente der LD-Biogenese (für die Gegenfärbung von LDs nach 30 Minuten siehe Abbildung 10F).

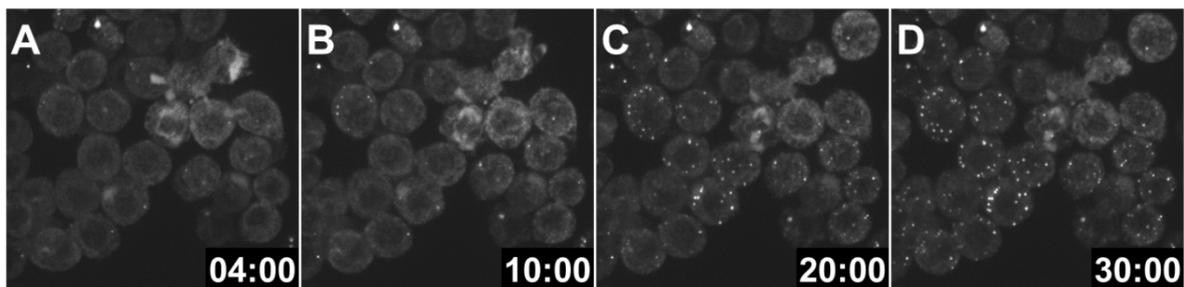


Abbildung 17: EGFP-CG2254 ändert seine Lokalisation innerhalb von Minuten nach Zugabe von OA. Dargestellt sind Einzelbilder einer Serienaufnahme über 30min von lebenden Kc167-Zellen mit EGFP-CG2254 Expression. Dem Zellkulturmedium wurden zum Zeitpunkt t_0 OA zugegeben (Endkonzentration $400 \mu\text{M}$) und über einen Zeitraum von 30 Minuten wurden alle 10 s ein Z-Stapel aufgenommen. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem PerkinElmer UltraVIEW VoX Spinning Disk Konfokalmikroskop aufgenommen wurden.

3.5 Struktur-Funktionsanalyse von CG2254

Überexprimiertes EGFP-markiertes CG2254-Protein lokalisiert nicht nur in Kc167-Zellkulturzellen und im Fettkörper auf LD-Subpopulationen (Abbildung 6 und Beller *et al.*, 2006), sondern auch in anderen *Drosophila*-Zellkultur-Zelllinien wie den neuronalen DmBG3-c2-Zellen und in anderen Geweben wie den Prothorakaldrüsenzellen der Ringdrüse (Abbildung 18). Selbst in artfremden Zelllinien befindet sich YFP-CG2254 auf LD-Subpopulationen (Abbildung 7). Dies lässt vermuten, dass die Fähigkeit von CG2254 auf LD-Subpopulationen zu lokalisieren in seiner Sequenz und seiner Struktur codiert ist. Um diese Bereiche zu bestimmen, wurde mit CG2254 eine Struktur-Funktionsanalyse durchgeführt, bei der Teile des Proteins entfernt oder verändert und die Lokalisation der resultierenden Proteinvarianten mit EGFP-Markierung untersucht wurden.

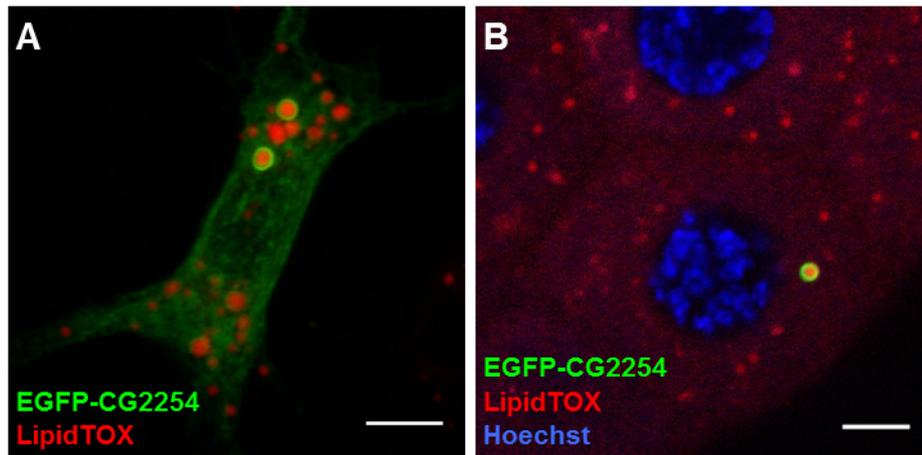


Abbildung 18: EGFP-CG2254 lokalisiert in weiteren Zelllinien und Geweben auf LD-Subpopulationen. (A) EGFP-CG2254 Expression in ML-DmBG3-c2-Zellen nach der Zugabe von 400 µM OA für drei Tage. Die Zellen wurden fixiert und die LDs mit HCS LipidTOX DeepRed gefärbt. Das Bild zeigt eine Maximum Intensitätsprojektion eines Z-Stapels, der mit einem Leica TCS SP2 aufgenommen wurde. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. (B) Mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems wurde EGFP-CG2254 in der Ringdrüse von wandernden L3-Larven exprimiert. Abgebildet ist eine Lebendaufnahme von Zellen der Prothorakaldrüse (ein Teil der Ringdrüse), die mit Hoechst und HCS LipidTOX DeepRed gefärbt wurden. Das Bild zeigt eine Aufnahme einer Fokalebene, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurde. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm.

Für die Struktur-Funktionsanalyse wurde die CG2254-Primärsequenz zunächst in drei Abschnitte unterteilt. Einen *N*-terminalen Teil (Aminosäure 1-48), der die vorausgesagte Transmembrandomäne (TMD) enthält und somit möglicherweise für die Bindung an die LDs notwendig ist; einen mittleren Teil (Aminosäure 49-238), der voraussichtlich die NAD(P)^+ -Bindestelle enthält; sowie einen *C*-terminalen Abschnitt (Aminosäure 239-320), der bei SDRs üblicherweise die Bindestelle für das Substrat einschließt. Letztere Funktion könnte unter Umständen für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen eine Rolle spielen, wenn dieses Substrat auch nur in LD-Subpopulationen vorkommt. Die einzelnen Teilabschnitte und Kombinationen wurden mit EGFP fusioniert in Kc167-Zellen exprimiert (Abbildung 19). Für die LD-Lokalisation ist EGFP-CG2254 aa1-48 ausreichend (Abbildung 19A). Dabei lokalisiert dieses Konstrukt auf allen LDs und nicht auf Subpopulationen. Der *C*-terminale Bereich alleine befindet sich nicht auf LDs, sondern aufgrund der gleichmäßigen Verteilung in der Zelle wahrscheinlich im Zytoplasma (Abbildung 19D). Eine Kombination aus dem *N*-terminalen Bereich und dem Mittelteil lokalisiert dagegen wieder auf einzelnen LDs (Abbildung 19G), sodass wahrscheinlich im Mittelteil ein Signal für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen vorhanden ist.

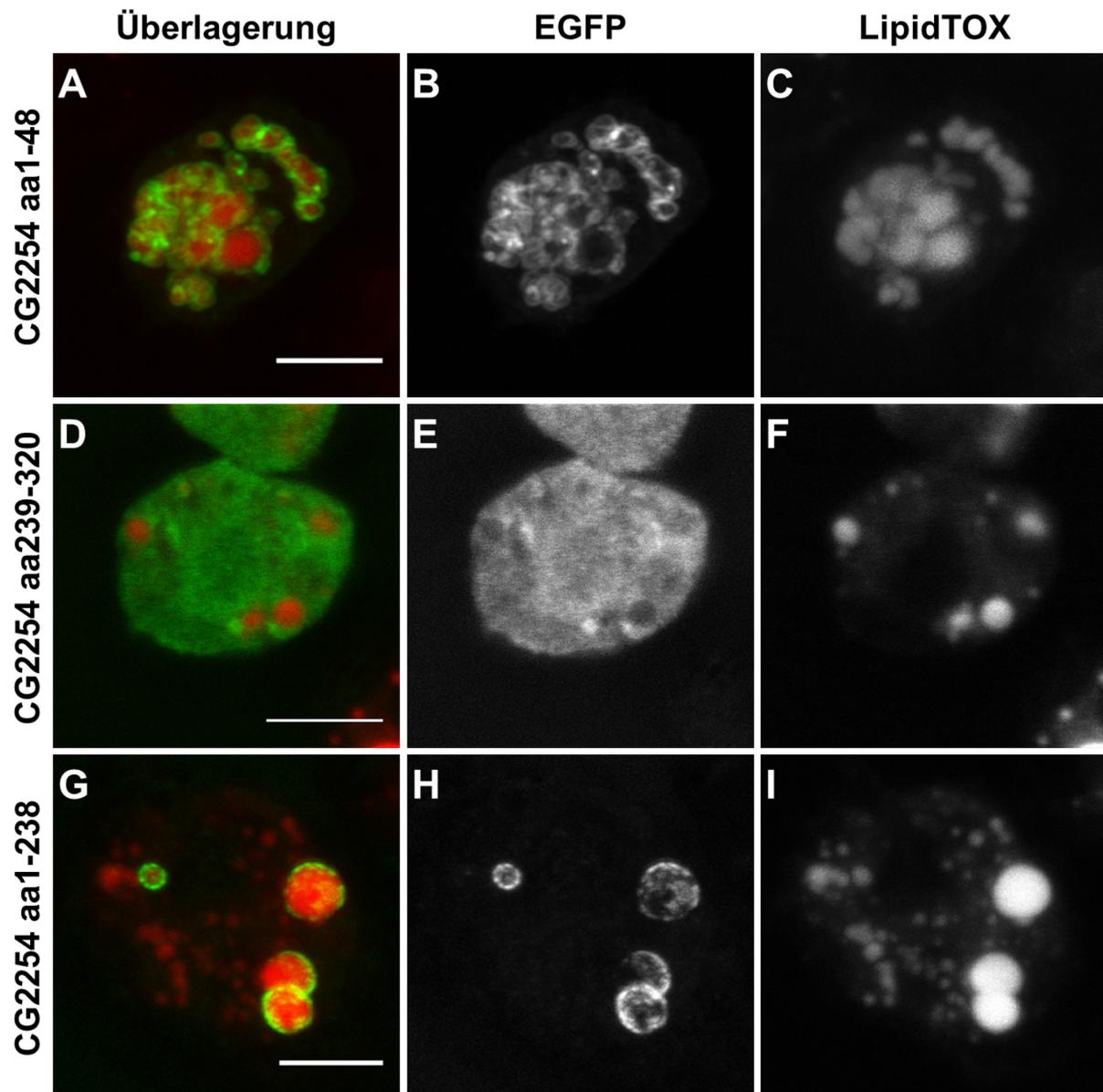


Abbildung 19: Lokalisation von CG2254-Deletionskonstrukten in Kc167-Zellen. Kc167-Zellen wurden für die Expression von EGFP-markierten Abschnitten von CG2254 transient transfiziert und für zwei Tage mit 800 μ M OA behandelt. Die Gegenfärbung der LDs in den fixierten Zellen erfolgte mit HCS LipidTOX DeepRed. (A-C) Der *N*-terminale Abschnitt von CG2254 (aa1-48) lokalisiert auf allen LDs. (D-F) Der *C*-terminale Abschnitt von CG2254 (aa239-320) befindet sich nicht auf LDs, sondern gleichmäßig in der Zelle verteilt. (G-I) Die Kombination aus *N*-terminalen Abschnitt und Mittelteil (aa1-238) lokalisiert auf LD-Subpopulationen. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

Um den notwendigen Bereich für die LD-Lokalisation genauer zu bestimmen, wurden weitere Deletionen hergestellt. Das Konstrukt bestehend aus dem CG2254 Mittelteil und dem *C*-terminalen Ende (aa49-320) lokalisiert mit EGFP markiert nicht mehr auf LDs (Abbildung 20A). Somit enthält nur der *N*-terminale Bereich ein LD-Lokalisationssignal. Eine weitere Eingrenzung dieses Lokalisationssignals erfolgte durch die Deletion des Bereiches vor der vorhergesagten TMD (aa1-20). Diese EGFP-markierte Proteinvariante (CG2254 aa21-320) lokalisiert wie das Volllängen-Protein auf LD-Subpopulationen (Abbildung 20D). Ein drittes

Konstrukt besteht nur aus den Aminosäuren 21-48, die der vorhergesagten TMD entsprechen. Dieses Konstrukt befindet sich auf allen LDs (Abbildung 20G). Damit ist die vorhergesagte TMD alleine sowohl notwendig und auch ausreichend für die LD-Lokalisation von EGFP-CG2254. Im folgendem wird dieser Bereich als LDL-Sequenz (für *lipid droplet*-Lokalisationssequenz) bezeichnet. Die Expression von EGFP-CG2254 aa21-48 wirkt sich auch auf die Morphologie der LDs aus: Sie sind in ihrer Größe homogener (Vergleich Abbildung 20C, F und I) und kommen zum Teil auch als Aggregate vor.

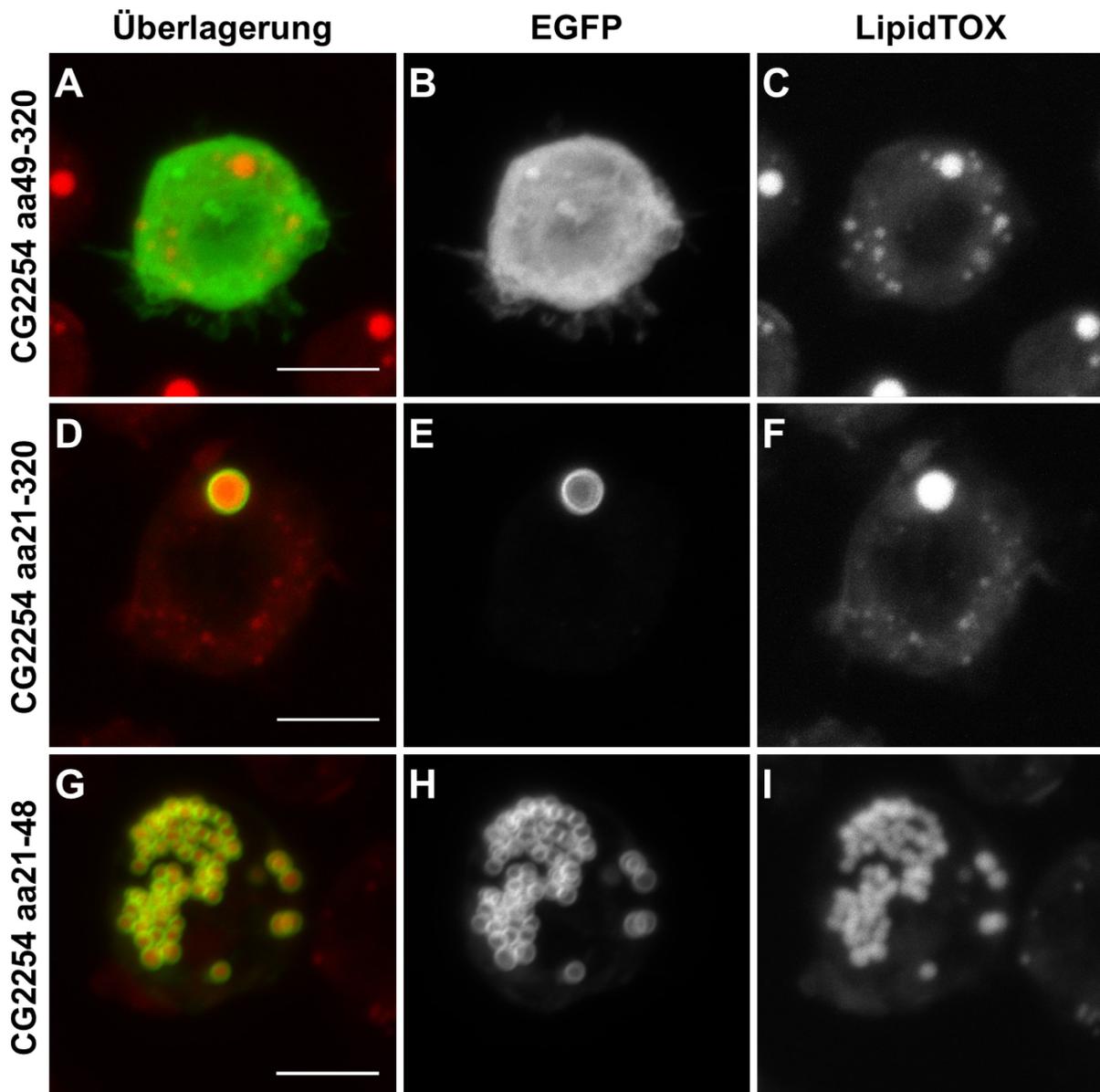


Abbildung 20: Die LDL-Sequenz von CG2254 befindet sich in den Aminosäuren 21-48. Kc167-Zellen wurden für die Expression von EGFP-markierten CG2254 aa49-320 (A-C), aa21-320 (D-F) und aa21-48 (G I) transient transfiziert und für zwei Tage mit 800 µM OA behandelt. Die LDs in den fixierten Zellen wurden mit HCS LipidTOX DeepRed gefärbt. (A-C) Ohne die Aminosäuren 1-48 (CG2254 aa49-320) erfolgt keine Lokalisation auf LDs. (D-F) Ohne die Aminosäuren 1-20 (CG2254 aa21-320) lokalisiert das Konstrukt auf LD-Subpopulationen. (G-I) Die Aminosäuren 21-48 alleine reichen für die Lokalisation auf LDs aus, nicht aber für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm.

3.6 Struktur-Funktionsanalyse für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen

Im Gegensatz zur vollen CG2254-Sequenz führt die LDL-Sequenz allein zur Lokalisation auf allen LDs. Daher muss es mindestens einen weiteren Bereich innerhalb von CG2254 geben, der die Lokalisation auf LD-Subpopulationen bewirkt. Mit Hilfe von zusätzlichen Deletionskonstrukten wurde nach diesem Bereich gesucht. EGFP-markiertes CG2254 aa1-238 lokalisiert auf LD-Subpopulationen (Abbildung 19G), ebenso wie die verkürzten CG2254-Varianten aa1-120 und aa1-90 (Abbildung 21A und D). EGFP-CG2254 aa1-60 lokalisiert dagegen auf allen LDs (Abbildung 21G). Die Lokalisation auf allen LDs bleibt auch bei aa1-73 bzw. aa1-82 (Abbildung 22A und D) erhalten. Damit liegt der notwendige Bereich für die Lokalisation auf LD-Subpopulation minimal zwischen den Aminosäuren 83 und 90, wenn nur einzelne Aminosäuren oder eine kurze Signalsequenz entscheidend sind, aber sicher zwischen den Aminosäuren 49 und 90, wenn größere Strukturelemente von Bedeutung sind. Im weiteren Text wird der Bereich aa49-90 als LDSP-Sequenz bezeichnet (für *lipid droplet*-Subpopulationssequenz). Falls dies die einzige notwendige Sequenz für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen ist, sollte durch das Entfernen dieses Abschnittes EGFP-CG2254 Δ 49-90 auf allen LDs lokalisieren. Dies ist jedoch nicht der Fall (Abbildung 22G). Somit muss es mindestens einen weiteren Bereich geben, der die Lokalisation auf Subpopulationen bestimmt. Trotz zusätzlicher Deletionskonstrukte (CG2254 Δ 49-238 und CG2254 aa1-48::91-120) konnte sie nicht eindeutig bestimmt werden (Abbildung 22J und M). Sie ist aber nicht im C-terminalen Bereich enthalten, der für die Substratbindung der SDRs notwendig ist, da dieser zusammen mit der LDL-Sequenz als Fusionsprotein mit EGFP (EGFP-CG2254 Δ 49-238) auf allen LDs lokalisiert (Abbildung 22J).

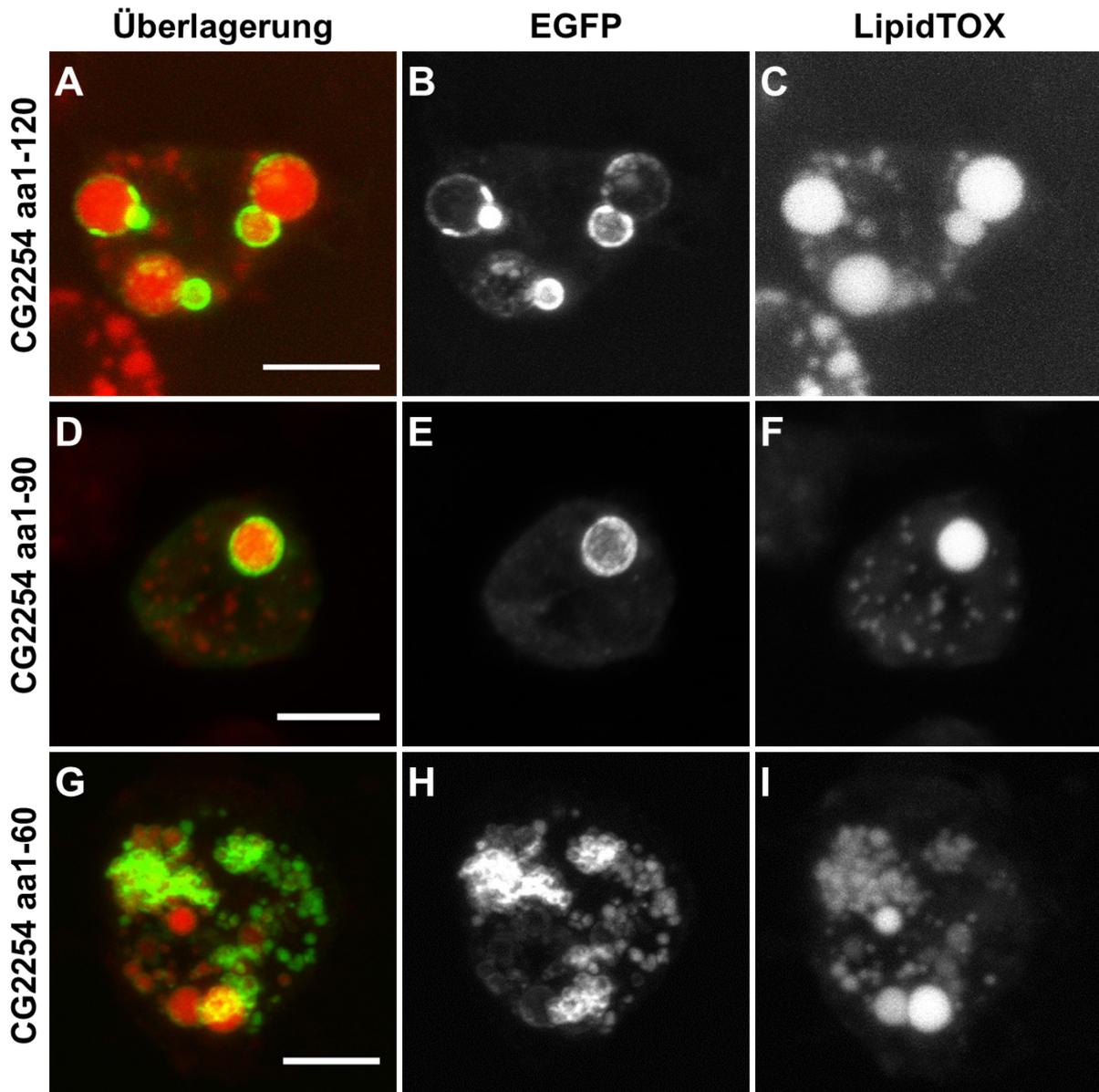


Abbildung 21: Die aa1-90 von CG2254 enthalten die Lokalisationssequenz für LD-Subpopulationen. Kc167-Zellen wurden für die Expression von EGFP-markierten Abschnitten von CG2254 transient transfiziert und für zwei Tage mit 800 μ M OA behandelt. Die Gegenfärbung der LDs in den fixierten Zellen erfolgte mit HCS LipidTOX DeepRed. In der Überlagerung der Kanäle (A, D und G) ist zu erkennen, dass die Deletionskonstrukte CG2254 aa1-120 (B) und aa1-90 (E) noch auf LD-Subpopulationen lokalisieren, während sich CG2254 aa1-60 (H) auf allen LDs befindet. Damit enthält CG2254 neben dem Signal für die generelle LD-Lokalisation ein weiteres Signal für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen zwischen den Aminosäuren 49-90. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

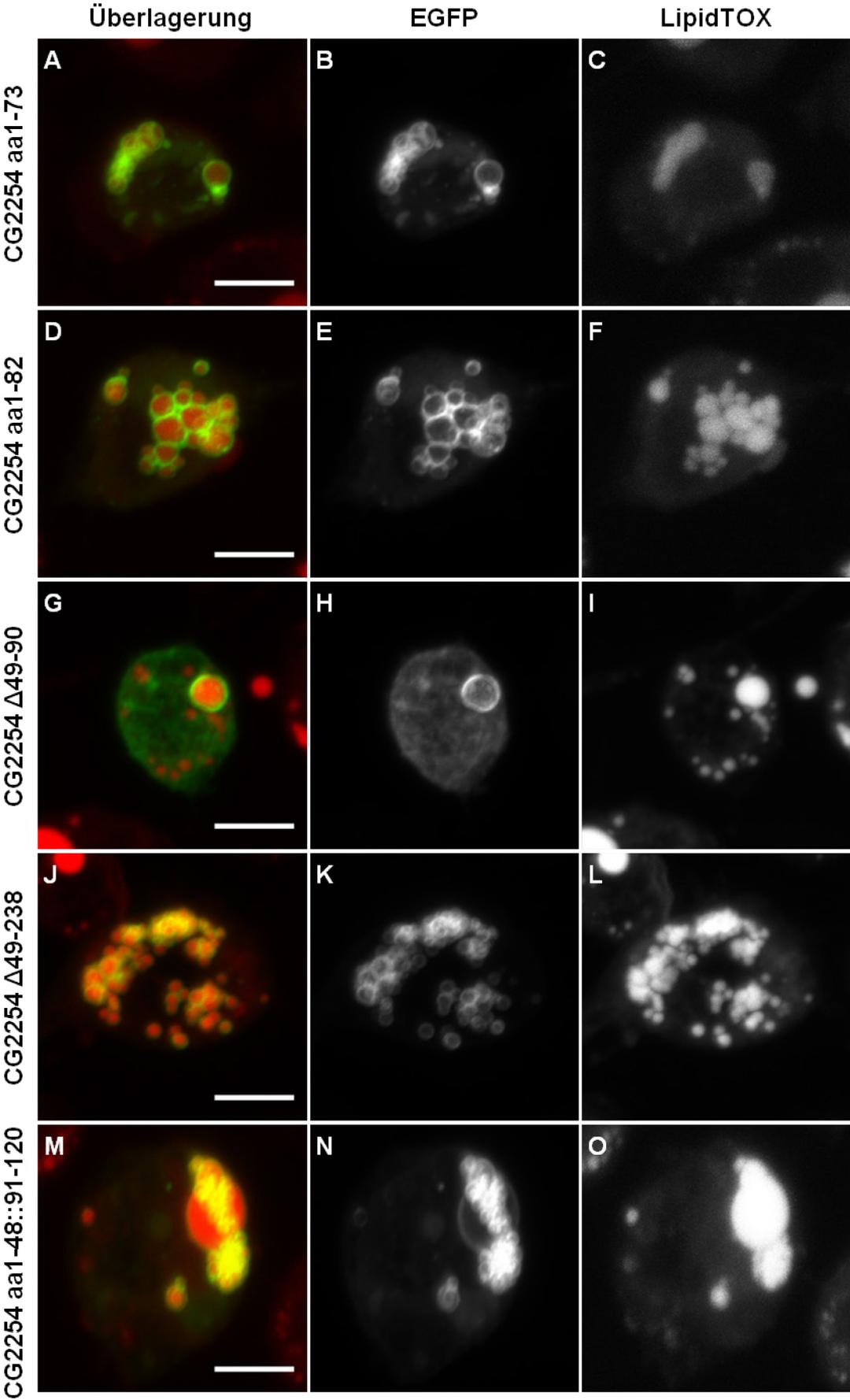


Abbildung 22: CG2254 besitzt mehr als ein Signal für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen. Kc167-Zellen wurden für die Expression von EGFP-markierten Abschnitten von CG2254 transient transfiziert und für zwei Tage mit 800 μM OA behandelt. Die Gegenfärbung der LDs in den fixierten Zellen erfolgte mit HCS LipidTOX DeepRed. Nur die ersten 73 (CG2254 1-73, A-C) bzw. 82 (CG2254 aa1-82, D-F) Aminosäuren reichen nicht für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen aus. (G-I) Selbst ohne die Sequenz für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen (CG2254 Δ 49-90) ist das Deletionsprotein auf einzelnen LDs zu finden. (J-L) Das C-terminale Ende mit dem Bereich für die Substratbindung (aa239-320) enthält kein weiteres Signal für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen, wie das Konstrukt CG2254 Δ 49-238 zeigt. (M-O) Auch die Fusion von CG2254 aa1-48::91-120 lokalisiert auf allen LDs. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm .

3.7 Notwendigkeit einzelner Aminosäuren für die Lokalisation von CG2254

Durch die Struktur-Funktionsanalyse konnten Bereiche in der Proteinsequenz von CG2254 identifiziert werden, die für die Lokalisation auf LDs und LD-Subpopulationen notwendig sind. In diesen Abschnitten kommen einzelne Aminosäuren vor, die durch ihre physikalischen Eigenschaften oder durch mögliche posttranslationale Modifikationen bei der Lokalisation eine Rolle spielen könnten. Mittels gezielter Punktmutationen wurde diese Hypothese für sechs dieser Aminosäuren getestet.

Für die LD-Lokalisation sind die Aminosäuren 21-48 notwendig und ausreichend. Dieser Abschnitt mit der vorhergesagten TMD enthält die zwei polaren Aminosäuren Asparaginsäure an Position 28 und Lysin an Position 35. Solche Aminosäuren können einer TMD einen amphipatischen Charakter verleihen (Monika Oberer, persönliche Kommunikation). Der Austausch dieser beiden Aminosäuren gegen zwei Aminosäuren mit einer kurzen, hydrophoben Seitenkette ändert die Polarität und könnte damit eventuell auch die Lokalisation des Proteins ändern. Die Abbildung 23 zeigt jedoch, dass dies nicht der Fall ist. Eine verringerte Polarität der vorhergesagten TMD hat daher keine direkten Auswirkungen auf die Lokalisation von EGFP-CG2254.

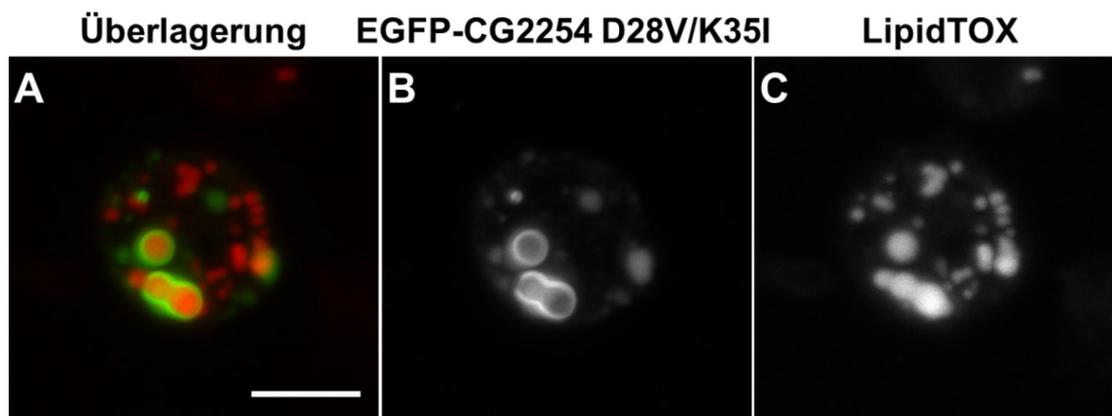


Abbildung 23: Die polaren Aminosäuren in der vorhergesagten TMD sind für die Lokalisation auf LDs nicht essentiell. (A-C) Kc167-Zellen wurden für die Expression von EGFP-CG2254 mit den zwei Punktmutationen D28V und K35I transient transfiziert und für 24 h mit 400 μM OA behandelt. Die LDs in den fixierten Zellen wurden mit HCS LipidTOX DeepRed gegengefärbt. EGFP-CG2254 D28V/K35I lokalisiert trotz der Punktmutationen auf LD-Subpopulationen. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm .

Die LDSP-Sequenz von CG2254 liegt in dem für die Bindung des Kosubstrats wichtigen, stärker konservierten Bereich der SDRs. Mit Hilfe eines Sequenzvergleiches dieser Region von CG2254 und den analogen Bereichen der weiteren untersuchten, nahen verwandten SDRs wurde nach Aminosäuren gesucht, die durch Abweichung von der Konsensus-Sequenz auffallen (Abbildung 24). Außer DHS-4 lokalisieren die untersuchten SDRs auf LD-Subpopulationen, sodass Unterschiede zu DHS-4 auf die Aminosäuren hindeuten könnten, die für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen notwendig sind. Die Unterschiede sind jedoch gering. Auffällig sind nur die zusätzlichen Aminosäuren YSLL an Position 31-34 (Position 51-54 und 80 des Alignments) und die Lysine an den Positionen 43 und 58 (Position 63 und 80 des Alignments).

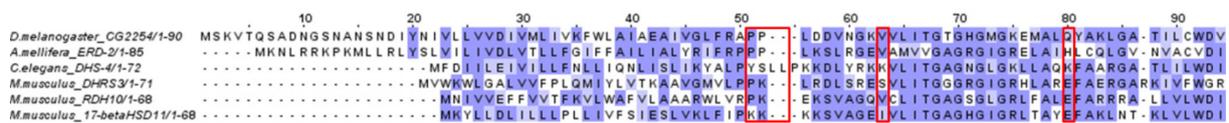


Abbildung 24: Sequenzvergleich von CG2254 und nah-verwandten SDRs. Dargestellt ist nur der Bereich, der bei CG2254 die LDSP-Sequenz enthält (aa1-90).

