

Einfluss der GTPase ARFRP1 auf die intestinale Absorption von Makronährstoffen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Alexander Jaschke
aus Ulm

Potsdam-Rehbrücke, Mai 2010

Die vorliegende Dissertation wurde von April 2006 bis Mai 2010 am Deutschen Institut für Ernährungsforschung unter der Aufsicht von Frau Prof. Dr. Schürmann angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Annette Schürmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke

Disputation am 02.09.2010

1	Einleitung	1
1.1	Der Intestinaltrakt	1
1.1.1	Morphologie des Darms	1
1.1.2	Kohlenhydrataufnahme durch das Darmepithel	2
1.1.3	Lipidaufnahme durch das Darmepithel	3
1.2	Monomere GTPasen	6
1.3	Die ARF-Familie der Ras-homologen GTPasen.....	7
1.4	ARFRP1, ein entferntes Mitglied der ARF-Familie	8
1.5	Die Rab-Familie der Ras-homologen GTPasen	9
1.6	Mausmodelle mit <i>Arfrp1-Knockout</i>	9
1.6.1	Die konventionelle <i>Arfrp1</i> -Nullmutante (<i>Arfrp1^{-/-}</i>) ist embryonal letal.....	9
1.6.2	Die Fettzell-spezifische <i>Arfrp1</i> -Nullmutante (<i>Arfrp1^{ad^{-/-}}</i>) ist lipodystroph.....	10
1.6.3	Die Darm-spezifische <i>Arfrp1</i> -Nullmutante (<i>Arfrp1^{vit^{-/-}}</i>)	11
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Verwendete Antikörper	13
2.1.1.1	Primärantikörper und -antiseren	13
2.1.1.2	Sekundärantikörper	14
2.1.2	Synthetische Oligonukleotide (<i>Primer</i>).....	15
2.1.2.1	<i>Primer</i> für die Genotypisierung der <i>Arfrp1^{vit^{-/-}}</i> -Mäuse	15
2.1.2.2	<i>Primer</i> für die cDNA Kontroll-PCR.....	15
2.1.2.3	<i>Primer</i> für die <i>Arfrp1</i> -RT-PCR.....	15
2.1.3	qRT-PCR-Sonden	15
2.1.4	Reaktionskits.....	16
2.1.5	Medien, Puffer und Lösungen	17
2.1.6	Chemikalien	17
2.1.7	Mausdiäten.....	17
2.2	Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen	18
2.2.2	RNA-Isolierung aus murinen Geweben	18
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	18
2.2.4	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.2.5	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	20
2.2.6	Erststrang-cDNA-Synthese	20

2.2.7	<i>Arfrp1</i> -RT-PCR.....	21
2.2.8	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qRT-PCR).....	22
2.3	Zellbiologische Methoden.....	22
2.3.1	Kultivierung von MDCK-Zellen.....	22
2.3.2	Kryokonservierung von Zellen.....	23
2.3.3	Auftauen der kryokonservierten Zellen.....	23
2.4	Biochemische Methoden.....	24
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten.....	24
2.4.2	Isolation von Proteinen aus murinen Geweben.....	24
2.4.2.1	Gewinnung von Gesamtmenbranpellets.....	24
2.4.2.2	Gewinnung von zellfreien Proteinlysaten.....	25
2.4.3	Proteingehaltsbestimmung.....	25
2.4.4	<i>Western blot</i> -Analyse.....	25
2.4.4.1	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.4.4.2	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulosemembranen.....	27
2.4.4.3	Immunchemische Detektion von Proteinen mittels Peroxidase-vermittelter Chemilumineszenz.....	27
2.4.5	Immunpräzipitation.....	28
2.4.6	Gewebeextraktion zur Bestimmung der Triglyceride.....	28
2.5	Histologie, indirekte Immunhisto- und Immunzytochemie.....	28
2.5.1	Indirekte Immunzytochemie und konfokale <i>Laser Scanning</i> -Mikroskopie.....	28
2.5.2	Gewebeaufarbeitung.....	29
2.5.2.1	Paraformaldehyd-Fixierung und Gewebeeinbettung.....	29
2.5.2.2	Herstellung von Gefrierschnitten.....	30
2.5.3	<i>Oil-Red-O</i> -Färbung von Geweben.....	30
2.5.4	Indirekte Immunhistochemie.....	31
2.5.5	Elektronenmikroskopie.....	31
2.6	Phänotypische Charakterisierung der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Maus.....	32
2.6.1	Versuchstierhaltung.....	32
2.6.2	Zucht der Darm-spezifischen <i>Arfrp1</i> -Nullmutante.....	32
2.6.3	Messung des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung.....	33
2.6.4	Bestimmung der Blutglucosespiegel.....	33
2.6.5	Blutentnahme.....	33
2.6.6	Tötung der Tiere und Gewebepreparation.....	33
2.6.7	Oraler Glucose-Toleranztest.....	34

2.6.8	Oraler Fett-Toleranztest	34
2.6.9	Bestimmung der Triglyceridsekretion des Darms nach Behandlung mit Tyloxapol	35
2.6.10	Diätetische Intervention und Ermittlung der Überlebensrate	35
2.7	Bestimmung metabolischer Plasmaparameter	35
2.7.1	Detektion freier Aminosäuren im Plasma.....	35
2.7.2	Bestimmung der Ketonkörperkonzentrationen im Plasma	36
2.7.3	Bestimmung von freien Fettsäuren im Plasma	36
2.7.4	Bestimmung der Triglyceride im Plasma	36
2.7.5	Bestimmung der Laktatkonzentration im Plasma.....	37
2.7.6	Bestimmung der Cholesterinkonzentration im Plasma.....	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Die Rolle von ARFRP1 für die korrekte Sortierung von E-Cadherin.....	38
3.1.1	Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von E-Cadherin in der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Maus.....	38
3.1.2	Die fehlerhafte Sortierung von E-Cadherin beeinflusst auch dessen Bindungspartner β -Catenin.....	40
3.1.3	ARFRP1 ist in MDCK-Zellen mit E-Cadherin ko-lokalisiert	41
3.1.4	In MDCK-Zellen ist ARFRP1 in einem Komplex mit E-Cadherin, β -Catenin, α -Catenin und p120 ^{ctn} assoziiert	42
3.1.5	Im Darmepithel von <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen verbleibt E-Cadherin zum Teil im Golgi-Apparat.....	43
3.2	Veränderung des Golgi-Apparates nach Deletion von <i>Arfrp1</i> im Darm	44
3.2.1	Das Fehlen von ARFRP1 in epithelialen Darmzellen führte zu einer Dissoziation von ARL1 vom Golgi-Apparat	44
3.2.2	ARFRP1 wird für eine korrekte Organisation des <i>trans</i> -Golgis benötigt.....	46
3.3	Die Malabsorption von Fetten nach Darm-spezifischer Deletion von <i>Arfrp1</i>	48
3.3.1	Die Darm-spezifische Deletion von <i>Arfrp1</i> resultierte in einer Wachstumsretardierung der Mäuse	48
3.3.2	Die relative Körperzusammensetzung der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäuse ist durch die Wachstumsretardierung nicht verändert	49
3.3.3	Die Wachstumsretardierung der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Maus ist mit einer reduzierten Darmlänge sowie geringeren Leber- und Nierengewichten assoziiert.....	50
3.3.4	Reduzierte Blutglucosespiegel und Plasmakonzentrationen von Triglyceriden und freien Fettsäuren der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäuse	51
3.3.5	Untersuchung der Absorption der Makronährstoffe	53

3.3.5.1	Erhöhte Sterblichkeitsrate der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäuse auf einer Kohlenhydrat-freien Hochfettdiät	53
3.3.5.2	Die Aufnahme von Glucose über das Darmepithel ist durch die Abwesenheit von ARFRP1 nicht beeinträchtigt.....	54
3.3.5.3	Keine Veränderung der freien Aminosäuren im Plasma der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tiere	57
3.3.5.4	Deletion von <i>Arfrp1</i> führt zu einer beeinträchtigten Aufnahme von Lipiden durch das Darmepithel	58
3.3.5.5	Stark reduzierte Akkumulation von Triglyceriden in <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tieren nach Injektion von Tyloxapol.....	59
3.3.5.6	<i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tiere weisen nach Fasten reduzierte Konzentrationen von Ketonkörpern im Plasma auf	61
3.3.5.7	Keine Veränderung der Expression oder Lokalisierung der an der Lipidabsorption im Darm beteiligten Proteine.....	62
3.3.6	ARFRP1 spielt für die Aufnahme von Nahrungslipiden in die Darmepithelzelle keine Rolle.....	64
3.4	Deletion von <i>Arfrp1</i> im Darm führt zu einer veränderten Expression von Rab-GTPasen.....	65
4	Diskussion	73
4.1	Absorption von Makronährstoffen durch das Darmepithel der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäuse	73
4.1.1	Uneingeschränkte Aufnahme von Glucose durch das Darmepithel der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Maus	73
4.1.2	Normale Absorption von Peptiden und Aminosäuren durch das Darmepithel der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tiere	74
4.1.3	Die Malabsorption von Fettsäuren in der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Maus	75
4.1.3.1	Mechanismen der gestörten Lipidaufnahme der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Maus	76
4.1.3.2	Mögliche Rolle von Rab-GTPasen beim Chylomikronentransport im Darmepithel.....	79
4.1.4	Ausblick auf weiterführende Versuchsansätze zur Klärung der Malabsorption von Fettsäuren in Abwesenheit von <i>Arfrp1</i>	81
4.2	Veränderte subzelluläre Verteilung von E-Cadherin im Darmepithel der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäuse.....	83
5	Zusammenfassung/ <i>Abstract</i>	86
5.1	Zusammenfassung.....	86
5.2	<i>Abstract</i>	88

6	Abbildungsverzeichnis	90
7	Tabellenverzeichnis	92
8	Abkürzungsverzeichnis	93
9	Literaturverzeichnis	96
10	Anhang	106

1 Einleitung

1.1 Der Intestinaltrakt

Die Funktion des Darms besteht hauptsächlich in der Nahrungsresorption und der Regulation des Wasser-, Vitamin- und Elektrolythaushaltes. Die Aufnahme von Wasser wird durch Osmolaritätsunterschiede zwischen Darmlumen und Plasma kontrolliert. Zusätzlich muss der Darm Mechanismen zum Schutz vor der Exposition mit Verdauungsenzymen und dem Eindringen von pathogenen Bakterien und Viren bereitstellen.

1.1.1 Morphologie des Darms

Der Darm in Säugern wird unterteilt in Dünn- und Dickdarm (Colon), wobei sich der Dünndarm aus Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Krummdarm (Ileum) zusammensetzt. Das Innere des Darms, das Darmlumen, wird hierbei durch ein einschichtiges Epithel abgegrenzt, an dessen basolaterale Membran sich Bindegewebs- (*Lamina propria*) sowie Muskelschichten (*Lamina muscularis mucosae*) anschließen.

Die Zellen des Darmepithels unterliegen einer permanenten Regeneration (Goodlad & Wright, 1984), wobei die Zellen innerhalb von zwei bis sieben Tagen vollständig erneuert werden. Um dies zu gewährleisten, teilt sich das Darmepithel des Dünndarms in zwei unterschiedliche Kompartimente, zum einen in die Lieberkühnschen Krypten, Einstülpungen des Darmepithels in das Bindegewebe, und zum anderen in die Villi, die Ausstülpungen in das Darmlumen darstellen. Die Bildung von Krypten und Villi erhöht zudem die resorptive Oberfläche des Darms.

Die Proliferation ist auf die Krypten beschränkt, hier sind pluripotente Stammzellen in der Nähe der Kryptenbasis lokalisiert, von denen die vier verschiedenen Zelltypen des Darmepithels Enterocyten, enteroendokrine Zellen, Becherzellen und Panethzellen abstammen (Cheng & Leblond, 1974).

Die Hauptaufgabe der Enterozyten, die etwa 90% der epithelialen Zellen ausmachen, ist die Absorption und Weiterleitung von Nährstoffen. Sie besitzen einen apikalen Bürstensaum, um die Trennfläche zwischen Epithelzelle und Darmlumen weiter zu erhöhen. Die drei anderen Zelltypen sind sekretorische Zellen. Becherzellen sezernieren zum Schutz des Epithels einen Glykoprotein- und Glykolipid-haltigen

Schleim (Mucus), enteroendokrine Zellen produzieren und sezernieren Peptidhormone wie Gastrin, Serotonin, Sekretin, GIP oder GLP1, die unter anderem regularisch auf die Darmperistaltik, sowie die Sezerierung von Verdauungsenzymen oder Hormonen wirken. Paneth-Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunität und sezernieren antimikrobielle Peptide und Enzyme wie α -Defensine (Cryptdine) oder Lysozym (Ayabe *et al.*, 2002).

Enterozyten, enteroendokrine Zellen und Becherzellen differenzieren während ihrer Migration entlang des Villus zur Villusspitze, wo sie in das Darmlumen abgestoßen werden. Paneth-Zellen migrieren im Gegensatz zu den drei anderen Zelltypen in Richtung Kryptengrund und differenzieren auf diesem Weg. Ihre Lebensdauer beträgt zirka 20 Tage, bevor sie phagozytiert werden.

Das Colon weist keine Villi auf, so dass das Epithel mit einer flachen Oberfläche zum Lumen abschließt. Zudem besitzt das Colon keine Paneth-Zellen, dafür aber eine stark erhöhte Anzahl von Becherzellen.

Für die korrekte Regeneration der Zellen des Darmeithels muss ein Gleichgewicht zwischen Zellnachschub durch Proliferation, Differenzierung und Migration, sowie dem Zellverlust durch Apoptose herrschen. Dieses wird durch ein enges Zusammenspiel diverser Signalwege wie den Faktoren *hedgehog*, PDGF (*platelet-derived growth factor*), BMP (*bone morphogenetic protein*) und Wnt (Gregorieff *et al.*, 2005; Haramis *et al.*, 2004; Madison *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2003) bewerkstelligt.

1.1.2 Kohlenhydrataufnahme durch das Darmepithel

Der Verdau von Kohlenhydraten beginnt bereits mit Aufnahme der Kohlenhydrate im Mundraum, wo Polysaccharide durch α -Amylasen gespalten werden. Diese Hydrolyse wird im Duodenum von der pankreatischen α -Amylase fortgesetzt. Schliesslich spalten Disaccharidasen im Bürstensaum des Darms die verbleibende Saccharose, Maltose und Lactose zu Monosacchariden, welche durch die apikale Membran aufgenommen und über die basolaterale Membran wieder abgegeben werden. Die Glucoseaufnahme aus dem Darm erfolgt hierbei aktiv über den Natrium-abhängigen Glucosetransporter SGLT1 (*sodium dependent glucose cotransporter*, Genname *SLC5A1*; Wright *et al.*, 2007). Er koppelt den Transport von Glucose entgegen seines Konzentrationsgradienten an den energetisch günstigen Symport von Natrium. Natrium wird anschließend von einer Na^+/K^+ -ATPase unter Verbrauch von ATP wieder aus der Zelle transportiert, um den Konzentrationsgradienten

aufrecht zu halten (Wood & Trayhurn, 2003). Neben Glucose wird auch Galactose über SGLT1 in den Enterozyten transportiert (Wright, 1998). Fructose wird durch passiven Transport, vermittelt durch den Glucosetransporter GLUT5, in die Zelle gebracht (Burant *et al.*, 1992), während Zuckeralkohole wie Xylose und Mannose durch passive Diffusion resorbiert werden.

Der passive Transport der Monosaccharide aus der Zelle entlang eines Konzentrationsgradienten erfolgt an der basolateralen Membran und wird durch den Glucosetransporter GLUT2 vermittelt (Cheeseman, 1993).

1.1.3 Lipidaufnahme durch das Darmepithel

Triglyceride, die ca. 90-95% der aus Nahrungsfetten gewonnenen Energie ausmachen, werden zuerst zu 2-Monoacyl-Glycerol und freien Fettsäuren gespalten. Dies geschieht im proximalen Teil des Jejunums und wird hauptsächlich durch die Pankreaslipase katalysiert (Mattson & Beck, 1955; Mattson & Beck, 1956; Mattson & Volpenhein, 1968). Monoacyl-Glyceride aus Micellen gelangen anschließend über Diffusion durch die Plasmamembran in das Innere der Enterozyten. Für die Aufnahme der Fettsäuren durch die apikale Membran der Enterozyten gibt es zwei Möglichkeiten, zum einen eine Protein-unabhängige Diffusion, zum anderen eine Protein-abhängige, bei der Fettsäuren von Transportern ins Innere der Enterozyten gebracht werden (Mansbach & Gorelick, 2007). Hierbei ist neben dem Fettsäure-Transport-Protein 4 (*fatty acid transport protein 4*, FATP4) hauptsächlich die Fettsäuretranslokase CD36/FAT (*fatty acid translocase*) für den Import von Fettsäuren verantwortlich (Abumrad, 2005; Bonen *et al.*, 2007).

Im Enterozyten müssen Monoacyl-Glycerol und Fettsäuren durch das Zytosol zum endoplasmatischen Retikulum (ER) gelangen, wo es zur Resynthese von Triglyceriden aus Monoacyl-Glycerol, Fettsäuren und Glycerol kommt. Die zytosolische Konzentration der aufgenommenen Fettsäuren muss möglichst gering gehalten werden, da sonst die Gefahr einer Schädigung der Integrität von zellulären Membranen besteht, was zum Tod der Zelle führen kann (Stralfors, 1990). Aus diesem Grund wird der Weg der Fettsäuren zum ER durch Fettsäure-bindende Proteine (*fatty acid binding proteins*, FABP) vermittelt, da von Protein-gebundenen Fettsäuren keine Gefahr der Schädigung von Membranen ausgeht. Im Enterozyten des Darms sind hierfür sowohl das Leber-FABP (L-FABP, FABP1) als auch das FABP des Darms (I-FABP, FABP2) verantwortlich. Beide binden zytosolische

Fettsäuren, wobei postuliert wird, dass der Transport von an L-FABP gebundenen Fettsäuren über Diffusion erfolgt, wohingegen der Transport von I-FABP-gebundenen Fettsäuren ein gerichteter Transport durch Bindung an ER-Membranen ist (Hsu & Storch, 1996; Storch & Corsico, 2008).

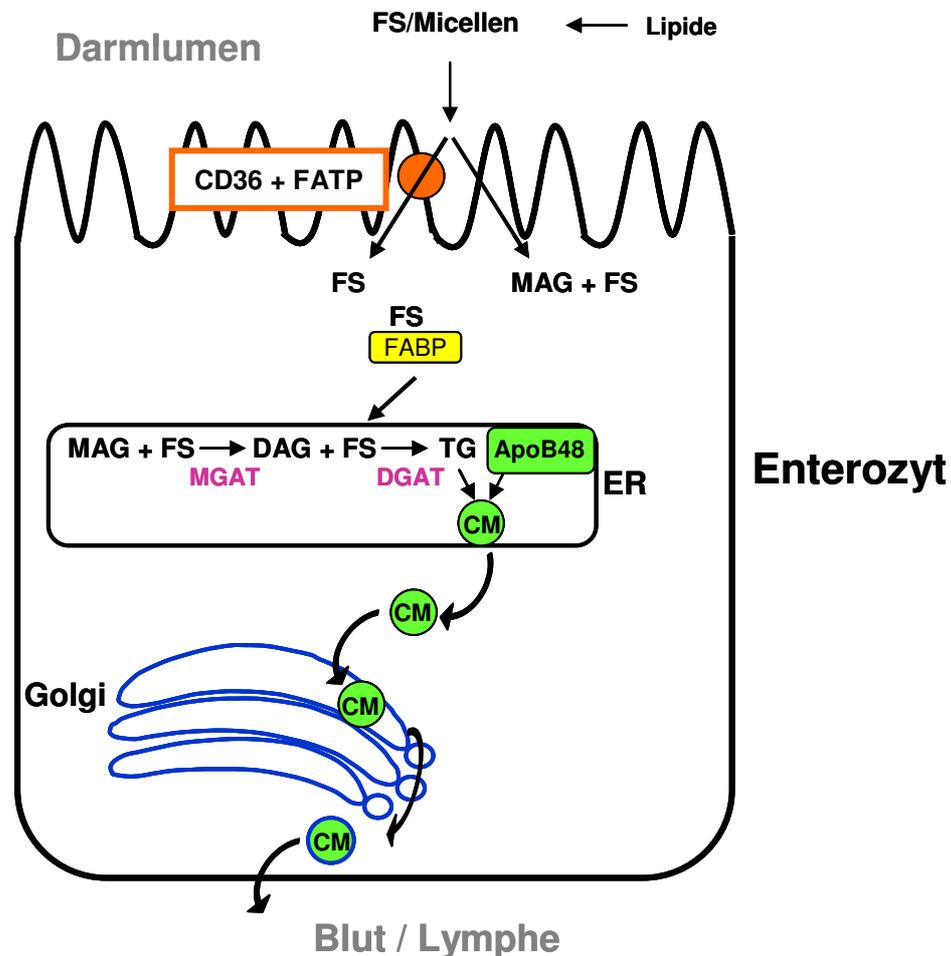


Abbildung 1.1: Übersicht über die Aufnahme von Fettsäuren durch den Enterozyten im Darm

Schematisch vereinfacht dargestellt sind die an der Lipidabsorption beteiligten Proteine sowie ihre Lokalisation in der epithelialen Darmzelle. FS = Fettsäure, CD36 = *fatty acid translocase*, FATP = *fatty acid transport protein*, FABP = *fatty acid binding protein*, MAG = Monoacyl-Glycerol, DAG = Diacyl-Glycerol, TG = Triglycerid, MGAT = Monoacyl-Glycerol-Transferase, DGAT = Diacyl-Glycerol-Transferase, CM = Chylomikron

Im ER werden Fettsäuren, Monoacylglycerol und Glycerol wieder zu Triglyceriden aufgebaut. Hierbei wird durch Monoacyl-Glycerol-Transferasen (MGAT) eine Fettsäure auf Monoacyl-Glycerol übertragen. Es existieren drei Isoformen der MGAT, MGAT1-3, wobei nur MGAT2 im proximalen Dünndarm exprimiert wird (Yen & Farese, 2003), während MGAT1 nicht im Darm vorkommt (Yen *et al.*, 2002) und MGAT3 nur im Ileum höherer Säuger vorzufinden ist (Cheng *et al.*, 2003). Auf das entstandene Diacyl-Glycerol wird eine weitere Fettsäure übertragen, so dass Triacyl-

Glycerol entsteht, eine Reaktion, die durch eine Diacyl-Glycerol-Transferase (DGAT) vermittelt wird. Auch von DGAT existieren zwei Isoformen, wobei im Darm sowohl DGAT1 als auch DGAT2 vorkommen. Diese beiden DGAT-Proteine unterscheiden sich funktionell, was unter anderem durch die unterschiedlichen Phänotypen der entsprechenden Nullmutanten belegt wird. Während DGAT1 *Knockout*-Tiere eine normale Aufnahme und Synthese von Triacyl-Glycerol aufwiesen (Buhman *et al.*, 2002), starben die DGAT-Nullmutanten kurz nach der Geburt und zeigten dabei stark reduzierte Spiegel von Triacyl-Glycerol, freien Fettsäuren und Glucose (Stone *et al.*, 2004).

Das synthetisierte Triacyl-Glycerol wird anschließend entweder im ER-Lumen in Prächylomikronen verpackt oder in zytosolischen Lipidtropfen gespeichert (Mansbach & Siddiqi, 2010). An die Oberfläche zytosolischer Lipidtropfen, die sich vor allem während der Fettabsorption bilden, lagern sich ähnlich wie an Lipidtropfen in Adipozyten Proteine der PAT-Familie (Perilipin, ADRP, TIP47) an, wobei dies im Darm nur von ADRP und TIP47 gewährleistet wird (Lee *et al.*, 2009). Diese Lipidtropfen-assoziierten Proteine stabilisieren den Tropfen und schützen ihn vor unkontrolliertem Abbau durch Lipasen (Olofsson *et al.*, 2008a). Die Bildung von Prächylomikronen im ER erfolgt in zwei Schritten, zum einen der Translation von ApoB48, der anschließenden Einschleusung ins ER und Bindung an Triacyl-Glycerol, Cholesterin und Phospholipide (Kane *et al.*, 1980) und zum zweiten der Aufnahme von Triacyl-Glycerol-reichen Partikeln.