Keine der genannten Aminosäuren fällt aber in den Abschnitt von Aminosäure 83 bis 90, der bei CG2254 für die LDSP-Sequenz notwendig ist. Hier lassen sich vier Aminosäuren ausmachen, die eine potentielle Funktion bei der Lokalisation haben könnten. Das Threonin an Position 84 lässt sich phosphorylieren und es ist bekannt, dass das Hinzufügen bzw. Entfernen einer Phosphatgruppe die Lokalisation von Proteinen ändern kann (z. B. HSL auf LDs (Sztalryd *et al.*, 2003)). Das Cystein an Position 87 kann durch Acylierung oder Prenylierung mit Lipidgruppen verknüpft werden, die eine Bindung an (bestimmte) Membranen erlaubt (z. B. Rab-Proteine, Calero *et al.*, 2003). Tryptophan an Position 88 hat eine große aromatische Seitenkette, mit der Membraninteraktionen möglich sind (de Jesus und Allen, 2013). Ebenso kann die Asparaginsäure an Position 89 aufgrund der polaren Seitenkette die Bindeeigenschaften verändern. Bis auf das Cystein kommen die genannten Aminosäuren auch bei DHS-4 vor. Dennoch wurden sie alle durch gezielte Punktmutationen einzeln im gekürzten CG2254 aa1-90 gegen kurz-kettige, neutrale bis hydrophobe Aminosäuren ausgetauscht: T84A, C87G, W88G und D89A. In Abbildung 25 ist die Lokalisation der EGFP-fusionierten Konstrukte zu sehen. In allen Fällen zeigt sich eine Lokalisation auf LD-Subpopulationen, wodurch keine der ausgetauschten Aminosäuren alleine für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen notwendig ist.

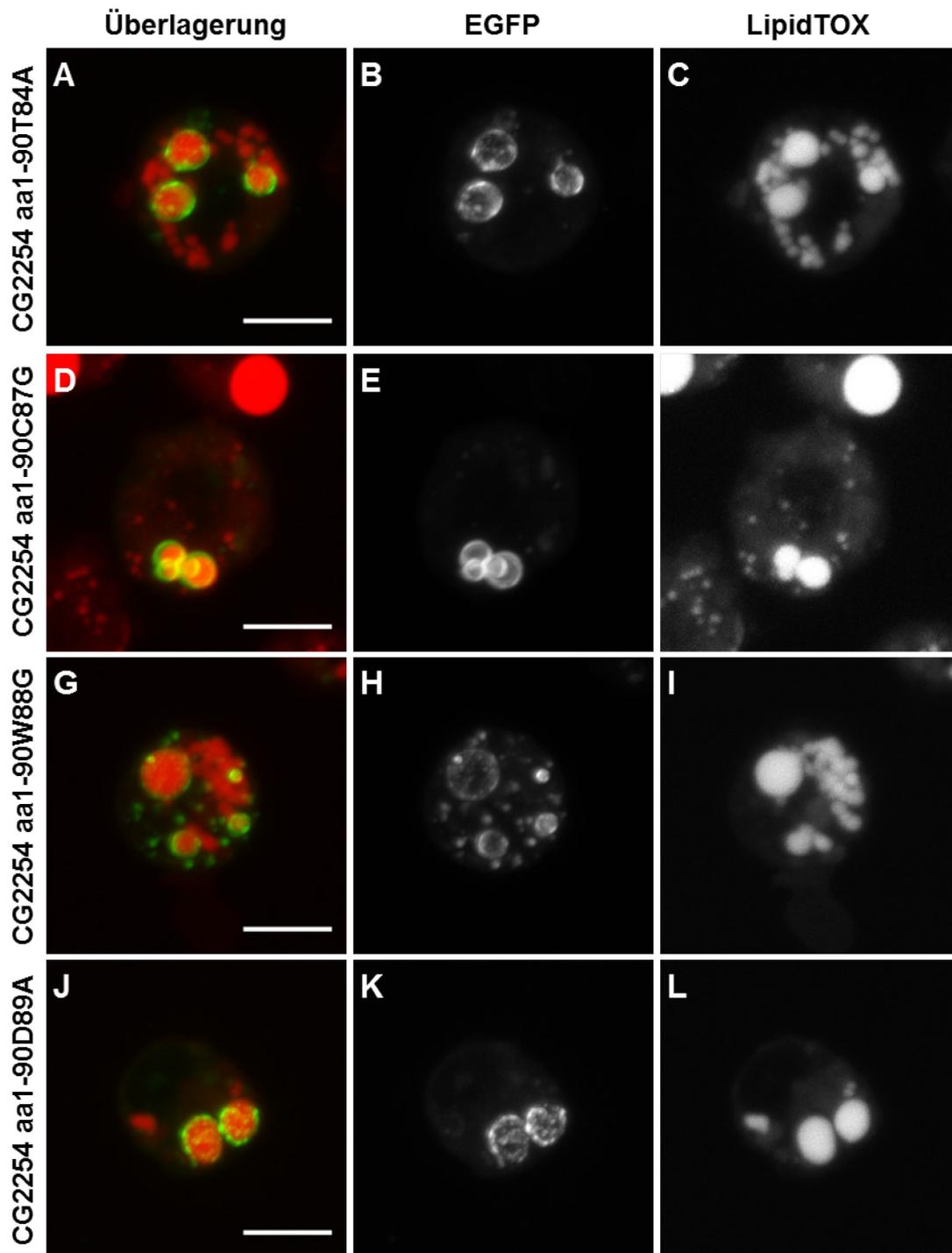


Abbildung 25: Verschiedene Punktmutationen in der LDSP-Sequenz haben keine Auswirkung auf die Lokalisation von CG2254. In das minimale noch auf LD-Subpopulationen lokalisierende Deletionskonstrukt von CG2254 (CG2254 aa1-90) wurden die Punktmutationen T84A (A-C), C87G (D-F), W88G (G-I) und D89A (J-L) eingeführt, und mit EGFP fusioniert transient in Kc167-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit 800 μ M OA für zwei Tage inkubiert, dann fixiert und mit HCS LipidTOX DeepRed gegengefärbt. Alle hier getesteten CG2254-Varianten lokalisieren weiterhin auf LD-Subpopulationen. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

Abbildung 26 fasst alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten Deletions- und Punktmutationen von CG2254 zusammen. Mittels der Struktur-Funktionsanalyse konnte gezeigt werden, dass CG2254 getrennte Signale für die Lokalisation zu LDs und zu LD-Subpopulationen besitzt.

Für die Lokalisation auf LDs ist der hydrophobe Bereich von aa21-48 ausreichend und notwendig, für die Subpopulationen gibt es mehrere Signale, eines davon im Bereich der Aminosäuren 49-90. Die untersuchten einzelnen Aminosäuren alleine haben dabei keine Auswirkung auf die Lokalisation.

Konstrukt	Lokalisation		Schema
	LDs	LD-Subpopulation	
Volllänge	ja	ja	
aa1-48	ja	nein	
aa239-320	nein	-	
aa49-320	nein	-	
aa21-320	ja	ja	
aa21-48	ja	nein	
aa1-60	ja	nein	
aa1-73	ja	nein	
aa1-82	ja	nein	
aa1-90	ja	ja	
aa1-120	ja	ja	
aa1-238	ja	ja	
Δ49-90	ja	ja	
Δ49-238	ja	nein	
aa1-48::aa91-120	ja	nein	
Punktmutationen			
Volllänge D28V K35I	ja	ja	
aa1-90 T84A	ja	ja	
aa1-90 C87G	ja	ja	
aa1-90 W88G	ja	ja	
aa1-90 D89A	ja	ja	

Abbildung 26: Übersicht der hergestellten CG2254-Proteinvarianten und ihrer Lokalisation auf LDs bzw. LD-Subpopulationen als EGFP-Fusionsprotein. In der rechten Spalte ist eine schematische Darstellung der Konstrukte bzw. Punktmutationen zu sehen. Das blaue Rechteck symbolisiert die LDL-Sequenz und das rote die LDSP-Sequenz.

3.8 Chimäre Proteine mit der LDSP-Sequenz von CG2254

Die Deletionsmutanten von CG2254 zeigen, dass die beiden Signalsequenzen für die Lokalisation auf allen LDs und auf LD-Subpopulationen voneinander getrennt liegen. Dadurch kam die Frage auf, ob die LDSP-Sequenz von CG2254 ausreicht, um auch bei anderen LD-assoziierten Proteinen die Lokalisation auf einzelne LDs zu beschränken. Das könnte weitere Aufschlüsse über den Wirkungsmechanismus dieser Sequenz geben, ob z. B. eine bestimmte Position der LDSP-Sequenz innerhalb des Proteins notwendig ist oder der Weg, auf dem das Protein zu den LDs gelangt. Für die Fusionen wurden zwei Proteine ausgewählt: die annotierte Lipase CG9186, deren LDL-Sequenz identifiziert wurde und die ähnlich wie CG2254 in Abwesenheit von LDs im ER vorkommt (Thiel *et al.*, 2013) und

PERILIPIN2 (PLIN2), dessen Funktion in der Regulation der Fettspeicherung bereits beschrieben wurde (Grönke *et al.*, 2003) und dessen LDL-Sequenzen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls durch Deletionskonstrukte bestimmt wurden (s. Anhang Abbildung 49). Im Gegensatz zu CG2254 und CG9186 lokalisiert es vom Zytosol auf die LDs und nicht vom ER. Bei beiden Proteinen wurde die LDSP-Sequenz sowohl an das C-terminale Ende des Proteins als auch direkt hinter die jeweilige LDL-Sequenz, wie es auch bei CG2254 der Fall ist, gefügt. Damit lässt sich überprüfen, ob die Funktion der LDSP-Sequenz positionsabhängig ist. Abbildung 27 zeigt eine schematische Darstellung der generierten Konstrukte. Die chimären Proteine wurden mit EGFP fusioniert und ihre Lokalisationen in Kc167-Zellen untersucht (Abbildung 28). Die LDSP-Sequenz am C-terminalen Ende kann weder PLIN2 (PLIN2::CG2254aa49-90, Abbildung 28A) noch CG9186 (CG9186::CG2254aa49-90, Abbildung 28G) auf LD-Subpopulationen lenken. PLIN2aa1-152::CG2254aa49-90, bei dem die LDSP-Sequenz direkt hinter einer LDL-Sequenz von PLIN2 liegt, lokalisiert ebenfalls auf allen LDs (Abbildung 28D). Nur wenn die LDSP-Sequenz direkt hinter der LDL-Sequenz von EGFP-CG9186 aa1-195 liegt, lokalisiert das chimäre Protein auf LD-Subpopulationen (CG9186aa1-195::CG2254aa49-90, Abbildung 28J). Daraus lassen sich zwei Rückschlüsse schließen: Die Funktion der LDSP-Sequenz ist positionsabhängig und außerdem scheint der Weg über das ER für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen notwendig zu sein.

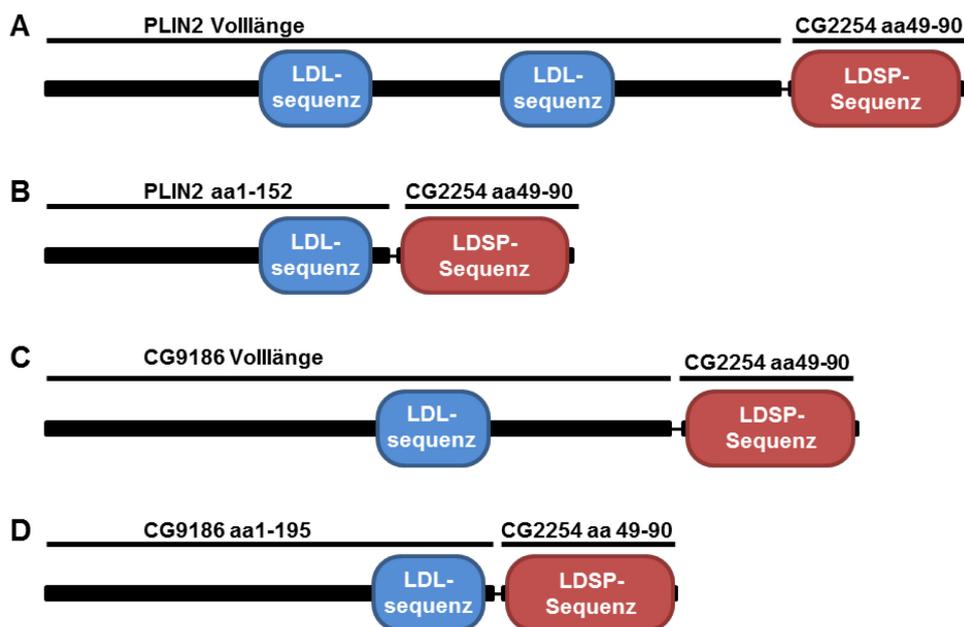


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Fusionsproteine aus PLIN2 bzw. CG9186 und der Sequenz für LD-Subpopulationen aus CG2254. Die LDSP-Sequenz von CG2254 wurde an zwei Positionen von PLIN2 bzw. CG9186 gefügt. Zum einen an das C-terminale Ende des Volllängen-Proteins (A bzw. C); zum anderen an das C-terminale Ende des gekürzten Proteins nahe der jeweiligen LDL-Sequenz. Bei PLIN2 entspricht das den aa1-152 (B), bei CG9186 den aa1-195 (D).

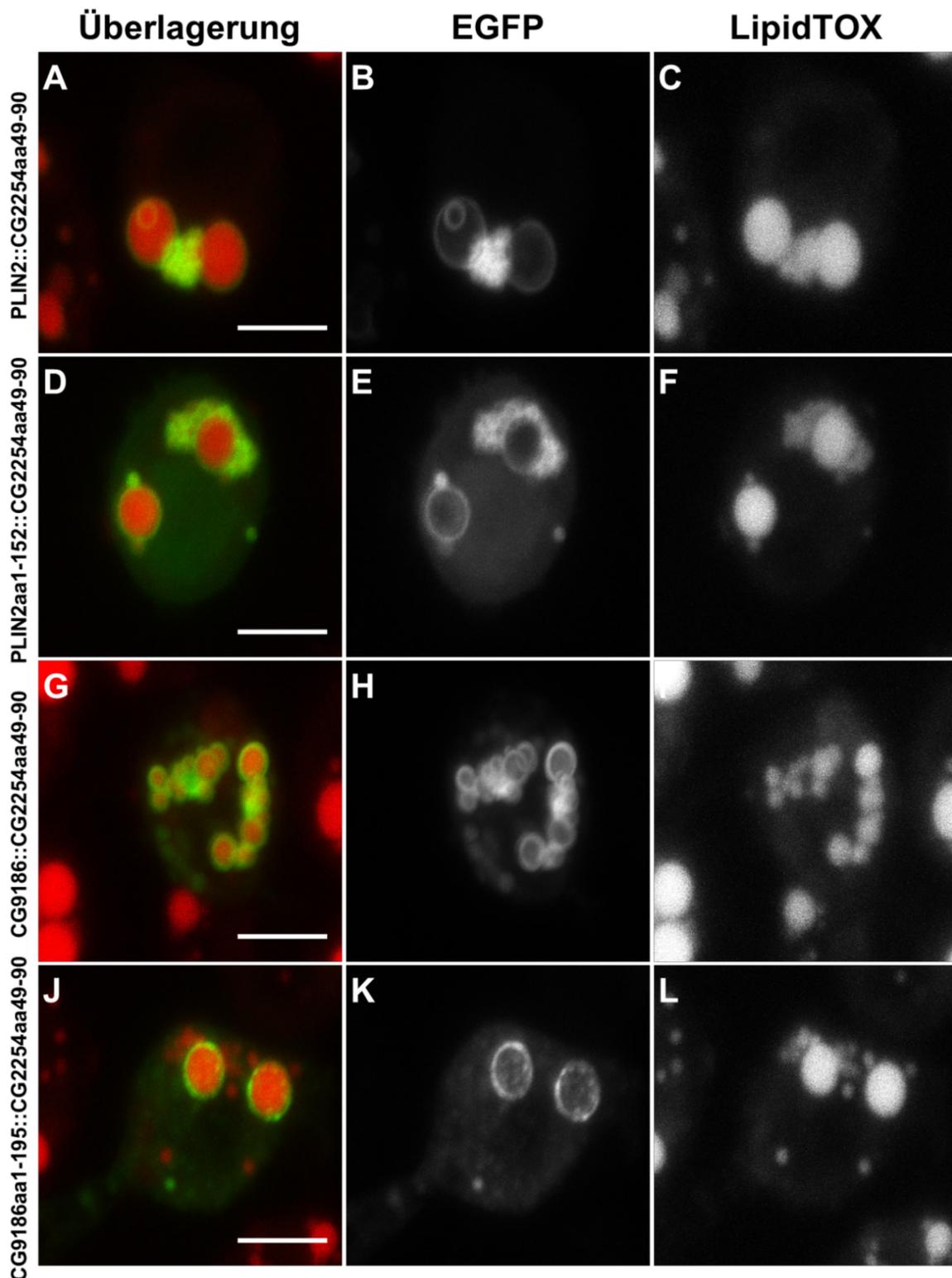


Abbildung 28: Chimäre Proteine mit der LDSP-Sequenz von CG2254. Kc167-Zellen wurden für die Expression von EGFP-fusionierten, chimären Proteinen aus PLIN2 bzw. CG9186 und der LDSP-Sequenz von CG2254 transient transfiziert und über Nacht mit 800 μ M OA behandelt. Die LDs in den fixierten Zellen wurden mit HCS LipidTOX DeepRed gegengefärbt. (A-C) Volllängen EGFP-PLIN2 mit CG2254 aa49-90 (PLIN2::CG2254aa49-90) lokalisiert auf allen LDs (D-F) EGFP-PLIN2-aa1-152, das eine LD-Signalsequenz enthält, befindet sich auf allen LDs, selbst wenn es mit CG2254 aa49-90 fusioniert ist. (G-I) Volllängen EGFP-CG9186 mit CG2254 aa49-90 (CG9186::CG2254aa49-90) lokalisiert auf allen LDs. (J-L) Nur wenn CG2254 aa49-90 direkt hinter der LD-Signalsequenz von EGFP-CG9186 fusioniert ist (CG9186aa1-195::CG2254aa49-90), lokalisiert das chimäre Protein auf LD-Subpopulationen. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

3.9 Die Charakterisierung von CG2254 *in vivo*

Im vorherigen Teil erfolgte die Beschreibung von CG2254 ausschließlich mit *in vitro* Daten. Zellkultursysteme erlauben aufgrund ihrer leichten Handhabung eine schnellere Analyse von zellulären Prozessen wie z. B. der Protein-Lokalisation. Doch in Kc167-Zellen wird CG2254 nicht exprimiert. Für eine weitere Charakterisierung von CG2254 wurde das Protein deswegen *in vivo* untersucht, um seine Funktion im organismischen Kontext zu verstehen. Im letzten Teil wird daher zunächst auf die Expression und die subzelluläre Lokalisation des endogenen CG2254 in *D. melanogaster* eingegangen, um auf diese Weise auch mögliche LD-Subpopulationen *in vivo* nachzuweisen. Abschließend werden die beobachteten Phänotypen bei veränderten CG2254-Proteinmengen dargestellt.

3.9.1 Nachweis der CG2254 *in vivo* Expression

Endogenes CG2254 kann nicht in Kc167-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 29A) und auch in den anderen bis jetzt etablierten *Drosophila* Zellkultur-Zelllinien wird es auf Basis von veröffentlichten Hochdurchsatz-Genexpressionsdaten nicht exprimiert (Gelbart und Emmert, 2013). Dagegen weisen diese Genexpressionsdaten sowie die Daten der durch das Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP, Tomancak *et al.*, 2002) durchgeführten *in situ* Hybridisierung in Embryonen unter anderem auf eine Expression von CG2254 im Fettkörper, in der Ringdrüse und im Darm von Embryonen und Larven hin.

Als erstes wurde untersucht, in welchen Geweben das endogene CG2254-Protein vorkommt. Das CG2254-Protein kann in der massenspektroskopischen Analyse von LDs, die aus Fettkörpern von späten wandernden L3-Larven stammen, nachgewiesen werden (Beller *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurden in diesem Gewebe CG2254-kodierende Transkripte beim Hochdurchsatz-Screening gefunden (Gelbart und Emmert, 2013). Mit einer Western Blot-Analyse von Fettkörpern aus späten wandernden *w¹¹¹⁸* L3-Larven konnte dieser Befund bestätigt werden (Abbildung 29A). Um zu testen, ob endogenes CG2254 nicht nur im Fettkörper exprimiert wird, sondern dort auch auf LDs lokalisiert, wurde eine subzelluläre Fraktionierung von Fettkörpern aus wandernden *w¹¹¹⁸* L3-Larven mit einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (Abbildung 29B). Dabei lassen sich die LDs leicht von den anderen Zellbestandteilen trennen, da sie aufgrund ihrer geringen Dichte nach oben steigen, wo sie sich als Fettschicht sammeln (Grönke *et al.*, 2003). Der größte Anteil des CG2254-Proteins befindet sich in den obersten beiden Fraktionen des Gradienten. Durch den LD-Marker PLIN2 (Beller *et al.*, 2010a) wird gezeigt, dass diese Fraktionen die LDs enthalten. Ein kleinerer Anteil des CG2254-Proteins ist im mikrosomalen Pellet zu finden, das

hauptsächlich aus Membranen des ERs besteht. Im Zytoplasma ist das CG2254-Protein dagegen kaum nachweisbar, während das zytoplasmatische Marker-Protein Alkoholdehydrogenase (Adh) (Beller et al., 2010a) hier am prominentesten vorliegt. Somit entspricht die Lokalisierung des endogenen Proteins im Fettkörper der Lokalisierung des EGFP-markierten Proteins in Zellkulturzellen, wo es auch auf LDs und in Anwesenheit von LDs in geringen Mengen im ER vorkommt.

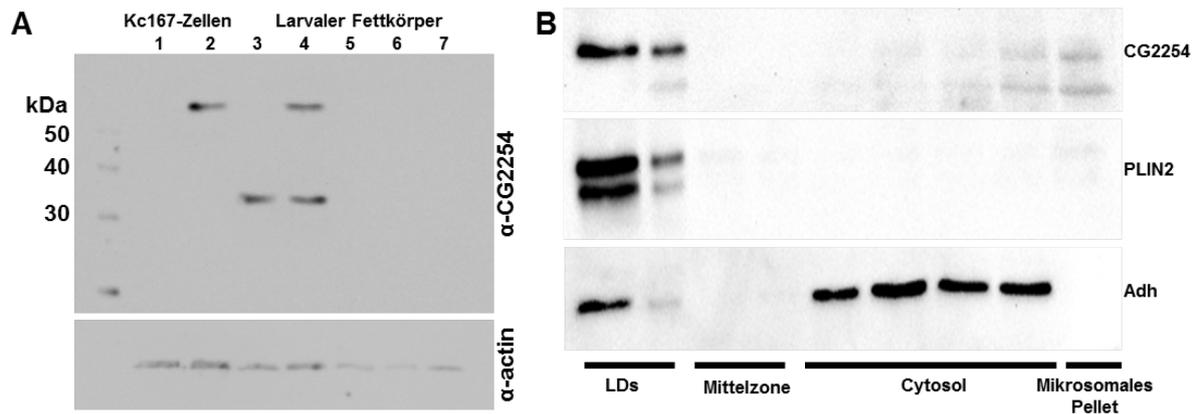


Abbildung 29: Analyse der CG2254-Expression und -Lokalisation (A) Untersuchung der Expression von CG2254 in Kc167-Zellen und Fettkörpern aus wandernden Larven des L3-Stadium mittels Western Blot Analyse. (1) Endogenes CG2254-Protein (theoretisches Molekulargewicht von 35,6 kDa) lässt sich nicht in *Drosophila* Kc167-Zellen nachweisen. (2) In Kc167-Zellen mit stabiler Expression von EGFP-CG2254 wird das Fusionsprotein (theoretisches Molekulargewicht 64,3 kDa) erkannt. (3-7) Jeweils zehn Fettkörper wurden aus wandernden L3-Larven entnommen und aufgetragen. (3) In *w*⁻ Larven kommt das CG2254-Protein endogen vor. (4) In Fettkörpern mit einer Gal4/UAS-vermittelten Expression von EGFP-CG2254 wird sowohl das endogene CG2254 als auch das transgene Fusionsprotein detektiert. (5-7) Die Effizienz der drei Fliegenlinien zur RNA Interferenz-vermittelten Reduktion des CG2254-Proteins wurde getestet, indem die RNAi mittels des Gal4/UAS-Systems spezifisch im Fettkörper aktiviert wurde. Weder bei VDRC101143 (5), VDRC5470 (6) noch bei TRiP HMS01622 (7) kann das CG2254-Protein detektiert werden. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Proteinbeladung dient das Signal der Actin Detektion (α -actin). (B) Endogenes CG2254 ist in der LD-Fraktion angereichert. Eine Fraktionierung mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation wurde wie unter 2.14.2 beschrieben mit 30 Fettkörpern aus *w*⁻ L3-Larven durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot und den Antikörpern gegen CG2254, PLIN2 und Adh. Vier Fraktionen wurden unterschieden: Die LD-Fraktion, in der das LD-Protein PLIN2 (Beller et al., 2010a) als Marker nachgewiesen werden kann; die Mittelzone, die kaum Proteine enthält; die zytoplasmische Fraktion, die hier mit Adh (Beller et al., 2010a) markiert ist; und das mikrosomale Pellet. Das CG2254-Signal ist in der LD-Fraktion am stärksten, was CG2254 als LD-Protein ausweist. Der geringere Anteil im mikrosomalen Pellet zeigt zudem, dass CG2254 auch *in vivo* im ER vorkommt. Die hier unter (B) gezeigte Fraktionierung und Western Blot-Analyse wurde von K. Thiel durchgeführt.

Die embryonale Expression von CG2254 wurde mit Hilfe von RNA *in situ* Hybridisierung an vollständigen Embryonen untersucht (Abbildung 30). Die deutliche Färbung in Embryonen im 16./17. Stadium lässt eine Expression von *CG2254* Transkripten im Fettkörper erkennen. Damit konnten die Ergebnisse des BDGPs bestätigt werden, in welchen mit der gleichen Sonde unter Hochdurchsatz-Bedingungen auch eine Expression im Fettkörper ab Stadium 13-16 gefunden wurde.

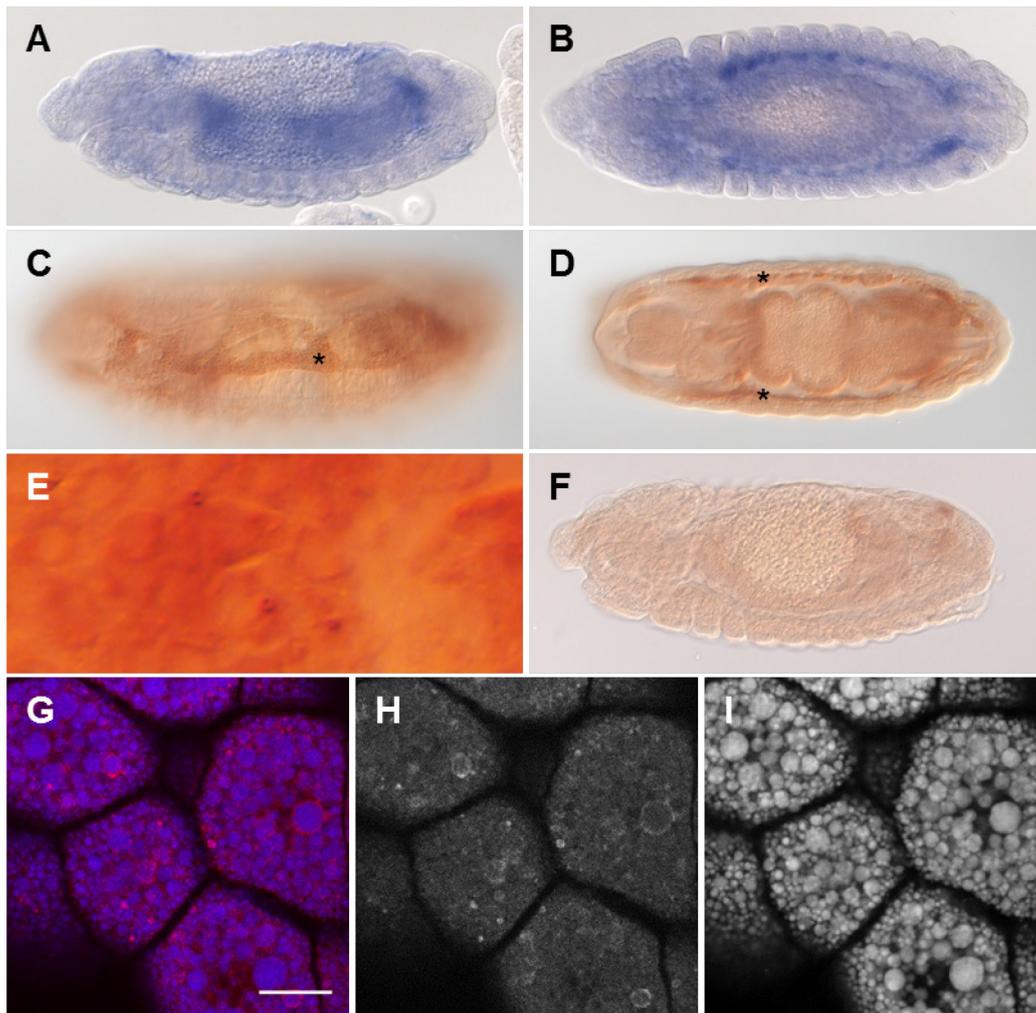


Abbildung 30: CG2254 wird im Fettkörper exprimiert und lokalisiert auf LD-Subpopulationen. (A-B) RNA *in situ* Hybridisierung an vollständigen Embryonen. DIG-markierte *antisense* RNA-Sonden wurden in *w*-Embryonen verwendet, um Transkripte von *CG2254* zu detektieren. In Embryonen im 16./17. Stadium wird eine Färbung im Fettkörper deutlich. (C-F) Kolorimetrische Antikörperfärbung gegen *CG2254* in späten *w*-Embryonen wie unter 2.10.3.1 beschrieben. Die Asteriscke markieren den embryonalen Fettkörper. (E) In der stärkeren Vergrößerung des Fettkörpers werden einzelne Ringe sichtbar. (F) Bei der Verwendung von Prä-Immunsereum erfolgt keine Färbung. (G-I) Antikörperfärbung gegen *CG2254* in Fettkörper aus späten, wandernden L3-Larven der *w* Fliegenlinie mit fluoreszenter Detektierung wurde wie unter 2.10.3.2 beschrieben durchgeführt. LDs sind mit HCS LipidTOX DeepRed gefärbt. Endogenes *CG2254* wird nur auf LD-Subpopulationen detektiert, nicht auf allen LDs. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop (A-F) und einem Leica TCS SP2 (G-I) aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Der Nachweis von *CG2254*-Transkripten alleine bedeutet jedoch noch nicht, dass auch das translatierte Protein vorhanden ist. Das endogene *CG2254*-Protein wurde anhand einer Antikörperfärbung mit kolorimetrischer Detektion in *w*-Embryonen im 16./17. Stadium nachgewiesen. Im Gegensatz zum Prä-Immunsereum, das zur Kontrolle für unspezifische Färbung diente, wurde mit einem *CG2254* spezifischen Antikörper der embryonale Fettkörper stärker gefärbt als der Hintergrund (Abbildung 30 C-F). Zudem sind dunkle Punkte zu sehen, die bei stärkerer Vergrößerung als Ringe erscheinen (Abbildung 30E). Das deutet auf eine Färbung von einzelnen LDs hin und damit auch auf eine Lokalisation von *CG2254* auf LDs.

Da der Fettkörper im Normalfall dicht mit LDs gefüllt ist, ist die Detektion nur relativ weniger Ringe ein starkes Indiz für die Existenz von LD-Subpopulationen *in vivo*.

Für eine eindeutige Aussage, ob auch endogenes CG2254 auf LD-Subpopulationen lokalisiert, wurde in Fettkörpern aus späten wandernden *w⁻* L3-Larven eine Antikörperfärbung gegen CG2254 mit fluoreszenter Detektion durchgeführt, bei der LDs mit HCS LipidTOX DeepRed gegengefärbt wurden (Abbildung 30K-M). LDs sind in den Zellen reichlich vorhanden und kommen in verschiedenen Größen vor. Das Signal des CG2254-spezifischen Antikörpers ist nur auf einzelnen LDs zu sehen, im Gegensatz zu den Kc167-Zellkulturzellen aber nicht immer auf den größten LDs. Das ist der erstmalige Beleg für die Existenz von LD-Subpopulationen *in vivo* und die Lokalisation von CG2254 auf diese.

Bei der Antikörperfärbung gegen CG2254 in späten Embryonen fanden sich einzelne Embryonen, bei denen in dorsaler Ansicht ein anteriores, paariges Signal zu sehen war (Abbildung 31). Anhand der Lage und Anordnung könnte es sich dabei um die Ringdrüse handeln. Dieser Fund wird von den Daten des BDGPs unterstützt, die angeben, dass bei ihrer RNA *in situ* Hybridisierung CG2254-Transkripte in der embryonalen Ringdrüse gefunden wurden (Tomancak *et al.*, 2002).



Abbildung 31: Mögliche CG2254-Expression in der Ringdrüse. (A) Dorsale Ansicht eines *w⁻* Embryos im 16. Stadium nach einer Antikörperfärbung gegen CG2254 mit kolorimetrischer Detektion (B) Vergrößerter Bildausschnitt des umrandeten Bereiches. Die Lage und symmetrische Anordnung des detektierten Signals deuten auf eine Expression in der Ringdrüse hin. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop erstellt.

Als weiteres Gewebe wurde der larvale Darm auf eine CG2254-Proteinexpression hin untersucht. Der Darm ist ähnlich wie der Fettkörper ein metabolisch aktives Organ und laut Hochdurchsatz-Daten wird CG2254 dort im Larvenstadium am stärksten exprimiert (Gelbart und Emmert, 2013). Abbildung 32 zeigt die Antikörperfärbung gegen CG2254 mit kolorimetrischer Detektion im Darmabschnitt m2 (Einteilung der Darmsegmente nach Definition von Murakami *et al.*, 1999) von einer nicht-wandernden *w⁻* L3-Larve vier Tage

nach der Eiablage. Bei den vielen, dunkel gefärbten Ringen handelt es sich aufgrund der Größe und Morphologie sehr wahrscheinlich um CG2254, das sich auf LDs befindet.