Der nächste Schritt im Anschluss an die Biosynthese der Chylomikronen ist der Export der Prächylomikronen aus dem ER und der Transport zum *cis*-Golgi, wobei der Export der Chylomikronen der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt ist (Mansbach & Nevin, 1998; Mansbach & Dowell, 2000). Der Export aus dem ER ist noch nicht hinreichend geklärt, allerdings konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Prächylomikronen-Transport-Vesikeln sowohl unabhängig von COPII als auch von Sar1 ist, da unter anderem die Größe der Prächylomikronen-Transport-Vesikel (~250nm) die Möglichkeiten von COPII-Vesikeln übersteigt (Siddiqi *et al.*, 2003). Zudem gilt es als wahrscheinlich, dass L-FABP für das Knospen (*budding*) von Prächylomikronen-Transport-Vesikeln notwendig ist (Neeli *et al.*, 2007), welches nicht GTP-abhängig ist (Barlowe *et al.*, 1994). Ebenso ist der Transport der Prächylomikronen-Transport-Vesikel vom ER zum *cis*-Golgi nicht hinreichend bekannt. Für die Fusion von Prächylomikronen-Transport-Vesikeln mit Membranen

des *cis*-Golgis sind jedoch einige beteiligte SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) bekannt, so scheint VAMP7 das v-SNARE der Prächylomikronen-Transport-Vesikel zu sein und bindet Syntaxin5, Rbet1 und Vti1 am *cis*-Golgi (Siddiqi *et al.*, 2006a).

Im Golgi-Apparat erfolgen zwei Modifikationen der Chylomikronen, erstens die Anlagerung von ApoAI (Siddiqi *et al.*, 2006b), und zweitens die Modifikation der Glykosylierung von ApoB48, so dass ApoB48 endoH(EndoglycosidaseH)-resistent wird (Berriot-Varoqueaux *et al.*, 2001).

Über den Export der Chylomikronen aus den Golgi-Apparat ist relativ wenig bekannt, außer, dass Chylomikronen mittels Vesikeltransport an die basolaterale Membran gebracht und dort durch Vesikelfusion mit der basolateralen Membran in die *Lamina propria* abgegeben werden (Sabesin *et al.*, 1977).

1.2 Monomere GTPasen

Monomere Guanin-Nukleotid-bindende Proteine (GTPasen) werden zur Superfamilie der Ras-homologen GTPasen zusammengefasst, die mehr als 150 Mitglieder umfasst (Wennerberg *et al.*, 2005). Sie sind evolutionär hoch konserviert (Colicelli, 2004) und unterteilen sich aufgrund Sequenzübereinstimmungen und funktionellen Ähnlichkeiten in die fünf Familien der Ras-, Rho-, Rab-, Ran- und ARF-Proteine. Eine Gemeinsamkeit monomerer GTPasen ist ihre Bindung sowohl von GTP als auch von GDP mit hoher Affinität. Durch Bindung von GTP oder GDP wirken die GTPasen als molekulare Schalter (Vetter & Wittinghofer, 2001). Der Zyklus der GTPasen zwischen inaktiver GDP-gebundener und aktiver GTP-gebundener Form (Bourne *et al.*, 1991) wird hierbei von regulatorischen Proteinen kontrolliert. GEFs (*guanine-nucleotide-exchange factor*) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP (Cherfils & Chardin, 1999; Schmidt & Hall, 2002) wohingegen GAPs (*GTPase-activating protein*) die intrinsische GTPase-Aktivität verstärken und somit durch Hydrolyse des GTPs den inaktiven Zustand wiederherstellen (Bernards & Settleman, 2004; Scheffzek & Ahmadian, 2005). Die Bindung von GDP bzw. GTP führt zu Konformationsänderungen der *SwitchI*- und *SwitchII*-Region, die von regulatorischen Proteinen und Effektoren erkannt werden, wobei die GTP-gebundene Konformation eine hohe Affinität zu Effektorproteinen aufweist (Bishop & Hall, 2000).

Ras (*rat sarcoma*)-Proteine werden durch extrazelluläre Stimuli (z.B. durch Wachstumsfaktoren) aktiviert und fungieren als zentrale Bindeglieder von Effektoren

diverser Signaltransduktionswege, die unter anderem die Genexpression, Proliferation und Differenzierung regulieren (Repasky *et al.*, 2004).

Rho (*Ras homologous*)-Proteine vermitteln extrazelluläre Signale und regulieren die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, den Zellzyklus, Genexpression sowie Zellpolarität und Zellbewegung (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Heasman & Ridley, 2008; Villalonga & Ridley, 2006).

Das Ran (*Ras-like nuclear*)-Protein ist am Import und Export von Proteinen durch die Kernhülle beteiligt, wobei mittels eines Kern-lokalisierten GEF ein Gradient der aktiven Ran-Konformation gebildet wird (Weis, 2003). Darüber hinaus ist Ran am Aufbau des mitotischen Spindelapparates und der Kernhülle, sowie der DNA-Replikation beteiligt (Askjaer *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Yamaguchi & Newport, 2003).

Rab (*Ras-like Proteins in Brain*) und ARF (*ADP-ribosylation factor*)-Proteine sind beide an der Regulation des intrazellulären Vesikeltransports beteiligt, da ARFRP1 ein Protein der ARF-Familie ist und auch Rab-Proteine in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, soll auf diese beiden Familien in den folgenden Abschnitten näher eingegangen werden.

1.3 Die ARF-Familie der Ras-homologen GTPasen

Die Familie der ARF-Proteine besteht aus drei Proteingruppen, den ARF-, ARL- (*ARF-like*) und SAR- (*secretion-associated and Ras-related*) Proteinen (Kahn *et al.*, 2006). Nahezu alle Proteine der ARF-Familie besitzen eine myristoylierte N-terminale amphipatische Helix, welche die GTPase in der aktiven, GTP-gebundenen Form an Membranen koppelt (Pasqualato *et al.*, 2002). ARF-Proteine werden aufgrund von Sequenzhomologien in drei Klassen eingeteilt, wobei ARF 1-3 die Klasse I, ARF 4 und 5 die Klasse II und ARF 6 die Klasse III bilden. ARFs regulieren bei der Knospung (*budding*) von Vesikeln in endozytotischen und exozytotischen Transportwegen die Rekrutierung von Vesikel-Coat-Proteinen (Bonifacino & Glick, 2004; D'Souza-Schorey *et al.*, 1995; Kahn *et al.*, 2005). So induziert ARF1 unter anderem die Rekrutierung von COPI (*coat protein complex I*) an knospende Transportvesikel (Bonifacino & Glick, 2004).

Aus der Gruppe der ARL-Proteine ist ARL1 am besten charakterisiert; es ist am *trans*-Golgi lokalisiert und reguliert dort Struktur und Funktion des *trans*-Golgi-Apparates unter anderem durch direkte Bindung und Rekrutierung von GRIP-

domain-Proteinen an den *trans*-Golgi (Lowe *et al.*, 1996; Lu & Hong, 2003; Van Valkenburgh *et al.*, 2001). Die Funktionen anderer ARL-Proteine sind weniger gut charakterisiert, sie sind jedoch nicht an intrazellulären Membranen von sekretorischen oder endozytotischen Organellen, sondern im Zytosol, Nukleus, an Mitochondrien und am Zytoskelett lokalisiert (Burd *et al.*, 2004). So sind ARL2 und 3 an der Regulation von Mikrotubuli-assoziierten Prozessen beteiligt (Beghin *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2006), wobei die Deletion von *Arl3* in der Maus zu einer starken Beeinträchtigung der Zilien bzw. des Ziliarkörpers in der Niere bzw. der Retina führte (Schrick *et al.*, 2006). ARL4A, 5A, 6 und 4C sind im Kern bzw. im Kernkörperchen lokalisiert (Jacobs *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002), wobei zum Beispiel für ARL5A die Bindung an Chromatin nachgewiesen wurde und ARL4A eine Rolle bei der Spermatogenese spielt (Schürmann *et al.*, 2002). In Säugern besteht die Gruppe der SAR-Proteine aus den paralogenen Proteinen SAR1A und SAR1B (Gillingham & Munro, 2007). SAR1 ist an Membranen des ER lokalisiert, rekrutiert dort COPII-*Coatomere* wie Sec23 und reguliert so die Vesikelbildung (Bi *et al.*, 2002; Matsuoka *et al.*, 1998) und den Transport vom ER zum *cis*-Golgi-Apparat.

1.4 ARFRP1, ein entferntes Mitglied der ARF-Familie

ARFRP1, das die höchsten Sequenzhomologien zu ARF- und ARL-Proteinen aufweist (39% zu ARL3 und 33% zu ARF1; (Schürmann *et al.*, 1995), wird zu den ARL-Proteinen gezählt (Kahn *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu anderen ARFs und ARLs hat ARFRP1 eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität in Abwesenheit eines GAP-Proteins. Zudem fehlt ARFRP1 die für die Membranassoziation benötigte N-Myristoylierungsstelle; die Membranassoziation von ARFRP1 kommt durch eine Acetylierung des initialen Methionins und die Interaktion mit dem Membranprotein Sys1 zustande (Behnia *et al.*, 2004; Burd *et al.*, 2004). In seiner aktiven Konformation ist ARFRP1 mit Membranen des *trans*-Golgi-Apparates assoziiert (Shin *et al.*, 2005; Zahn *et al.*, 2006). Sowohl für ARFRP1 als auch sein orthologes Protein in Hefe, *Arl3p*, konnte nachgewiesen werden, dass es für die Rekrutierung von ARL1 bzw. dessen Hefeortholog *Arl1p* essentiell ist (Panic *et al.*, 2003; Zahn *et al.*, 2006). Ein ARFRP1-spezifisches GEF-Protein ist bisher nicht bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass ARFRP1 an die Sec7-Domäne ARF-spezifischer GEFs wie Cytohesin oder ARNO bindet und so die Aktivierung von ARF-Proteinen modulieren kann (Schürmann *et al.*, 1999).

1.5 Die Rab-Familie der Ras-homologen GTPasen

Neben ARF-Proteinen sind die Mitglieder der Rab (*Ras-like proteins in brain*)-Familie am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt und stellen mit mehr als 60 Mitgliedern in Säugern zudem die größte Gruppe der monomeren GTPasen dar. Rab-Proteine zeigen eine definierte Lokalisation an spezifische intrazelluläre Kompartimente und wirken regulatorisch auf distinkte Prozesse des Vesikeltransports wie zum Beispiel die Vesikelknospung, den Transports von Vesikeln über Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine oder die Fusion von Transportvesikeln mit der Akzeptormembran (Chavrier *et al.*, 1990; Pereira-Leal & Seabra, 2001; Schwartz *et al.*, 2007; Zerial & McBride, 2001). Membranassoziation von Rab-Proteinen wird über Isoprenylierung von ein oder zwei C-Terminalen Cysteinen vermittelt. Zusätzlich sind neben GEFs und GAPs bei der Regulation der Rab-Proteine und deren Translokation an die relevanten Membranen auch REP- (*Rab escort protein*), GGT- (*geranygeranyl transferase*), GDI- (*GDP dissociation inhibitor*) und GDF- (*GDF displacement factor*) Proteine beteiligt (Shen & Seabra, 1996; Sivars *et al.*, 2003; Soldati *et al.*, 1994; Ullrich *et al.*, 1993).

1.6 Mausmodelle mit *Arfrp1*-Knockout

Neben der hier beschriebenen Darm-spezifischen *Arfrp1*-Nullmutante gibt es weitere, bereits beschriebene *Knockout*-Modelle von *Arfrp1* in der Maus.

1.6.1 Die konventionelle *Arfrp1*-Nullmutante (*Arfrp1*^{-/-}) ist embryonal letal

Unsere Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass die Deletion von *Arfrp1* in der Maus zu einer frühen embryonalen Letalität führte. In 6,0 bis 6,5 Tage alten Embryonen war die Differenzierung von Epiblasten zu mesodermalen Zellen gestört, was zu einem Absterben und zu einer Ablösung der Zellen vom embryonalen Ektoderm führte (Mueller *et al.*, 2002). Weitere Arbeiten identifizierten bereits ab Tag 5,0 eine veränderte Lokalisierung von E-Cadherin in den Embryos der *Arfrp1*^{-/-}-Tiere. Während E-Cadherin im embryonalen Ektoderm der Kontroll-Embryonen an der Plasmamembran vorlag, wurde es in *Arfrp1*^{-/-}-Embryonen vor allem in intrazellulären Membranen nachgewiesen (Zahn *et al.*, 2008).

1.6.2 Die Fettzell-spezifische *Arfrp1*-Nullmutante (*Arfrp1^{ad/-}*) ist lipodystroph

Für die Generierung der Fettzell-spezifischen *Arfrp1*-Nullmutante (*Arfrp1^{ad/-}*) wurde das Cre/loxP-System verwendet. Tiere mit gefloxtem *Arfrp1*-Allel (Zahn *et al.*, 2008) wurden hierzu mit transgenen Tieren verpaart, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Fabp4/aP2* Promotors exprimieren (He *et al.*, 2003). Die *Arfrp1^{ad/-}*-Tiere zeigten einen lipodystrophen Phänotyp. Im Alter von 14 Tagen konnte kein weißes Fettgewebe nachgewiesen werden, und die Masse des braunen Fettgewebes war stark reduziert. Ebenso wiesen die Tiere erniedrigte Blutglucosespiegel und eine geringere Körpertemperatur auf, was letztendlich zu einer stark verminderten Überlebensrate der Mäuse führte. Untersuchungen der Adipozyten des braunen Fettgewebes zeigten keine Auswirkung der Deletion von *Arfrp1* auf die Differenzierung der Adipozyten. Adipozyten des braunen Fettgewebes wiesen jedoch eine starke Reduzierung der Lipidtropfengröße auf, wobei jedoch die Synthese von Triglyceriden nicht beeinflusst war. Zum einen war die Lipolyse in Adipozyten der *Arfrp1^{ad/-}*-Maus deutlich erhöht, was sich auch durch höhere Mengen der Lipasen phospho-HSL (*hormone-sensitive lipase*) und ATGL (*adipocyte-specific triglyceride lipase*) zeigte, zum anderen wurde eine Beeinträchtigung der Lipidtropfenfusion beobachtet. Ultrastrukturelle Analysen hatten gezeigt, dass im braunen Fettgewebe der *Arfrp1^{ad/-}*-Tiere mehr Lipidtropfen vorlagen als in den Kontroll-Tieren, diese jedoch eine limitierte Größe aufwiesen. Detaillierte Analysen zeigten in Kontrollzellen die Fusion von kleineren Lipidtropfen und Lipid-beladenen Membranstrukturen mit größeren Lipidtropfen, ein Ereignis, das in *Arfrp1^{ad/-}*-Zellen selten beobachtet wurde. SNAP23 wurde als ein Protein identifiziert, das neben anderen Fusionsereignissen auch die Fusion von Lipidtropfen und damit das Wachstum von Lipidtropfen reguliert (Bostrom *et al.*, 2007). Tatsächlich wurde SNAP23 im braunen Fettgewebe der Kontrolltiere an den Lipidtropfen nachgewiesen und war dagegen in Zellen der *Knockout*-Tiere hauptsächlich im Zytosol und an der Zelloberfläche der Adipozyten lokalisiert, so dass vermutet wird, dass ARFRP1 in Fettzellen die Assoziation von SNAP23 an die Lipidtropfen und so deren Fusion reguliert (Hommel *et al.*, 2010).

Zusätzlich wurde in *Arfrp1^{ad/-}*-Adipozyten eine fehlerhafte Sortierung des Glucosetransporters GLUT4 beobachtet. GLUT4 war in Zellen der *Knockout*-Tiere vermehrt an der Plasmamembran lokalisiert, während es in den Kontrolltieren

vorwiegend in intrazellulären, Insulin-sensitiven Speichervesikeln vorlag (Hesse *et al.*, 2010).

1.6.3 Die Darm-spezifische *Arfrp1*-Nullmutante (*Arfrp1^{vil-/-}*)

Die Darm-spezifische *Arfrp1*-Nullmutante wurde durch eine Verpaarung von Tieren mit gefloxtem *Arfrp1*-Allel mit transgenen Tieren, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Fragmentes des *villin*-Promotors exprimieren erzeugt (Madison *et al.*, 2002; Zahn *et al.*, 2008). *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäuse wurden lebend geboren, wiesen jedoch eine frühe postnatale Wachstumsretardierung auf. Histologische Analysen zeigten in Enterozyten der *Arfrp1^{vil-/-}*-Tiere eine Vakuolisierung und eine irreguläre Positionierung der Zellkerne, wobei die Differenzierung und Adhäsion der Enterozyten prinzipiell nicht beeinflusst war. Die Anzahl reifer Becher- und Panethzellen war in *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren stark reduziert. Einhergehend mit diesem scheinbaren Differenzierungsdefekt von Becher- und Paneth-Zellen wiesen die Tiere eine Kryptenhyperplasie mit einer erhöhten Zellproliferation im Bereich der Krypten auf (Zahn, Dissertation 2007).

Im Darmepithel der *Arfrp1^{vil-/-}*-Tiere zeigte sich ähnlich der Situation im Embryo der konventionellen *Arfrp1*-Nullmutante eine Fehlverteilung von E-Cadherin an intrazelluläre Membranen (Zahn *et al.*, 2008).

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Funktion der Ras-homologen GTPase ARFRP1 im Darm von Mäusen im Hinblick auf die Adhäsion epithelialer Zellen sowie die Resorption von Makronährstoffen. Dazu sollte das mittels des Cre/loxP-Systems generierte Mausmodell der Darm-spezifischen *Arfrp1*-Nullmutante (*Arfrp1^{vil-/-}*) näher charakterisiert werden. Aufgrund des bekannten Defekts in der Mesodermentwicklung der konventionellen *Arfrp1*-Nullmutante sollte hierbei die Rolle von ARFRP1 auf den Transport des Adhäsionsproteins E-Cadherin durch den Golgi-Apparat sowie seine Translokation an die Plasmamembran von Enterozyten genauer untersucht werden. Zudem sollten vorhandene Kenntnisse aus Zellkultur-experimenten über die Funktion von ARFRP1 am *trans*-Golgi-Apparat überprüft und so neue Erkenntnisse über die Rolle von ARFRP1 für die Struktur und Funktion des Golgi-Apparates gewonnen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Ursache der bereits im Rahmen der Doktorarbeit von Claudia Zahn (Zahn, Dissertation 2007) beobachteten Wachstumsretardierung der *Arfrp1^{vil-/-}*-Tiere geklärt und in diesem Zusammenhang die Funktion von ARFRP1 auf die Absorption von Makronährstoffen im Darm der Tiere und ihre Bereitstellung im Körper untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Antikörper

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper verwendet. Angegeben sind jeweils die Verdünnungen für die spezifischen Analysen (WB: Westernblot; IC: Immunzytochemie; IF: Immunhistochemie mit Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern), sowie die Herkunft der Antikörper.

2.1.1.1 Primärantikörper und -antiseren

Tabelle 2.1: Verwendete Primärantikörper und -antiseren

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
anti-GST-ARFRP1 (polyklonal, Kaninchen)	WB (1:500)	SCHÜRMAN <i>et al.</i> , 1995
anti-ARL1 (E6P3) (polyklonal, Kaninchen)	WB (1:1000); IF (1:800)	LOWE <i>et al.</i> , 1996; LU und HONG, 2003
anti-TGN38 (polyklonal, Schaf)	IF (1:100)	AbD Serotec (Oxford, UK)
anti-GM130 (monoklonal, Maus)	IF (1:100)	BD Transduction Laboratories
anti-GLUT2 (H67) (polyklonal, Kaninchen)	IF (1:20)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-GLUT2 (C-19) (polyklonal, Kaninchen)	WB (1:150)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-SGLT1 (polyklonal, Kaninchen)	WB (1:300)	Millipore (Billerica, MA, USA)
anti- β -Catenin (monoklonal, Maus)	IF (1:100); WB (1:2500)	BD Transduction Laboratories
anti- α -Catenin (monoklonal, Maus)	WB (0,5 μ g/ml)	NanoTools (Teningen)
anti-IQGAP1 (monoklonal, Maus)	WB (1 μ g/ml)	BD Transduction Laboratories
anti-p120 ^{ctn} (monoklonal, Maus)	WB (1 μ g/ml)	BD Transduction Laboratories
anti-FATP1 (polyklonal, Kaninchen)	IF (1:200)	STAHL <i>et al.</i> , 1999, 2002
anti-DGAT2 (C-15) (polyklonal, Ziege)	IF (1:1000)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-TIP47 (polyklonal, Kaninchen)	IF (1:100)	AnaSpec (Fremont, CA, USA)
anti-Lamp1 (monoklonal, Ratte)	IF (1:200)	BD Biosciences Pharmingen

anti-Myc-Antikörper (9E10) (monoklonal, Maus)	WB (1:1000) IC (1:400)	Gentaur Molecular Products
anti-p115 (monoklonal, Maus)	IF (1:100)	BD Transduction Laboratories
anti-FABP1 (polyklonal, Kaninchen)	IF (1:200)	Abcam (Cambridge, UK)
anti-gp84 (E-Cadherin) (polyklonal, Kaninchen)	IF (1:100); WB (1:1500); IC (1:300)	VESTWEBER und KEMLER, 1994
anti-Rab2 (FL-212) (polyklonal, Kaninchen)	IF (1:100) WB (1:200)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-Rab6A (38-TB) (monoklonal, Maus)	IF (1:10)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-Rab8 (monoklonal, Maus)	IF (1:200) WB (1:1000)	BD Transduction Laboratories
anti-Rab18 (polyklonal, Kaninchen)	IF (1:100) WB (1:1000)	Proteintech Group (Chicago, IL, USA)

2.1.1.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.2: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Alexa Fluor [®] 488 F(ab') ₂ Fragment anti-Maus IgG (H+L) (Ziege)	IC (1:500) IF (1:200)	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor [®] 546 F(ab') ₂ Fragment anti-Maus IgG (H+L) (Ziege)	IF (1:100)	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor [®] 488 F(ab') ₂ Fragment anti-Kaninchen IgG (H+L) (Ziege)	IF (1:200)	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor [®] 546 F(ab') ₂ Fragment anti-Kaninchen IgG (H+L) (Ziege)	IC (1:300)	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor [®] 488 anti-Ziege IgG (H+L) (Esel)	IF (1:200)	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor [®] 546 anti-Schaf IgG (H+L) (Esel)	IF (1:100)	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor [®] 546 anti-Ratte IgG (H+L) (Ziege)	IF (1:100)	Invitrogen (Karlsruhe)
Peroxidase-konjugierter anti-Maus- IgG-Fc-Fragment (Kaninchen)	WB (1:20000)	Dianova
Peroxidase-konjugierter anti- Kaninchen-IgG(H+L) (Ziege)	WB (1:20000)	Dianova

2.1.2 Synthetische Oligonukleotide (*Primer*)

Synthetische Oligonukleotide (*Primer*) für PCR- und RT-PCR-Analysen wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA) bezogen und als HPLC-gereinigte Lyophilisate geliefert. Die *Primer* wurden in dest. H₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/μl gebracht und in PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.1.2.1 *Primer* für die Genotypisierung der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse

Cre-Genotypisierung:

cre-genot-fwd: 5'-TCTCACGTA CTGACGGTGG-3'

cre-genot-rev: 5'-ACCAGCTTGCATGATCTCC-3'

loxP-Genotypisierung:

flox-genot-fwd: 5'-CAGGGTCAGGGATTTTAACA-3'

flox-genot-rev: 5'-GAAAGCAACTTGGGAACCTG-3'