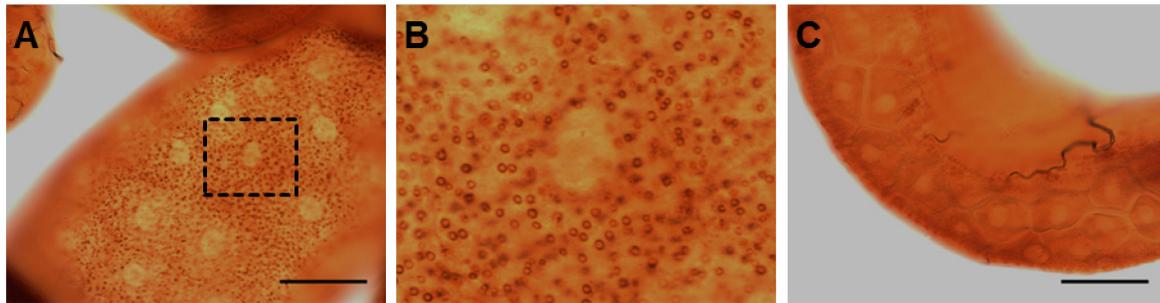


Abbildung 32: CG2254 wird im Darm exprimiert. Eine Antikörperfärbung gegen CG2254 mit kolorimetrischer Detektion wurde wie unter 2.10.3.1 beschrieben mit Därmen durchgeführt, die aus nicht wandernden L3-Larven der *w* Fliegenlinie vier Tage nach der Eiablage entnommen wurden. (A) zeigt den m2-Darmanschnitt nahe des Proventriculus. Das schwarze Quadrat umrahmt den vergrößerten Ausschnitt in (B), in welchem deutlich Ringe sichtbar sind. Mit Prä-Immunsereum erfolgt keine Färbung (C). Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioskop Mot 2 erstellt. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

3.9.2 Funktionsanalyse von CG2254 *in vivo*

In Kc167-Zellen wird CG2254 nicht exprimiert. Es ist für die Zellen weder überlebenswichtig noch im Zusammenhang mit LDs essentiell, wie z. B. für deren Bildung, Abbau oder Positionierung. Die Expression von EGFP-CG2254 in Kc167 wirkt sich auch nicht auf die Speicherung von TAG aus (Abbildung 33).

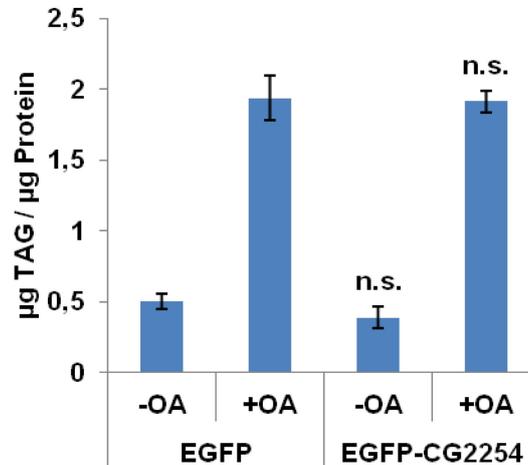


Abbildung 33: TAG-Messung von stabil transfizierten Kc167-Zellen. Enzymgekoppelte kolorimetrische Bestimmung des TAG-Gehalt (unter 2.14.7 beschrieben) von Kc167-Zellen, die entweder stabil EGFP-CG2254 oder nur EGFP exprimieren. Im Vergleich zeigen sich keine Unterschiede unabhängig davon, ob die Zellen für drei Tage mit 400 μM OA behandelt wurden oder nicht.

Die weitere Charakterisierung der CG2254 Funktion wurde daher *in vivo* durchgeführt. Neben dem Fettkörper und dem Darm, den beiden Geweben mit bestätigter CG2254-Expression, wurde aufgrund der Antikörperfärbung und den Daten der *in situ*-Färbung vom BDGP auch eine mögliche Funktion in der Ringdrüse untersucht. Um die CG2254-Proteinmenge mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems (Brand und Perrimon, 1993) zu verändern, standen vier Fliegenlinien

zur Verfügung: Eine UAS-EGFP-CG2254 Expressionslinie für die Überexpression von CG2254 (Beller *et al.*, 2006) und drei Linien zur RNA Interferenz-vermittelten Reduktion des CG2254-Proteins. Zwei dieser RNAi-Linien (VDRC101149 und VDRC5470) stammten vom „Vienna *Drosophila* RNAi Center“ (VDRC, Dietzl, Chen *et al.* 2007) und eine RNAi-Linie (TRiP HMS01622) vom „Transgenic RNAi Project“ (TRiP) der Harvard Medical School. Bei allen drei RNAi-Linien kann bei spezifischer Aktivierung im Fettkörper eine Reduktion des CG2254-Proteins unter die Nachweisgrenze des generierten Antiköpers festgestellt werden (Abbildung 29A). Jedoch richtet sich bei den beiden VDRC-Linien die RNAi nicht ausschließlich gegen *CG2254*, sondern auch noch gegen weitere Gene (VDRC101149: CG1500 und CG3415; VDRC5470: CG1500 und CG42784; s. <http://stockcenter.vdrc.at/>). Es ist daher nicht eindeutig, ob die teilweise aufgetreten Diskrepanzen der Phänotypen zwischen den drei RNAi-Linien durch eine unterschiedlich starke RNAi-vermittelte Reduktion von *CG2254* verursacht wurde oder durch die Reduktion weiterer Gentranskripte. Dabei sei angemerkt, dass bei den Diskrepanzen keine gegensätzlichen Phänotypen auftraten, sondern der Phänotyp nur nicht bei allen drei RNAi-Linien beobachtet werden konnte. Dennoch liegt der Fokus hier auf den Ergebnissen der TRiP-Linie (hiernach als RNA-Linie 1 bezeichnet), da bei dieser Linie neben *CG2254* keine weiteren Gene durch die RNAi betroffen sind. Die Ergebnisse der beiden VDRC RNAi-Linien (hiernach als RNAi-Linie 2 (VDRC101149) und 3 (VDRC5470) bezeichnet) befinden sich im Anhang unter 5.3 und teilweise in Tabelle 13.

3.9.2.1 Funktion von CG2254 im Fettkörper

Der Fettkörper der Fliege ist nicht nur ein Organ zur Speicherung von Fetten, vielmehr ähnelt er der Leber von Vertebraten und nimmt an der endokrinen Regulation des Energiehaushaltes teil (Colombani *et al.*, 2003). In Beller *et al.* (2006) wird die Lokalisation von EGFP-markiertem CG2254 im Fettkörper von wandernden L3-Larven gezeigt. In Abbildung 34A-C ist eine Übersicht über mehrere Fettkörperzellen von wandernden L3-Larven sieben Tage nach der Eiablage zu sehen. Wie auch das endogene CG2254-Protein lokalisiert das EGFP-markierte CG2254-Protein auf einzelnen LDs stärker. Interessanterweise sind das nicht immer die größten LDs innerhalb der Zelle, wie es in Zellkulturzellen zu beobachten ist. Zusätzlich kommt es schwach in ER-ähnlichen Strukturen vor. Die Überexpression von EGFP-CG2254 führt zu keinem prominenten Phänotyp bei der Anzahl oder Morphologie der LDs (vgl. Abbildung 30I). In Abbildung 34D-F ist eine Nahaufnahme einer Fettkörperzelle zu sehen. Mehrere kleine, eng gruppierte LDs sind mit EGFP-CG2254 bedeckt. Dagegen haben größere LDs kein EGFP-CG2254 auf ihrer Oberfläche.

Der Fettkörper ist ein metabolisch sehr aktives Organ. Da sich der Metabolismus von jungen L3-Larven zu alten L3-Larven kurz vor dem Verpuppen stark ändert, wurde untersucht, ob sich dies auch auf die Lokalisation von EGFP-CG2254 auswirkt. In der Tat zeigen sich Unterschiede im dritten Larvenstadium vier Tage (Abbildung 34G-I) bzw. sieben Tage (Abbildung 34A-C) nach der Eiablage. Während nach vier Tagen, wenn sich die Larve noch im Futter befindet und Nahrung aufnimmt, EGFP-CG2254 auf vielen, wenn nicht sogar auf allen LDs im Fettkörper zu finden ist (Abbildung 34G-I), hat es im Fettkörper von späten, wandernden L3-Larven ohne Nahrungsaufnahme die schon zuvor beobachtete Lokalisation auf LD-Subpopulationen (Abbildung 34A-C).

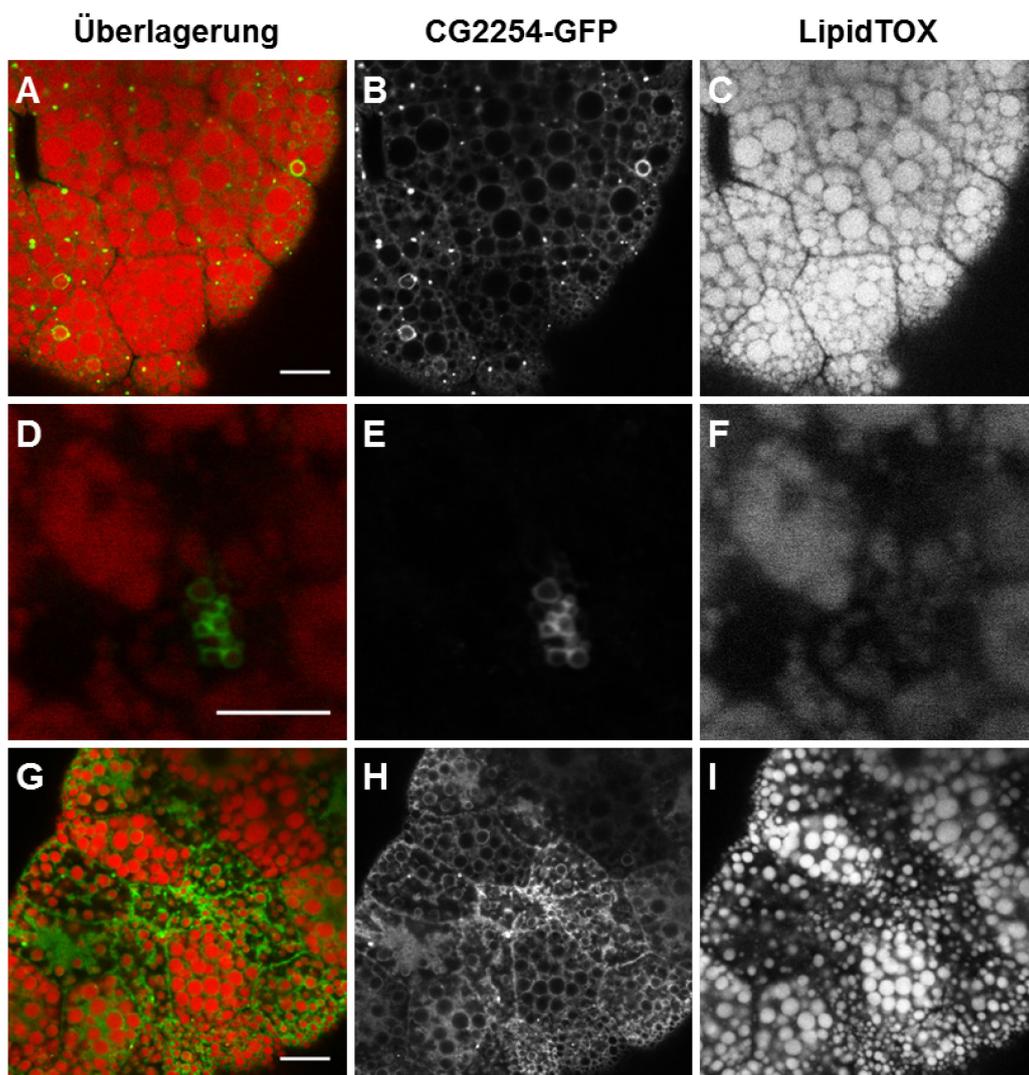


Abbildung 34: EGFP-CG2254 im larvalen Fettkörper. Die hier gezeigten Fettkörper stammen aus Kreuzungen mit der UAS-EGFP-CG2254 Fliegenlinie und einer Fettkörper-spezifischen Gal4-Linie. Die Färbung der LDs erfolgte mit HCS LipidTOX DeepRed. (A-C) Ausschnitt vom Fettkörper einer späten, wandernden L3-Larve sieben Tage nach der Eiablage. EGFP-CG2254 lokalisiert auf LD-Subpopulationen. (D-F) In der starken Vergrößerung ist EGFP-CG2254 auf kleinen, aggregierten LDs zu sehen. (G-I) Ausschnitt vom Fettkörper einer jungen L3-Larve vier Tage nach der Eiablage. Im Gegensatz zu den wandernden Larven ist EGFP-CG2254 gleichmäßig um alle LDs verteilt. Dargestellt sind Aufnahmen von fixierten Fettkörpern, die mit einem Zeiss LSM780 erstellt wurden, (A-C und G-I) und Aufnahmen von unfixierten Fettkörpern, die mit einem Leica TCS SP2 erstellt wurden (D-F). Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μm (A und G) bzw. 5 μm (D).

Bei der Überexpression im Fettkörper fiel auf, dass zwar viele Larven und Puppen vorhanden waren, aber kaum eine Fliege schlüpfte. Um zu quantifizieren, ob sich zusätzliches CG2254 im Fettkörper auf das Überleben während der Entwicklung auswirkt, wurden die Nachkommen aus Kreuzungen mit einer homozygoten Fettkörper-spezifischen Gal4-Linie und einer heterozygoten UAS-Linie gezählt, die sowohl das Chromosom mit dem UAS-CG2254-EGFP-Transgen als auch das CyO-Balancierchromosom in sich trägt. Wenn EGFP-CG2254 keinen Einfluss auf die Entwicklung hat, sollten unter den gleichen Bedingungen ähnlich viele homo- und heterozygote Nachkommen entstehen. Doch der Vergleich zeigt, dass die Anzahl der homozygoten Fliegen nur 2,3% der Anzahl der heterozygoten Fliegen entspricht (Abbildung 35A). Die Expression von EGFP-CG2254 ist folglich letal, wobei der Tod während des Puppenstadiums eintritt. Im Gegensatz dazu wurde bei der Reduktion der CG2254-kodierenden Transkripte mittels RNAi (hiernach CG2254 RNAi) im Fettkörper nur ein geringer Effekt auf die Überlebensrate beobachtet (Abbildung 35B).

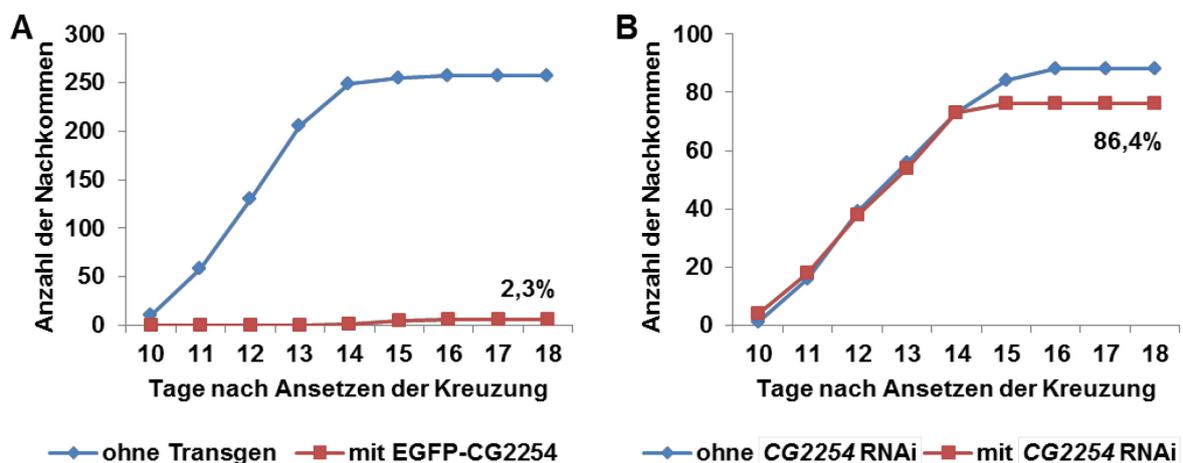


Abbildung 35: EGFP-CG2254 Expression im Fettkörper ist letal. Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben (A) Kreuzung der heterozygoten UAS-EGFP-CG2254 Linie mit der homozygoten Fettkörper-Gal4-Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 25 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus drei parallelen Ansätzen. (B) Kreuzung der homozygoten CG2254 RNAi-Linie 1 mit der mittels eines Balancierchromosoms heterozygot verwendeten Fettkörper-Gal4-Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 25 °C. Dargestellt ist jeweils die Summe der Nachkommen aus zwei parallelen Ansätzen.

Durch eine Expression von EGFP-CG2254 in Kc167-Zellen wurde keine Veränderung im Gehalt an TAG gefunden (Abbildung 33). Dies könnte am Zelltyp (Kc167-Zellen sind Plasmatozyten-ähnlich) und dem damit verbundenen Fehlen von möglichen Kofaktoren für die CG2254-Funktion liegen. Daher wurde auch *in vivo* der Einfluss von CG2254 auf die Fettspeicherung unter physiologischen Bedingungen untersucht. Unterschiede im Fettgehalt verschiedener Genotypen sind während des Larvenstadiums noch nicht so stark ausgeprägt, weil der larvale Metabolismus auf eine schnelle Massezunahme ausgelegt ist. Daher lassen

sich selbst genetische Veränderungen, die eine erhöhte Speicherung verursachen, wie z. B. die RNAi-vermittelte Reduktion der Lipase Brummer, kaum bis gar nicht nachweisen (s. Anhang Abbildung 52). Doch auch bei der Bestimmung des TAG-Gehalts von adulten Fliegen, bei denen die *CG2254* RNAi mit Hilfe des Gal4/UAS-System spezifisch im Fettkörper aktiviert wurde, lässt sich verglichen mit der Kontrolllinie keine signifikante Reduktion feststellen (Abbildung 36).

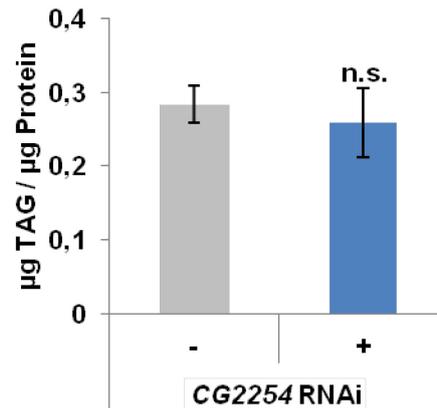


Abbildung 36: Bestimmung des TAG-Gehalts bei RNAi vermittelter Reduktion von *CG2254* im Fettkörper. Der TAG-Gehalt wurde wie unter 2.14.7 beschrieben bestimmt. Die adulten Tiere wurden bei 29 °C gehalten. Durch die Kreuzung der Fettkörper-Gal4-Linie mit der *CG2254* RNAi-Linie 1 wurde *CG2254* mittels RNAi dort herunterreguliert. Im Vergleich zu Fliegen aus der Kreuzung mit der TRiP Kontrolllinie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils sechs Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

3.9.2.2 Funktion von *CG2254* in der Ringdrüse

Die Ringdrüse ist ein neuroendokrines Organ, dessen bekannteste Funktion die zeitliche Regulation der Entwicklung vom Embryo zum adulten Tier ist. Dies geschieht hauptsächlich über die Sekretion der beiden Hormone Ecdyson und Juvenilhormon (JH), die im Wechselspiel das Schlüpfen in das nächste Entwicklungsstadium steuern (Harvie *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist sie aber auch noch an weiteren Aufgaben beteiligt, wie z. B. der Energiehomöostase durch die Sekretion des „Adipokinetik hormone“ (AKH), das ein Homolog des Vertebraten-Glucagons ist (Kim und Rulifson, 2004). Die larvale Ringdrüse setzt sich aus drei Bestandteilen zusammen: dem *corpus allatum* (CA), dem *corpus cardiacum* (CC) und den Zellen der Prothorakaldrüse (PTG) (King *et al.*, 1966). Zur Untersuchung einer möglichen Funktion von *CG2254* in der Ringdrüse standen vier Gal4-Aktivatorlinien zur Verfügung. Diese Linien unterscheiden sich in ihrer räumlichen und zeitlichen Expression. In Tabelle 12 sind die vier Linien mit ihren Expressionscharakteristika aufgelistet. Aufgrund der spezifischen Aufgaben der drei Teile der Ringdrüse könnte ein Phänotyp, der bei den Linien unterschiedlich ausfällt, weitere Rückschlüsse auf die Funktion von *CG2254* in den verschiedenen Teilen und jeweiligen Zeitpunkten geben.

Tabelle 12: Verwendete Gal4-Linien mit Expressionsaktivität in der Ringdrüse

Name	Ringdrüsenaktivität	weitere Gewebe mit Aktivität	Zeitpunkt der Aktivität	Referenz
2-286	komplette Ringdrüse	Speicheldrüse, Tracheen, Fettkörper, Kutikula	Larvale Stadien, spätestens L3	Timmons <i>et al.</i> , 1997
Feb36	<i>corpus allatum</i> und Prothorakaldrüse	Tracheen, Malpighische Gefäße und manche Zellen im Mitteldarm	Larvale Stadien, spätestens L3	Siegmund und Korge, 2001, Thummel, 2010
Di-11	<i>corpus allatum</i>	nicht bekannt	permanent	Belgacem & Martin, 2007
Di-3	<i>corpus allatum</i>	Fettkörper, wenige Zellen in der <i>pars intercerebralis</i>	2 Tage nach Schlüpfen; keine Aktivität im CA nach 5 Tagen	Belgacem & Martin, 2007

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss eine veränderte Proteinmenge von CG2254 in der kompletten Ringdrüse hat. Die Expression von EGFP-CG2254 führt zum Tod im frühen Larvenstadium (ohne Abbildung). Dabei zeigten einzelne Larven des L2-Stadiums das ungewöhnliche Verhalten, dass sie aus dem Futter herauswanderten, bevor sie starben. Unter normalen Bedingungen verlassen Larven erst im späten L3-Stadium das Futter, um einen geeigneten Ort zum Verpuppen aufzusuchen. Bei CG2254 RNAi in der kompletten Ringdrüse wurde dagegen kein Effekt auf die Überlebensrate beobachtet (Abbildung 37A).

Die Ringdrüse selbst dient nicht zur Speicherung von Neutrallipiden. Sie ist aber an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt (Kim und Rulifson, 2004). Deshalb wurde auch hier untersucht, ob sich die organismische Gesamtmenge an TAG ändert, wenn in der kompletten Ringdrüse CG2254-kodierende Transkripte mittels RNAi herunterreguliert werden. Bei reduziertem CG2254 speichern die männlichen Fliegen doppelt so viel TAG wie die Kontrollfliegen (Abbildung 37B). Auch bei den beiden anderen CG2254 RNAi-Linien konnte diese erhöhte TAG-Speicherung beobachtet werden (s. Anhang Abbildung 53).

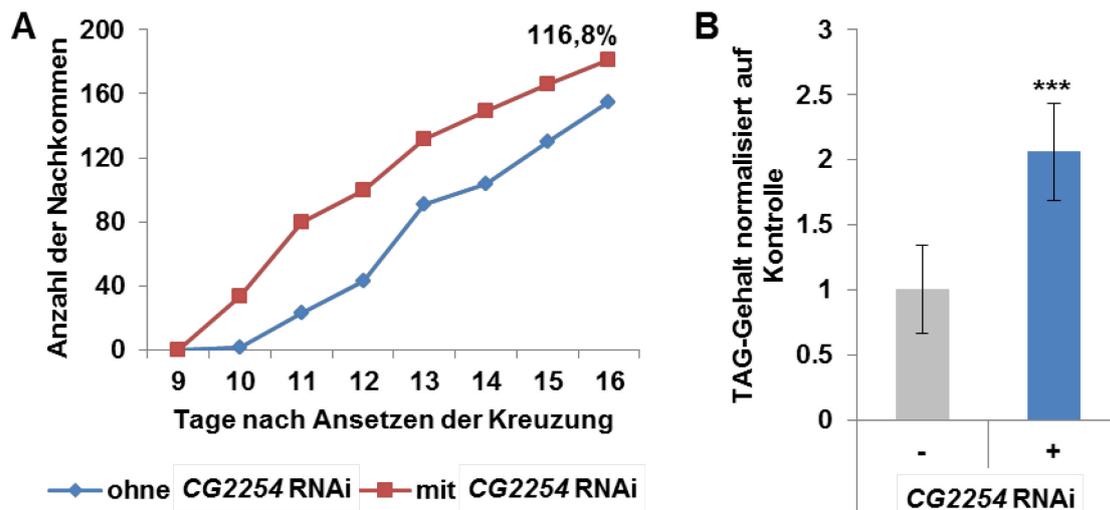


Abbildung 37: CG2254 RNAi in der kompletten Ringdrüse. (A) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung von homozygoter RNAi-Linie mit heterozygoter 2-286 Gal4-Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 29 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus drei parallelen Ansätzen. (B) Der TAG-Gehalt wurde wie unter 2.14.7 beschrieben bestimmt. Die adulten Tiere wurden bei 29 °C gehalten. Männchen stammen aus der Kreuzung der homozygoten RNAi-Linie 1 mit der mittels eines Balancierchromosoms heterozygot verwendeten 2-286-Gal4-Aktivatorlinie. Die Normalisierung der Werte erfolgte auf den TAG-Gehalt der Fliegen mit Balancierchromosom. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils sechs Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

Als nächstes wurde die Feb36 Gal4-Aktivatorlinie verwendet, die nur im CA und der PTG aktiv ist (Siegmond und Korge, 2001, Thummel, 2010). Erneut wurde der Effekt auf die Überlebensrate und die Fettspeicherung bei EGFP-CG2254 Expression und CG2254 RNAi untersucht (Abbildung 38). Die Feb36-vermittelte Überexpression während der larvalen Entwicklung ist semi-letal (Abbildung 38A; 43,9% homozygote Nachkommen). Die Menge an gespeicherten TAG ist dabei leicht reduziert (Abbildung 38B) und diese Änderung wird nicht durch das Balancierchromosom verursacht (s. Anhang Abbildung 51). Die Feb36-vermittelte CG2254 RNAi verursacht keine Veränderung in der Überlebensrate oder am TAG-Gehalt (Abbildung 38C und D).

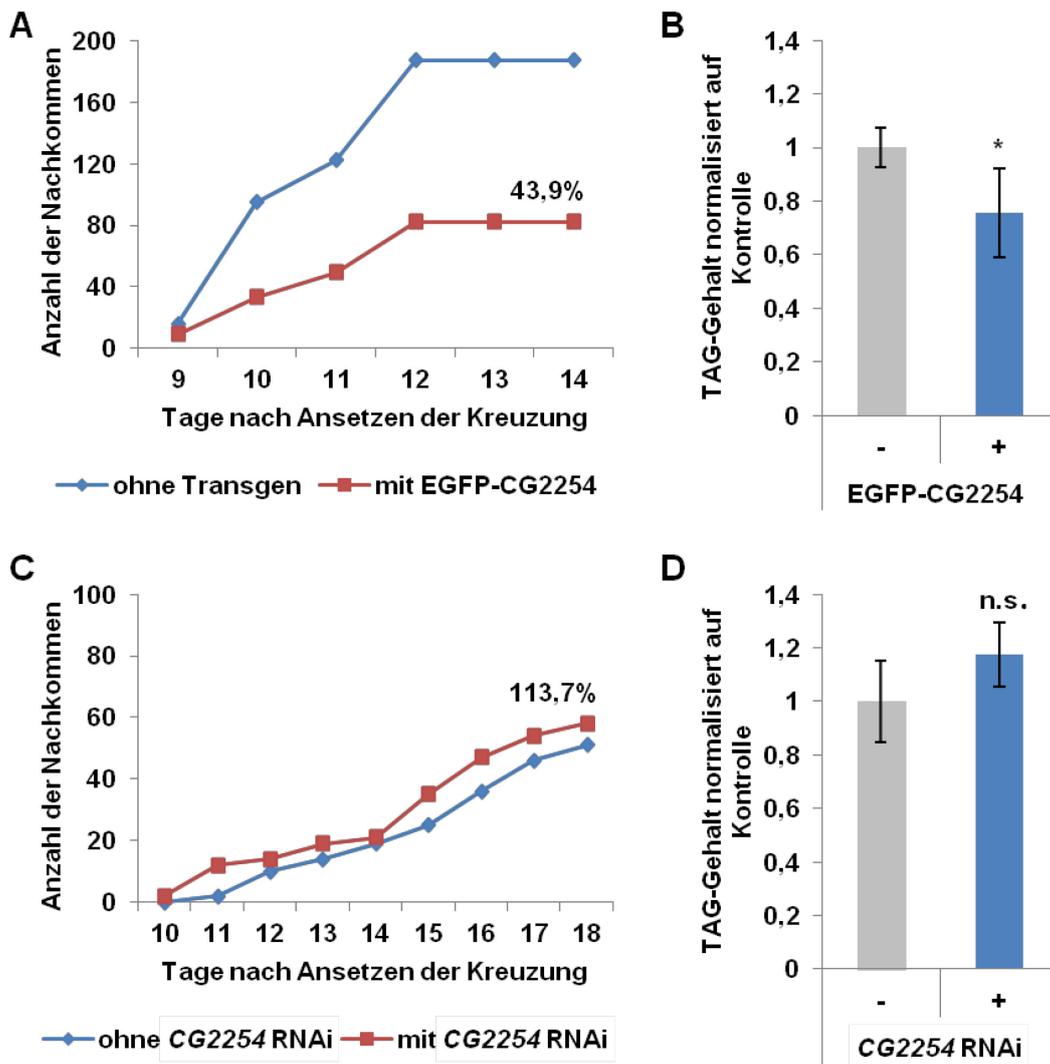


Abbildung 38: EGFP-CG2254 Expression und CG2254 RNAi im CA und in der PTG (A) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung der heterozygoten UAS-EGFP-CG2254 Linie mit der homozygoten Feb36-Gal4-Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 25 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus einem Ansatz. (B) Der TAG-Gehalt wurde wie unter 2.14.7 beschrieben bestimmt. Die adulten Tiere wurden bei 29 °C gehalten. Männchen stammen aus der Kreuzung mit einer heterozygoten UAS-EGFP-CG2254 Linie und homozygoter Feb36-Gal4-Aktivatorlinie. Die Normalisierung der Werte erfolgte auf den TAG-Gehalt der Fliegen mit Balancierchromosom. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils vier Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung (C) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung der homozygoten RNAi-Linie 1 mit der mittels eines Balancierchromosoms heterozygot verwendeten Feb36-Gal4-Aktivatorlinie. Nach fünftägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 25 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus einem Ansatz. (D) Der TAG-Gehalt wurde wie unter 2.14.7 beschrieben bestimmt. Die adulten Tiere wurden bei 29 °C gehalten. Männchen stammen aus der Kreuzung mit der RNAi-Linie 1 bzw. TRiP Kontrolllinie und Feb36-GAL4. Die Normalisierung der Werte erfolgte auf den TAG-Gehalt der TRiP Kontrolllinie. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils vier Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

Mit Hilfe der Gal4-Aktivatorlinie Di-11 wurde das EGFP-CG2254 Protein spezifisch im CA überexprimiert bzw. CG2254-kodierende Transkripte herunterreguliert. Diese CA-spezifische Überexpression ist in frühen L1/L2 Larvenstadien letal (ohne Abbildung). Aber auch bei der D-11-vermittelten CG2254 RNAi im CA alleine beträgt die Anzahl der homozygoten Nachkommen nur 35,2% gegenüber denen mit Balancierchromosom (Abbildung 39A). Die geschlüpften Fliegen mit CG2254 RNAi besitzen keinen veränderten TAG-Gehalt gegenüber den Vergleichsfliegen (Abbildung 39B).

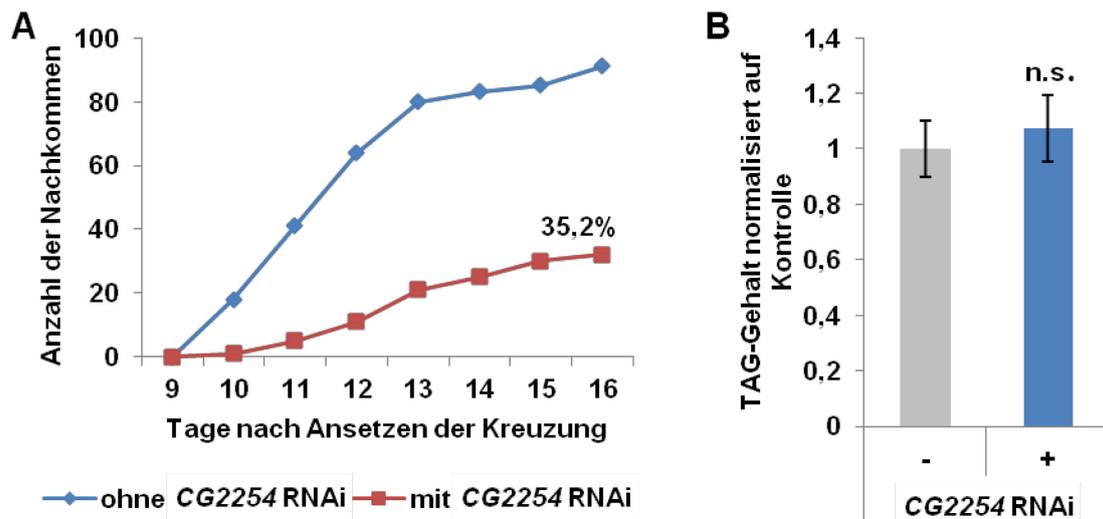


Abbildung 39: CG2254 RNAi im CA. (A) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung von homozygoter CG2254 RNAi-Linie 1 mit heterozygoter Di-11-Gal4-Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 29 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus drei parallelen Ansätzen. (B) Der TAG-Gehalt wurde wie unter 2.14.7 beschrieben bestimmt. Die adulten Tiere wurden bei 29 °C gehalten. Männchen stammen aus der Kreuzung der homozygoten RNAi-Linie mit der heterozygoten Di-11-Gal4-Aktivatorlinie. Die Normalisierung erfolgte auf den TAG-Gehalt der Kontrollfliegen mit Balancierchromosom.

Als letztes wurde die Gal4-Aktivatorlinie Di-3 benutzt. Diese Linie ist wie Di-11 nur im CA aktiv. Im Gegensatz zu Di-11 beginnt die Aktivität von Di-3 aber erst zwei Tage nach dem Schlüpfen, wird schwächer und ist fünf Tage nach dem Schlüpfen nicht mehr vorhanden (Belgacem und Martin, 2007). Mit Di-3 kann somit die bei veränderter CG2254-Proteinmenge in der larvalen Entwicklung auftretende Sterblichkeit umgangen und die Auswirkung auf die Fettspeicherung in adulten Tieren untersucht werden. Bei den Kreuzungen mit der Di-3-Linie wurden Unterschiede sowohl bei der EGFP-CG2254 Expression als auch bei CG2254 RNAi gemessen. Die Überexpression führt dabei zu einem starken Anstieg der Fettspeicherung, während bei CG2254 RNAi der TAG-Gehalt nur fast halb so hoch war wie bei den Kontrollfliegen (Abbildung 40).

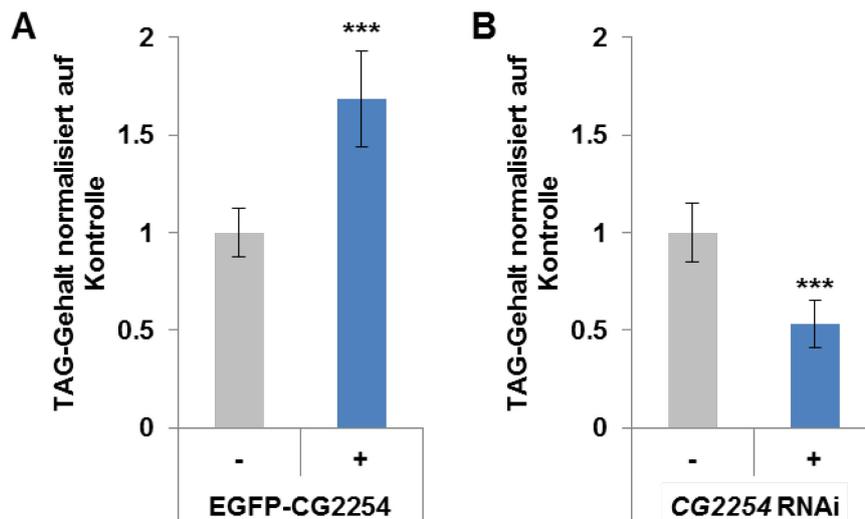


Abbildung 40: TAG-Bestimmung bei veränderter CG2254 Proteinnenge im CA junger adulter Männchen. Der TAG-Gehalt wurde wie unter 2.14.7 beschrieben bestimmt. Die adulten Tiere wurden bei 29 °C gehalten. (A) Männchen stammen aus der Kreuzung der heterozygoten UAS-EGFP-CG2254 Linie und der homozygoten Di-3-Gal4-Aktivatorlinie. (B) Männchen stammen aus der Kreuzung der RNAi-Linie 1 bzw. der TRiP Kontrolllinie mit der homozygoten Di-3-Gal4-Aktivatorlinie. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei parallelen Kreuzungen mit jeweils vier bis sechs Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung. Die Normalisierung erfolgte auf den TAG-Gehalt der (A) Fliegen mit Balancierchromosom bzw. (B) der Fliegen aus der Kreuzung mit der TRiP Kontrolllinie.

Die Ergebnisse der *in vivo* Analyse bei veränderter CG2254-Proteinmenge in der Ringdrüse sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Tabelle beinhaltet auch die beiden *CG2254* RNAi-Linien des VDRCs. Es wird deutlich, dass *CG2254* sowohl die Überlebensrate in der larvalen Entwicklung als auch die Fettspeicherung beeinflusst. Die Effekte sind bei der Expression von EGFP-*CG2254* stärker, doch wenn sie bei *CG2254* RNAi auftreten, dann sind sie bei der Fettspeicherung komplementär zur Überexpression.

Tabelle 13: Ergebnisse der *in vivo* Analyse bei veränderter *CG2254*-Proteinmenge in der Ringdrüse. Die Pfeile geben die Stärke des beobachteten Phänotypen an: ↑ erhöht ↓ verringert bzw. letal ↘ semi-letal → keine Veränderung.

Gal4-Aktivität	Phänotyp	EGFP-CG2254	RNAi-Linie 1 (TRiP HMS01622)	RNAi-Linie 2 (VDRC101149)	RNAi-Linie 3 (VDRC5470)
komplette Ringdrüse	Überlebensrate	↓	→	→	→
	TAG-Speicherung	nicht möglich	↑	↑	↑
<i>Corpus allatum</i> und Prothorakaldrüse	Überlebensrate	↘	→	→	→
	TAG-Speicherung	↓	→	↑	↑
<i>Corpus allatum</i>	Überlebensrate	↓	↘	↘	↘
	TAG-Speicherung	nicht möglich	→	↑	↑
<i>Corpus allatum</i> in jungen adulten Fliegen	Überlebensrate	→	→	→	→
	TAG-Speicherung	↑	↓	→	↓

3.9.2.3 Funktion von CG2254 im Darm

Wegen der starken Expression und des Nachweises des endogenen Proteins wurde die Funktion von CG2254 im larvalen Darm untersucht. Durch die Antikörperfärbung gegen CG2254 konnte gezeigt werden, dass das Protein im Darm in der Nähe des Proventriculus exprimiert wird (vgl. Abbildung 32). Auch in der hinteren Region des Mitteldarms wurde eine CG2254-Proteinexpression detektiert (ohne Abbildung). Für die Funktionsuntersuchung im Darm wurde daher die NPC1b-Gal4 Linie ausgewählt. Die für die Sterolabsorption notwendigen *NPC1b*-positiven Zellen befinden sich kurz hinter dem Proventriculus sowie in einer Region des Mitteldarms (Voght *et al.*, 2007), und somit besitzt *NPC1b* ein vergleichbares Expressionsmuster wie CG2254. Die Abbildung 41 zeigt die Lokalisation von EGFP-CG2254 in diesen Zellen. In Abbildung 41C ist eine Vergrößerung der Zellen nahe des Proventriculus zu sehen. Ähnlich wie bei der Antikörperfärbung gegen CG2254 befindet sich auch das EGFP-markierte Protein in ringförmigen Strukturen, und sitzt daher wahrscheinlich auf LDs. Im Fettkörper lokalisierte EGFP-CG2254 abhängig vom Alter der Larve unterschiedlich. Deswegen wurde die Lokalisation von EGFP-CG2254 in larvalen Därmen vier und sieben Tage nach der Eiablage miteinander verglichen. Hier fanden sich Unterschiede sowohl bei der Lokalisation von EGFP-CG2254 als auch bei der Positionierung der LDs (Abbildung 41D-K). Die LDs in den Därmen von jungen Larven (vier Tage nach Eiablage) liegen fast komplett an der Grenze zum Darmlumen (Abbildung 41G). Nur einzelne, deutlich kleinere LDs befinden sich in anderen Teilen der Zellen. EGFP-CG2254 lokalisiert in diesem Stadium auf vielen – möglicherweise auf allen – LDs. Sieben Tage nach der Eiablage, wenn die Larve ihr kritisches Gewicht erreicht und das Futter zum Verpuppen verlassen hat, sind indessen die LDs kleiner, homogener in ihrer Größe und über die gesamte Zelle verteilt (Abbildung 41H-K). Das EGFP-CG2254 Protein lokalisiert nur noch auf einzelnen LDs. Die 3D-Projektion einer Darm-Zelle verdeutlicht noch einmal die Lokalisation der LDs am apikalen Pol im Darm von jungen Larven (Abbildung 41L-M). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die EGFP-CG2254 Lokalisation und die Positionierung der LDs mit der Aufnahme von Nahrung oder dem Entwicklungsstadium verknüpft sind.

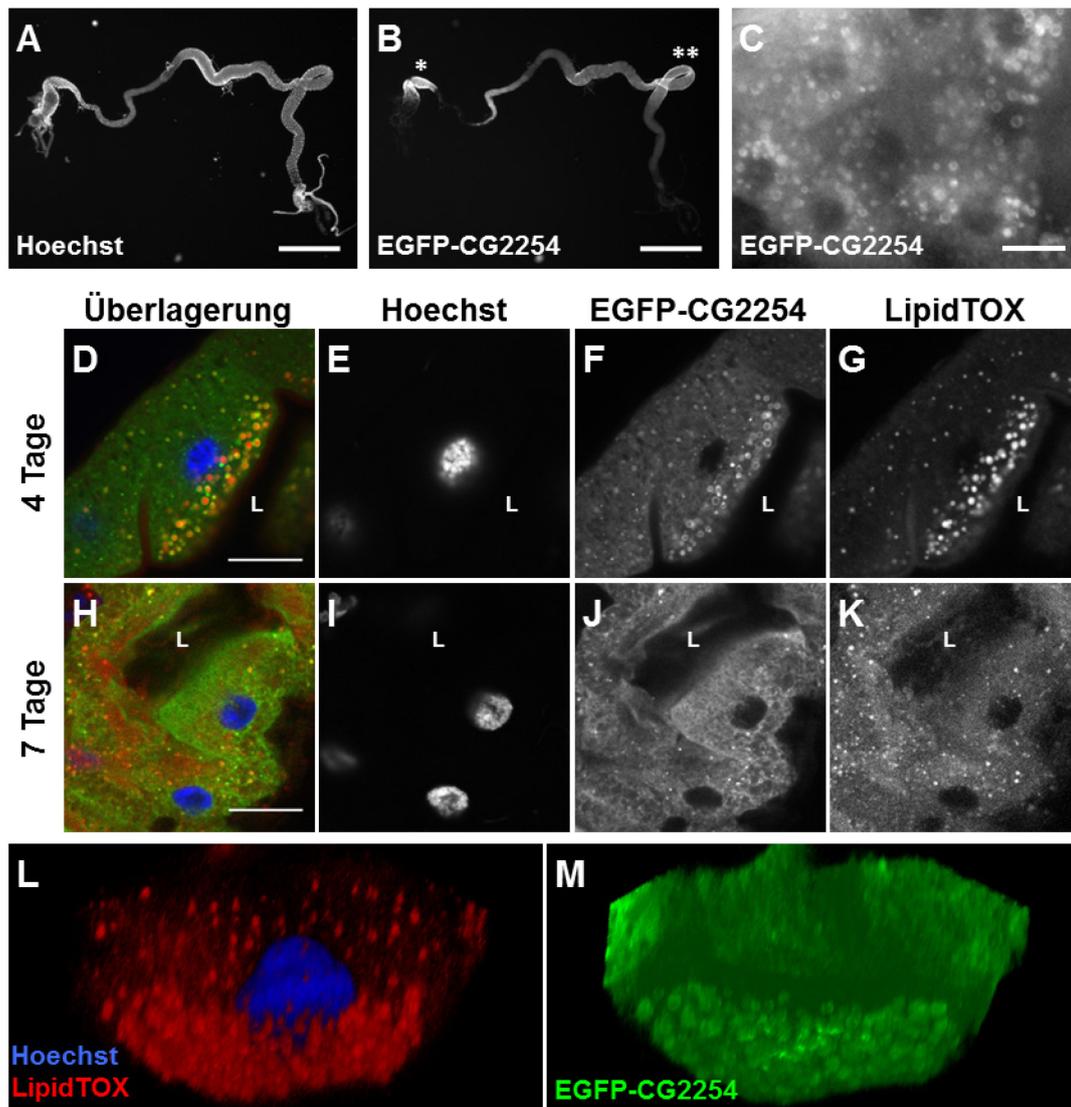


Abbildung 41: EGFP-CG2254 im larvalen Darm. (A-C) Lebendaufnahmen von Därmen aus nicht-wandernden L3-Larven vier Tage nach der Eiablage, die EGFP-CG2254 in *NPC1b*-aktiven Zellen exprimieren. (A) Die DNA der Nuclei wurden mit Hoechst gefärbt. (B) EGFP-CG2254 wird im Darmabschnitt m2 nahe des Proventriculus (*) und in m10-m12 des Mitteldarms (**) exprimiert (Unterteilung der Darmabschnitte nach Murakami *et al.*, 1999). (C) Eine Vergrößerung aus m2 zeigt EGFP-CG2254 in Ringen. (D-K) Vergleich der LDs und der Lokalisation von EGFP-CG2254 zwischen Larven vier Tage (D-G) und sieben Tage (H-K) nach der Eiablage. Die Därme wurden fixiert und mit Hoechst und HCS LipidTOX DeepRed gefärbt. In Larven vier Tage nach der Eiablage lokalisieren die LDs zum apikalen Pol der Zelle (Darmlumen mit L gekennzeichnet) und die meisten, wenn nicht sogar alle, sind mit EGFP-CG2254 bedeckt, während sieben Tagen nach der Eiablage die LDs in den Zellen verteilt sind und sich EGFP-CG2254 nur noch auf einzelnen LDs befindet. (L-M) 3D-Projektion einer einzelnen Darmzelle mit EGFP-CG2254 Expression. LDs sind in der Zelle bis auf wenige Ausnahme am apikalen Zellpol lokalisiert. EGFP-CG2254 lokalisiert hauptsächlich auf diese LDs. Dargestellt sind Aufnahmen von einem Zeiss Axio Imager.M2 (A-C) und einem Zeiss LSM780 (D-M). Die Maßstabsbalken entsprechen 1 mm (A und B), bzw. 20 µm (C, D und H).

Im Fettkörper und in der Ringdrüse wirkte sich eine veränderte Menge an CG2254 auf die Überlebensrate aus. Im Darm hatte dies dagegen keine Auswirkungen, da die Anzahl der homozygoten Nachkommen bei der Überexpression von EGFP-CG2254 (Abbildung 42A, 113,7% homozygote Nachkommen) und *CG2254* RNAi (Abbildung 42B, 145,3% homozygote Nachkommen) jeweils höher lag als die Anzahl der heterozygoten Nachkommen. Die *CG2254*-Expression im Darm ist damit nicht für die Entwicklung wichtig.

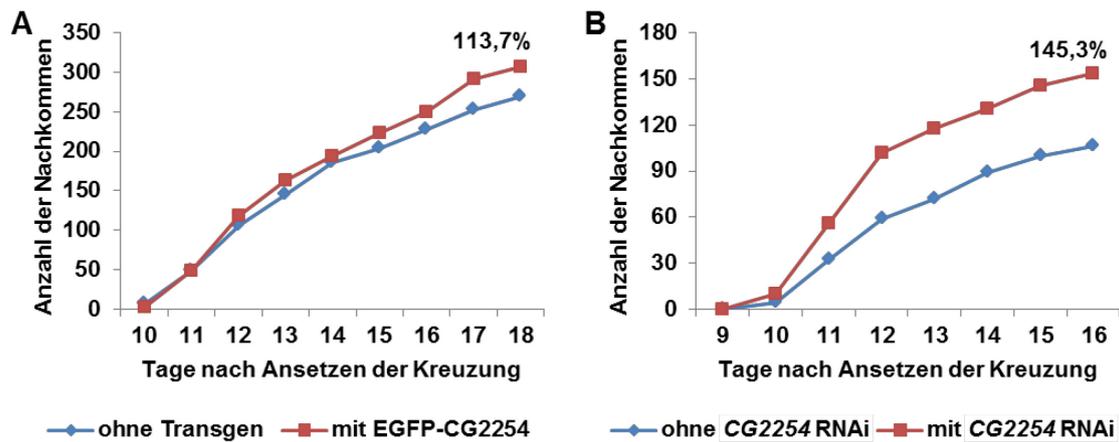


Abbildung 42: CG2254 hat im Darm keinen Einfluss auf die larvale Überlebensrate. A) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung von heterozygoter UAS-EGFP-CG2254 Linie und homozygoter darmspezifischer NPC1b-Gal4-Aktivatorlinie. Nach fünftägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 25 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus drei parallelen Ansätzen. (B) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung der homozygoten RNAi-Linie 1 mit heterozygoter der mittels eines Balancierchromosoms heterozygot verwendeten NPC1b--Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 29 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus drei parallelen Ansätzen.

Der Darm nimmt Fette aus der Nahrung auf und es findet bis zur Weitergabe an die Hämolymphe eine kurze (Zwischen-)Lagerung statt. Ein veränderter Proteinlevel von CG2254 könnte daher einen direkten Einfluss auf die Fettspeicherung im Darm oder der gesamten Fliegen haben. Abbildung 43 stellt die Auswirkung auf den TAG-Gehalt dar, wenn EGFP-CG2254 in den *NPC1b*-aktiven Zellen des Darms exprimiert wird (Abbildung 43A) bzw. die Menge an CG2254 mittels *CG2254* RNAi gesenkt wird (Abbildung 43B). Durch zusätzliches EGFP-CG2254 speichern die Fliegen mehr TAG als Fliegen ohne die Expression des Transgens, während die Reduktion des CG2254-Proteins zu keinem signifikanten Unterschied führt. Wie in der Ringdrüse beeinflusst die CG2254-Proteinmenge somit auch im Darm die Fettspeicherung.

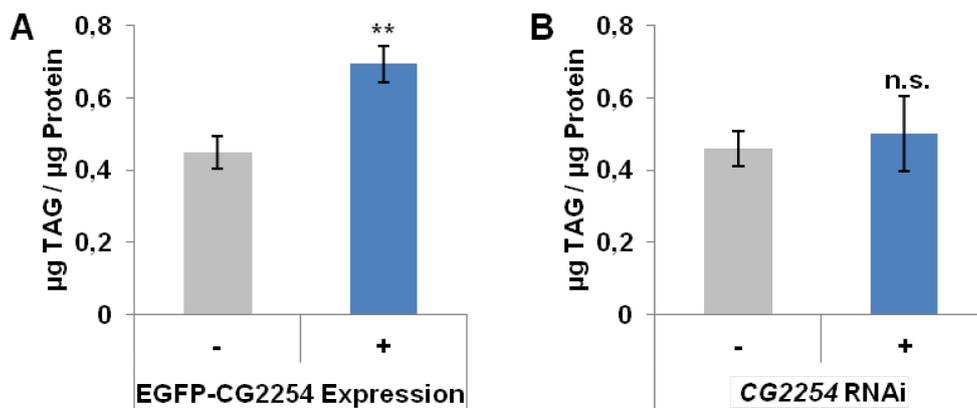


Abbildung 43: TAG-Gehalt bei veränderten CG2254-Proteinmengen im Darm. Der TAG-Gehalt wurde wie unter 2.14.7 beschrieben bestimmt. Die adulten Tiere wurden bei 25 °C gehalten (vergleichbare Ergebnisse auch bei 29 °C). Männchen stammen aus der Kreuzung der NPC1B-Gal4-Aktivatorlinie mit (A) heterozygoter UAS-EGFP-CG2254 und (B) RNAi-Linie 1 bzw. TRiP Kontrolllinie. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils vier Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

4 Diskussion

Lipidtröpfchen sind die universellen Lipidspeicher-Organellen (Walther und Farese, 2012). Obwohl ihre Existenz schon lange bekannt ist und sie essentiell für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase sind (s. 1.1), ist die Biologie der LDs noch nicht gänzlich aufgeklärt. So sind z. B. grundlegende Fragen zu ihrer Bildung oder zum Lokalisationsmechanismus der Proteine auf ihre Oberfläche noch unvollständig beantwortet (s. 1.2). Ergebnisse aus den vergangenen Jahren machten außerdem deutlich, dass sich selbst innerhalb einer Zelle LDs in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden, wodurch LD-Subpopulationen entstehen (Beller *et al.*, 2010b). Mit dem *Drosophila* Protein CG2254 wurde ein Protein identifiziert, das nur auf den LDs einer solchen Subpopulation lokalisiert (Beller *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde CG2254 sowohl in Zellkulturzellen als auch im lebenden Organismus hinsichtlich der Lokalisation und der Funktion näher charakterisiert.

4.1 CG2254 als annotierte SDR

CG2254 wurde im Rahmen der *Drosophila* Genom Annotation (Flybase.org) als SDR klassifiziert, da es die für diese Proteinfamilie typischen Rossmann-Proteinfaltung und Motive besitzt (3.1). Ob das Protein *in vitro* oder *in vivo* eine enzymatische Funktion als Dehydrogenase oder Reduktase ausübt, wurde nicht untersucht. Während sich eine mögliche Aktivität durch den Umsatz des Kosubstrats NAD(P)⁺ messen ließe, ist die Bestimmung des Substrates nur durch Testen möglich. Aus dem Vergleich mit Proteinsequenzen von SDRs mit bekannten Substraten ist die Spezifität nicht ablesbar, da sie vor allem durch die Tertiärstruktur im variablen C-terminalen Bereich des Proteins bestimmt wird (Oppermann *et al.*, 2003). Als Ausgangspunkt für eine Substrat-Testreihe könnten daher die bekannten Substrate von anderen LD-assoziierten SDRs dienen. Bei den in dieser Arbeit untersuchten SDRs (17 β -HSD11, RDH10 und DHRS3) gehören die Substrate zu den Steroiden (17 β -HSD11, Brereton *et al.*, 2001) und Retinoiden (RDH10 und DHRS3, Jiang und Napoli, 2013, bzw. Haeseleer *et al.*, 1998) und damit zu Stoffgruppen, die von Organismen als Hormone verwendet werden (Michal und Schomburg, 2013). LDs werden vor allem für die Speicherung der Ausgangsstoffe für die Hormonsynthese verwendet. Für Steroide wird dafür Cholesterol intrazellulär von LDs zu Mitochondrien transportiert, in denen die Steroid-Synthese stattfindet (Miller und Bose, 2011). Retinoide werden als Retinylester in LDs gespeichert (Blaner *et al.*, 2009). Die Lokalisation von RDH10 und DHRS3 auf LDs deutet

darauf hin, dass dort auch der Umbau zu der hormonell aktiven *all-trans*-Retinsäure stattfindet (Jiang und Napoli, 2013, bzw. Haeseleer *et al.*, 1998). Eine Beteiligung von CG2254 im Hormon-Stoffwechsel ist denkbar (s.u.). Da der Hormonhaushalt reguliert werden muss, könnte die Lokalisation von SDRs auf LD-Subpopulationen ein Mechanismus zur Justierung der Hormonmenge darstellen. So kann die Hormonmenge mit der Aufnahme von freien Fettsäuren und der damit verbundenen Anzahl an anabolisch aktiven LDs verknüpft werden. Alternativ dazu könnten auch nur die anabolisch aktiven LDs ausreichend Substrat zur Synthese der Hormone zur Verfügung stellen. Daneben könnten sich einzelne LDs, auf denen sich alle benötigten Enzyme befinden, auf die Hormonsynthese spezialisieren, um so eine rasche und verlustfreie Bildung zu ermöglichen.

Von 17 β -HSD11 wird vermutet, dass es am Metabolismus von potentiell giftigen Stoffen in Darm und Leber beteiligt ist (Horiguchi *et al.*, 2008b). Da deren Aufnahme hauptsächlich durch die Nahrung geschieht, könnte die beobachtete Lokalisation von EGFP-CG2254 auf allen LDs im Darm und Fettkörper in frühen Larvenstadien (Abbildung 34G und Abbildung 41D) auch mit dieser Entgiftung zusammenhängen.

4.2 Die Lokalisation zu LD-Subpopulation ist konserviert

Zu Beginn dieser Arbeit war CG2254 das einzige bekannte auf LD-Subpopulationen lokalisierende *Drosophila*-Protein. Mittlerweile wurden drei weitere Proteine (GPAT4, AGPAT4 und CCT1) mit einer solchen Lokalisation identifiziert (Wilfling *et al.*, 2013), aber noch keine weitere SDR. Daher wurde zunächst untersucht, ob CG2254 eine Ausnahme innerhalb der SDRs bildet, und ob eine solche Lokalisation auf LD-Subpopulationen evolutionär konserviert ist. Durch die hier mit CG2254 und seinen Orthologen 17 β -HSD11, DHRS3, RDH10 und ERD-2 durchgeführten Lokalisationsstudien konnte die Annahme bestätigt werden, dass die Lokalisation auf LD-Subpopulationen nicht auf CG2254 und eine bestimmte Spezies beschränkt ist (Abbildung 6). Darüber hinaus konnten auch in den Säugerzelllinien HeLa, AML12, COS7 und MDCK LD-Subpopulationen gefunden werden (Abbildung 8 und Abbildung 9). Interessanterweise ist in HeLa-Zellen die Stärke der Ausprägung von LD-Subpopulationen abhängig von der OA-Zugabe (Abbildung 7): Bei höheren OA-Konzentrationen nimmt die Anzahl der LDs mit YFP-CG2254 zu. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Lokalisation auf LD-Subpopulationen mit dem metabolischen Status der LDs zusammenhängt und nicht mit der (überexprimierten) Proteinmenge. Bei der Ausbildung der LD-Subpopulationen spielen daher vor allem die metabolischen Bedingungen eine Rolle, aber auch die Zelllinie, wie die fehlende Lokalisation

von YFP-CG2254 auf LD-Subpopulationen in HEK-293 und CHO-Zellen zeigt (ohne Abbildung). Das könnte erklären, warum die hier untersuchten SDRs aus *M. musculus* bei ihrer initialen Charakterisierung mit einer generellen LD-Lokalisation beschrieben wurden (17 β -HSD11: CHO-Zellen mit 150 μ M OA (Horiguchi *et al.*, 2008b) RDH10: COS7-Zellen mit 400 μ M OA (Jiang und Napoli, 2013) und DHRS3: HepG2-Zellen (Deisenroth *et al.*, 2011)). Nur unter bestimmten physiologischen und experimentellen Bedingungen könnte die Bildung von LD-Subpopulationen stattfinden, wie das Beispiel der LDs im Darm zeigt (Abbildung 41). Wenn diese Bedingungen erfüllt werden, könnten mehr Proteinlokalisationen auf LD-Subpopulationen identifiziert werden, als heute bekannt sind. Gerade niedrigere OA-Konzentrationen als die häufig verwendeten 400 μ M OA könnte das gleichzeitige Vorhandensein von anabolisch und katabolisch aktiven LDs begünstigen. Der Nachweis des endogenen CG2254 auf LD-Subpopulation im Fettkörper (Abbildung 30G) zeigt, dass es sich bei den beobachteten Lokalisationen auf LD-Subpopulationen jedenfalls nicht um ein Zellkultur- oder Überexpressionsartefakt handelt. Wie es zur Lokalisation von Proteinen auf LD-Subpopulationen kommen kann, wird in Abschnitt 4.4 ausführlicher diskutiert.

LD-Subpopulationen sind evolutionär konserviert, jedoch ist es bemerkenswert, dass anhand des *C. elegans* Proteins DHS-4 gezeigt werden konnte, dass selbst sequenzähnliche Proteine nicht zwingend auf LD-Subpopulationen lokalisieren. Die Fettspeicher in *C. elegans* wurden lange als abweichend von denen anderer Spezies betrachtet, weil nicht nur LDs, sondern auch Lysosom-verwandte Organellen mit den Standardmethoden (z. B. NileRed Färbung) detektiert werden (Klapper *et al.*, 2011). Durch optimierte Färbeprotokolle (Klapper *et al.*, 2011) und den Einsatz von „Kohärenter Anti-Stokes-Raman-Streuung“-Mikroskopie (Yen *et al.*, 2010) können LDs aber eindeutig visualisiert werden. Die hier untersuchten SDRs könnten verwendet werden, um zu prüfen, ob in *C. elegans* LD-Subpopulationen vorkommen, oder ob die LDs dort eine größere Homogenität besitzen. Dazu könnte eines der auf LD-Subpopulationen lokalisierenden Proteine wie z. B. EGFP-CG2254 in *C. elegans* exprimiert und dessen Lokalisation analysiert werden. Im Vergleich mit DHS-4 könnten so zusätzliche Informationen über die Lokalisationsmechanismen gewonnen werden.

4.3 CG2254 lokalisiert auf anabolisch aktiven LDs

Schon mit einem einfachen Lichtmikroskop lassen sich in *Drosophila* Kc167-Zellkulturzellen, die mit OA behandelt wurden, zwei Populationen von LDs unterscheiden: Einzelne große LDs neben vielen kleineren LDs (eigene Beobachtung). Mit der Einzelzell-Analyse konnte die Dynamik dieser Populationsbildung untersucht werden (Abbildung 12).

Bereits nach 24 h können die anfangs homogenen LDs anhand ihrer Größe in zwei Klassen eingeteilt werden. Darüber hinaus konnte mit dieser Analyse­methode auch quantitativ gezeigt werden, dass sich EGFP-CG2254 hauptsächlich auf den größeren LDs in der Zelle befindet. Doch was zeichnet diese LDs aus? Bis jetzt wurden nur wenige Proteine mit einer Lokalisation auf LD-Subpopulationen beschrieben. Dazu gehören Proteine, die in Abhängigkeit des Reifegrades und der Lipidzusammensetzung der LDs unterschiedlich lokalisieren, wie die Mitglieder der PERILIPIN-Proteinfamilie (Wolins *et al.* (2006) und Hsieh *et al.* (2012)) und Proteine, die sich in Abhängigkeit vom metabolischen Status auf einzelnen LDs befinden, wie z. B. die kleine GTPase Rab18 auf katabolisch aktiven LDs (Martin *et al.*, 2005) oder GPAT4 und AGPAT3 auf anabolisch aktiven LDs (Wilfling *et al.*, 2013). Bei den Proteinen AUP1 und ORP2 wurde ebenfalls eine Lokalisation auf LD-Subpopulationen beobachtet (Thiele und Spandl, 2008). Die Identität dieser LD-Subpopulationen wurde aber nicht weiter charakterisiert. Für EGFP-CG2254 wurde zunächst untersucht, ob die Lokalisation von der LD-Reifung abhängt. Wie die Lebendaufnahmen mit EGFP-CG2254 exprimierenden Zellen zeigen (Abbildung 17), beginnt die Lokalisation auf Subpopulationen schon wenige Minuten nach der Zugabe von OA und damit vermutlich schon während der LD-Biogenese. Auch während der Remobilisierung verbleibt EGFP-CG2254 auf LD-Subpopulationen (Abbildung 10). Ein Bezug zwischen LD-Reifung bzw. – Abbau und der EGFP-CG2254 Lokalisation konnte damit nicht festgestellt werden. Als nächstes wurde untersucht, ob die CG2254-Lokalisation mit dem metabolischen Status der einzelnen LDs verknüpft ist. In 3T3-L1 Adipozyten und COS7-Zellen existieren LDs, die mehr Fettsäuren einlagern als ihre benachbarten LDs (Kuerschner *et al.*, 2008). Diese sind anabolisch aktiver, weil sich vermehrt DGAT2 auf oder in der Nähe der LDs befindet und somit die TAG-Synthese schneller ablaufen kann. Von *Drosophila* S2-Zellen ist bekannt, dass sich nur auf einzelnen LDs alle benötigten Enzyme für die komplette *de novo* TAG-Synthese befinden, und dass diese LDs dadurch schneller an Größe gewinnen (Wilfling *et al.*, 2013). Diese Enzyme wie GPAT4 sind deshalb Marker für anabolisch aktive LDs. Die gefundene Kolo­kalisierung von EGFP-CG2254 und GPAT4 (Abbildung 14) ist ein deutlicher Hinweis, dass CG2254 auch nur auf anabolisch aktiven LDs lokalisiert. Unterstützt wird diese These durch die fehlende Fähigkeit von EGFP-CG2254, sich auf bereits bestehende LDs zu bewegen, wenn die Neusynthese von TAG durch TriacsinC inhibiert ist (Abbildung 15). Katabolisch aktive LDs erlauben daher keine Lokalisation von CG2254. Bei Zellen, denen kein Überschuss an freien Fettsäuren zur Verfügung steht, deren TAG-Synthese aber nicht durch die Zugabe von Triacsin C gehemmt wird, lässt sich dennoch vereinzelt eine

Lokalisation auf bestehende LDs beobachten (ohne Abbildung). Das könnte ein Indiz dafür sein, dass in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der gespeicherten Neutrallipide existiert, welches je nach Verfügbarkeit an freien Fettsäuren auf die eine oder andere Seite verlagert wird. So könnten LDs kurzzeitig wieder anabolisch aktiv werden und damit die Lokalisation von CG2254 wieder ermöglichen. Auch eine Neubildung von LDs ist denkbar, was die kleinen LDs mit EGFP-CG2254 im Fettkörper von wandernden L3-Larven (Abbildung 34D) erklären könnte.

Doch welchen Nutzen hat die Zelle davon, LD-Subpopulationen auszubilden, die sich in ihrem metabolischen Zustand unterscheiden? Eine Erklärung könnte die Bildung von getrennten Kompartimenten sein. Die gegenläufigen Reaktionen von Auf- und Abbau des TAG könnten auf diese Weise getrennt voneinander ablaufen, wodurch sie effizienter sind, weil sie sich nicht gegenseitig neutralisieren. Dadurch könnte eine LD-Subpopulation schon abgebaut werden und die Zelle könnte die frei gewordenen Fettsäuren gezielt einsetzen, z. B. zur Energiegewinnung, während gleichzeitig eine andere Subpopulation überschüssige Fettsäuren für den späteren Gebrauch einlagert. Dies kann im Zusammenhang der Lipotoxizität wichtig sein. Damit wird die schädliche Wirkung bezeichnet, die freie Fettsäuren auf die Zelle haben (Listenberger *et al.*, 2003). In dem Fall, dass die Zelle mehr TAG zu freien Fettsäuren abbaut, als sie verbrauchen oder sekretieren kann, stellt die direkte Reesterifizierung in neue LDs somit einen Schutzmechanismus für die Zelle dar.