2.1.2.2 *Primer* für die cDNA Kontroll-PCR

GAPDH-for: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

GAPDH-rev: 5'-TCCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

2.1.2.3 *Primer* für die *Arfrp1*-RT-PCR

Arfrp1-ex1-for: 5'-ATTCCGCCCGTGCTCCG-3'

Arfrp1-ex5-rev: 5'-TTGATTCTGACAGCCTTTC-3'

2.1.3 qRT-PCR-Sonden

Die Sonden für die quantitative *realtime*-PCR (qRT-PCR) sind, mit Ausnahme der β-Aktin-Sonde, Taqman[®] Gene Expression Assays von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Tabelle 2.3: Verwendete Taqman Gene Expression Assays

Gen (Protein)	Taqman [®] Gene Expression Assay	Exon-Exon Übergang
<i>ApoB</i> (ApoB48)	Mm01545159_m1	4 - 5
<i>Arfrp1</i> (ARFRP1)	Mm00513004_m1	6 - 7
<i>Arl1</i> (ARL1)	Mm01705814_s1	---
<i>Cd36</i> (CD36/FAT)	Mm00432403_m1	9 - 10

<i>Cdh1</i> (E-Cadherin)	Mm00486906_m1	3 - 4
<i>Dgat1</i> (DGAT1)	Mm00515643_m1	1 - 2
<i>Dgat2</i> (DGAT2)	Mm00499530_m1	1 - 2
<i>Fabp1</i> (FABP1, L-FABP)	Mm00444340_m1	1 - 2
<i>Fabp2</i> (FABP2, I-FABP)	Mm00433188_m1	2 - 3
<i>Rab2</i> (Rab2)	Mm00445482_m1	6 - 7
<i>Rab6</i> (Rab6)	Mm00445868_m1	3 - 4
<i>Rab8a</i> (Rab8A)	Mm00445684_m1	4 - 5
<i>Rab18</i> (Rab18)	Mm00441057_m1	1 - 2
<i>Rab19</i> (Rab19)	Mm00803242_m1	3 - 4
<i>Rab30</i> (Rab30)	Mm00512814_m1	2 - 3
<i>Slc2a2</i> (GLUT2)	Mm00446224_m1	4 - 5
<i>Slc2a5</i> (GLUT5)	Mm00600311_m1	7 - 8
<i>Slc5a1</i> (SGLT1)	Mm00451203_m1	5 - 6
<i>Slc27a4</i> (FATP4)	Mm01327414_g1	9 - 10

Die verwendete β -Aktin-Sonde wurde in der Arbeitsgruppe Schürmann entworfen, die Sequenzen der *Primer* und der Sonde sind hierbei:

act_b_design_for: 5' GCCAACCGTGAAAAGATGAC 3'

act_b_design_rev: 5' TACGACCAGAGGCATACAG 3'

Sonde: 5' TTGAGACCTTCAACACCCCAGCCA 3',

Modifikationen: 5' FAM, 3' TAMRA

2.1.4 Reaktionskits

Tabelle 2.4: Verwendete Reaktionskits

Amersham [®] ECL [®] Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, München
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Cholesterol Liquicolor	Human, Wiesbaden
Free Glycerol Determination Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Invisorb [®] Genomic DNA Kit II	Invitek, Berlin
L-Lactate (LAC)	Randox, Krefeld
NEFA-C	Wako Chemicals, Neuss

Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
RANBUT Kit	Randox, Krefeld
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser (Milli-Q® Ultrapure Water Purification System, Millipore, Schwalbach) angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert (25 min, 121 °C, 1 bar). Die Zusammensetzungen der jeweiligen Lösungen sind unter den entsprechenden Methoden aufgeführt. Die Einstellung des pH-Werts erfolgte mit 1 M HCL oder 1 M NaOH. Hitze-labile Lösungsbestandteile wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und nach dem Autoklavieren zugesetzt.

2.1.6 Chemikalien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) in der Qualitätsklasse p.a. bezogen.

2.1.7 Mausdiäten

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der verwendeten Diäten

Diät	Kalorienprozent aus			Energie- gehalt kcal/g	Art.-Nr.	Hersteller
	Protein	Kohlen- hydraten	Fett			
Haltungsdiät (HD)	23	69	8	3,1	V153 x R/M-H	ssniff Spezial- diäten (Soest)
Fetteiche, Kohlenhydrat- arme Diät (CFD)	27,8	0	72,2	3,7	C1057 Sonder- diät	Altromin Spezial- futter (Lage)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen

Den Mäusen wurde beim Absetzen im Alter von drei Wochen ein ca. 3-4 mm großes Stück der Schwanzspitze abgetrennt. Die Isolation der DNA wurde mit dem Invisorb Genomic DNA-Kit II (Invitex, Berlin) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt und eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 10 ng/µl hergestellt.

2.2.2 RNA-Isolierung aus murinen Geweben

Die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Maus wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Das Gewebe wurde gemörsert und 30-100 mg (abhängig von der Gewebeart) wurde mit 1 ml *quiazol* Reagenz zur Lyse versetzt. Die Homogenisierung erfolgte im TissueLyser II (Qiagen, Hilden). Das Lysat wurde nach Zugabe von 200 µl Chloroform 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge® *fresco*, Heraeus®, Hanau) und der Überstand mit 600 µl Ethanol (75%) versetzt. Hintereinander wurden jeweils 600 µl des Gemisches auf die Säule gegeben und 15 s bei 13.000 rpm (Biofuge® *pico*, Heraeus®) zentrifugiert. Es folgten hintereinander die Zugabe von 700 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer auf die Säule mit anschließendem Zentrifugationsschritt (1 min bei 13.000 rpm). Am Ende folgte eine 2-minütige Inkubation der Säule mit 100 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat-Wasser) und eine finale Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm. Die Konzentrationsbestimmung und Lagerung erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde mittels des NanoDrop ND-1000 der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH durchgeführt. Vermessen wurden jeweils 1,2 µl DNA- oder RNA-Lösung. Als Nullwert diente DEPC-H₂O. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die DNA-Proben bei -20 °C und die RNA-Proben bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.2.4 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Unter Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) versteht man die spezifische *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1985). Unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden (*Primern*), einer thermostabilen DNA-Polymerase, sowie den vier Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) können individuelle DNA-Fragmente in großer Menge synthetisiert werden. Zur Genotypisierung von Zucht- und Versuchstieren wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit spezifischen *Primern* (siehe 2.1.2.1), dNTPs (Fermentas, St. Leon-Rot), sowie der Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland). Die Genotypisierungs-PCRs wurden im 20 µl Maßstab angesetzt und in einem *Thermocycler* (DNA Engine Tetrad2 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad, München) durchgeführt.

Die PCR-Bedingungen der initialen Denaturierung, Denaturierung, Elongation und finalen Elongation wurden entsprechend der verwendeten Polymerase optimiert, die Länge der Elongationsphase und die Annealing-Temperatur wurden entsprechend der Amplifikatslänge bzw. der Schmelztemperatur der *Primer* optimiert.

Für den Nachweis der Cre-Rekombinase wurden *Primer* verwendet, die auf der codierenden Sequenz der Cre-Rekombinase liegen. Für Cre-positive Tiere entsteht ein Produkt von ca. 390 bp, im Fall der WT-Situation entsteht kein PCR-Amplifikat.

Reaktionsansatz und Bedingungen der Cre-Genotypisierungs-PCR:

Reaktionsansatz:		Temperatur-Zeit-Programm:		
DNA (10 ng/µl)	4 µl	1 x	98 °C	30 s
HF-Puffer (5x)	4 µl	31 x	98 °C	10 s
dNTP-Mix (25 mM/dNTP)	2 µl		56 °C	30 s
5`- <i>Primer</i> (10 µM)	0,5 µl		72 °C	10 s
3`- <i>Primer</i> (10 µM)	0,5 µl	1 x	72 °C	10 min
Phusion-Polymerase (2U/µl)	0,2 µl		4 °C	∞
dest. H ₂ O	ad 20 µl			

Zur Genotypisierung der inserierten loxP-Elemente wurden die in 2.1.2.1 aufgeführten *Primer* verwendet, welche die beiden loxP-Elemente einschließen. Durch die inserierten loxP-Sequenzen und Reste des pFlox-Vektors ergibt sich für die Amplifikate des WT-Allels und des *Arfrp1^{fllox}*-Allels ein Größenunterschied von 200 Basenpaaren, der elektrophoretisch nachgewiesen werden kann. Bei homozygoten loxP-Allel-Tieren wird nur das längere Fragment und bei homozygoten

Wildtyp-Allel-Tieren nur das kürzere gebildet, heterozygote Tiere bilden beide Amplifikate.

Reaktionsansatz und Bedingungen der loxP-Genotypisierungs-PCR:

Reaktionsansatz:		Temperatur-Zeit-Programm:		
DNA (10 ng/μl)	4 μl	1 x	98 °C	30 s
HF-Puffer (5x)	4 μl	31 x	98 °C	10 s
dNTP-Mix (25 mM/dNTP)	2 μl		61,5 °C	30 s
5`-Primer (10 μM)	0,5 μl		72 °C	30 s
3`-Primer (10 μM)	0,5 μl	1 x	72 °C	10 min
Phusion-Polymerase (2U/μl)	0,2 μl		4 °C	∞
dest. H ₂ O	ad 20 μl			

2.2.5 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach erfolgter Amplifikation wurde eine Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Abhängig von der Größe der zu detektierenden DNA-Fragmente wurden Gele mit Konzentrationen zwischen 0,8% bis 2,0% (w/v) angefertigt. Entsprechende Mengen Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) wurden mit TAE-Puffer versetzt, in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen in Gelkammern gegossen. Zur Detektion wurden der noch flüssigen Gellösung 0,1 μg/ml Ethidiumbromid (ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) zugesetzt.

TAE-Puffer, pH 8,0:

40 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
20 mM Eisessig

Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 V in Elektrophoreseapparaturen der Firma Biometra (Göttingen). Zur Größenbestimmung wurden die 1 kb- oder 50 bp-Leiter von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems E.A.S.Y Win32 (Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch) bei einer Wellenlänge von 312 nm.

2.2.6 Erststrang-cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte auf Basis der isolierten Gesamt-RNA unter Verwendung von SuperScript™ III Reversen Transcriptase (Invitrogen). Die

einzelnen Arbeitsschritte erfolgten nach den Vorgaben des Herstellers. Zur Synthese wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die verwendeten *Random-Hexanukleotid-primer* und dNTPs wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Zur Überprüfung der Reinheit der synthetisierten cDNA wurde eine PCR mit *Primern* spezifisch für Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und der GoTaq®-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) durchgeführt. Die Lagerung der cDNA-Proben erfolgte bei -20 °C.

Reaktionsansatz und Bedingungen der cDNA-Kontroll-PCR:

Reaktionsansatz:		Temperatur-Zeit-Programm:		
cDNA	0,5 µl	1 x	95 °C	2 min
GoTaq-Puffer (5x)	2 µl	30 x	95 °C	30 s
dNTP-Mix (25 mM/dNTP)	1 µl		56 °C	30 s
5`-Primer (6,6 µM)	0,5 µl		72 °C	1 min
3`-Primer (6,6 µM)	0,5 µl	1 x	72 °C	2 min
GoTaq-Polymerase (5U/µl)	0,2 µl		4 °C	∞
dest. H ₂ O	ad 10 µl			

2.2.7 *Arfrp1*-RT-PCR

Mittels RT-PCR wurde die gewebsspezifische Deletion der Exone zwei bis vier des *Arfrp1*-Gens kontrolliert. Mittels spezifischen Primern (siehe 2.1.2.3) auf Exon 1 und Exon 5 des *Arfrp1*-Gens konnte cDNA aus Geweben von Kontroll- und *Knockout*-Tieren auf die Cre-vermittelte Rekombination untersucht werden. Dabei wird ein Amplifikat von 450 bp für das WT-*Arfrp1*-Gen erwartet, wohingegen im Falle einer Deletion der Exone zwei bis vier das resultierende Produkt nur 150 bp lang ist. Für die RT-PCR wurde die JumpStart™ REDAccuTaq™ DNA Polymerase der Firma Sigma verwendet.

Reaktionsansatz und Bedingungen der RT-PCR:

Reaktionsansatz:		Temperatur-Zeit-Programm:		
cDNA	2 µl	1 x	95 °C	2 min
AccuTaq-Puffer (10x)	2 µl	35 x	95 °C	45 s
dNTP-Mix (25 mM/dNTP)	2 µl		58 °C	30 s
5`-Primer (10 µM)	2 µl		68 °C	30 s
3`-Primer (10 µM)	2 µl	1 x	68 °C	10 min
AccuTaq (1U/µl)	0,6 µl		4 °C	∞
dest. H ₂ O	ad 20 µl			

2.2.8 Quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR)

Die Bestimmung der Expressionsstärken verschiedener Gene wurde mittels quantitativer *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des 7500 Fast Real-Time PCR Systems von Applied Biosystems (Darmstadt) und TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems, siehe 2.1.3). Für alle Reaktionen wurden genspezifischen TaqMan[®]-Sonden so gewählt, dass exon-übergreifende Nukleotidsequenzen amplifiziert wurden. Die Sonden sind mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen markiert, wobei die Fluoreszenz des 5'-Reporterfarbstoffs (FAM) bei intakter Sonde durch die räumliche Nähe des 3'-Quencherfarbstoffs (TAMRA) unterdrückt wird. Durch die 5'-nukleolytischen Aktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde während der PCR-Elongation gespalten, wodurch die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr unterdrückt wird. Die so entstehende Lichtemission ist direkt proportional zu der Menge des gebildeten PCR-Produkts. Die Quantifizierung erfolgte über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001) wobei β -Aktin als Bezugsgen verwendet wurde. Als Ct-Wert (*threshold cycle*) wurde derjenige PCR-Zyklus bestimmt, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal in den exponentiellen Anstieg überging. Die qRT-PCR wurde in einem Volumen von 10 μ l mit 2 ng cDNA sowie 0,5 μ l der entsprechenden Sonde und 1 x TaqMan[®] Universal PCR Master-Mix, No AmpErase[®] UNG (Applied Biosystems) durchgeführt. Die PCR erfolgte in optisch durchlässigen 96-Well-Platten. Ein einleitender Dekontaminierungsschritt für 2 min bei 50°C führte zum Abbau eventuell vorhandener Uracil-haltiger Amplikons. Es folgte eine initiale Denaturierung für 10 min, sowie 40 Zyklen mit je einer Denaturierung für 15 s bei 95°C und einem kombinierten Anlagerungs- und Elongationsschritt für 1 min bei 60°C, entsprechend der Angaben von Applied Biosystems. Die Analyse der cDNA-*templates* erfolgte in Triplikaten, um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von MDCK-Zellen

MDCK-T23-Zellen, die mittels eines Tet-Off-Systems ein mit einem Myc-Tag fusioniertes ARFRP1-Protein (myc-ARFP1) exprimieren, wurden wie in Zahn *et al.* 2008 beschrieben generiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einer

wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂. Zur Passagierung der Zellen wurden sie mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin (0,05 % Trypsin/EDTA; Seromed, Berlin, Deutschland) bei 37 °C trypsinisiert. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellen in der gewünschten Verdünnung neu ausgesät. Als Kulturmedium wurde DMEM High Glucose/Na-pyruvate mit 10% FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (alles PAA Laboratories, Linz, Österreich) verwendet. Als Selektionsdruck zur Erhaltung der Expression des *tetracycline-repressible transactivators* und myc-ARFRP1 wurden dem Medium Puromycin (5 µl / 500 ml) und Hygromycin (0,3 mg/ml) zugesetzt. Zur Kultivierung wurden zusätzlich 40 ng/ml Doxycyclin zugegeben um die Expression von myc-ARFRP1 zu unterbinden. Zur Aufrechterhaltung der Hemmung musste das Kulturmedium alle 48 h ausgetauscht und dabei Doxycyclin frisch zugegeben werden. Für die Versuche wurde das Medium durch Doxycyclin-freies Medium ausgetauscht und so eine Expression von myc-ARFRP1 initiiert.

2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Die trypsinisierten und in Kulturmedium sedimentierten Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryokonserven überführt. Das Einfriermedium bestand aus 90 % des für die Zelllinie benutzen Mediums und 10 % DMSO. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert, bei -80 °C für wenige Tage gelagert, um sie dann in flüssigem Stickstoff (-196 °C) über längere Zeiträume vital zu halten.

2.3.3 Auftauen der kryokonservierten Zellen

Im 37 °C warmen Wasserbad wurden die Kryokonserven solange aufgetaut, bis nur noch kleine Eiskristalle zu erkennen waren. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium pipettiert und sedimentiert. Es folgte die Resuspension des Pellets in Kulturmedium und Aussäen der Zellen auf die gewünschten Kulturschalen.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten der MDCK-Zellen zur *Westernblot*-Analyse wurde nach Kultivierung der Zellen das Medium abgesaugt, der Zellrasen kurz mit PBS gewaschen, die Zellen trypsiniert und nach Abstopfung der Reaktion mit Medium wurden die Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und in 200 µl kaltem RIPA-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zur Lyse 30 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 16060 x g bei 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Proteinbestimmung bzw. der Analyse bei -80 °C gelagert.

RIPA-Puffer (pH 7,4):

790 mg	Tris-HCl
900 mg	NaCl
2,5 ml	10%ige Na-Deoxychelate-Lösung
1 ml	TritonX
1 ml	10mM EDTA-Lösung

2.4.2 Isolation von Proteinen aus murinen Geweben

2.4.2.1 Gewinnung von Gesamtmenbranpellets

Die in Stickstoff schockgefrorenen Gewebe wurden auf Eis mit 1 ml TES-Puffer versetzt und anschließend im TissueLyser II (Qiagen, Hilden) homogenisiert. Die Homogenate wurden in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und mit einem weiteren ml TES-Puffer versetzt. Es folgte eine Zentrifugation bei 200.000 x g und 4 °C für eine Stunde (Optima™ Max Ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA), um die Membranen von der zytosolischen Fraktion zu trennen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Abhängigkeit von Gewebe und Menge in 100 – 300 µl TES-Puffer resuspendiert und die Proben bis zur Analyse bzw. Proteinkonzentrationsbestimmung bei -80 °C gelagert. Vor der Durchführung wurden dem TES-Puffer frisch Aprotinin, PMSF und Leupeptin als Proteinase-Inhibitoren zugesetzt.

TES-Puffer (pH 7,4):

20 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA
250 mM	Saccharose

2.4.2.2 Gewinnung von zellfreien Proteinlysaten

Zur Herstellung von zellfreien Proteinlysaten wurden ca. 50 mg des in Stickstoff schockgefrorenen Gewebes mit 400 µl Lysepuffer versetzt und anschließend im TissueLyser II (Qiagen) homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C für 10 min bei 16060 x g zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert. Das so gewonnene Lysat wurde bei -80 °C gelagert.

Lysepuffer (pH 7,5):

20 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
1 %	Triton-X-100
2,5 mM	Natriumpyrophosphat
frisch zugegeben:	
40 µl/ml	Complete™ (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
1 mM	Na-Orthovanadat

2.4.3 Proteingehaltsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten und Gesamtmembranpellets wurde der *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben (*Microwell Plate Protocol*) verwendet. Als Kalibrierreihe wurden acht verschiedene Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA) mitgeführt und ermöglichten eine Konzentrationsbestimmung im Bereich von 0,5-7,0 µg Protein/µl.

2.4.4 Westernblot-Analyse

Die *Westernblot*-Analyse (Towbin *et al.*, 1979) ist eine klassische Methode, Protein nach vorangegangener SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese immunchemisch nachzuweisen.

2.4.4.1 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch Anlagerung von SDS-Molekülen an Proteine werden Tertiär- und Quartärstrukturen zerstört, sowie Ladungsunterschiede neutralisiert, außerdem werden die Proteine mit einer negativen Ladung bestückt, wodurch sie in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) zur Anode wandern und so in der Polyacrylamid-Matrix aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

20 µg Protein wurden mit H₂O auf ein Volumen von 12 µl gebracht und mit 4 µl 2x Laemmli-Puffer/DTT (60 mg/ml) versetzt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden sie 30 min bei RT inkubiert und schließlich durch SDS-PAGE getrennt. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems mit einem Sammelgel- und einem Trenngel erlaubte hierbei eine optimale Trennschärfe der Proteine. Die Prozentigkeit des Trenngels richtet sich nach dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins. Das Trenngel wurde zwischen zwei abgedichtete Glasplatten (Biometra, Göttingen) gegossen und mit 0,2%iger SDS-Lösung überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde die 0,2%ige SDS-Lösung entfernt, das Sammelgel eingefüllt und zur Ausbildung von Probenfächerchen mit einem Kamm versetzt.

Die Elektrophorese in Elektrophorese-Puffer und wurde im Minigel-Twin, PowerPack P25 (Biometra, Göttingen) bei einer Stromstärke von 10 mA/pro Gel im Sammelgel und 20 mA/pro Gel im Trenngel durchgeführt. Zur Analyse des Molekulargewichts wurde mit den Proben ein Proteingrößenstandard (Precision Plus ProteinTM Standard Dual Color, Bio-Rad, München) aufgetragen.

Elektrophoresepuffer (pH 8,4):

25 mM	Tris
250 mM	Glycin
0,1%	SDS

2x Laemmli-Puffer:

20%	Glycerin
8%	SDS
10 mM	EDTA
250 mM	Tris
1%	Bromphenolblau

Unterer Gelpuffer (pH 8,8):

1,5 M	Tris
0,4%	SDS

Oberer Gelpuffer (pH 6,8):

0,5 M	Tris
0,4%	SDS

Trenngel: 8%/10%/12%/14%

Unterer Gelpuffer	1,56 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (Bio-Rad, München)	1,6/2,0/2,4/2,8 ml
H ₂ O	2,84/2,44/2,04/1,64 ml
Ammoniumpersulfat (0,5mg/μl)	12 μl
TEMED	6 μl

Kammgel:

Oberer Gelpuffer	520 μl
30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	260 μl
H ₂ O	1,22 ml
Ammoniumpersulfat (0,5mg/μl)	4 μl
TEMED	2 μl

2.4.4.2 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulosemembranen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer TankBlot-Apparatur (TankBlot Mighty-Small-Transphor, Amersham-Biosciences, Freiburg) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher&Schuell, Dassel) transferiert. Der Transfer wurde in Transferpuffer bei 200 mA für eine Stunde durchgeführt

Transferpuffer (pH 8,4):

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol

2.4.4.3 Immunchemische Detektion von Proteinen mittels Peroxidase-vermittelter Chemilumineszenz

Die Nitrozellulosemembran mit den immobilisierten Proteinen wurde in TBS-Tween (0,05% Tween[®] 20) mit 5% Magermilchpulver für 1 h bei RT geblockt. Danach folgte eine Inkubation mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu detektierende Protein. Die Verdünnung der Antikörper (siehe 2.1.1.1) erfolgte ebenfalls in TBS-Tween mit 5% Magermilchpulver. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend für 1x 15 min und 3x 5 min in TBS-Tween geschwenkt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei RT mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (siehe 2.1.1.2), der ebenfalls in TBS-Tween mit 5% Magermilchpulver verdünnt wurde. Abschließend wurde die Nitrozellulosemembran erneut gewaschen und der Antikörperkomplex mittels eines Chemilumineszenz-Assays (Amersham[®] ECL[®] Western Blotting

Analysis System, GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben detektiert. Hierbei oxidiert die am sekundäre Antikörper lokalisierte Peroxidase das Luminol der Substratlösung unter Beteiligung von Wasserstoffperoxid. Das dabei entstehende Lichtsignal wurde von einer Lichtempfindlichen Kamera (FUJIFILM LAS-1000, Düsseldorf) detektiert und mit Hilfe der entsprechenden Software ausgewertet (Image Reader LAS-1000).