Eine weitere mögliche Erklärung für die gleichzeitige Existenz von anabolisch und katabolisch aktiven LDs könnte sein, dass bei LDs eine Form von „*Bet-Hedging*“ vorkommt. Dieses Konzept beschreibt eine Strategie aus der Evolutionsbiologie (Slatkin, 1974): Danach kommen innerhalb einer Population alle Phänotypen vor, wodurch die generelle Fitness der Population zwar verringert wird, dafür aber die schnellere Anpassung an eine veränderte Umgebung ermöglicht wird. Auf die LDs übertragen würde das bedeuten, dass sich in den Zellen LD-Subpopulationen bilden, damit sich die Zellen schneller auf wechselnde Fettsäuremengen im Organismus oder der Umwelt einstellen können. Dies könnte auf die Mehrheit der Zelltypen zutreffen. Doch bei denjenigen Zelltypen, die eine entscheidende Rolle in der Regulation des Nahrungshaushaltes spielen, wie z. B. Adipozyten, Hepatozyten oder bei Insekten die Zellen des Fettkörpers, könnte die Ausbildung von LD-Subpopulationen Teil ihrer Spezialisierung sein. Sie müssen rasch auf einen Wechsel zwischen Überschuss und Mangel an Fettsäuren reagieren, damit der Organismus jederzeit ausreichend versorgt ist.

4.4 Die LDL- und LDSP-Sequenz von CG2254 sind getrennt

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der CG2254-Sequenzbereiche, die für die Lokalisation auf LDs (LDL-Sequenz) und für die Lokalisation auf LD-Subpopulationen (LDSP-Sequenz) ausreichend und notwendig sind. Studien zur Identifizierung von LDL-Sequenzen wurden bereits an einer Reihe von Proteinen durchgeführt, wobei auch wiederkehrende Motive gefunden wurden (Walther und Farese, 2012). Untersuchungen zu einer LDSP-Sequenz existierten jedoch noch nicht. Mit der Struktur-Funktionsanalyse von CG2254 konnte hier erstmals nicht nur die LDL-, sondern auch eine LDSP-Sequenz identifiziert werden (Abbildung 20 und Abbildung 21). Interessanterweise liegen diese beiden Sequenzen voneinander getrennt vor. Die LDL-Sequenz ist ein 28 Aminosäuren-langer Bereich, der vor der vorausgesagten Rossmann-NAD⁺-Bindedomäne am N-terminalen Ende des CG2254-Proteins liegt. Sie ist notwendig und ausreichend für die LD-Lokalisation. Darüber hinaus enthält sie auch das Signal für die Lokalisation in das ER, denn ohne sie befindet sich das verkürzte EGFP-CG2254 im Zytoplasma (Abbildung 20A). Überlappende Signale für die ER- und LD-Lokalisation wurden bereits für AUP1 beschrieben (Stevanovic und Thiele, 2013) und sind möglicherweise weit verbreitet bei Proteinen, die in beiden Organellen vorkommen (siehe auch Thiel *et al.*, 2013). In CG2254 besteht die LDL-Sequenz aus einer hydrophoben Sequenz, die laut Vorhersageprogrammen eine amphipatische Helix formen kann. Von solchen Strukturen ist bekannt, dass sie Proteine an LDs verankern können (u. a. Garcia *et al.*, 2003, Hinson und Cresswell, 2009, und Wilfling *et al.*, 2013). Proline, mit denen eine hydrophobe Haarnadelschleife zur Bindung an LDs (Abell *et al.*, 1997) ausgebildet werden könnte, wurden in der LDL-Sequenz nicht gefunden. Auch das PVG-Motiv von AUP1, welches ein Abknicken in der Struktur verursacht und damit die monotopische Einlagerung in die LD-Membran ermöglicht (Stevanovic und Thiele, 2013), ist nicht vorhanden. Basische Aminosäurereste können ebenfalls ein Signal für eine LD-Lokalisation sein (Ingelmo-Torres *et al.*, 2009, Stevanovic und Thiele, 2013). Mit dem Lysinrest an Position 35 befindet sich jedoch nur ein einziger davon in der CG2254 LDL-Sequenz, dessen Austausch gegen Isoleucin die LD-Lokalisation nicht unterbindet (Abbildung 23). Der genaue Mechanismus der Verankerung von CG2254 in die LD-Membran bleibt damit ungeklärt.

Die LDSP-Sequenz befindet sich gleich hinter der LDL-Sequenz im Bereich der Aminosäuren 49-90 (Abbildung 21). Das ist bemerkenswert, denn dieser Abschnitt ist innerhalb der Familie der SDRs aufgrund der Notwendigkeit für die Bindung des Coenzym

stärker konserviert. Dass sich dort eine Signalsequenz befindet, ist ungewöhnlich, weil diese bei SDRs sonst in *N*- oder *C*-terminalen Verlängerungen zur eigentlichen SDR-definierenden Rossmann-NAD⁺-Bindedomäne gefunden werden (z. B. Signalsequenzen zur ER- oder Peroxisom-Lokalisation, Zhang *et al.*, 2004 bzw. Reumann *et al.*, 2007), so wie es auch für die hier beschriebene LDL-Sequenz der Fall ist. Von daher könnten die in der LDSP-Sequenz enthaltenen strukturellen Elemente für die Lokalisation entscheidender sein als einzelne Aminosäuren. Diese Annahme wird durch die hier durchgeführten Lokalisationsstudien mit Punktmutationen tragenden CG2254-Varianten unterstützt, da sie keine Änderung der Lokalisation bewirken (Abbildung 25). Die Tatsache, dass CG2254 mindestens zwei redundante LDSP-Sequenzen besitzt (Abbildung 22G), hebt noch einmal die Bedeutung der Lokalisation auf LD-Subpopulationen hervor.

4.5 Die Sortierung von CG2254 auf LD-Subpopulationen

Die LDSP-Sequenzen fungieren als eine Art „Schleusenwächter“ für CG2254, da sie den Zugang auf einzelne LDs beschränken. Mit der LDL-Sequenz alleine lokalisiert das Protein auf allen LDs (Abbildung 20). Mindestens drei Möglichkeiten bestehen, wie eine Lokalisation auf allen LDs verhindert werden kann (Abbildung 44): (1) CG2254 wird rasch degradiert und behält nur in einer LD-Subpopulation seine Stabilität, (2) CG2254 kehrt direkt wieder zurück ins ER, oder (3) der Zugang zu den nicht anabolisch aktiven LDs ist für CG2254 versperrt.

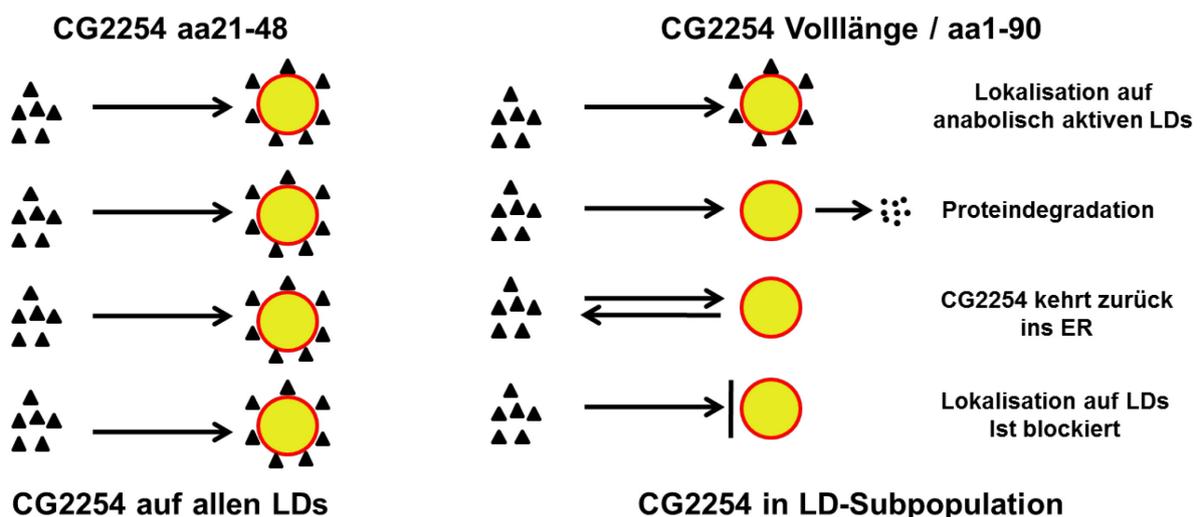


Abbildung 44: Möglichkeiten zur CG2254-Lokalisation auf LD-Subpopulationen. Während die LDL-Sequenz (CG2254 aa21-48) alleine auf allen LDs lokalisiert, befindet sich das Vollängenprotein oder die Aminosäuren 1-90 nur auf einzelnen LDs. Dies kann auf mindestens drei Wegen erreicht werden: CG2254 wird degradiert, direkt wieder zurück ins ER transportiert oder der Zugang ist blockiert.

In dem Fall, dass CG2254 auf bestimmten LDs degradiert wird, muss es für seinen Abbau markiert werden. In Zellen geschieht dies durch das Verknüpfen von mehreren Ubiquitinresten an Proteine, was als Signal für den gezielten Abbau in Proteasomen erkannt wird (Hershko *et al.*, 2000). Bisher wurde sowohl die Lokalisation der für eine Ubiquitinierung notwendigen Enzyme auf LDs (Hooper *et al.*, 2010), als auch eine Rolle der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation bei der Regulation von LD-assoziierten Proteinen demonstriert (Xu *et al.*, 2006). Die Voraussetzung zur Ubiquitinierung ist das Vorhandensein von Lysinresten, da über deren Amino-Gruppe die Bindung mit Ubiquitin erfolgt (Hershko *et al.*, 2000). In der LDSP-Sequenz von CG2254 befinden sich drei Lysine, die jedoch laut dem Vorhersageprogramm UbPred (Radivojac *et al.*, 2010) keiner bekannten Ubiquitinierungsstelle entsprechen. Vereinzelt kommt eine Ubiquitinierung aber auch an anderen Aminosäuren als Lysin vor (Cadwell und Coscoy, 2005), sodass sich eine Verknüpfung von Ubiquitin an die LDSP-Sequenz nicht gänzlich ausschließen lässt. Experimentell ließe sich die Degradation von CG2254 auf verschiedene Arten untersuchen, ähnlich wie es schon für PERILIPINE bei Xu *et al.* (2006) beschrieben wurde. Durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren wie z. B. MG-132 (Read *et al.*, 1995) sollte der Abbau verhindert werden. Dadurch würde das Fusionsprotein EGFP-CG2254 auf allen LDs lokalisieren. Vorläufige Daten von Experimenten mit MG-132 zeigen das jedoch nicht (ohne Abbildung). Zudem würde sich ubiquitiniertes CG2254 in der Zelle anreichern, das sich mit einer Western Blot-Analyse nachweisen ließe. Indizien, die gegen die Degradation von CG2254 sprechen, sind zudem die fehlenden Banden von teilweise abgebautem CG2254 im Western Blot (Abbildung 29A).

Anstatt der Degradation könnte auch ein direkter Rücktransport vom LD zum ER das Fehlen von CG2254 in einer LD-Subpopulation bewirken. UBXD8 und AAM-B sind Beispiele für Proteine, die sich wieder zurück in das ER bewegen, jedoch auch nur, wenn sich die LDs zurückbilden (Zehmer *et al.*, 2009). Für diesen Austausch vermuten die Autoren kurzfristige oder dauerhafte Kontakte mit dem ER. Darüber hinaus ist ebenfalls ein Transport in Vesikeln möglich. COPI bedeckte Vesikel steuern die Lokalisation von LD-assoziierten Proteinen wie der Lipase ATGL oder Perilipin2 auf die LDs (Beller *et al.*, 2008, und Soni *et al.*, 2009), daher könnte für CG2254 der umgekehrte Weg ins ER zutreffen. Die LDSP-Sequenz könnte dabei ein Signal für Rezeptoren oder Proteinkomplexe sein, die die Sortierung übernehmen und entscheiden, welche Proteine auf den LDs verbleiben und welche zurücktransportiert werden. Solche „Retromer“ genannte Proteinkomplexe finden sich z. B. zwischen den

Endosomen und dem Trans-Golgi-Netzwerk (Arighi *et al.*, 2004). Allerdings tritt hier die Frage auf, ob sich diese möglichen Rezeptoren auf allen LDs befinden, aber die LDSP-Sequenzen auf manchen LDs nicht erkennen können, oder ob die Rezeptoren nur auf den LDs vorkommen, auf denen sich CG2254 nicht befindet.

Gegen die Annahme, dass die Lokalisation auf LD-Subpopulationen durch die Degradation oder den Rücktransport entsteht, sprechen die Ergebnisse der Lokalisationsstudien mit den chimären Proteinen aus PLIN2 bzw. CG9186 und der CG2254 LDSP-Sequenz (Abbildung 28). Mit diesen Lokalisationsstudien wurde untersucht, ob die LDSP-Sequenz die Lokalisation in Abhängigkeit zu der Position zur LDL-Sequenz und dem Weg, den die Proteine auf die LDs nehmen, beeinflusst. Bei den getesteten chimären Proteinen wurde nur im Fall vom EGFP-CG9186aa1-195::CG2254aa49-90 eine Lokalisation auf Subpopulationen erzielt. Hier liegt die LDSP-Sequenz direkt hinter der LDL-Sequenz und das Protein gelangt über das ER auf die LDs (Abbildung 28). Für eine Ubiquitinierung sollte weder die Position der LDSP-Sequenz noch der Weg auf die LDs eine Rolle spielen und auch ein möglicher Rücktransport sollte, wenn er durch Rezeptoren gesteuert würde, die LDSP-Sequenz am Ende des Proteins erkennen können. Daher spricht viel dafür, dass der Zugang für CG2254 auf manche LDs blockiert ist. Diese Erklärung lässt sich auch mit der frühen Lokalisation von CG2254 auf die LD-Subpopulationen in Einklang bringen. Schon wenige Minuten nach der Zugabe von OA ist CG2254 auf neugebildeten LDs zu finden, sodass es vermutlich bereits während der Biogenese der LDs auf ihnen lokalisiert (Abbildung 17).

Neuere Studien zeigen, dass LDs in speziellen Mikrodomänen der ER-Membran gebildet werden (Kassan *et al.*, 2013). Hier könnten sich bereits die unterschiedlichen LD-Subpopulationen herausbilden: Eine Population mit LDs, die in ihrer Größe stärker wachsen, sei es durch die Lokalisation der Enzyme zur TAG-Synthese oder durch eine bevorzugte Verschmelzung mit anderen LDs, und andererseits die kleinen, metabolisch weniger aktiven LDs, denen diese Fähigkeiten fehlen. Die Entscheidung über den Zugang zum LD könnte in diesen Mikrodomänen durch eine bestimmte Maschinerie erfolgen, die in der LDSP-Sequenz Sortiermerkmale erkennt und so eine Lokalisation auf die LDs zulässt oder verhindert. Gleichzeitig könnte die LDSP-Sequenz selbst ein Sensor sein und Merkmale der entstehenden LDs erfassen: Durch Interaktionen könnte festgestellt werden, ob sich bestimmte Proteine auf der Oberfläche befinden oder die Membran mit spezifischen Phospholipiden angereichert ist. Ebenso könnten biophysikalische Parameter wie die Krümmung oder die Spannung der wachsenden LD-Membran erkannt werden. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte

gezeigt werden, dass die Arf1/COPI-Maschinerie die Menge an Phospholipiden in der LD-Membran verringert, wodurch die Oberflächenspannung erhöht wird und Kontakte zwischen dem ER und den LDs ermöglicht werden (Wilfling *et al.*, 2014). Diese Kontaktstellen könnten für die Lokalisation von CG2254 notwendig sein. Es gibt aber auch LD-Proteine wie CCT1, die LDs mit geringem Gehalt an Phosphatidylcholin erkennen. Dadurch besitzen diese LDs eine besonders hohe Oberflächenspannung und CCT1 lokalisiert nur auf diese (Krahmer *et al.*, 2011). Weitere Studien werden nötig sein, um zu untersuchen, wie solche Parameter von CCT1 oder der LDSP-Sequenz erfasst werden können. Abbildung 45 fasst noch einmal die verschiedenen Möglichkeiten zusammen, wie die LDSP-Sequenz die Lokalisation bestimmen könnte.

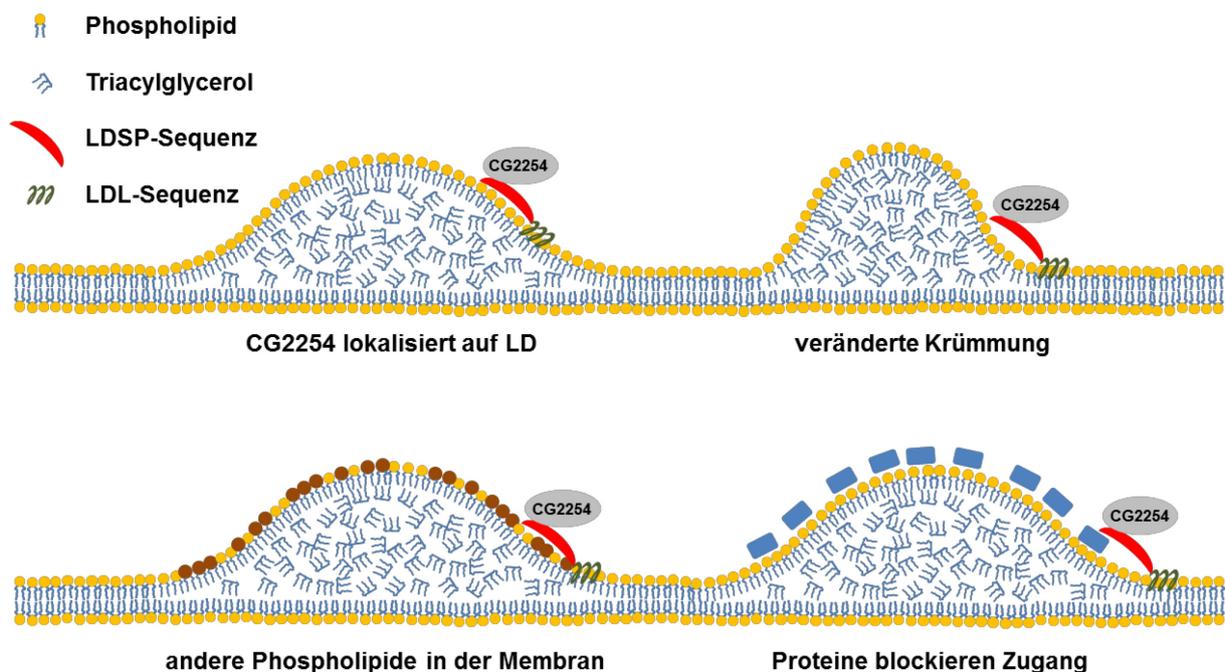


Abbildung 45: Mögliche von der LDSP-Sequenz erkannte Faktoren. Die LDSP-Sequenz ist möglicherweise in der Lage, verschiedene Faktoren der wachsenden LDs in den ER-Mikrodomänen zu erkennen und dadurch die Lokalisation von CG2254 auf die LDs zu verhindern.

4.6 Zu der *in vivo* Funktion von CG2254

Die Existenz von LD-Subpopulationen wurde bislang vor allem in Zellkulturzellen beobachtet. Dabei war nicht auszuschließen, dass es sich bei dieser subzellulären Lokalisation um ein *in vitro*-Artefakt handelt. Erste Hinweise auf die Existenz von LD-Subpopulationen *in vivo* lieferten Überexpressionsstudien mit EGFP-markierten CG2254 in *Drosophila* L3-larvalen Fettkörpern (Beller *et al.*, 2006) sowie die Lokalisation von Perilipinen in krankhaft verändertem Lebergewebe (Straub *et al.*, 2008) oder Tumoren (Straub *et al.*, 2010). In beiden Fällen könnte die differenzielle Lokalisation der Proteine aber durch die Überexpression bzw.

die pathologische Situation verursacht werden. Daher war es eines der Ziele dieser Arbeit, die Lokalisation und darüber hinaus die Funktion des endogenen CG2254 zu bestimmen. Die *in vivo* Studien wurden auf Fettkörper, Ringdrüse und Darm beschränkt, obwohl weitere Hinweise auf eine CG2254 Expression im adulten Herzen (Proteomanalyse, Cammarato *et al.*, 2011) und Auge (Hochdurchsatz-Screening für Expressionsdaten, Gelbart und Emmert, 2013) auf eine Funktion in anderen Gewebe hindeuten.

4.6.1 CG2254 besitzt *in vivo* eine dynamische subzelluläre Lokalisation

Mit Hilfe von Antikörperfärbungen wurde zunächst im Fettkörper von *Drosophila* Embryonen untersucht, ob sich CG2254 auf LD-Subpopulationen befindet. Die Fettkörper sind mit LDs dicht gepackt (Beller *et al.*, 2010a). Bereits hier zeigten sich bei einer CG2254-Antikörperfärbung nur einzelne Ringe (Abbildung 30). Erst durch die Gegenfärbung der LDs in L3-larvalen Fettkörpern offenbarte sich die Existenz von CG2254-markierten LD-Subpopulationen (Abbildung 30). Damit ist CG2254 das erste bekannte Protein, für das *in organismo* eine solche Lokalisation nachgewiesen und damit auch das Auftreten von LD-Subpopulationen *in organismo* gezeigt werden konnte. Im Darmgewebe von L3-Larven wurden deutlich mehr CG2254-markierte Ringe sichtbar (Abbildung 32). Dieses Ergebnis deutet eher auf eine Lokalisation auf allen LDs hin als auf eine Lokalisation auf LD-Subpopulationen. Im Unterschied zu der Antikörperfärbung mit den Fettkörpern wurden hier aber keine wandernden L3-Larven kurz vor dem Verpuppen, sondern L3-Larven vier Tage nach der Eiablage verwendet. Zu diesem Zeitpunkt sind die Larven noch im Futter und besitzen mehr LDs im Darm (eigene Beobachtung). Um den Zusammenhang zwischen dem Alter der Larven und der CG2254-Lokalisation zu belegen, wurde die Lokalisation von EGFP-CG2254 in Fettkörpern und Därmen von Larven vier bzw. sieben Tage nach der Eiablage untersucht. Die Verwendung des Fusionsproteins war dabei vorteilhaft, da es wie das endogene Protein lokalisiert (vgl. Abbildung 30 und Abbildung 34) und keine Membranpermeabilisation notwendig ist, bei der durch den Einsatz von Detergenzien kleinere LDs verloren gehen können. In L3-Larven vier Tage nach der Eiablage befindet sich EGFP-CG2254 sowohl im Fettkörper als auch im Darm auf vielen, wenn nicht sogar auf allen LDs (Abbildung 34D und Abbildung 41G). Im Darm weisen die LDs zudem eine polarisierte Lokalisation zum Darmlumen hin auf. Dort sind die LDs deutlich größer als die vereinzelt LDs in den anderen Bereichen der Zelle. Sieben Tage nach der Eiablage lokalisiert EGFP-CG2254 wieder nur auf LD-Subpopulationen im Fettkörper und im Darm (Abbildung 34A und Abbildung 41H). Einer der markantesten Unterschiede zwischen den wandernden und

den nicht-wandernden L3-Larven betrifft die Nahrungsaufnahme. Fette werden von den jungen Larven über das Futter aufgenommen, kurzfristig im Darm eingelagert und dann als DAG gebunden an Lipophorin an den Fettkörper weitergegeben (Palm *et al.*, 2012). Ließen sich die Zellkulturdaten, laut derer EGFP-CG2254 nur auf den wachsenden LDs lokalisiert, auf die Beobachtungen *in vivo* übertragen, so wären die LDs in den jungen Larven mehrheitlich anabolisch aktiv. Die polarisierte Lokalisation der LDs wurde schon bei Darmzellen von adulten *Drosophila* Fliegen beobachtet, in denen die Aufnahme der freien Fettsäuren stattfindet (Lemaitre *et al.*, 2013) und diese direkt in die LDs eingebaut werden können. Diese Annahme ist im Einklang mit Ergebnissen aus ausdifferenzierten Caco2-Zellen (einer humanen Darmepithelzelllinie) bei denen zwei LD-Populationen beschrieben werden (Khalidoun *et al.*, 2014): Eine besteht aus hauptsächlich großen LDs, die für eine längere Lipidspeicherung von der Zelle gebildet werden und aktiv an den basalen Pol der Zelle transportiert werden. Die zweite Population aus kleinen LDs wird durch Autophagie direkt degradiert, um – sofern es sich um eine Darmzelle *in vivo* handelt - die Fettsäuren in den Organismus weiterzugeben. Ähnliches könnte sich auch im larvalen Darm von *Drosophila* abspielen. Mit dem Futter würde eine so große Menge an Neutrallipiden aufgenommen, dass die Darmzellen nur einen Teil in die Hämolymphe abgeben können. Der Rest würde in LDs gespeichert, bevor eine Remobilisierung und Abgabe der gespeicherten Lipide an die Hämolymphe erfolgt, sobald das kritische Gewicht erreicht ist und die Larve zu wandern beginnt (Bakker, 1959). Auf diese nun nicht mehr anabolisch aktiven LDs könnte CG2254 nicht mehr länger lokalisieren.

Im Fettkörper könnten vergleichbare Prozesse ablaufen. Bemerkenswert sind dort aber die vereinzelt auftauchenden kleineren LDs, die Aggregate formen (Abbildung 34D). Durch die Lokalisation von EGFP-CG2254 werden sie als anabolisch aktiv markiert und fusionieren wahrscheinlich zu einem größeren LD. Für die Lipidspeicherung werden sie vermutlich nicht verwendet, da die Zelle gleichzeitig ihre gespeicherten Reserven abbaut, um die fastende Larve mit Energie zu versorgen (Scott *et al.*, 2004). Die LDs könnten als Schutz vor Schäden durch einen Überschuss an freigesetzten Fettsäuren dienen oder die LDs und die darin enthaltenen Fette könnten für andere Funktionen genutzt werden. Dies könnte z. B. die Synthese von Hormonen oder essentiellen Fettsäuren wie z. B. Linolensäure beinhalten (Canavoso *et al.*, 2001).

4.6.2 CG2254 beeinflusst in der larvalen Entwicklung das Überleben und die Regulation der Energiehomöostase

CG2254 wird in keiner der bekannten *Drosophila* Zellkultur-Zelllinien exprimiert. Die ektopische Expression von EGFP-CG2254 in Zellkulturzellen wirkt sich weder auf die Vitalität noch auf die LD-Menge oder -Morphologie aus (Abbildung 33). Dagegen hat eine veränderte Proteinmenge *in vivo* zum Teil drastische Konsequenzen. Hierbei wirkt sich eine CG2254 Überexpression stärker aus als die Reduktion durch CG2254 RNAi. Ubiquitär exprimiertes EGFP-CG2254 ist letal, während bei ubiquitärer CG2254 RNAi keine offensichtlichen Phänotypen vorhanden sind (ohne Abbildung). Im Fettkörper verursacht die EGFP-CG2254 Überexpression den Tod während des Puppenstadiums (Abbildung 35), im Darm hingegen bewirkt die Überexpression von EGFP-CG2254 eine erhöhte Fettspeicherung (Abbildung 43). In beiden Geweben hat CG2254 RNAi dagegen weder einen Einfluss auf die Vitalität noch auf die Fettspeicherung.

Die Ringdrüse, und dort insbesondere das CA, hat eine wichtige Rolle für die *in vivo*-Funktionen von CG2254. Sowohl die Überexpression als auch die RNAi zeigen eine Wirkung auf die Vitalität und die Menge des im Organismus gespeicherten Fettes (Tabelle 13). Dies kann mit der vielfältigen Aufgabenstellung der Ringdrüse zusammenhängen, die anhand der Sekretion von Hormonen an der Regulation der Entwicklung und Energiehomöostase beteiligt ist (Harvie *et al.*, 1998). Die holometabole Entwicklung bei Insekten wird hauptsächlich durch Ecdysteroide und Farnesoide (z. B. JH) gesteuert, wobei Störungen in diesem Hormonhaushalt für die Fliegen drastische Folgen haben. So führt der Verlust des JH-Rezeptors bereits in frühen Larvenstadien zum Tod. Dabei verlassen die Larven vor dem Sterben teilweise das Futter (Jones *et al.*, 2010). Ein vergleichbares Verhalten wird auch bei einzelnen Larven beobachtet, die in der kompletten Ringdrüse EGFP-CG2254 exprimieren. Allerdings tritt in diesen Fällen nicht der „Ultraspiracle“-Phänotyp (zwei Cuticulas und zwei Paar Mundhaken bei toten Larven) auf, der typisch für eine unzureichende Menge an Ecdyson und JH ist (Jones *et al.*, 2010). Ein direkter Zusammenhang zwischen CG2254 und Ecdyson bzw. JH besteht daher wahrscheinlich nicht.

Ein solcher Zusammenhang könnte auch nicht den Phänotyp im TAG-Gehalt adulter Tiere erklären. Die Ringdrüse selbst ist kaum als Energiespeicher geeignet, stattdessen hat sie auch hier eine regulatorische Funktion. Dabei führt CG2254 RNAi in der kompletten Ringdrüse zu einer erhöhten Speicherung bei jungen adulten Männchen, wenn die RNAi schon während der Larvenzeit startet und auch in den adulten Tieren dauerhaft stattfindet (Abbildung 37,

Abbildung 40). Interessanterweise ist die TAG-Speicherung geringer, wenn die CG2254-Proteinmenge im CA nur kurz nach dem Schlüpfen reduziert wird (Abbildung 40). Gleichzeitig wird bei der Überexpression in dieser kurzen Zeit eine erhöhte TAG-Menge gemessen (Abbildung 40). Anscheinend wird in dieser Phase die Energiehomöostase anders reguliert als bei älteren adulten Tieren. Für die Regulation werden Peptidhormone wie DILPs aus den medianen Neurosekretorischen Zellen im Gehirn (Rulifson *et al.*, 2002a) oder AKH aus den Zellen des CC (Kim und Rulifson, 2004) sekretiert. Wie kann nun eine veränderte Menge an CG2254 in der Ringdrüse die larvale Entwicklung und die Regulation der Energiehomöostase beeinflussen? CG2254 könnte in der Ringdrüse einen Einfluss auf die Synthese und Ausschüttung von Botenstoffen besitzen. Zum einen könnte CG2254 an der Messung des Ernährungszustandes beteiligt sein. In Säugern sind neurosekretorischen Zellen des Hypothalamus, die „Agouti-related peptide“ (AgRP)-Neuronen, Sensoren für den Ernährungszustand (Kaushik *et al.*, 2011). In diesen Neuronen löst Hunger eine Lipophagie von LDs aus, wodurch die intrazelluläre Menge an freien Fettsäuren steigt. Durch die Fettsäuren wird die Expression von AgRP erhöht, welches wiederum die Expression von „pro-opiomelanocortin“ (POMC) in benachbarten Neuronen senkt. Neurone ohne POMC stimulieren den Organismus zur Nahrungsaufnahme (Kaushik *et al.*, 2011). In *Drosophila* könnte dieser Sensor nicht über die Lipophagie, sondern über die Lokalisation von CG2254 auf anabolisch aktive LDs funktionieren. Diese könnten besonders dann zahlreich sein, wenn viele Fette über die Nahrung aufgenommen werden, und es könnte somit zu einer höheren Aktivität von CG2254 kommen. Die Überexpression oder Reduktion von CG2254 würde demnach zu einer falschen Regulation des Energiehaushalts führen. Bei adulten Tieren kann das die beobachtete veränderte Fettspeicherung verursachen (s. Tabelle 13). Auch das Sterben in der larvalen Entwicklung bei veränderter CG2254-Proteinmenge lässt sich mit einer Störung in der Regulation des Energiehaushaltes erklären. Der Energiehaushalt bestimmt den Zeitpunkt des Schlüpfens und ein Fehler in dieser kritischen Phase führt zum Tod (Mirth *et al.*, 2005).

CG2254 könnte des Weiteren wie seine nah-verwandten Säuger-SDRs auch an der Synthese von Hormonen oder deren Vorstufen beteiligt sein. Neben Ecdyson und JH sekretiert die Ringdrüse weitere Steroidhormone und Sesquiterpene, für deren Synthese ebenfalls Dehydrogenasen benötigt werden (Huang *et al.*, 2008, und Belles *et al.*, 2005). Als Ort für diese Synthesen sind LDs bis jetzt noch nicht bekannt. Sie laufen in Mitochondrien, im Zytoplasma und im ER ab (Belles *et al.*, 2005). CG2254 könnte auch im ER aktiv sein oder die Ausgangssubstanzen aus den LDs bereitstellen, indem diese beispielsweise die Lipidvorstufen zu den Mitochondrien bringen, wie es in steroidogenen Zellen vorkommt

(Almahbobi *et al.*, 1993). Dies kann gerade bei Steroidhormonen wichtig sein, da *Drosophila* selbst nicht in der Lage ist, Sterole *de novo* herzustellen. Daher sind die Fliegen auf die Aufnahme von Sterolen über die Nahrung angewiesen (Carvalho *et al.*, 2010). Diese müssen soweit modifiziert werden, damit die Fliegen sie verwenden können. Eine Veränderung im CG2254-Gehalt könnte so den Hormontiter beeinflussen. Gleichfalls könnte CG2254 auch am Abbau oder der Deaktivierung von Hormonen beteiligt sein.

CG2254 könnte aber auch nur auf indirekte Weise andere Stoffwechsel- oder Hormonwege beeinflussen. Die Phänotypen sind bei CG2254 Überexpression stärker vorhanden als bei CG2254 RNAi. Durch einen Überschuss an CG2254 könnte die von dem Protein katalysierte Reaktion so stark ablaufen, dass das Substrat verbraucht wird und damit anderen Reaktionen nicht mehr zur Verfügung steht.

Obwohl eine Veränderung der CG2254 Menge in der Ringdrüse letal ist bzw. die TAG-Speicherung beeinflusst, konnte dort keine endogene Expression bzw. die subzelluläre Lokalisation geklärt werden. Dabei deuten Ergebnisse mit CG2254 RNAi darauf hin, dass das Protein im CA exprimiert wird (Abbildung 39). Jedoch ergaben Antikörperfärbungen gegen CG2254 kein spezifisches Signal. Auch die Bestimmung der Lokalisation durch die Expression von EGFP-markiertem CG2254 gelang nur in der PTG. In der PTG von späten, wandernden L3-Larven lokalisiert EGFP-CG2254 auf LD-Subpopulationen und dort auch auf den größeren LDs (Abbildung 18B). Die LDSP-Sequenz wird also ebenfalls in diesem Gewebe erkannt. Im CA dagegen konnten keine LDs gefunden werden. Somit sind wohl zu diesem späten Entwicklungsstadium keine LDs im CA vorhanden. Für eine Lokalisationsstudie von CG2254 im CA müsste daher zuerst bestimmt werden, ob und zu welchem Zeitpunkt überhaupt LDs im larvalen CA vorkommen. Im Embryonal- und Puppenstadium konnten LDs im CA nachgewiesen werden (Beller *et al.*, 2010a, Dai und Gilbert, 1991), bisher jedoch nicht in den drei Larvenstadien. Es ist denkbar, dass die LDs nur sehr kurzfristig als Speicher für hydrophobe Substanzen wie z. B. JH und dessen Ausgangssubstrate existieren (Dai und Gilbert, 1991), ähnlich wie es in der PTG der Fall ist. Dort steht die Bildung der LDs in Zusammenhang mit der Synthese von Ecdysteroiden und kommt besonders vor der Verpuppung vor (Dai *et al.*, 1991). Daneben könnten die LDs im CA aber auch nicht-existent oder zu klein für eine Detektion sein. Im larvalen CA ist das glatte ER stark vergrößert und kompakt (King *et al.*, 1966). Dieses glatte ER könnte mit seiner großen (Reaktions-)Fläche als Synthese- und Speicherort für wasserunlösliche Hormone dienen, die dann direkt sekretiert werden. So könnten LDs in diesem Entwicklungsstadium im CA nicht notwendig sein.

Im Fettkörper verursacht die *CG2254* RNAi trotz einer Reduktion der *CG2254*-Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 29) keine erhöhte Letalität oder einen veränderten TAG-Gehalt (Abbildung 35 und Abbildung 36). Auch bei der EGFP-*CG2254* Überexpression gibt es während der Larvenentwicklung keine augenscheinlichen Unterschiede zu den Kontrollfliegen. Erst im Puppenstadium tritt eine Letalität auf (Abbildung 35). Das könnte im Kontext mit der umfangreichen Remodellierung des Fettkörpers stehen. Dabei löst dieser sich zu großen Teilen auf und wird anschließend neu gebildet (Nelliot *et al.*, 2006). Die Remodellierung ist hormonabhängig, wodurch sie wie oben beschrieben durch zusätzliches EGFP-*CG2254* gestört oder verändert werden könnte. Die Menge an frei zirkulierenden Hormonen ist von deren Sekretion und deren Degradation abhängig. Der Fettkörper hat ähnlich wie die Leber von Säugern die Funktion Hormone abzubauen (Arrese und Soulages, 2010). Darüber hinaus können LDs Hormone speichern und als Puffer dienen, um einen gewissen Hormontiter aufrechtzuerhalten (Hammock *et al.*, 1975). Sollten während der Remodellierung des Fettkörpers diese Funktionen durch die *CG2254* Überexpression beeinträchtigt werden, könnte dies zum beobachteten Tod der Puppen führen.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Geweben hat eine veränderte Proteinmenge im Darm von *CG2254* keine negativen Auswirkungen auf die Entwicklung (Abbildung 42). Dafür ist bei adulten männlichen *Drosophila* die Fettspeicherung erhöht, wenn EGFP-*CG2254* in NPC1b-positiven Zellen exprimiert wird (Abbildung 43). Der Darm selbst besitzt gegenüber dem Fettkörper nur einen geringen Lipidspeicher. Diese Lipide werden im Hungerzustand rasch aufgebraucht (Gutierrez *et al.*, 2007). Der erhöhte TAG-Gehalt geht daher vermutlich nicht auf zusätzliches Fett im Darm zurück, sondern auf die Einlagerung in anderen Geweben. Generell wird eine erhöhte Speicherung entweder durch eine erhöhte Nahrungsaufnahme oder einen verringerten Verbrauch erzielt. Eine erhöhte Aufnahme wird bei adulten Tieren erzielt, wenn die Fliegen häufiger fressen als notwendig. Dieses Verhalten wird durch Hormone, die sowohl im Gehirn als auch im Darm vorkommen, mitbestimmt (Reiher *et al.*, 2011). Dabei beeinflussen Hormone zwei Prozesse, die die Nahrungsaufnahme steuern: Zum einen sind sie in der Einstellung der circadianen Rhythmik beteiligt und zum anderen vermitteln sie den gemessenen Sättigungsgrad. Die enterokrinen Zellen des Darm schütten Hormone wie beispielsweise „Neuropeptide F“ (NPF) und „short Neuropeptide F“ (sNPF) aus, die in beide Prozesse involviert sind (Nässel und Wegener, 2011). In der Synthese der Hormone des Darms könnte *CG2254* einwirken und somit das Fressverhalten beeinflussen, was zu der gemessenen TAG-Veränderung führt.

Die zweite Möglichkeit, den TAG-Gehalt zu steigern, ist ein verringerter Verbrauch der gespeicherten Neutrallipide, entweder durch eine geringere Aktivität oder einen gestörten Abbau der TAGs, wie z. B. bei Mutanten ohne die Lipase BMM (Grönke *et al.*, 2005). Auch hier könnte CG2254 auf hormonelle Weise eingreifen und die Aktivität der Fliege senken oder Lipasen im Organismus hemmen. Dies muss für die Fliege nicht zwangsläufig letal sein, wenn sie auf andere Energielieferanten wie Glykogen zurückgreifen kann (Palanker *et al.*, 2009) oder wenn die gehemmten Lipasen während der Larvalentwicklung noch nicht benötigt oder ersetzt werden können.

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Möglichkeiten, die CG2254 und *Drosophila* als Modellorganismus für die Erforschung von LD-Subpopulationen bieten. *In vitro* stellt die Entdeckung der LDSP-Sequenz einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen der Lokalisation dar. Die Frage, was diese Sequenz als Sortiersignal erkennt, bleibt ungeklärt. Hier sind Experimente notwendig, die den Einfluss verschiedener Parameter, wie etwa der Phospholipid-Zusammensetzung der LD-Membran, untersuchen. Durch Protein-Interaktionsstudien mit der LDSP-Sequenz, beispielsweise „Pull down“-Experimente, könnten Proteine identifiziert werden, die an der Lokalisation auf LD-Subpopulationen beteiligt sind. Anhand des CG2254 Nachweises konnten LD-Subpopulationen erstmals auch *in organismo* in verschiedenen Geweben gezeigt werden. Damit kann CG2254 zum einen dazu verwendet werden, die generelle Bedeutung von LD-Subpopulationen im Organismus zu untersuchen. Dies könnte besonders im Hinblick auf wechselnde metabolische Bedingungen geschehen, wie sie beispielsweise während der Entwicklung oder zwischen Nahrungsaufnahme und Hungerzeiten vorkommen. Zum anderen erfordert CG2254 selbst eine vollständigere *in vivo*-Charakterisierung. Fragen zur (enzymatischen) Funktion und wie diese eventuell mit der Lokalisation zusammenhängt sind ebenso offen wie die Fragen, wodurch die Letalität und die veränderte TAG-Speicherung ausgelöst werden. Hier sollten insbesondere Untersuchungen an der Ringdrüse im Fokus stehen, weil dort eine veränderte Menge an CG2254 die stärksten Phänotypen verursacht und die genaue Rolle von LDs in der Ringdrüse noch unbekannt ist. Dabei reguliert die Ringdrüse im Wechselspiel mit anderen Geweben die Entwicklung und die Energiehomöostase auf hormonelle Weise, wie sie vergleichbar auch bei anderen vielzelligen Organismen beobachtet wird. Tiefere Erkenntnisse zur Rolle von CG2254 und LD-Subpopulationen könnten so zu Konzepten führen, die nicht nur für *Drosophila* gelten, sondern allgemein gültig sind.

5 Anhang

5.1 Daten aus dem RNAi-Screen in *Drosophila* Zellkultur

Wie unter 3.3 beschrieben, wurde ein RNAi-Screen in *Drosophila* Zellkulturzellen (siehe 2.16) mit der „*Drosophila* Kinase/Phosphatase RNAi Sub-Library“ des DRSC durchgeführt, um die Einzelzell-Analyse in diesem Rahmen zu testen. Damit eine die gewonnenen Daten vergleichbar sind, wurde eine Z-Transformation durchgeführt (Abbildung 46). Dies war besonders notwendig, weil bei einem Teil der Platten die Färbung mit BODIPY deutlich schwächer ausfiel.

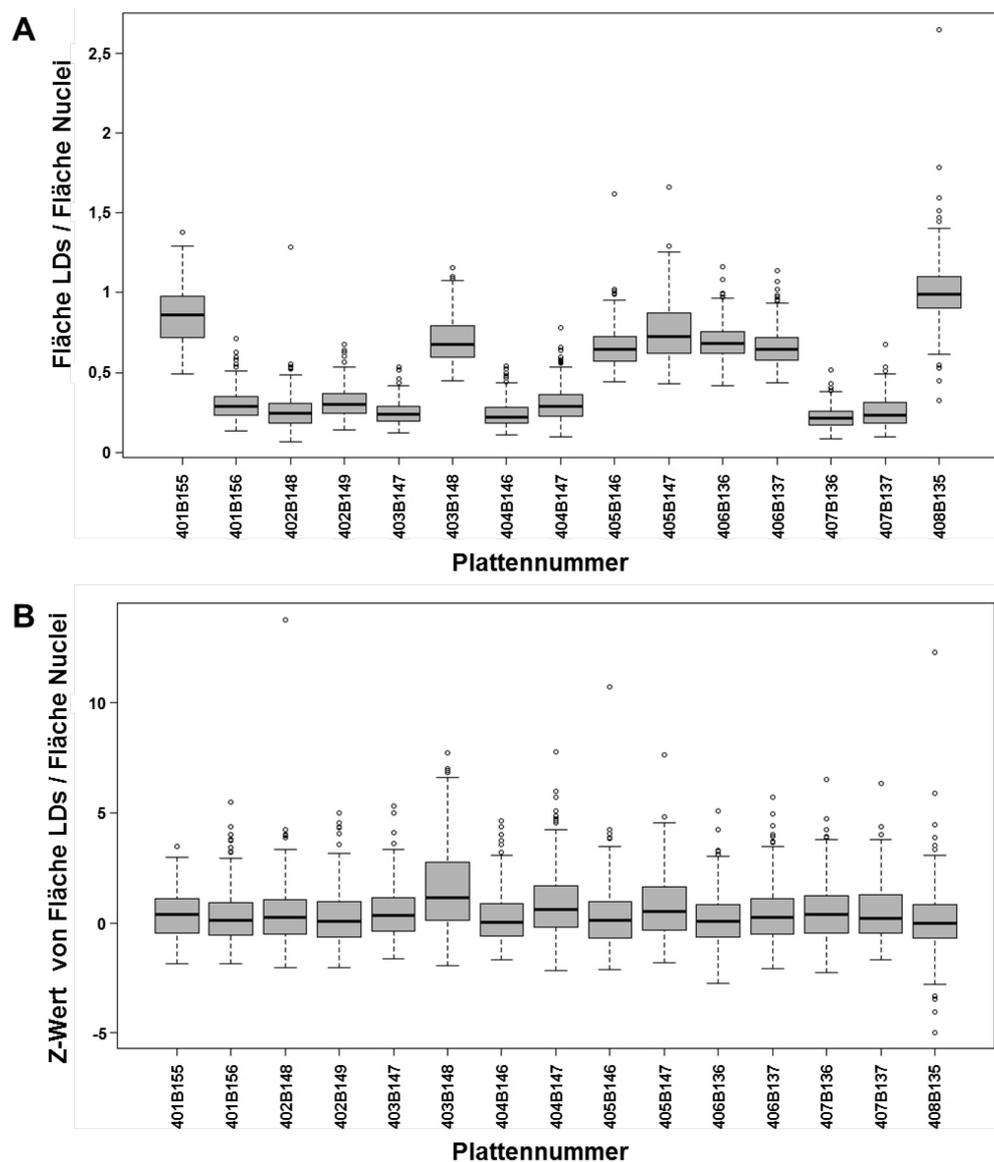


Abbildung 46: Normalisierung des RNAi-Screens in Bezug auf die Lipidspeicherung. Der Lipidgehalt der Zellen wurde anhand des Quotienten aus der Fläche von LDs und Nuclei bestimmt. (A-B) Boxplots der Lipidspeicherung vor (A) und nach (B) der Z-Transformation. Der Screen wurde als Duplikat durchgeführt. Replikate sind durch die ersten vier, identischen Stellen gekennzeichnet.

Mit Hilfe von Rangorder-Diagrammen (ein Beispiel ist in Abbildung 47 dargestellt) wurde kontrolliert, ob die Verteilung der Datenpunkte nach der Z-Transformation einen sigmoidalen Verlauf annimmt.

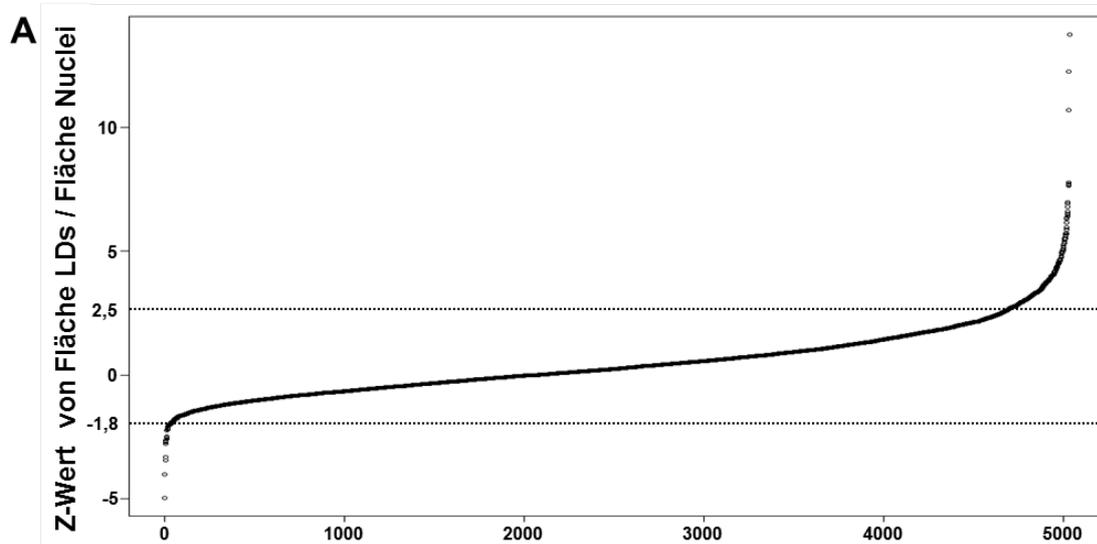


Abbildung 47: Rangorder-Diagramm nach aufsteigenden Z-Werten in Bezug auf die Lipidspeicherung. Z-Werte unterhalb von -1,8 galten als Treffer für eine verringerte Speicherung, Werte oberhalb von 2,5 für eine erhöhte Speicherung.

Die Analyse des RNAi-Screens erfolgte in Hinblick auf Phänotypen, die die Lipidspeicherung oder LD-Biologie betrafen wie z. B. Größe, Anzahl oder Aggregationen der LDs. Eine Auswahl der beobachteten Phänotypen ist in Abbildung 48 dargestellt.

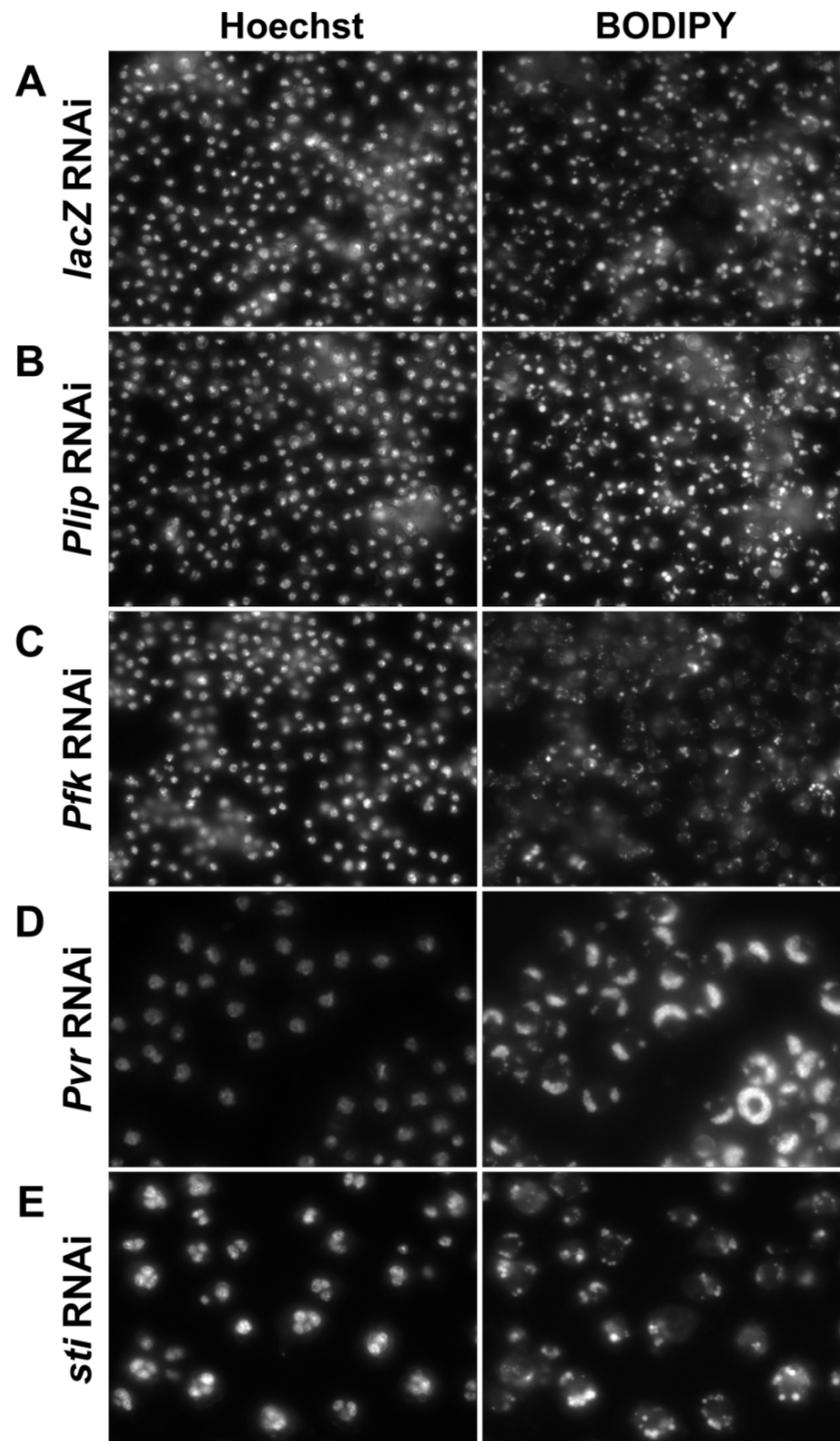


Abbildung 48: Beispiele für die verschiedenen beobachteten Phänotypen im RNAi-Screen. (A) Als Vergleich wurden Wells genommen, in denen keine RNAi stattfand, entweder durch die Abwesenheit von dsRNA oder durch eine dsRNA ohne Ziel (*lacZ*) in der Zelle. (B) RNAi gegen *PTEN-like phosphatase (Plip)* verursacht eine erhöhte Speicherung an TAG. (C) Im Gegensatz dazu wird durch Herunterregulierung der *Phosphofruktokinase (Pfk)* weniger TAG in den Zellen gespeichert. (D) Ein weiterer Phänotyp ist die Aggregation von LDs. Durch RNAi gegen *PDGF- and VEGF-receptor related (Pvr)* ballen sich die LDs zusammen und/oder Fusionen zu größeren LDs kommen seltener vor (Abgebildet ist ein vergrößerter Ausschnitt). (E) Ein Phänotyp, der nicht mit der LD-Biologie zusammenhängt, ist z. B. eine unvollständige Zellteilung nach der Mitose, wie sie nach der RNAi gegen *sticky (sti)* zu sehen ist.

In der Tabelle 14 sind die Gene aufgelistet, bei der durch RNAi-vermittelte Reduktion der Transkripte ein Phänotyp beobachtet wurde. Dabei sind zwei Gene ersichtlich, in denen eine Klassifizierung als Phänotyp nur anhand der zellbasierten Analyse erfolgen konnte. Des Weiteren kann man erkennen, dass die zellbasierte Analyse häufig eine feinstufigere Klassifizierung des Phänotyps erlaubt als die Analyse des kompletten Bilds.

Tabelle 14: RNAi-Screen Ergebnisse. Angegeben sind neben der Genbezeichnung der Enzym-Typ (K=Kinase, P=Phosphatase), der beobachtete Phänotyp bei der Analyse von Zellen des kompletten Wells oder Einzel-Zellanalyse, sowie die (mögliche) Funktion basierend auf den Daten von FlyBase (Pierre *et al.*, 2014).

Genbezeichnung	Typ	Phänotyp (komplett)	Phänotyp (Einzelne Zelle)	Funktion
Cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4)	K	Größe (erhöht)	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Regulation des Zellzyklus
Cyclin-dependent kinase 7 (Cdk7)	K	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (erhöht) Aggregation (verringert)	Regulation des Zellzyklus
Cyclin-dependent kinase 9 (Cdk9)	K	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (verringert) Anzahl (erhöht) Aggregation (verringert)	Regulation des Zellzyklus
CG17026	P	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (erhöht) Aggregation (erhöht)	Inositol-monophosphat 1-Phosphatase Aktivität
CG3530	P	Speicherung (verringert) Größe (verringert)	Speicherung (verringert) Anzahl (verringert) Aggregation (verringert)	Protein Tyrosin/Serin/Threonin-Phosphatase Aktivität; Myotubularin-ähnliche Phosphatase; Zellzyklus
CG3632	P	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (erhöht) Aggregation (verringert)	Protein Tyrosin/Serin/Threonin-Phosphatase Aktivität; Myotubularin-ähnliche Phosphatase
CG5026	P	Aggregation (verringert)	Speicherung (verringert) Anzahl (verringert) Aggregation (verringert)	Protein Tyrosine/Serine/Threonine-Phosphatase Aktivität; Myotubularin-ähnliche Phosphatase
CG6767	K	-	Speicherung (verringert)	Nukleotid-Biosynthese
CG7378	P	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (erhöht) Aggregation (verringert)	Protein Tyrosine/Serine/Threonine-Phosphatase Aktivität
CG9449	P	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht)	Speicherung (verringert) Aggregation (verringert)	Mitglied in der Histidin-Phosphatase Superfamily; Phagozytose
Glycogen binding subunit 76A (CG9619)	(P)	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl s (erhöht)	Protein Phosphatase Typ 1 Regulatoraktivität
casein kinase II α (CkIIalpha)	K	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl s (erhöht) Aggregation (erhöht)	Wnt-Signalweg
Casein kinase II β subunit (CkIIbeta)	K	Größe (erhöht)	Speicherung (erhöht) Aggregation (verringert)	Wnt-Signalweg; Regulation der α -Untereinheit
Cyclin B (CycB)	K	Größe (verringert)	Speicherung (verringert) Aggregation (verringert)	Regulation des Zellzyklus
Cyclin C (CycC)	K	Speicherung (verringert) Größe (verringert)	Speicherung (unklar) Anzahl (erhöht)	Regulation des Zellzyklus
Cyclin K (CycK)	K	Speicherung (verringert) Größe (verringert) Aggregation (verringert)	Speicherung (unklar) Anzahl (verringert) Aggregation (verringert)	Regulation des Zellzyklus
Cyclin T (CycT)	K	Speicherung (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl(erhöht)	Regulation des Zellzyklus
Fructose-1,6-Bisphosphatase (Fbp)	P	-	Anzahl(verringert) Aggregation (verringert)	GlukoseStoffwechsel
Hexokinase A (Hex-A)	K	Speicherung (unklar) Aggregation (verringert)	Speicherung (erhöht) Anzahl (verringert) Aggregation (verringert)	Zelluläre Glukose-Homeostasis Glykolyse
MAP kinase activated protein-kinase-2 (MAPk-Ak2)	K	Speicherung (erhöht)	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Regulation der JNK-Kaskade
Mekk1	K	Speicherung (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (unklar) Aggregation (verringert)	MAP Kinase Kinase Kinase Aktivität

Genbezeichnung	Typ	Phänotyp (komplett)	Phänotyp (Einzelne Zelle)	Funktion
Myotubularin (mtm)	P	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl(erhöht) Aggregation (verringert)	Myotubularin-ähnliche Phosphatase; Organisation des corticalen Aktin- Zytoskeletts; Enodzytose
microtubule star (mts)	(P)	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (erhöht) Aggregation (erhöht)	Protein Phosphatase Regulator- aktivität; Aktinfilament-Organisation; Centrosom-Organisation
Nipped-A	K	Speicherung (erhöht) Größe (verringert) Aggregation (erhöht)	Speicherung (verringert) Anzahl (erhöht) Aggregation (verringert)	Positiver Regulator des Notch- Signalweges
p38b	K	Speicherung (verringert) Größe (verringert)	Speicherung (erhöht) Anzahl (verringert) Aggregation (verringert)	MAP-Kinase Aktivität; Stressantwort
par-1	K	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (erhöht) Aggregation (unklar)	Tau-Kinaseaktivität; Achsenbestimmung in der Oozyte
Phosphofruktokinase (Pfk)	K	Speicherung (verringert) Größe (verringert) Aggregation (verringert)	Speicherung (verringert) Anzahl (verringert) Aggregation (unklar)	Geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse
Phosphoinositide- dependent kinase 1 (Pik61C)	K	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (erhöht) Aggregation (verringert)	Verhindert Apoptosis; im Insulin- Rezeptorsignalweg aktiv
PTEN-like phosphatase (Plip)	P	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Pphosphatidylinositol-4,5- Bisphosphate 5-Phosphatase Aktivität; Lipid-/Proteinphosphatase in Mitochondrien
Pomp, varicose (vari)	K (vari)	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Anzahl (erhöht)	Pomp: Proteasom Reifungsfaktor vari: Guanylatkinase-Aktivität; Tracheenentwicklung
Protein phosphatase 1 at 87B (Pp1-87B)	P	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (verringert)	Myosin Phosphatase-Aktivität; Trennung der Chromosomen während der Mitose
Protein phosphatase V (PpV)	P	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (unklar) Anzahl (erhöht)	Regulation des Zellzyklus
Protein tyrosine phosphatase- ERK/Enhancer of Ras 1 (PTP-ER)	P	Speicherung (erhöht) Größe (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (erhöht) Aggregation (erhöht)	Ras-Protein Signalweitergabe; Inaktivierung des MAP-Signalweges
Ptpmeg	P	Größe (verringert)	Speicherung (verringert) Anzahl (verringert) Aggregation (verringert)	Bindet am Zytoskelett; an der Autophagie beteiligt
PDGF- and VEGF- receptor related (Pvr)	(K)	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (unklar) Anzahl (erhöht) Aggregation (erhöht)	Beitrag "vascular endothelial growth factor-activated receptor activity" und ist über diesen Signalweg an einer Vielzahl an Zellfunktionen beteiligt;
Sphingosine kinase 1 (Sk1)	K	Speicherung (erhöht) Aggregation (erhöht)	Speicherung (erhöht) Anzahl (erhöht)	Sphingosine Kinase-Aktivität; Diacylglycerol-Kinaseaktivität
Sticky (sti)	K	Phänotyp Zelle: Mehrere Kerne in einer Zelle		Zellteilung nach erfolgter Mitose
Tousled-like kinase (tlk)	K	Speicherung (verringert) Aggregation (verringert)	Speicherung (erhöht) Anzahl (verringert) Aggregation (verringert)	Regulation des Zellzyklus

5.2 Struktur-Funktionsanalyse von *Drosophila* PERILIPIN 2

Bei der Generierung der chimären Proteine wurde die LDSP-Sequenz von CG2254 unter anderem direkt hinter die LDL-Sequenz von PERILIPIN 2 (PLIN2, Grönke *et al.*, 2003) gefügt (s. 3.8). Zur Bestimmung der LDL-Sequenz von PLIN2 wurde eine Struktur-Funktionsanalyse des Proteins durchgeführt. Die hergestellten Konstrukte basierten auf den Ergebnissen von Arrese *et al.* (2008), die mittels Circular dichroismus-Spektroskopie zwei α -Helices (aa69-85 und aa250-256) zum Binden an die LD-Membran identifiziert hatten. Zudem befindet sich die PAT-Domäne, definierend für die PERILIPIN-Proteinfamilie (Miura *et al.*, 2002), in den aa35-152 (Arrese *et al.*, 2008).

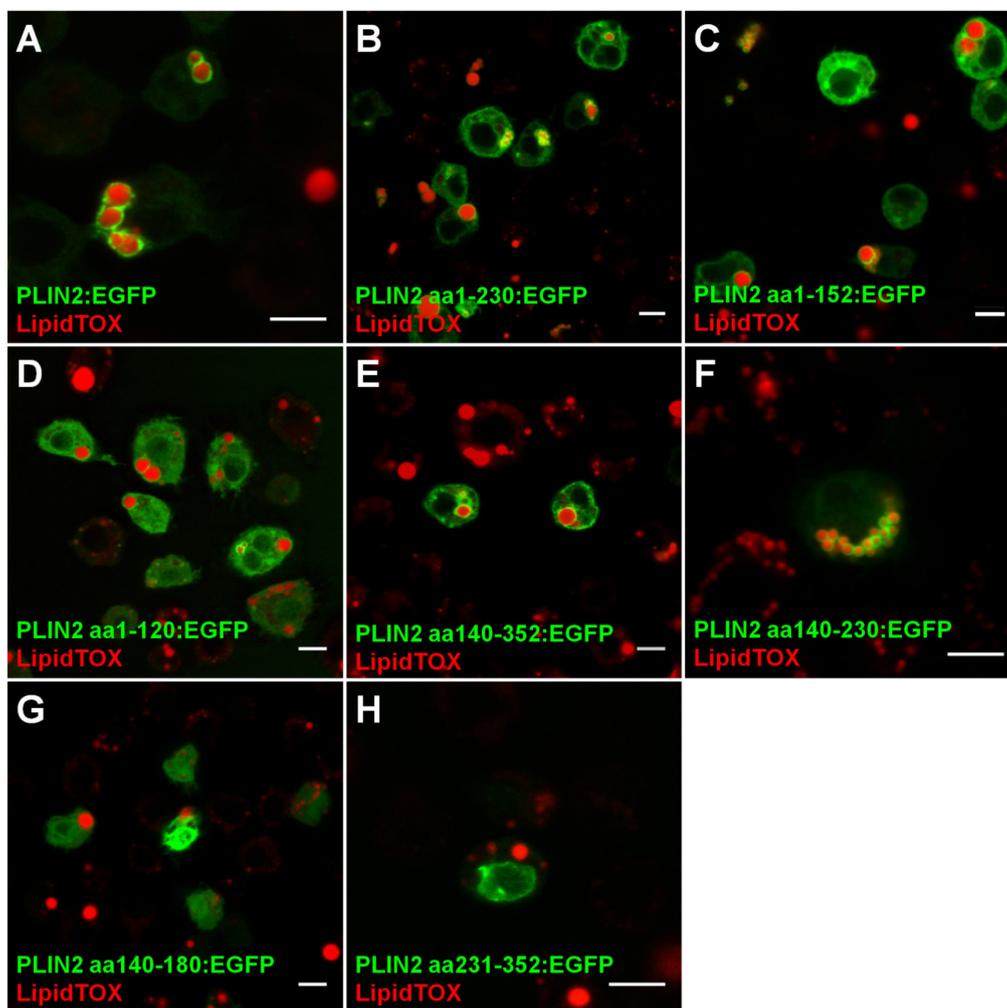


Abbildung 49: Struktur-Funktionsanalyse von PLIN2 zur Bestimmung der LDL-Sequenz(en). In Kc167-Zellen wurden Deletionskonstrukte von PLIN2 als EGFP-Fusion transient exprimiert und die Zellen mit 400 μ M OA behandelt. Die Gegenfärbung der LDs in den fixierten Zellen erfolgte mit HCS LipidTOX DeepRed. (A) Volllänge PLIN2 lokalisiert auf LDs. Bei einer Verkürzung auf die Aminosäuren (B) 1-230 und (C) 1-152 lokalisiert das Fusionsprotein weiterhin auf den LDs und damit enthält aa1-152 eine LDL-Sequenz. (D) Bei einem Konstrukt bestehend aus den Aminosäuren 1-120 findet die Lokalisation auf die LDs nur noch in einzelnen Zellen statt, sodass die LDL-Sequenz teilweise gestört ist. (E) Bei einer N-terminalen Verkürzung auf die Aminosäuren 140-352 lokalisiert das Fusionsprotein auf die LDs, (F) ebenso wie bei einer weiteren Verkürzung auf die Aminosäuren 140-230. (G-H) Weder die Aminosäuren 140-180 noch 231-352 sind ausreichend für die LD-Lokalisation. Damit hat PLIN2 eine zweite LDL-Sequenz im Bereich der Aminosäuren 180-230. Die Bilder zeigen Maximum Intensitätsprojektionen von Z-Stapeln, die mit einem Leica TCS SP2 aufgenommen wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m.

5.3 Ergänzende Daten zur *in vivo* Funktionsanalyse von CG2254

Der Abschnitt 3.9.2 beschreibt die *in vivo* Funktionsanalyse des CG2254 Proteins. Hier sind dazu weitere Kontrollversuche sowie die Daten der beiden RNAi-Linien VDRC 101149 und 5470 dargestellt.