2.4.5 Immunpräzipitation

Myc-ARFRP1-exprimierende MDCK-T23-Zellen wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Huber (Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin) nach 96 h Kultivierung ohne Doxycyclin für 10 min bei 4 °C in eiskaltem Lysispuffer (10 mM Imidazol (pH 6,8), 0,1 M NaVO₃, 0,2 % (v/v) Triton X-100, *Complete*-EDTA Protease-Inhibitor-Gemisch) inkubiert. Ausgehend von Zelllysaten (400 µg Protein/Ansatz) wurde die Immunpräzipitation mit 4 µg monoklonalem anti-Myc (9E10)-Antikörper, der an Protein-A-Beads gebunden war, wie beschrieben (Weiske & Huber, 2005; Weiske *et al.*, 2001) durchgeführt.

2.4.6 Gewebeextraktion zur Bestimmung der Triglyceride

Das bei -80 °C gelagerte Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert. 20-30 mg wurden zusammen mit HB-Puffer (1 ml HB-Puffer pro 40 mg Gewebe) im TissueLyser II (Qiagen) homogenisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 16060 x g und 4 °C (Biofuge fresco, Heraeus). Der Überstand wurde abgenommen, für 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und zur Bestimmung von Triglyceriden und Proteinen eingesetzt.

2.5 Histologie, indirekte Immunhisto- und Immunzytochemie

2.5.1 Indirekte Immunzytochemie und konfokale *Laser Scanning*-Mikroskopie

Die auf Deckgläschen kultivierten MDCK-Zellen wurden kurz mit warmem PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit 3% Paraformaldehyd fixiert. Danach wurden

die Zellen 3x 3 min mit PBS und 3x 3 min mit 50 mM NH₄Cl in PBS gewaschen. Es folgte eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,2% Saponin in PBS für 6 min, danach wurden die Zellen mit 0,02% Saponin in PBS für 5 min gewaschen. Zur Blockierung folgte eine 30 minütige Inkubation mit Blockpuffer (2% BSA, 0,02% Saponin in PBS). Die Inkubation mit den primären Antikörpern (siehe 2.1.1.1) in Blockpuffer erfolgte für 1 h bei RT. Nach 3x 7 min Waschen mit 0,02% Saponin in PBS wurden die Zellen mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (siehe 2.1.1.2) in Blockpuffer inkubiert. Abschließend wurde 3x 7 min mit 0,02% Saponin in PBS gewaschen und die Zellen in *Fluorescent Mounting Medium* (Dako) eingedeckt und mit einem Leica-TCS-SP2- *Laser-Scan-Inverted-Mikroskop* (Leica Microsystems, Heidelberg) analysiert. Die Anregung der Fluoreszenz-Farbstoffe mit einem Argon-Krypton-Laser (488 nm) und mit einem Helium-Neon-Laser (543 nm) erfolgte sequentiell. Licht-Emissionen wurden bei 510-560 nm bzw. 580-660 nm detektiert. Die erhaltenen Bilder (1,024 x 1,024 Pixel) wurden mit Corel PHOTO-PAINT 10.0 (Coral Corporation) bearbeitet.

2.5.2 Gewebeaufarbeitung

2.5.2.1 Paraformaldehyd-Fixierung und Gewebeeinbettung

Die entnommenen Mausgewebe wurden für 24 h in 4 % PFA/PBS-Lösung bei RT fixiert und anschließend 24 h unter fließendem Leitungswasser gespült. Vor der Einbettung der Gewebe in Histoplast (Shandon, Frankfurt) wurde das Gewebe dehydriert. Die Dehydrierung fand in einem Entwässerungsautomaten (Hypercenter[®] XP, Shandon, Frankfurt) über aufsteigende Alkoholkonzentrationen und Toluol statt.

Gewebeeinbettung:

Ethanol, 55%	90 min	40 °C
Ethanol, 70%	90 min	40 °C
Ethanol, 96%	90 min	40 °C
Ethanol, 100%	60 min	40 °C
Ethanol, 100%	90 min	40 °C
Ethanol, 100%	120 min	40 °C
Toluol	90 min	40 °C
Toluol	150 min	40 °C
Histoplast	60 min	60 °C
Histoplast	180 min	60 °C

Im nächsten Schritt wurden 2 µm dicke Mikrotom-Schnitte des eingebetteten Gewebes angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Diese mussten vor den immunhistochemischen Analysen entparaffiniert werden, dies erfolgte mittels den angegebenen Lösungen in einem Automaten (Cellstain[®]-Histo, Tharmac, Waldsolms).

Rehydrieren von Schnitten:

Toluol	2:00 min
Toluol	3:00 min
Ethanol, 100%	2:00 min
Ethanol, 100%	3:00 min
Ethanol, 96%	2:00 min
Ethanol, 70%	1:45 min
Ethanol, 40%	1:45 min
ddH ₂ O	1:30 min

2.5.2.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die bei -80 °C gelagerten Gewebe mit einem Gewebekleber (Tissue-Tek[®], Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL) auf einem Träger fixiert und an einem Gefriermikrotom bei -20 °C geschnitten. Die 5 µm dicken Schnitte wurden auf Objektträger gezogen, kurz bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich bei -80 °C gelagert.

2.5.3 Oil-Red-O-Färbung von Geweben

Die *Oil-Red-O*-Färbung, welche neutrale Lipide anfärbt, wurde zum Nachweis von Lipidtropfen auf Gefrierschnitten verwendet. Zuerst erfolgte die Herstellung einer 0,5 %igen Stocklösung von *Oil-Red-O* in Isopropanol. Drei Teile der Stocklösung wurden mit zwei Teilen Wasser vermischt und durch ein Whatman-Papier gefiltert um ungelöste Reste zu entfernen. Gefrierschnitte wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend für 5 min in 4% Formaldehyd fixiert. Danach wurden die Schnitte für 10 min in H₂O und für 5 min in 60%igem Isopropylalkohol gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Schnitte mit der *Oil-Red-O*-Färbelösung für 10 min bei RT. Abschließend wurden die Schnitte zuerst in 60% Isopropanol, danach in H₂O gewaschen und anschließend eingedeckt (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako, Hamburg). Der mikroskopische Nachweis, sowie die Dokumentation erfolgte mit dem Licht- und Fluoreszenz-Mikroskop ECLIPSE E-100 (Nikon,

Düsseldorf) in Kombination mit der Video-Kamera CCD-1300CB (Vosskühler, Osnabrück) und dem Echtfarbbildanalysesystem LUCIA G (Nikon).

2.5.4 Indirekte Immunhistochemie

Nach Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte zur Demaskierung der Antikörperbindungsstellen einer Hitzebehandlung (Mikrowelle, 2,5 min, 850 W) in REAL™Target Retrieval Solution (Dako, Hamburg) unterzogen. Nach Abkühlung wurden die Schnitte in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Antikörper-Verdünnungsmedium (Dako) für 30 min bei RT. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer mit den in Antikörper-Verdünnungsmedium verdünnten Primärantikörpern (siehe 2.1.1.1) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte 3x mit TBS-Tween (0,1% Tween® 80) und 1x 3 min mit TBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (siehe 2.1.1.2) für 30 min in einer feuchten Kammer bei RT. Hierbei wurde, zu Färbung der Kerne TOPRO-3-Iodid in einer Verdünnung von 1:500 zugegeben. Abschließend wurden die Objektträger wie zuvor in TBS-Tween und TBS gewaschen und eingedeckt (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence, Vector Lab., Burlingame, CA, USA). Die Analyse der Färbungen erfolgte am Leica-TCS-SP2- *Laser-Scan-Inverted*-Mikroskop wie unter 2.5.1 beschrieben.

TBS-Puffer (pH 7,6):

5 mM	Tris
150 mM	NaCl
3,7% (v/v)	1M HCl

2.5.5 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Darstellung des Darms von *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen und ihrer *Arfrp1^{flox/flox}*-Geschwister erfolgte in Kooperation mit Prof. Gruber (Institut für Tierpathologie, FU-Berlin). Kurze Stücke des Darms wurden nach Gewebeentnahme in Karnovsky-Puffer fixiert. Anschließend wurde das Gewebe in 1% Osmiumtetroxid in Na-Cacodylat-Puffer inkubiert, danach dehydriert und in Epon-Araldite eingebettet. Die Blockkontrastierung erfolgte in 1% Uranylacetat und 0,5% Phosphorwolframsäure. Ultradünnschnitte (50-60 nm) wurden mit Bleicitrat gefärbt und an einem Zeiss EM10 Elektronenmikroskop analysiert.

<u>Karnovsky-Puffer (pH 7,4):</u>		<u>Cacodylatpuffer (pH 7,4):</u>	
400 ml	7,5% Paraformaldehyd	200 mM	Cacodylsäure (Na-Salz)
300 ml	25% Glutaraldehyd		
300 ml	Cacodylatpuffer		
500 mg	CaCl ₂		

2.6 Phänotypische Charakterisierung der *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Maus

2.6.1 Versuchstierhaltung

Die Versuchstiere wurden im Max-Rubner-Laboratorium des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung in isolierten, klimatisierten Räumen bei einer Temperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten. Die Haltungsräume unterlagen einem 12h/12h Tag-/Nacht-Rhythmus. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Übereinstimmung mit den von der FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*) vorgegebenen Richtlinien zur Pflege und Nutzung von Versuchstieren, desweiteren wurden alle Versuche von der Tierversuchskommission des Ministerium für Ländliche Entwicklung, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Brandenburg genehmigt (32-44457+36 und 23-2347-8-19-2008).

2.6.2 Zucht der Darm-spezifischen *Arfrp1*-Nullmutante

Zur Generierung der Darm-spezifischen *Arfrp1*-Deletion wurde das Cre/loxP-Rekombinationssystem (Gu *et al.*, 1994; Lewandoski, 2001) verwendet. Hierzu wurden homozygote B6;129S3-*Arfrp1*^{tm1.1}-Tiere (Zahn, Dissertation, 2007) aus dem *Intercross* der N3-Generation mit der transgenen villin-Cre-Mauslinie (Madison *et al.*, 2002) verpaart. Cre-positive F1-Nachkommen aus dieser Verpaarung wurden, zur Generierung der Versuchstiere, mit homozygoten B6;129S3-*Arfrp1*^{tm1.1}-Tieren verpaart. Durch diese Verpaarung wurden sowohl die Darm-spezifischen *Knockout*-Tiere, die homozygot das für das gefloخته Allel von *Arfrp1* sind und zusätzlich heterozygot das Cre-Rekombinasegen besitzen (*Arfrp1*^{vil^{-/-}}) als auch die Kontrolltiere, die ebenfalls homozygot das gefloخته Allel von *Arfrp1* tragen, jedoch Cre-negativ sind (*Arfrp1*^{flox/flox}), erzeugt.

2.6.3 Messung des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung

Das Körpergewicht von nicht-gefasteten Kontroll- und *Knockout*-Tieren im Alter von drei, 14 und 28 Tagen wurde mit einer elektronischen Waage (Satorius, Göttingen) ermittelt. Im Alter von 28 Tagen erfolgte im Anschluss die Messung der Körperzusammensetzung mit Hilfe eines Kernresonanzspektrometers (Bruker-Minispec-NMR-analyser mq 10, Bruker Optics, Houston, USA). Das Spektrometer wurde dabei vor jedem Einsatz mit Rapssamen adjustiert, die einen definierten Eiweiß- und Fettgehalt besaßen.

2.6.4 Bestimmung der Blutglucosespiegel

Die Bestimmung der Blutglucosewerte der Tiere im gefütterten oder nüchternen (15 h gefastet über Nacht) Zustand erfolgte morgens zwischen 8 und 9 Uhr. Die Messungen wurden mit einem Blutzuckerhandmessgerät (Glucose Elite) der Firma Bayer (Leverkusen) durchgeführt. Dafür wurde den Tieren mittels Schwanzvenenpunktion Blut entnommen und über Sensorplättchen mit dem Gerät als Vollblut vermessen. Das Messprinzip beruht auf der Reaktion von Glucose mit dem Enzym Glucoseoxidase, wobei die in der Reaktion entstandenen Elektronen gemessen wurden.

2.6.5 Blutentnahme

Zur Analyse der metabolischen Parameter wurden den Tieren im Alter von vier bis fünf Wochen Blut entnommen. Die Entnahme erfolgte entweder aus der Schwanzvene, durch Kappen der Schwanzspitze, oder nach vorangehender Narkose mit Isofluran, durch Herzpunktion. Das Blut wurde bis zur Zentrifugation in mit Lithium-Heparin oder EDTA beschichteten Gefäßen auf Eis aufbewahrt und der Plasmaüberstand bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Die Blutabnahmen fanden zwischen 9 und 10 Uhr morgens statt, entweder im gefütterten Zustand oder nach einer 15-stündigen Fastenzeit über Nacht.

2.6.6 Tötung der Tiere und Gewebepräparation

Unter Isoflurananästhesie wurden die Mäuse durch Herzpunktion entblutet (4,5 ml EDTA Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht) und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Das Blut wurde bei 4 °C bei 3800 x g für 10 min zentrifugiert

(Heraeus Varifuge 3.0R, Kendro, Langenselbold). Der Plasmaüberstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert. Organe zur Isolation von RNA oder Protein wurden nach Entnahme gewogen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Gewebe für histologische Untersuchungen wurden direkt nach Entnahme in 4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Für die Präparation der Mucosa zur Isolation von Proteinen wurden spezifische Darmabschnitte entnommen und mit eisgekühltem PBS gespült. Anschließend wurde das Darmstück mit einer Knopfschere aufgeschnitten und mit der Muskelschicht auf einer eisgekühlten Platte gelagert. Die Mucosa wurde mittels eines Plastikspatels abgeschabt und zur sofortigen Aufarbeitung in kalten TES-Puffer überführt.

2.6.7 Oraler Glucose-Toleranztest

Zur Durchführung eines oralen Glucose-Toleranztests (oGTT) wurden die Mäuse für 16 h gefastet, hatten jedoch über den gesamten Versuchszeitraum freien Zugang zum Trinkwasser. Anschließend wurde zur Bestimmung der Nüchtern-Blutglucose Blut aus der Schwanzvene entnommen. Es folgte die orale Gabe einer Einmaldosis einer 20 %igen Glucoselösung (Fresenius, Bad Homburg) in Abhängigkeit des Körpergewichts (2 mg Glucose pro g Körpergewicht). Zu den Zeitpunkten 7,5, 15, 30, 60, 120 und 150 min wurden die Blutglucose-Werte bestimmt.

2.6.8 Oraler Fett-Toleranztest

Mit Hilfe des oralen Fett-Toleranztests (oFTT) lässt sich die Absorption von Nahrungslipiden sowie der postprandiale Fettstoffwechsel untersuchen. Tiere im Alter von 4-5 Wochen wurden über Nacht 12 h nüchtern gesetzt hatten jedoch über den gesamten Versuchszeitraum freien Zugang zum Trinkwasser. Es folgte eine basale Blutentnahme zur Bestimmung der Triglyceridkonzentration im Plasma, sowie eine Gewichtsbestimmung der Tiere. Zum Zeitpunkt 0 bekamen die Tiere 10 µl/g Körpergewicht Olivenöl gavagiert. Es folgten die Blutentnahmen zu den Zeitpunkten 2, 3, 4, 6 und 12 Stunden nach Öl-Applikation.

2.6.9 Bestimmung der Triglyceridsekretion des Darms nach Behandlung mit Tyloxapol

Mit Hilfe von Tyloxapol kann die Aktivität der Lipasen im Plasma gehemmt werden, wodurch eine Aufnahme von Fettsäuren ins Gewebe verhindert wird, was zu einer Anreicherung Triglycerid-reicher Partikel im Blut führt. Die Versuche zur Sekretion von Triglyceriden aus dem Darm wurden in Lebenswoche vier bis fünf durchgeführt. Die Mäuse wurden dazu für fünf Stunden nüchtern gesetzt. Anschließend folgten eine Körpergewichtsbestimmung sowie eine basale Blutentnahme zur Messung der Plasma-Triglyceride. Zum Zeitpunkt 0 bekamen die Mäuse 10 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht Olivenöl gavagiert. 20 Minuten danach erfolgte eine intravenöse Applikation von 0,5 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht Tyloxapol (Triton WR-1339) als 15%ige Lösung in isotonischer NaCl-Lösung. Es folgten Blutentnahmen 30, 60 und 90 Minuten nach Tyloxapolinjektion. 100 Minuten nach Tyloxapolinjektion erfolgte eine Narkose mit Isofluran und anschließender Blutentnahme per Herzpunktion.

2.6.10 Diätetische Intervention und Ermittlung der Überlebensrate

Zur Bestimmung der Überlebensrate von Kontroll- und *Knockout*-Tieren wurden Zuchtkäfige *ad libitum* mit Haltdiät (HD) oder einer Kohlenhydrat-freien Hochfettdiät (CFD) gefüttert. Nach Geburt der Tiere wurde täglich überprüft, ob die Jungtiere noch am Leben waren, toten Tieren wurde eine Schwanzbiopsie zur Genotypisierung entnommen. Nach 21 Tagen erfolgte der Absatz der Tiere, wobei die Jungtiere nach Geschlecht getrennt wurden. Es erfolgte ebenfalls eine Schwanzbiopsie für die Genotypisierung. Beim Absatz erhielten die Jungtiere weiterhin die entsprechende Diät des Zuchtkäfigs. Anschließend wurde bis Tag 31 täglich das Überleben der Jungtiere dokumentiert.

2.7 Bestimmung metabolischer Plasmaparameter

2.7.1 Detektion freier Aminosäuren im Plasma

Die Bestimmung der Konzentrationen freier Aminosäuren im Plasma von *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen und ihrer *Arfrp1^{flox/flox}*-Geschwister erfolgte in Kooperation mit Dr. Petzke (Abteilung Analytik, DIFE Potsdam-Rehbrücke). Die Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben (Daenzer *et al.*, 2001). Hierbei wurden die Aminosäuren präzipitiert und

nach Ionenaustausch-Chromatographie mittels Ninhydrin-Nachweis detektiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe externer Standards.

2.7.2 Bestimmung der Ketonkörperkonzentrationen im Plasma

Zur Bestimmung der β -Hydroxybutyrat-Konzentrationen im Plasma der Mäuse wurde der RANBUT-Kit (Randox, Krefeld) verwendet. 5 μ l frisches Plasma von *Arfrp1*^{vil/-}- und *Arfrp1*^{flox/flox}-Tieren wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit 200 μ l Reaktionspuffer gemischt. Je 5 μ l H₂O und Standardlösung wurden als Reagenzienleerwert bzw. Vergleichsprobe mitgeführt. Es folgte eine Inkubation für 60 s bei 37°C. Anschließend wurden im Abstand von je 60 s drei Messungen der Extinktion bei 340 nm am Plattenreader (Spectra Max M2^e, Molecular Devices, Union City, CA, USA) durchgeführt. Die Konzentration von β -Hydroxybutyrat ergab sich aus der Extinktionsänderung pro Minute im Vergleich zur Standardlösung. Bei allen Reaktionskits von Randox wurde zur Qualitätskontrolle die Richtigkeitskontrollen 2 und 3 mitgeführt, die durch bekannte Konzentration der zu untersuchenden Variablen einen Rückschluss auf die Funktionalität des Assays ermöglicht.

2.7.3 Bestimmung von freien Fettsäuren im Plasma

Zur Untersuchung der freien Fettsäuren im Plasmaproben der Tiere wurde der NEFA-C-Kit (Wako, Neuss) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Testprinzip basiert hierbei auf der Umsetzung freier Fettsäuren zu Acyl-CoA durch die Acyl-CoA-Synthetase und anschließender Oxidation durch Acyl-CoA-Oxidase. Durch frei werdendes Wasserstoffperoxid kommt es zur Kondensation von 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β -Hydroxyethyl)-Anilin, wobei ein roter Farbstoff gebildet wird, der bei 550 nm photometrisch nachweisbar ist.

2.7.4 Bestimmung der Triglyceride im Plasma

Die Plasma-Triglyceridkonzentration wurde mit dem Free Glycerol Determination Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bestimmt. Triglyceride wurden hierbei durch Lipasen zu freien Fettsäuren und Glycerol umgewandelt. Das Glycerol wurde zu Glycerol-1-Phosphat (G-1-P) phosphoryliert, welches wiederum unter anderem zu Wasserstoffperoxid oxidiert wurde. H₂O₂ katalysierte letztendlich die Bildung eines

Quinonimin-Farbstoffes, der bei 540 nm photometrisch nachweisbar war. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.7.5 Bestimmung der Laktatkonzentration im Plasma

Die Plasma-Laktatkonzentration wurde mit Hilfe des L-Lactate (LAC)-Kits (Randox, Krefeld) bestimmt. Das Testprinzip beruhte hierbei auf einer enzymatischen Umsetzung von Laktat zu Pyruvat und H_2O_2 durch die Laktat-Oxidase. Frei werdendes H_2O_2 bildete mit 4-Aminoantipyrin und N-Ethyl-N-(2-Hydroxy-3-Sulphopropyl)-m-Toluidin ein lila-farbenes Produkt das bei 550 nm photometrisch nachweisbar war. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.7.6 Bestimmung der Cholesterinkonzentration im Plasma

Die Plasma-Cholesterinkonzentration wurde mittels Cholesterol Liquicolor (Human, Wiesbaden) bestimmt. Nach enzymatischer Hydrolyse und Oxidation von Cholesterinestern durch Cholesterinesterase bzw. Cholesterinoxidase bildete sich aus Wasserstoffperoxid, 4-Amino-phenazon und Phenol Chinonimin aus. Dieser Farbstoff konnte anschließend bei einer Wellenlänge von 500 nm detektiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von ARFRP1 für die korrekte Sortierung von E-Cadherin

3.1.1 Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von E-Cadherin in der *Arfrp1*^{vil/-}-Maus

Um die Rolle von *Arfrp1* für die Funktion des Darms und die Sortierung des Adhäsionsproteins E-Cadherin mit Hilfe der Darm-spezifischen *Knockout*-Maus zu untersuchen, musste zunächst die erfolgreiche und spezifische Deletion überprüft werden. Abb. 3.1 zeigt exemplarisch die qRT-PCR- (A) und die *Westernblot*-Analysen (B) von vier Wochen alten Kontroll- und *Arfrp1*^{vil/-}-Tieren, die die erfolgreiche Reduktion der *Arfrp1*-Expression bestätigten. Die mRNA-Menge war in den *Arfrp1*^{vil/-}-Mäusen um etwa 55% (Ileum) bis 65% (Colon) reduziert, während sich ein positives ARFRP1-Signal im *Westernblot* kaum nachweisen ließ.

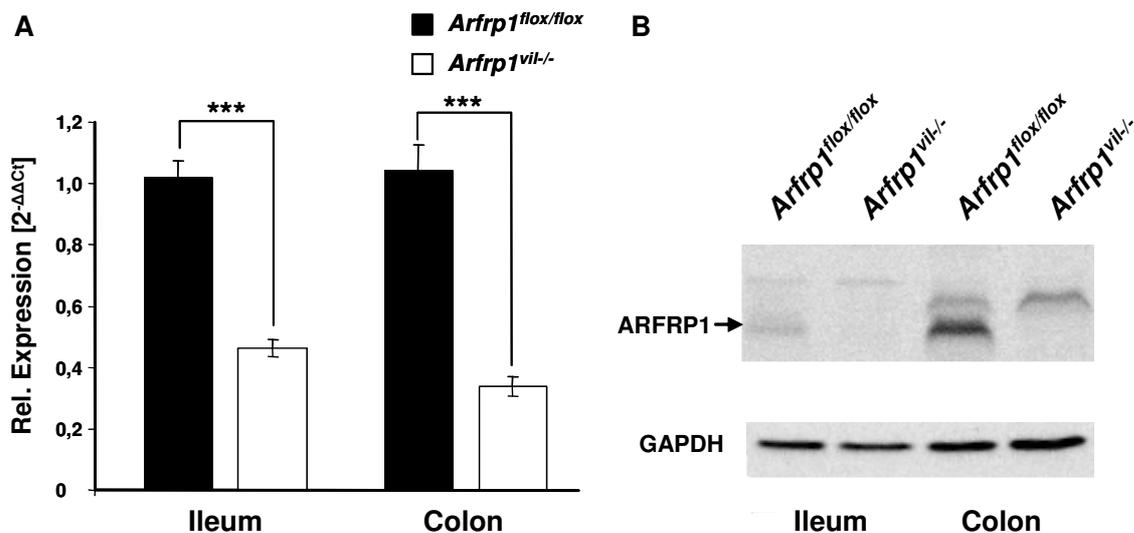


Abbildung 3.1: Reduzierter mRNA- und Proteingehalt in Darmabschnitten der *Arfrp1*^{vil/-}-Mäuse
 (A) mRNA-Gehalt von *Arfrp1* wurde mittels qRT-PCR im Ileum und Colon von Kontroll- und *Knockout*-Tieren ermittelt (n = 22 für Ileum bzw. 13 für Colon pro Genotyp, Mittelwert ± SEM, p<0,001***). (B) Lysate von Ileum und Colon vier Wochen alter *Arfrp1*^{flox/flox}- und *Arfrp1*^{vil/-}-Tiere wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit dem *anti*-ARFRP1-Antiserum inkubiert. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH nachgewiesen.

Aufgrund von *in-vitro*-Ergebnissen, die zeigten, dass ARFRP1 für die korrekte Lokalisation von E-Cadherin an der Zelloberfläche essentiell ist (Zahn, Dissertation, 2007), sowie des Befundes der intrazellulären Lokalisierung von E-Cadherin im Embryo der konventionellen *Arfrp1*-*Knockout*-Maus (Hommel, Dissertation, 2007),

wurde die subzelluläre Verteilung von E-Cadherin im Darm der Darm-spezifischen *Arfrp1*-Knockout-Maus (*Arfrp1*^{vil^{-/-}}) genauer untersucht.

Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von E-Cadherin bestätigten, dass seine Sortierung an die Plasmamembran der Epithelzelle des Darms der *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Maus gestört war (Abb. 3.2 A).

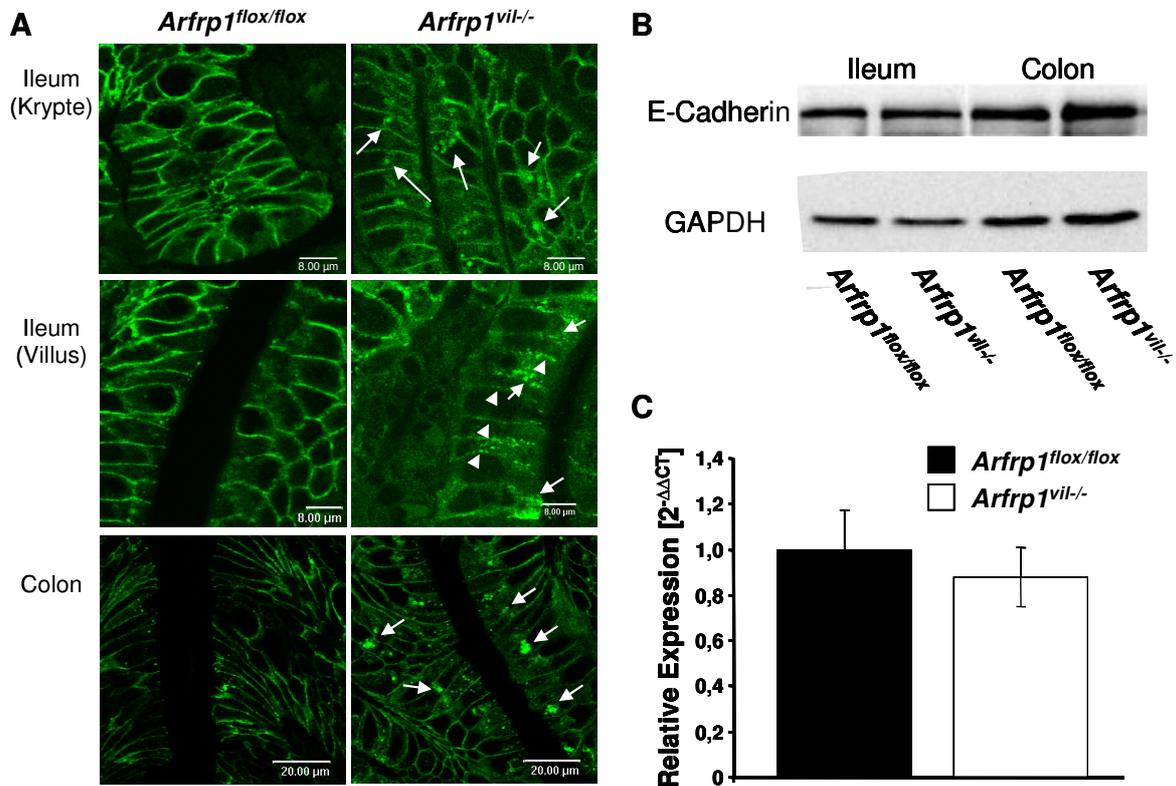


Abbildung 3.2: Veränderte Lokalisation von E-Cadherin im Darmepithel der *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Maus

(A) Ileum- und Colon-Schnitte von *Arfrp1*^{flox/flox}- und *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Tieren wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen E-Cadherin (gp84) immunhistologisch gefärbt. Pfeile weisen auf intrazellulär vorliegendes und Pfeilspitzen auf punktförmig an der Plasmamembran liegendes E-Cadherin hin. (B) Lysate von Ileum und Colon vier Wochen alter *Arfrp1*^{flox/flox}- und *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Tiere wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und diese mit dem anti-E-Cadherin-Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH nachgewiesen. (C) Die mRNA Expression von E-Cadherin wurde mittels qRT-PCR bestimmt (n = 6 pro Genotyp, Mittelwert ± SEM).

Das im Epithel von Kontroll-Mäusen fast ausschließlich in der Plasmamembran lokalisierte Adhäsionsprotein war in den *Knockout*-Tieren nur partiell an der Zelloberfläche zu finden. In vielen Bereichen wurde E-Cadherin im *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Epithel apikal der Kerne im Bereich des Golgi-Apparates (Pfeile in Abb. 3.2A) oder punktförmig verteilt an der Plasmamembran (Pfeilspitzen in Abb. 3.2A) nachgewiesen. Die Proteinmenge (Abb. 3.2B), sowie der mRNA-Gehalt von E-Cadherin (Abb. 3.2C) war in den *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Tieren jedoch nicht verändert. Die modifizierte Lokalisierung von E-Cadherin scheint also weder zu einer Expressionänderung zu führen, noch durch diese bedingt zu sein.

3.1.2 Die fehlerhafte Sortierung von E-Cadherin beeinflusst auch dessen Bindungspartner β -Catenin

Aufgrund der beeinträchtigten Sortierung von E-Cadherin in Abwesenheit von ARFRP1 stellte sich die Frage, ob auch Komplexpartner, wie zum Beispiel β -Catenin einer veränderten Sortierung unterliegen.

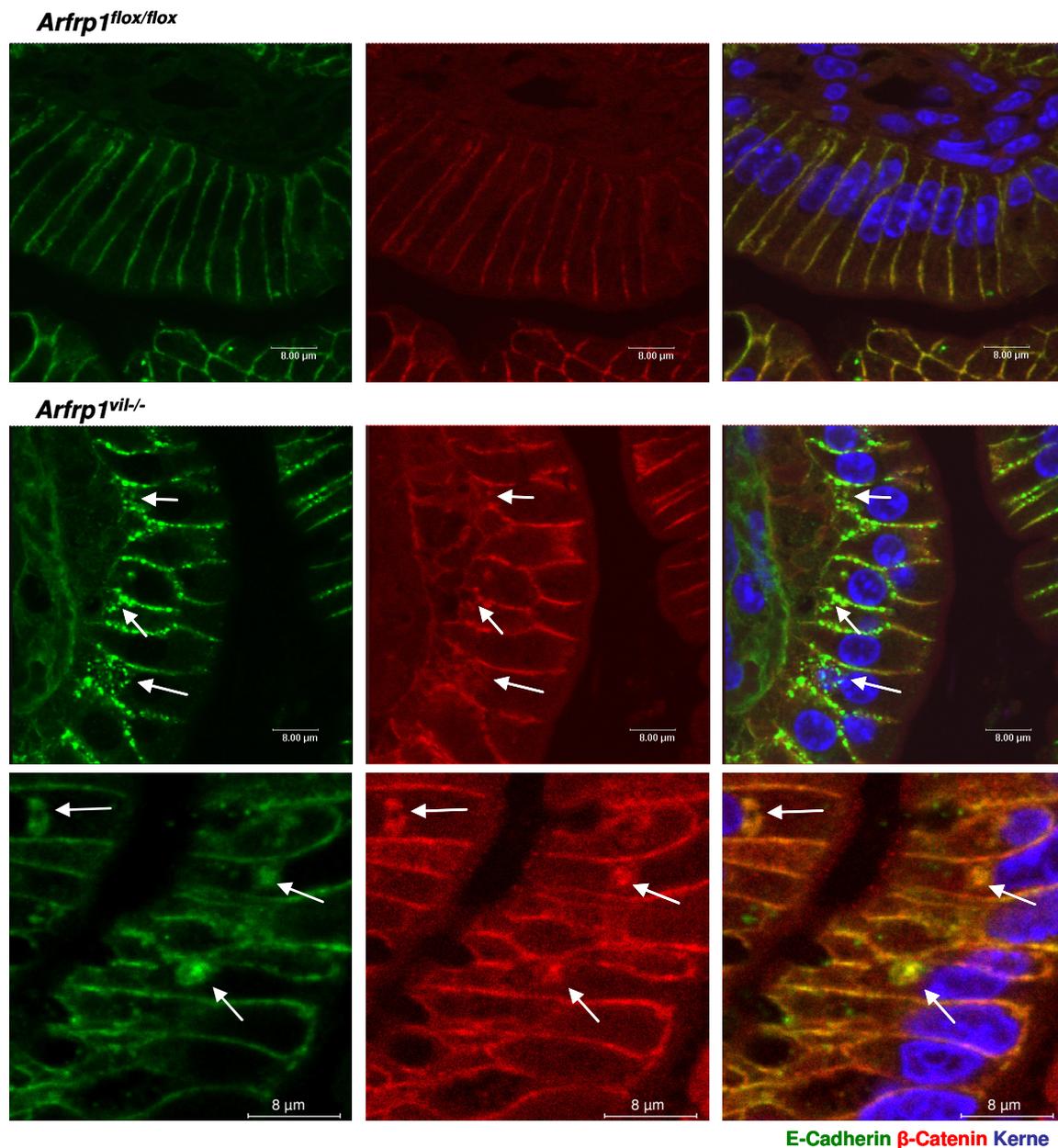


Abbildung 3.3: Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation von E-Cadherin und β -Catenin im Ileum von Kontroll- und *Knockout*-Tieren
 Ileum-Schnitte vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tiere wurden immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen E-Cadherin und β -Catenin untersucht. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

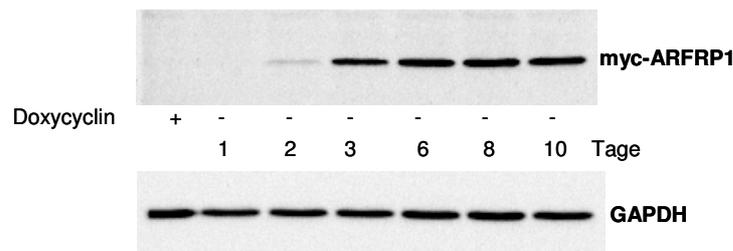
Dazu wurden Schnitte des Ileums von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäusen immunhistologisch untersucht. Wie erwartet befanden sich beide Proteine, E-

Cadherin und β -Catenin, im Darmepithel der Kontroll-Tiere an den basolateralen Membranen (Abb. 3.3). In den Zellen des *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Ileums war β -Catenin darüberhinaus teilweise mit E-Cadherin an intrazellulären Membranen ko-lokalisiert. Der durch fehlendes ARFRP1 hervorgerufene Sortierungsfehler scheint also den gesamten E-Cadherin/ β -Catenin-Komplex zu betreffen.

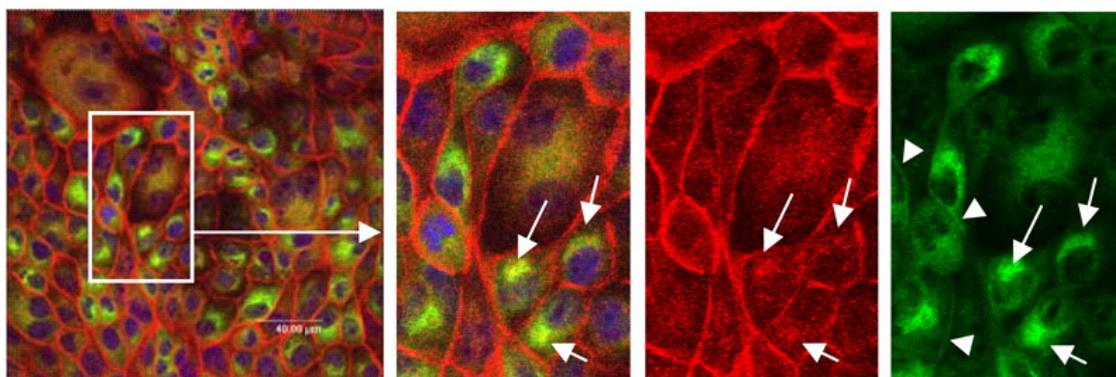
3.1.3 ARFRP1 ist in MDCK-Zellen mit E-Cadherin ko-lokalisiert

Um zu untersuchen, in welchen zellulären Kompartimenten ARFRP1 und E-Cadherin interagieren, wurde in MDCK-T23-Zellen mittels eines Tet-Off-Systems ein mit einem Myc-Tag fusioniertes ARFRP1-Protein (myc-ARFRP1) exprimiert. Diese epithelialen Zellen synthetisieren ARFRP1 48-72 Stunden nach Entzug von Doxycyclin aus dem Medium (Abb. 3.4A).

A



B



E-Cadherin myc-ARFRP1 Kerne

Abbildung 3.4: Immunzytochemischer Nachweis der Lokalisation von E-Cadherin und ARFRP1 in myc-ARFRP1 exprimierenden MDCK-Zellen

(A) Nachweis der Expression von myc-ARFRP1 in MDCK-Zellen unter Doxycyclin-freien Bedingungen mittels *Westernblot*-Analyse. (B) MDCK-Zellen wurden sechs Tage unter Doxycyclin-freien Bedingungen gehalten, fixiert und immunzytochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen E-Cadherin und c-Myc untersucht. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Weiße Pfeile weisen auf intrazelluläres E-Cadherin bzw. myc-ARFRP1, weiße Pfeilspitzen auf myc-ARFRP1 an der Plasmamembran hin.

Zur Untersuchung der Ko-Lokalisation von ARFRP1 und E-Cadherin wurden myc-ARFRP1 exprimierende MDCK-Zellen sechs Tage Doxycyclin-frei gehalten.

Anschließend wurde eine immunzytochemische Färbung von ARFRP1 (myc-Antikörper) und E-Cadherin (gp84-Antikörper) durchgeführt. Wie in Abbildung 3.4B gezeigt, befand sich E-Cadherin hauptsächlich an der Plasmamembran und nur zu einem kleineren Teil an intrazellulären Membranen, wo es allerdings mit ARFRP1 kolo-kalisiert vorlag. Im Gegensatz dazu lag ARFRP1 hauptsächlich an intrazellulären Membranen vor und wurde nur in einem geringen Maße an der Plasmamembran nachgewiesen (siehe Pfeilspitzen in Abb. 3.4B).

3.1.4 In MDCK-Zellen ist ARFRP1 in einem Komplex mit E-Cadherin, β -Catenin, α -Catenin und p120^{ctn} assoziiert

Um eine direkte Assoziation von ARFRP1 mit dem E-Cadherin/ β -Catenin/ α -Catenin/p120^{ctn}-Komplex zu verifizieren, wurde eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt. Hierzu wurden wiederum die myc-ARFRP1-exprimierenden MDCK-T23-Zellen verwendet (siehe auch 3.1.3).

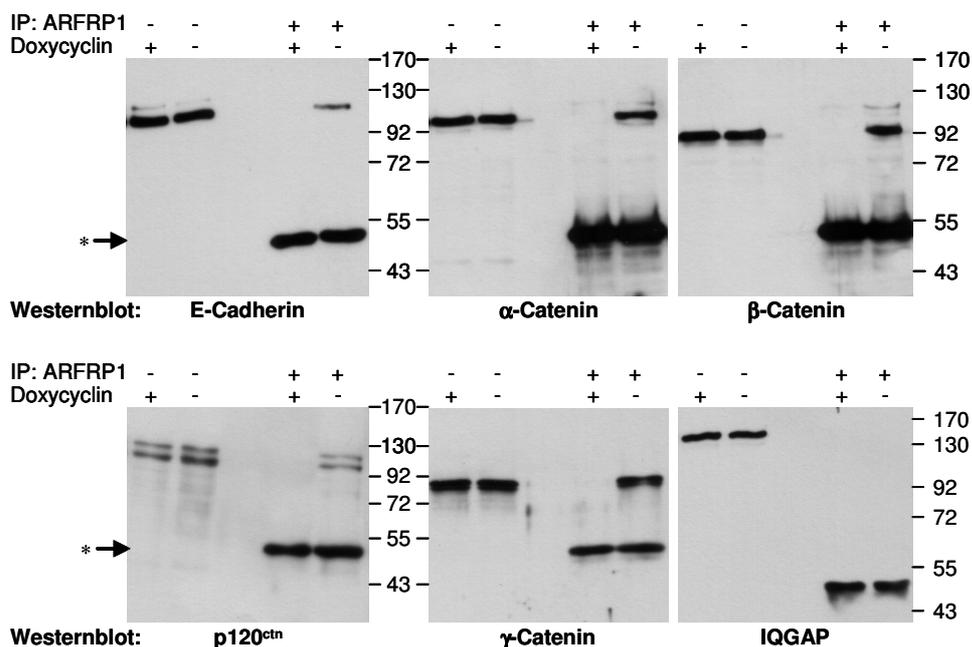


Abbildung 3.5: ARFRP1 ko-immunopräzipitiert mit Proteinen des E-Cadherin/Catenin-Komplexes.

MDCK-Zellen wurden 96 Stunden mit oder ohne Doxycyclin kultiviert, anschließend wurde in Lysaten dieser Zellen Ko-Immunopräzipitations-Experimente mit einem monoklonalen anti-myc-Antikörper (9E10) durchgeführt. Immunopräzipitate wurden durch *Westernblot*-Analysen mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Dargestellt sind jeweils Lysate und Immunopräzipitate von Zellen mit und ohne Doxycyclin. Die Versuche wurden freundlicherweise von Dr. Jörg Weiske in der Arbeitsgruppe von Prof. Huber durchgeführt.

In Lysaten aus Zellen, die 96 Stunden ohne Doxycyclin gewachsen waren, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Huber (Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin) myc-ARFRP1 mit einem anti-Myc-Antikörper immunopräzipitiert. E-Cadherin und seine Bindungspartner wurden schließlich durch *Westernblot*-Analyse in den Immunopräzipitaten nachgewiesen. Wie in Abb. 3.5 gezeigt, ko-immunopräzipitierte E-Cadherin mit ARFRP1. Wie in Abb. 3.5 dargestellt, wurden auch α -Catenin, β -Catenin und p120^{ctn} in dem Komplex mit E-Cadherin und ARFRP1 im *Westernblot* nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte IQGAP1 mit dem anti-Myc-Antikörper nicht ko-immunopräzipitiert werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine direkte Interaktion von ARFRP1 mit dem E-Cadherin/ β -Catenin/ α -Catenin/p120^{ctn}-Komplex am korrekten *Targeting* und/oder der Stabilisierung von E-Cadherin an der Zelloberfläche involviert ist.

3.1.5 Im Darmepithel von *Arfrp1*^{vil/-}-Mäusen verbleibt E-Cadherin zum Teil im Golgi-Apparat

Zur Bestimmung der Kompartimente, in denen E-Cadherin intrazellulär vorliegt, wurden immunhistochemische Analysen mit Golgi-Markern durchgeführt. Die Ko-Färbung des *cis*-Golgi-Markers GM130 und E-Cadherin auf Schnitten des Ileums zeigte, dass das intrazelluläre E-Cadherin teilweise mit GM130 ko-lokalisiert vorlag (Abb. 3.6 rechte Spalte). Generell war der *cis*-Golgi sowohl in Zellen der *Arfrp1*^{flox/flox}- als auch in denen der *Arfrp1*^{vil/-}-Tiere nachweisbar (Abb. 3.6 linke Spalte), wobei seine Struktur in den Zellen der *Arfrp1*^{vil/-} Maus leicht verändert war und verbreitert erschien. Die partielle Ko-Lokalisation von E-Cadherin mit GM130 lässt vermuten, dass in Abwesenheit von *Arfrp1* ein Teil des an die Plasmamembran zu transportierenden E-Cadherins im Golgi-Apparat verbleibt oder nur verzögert durch den Golgi-Apparat transportiert wird.

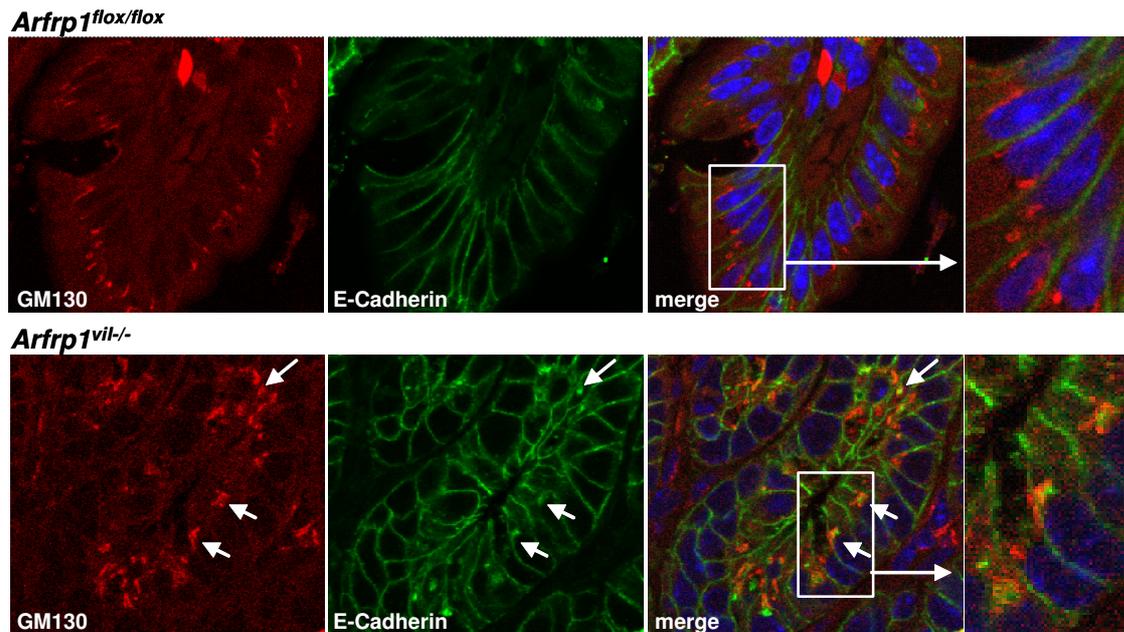


Abbildung 3.6: Immunhistochemischer Nachweis von GM130 und E-Cadherin im Ileum von Kontroll- und *Knockout*-Tieren

Ileum-Schnitte von vier Wochen alten *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren wurden immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen GM130 und E-Cadherin untersucht. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Weiße Pfeile weisen auf Ko-Lokalisation von GM130 und E-Cadherin hin.

3.2 Veränderung des Golgi-Apparates nach Deletion von *Arfrp1* im Darm

3.2.1 Das Fehlen von ARFRP1 in epithelialen Darmzellen führte zu einer Dissoziation von ARL1 vom Golgi-Apparat

Da in *in-vitro*-Experimenten gezeigt werden konnte, dass ARFRP1 für die Rekrutierung von ARL1 an den *trans*-Golgi verantwortlich ist (Zahn, Dissertation, 2007), wurde die Verteilung von ARL1 auch in Darmzellen des Epithels des Ileums von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäusen untersucht. In *Arfrp1^{flox/flox}*-Mäusen war ARL1 sowohl an Membranen des Golgi-Apparates (Pfeile in Abb. 3.7A) als auch im Zytosol der Zellen (Pfeilspitzen in Abb. 3.7A) lokalisiert.