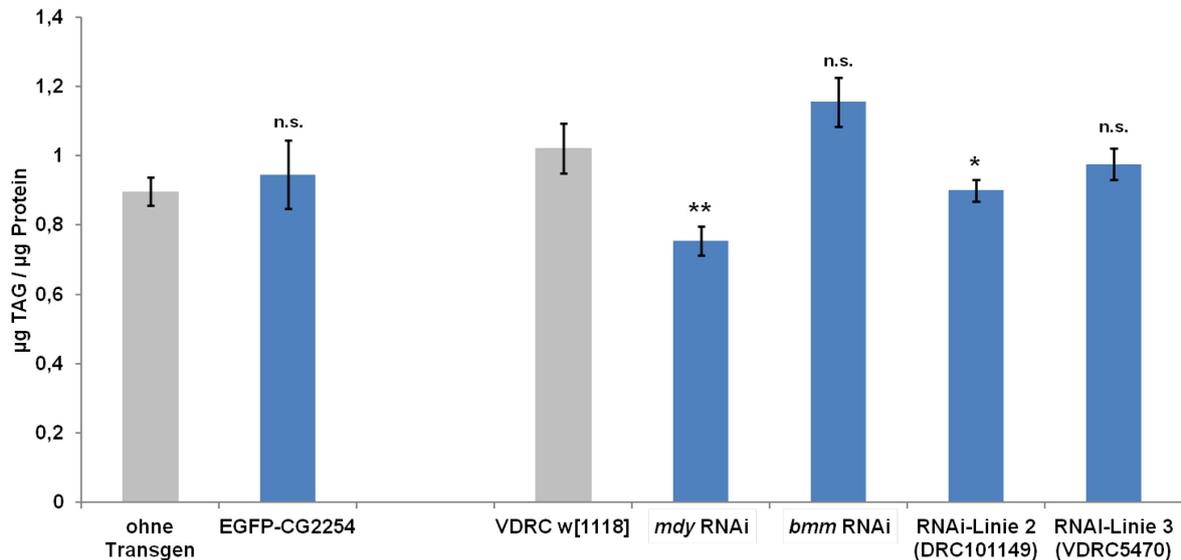


Abbildung 50: TAG-Messung bei veränderten CG2254 Proteinmengen im Fettkörper. Der TAG-Gehalt wurde wie unter 2.14.7 beschrieben bestimmt. Die Larven wurden bei 25 °C gehalten. Durch Kreuzungen mit einer Fettkörper-spezifischen Gal4-Aktivatorlinie wurde EGFP-CG2254 exprimiert bzw. *CG2254*, *midway* (*mdy*, Buszczak et al., 2002) und *brummer* (*bmm*, Grönke et al., 2005) mittels RNAi herunterreguliert. Durch die Überexpression von EGFP-CG2254 speichern die Larven nicht mehr TAG als die Larven ohne Transgen. Der TAG-Gehalt ist bei der RNAi-Linie 2 signifikant niedriger gegenüber der VDRC w[1118] Kontrolllinie, aber nicht so stark wie bei *mdy* RNAi, das eine der Kontrolle für eine reduzierte Speicherung ist. Bei der RNAi-Linie 3 und der Kontrolle für eine erhöhte Speicherung (*bmm* RNAi) lassen sich dagegen im Larvenstadium keine signifikanten Unterschiede feststellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

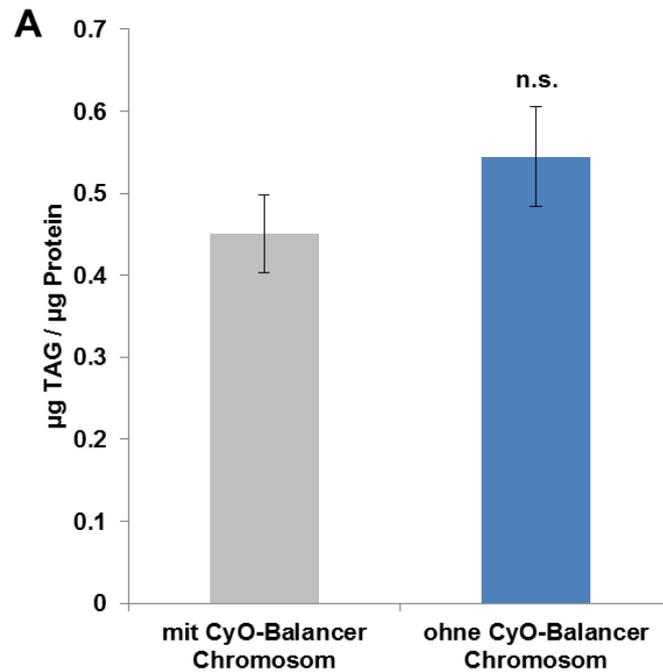


Abbildung 51: Einfluss des CyO-Balancierchromosoms auf den TAG-Gehalt. Um auszuschließen, dass das CyO-Balancierchromosom den TAG-Gehalt bei der Fliege beeinflusst und dadurch die bei der EGFP-Expression beobachtete Veränderung des TAG-Gehalts nur auf dem Balancierchromosoms beruht, wurde ein Kontrollexperiment ohne die Aktivierung des Gal4/UAS-Systems durchgeführt. Der TAG-Gehalt wurde wie unter 2.14.7 beschrieben bestimmt. Die adulten Tiere wurden bei 25 °C gehalten. Männchen stammen aus der Kreuzung der VDRC w[1118] Kontrolllinie mit der mittels des CyO-Balancierchromosoms heterozygoten UAS-EGFP-CG2254 Linie. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils vier Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung..

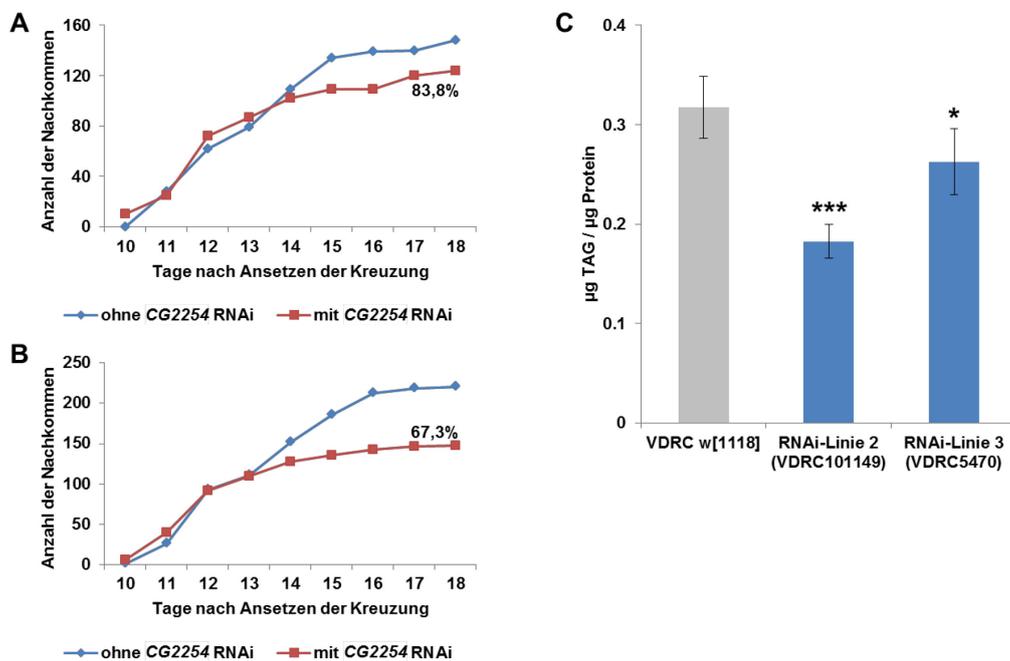


Abbildung 52: *In vivo* Ergebnisse bei Kreuzungen mit den CG2254 RNAi-Linien 2 und 3 und einer Fettkörper-spezifischen Gal4-Aktivatorlinie. (A und B) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung von homozygoter (A) CG2254 RNAi-Linie 2 und (B) CG2254 RNAi-Linie 3 mit mittels eines Balancierchromosoms heterozygot verwendeten Fettkörper-Gal4-Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 25 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus zwei parallelen Ansätzen. (C) Bestimmung des TAG-Gehalts wie in Abbildung 36 beschrieben. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils sechs Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

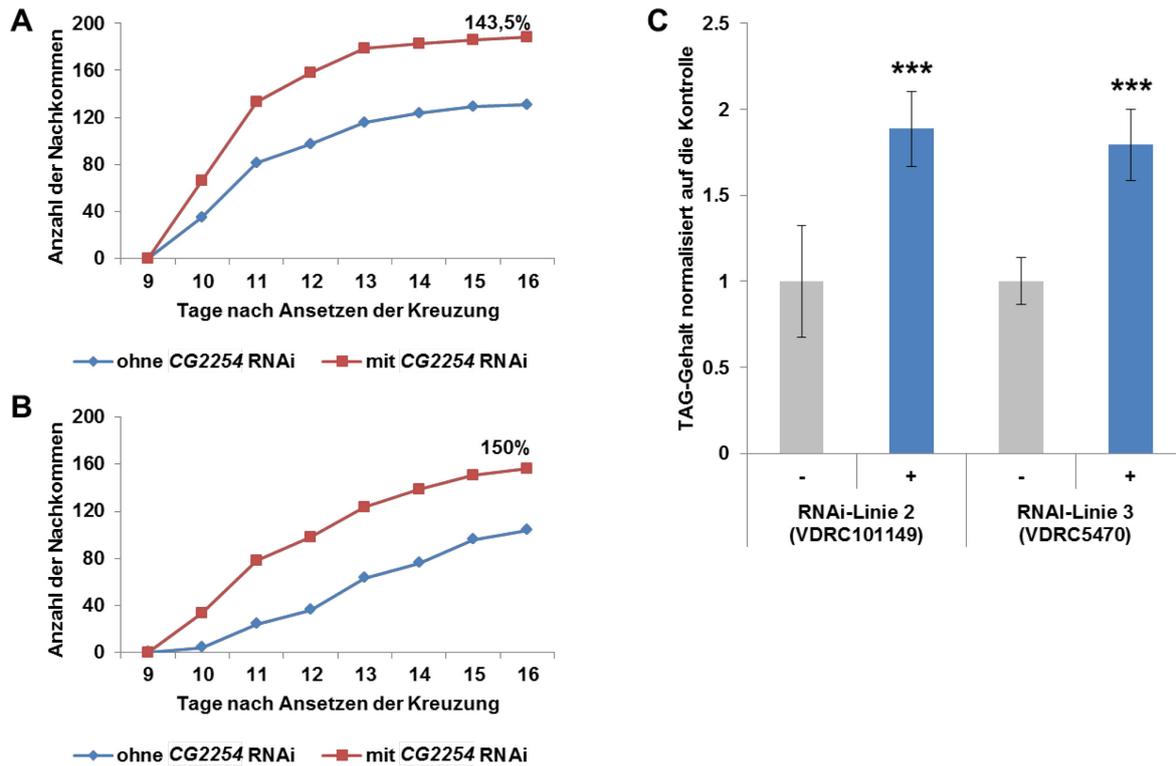


Abbildung 53: *In vivo* Ergebnisse bei Kreuzungen mit den *CG2254* RNAi-Linien 2 und 3 und einer Gal4-Aktivatorlinie mit Aktivierung in der kompletten Ringdrüse. (A und B) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung von homozygoter (A) *CG2254* RNAi-Linie 2 und (B) *CG2254* RNAi-Linie 3 mit heterozygoter 2-286 Gal4-Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 29 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus drei parallelen Ansätzen. (C) Bestimmung des TAG-Gehalt wie unter Abbildung 37 beschrieben. Männchen stammen aus der Kreuzung mit den beiden *CG2254* RNAi-Linien und heterozygoten 2-286-GAL4. Normalisierung auf den TAG-Gehalt der Kontrollfliegen mit Balancierchromosom. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils sechs Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

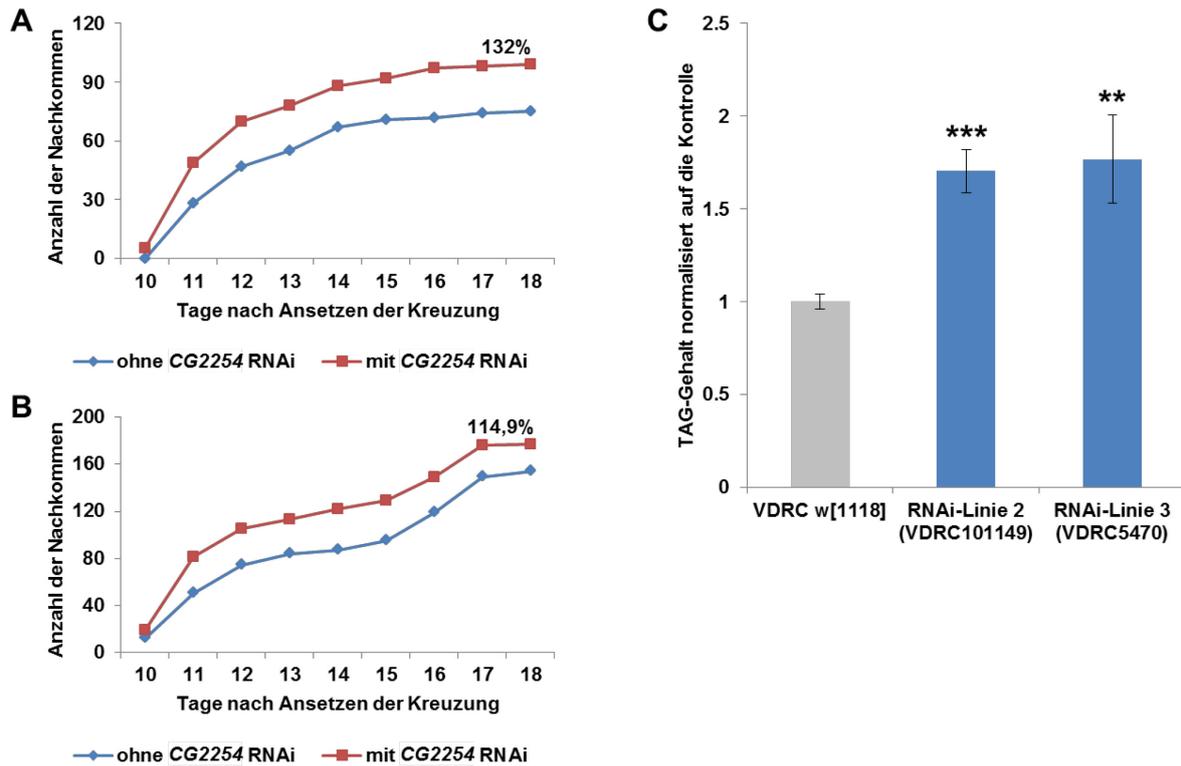


Abbildung 54: *In vivo* Ergebnisse bei Kreuzungen mit den *CG2254* RNAi-Linien 2 und 3 und einer Gal4-Aktivatorlinie mit Aktivierung im CA und der PTG. (A und B) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung von homozygoter (A) *CG2254* RNAi-Linie 2 und (B) *CG2254* RNAi-Linie 3 mit der mittels eines Balancierchromosoms heterozygot verwendeten Feb36-Gal4-Aktivatorlinie. Nach fünftägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 25 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus zwei parallelen Ansätzen. (C) Bestimmung des TAG-Gehalts wie unter Abbildung 38D beschrieben. Die Normalisierung der Werte erfolgte auf den TAG-Gehalt der VDRC w[1118] Kontrolllinie. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils vier Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

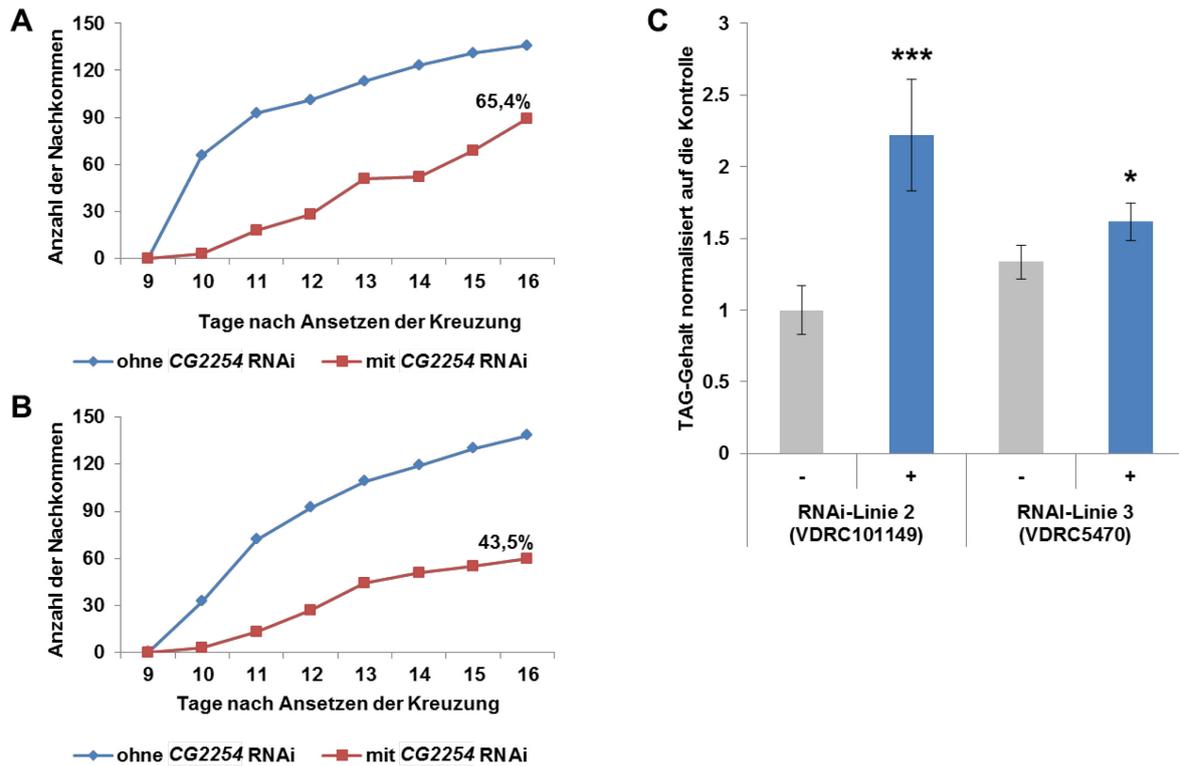


Abbildung 55: *In vivo* Ergebnisse bei Kreuzungen mit den *CG2254* RNAi-Linien 2 und 3 und einer Gal4-Aktivatorlinie mit Aktivierung im CA (A und B) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung von homozygoter (A) *CG2254* RNAi-Linie 2 und (B) *CG2254* RNAi-Linie 3 mit heterozygoter Di-11 Gal4-Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 29 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus drei parallelen Ansätzen. (C) Bestimmung des TAG-Gehalts wie unter Abbildung 39B beschrieben. Männchen stammen aus den Kreuzungen mit den RNAi-Linien und heterozygoter Di-11. Die Normalisierung erfolgte auf den TAG-Gehalt der Kontrollfliegen mit Balancierchromosom.

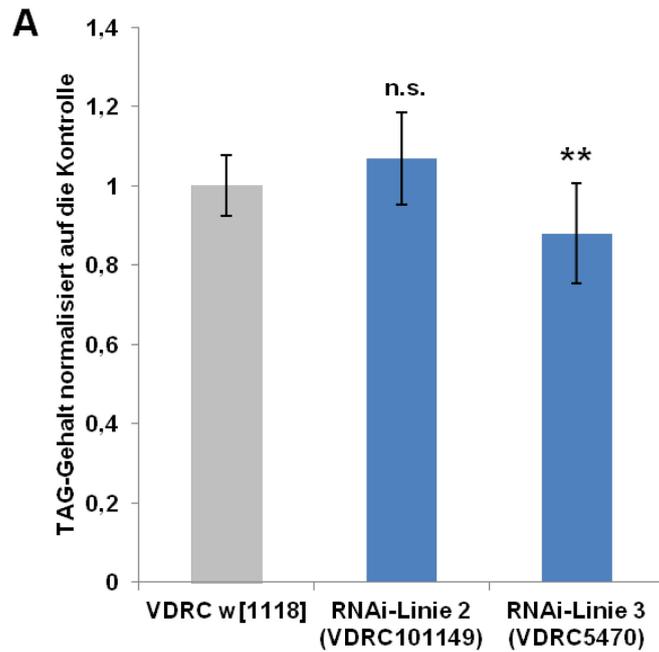


Abbildung 56: TAG-Bestimmung bei verringerter CG2254 Menge im adulten CA. (A) Bestimmung des TAG-Gehalts wie unter Abbildung 40 beschrieben. Männchen stammen aus den Kreuzungen von Di-3 mit den RNAi-Linien 2, 3 und der VDRC w[1118]-Kontrolllinie. Dargestellt werden die Mittelwerte aus drei parallelen Kreuzungen mit jeweils vier bis sechs Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung. Die Normalisierung erfolgte auf den TAG-Gehalt der Fliegen aus der Kreuzung mit der VDRC w[1118]-Kontrolllinie.

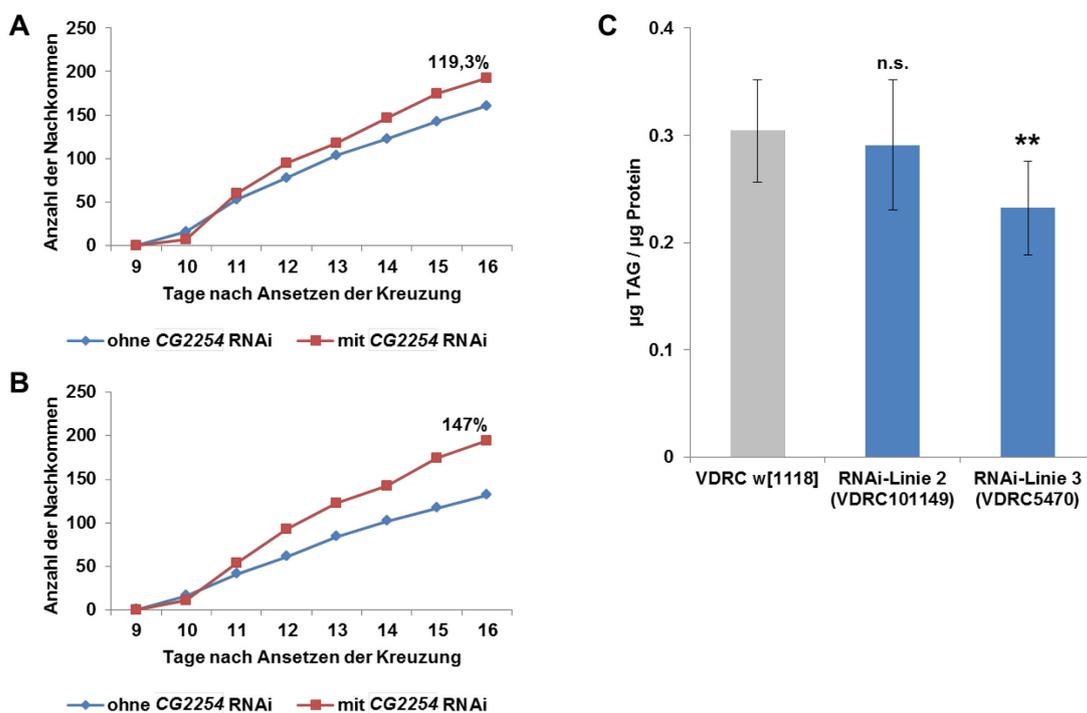


Abbildung 57: In vivo Ergebnisse bei Kreuzungen mit den CG2254 RNAi-Linien 2 und 3 und einer darmspezifischen Gal4-Aktivatorlinie. (A und B) Test auf Letalität wie unter 2.9.1 beschrieben. Kreuzung von homozygoter (A) *CG2254* RNAi-Linie 2 und (B) *CG2254* RNAi-Linie 3 mit der mittels eines Balancierchromosoms heterozygot verwendeten NPC1b-Gal4-Aktivatorlinie. Nach dreitägiger Eiablage erfolgte die Entwicklung bei 29 °C. Dargestellt ist die Summe der Nachkommen aus drei parallelen Ansätzen. (C) Bestimmung des TAG-Gehalts wie in Abbildung 43 beschrieben. *CG2254* RNAi mit der RNA-Linie 3 führt zu einer signifikanten Reduktion des gespeicherten TAG gegenüber den VDRC w[1118] Kontrollfliegen, während mit der RNAi-Linie 2 keine signifikanten Unterschiede gemessen wurden. Dargestellt werden die Mittelwerte von jeweils vier Datenpunkten mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

6 Zusammenfassung

Neutralfette sind aufgrund ihrer hohen Energiedichte die wichtigste Energiespeicherform vielzelliger Organismen. Auf zellulärer Ebene erfolgt die Fettspeicherung in Lipidtröpfchen (engl. *lipid droplets*, LDs). Erst in den vergangenen Jahren wurden LDs als dynamische, zytoplasmatische Organellen anerkannt. Neben der Energieversorgung werden LDs und die darin gespeicherten Fette für vielfältige Aufgaben verwendet. Die Funktion der LDs hängt dabei maßgeblich von den mit ihnen assoziierten Proteinen ab. Während LD-assoziierte Proteine in der Regel auf allen LDs lokalisieren, konnten auch Proteine identifiziert werden, die sich nur auf LD-Subpopulationen befinden. Wie diese Proteine eine solche differenzielle Lokalisation erreichen, und wodurch sich LD-Subpopulationen auszeichnen, ist noch ungeklärt.

Um diese Fragen zu beantworten, wurde in dieser Arbeit die auf LD-Subpopulationen lokalisierte Dehydrogenase/Reduktase CG2254 aus *Drosophila melanogaster* charakterisiert. Lokalisationsstudien mit CG2254 und verwandten Proteinen aus anderen Spezies zeigten, dass LD-Subpopulationen evolutionär konserviert und verbreiteter als bisher angenommen sind. Die durch CG2254-markierten LD-Subpopulationen konnten als anabolisch aktive LDs klassifiziert werden. Mittels einer Struktur-Funktionsanalyse wurden in der CG2254 Primärsequenz zwei getrennte Bereiche identifiziert: einerseits ein Bereich für die Lokalisation auf LDs allgemein und andererseits ein Bereich für die Beschränkung auf LD-Subpopulationen.

Um die Bedeutung der LD-Subpopulationen im Organismus zu untersuchen, wurde CG2254 auch *in vivo* studiert. Mit der Lokalisationsanalyse des endogenen CG2254-Proteins konnten erstmals LD-Subpopulationen im Organismus nachgewiesen werden. Die CG2254-Funktion wurde durch gewebespezifische Veränderungen der Proteinmenge mittels des GAL4/UAS-Systems untersucht. Im Darm stellte sich CG2254 als bedeutend für die Fettspeicherung heraus, während die Überexpression von CG2254 im Fettkörper Letalität im Puppenstadium verursachte. In der neurosekretorischen Ringdrüse beeinflusste CG2254 sowohl die Fettspeicherung als auch die Vitalität während der larvalen Entwicklung, was auf eine Beteiligung von CG2254 an verschiedenen regulatorischen Prozessen hindeutet.

Wie die Fettspeicherung in LDs auf zellulärer Ebene gesteuert wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Mit den durchgeführten Analysen konnten wichtige Erkenntnisse über LD-Subpopulationen gewonnen, sowie die Werkzeuge generiert werden, um diese genauer zu untersuchen. Damit ist eine Grundlage gelegt, um in weiterführenden Studien ein besseres Verständnis der zellulären Fettspeicherung von *Drosophila* und anderen Organismen zu erhalten.

Summary

Multicellular organisms store energy mainly in the form of neutral lipids. On the cellular level, this storage occurs in lipid droplets (LD). Only recently, LDs were acknowledged as dynamic, cytoplasmic organelles. Besides their function in supplying energy, LDs and the lipids stored by them are used for various cellular tasks, which highly depend on the proteins associated with the LD-surface. Most of the known LD-associated proteins localise to all LDs, but a growing number of proteins has been identified which target only to LD-subsets. It is yet unknown, how these proteins achieve a differential localisation and which functions LD-subsets have.

Here, the LD-subset targeting annotated short-chain dehydrogenase/reductase CG2254 from *Drosophila melanogaster* was characterised to answer these questions. CG2254 and related proteins from *Mus musculus* showed an evolutionary conserved localisation to LD-subsets in mammalian and fly tissue culture cells. LDs labelled by CG2254 localisation turned out to be anabolically active. Using structure-function analyses, two distinct targeting motifs within the CG2254 primary sequence could be identified: on the one hand a sequence necessary for the localisation to all LDs, and on the other hand a sequence for the limitation of the localisation to LD-subsets.

To gain knowledge about the role of LD-subsets for the organism, CG2254 was also studied *in vivo*. Endogenous CG2254 protein localises to LD-subsets, hence confirming the existence of LD-subsets in organisms for the first time. By Gal4/UAS-mediated knockdown and overexpression studies the function of CG2254 was investigated in the fat body, the gut and the neurosecretory ring gland. Overexpression of an EGFP-tagged CG2254 transgene in the fat body caused lethality in the pupal stage, whereas overexpression in the gut led to an increased storage of lipids. In the ring gland, CG2254 gain-of- and loss-of-function influenced both the viability during development as well as the fat storage, indicating a regulatory role of CG2254 in multiple processes.

It is still not fully understood how the fat storage on the cellular level is controlled. The findings of this work provide an important contribution to the knowledge about LD-subsets and the tools for further investigation. This will help to gain a deeper insight into the mechanisms of cellular fat storage in *Drosophila* as well as in other organisms.

7 Abkürzungsverzeichnis

17 β -HSD11	„17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 11“
20E	20-Hydroxyecdysone
aa	Aminosäure(n)
AAM-B	„S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase, Klasse I“
Adh	„Alkohol Dehydrogenase“
AgRP	„Agouti-related peptide“
AGPAT	„sn-1-Acylglycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase“
AKH	„Adipokinetic Hormone“
ATGL	„Adipose Triglyceride Lipase“
AUP1	„Ancient ubiquitous protein 1“
Bmm	„Brummer“
BCA	Bicinchoninsäure, engl. <i>bicinchoninic acid</i>
BSA	Rinderserumalbumin, engl. <i>bovine serum albumine</i>
C-	Carboxy-
CA	<i>corpus allatum</i> , Teil der Ringdrüse
Cav3 ^{DGV}	Negativ-dominante Caveolin 3 Mutante
CC	<i>corpus cardiacum</i> , Teil der Ringdrüse
CCT	„Cytidine triphosphate:phosphocholine cytidyltransferase“
COPI	„Coat Protein Complex I“
CyO	„Curly of Oster“
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGAT	„Diacylglycerol-O-Acyltransferase“
DHRS3	„Dehydrogenase/reductase (SDR Family) Member 3“
DHS-4	„DeHydrogenases, Short chain 4“
DIG	Digoxigenin
DILPs	„ <i>Drosophila</i> insulin-like peptides“

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
(E)GFP	(Verbessertes) grün fluoreszierendes Protein, engl. <i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, engl. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, engl. <i>Ethylene glycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERD-2	„Epidermal Retinol Dehydrogenase 2-like“
EST	engl. <i>expressed sequence tag</i>
Fsp27	„fat-specific protein p27“
G0S2	„G0/G1 Switch Protein 2“
GPAT	„Glycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. <i>horse raddish peroxidase</i>
HSL	„Hormonsensitive Lipase“
I.U.	engl. <i>International Units</i>
IPC	Insulin-produzierenden Zellen, engl. <i>Insulin-producing cells</i>
JH	Juvenilhormon
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LD	Lipidtröpfchen, engl. <i>lipid droplet</i>
LDL-Sequenz	Sequenz für die <i>lipid droplet</i> Lokalisation
LDSP-Sequenz	Sequenz für die Lokalisation auf <i>lipid droplet</i> Subpopulationen
<i>mdy</i>	„ <i>midway</i> “
MG-132	Carbobenzoxyl-leucinyl-leucinyl-leucinal-H
N-	Amino-
NAD(P)	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NPC	„Niemann-Pick type C“
NPF	„Neuropeptid F“

n.s.	nicht signifikant
OA	Ölsäure, engl. <i>oleic acid</i>
ORP2	„Oxysterol binding protein-related protein 2“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
PLIN	„Perilipin“
POMC	„pro-opiomelanocortin“
PPH-1	„Phosphatidat-Phosphatase 1“
PTG	Prothorakaldrüse, engl. <i>prothoracic gland</i> , Teil der Ringdrüse
RDH10	„Retinol Dehydrogenase 10“
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rounds per minute</i>
s.	siehe
<i>sc</i>	„ <i>scute</i> “
SDR	kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase, engl. <i>Short-chain dehydrogenase/reductase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Ser</i>	„ <i>Serrate</i> “
sNPF	„short Neuropeptide F“
SE	Sterolester
SSC	Kochsalz-Natriumcitrat, engl. <i>saline sodium citrate</i>
TAG	Triacylglycerol
<i>th</i>	„ <i>thread</i> “
TMD	Transmembran-Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UAS	engl. <i>Upstream Activating Sequence</i>
UBXD-8	„Ubiquitin X Domäne enthaltenes Protein 8“
Upd2	„Unpaired2“
<i>v</i>	„ <i>vermilion</i> “
<i>w</i>	„ <i>white</i> “
<i>y</i>	„ <i>yellow</i> “
z. B.	zum Beispiel

8 Literaturverzeichnis

- Abell, B. M., Holbrook, L. A., Abenes, M., Murphy, D. J., Hills, M. J. und Moloney, M. M.** (1997). "Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting." *Plant Cell* 9(8): 1481-1493.
- Almahbobi, G., Williams, L. J., Han, X.-G. und Hall, P. F.** (1993). "Binding of lipid droplets and mitochondria to intermediate filaments in rat Leydig cells." *Journal of Reproduction and Fertility* 98(1): 209-217.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990). "Basic local alignment search tool." *Journal of molecular biology* 215(3): 403-410.
- Arighi, C. N., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R. und Bonifacino, J. S.** (2004). "Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor." *J Cell Biol* 165(1): 123-133.
- Arrese, E. L., Rivera, L., Hamada, M. und Soulages, J. L.** (2008). "Purification and characterization of recombinant lipid storage protein-2 from *Drosophila melanogaster*." *Protein and peptide letters* 15(9): 1027.
- Arrese, E. L. und Soulages, J. L.** (2010). "Insect fat body: energy, metabolism, and regulation." *Annu Rev Entomol* 55: 207.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila. A laboratory handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S. D. und Daum, G.** (1999). "Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Bacteriology* 181(20): 6441-6448.
- Bakker, K.** (1959). "Feeding period, growth, and pupation in larvae of *Drosophila melanogaster*." *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2(3): 171-186.
- Bartz, R., Zehmer, J. K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y. und Liu, P.** (2007). "Dynamic Activity of Lipid Droplets: Protein Phosphorylation and GTP-Mediated Protein Translocation." *Journal of Proteome Research* 6(8): 3256-3265.
- Beadle, G., Tatum, E. L. und Clancy, C.** (1938). "Food level in relation to rate of development and eye pigmentation in *Drosophila melanogaster*." *The Biological Bulletin* 75(3): 447-462.
- Beilstein, F., Bouchoux, J., Rousset, M. und Demignot, S.** (2013). "Proteomic analysis of lipid droplets from Caco-2/TC7 enterocytes identifies novel modulators of lipid secretion." *PLoS One* 8(1): e53017.
- Belgacem, Y. H. und Martin, J.-R.** (2007). "Hmgcr in the *Corpus Allatum* Controls Sexual Dimorphism of Locomotor Activity and Body Size via the Insulin Pathway in *Drosophila*." *PLoS One* 2(1): e187.