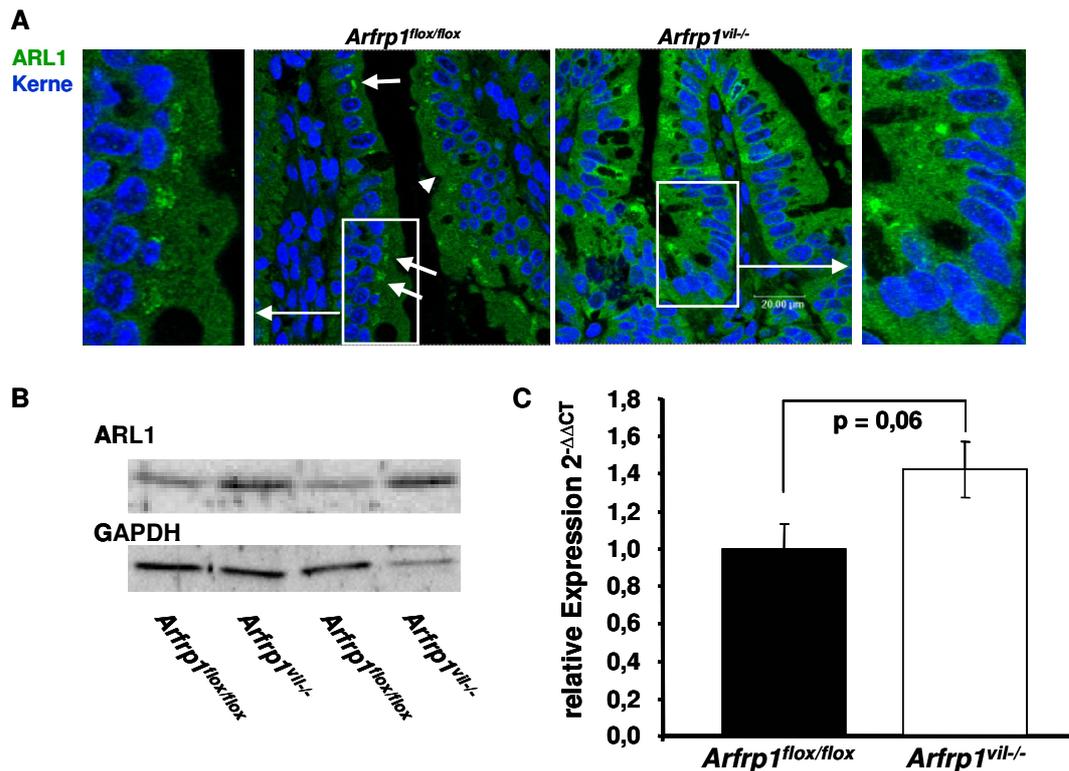


Abbildung 3.7: Untersuchung der Lokalisation und Expression von ARL1 im Ileum von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren

(A) Ileum-Schnitte vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren wurden immunhistochemisch mit einem spezifischen Antiserum gegen ARL1 untersucht. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Weiße Pfeile weisen auf ARL1 am Golgi, weiße Pfeilspitzen auf zytosolisches ARL1 hin. (B) Lysate des Ileums vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tiere wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit einem *anti-ARL1*-Anti-Serum inkubiert. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH nachgewiesen. (C) Die mRNA-Expression von *Ar11* wurde mittels qRT-PCR bestimmt (n = 6 pro Genotyp, Mittelwert \pm SEM).

Im Gegensatz dazu befand sich ARL1 in den *Knockout*-Mäusen fast ausschließlich im Zytosol der epithelialen Zellen. Um zu überprüfen, ob die intensivere Färbung der *Arfrp1^{vil-/-}*-Präparate mit einer erhöhten ARL1-Proteinmenge einhergeht, wurde eine *Westernblot*-Analyse mit Lysaten des Ileums beider Tiere durchgeführt. Diese zeigte, dass die Proteinmenge von ARL1 in den epithelialen Zellen der *Arfrp1^{vil-/-}*-Tiere erhöht war (Abb. 3.7B). Zudem konnte auch mittels quantitativer *Real-Time*-PCR eine leichte aber nicht signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von *Ar11* gezeigt werden (Abb. 3.7C). Bei der erhöhten Expression von ARL1 könnte es sich um einen gegenregulatorischen Effekt handeln, ausgelöst durch die Abwesenheit von ARL1 am Golgi-Apparat.

3.2.2 ARFRP1 wird für eine korrekte Organisation des *trans*-Golgis benötigt

In Abwesenheit von ARFRP1 ist die Rekrutierung von ARL1 an den *trans*-Golgi gestört (siehe 3.2.1, Abb. 3.7A). Um zu untersuchen, inwieweit sich die Abwesenheit von ARFRP1 zusätzlich auf die strukturelle Organisation des Golgi-Apparates auswirkt, wurden verschiedene Golgi-Marker in immunhistologischen Analysen verwendet. Wie bereits in Abb. 3.6 gezeigt, war die Verteilung des *cis*-Golgi-Markers GM130 in *Arfrp1^{vil/-}*-Zellen nur leicht verändert, er zeigte eine breitere Verteilung als in den Kontrollproben. Dies legt die Vermutung nahe, dass der *cis*-Golgi strukturell abgegrenzt und intakt ist.

Um die Frage zu beantworten, ob dies auch für den Bereich des *trans*-Golgis gilt, an den ARFRP1 in seiner aktiven Form bindet, wurden immunhistologische Färbungen mit dem *trans*-Golgi-Marker TGN38 durchgeführt. Wie Abb. 3.8 zeigt, wurde TGN38 in den Epithelzellen des Ileums (A, linke Spalte) und Jejunums (B, linke Spalte) der Kontrollmäuse eindeutig apikal der Kerne im Bereich des Golgi-Apparates detektiert. Im Gegensatz dazu zeigten die immunhistochemischen Färbungen der *Arfrp1^{vil/-}*-Darmabschnitte (Abb. 3.8A und B rechte Spalte), dass TGN38 im Grossteil der Zellen nicht nachweisbar war und in einigen Zellen nur eine schwache Golgi-Färbung zu erkennen war. Dies bedeutet, dass ähnlich der *in-vitro*-Versuche die Abwesenheit von ARFRP1 *in-vivo* eine gestörte Organisation des TGN zur Folge hat. Um diese fehlerhafte Organisation auch ultrastrukturell zu visualisieren, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an Darmschnitten von *Arfrp^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen durchgeführt. Wie in Abb. 3.8C zu sehen, waren in den Golgi-Apparaten der Kontrollzellen einzelne Zisternen klar voneinander abgegrenzt und die Golgistruktur intakt (Abb. 3.8C, linker Bildteil). In Zellen der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse hingegen war die Struktur des Golgi-Apparates und einzelner Zisternen stark beeinträchtigt, was sich in einer abnormen Vakuolisierung der Golgi-Membranen zeigte (Abb. 3.8C, rechter Bildteil).

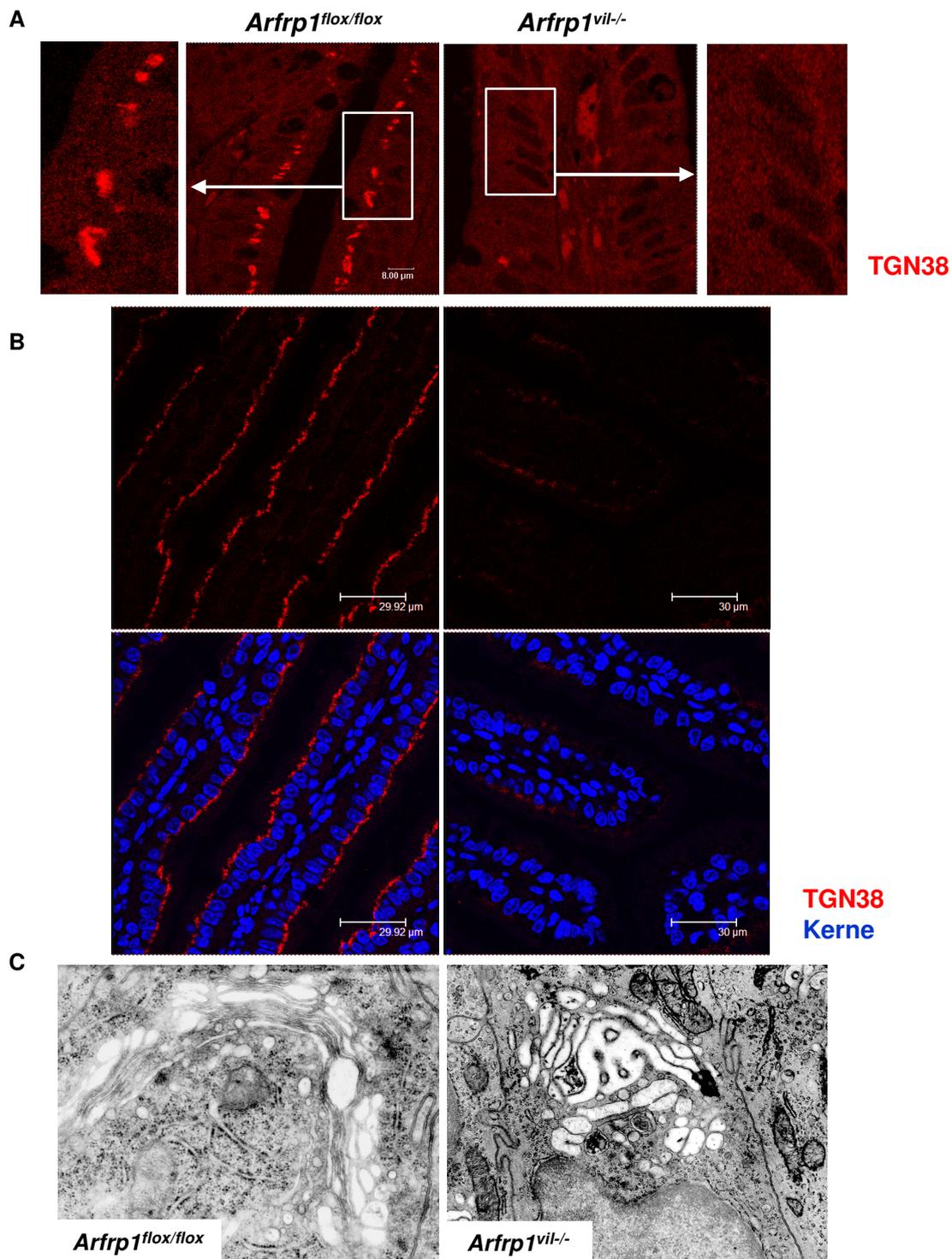


Abbildung 3.8: Immunhistochemischer Nachweis von TGN38 und elektronenmikroskopische Analyse des Golgi-Apparates im Darm der Kontroll- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäuse

Schnitte des Ileums (A) und Jejunums (B) vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren wurden immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper gegen TGN38 untersucht. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Golgi-Apparates von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren. Vergrößerung 6300x.

3.3 Die Malabsorption von Fetten nach Darm-spezifischer Deletion von *Arfrp1*

Da die *Arfrp1^{vil/-}*-Maus trotz der beeinträchtigten E-Cadherin-Sortierung zumindest in den ersten Wochen lebensfähig war, wurde ihr Phänotyp besonders im Hinblick auf die Fähigkeit der Makronährstoffaufnahme untersucht.

3.3.1 Die Darm-spezifische Deletion von *Arfrp1* resultierte in einer Wachstumsretardierung der Mäuse

Arfrp1^{vil/-}-Mäuse wurden, wie schon von Claudia Zahn beschrieben, lebend geboren und waren bei der Geburt nicht von ihren Wurfgeschwistern zu unterscheiden, wiesen jedoch ein frühe postnatale Reduktion des Körpergewichts auf.

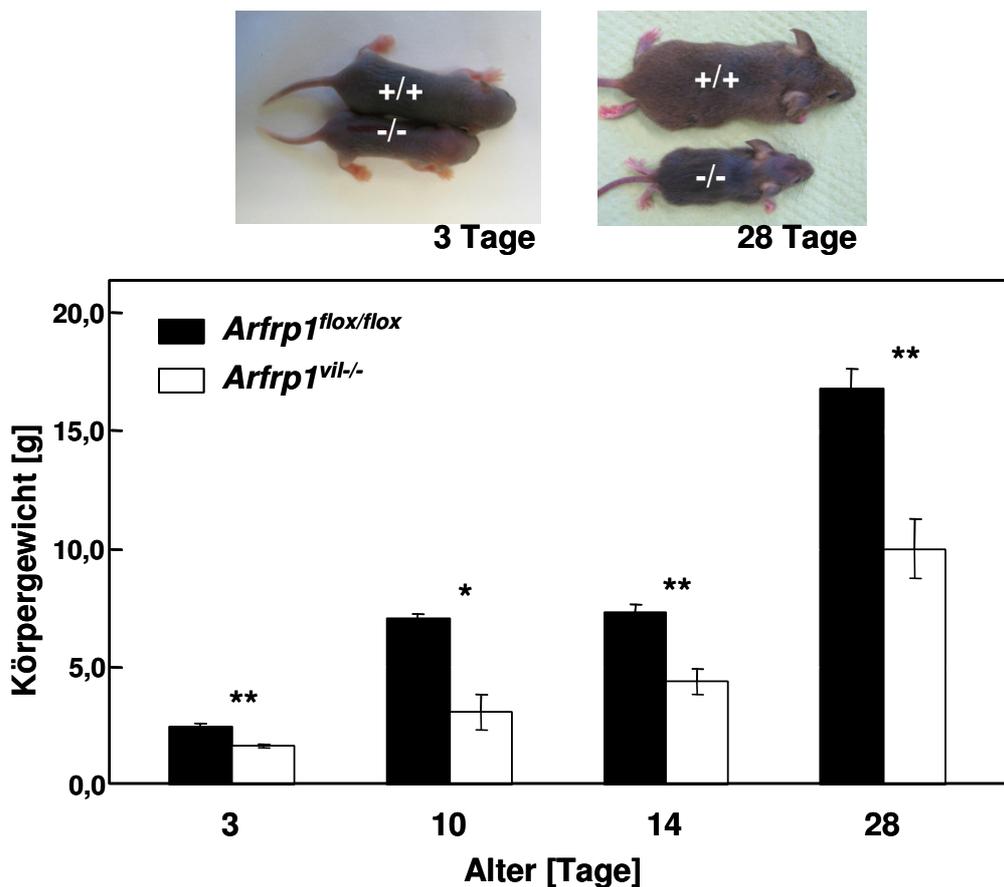


Abbildung 3.9: Nachweis der Wachstumsretardierung der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere
 Photographische Darstellungen von je einem *Arfrp1^{flox/flox}*- (+/+) und *Arfrp1^{vil/-}*-Tier (-/-) im Alter von drei bzw. 28 Tagen (oberer Bildteil). Zusätzlich wurde das Körpergewicht der Kontroll- und *Knockout*-Tiere im Alter von 3, 10, 14 und 28 Tagen bestimmt. Balken zeigen die Mittelwerte ± SEM (unterer Bildteil). $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$.

Die Gewichtsunterschiede wurden sowohl zu Zeitpunkten, in denen die Darm-Morphogenese der Maus noch nicht komplett abgeschlossen ist, als auch in Tieren im Alter von vier Wochen mit einem voll ausdifferenzierten Intestinaltrakt beobachtet.

3.3.2 Die relative Körperzusammensetzung der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse ist durch die Wachstumsretardierung nicht verändert

Die Messung der Körperzusammensetzung von vier Wochen alten Mäusen ergab für die leichteren *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse sowohl eine reduzierte Fettmasse als auch eine reduzierte fettfreie Masse (siehe Abb. 3.10).

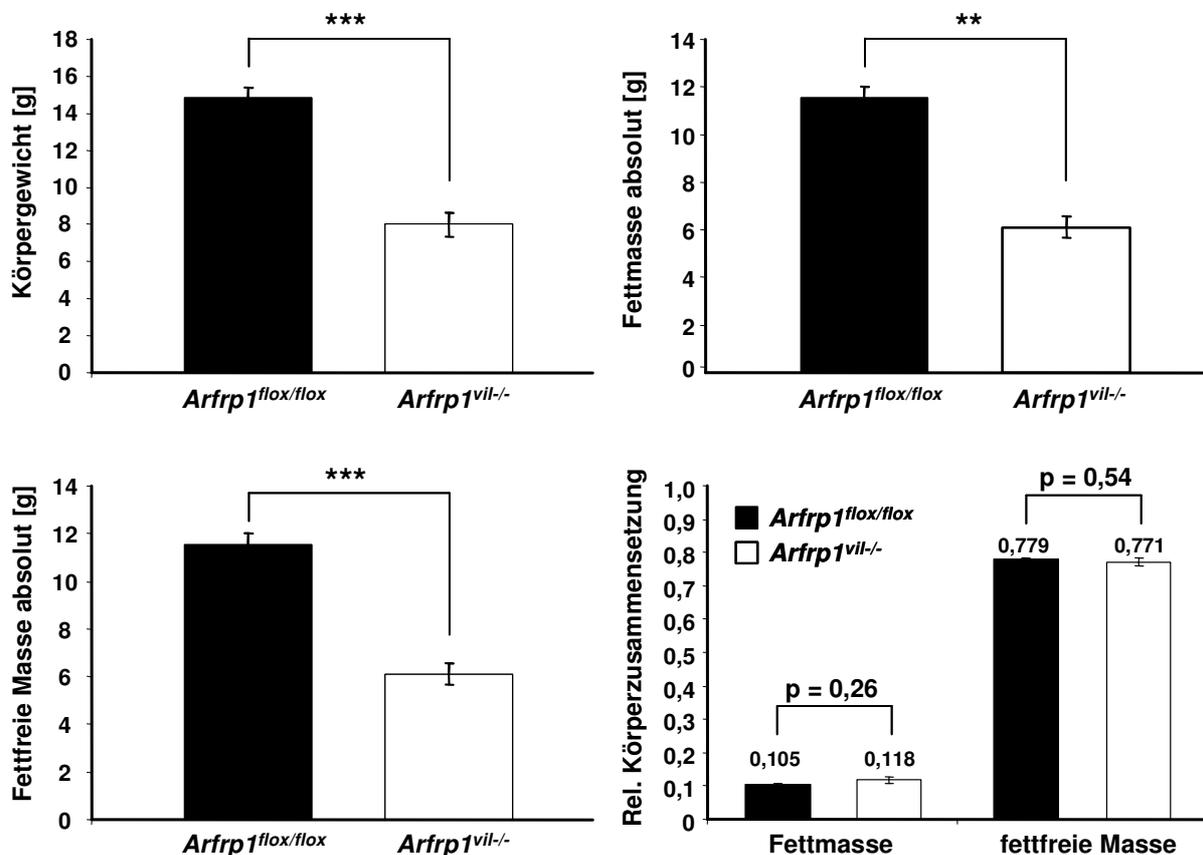


Abbildung 3.10: Körperzusammensetzung der *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere im Alter von vier Wochen

Die Körperzusammensetzung von Kontroll- und *Knockout*-Tieren wurde im Alter von vier Wochen mittels NMR bestimmt. Balken zeigen die Mittelwerte \pm SEM von 26 *Arfrp1^{flox/flox}*- und 10 *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren. Die relativen Massenangaben wurden auf das absolute Körpergewicht bezogen. $p < 0,01$ **;
 $p < 0,001$ ***.

Errechnete man jedoch die relative Körperzusammensetzung (Abb. 3.10, rechts unten), waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und *Knockout*-Tieren vorhanden, beide Gruppen wiesen einen Fettanteil von ca. 11% sowie einen Anteil der fettfreien Masse von ca. 77% des Körpergewichtes auf. Die Deletion von

Arfrp1 im Darm führte somit nicht zu einer spezifischen Reduktion zum Beispiel der Fett- oder Muskelmasse, sondern zu einem allgemein verminderten Körpergewicht und einer reduzierten Körperlänge.

3.3.3 Die Wachstumsretardierung der *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Maus ist mit einer reduzierten Darmlänge sowie geringeren Leber- und Nierengewichten assoziiert

Die Wachstumsretardierung der *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Mäuse assoziierte signifikant mit einer verminderten Länge des Dünndarms (Duodenum, Jejunum und Ileum). Wie in Abb. 3.11 dargestellt, zeigten die Messungen der Dünndarmlänge von vier bis fünf Wochen alten Knockout-Mäusen eine Verkürzung um ca. 20% (25,48 ± 0,86 cm zu 32,07 ± 0,57 cm). Weiterhin wurden reduzierte absolute Gewichte von Leber und Niere der *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Tiere beobachtet. Da die Reduktion der Organgewichte im Hinblick auf das um >40% verminderte Körpergewicht wenig aussagekräftig ist, wurde das relative Organgewicht in Bezug auf das Körpergewicht errechnet (Abb. 3.11, untere Reihe rechts). Hierbei ergab sich, dass die Lebern der *Arfrp1*^{vil^{-/-}}-Tiere auch bezogen auf das Körpergewicht signifikant kleiner waren als die der *Arfrp1*^{flox/flox}-Tiere. Betrachtet man hingegen die relativen Gewichte der Nieren, zeigte sich, dass das der *Knockout*-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht vermindert war.

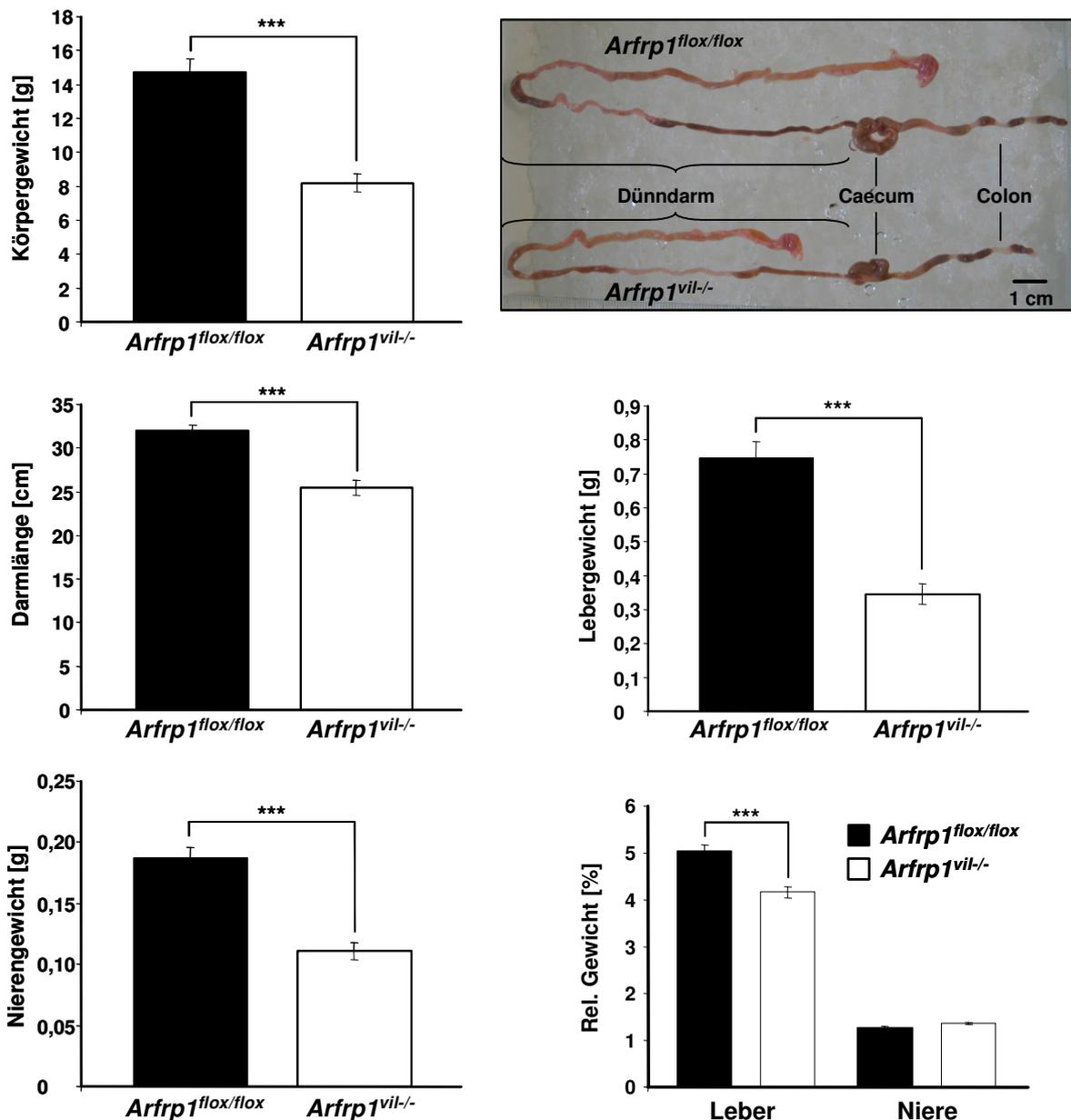


Abbildung 3.11: Verminderte Darmlänge und Gewichte von Lebern und Nieren in *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren

Kontroll- und *Knockout*-Tieren wurden bei der Organentnahme im Alter von vier Wochen der Darm sowie die Leber und die Niere entnommen und die Länge bzw. das Gewicht bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 20 Kontroll- und 25 *Knockout*-Tieren bezüglich des Körpergewichts, der Darmlänge des Dünndarms (Duodenum, Jejunum, Ileum), des Leber- und Nierengewichts, sowie die relativen Leber- und Nierengewichte bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse. Zusätzlich photographisch dargestellt, der gesamte Darm eines *Arfrp1^{flox/flox}*- und eines *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieres. $p < 0,001$ ***.

3.3.4 Reduzierte Blutglucosespiegel und Plasmakonzentrationen von Triglyceriden und freien Fettsäuren der *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäuse

Da das reduzierte Körpergewicht der *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäuse auf eine Malabsorption zurückzuführen sein könnte, wurde eine Analyse mehrerer Plasmaparameter von Kontroll- und *Knockout*-Tieren im Alter von vier bis fünf Wochen durchgeführt (Tab.

3.1). Den größten Unterschied zeigten *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere im Triglycerid-Spiegel im gefütterten Zustand, der zirka ein Drittel des Spiegels der Kontrolltiere aufwies, während er im gefütterten Zustand um etwas mehr als die Hälfte reduziert war. Die *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse zeigten darüber hinaus signifikant erniedrigte Blutglucosewerte sowohl im gefütterten, als auch im nüchternen Zustand.

Tabelle 3.1: Metabolische Parameter der *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere

	<i>Arfrp1^{flox/flox}</i>	<i>Arfrp1^{vil/-}</i>	n-Zahl	p-Wert
Blutglucose gefüttert mmol/l	7,60 ± 0,21	5,35 ± 0,29	28/28	< 0,001
Blutglucose nüchtern mmol/l	3,58 ± 0,18	2,54 ± 0,16	25/25	< 0,001
TG gefüttert µg/ml	239 ± 19	77 ± 13	10/6	< 0,001
TG nüchtern µg/ml	560 ± 128	217 ± 72	8/8	< 0,05
FA gefüttert mmol/l	0,62 ± 0,05	0,39 ± 0,09	10/6	0,055
FA nüchtern mmol/l	1,94 ± 0,16	1,19 ± 0,20	8/8	< 0,05
Cholesterin gefüttert mg/dl	48,4 ± 3,1	28,0 ± 5,5	10/6	< 0,05
Lactat gefüttert mg/dl	66,2 ± 4,1	58,9 ± 2,7	13/13	0,15

Zur Bestimmung der metabolischen Parameter wurde *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen. Aus dem Blutplasma wurden die Triglyceride (TG), die freien Fettsäuren (FA), Cholesterin und Lactat bestimmt. Die Messung der Blutglucosespiegel erfolgte aus Vollblut. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Analysen beider Genotypen ± SEM, sowie zugehörige n-Zahlen und p-Werte.

Die Analyse der freien Fettsäuren zeigte ebenfalls erniedrigte Konzentrationen im Plasma der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere, wobei dies für *ad libitum* gefütterte Tiere gerade nicht signifikant war. Zudem war die Cholesterin-Konzentration im Plasma der *Knockout*-Tiere signifikant erniedrigt. Lactat, das unter anaeroben Bedingungen im Muskel während der Glykolyse entsteht und in der Leber für die Gluconeogenese verwendet

werden kann, zeigte nur eine leichte und nicht signifikante Reduzierung in den *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen. Die verminderten Werte von Glucose und Plasma-Lipiden der *Knockout*-Tiere bestätigten demnach die Vermutung einer chronischen Unterversorgung, die wahrscheinlich durch eine Malabsorption über das Darmepithel zustande kommt.

3.3.5 Untersuchung der Absorption der Makronährstoffe

Um die Hypothese zu prüfen, dass die Wachstumsretardierung der *Arfrp1^{vil/-}*-Maus das Resultat einer Malabsorption ist, wurde die Aufnahme in bzw. der Transport von Makronährstoffen durch das Darmepithel untersucht.

3.3.5.1 Erhöhte Sterblichkeitsrate der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse auf einer Kohlenhydrat-freien Hochfettdiät

Da anfänglich aufgrund der Ergebnisse von Claudia Zahn die Vermutung einer veränderten SGLT1-Stabilität oder -Prozessierung vorlag, wurde versucht, die Überlebensrate der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere durch eine Kohlenhydrat-freie, fettreiche Diät (CFD) zu steigern. Konkret wurden Kontroll- und *Knockout*-Tiere für 30 Tage mit Haltungsdiät (Kalorienprozent: 58% Kohlenhydrate, 33% Protein, 9% Fett) oder einer Kohlenhydrat-freien Diät (Kalorienprozent: 28% Protein, 72% Fett) gefüttert und ihr Überleben dokumentiert. Wie in Abb. 3.12 ersichtlich, überlebten 92,6 % der Kontroll-Tiere, wenn sie die Haltungsdiät (HD) erhielten (weiße Dreiecke in Abb. 3.12). Im Gegensatz dazu zeigten die *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere eine stark beeinträchtigte Überlebensrate von 47,1 % (schwarze Dreiecke in Abb. 3.12). Auf der Kohlenhydrat-freien Hochfettdiät (CFD) überlebten 90,9% der *Arfrp1^{flox/flox}*-Tiere die 30 Tage (weiße Quadrate in Abb. 3.12). Wurde den *Knockout*-Tieren die CFD angeboten (schwarze Dreiecke in Abb. 3.12), war ihre Sterblichkeitsrate entgegen den Erwartungen deutlich erhöht; nur 14,3% überlebten die 30-tägige Intervention ohne Kohlenhydrate. Mit diesem Versuchsansatz konnte demnach die Hypothese einer veränderten Kohlenhydratabsorption der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere nicht bestätigt werden.

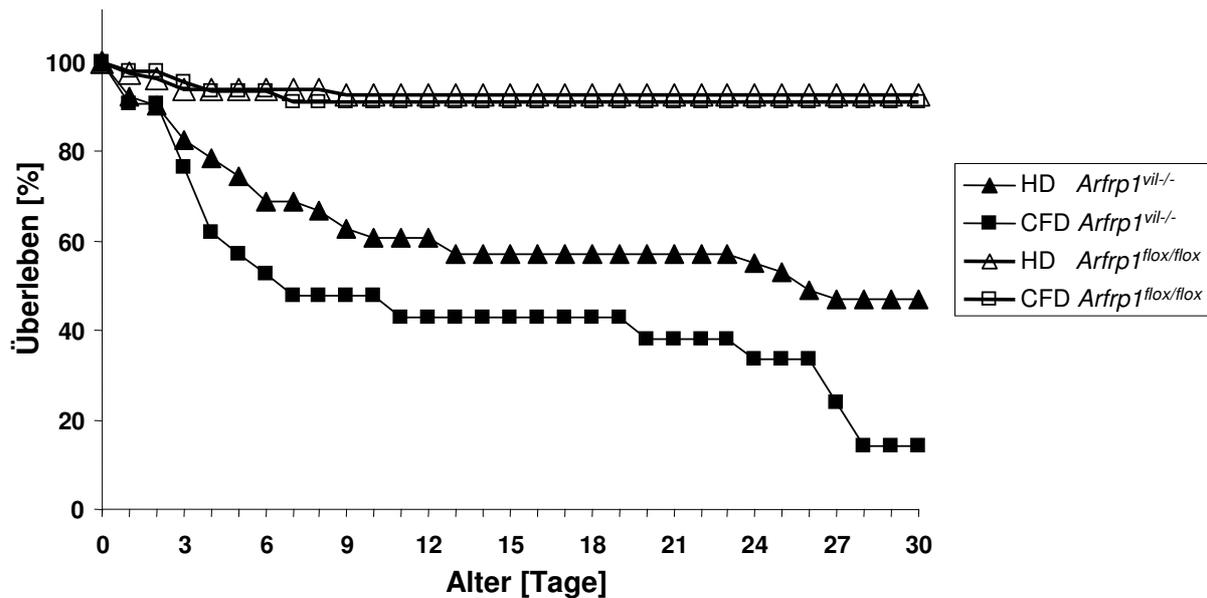


Abbildung 3.12: Überlebenskurve von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen auf Haltungsdiät bzw. Kohlenhydrat-freier Hochfett-Diät

Dargestellt ist das prozentuelle Überleben von Kontroll-Tieren (weiß) und Knockout-Tieren (schwarz) auf Haltungsdiät (HD, Dreiecke) bzw. Kohlenhydrat-freier Hochfett-Diät (CFD, Quadrate), während der ersten 30 Lebenstage. n = 81/51 für HD und 44/21 für CFD.

Die Tatsache, dass die CFD die Sterblichkeit der *Knockout*-Tiere sogar steigerte, könnte auf ihren erhöhten Fettanteil zurückzuführen und damit ein erster Hinweis auf eine beeinträchtigte Fettabsorption sein.

3.3.5.2 Die Aufnahme von Glucose über das Darmepithel ist durch die Abwesenheit von ARFRP1 nicht beeinträchtigt

Die Aufnahme von Glucose durch das Darmepithel erfolgt im wesentlichen mittels zweier Glucosetransporter, dem aktiven Glucosetransporter SGLT1 an der apikalen Membran der Epithelzelle, der Glucose zusammen mit Natriumionen aktiv aus dem Darmlumen in die Zelle transportiert, und dem passiven Glucosetransporter GLUT2, der basolateral für den Transport aus der Epithelzelle verantwortlich ist. Die Expression dieser Glucosetransporter im Jejunum wurde mittels *Westernblot*-Analyse und qRT-PCR untersucht. Wie Abb. 3.13A zeigt, konnten im *Westernblot* keine veränderten Signalstärken für SGLT1 oder GLUT2 nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse (Abb. 3.13B) ergab ebenfalls keine signifikanten Expressionsunterschiede der mRNA von *Slc5a1* (SGLT1) oder *Slc2a2* (GLUT2); darüber hinaus war die Expression von *Slc2a5* (GLUT5), der den Fructosetransport in die Darmepithelzelle katalysiert, ebenfalls unverändert.

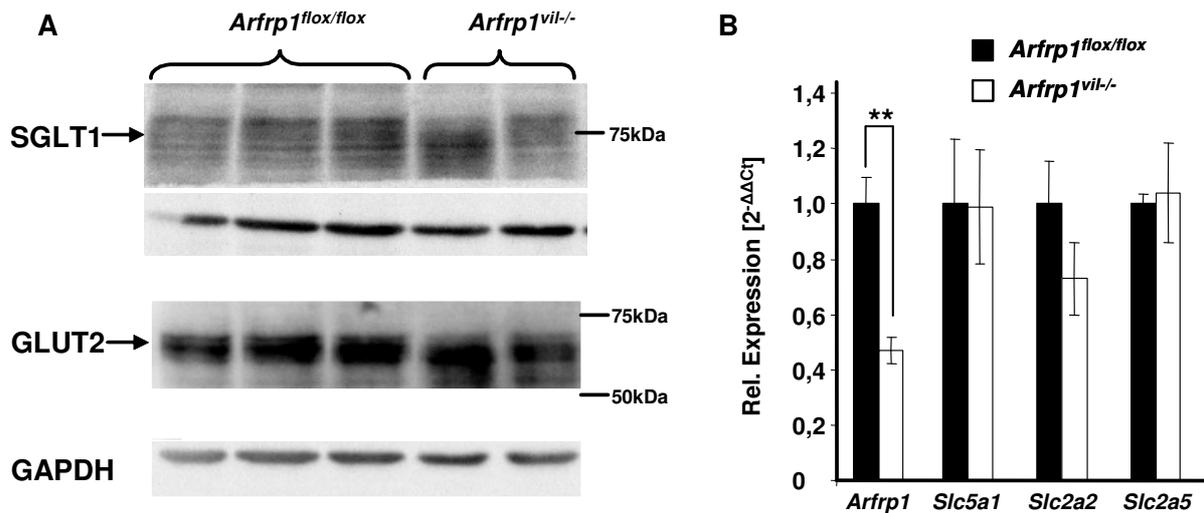


Abbildung 3.13: Die Proteinexpression und Transkriptmenge von Glucosetransportern im Darm wird durch die Deletion von *Arfrp1* nicht beeinflusst

(A) Gesamtmembranpellets des Jejunums vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tiere wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und diese mit einem *anti-SGLT1*- bzw. *anti-GLUT2*-Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH nachgewiesen. (B) Die mRNA-Spiegel von *Arfrp1*, *Slc5a1* (SGLT1), *Slc2a2* (GLUT2) und *Slc2a5* (GLUT5) im Jejunum von Kontroll- und *Knockout*-Tieren wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 *Arfrp1^{flox/flox}*- und 9 *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren. $p < 0,01^{**}$.

Da unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt hatte, dass das Fehlen von *Arfrp1* Einfluss auf die Lokalisation von Proteinen (E-Cadherin, ARL1) nimmt, wurde auch die subzelluläre Verteilung der Glucosetransporter genauer betrachtet. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen von GLUT2 und SGLT1 des Jejunums von vier Wochen alten *Knockout*- und Kontrolltieren durchgeführt. Die Färbungen von SGLT1 wurden hierbei freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Koepsell (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg) durchgeführt. Sowohl die Verteilung von GLUT2 als auch von SGLT1 in Zellen der *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäuse war nicht verändert. GLUT2 lag sowohl in Zellen der Kontrolltiere als auch in Zellen der *Knockout*-Tiere an der basolateralen Membran, wohingegen SGLT1 in beiden Gruppen exklusiv an der apikalen Membran detektiert wurde (Abb. 3.14).

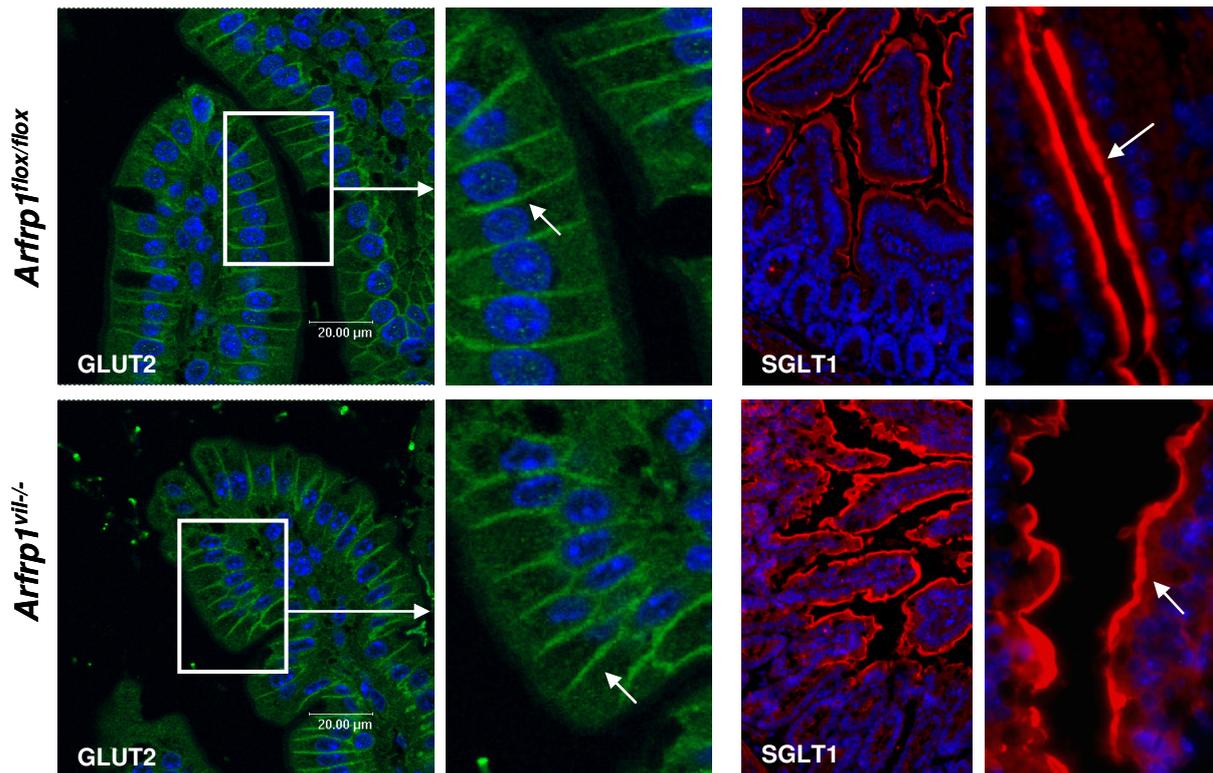


Abbildung 3.14: Deletion von *Arfrp1* im Darm hatte keinen Einfluss auf die Verteilung von SGLT1 und GLUT2 in Enterozyten

Jejunum-Schnitte vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tiere wurden immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen GLUT2 und SGLT1 gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Weiße Pfeile weisen auf GLUT2 an der lateralen Membran (linke Spalte) bzw. SGLT1 an der apikalen Membran (rechte Spalte) hin.

Somit war sowohl die Expression als auch die Lokalisierung der Glucosetransporter im Darm nicht durch die Deletion von *Arfrp1* beeinflusst. Um sicherzustellen, dass der Mangel an ARFRP1 neben der Expression und Lokalisierung auch die Funktionalität der Glucosetransporter nicht beeinflusst, wurde ein oraler Glucose-Toleranztest durchgeführt, der zeigen sollte, ob oral applizierte Glucose schließlich im Blut der Tiere erscheint. Der orale Glucose-Toleranztest (Abb. 3.15) zeigte, dass die Glucosekonzentration im Blut beider Gruppen zunächst über einen Zeitraum von 10 bis 30 Minuten anstieg und schließlich abfiel, wobei sich beide Gruppen im Verlauf der Blutglucose-Konzentration nicht unterschieden. Weiterhin wies auch die Fläche unter Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC, *area under the curve*) keine Unterschiede in der Aufnahme von Glucose zwischen *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäusen auf.

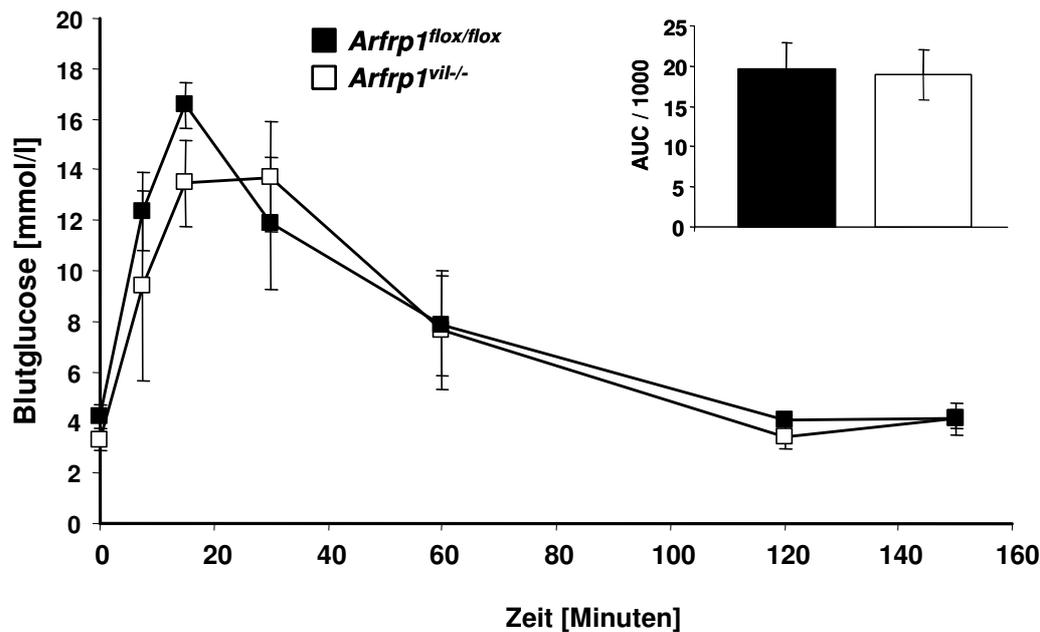


Abbildung 3.15: Untersuchung der Glucose-Absorption der *Arfrp1^{vil/-}*-Maus mit Hilfe eines oralen Glucose-Toleranztests

Dargestellt ist der Verlauf der Blutglucose-Konzentration von über Nacht gefasteten *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen nach oraler Applikation von 2 mg Glucose / g Körpergewicht und die errechnete Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM von je sechs Tieren pro Genotyp.

Dieser Befund machte deutlich, dass die Absorption von Glucose in die Epithelzelle, sowie der Transport durch die Zelle ins Blut in *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert war und somit nicht zum Phänotyp der Wachstumsretardierung beitragen konnte.

3.3.5.3 Keine Veränderung der freien Aminosäuren im Plasma der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere

Um zu untersuchen, ob in *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen die Aufnahme spezifischer Aminosäuren gestört ist, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Petzke (Abteilung Analytik, DfE) mittels HPLC ein Profil der freien Aminosäuren im Plasma von gefütterten Kontroll- und *Knockout*-Mäusen erstellt. Wie in Abb. 3.16 dargestellt, ergab das Aminosäureprofil keine Reduzierung spezifischer Aminosäuren im Plasma der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere, vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Konzentration einiger Aminosäuren leicht erhöht war. Dies könnte auf einen vermehrten Proteinabbau schließen lassen. Allerdings war für die erhöhten Aminosäuren kein Muster zu erkennen, so waren sowohl essentielle als auch nicht essentielle, sowie ketogene als auch glucogene Aminosäuren erhöht. Ebenfalls erhöht waren die beiden nicht-proteinogenen Aminosäuren Ornithin und Citrullin, die beide Bestandteil der Harnstoff-Zyklus sind.