- Beller, M.** (2005). "Identification and characterization of *Drosophila* lipid droplet-associated proteins". Doctoral Thesis, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Beller, M., Bulankina, A. V., Hsiao, H.-H., Urlaub, H., Jäckle, H. und Kühnlein, R. P.** (2010a). "PERILIPIN-Dependent Control of Lipid Droplet Structure and Fat Storage in *Drosophila*." *Cell Metab* 12(5): 521-532.
- Beller, M., Riedel, D., Jänsch, L., Dieterich, G., Wehland, J., Jäckle, H. und Kühnlein, R. P.** (2006). "Characterization of the *Drosophila* Lipid Droplet Subproteome." *Molecular & Cellular Proteomics* 5(6): 1082-1094.
- Beller, M., Sztalryd, C., Southall, N., Bell, M., Jäckle, H., Auld, D. S. und Oliver, B.** (2008). "COPI complex is a regulator of lipid homeostasis." *PLoS Biol* 6(11): e292.
- Beller, M., Thiel, K., Thul, P. J. und Jäckle, H.** (2010b). "Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus." *FEBS Lett* 584(11): 2176-2182.
- Belles, X., Martin, D. und Piulachs, M. D.** (2005). "The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects." *Annu Rev Entomol* 50: 181-199.
- Biondi, B.** (2010). "Thyroid and obesity: an intriguing relationship." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95(8): 3614-3617.
- Blaner, W. S., O'Byrne, S. M., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D'Ambrosio, D. M., Jiang, H., Schwabe, R. F., Hillman, E. M. C., Piantedosi, R. und Libien, J.** (2009). "Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791(6): 467-473.
- Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118(2): 401-415.
- Brasaemle, D. L., Dolios, G., Shapiro, L. und Wang, R.** (2004). "Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes." *Journal of Biological Chemistry* 279(45): 46835-46842.
- Brereton, P., Suzuki, T., Sasano, H., Li, K., Duarte, C., Obeyesekere, V., Haeseleer, F., Palczewski, K., Smith, I., Komesaroff, P. und Krozowski, Z.** (2001). "Pan1b (17 β HSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung." *Mol Cell Endocrinol* 171(1-2): 111-117.
- Buhman, K. K., Chen, H. C. und Farese, R. V.** (2001). "The enzymes of neutral lipid synthesis." *Journal of Biological Chemistry* 276(44): 40369-40372.
- Buszczak, M., Lu, X., Segraves, W. A., Chang, T. Y. und Cooley, L.** (2002). "Mutations in the midway gene disrupt a *Drosophila* acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase." *Genetics* 160(4): 1511-1518.
- Cadwell, K. und Coscoy, L.** (2005). "Ubiquitination on Nonlysine Residues by a Viral E3 Ubiquitin Ligase." *Science* 309(5731): 127-130.

- Calero, M., Chen, C. Z., Zhu, W., Winand, N., Havas, K. A., Gilbert, P. M., Burd, C. G. und Collins, R. N.** (2003). "Dual Prenylation Is Required for Rab Protein Localization and Function." *Molecular Biology of the Cell* 14(5): 1852-1867.
- Cammarato, A., Ahrens, C. H., Alayari, N. N., Qeli, E., Rucker, J., Reedy, M. C., Zmasek, C. M., Gucek, M., Cole, R. N., Van Eyk, J. E., Bodmer, R., O'Rourke, B., Bernstein, S. I. und Foster, D. B.** (2011). "A Mighty Small Heart: The Cardiac Proteome of Adult *Drosophila melanogaster*." *PLoS One* 6(4): e18497.
- Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Karnas, K. J., Pennington, J. E. und Wells, M. A.** (2001). "Fat metabolism in insects." *Annual review of nutrition* 21(1): 23-46.
- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., Golland, P. und Sabatini, D. M.** (2006). "CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes." *Genome Biol* 7(10): R100.
- Carvalho, M., Schwudke, D., Sampaio, J. L., Palm, W., Riezman, I., Dey, G., Gupta, G. D., Mayor, S., Riezman, H., Shevchenko, A., Kurzchalia, T. V. und Eaton, S.** (2010). "Survival strategies of a sterol auxotroph." *Development* 137(21): 3675-3685.
- Cermelli, S., Guo, Y., Gross, S. P. und Welte, M. A.** (2006). "The Lipid-Droplet Proteome Reveals that Droplets Are a Protein-Storage Depot." *Current Biology* 16(18): 1783-1795.
- Cherbas, L., Willingham, A., Zhang, D., Yang, L., Zou, Y., Eads, B. D., Carlson, J. W., Landolin, J. M., Kapranov, P., Dumais, J., Samsonova, A., Choi, J. H., Roberts, J., Davis, C. A., Tang, H., van Baren, M. J., Ghosh, S., Dobin, A., Bell, K., Lin, W., Langton, L., Duff, M. O., Tenney, A. E., Zaleski, C., Brent, M. R., Hoskins, R. A., Kaufman, T. C., Andrews, J., Graveley, B. R., Perrimon, N., Celniker, S. E., Gingeras, T. R. und Cherbas, P.** (2011). "The transcriptional diversity of 25 *Drosophila* cell lines." *Genome Res* 21(2): 301-314.
- Chintapalli, V. R., Wang, J., Herzyk, P. und Dow, J. A. T.** (2010). *FlyAtlas: survey of adult and larval expression*.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J. und Léopold, P.** (2003). "A Nutrient Sensor Mechanism Controls *Drosophila* Growth." *Cell* 114(6): 739-749.
- Dai, J.-d. und Gilbert, L. I.** (1991). "Metamorphosis of the corpus allatum and degeneration of the prothoracic glands during the larval-pupal-adult transformation of *Drosophila melanogaster*: A cytophysiological analysis of the ring gland." *Developmental biology* 144(2): 309-326.
- Dai, J.-d., Henrich, V. C. und Gilbert, L. I.** (1991). "An ultrastructural analysis of the ecdysoneless ((l(3)ecd 1ts) ring gland during the third larval instar of *Drosophila melanogaster*." *Cell and Tissue Research* 265(3): 435-445.
- de Jesus, A. J. und Allen, T. W.** (2013). "The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch." *Biochim Biophys Acta* 1828(2): 864-876.

- De Moed, G., Kruitwagen, C., De Jong, G. und Scharloo, W.** (1999). "Critical weight for the induction of pupariation in *Drosophila melanogaster*: genetic and environmental variation." *Journal of Evolutionary Biology* 12(5): 852-858.
- Deisenroth, C., Itahana, Y., Tollini, L., Jin, A. und Zhang, Y.** (2011). "p53-Inducible DHRS3 is an endoplasmic reticulum protein associated with lipid droplet accumulation." *J Biol Chem* 286(32): 28343-28356.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V. und Lescot, M.** (2008). "Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist." *Nucleic acids research* 36(suppl 2): W465-W469.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K. und Dickson, B. J.** (2007). "A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*." *Nature* 448(7150): 151-156.
- Ding, Y., Wu, Y., Zeng, R. und Liao, K.** (2012). "Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse." *Acta biochimica et biophysica Sinica* 44(5): 394-406.
- Druce, M. und Bloom, S. R.** (2006). "The regulation of appetite." *Archives of Disease in Childhood* 91(2): 183-187.
- Echalier, G. und Ohanessian, A.** (1969). "Isolement, en cultures in vitro, de lignis cellulides diploides de *Drosophila melanogaster*." *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 268(13): 1771-1773.
- Edgar, B. A.** (2006). "How flies get their size: genetics meets physiology." *Nat Rev Genet* 7(12): 907-916.
- Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jornvall, H. und Oppermann, U.** (2002). "Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases." *J Biol Chem* 277(28): 25677-25684.
- Flatt, T., Tu, M. P. und Tatar, M.** (2005). "Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history." *Bioessays* 27(10): 999-1010.
- Friedman, J. M.** (2009). "Leptin at 14 y of age: an ongoing story." *The American journal of clinical nutrition* 89(3): 973S-979S.
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Sakai, J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S. und Takano, T.** (2004). "Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1644(1): 47-59.
- Garcia, A., Sekowski, A., Subramanian, V. und Brasaemle, D. L.** (2003). "The Central Domain Is Required to Target and Anchor Perilipin A to Lipid Droplets." *Journal of Biological Chemistry* 278(1): 625-635.

- Garnier, J., Gibrat, J., Robson, B. und Doolittle, R.** (1996). "GOR secondary structure prediction method version IV." *Methods Enzymol* 266: 540-553.
- Gaush, C. R., Hard, W. L. und Smith, T. F.** (1966). "Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK)." *Proc Soc Exp Biol Med* 122(3): 931-935.
- Gelbart, W. M. und Emmert, D. B.** (2013). FlyBase High Throughput Expression Pattern Data.
- Géminard, C., Arquier, N., Layalle, S., Bourouis, M., Slaidina, M., Delanoue, R., Bjordal, M., Ohanna, M., Ma, M. und Colombani, J.** (2006). "Control of metabolism and growth through insulin-like peptides in *Drosophila*." *Diabetes* 55(Supplement 2): S5-S8.
- Gluzman, Y.** (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell* 23(1): 175-182.
- Gong, J., Sun, Z., Wu, L., Xu, W., Schieber, N., Xu, D., Shui, G., Yang, H., Parton, R. G. und Li, P.** (2011). "Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites." *J Cell Biol* 195(6): 953-963.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R.** (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Graveley, B. R., May, G., Brooks, A. N., Carlson, J. W., Cherbas, L., Davis, C. A., Duff, M., Eads, B., Landolin, J., Sandler, J., Wan, K. H., Andrews, J., Brenner, S. E., Cherbas, P., Gingeras, T. R., Hoskins, R., Kaufman, T. und Celniker, S. E.** (2011). The *D. melanogaster* transcriptome: modENCODE RNA-Seq data for dissected tissues.
- Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Garty, N. B., Blanchette-Mackie, E. und Londos, C.** (1991). "Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets." *Journal of Biological Chemistry* 266(17): 11341-11346.
- Grönke, S., Beller, M., Fellert, S., Ramakrishnan, H., Jäckle, H. und Kühnlein, R. P.** (2003). "Control of Fat Storage by a *Drosophila* PAT Domain Protein." *Current Biology* 13(7): 603-606.
- Grönke, S., Mildner, A., Fellert, S., Tennagels, N., Petry, S., Müller, G., Jäckle, H. und Kühnlein, R. P.** (2005). "Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*." *Cell Metab* 1(5): 323-330.
- Gutierrez, E., Wiggins, D., Fielding, B. und Gould, A. P.** (2007). "Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism." *Nature* 445(7125): 275-280.
- Haeseleer, F., Huang, J., Lebioda, L., Saari, J. C. und Palczewski, K.** (1998). "Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal." *Journal of Biological Chemistry* 273(34): 21790-21799.

- Hammock, B., Nowock, J., Goodman, W., Stamoudis, V. und Gilbert, L. I.** (1975). "The influence of hemolymph-binding protein on juvenile hormone stability and distribution in *Manduca sexta* fat body and imaginal discs in vitro." *Mol Cell Endocrinol* 3(3): 167-184.
- Harvie, P. D., Filippova, M. und Bryant, P. J.** (1998). "Genes Expressed in the Ring Gland, the Major Endocrine Organ of *Drosophila melanogaster*." *Genetics* 149(1): 217-231.
- Hershko, A., Ciechanover, A. und Varshavsky, A.** (2000). "The ubiquitin system." *Nature medicine* 6(10): 1073-1081.
- Hildebrandt, A., Bickmeyer, I. und Kühnlein, R. P.** (2011). "Reliable *Drosophila* body fat quantification by a coupled colorimetric assay." *PLoS One* 6(9): e23796.
- Hinson, E. R. und Cresswell, P.** (2009). "The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic α -helix." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(48): 20452-20457.
- Hooper, C., Puttamadappa, S. S., Loring, Z., Shekhtman, A. und Bakowska, J. C.** (2010). "Spartin activates atrophin-1-interacting protein 4 (AIP4) E3 ubiquitin ligase and promotes ubiquitination of adipophilin on lipid droplets." *BMC Biol* 8: 72.
- Horiguchi, Y., Araki, M. und Motojima, K.** (2008a). "17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 13 is a liver-specific lipid droplet-associated protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370(2): 235-238.
- Horiguchi, Y., Araki, M. und Motojima, K.** (2008b). "Identification and characterization of the ER/lipid droplet-targeting sequence in 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 11." *Arch Biochem Biophys* 479(2): 121-130.
- Horn, T. und Boutros, M.** (2010). "E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents—2010 update." *Nucleic acids research* 38(suppl 2): W332-W339.
- Hsieh, K., Lee, Y. K., Londos, C., Raaka, B. M., Dalen, K. T. und Kimmel, A. R.** (2012). "Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets." *J Cell Sci* 125(17): 4067-4076.
- Huang, X., Warren, J. T. und Gilbert, L. I.** (2008). "New players in the regulation of ecdysone biosynthesis." *Journal of Genetics and Genomics* 35(1): 1-10.
- Igal, R. A., Wang, P. und Coleman, R. A.** (1997). "Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA." *Biochem. J.* 324(2): 529-534.
- Ingelmo-Torres, M., Gonzalez-Moreno, E., Kassan, A., Hanzal-Bayer, M., Tebar, F., Herms, A., Grewal, T., Hancock, J. F., Enrich, C., Bosch, M., Gross, S. P., Parton, R. G. und Pol, A.** (2009). "Hydrophobic and basic domains target proteins to lipid droplets." *Traffic* 10(12): 1785-1801.
- Jang, H. und Serra, C.** (2014). "Nutrition, Epigenetics, and Diseases." *Clin Nutr Res* 3(1): 1-8.

- Jiang, W. und Napoli, J. L.** (2013). "The Retinol Dehydrogenase Rdh10 Localizes to Lipid Droplets during Acyl Ester Biosynthesis." *Journal of Biological Chemistry* 288(1): 589-597.
- Jones, D., Jones, G., Teal, P., Hammac, C., Messmer, L., Osborne, K., Belgacem, Y. H. und Martin, J. R.** (2010). "Suppressed production of methyl farnesoid hormones yields developmental defects and lethality in *Drosophila* larvae." *Gen Comp Endocrinol* 165(2): 244-254.
- Kallberg, Y., Oppermann, U. und Persson, B.** (2010). "Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models." *FEBS J* 277(10): 2375-2386.
- Kassan, A., Herms, A., Fernandez-Vidal, A., Bosch, M., Schieber, N. L., Reddy, B. J., Fajardo, A., Gelabert-Baldrich, M., Tebar, F., Enrich, C., Gross, S. P., Parton, R. G. und Pol, A.** (2013). "Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains." *J Cell Biol* 203(6): 985-1001.
- Kaushik, S., Rodriguez-Navarro, Jose A., Arias, E., Kiffin, R., Sahu, S., Schwartz, Gary J., Cuervo, Ana M. und Singh, R.** (2011). "Autophagy in Hypothalamic AgRP Neurons Regulates Food Intake and Energy Balance." *Cell Metab* 14(2): 173-183.
- Kavanagha, K., Jernvall, H., Persson, B. und Oppermann, U.** (2008). "The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes." *Cell. Mol. Life Sci* 65: 3895-3906.
- Khaldoun, S. A., Emond-Boisjoly, M.-A., Chateau, D., Carrière, V., Lacasa, M., Rousset, M., Demignot, S. und Morel, E.** (2014). "Autophagosomes contribute to intracellular lipid distribution in enterocytes." *Molecular Biology of the Cell* 25(1): 118-132.
- Kim, S. K. und Rulifson, E. J.** (2004). "Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells." *Nature* 431(7006): 316-320.
- King, R., Aggarwal, S. und Bodenstein, D.** (1966). "The comparative submicroscopic morphology of the ring gland of *Drosophila melanogaster* during the second and third larval instars." *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 73(2): 272-285.
- Klapper, M., Ehmke, M., Palgunow, D., Böhme, M., Matthäus, C., Bergner, G., Dietzek, B., Popp, J. und Döring, F.** (2011). "Fluorescence-based fixative and vital staining of lipid droplets in *Caenorhabditis elegans* reveal fat stores using microscopy and flow cytometry approaches." *J Lipid Res* 52(6): 1281-1293.
- Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, Heather W., Schmidt-Supprian, M., Vance, Dennis E., Mann, M., Farese Jr, Robert V. und Walther, Tobias C.** (2011). "Phosphatidylcholine Synthesis for Lipid Droplet Expansion Is Mediated by Localized Activation of CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase." *Cell Metab* 14(4): 504-515.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L.** (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." *Journal of molecular biology* 305(3): 567-580.

- Kuerschner, L., Moessinger, C. und Thiele, C.** (2008). "Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets." *Traffic* 9(3): 338-352.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Larsson, S., Resjö, S., Gomez, M. F., James, P. und Holm, C.** (2012). "Characterization of the lipid droplet proteome of a clonal insulin-producing β -cell line (INS-1 832/13)." *Journal of Proteome Research* 11(2): 1264-1273.
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. und Zechner, R.** (2011). "Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores." *Progress in Lipid Research* 50(1): 14-27.
- Lee, K.-S., You, K.-H., Choo, J.-K., Han, Y.-M. und Yu, K.** (2004). "Drosophila short neuropeptide F regulates food intake and body size." *Journal of Biological Chemistry* 279(49): 50781-50789.
- Lemaitre, B., Fang, H. Y., Buchon, N., Deplancke, B., Boquete, J.-P., David, F. und Osman, D.** (2013). "Morphological and Molecular Characterization of Adult Midgut Compartmentalization in Drosophila." *Cell Reports* 3(EPFL-ARTICLE-189130): 1725-1738.
- Li, Z., Thiel, K., Thul, P. J., Beller, M., Kuhnlein, R. P. und Welte, M. A.** (2012). "Lipid droplets control the maternal histone supply of Drosophila embryos." *Curr Biol* 22(22): 2104-2113.
- Lisi, S., Mazzon, I. und White, K.** (2000). "Diverse Domains of THREAD/DIAP1 Are Required to Inhibit Apoptosis Induced by REAPER and HID in Drosophila." *Genetics* 154(2): 669-678.
- Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Ory, D. S. und Schaffer, J. E.** (2003). "Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(6): 3077-3082.
- Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D. I., Zhu, M. und Anderson, R. G. W.** (2004). "Chinese Hamster Ovary K2 Cell Lipid Droplets Appear to Be Metabolic Organelles Involved in Membrane Traffic." *Journal of Biological Chemistry* 279(5): 3787-3792.
- Loos, R. J. F.** (2012). "Genetic determinants of common obesity and their value in prediction." *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 26(2): 211-226.
- Martin, S., Driessen, K., Nixon, S. J., Zerial, M. und Parton, R. G.** (2005). "Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism." *J Biol Chem* 280(51): 42325-42335.
- Michal, G. und Schomburg, D.** (2013). *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*, John Wiley & Sons.

- Miller, W. L. und Bose, H. S.** (2011). "Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking: Thematic Review Series: Genetics of Human Lipid Diseases." *J Lipid Res* 52(12): 2111-2135.
- Mirth, C., Truman, J. W. und Riddiford, L. M.** (2005). "The Role of the Prothoracic Gland in Determining Critical Weight for Metamorphosis in *Drosophila melanogaster*." *Current Biology* 15(20): 1796-1807.
- Miura, S., Gan, J. W., Brzostowski, J., Parisi, M. J., Schultz, C. J., Londos, C., Oliver, B. und Kimmel, A. R.** (2002). "Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*." *J Biol Chem* 277(35): 32253-32257.
- Moeller, G. und Adamski, J.** (2009). "Integrated view on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases." *Mol Cell Endocrinol* 301(1–2): 7-19.
- Murakami, R., Takashima, S. und Hamaguchi, T.** (1999). "Developmental genetics of the *Drosophila* gut: specification of primordia, subdivision and overt-differentiation." *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 45(5): 661-676.
- Nässel, D. R. und Wegener, C.** (2011). "A comparative review of short and long neuropeptide F signaling in invertebrates: Any similarities to vertebrate neuropeptide Y signaling?" *Peptides* 32(6): 1335-1355.
- Nelliot, A., Bond, N. und Hoshizaki, D. K.** (2006). "Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*." *genesis* 44(8): 396-400.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B. und Jörnvall, H.** (2003). "Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update." *Chemico-Biological Interactions* 143-144: 247-253.
- Palanker, L., Tennessen, J. M., Lam, G. und Thummel, C. S.** (2009). "*Drosophila* HNF4 Regulates Lipid Mobilization and β -Oxidation." *Cell Metab* 9(3): 228-239.
- Palm, W., Sampaio, J. L., Brankatschk, M., Carvalho, M., Mahmoud, A., Shevchenko, A. und Eaton, S.** (2012). "Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*—assembly, function, and influence on tissue lipid composition." *PLoS Genet* 8(7): e1002828.
- Persson, B., Hedlund, J. und Jörnvall, H.** (2008). "Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families." *Cellular and molecular life sciences* 65(24): 3879-3894.
- Persson, B. und Kallberg, Y.** (2013). "Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs)." *Chemico-Biological Interactions* 202(1–3): 111-115.
- Persson, B., Krook, M. und Jörnvall, H.** (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 5, Springer: 383-395.

- Pierre, S. E. S., Ponting, L., Stefancsik, R. und McQuilton, P.** (2014). "FlyBase 102—advanced approaches to interrogating FlyBase." *Nucleic acids research* 42(D1): D780-D788.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E. und Parton, R. G.** (2001). "A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance." *J Cell Biol* 152(5): 1057-1070.
- Puck, T. T., Cieciura, S. J. und Robinson, A.** (1958). "Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects." *J Exp Med* 108(6): 945-956.
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R. R., Mohan, A., Heyen, J. W., Goebel, M. G. und Iakoucheva, L. M.** (2010). "Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78(2): 365-380.
- Rajan, A. und Perrimon, N.** (2011). "Drosophila as a model for interorgan communication: lessons from studies on energy homeostasis." *Dev Cell* 21(1): 29-31.
- Rajan, A. und Perrimon, N.** (2012). "Drosophila cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion." *Cell* 151(1): 123-137.
- Read, M. A., Neish, A. S., Luscinskas, F. W., Palombella, V. J., Maniatis, T. und Collins, T.** (1995). "The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression." *Immunity* 2(5): 493-506.
- Reiher, W., Shirras, C., Kahnt, J. r., Baumeister, S., Isaac, R. E. und Wegener, C.** (2011). "Peptidomics and Peptide Hormone Processing in the Drosophila Midgut." *Journal of Proteome Research* 10(4): 1881-1892.
- Reumann, S., Babujee, L., Ma, C., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G. E., Rasche, N., Luder, F., Weckwerth, W. und Jahn, O.** (2007). "Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms." *Plant Cell* 19(10): 3170-3193.
- Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Robenek, M. J., Troyer, D. und Severs, N. J.** (2006). "Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis." *J Cell Sci* 119(Pt 20): 4215-4224.
- Rosen, E. D. und Spiegelman, B. M.** (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." *Nature* 444(7121): 847-853.
- Rulifson, E. J., Kim, S. K. und Nusse, R.** (2002a). "Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes." *Science* 296(5570): 1118-1120.
- Rulifson, E. J., Kim, S. K. und Nusse, R.** (2002b). "Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes." *Science* 296(5570): 1118-1120.
- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2006). "Preparation and transformation of competent E. coli using calcium chloride." *Cold Spring Harbor Protocols* 2006(1): pdb. prot3932.

- Sapay, N., Guermeur, Y. und Deléage, G.** (2006). "Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier." *BMC Bioinformatics* 7(1): 255.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. und Gey, G. O.** (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix." *J Exp Med* 97(5): 695-710.
- Scott, R. C., Schuldiner, O. und Neufeld, T. P.** (2004). "Role and Regulation of Starvation-Induced Autophagy in the *Drosophila* Fat Body." *Dev Cell* 7(2): 167-178.
- Shin, S. C., Kim, S.-H., You, H., Kim, B., Kim, A. C., Lee, K.-A., Yoon, J.-H., Ryu, J.-H. und Lee, W.-J.** (2011). "Drosophila Microbiome Modulates Host Developmental and Metabolic Homeostasis via Insulin Signaling." *Science* 334(6056): 670-674.
- Siegmund, T. und Korge, G.** (2001). "Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*." *The Journal of Comparative Neurology* 431(4): 481-491.
- Slatkin, M.** (1974). "Hedging one's evolutionary bets." *Nature* 250: 704-705.
- Smith, P., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. und Klenk, D.** (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical biochemistry* 150(1): 76-85.
- Soni, K. G., Mardones, G. A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C. L. und Bonifacio, J. S.** (2009). "Coatmer-dependent protein delivery to lipid droplets." *J Cell Sci* 122(11): 1834-1841.
- Stapleton, M., Liao, G., Brokstein, P., Hong, L., Carninci, P., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Champe, M., Pacleb, J., Wan, K., Yu, C., Carlson, J., George, R., Celniker, S. und Rubin, G. M.** (2002). "The *Drosophila* Gene Collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes." *Genome Res* 12(8): 1294-1300.
- Stevanovic, A. und Thiele, C.** (2013). "Monotopic topology is required for lipid droplet targeting of ancient ubiquitous protein 1." *J Lipid Res* 54(2): 503-513.
- Stoter, M., Niederlein, A., Barsacchi, R., Meyenhofer, F., Brandl, H. und Bickle, M.** (2013). "CellProfiler and KNIME: open source tools for high content screening." *Methods Mol Biol* 986: 105-122.
- Straub, B. K., Herpel, E., Singer, S., Zimmelmann, R., Breuhahn, K., Macher-Goeppinger, S., Warth, A., Lehmann-Koch, J., Longrich, T., Heid, H. und Schirmacher, P.** (2010). "Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis." *Mod Pathol* 23(3): 480-492.
- Straub, B. K., Stoeffel, P., Heid, H., Zimmelmann, R. und Schirmacher, P.** (2008). "Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis." *Hepatology* 47(6): 1936-1946.

- Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J. T., Contreras, J. A., Kimmel, A. R. und Londos, C.** (2003). "Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation." *J Cell Biol* 161(6): 1093-1103.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. und Fujimoto, T.** (2002). "The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition." *Journal of Biological Chemistry* 277(46): 44507-44512.
- Thiam, A. R., Farese Jr, R. V. und Walther, T. C.** (2013). "The biophysics and cell biology of lipid droplets." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(12): 775-786.
- Thiel, K., Heier, C., Haberl, V., Thul, P. J., Oberer, M., Lass, A., Jackle, H. und Beller, M.** (2013). "The evolutionarily conserved protein CG9186 is associated with lipid droplets, required for their positioning and for fat storage." *J Cell Sci* 126(Pt 10): 2198-2212.
- Thiele, C. und Spandl, J.** (2008). "Cell biology of lipid droplets." *Current Opinion in Cell Biology* 20(4): 378-385.
- Thompson, S. N.** (2003). "Trehalose—the insect ‘blood’ sugar." *Advances in Insect Physiology* 31: 205-285.
- Timmons, L., Becker, J., Barthmaier, P., Fyrberg, C., Shearn, A. und Fyrberg, E.** (1997). "Green fluorescent protein/ β -galactosidase double reporters for visualizing *Drosophila* gene expression patterns." *Developmental Genetics* 20(4): 338-347.
- Tomancak, P., Beaton, A., Weiszmam, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Hartenstein, V. und Celniker, S. E.** (2002). "Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis." *Genome Biol* 3(12): 0081-0088.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(9): 4350-4354.
- Tremaroli, V. und Backhed, F.** (2012). "Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism." *Nature* 489(7415): 242-249.
- Truman, J. W., Hiruma, K., Allee, J. P., MacWhinnie, S. G. B., Champlin, D. T. und Riddiford, L. M.** (2006). "Juvenile Hormone Is Required to Couple Imaginal Disc Formation with Nutrition in Insects." *Science* 312(5778): 1385-1388.
- Tusnady, G. E. und Simon, I.** (2001). "The HMMTOP transmembrane topology prediction server." *Bioinformatics* 17(9): 849-850.
- Ui, K., Nishihara, S., Sakuma, M., Togashi, S., Ueda, R., Miyata, Y. und Miyake, T.** (1994). "Newly established cell lines from *Drosophila* larval CNS express neural specific characteristics." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A(4): 209-216.
- Voght, S. P., Fluegel, M. L., Andrews, L. A. und Pallanck, L. J.** (2007). "*Drosophila* NPC1b promotes an early step in sterol absorption from the midgut epithelium." *Cell Metab* 5(3): 195-205.

- Wältermann, M. und Steinbüchel, A.** (2005). "Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure, Formation, and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots." *Journal of Bacteriology* 187(11): 3607-3619.
- Walther, T. C. und Farese, R. V., Jr.** (2012). "Lipid droplets and cellular lipid metabolism." *Annu Rev Biochem* 81: 687-714.
- Welte, M. A., Gross, S. P., Postner, M., Block, S. M. und Wieschaus, E. F.** (1998). "Developmental Regulation of Vesicle Transport in Drosophila Embryos: Forces and Kinetics." *Cell* 92(4): 547-557.
- Wessel, D. und Flügge, U.-I.** (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." *Analytical biochemistry* 138(1): 141-143.
- Wilfling, F., Thiam, A. R., Olarte, M.-J., Wang, J., Beck, R., Gould, T. J., Allgeyer, E. S., Pincet, F., Bewersdorf, J. und Farese, R. V.** (2014). "Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting." *eLife* 3.
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J. T., Kraemer, N., Gould, T. J., Uchida, A., Cheng, J. X., Graham, M., Christiano, R., Frohlich, F., Liu, X., Buhman, K. K., Coleman, R. A., Bewersdorf, J., Farese, R. V., Jr. und Walther, T. C.** (2013). "Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets." *Dev Cell* 24(4): 384-399.
- Wilson, L., Matsudaira, P. T., Goldstein, L. S. und Fyrberg, E. A.** (1995). *Drosophila melanogaster: Practical Uses in Cell and Molecular Biology: Drosophila Melanogaster: Practical Uses in Cell and Molecular Biology* Volume 44, Academic Press.
- Wolins, N. E., Brasaemle, D. L. und Bickel, P. E.** (2006). "A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins." *FEBS Lett* 580(23): 5484-5491.
- Wu, J. C., Merlino, G. und Fausto, N.** (1994). "Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2): 674-678.
- Xu, G., Sztalryd, C. und Londos, C.** (2006). "Degradation of perilipin is mediated through ubiquitination-proteasome pathway." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761(1): 83-90.
- Yen, K., Le, T. T., Bansal, A., Narasimhan, S. D., Cheng, J.-X. und Tissenbaum, H. A.** (2010). "A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods." *PLoS One* 5(9): e12810.
- Zehmer, J. K., Bartz, R., Bisel, B., Liu, P., Seemann, J. und Anderson, R. G.** (2009). "Targeting sequences of UBXD8 and AAM-B reveal that the ER has a direct role in the emergence and regression of lipid droplets." *J Cell Sci* 122(20): 3694-3702.
- Zhang, H., Wang, Y., Li, J., Yu, J., Pu, J., Li, L., Zhang, H., Zhang, S., Peng, G. und Yang, F.** (2011). "Proteome of skeletal muscle lipid droplet reveals association with

mitochondria and apolipoprotein aI." *Journal of Proteome Research* 10(10): 4757-4768.

Zhang, M., Hu, P. und Napoli, J. L. (2004). "Elements in the N-terminal Signaling Sequence That Determine Cytosolic Topology of Short-chain Dehydrogenases/Reductases: Studies With Retinol Dehydrogenase Type 1 And Cis-Retinol/Androgen Dehydrogenase Type 1." *Journal of Biological Chemistry* 279(49): 51482-51489.

Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A. und Zechner, R. (2004). "Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase." *Science* 306(5700): 1383-1386.

9 Danksagung

Der größte Dank gebührt Dr. Mathias Beller, der immer mit vollem Einsatz hinter dem Projekt stand. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Herbert Jäckle, der mich auch nach dem Weggang aus Göttingen unterstützt hat.

Prof. Dr. Thomas Klein danke ich nicht nur für die Übernahme des Korreferats, sondern auch für die freundliche Erlaubnis, die Fliegenlabore in seinem Institut zu benutzen.

Prof. Dr. Markus Kollmann danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Institut. Bei den Mitgliedern des Instituts für Mathematische Modellierung Biologischer Systeme bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank geht an Kirsten Tschapalda für die Experimente mit den Säugerzellen, an Petra Kolkhof für ihre große Hilfe gerade in der Endphase und an Michael Werthebach für das Korrekturlesen.

Bei der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie am MPI möchte ich mich für die schöne Anfangszeit in Göttingen bedanken, vor allem bei Dr. Katharina Thiel für die Einführung in die Welt der Fliegen.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir immer Rückhalt gaben.

Als Letztes bedanke ich mich bei meiner Freundin, dass sie mir selbst in anstrengenden Zeiten immer ein Lächeln ins Gesicht zauberte.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, April 2014 Peter J. Thul