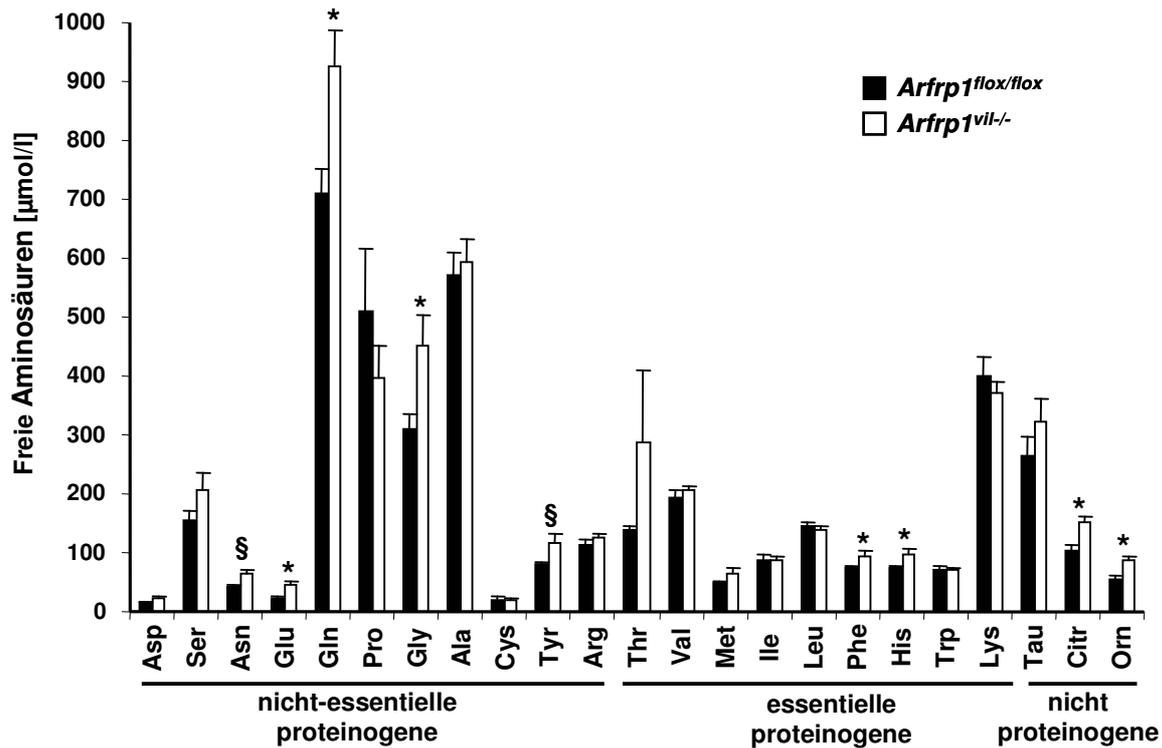


Abbildung 3.16: Quantifizierung freier Aminosäuren im Plasma von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren

Die freien Aminosäuren im Plasma wurde präzipitiert, mittels Ionenaustausch-Chromatographie getrennt und nach Durchfluss per Ninhydrin-Nachweis detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 8 Tieren pro Genotyp. p<0,05*, p=0,055[§].

Insgesamt lassen die in Abb. 3.16 gezeigten Befunde den Schluss zu, dass das Fehlen von ARFRP1 im Darm nicht zur reduzierten Aufnahme einzelner Aminosäuren führt und somit auf diesem Wege auch nicht zur Wachstumsretardierung der *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäuse beitragen kann.

3.3.5.4 Deletion von *Arfrp1* führt zu einer beeinträchtigten Aufnahme von Lipiden durch das Darmepithel

Zur Untersuchung der Absorption von Nahrungslipiden wurde ein oraler Fett-Toleranztest durchgeführt. Betrachtet man die Plasmakonzentration der Triglyceride nach oraler Applikation von Olivenöl, wurde in Kontrolltieren ein Anstieg der Triglyceride nach zwei Stunden beobachtet, der nach vier Stunden wieder ungefähr den Basalwert erreichte. Im Gegensatz dazu wiesen die *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäuse keinen Anstieg der Triglyceridkonzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum auf (siehe Abb. 3.17).

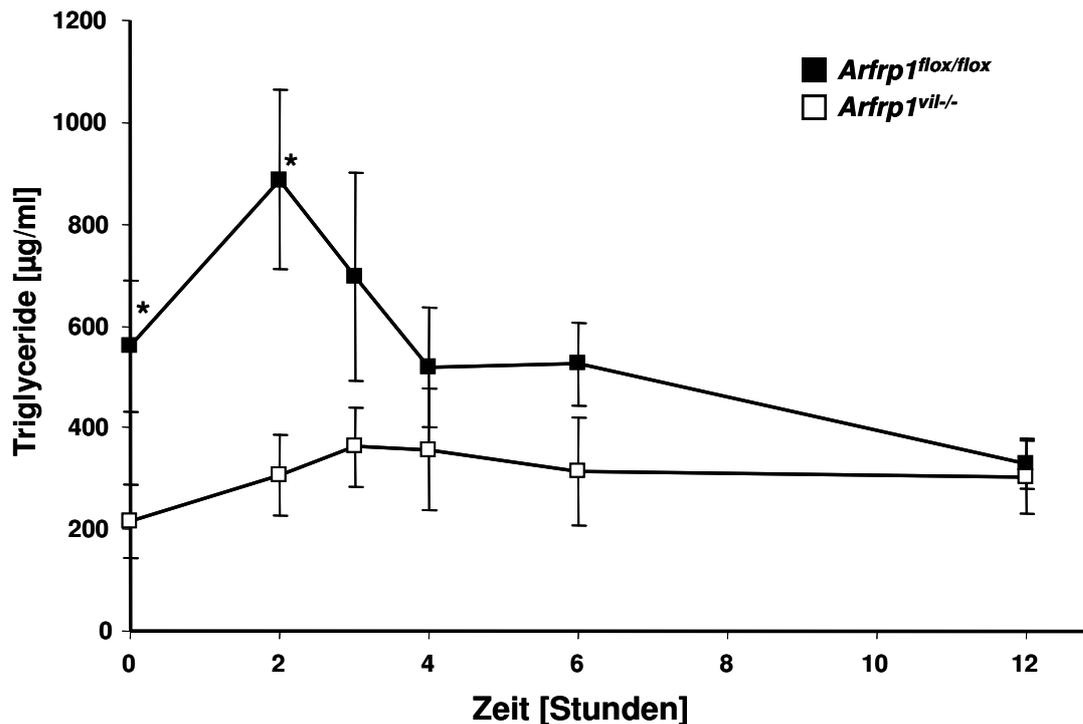


Abbildung 3.17: Untersuchung der Plasma-Triglyceridkonzentration der *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäuse im oralen Fett-Toleranztest

Dargestellt ist der Verlauf der Plasma-Triglyceridkonzentration von über Nacht gefasteten Kontroll- und *Knockout*-Tieren nach oraler Applikation von 10 µl Olivenöl pro Gramm Körpergewicht. Punkte zeigen den Mittelwert ± SEM. n = 8 pro Genotyp, p<0,05*.

Demnach erreichten oral zugeführte Lipide das Plasma der Tiere nicht, so dass von einer beeinträchtigten Lipidaufnahme in die Epithelzelle oder von einem gestörten Transport durch die Epithelzelle in die Lymphe ausgegangen werden kann.

3.3.5.5 Stark reduzierte Akkumulation von Triglyceriden in *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren nach Injektion von Tyloxapol

Verminderte Triglycerid-Konzentrationen in einem oralen Fett-Toleranztest können prinzipiell (1) durch eine verminderte Fettsäureaufnahme in den Organismus oder (2) durch eine beschleunigte Aufnahme von Fettsäuren in die Leber und das Fettgewebe bedingt sein. Nach Aufnahme der Fettsäuren im Darmepithel werden diese zu Triglyceriden aufgebaut und in Chylomikronen verpackt, die über die Lymphe schließlich ins Blut gelangen. Nach lipolytischer Spaltung (vermittelt durch die Lipoproteinlipase, LPL) der Chylomikronen werden schließlich die Fettsäuren von der Leber, dem Fettgewebe und gegebenenfalls auch von anderen Zellen aufgenommen.

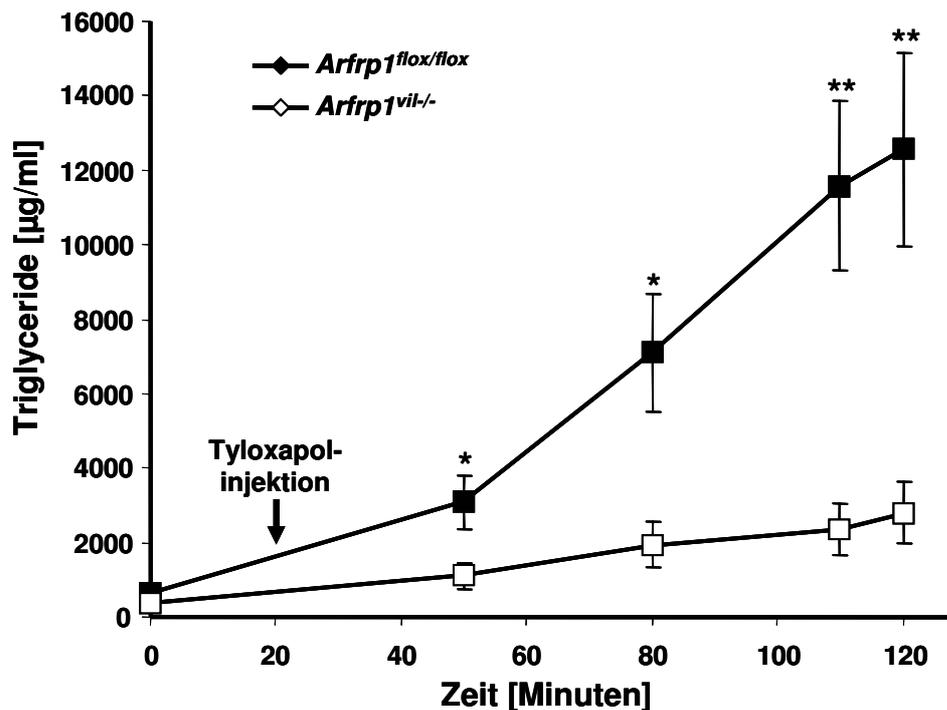


Abbildung 3.18: Verlauf der Triglyceridkonzentration im Plasma von Kontroll- und *Knockout*-Tieren nach Ölbolus und Tyloxapolinjektion

Kontroll- und Knockout-Tiere im Alter von vier bis fünf Wochen bekamen nach einer fünf-stündigen Fastenperiode einen Ölbolus (Zeitpunkt = 0 Minuten) und 20 Minuten später eine intravenöse Injektion einer Tyloxapollösung. Der Verlauf der Triglyceridkonzentration im Plasma wurden durch Blutentnahmen 30, 60, 90 und 100 Minuten nach Tyloxapolinjektion untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von je 9 Tieren pro Genotyp.

Tyloxapol (Triton WR-1339) ist ein nichtionisches Polymer, das nach intravenöser Applikation den lipolytischen Abbau von Triglyceriden blockiert, so dass die Spaltung der Chylomikronen und die Aufnahme von freien Fettsäuren ins Gewebe inhibiert wird. Somit kommt es bei ungestörter Lipidaufnahme über den Darm nach Tyloxapolbehandlung zu einer kontinuierlichen Zunahme der Triglyceridkonzentration. *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tiere wurde 20 Minuten nach einem Ölbolus intravenös Tyloxapol injiziert und die anschließenden Triglyceridkonzentrationen verfolgt. Die Kontrolltiere zeigten wie erwartet einen starken Anstieg der Triglyceridwerte im Plasma ab 30 Minuten nach Tyloxapolinjektion, der über den gesamten Beobachtungszeitraum weiter anstieg (Abb. 3.18). Die *Knockout*-Tiere zeigten hingegen lediglich einen leichten Anstieg der Triglyceridkonzentration im Plasma über den gesamten Beobachtungszeitraum. Dies zeigte, dass die Produktion oder die Abgabe von Chylomikronen ins Blut in den *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren signifikant erniedrigt war.

3.3.5.6 *Arfrp1*^{vil/-}-Tiere weisen nach Fasten reduzierte Konzentrationen von Ketonkörpern im Plasma auf

Um den Organismus auch in katabolen Stoffwechselsituationen ausreichend mit Energie zu versorgen, produziert er Ketonkörper. Die wichtigsten Vertreter sind hierbei β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat. Die Generierung der Ketonkörper erfolgt entweder aus Aminosäuren, wie etwa Leucin, Phenylalanin oder Tyrosin, oder aus Acetyl-CoA der β -Oxidation, also aus dem Abbau von Fettsäuren.

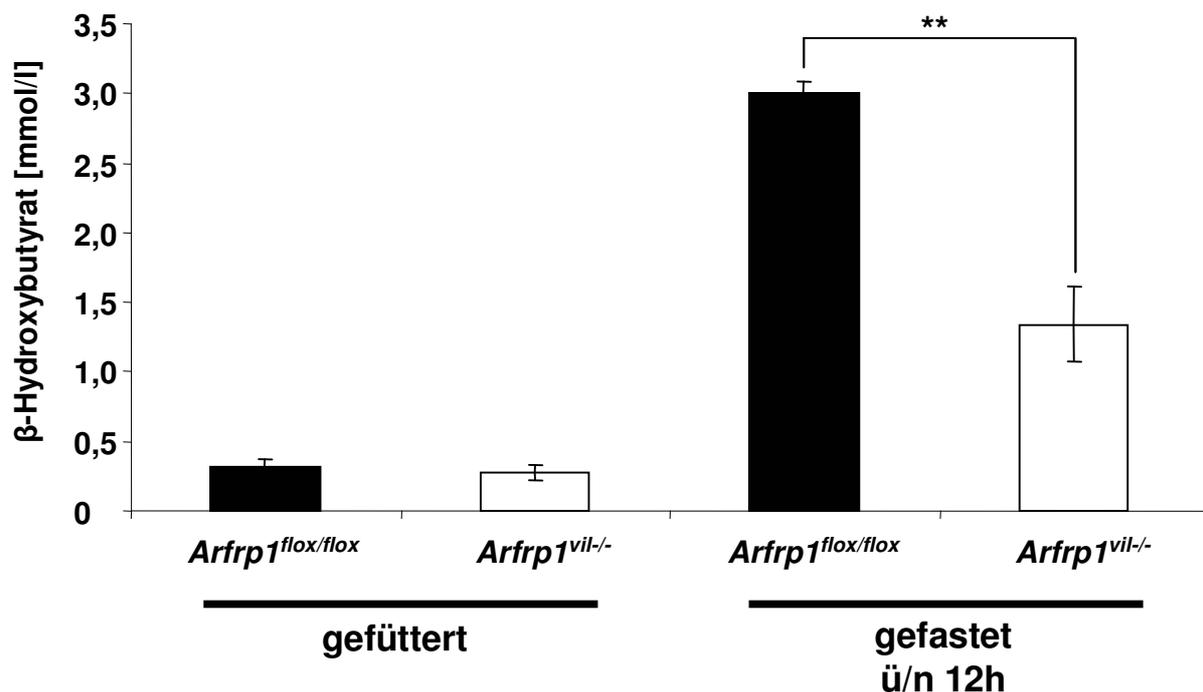


Abbildung 3.19: Bestimmung der β -Hydroxybutyrat-Konzentrationen im Plasma von *Arfrp1*^{flox/flox}- und *Arfrp1*^{vil/-}-Mäusen

Dargestellt sind die Werte der Analyse der β -Hydroxybutyrat-Konzentrationen von Kontroll- und *Knockout*-Tieren im Alter von vier bis fünf Wochen im gefütterten und nüchternen Zustand. Mittelwert \pm SEM von je 11 (gefüttert) bzw. 5 (gefastet) Tieren pro Genotyp. $p < 0,01$ **.

Da die *Knockout*-Tiere reduzierte Blutglucose-Konzentrationen und zudem offensichtlich eine gestörte Lipidaufnahme aufwiesen, wurde die Ketonkörperproduktion der Tiere genauer untersucht. Hierbei war von Interesse, inwieweit die Ketonkörperproduktion der *Knockout*-Tiere durch die Unterversorgung auch im gefütterten Zustand aktiv ist, und ob aufgrund der Lipidabsorptionsstörung in *Arfrp1*^{vil/-}-Tieren eine adäquate Ketonkörperproduktion als Antwort auf eine Fastenperiode erfolgt. Wie in Abb. 3.19 zu sehen, wiesen die *Arfrp1*^{vil/-}-Tiere im gefütterten Zustand keine signifikant veränderten β -Hydroxybutyrat-Konzentrationen auf. Im nüchternen Zustand, d.h. bei über Nacht gefasteten Tieren, konnte jedoch

eine signifikante Reduktion, bzw. ein verminderter Anstieg der Ketonkörper in den *Knockout*-Tieren nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass die *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere aufgrund ihrer Fettmalabsorption und ihrer geringen Fett- und fettfreien Masse nicht in der Lage sind, in adäquater Weise auf eine katabole Stoffwechselsituation zu reagieren.

3.3.5.7 Keine Veränderung der Expression oder Lokalisierung der an der Lipidabsorption im Darm beteiligten Proteine

Im Folgenden galt zu klären, an welcher Stelle die Lipidabsorption im Darm der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere gestört ist.

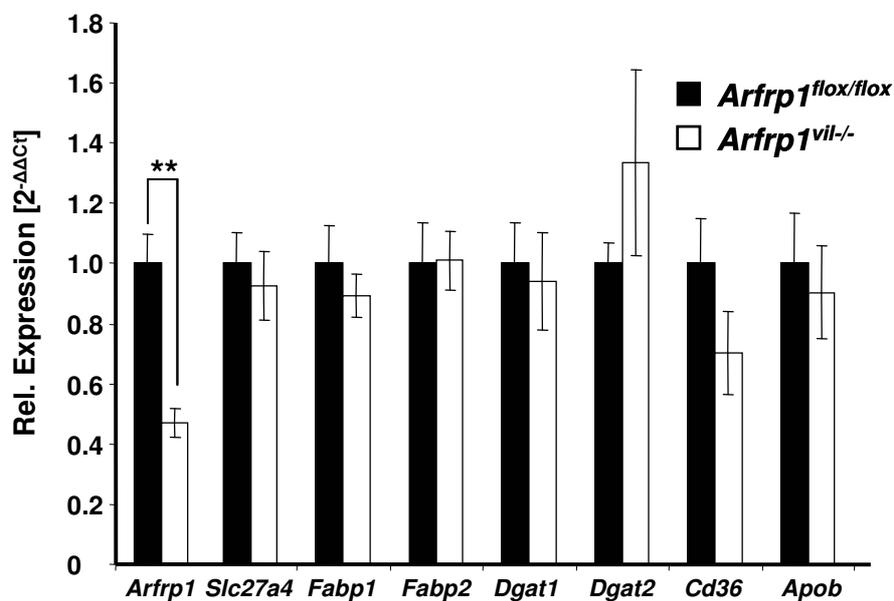


Abbildung 3.20: mRNA-Spiegel verschiedener, für die Lipid-Absorption wichtiger Gene im Jejunum von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen

Dargestellt ist die Analyse der Transkripte von *Arfrp1* und verschiedener für die Lipidabsorption der Enterozyten relevanter Gene. Die quantitative Ermittlung erfolgte mittels qRT-PCR aus Jejunum von Kontroll- und *Knockout*-Tieren. n = 7-9 pro Genotyp, p < 0,01**.

Zunächst wurden Transkripte der an der Lipidaufnahme des Darms beteiligten Proteine, wie CD36 (*fatty acid translocase*) oder FATP4 (Genname *Slc27a4*; *fatty acid transport protein*) die an der Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle beteiligt sind, FABP1 und 2 (*fatty acid binding protein*) die den intrazellulären Transport von Fettsäuren vermitteln, die Diacyl-Glycerol-Transferasen DGAT1 und 2 (*Diacylglycerol O-acyltransferase-1* und *2*), die die Resynthese von Triglyceriden aus aufgenommenen Fettsäuren und Monoacylglyceriden katalysieren und ApoB48 (Apolipoprotein B) als Hauptbestandteil von Chylomikronen per qRT-PCR analysiert.

Die Expression der mRNA von FATP4, FABP1 und 2, DGAT1 und 2, CD36 und ApoB48 war zwischen *Arfrp1^{vil/-}*- und *Arfrp1^{flox/flox}*-Tieren nicht verändert (Abb. 3.20). Im nächsten Schritt wurde die subzelluläre Verteilung dieser Proteine untersucht, wobei leider nicht für alle Proteine funktionstüchtige Antikörper zur Verfügung standen.

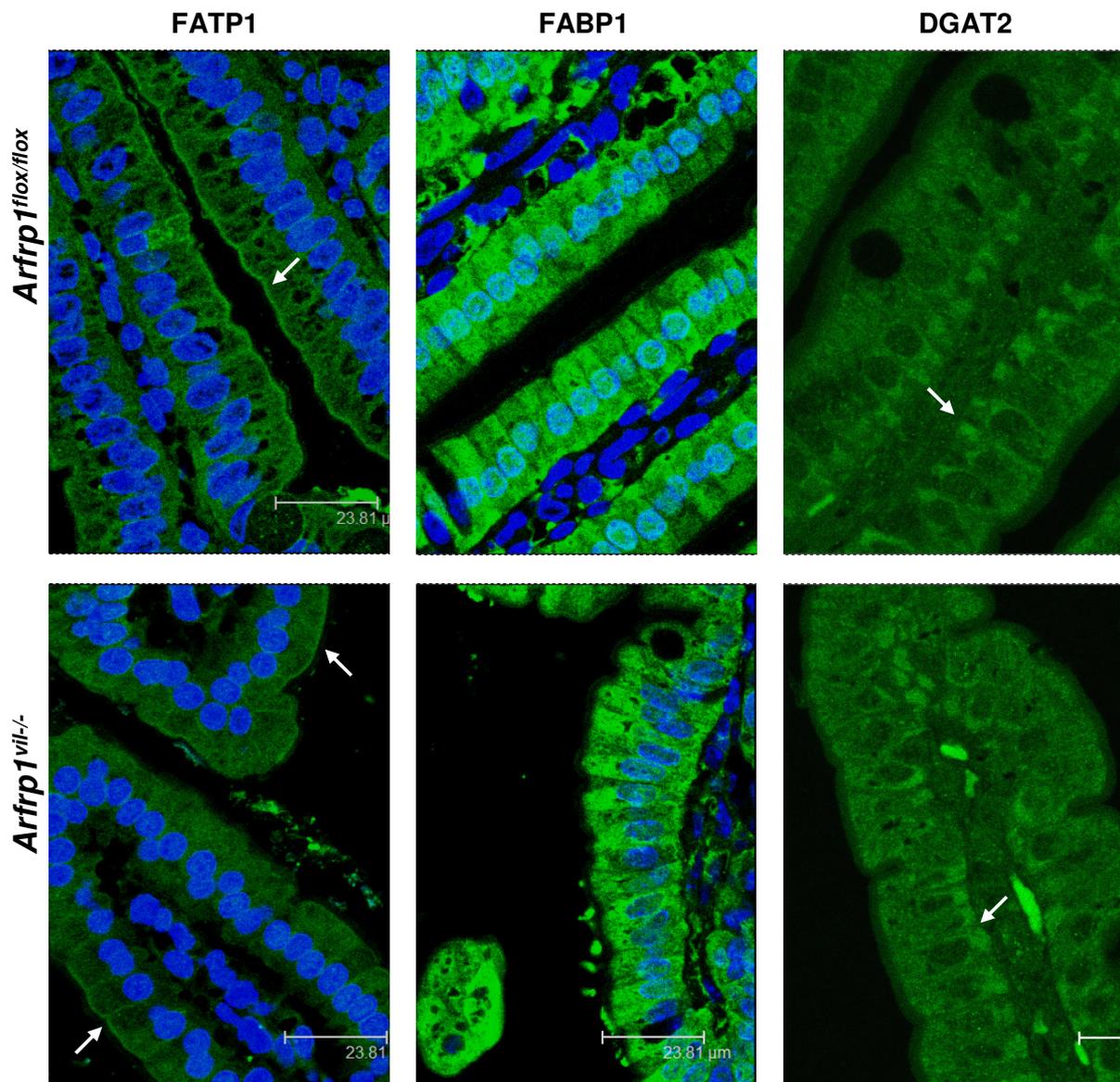


Abbildung 3.21: Immunhistochemische Analyse von FATP1, FABP1 und DGAT2 im Jejunum von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren

Jejunum-Schnitte vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere wurden immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen FATP1, FABP1 und DGAT2 gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Weiße Pfeile weisen auf FATP1 an der apikalen Membran (linke Spalte) bzw. auf DGAT2-Färbung basal der Kerne (rechte Spalte) hin.

Die erfolgreich durchgeführten immunhistologischen Färbungen zeigten jedoch keine Veränderungen bezüglich der Lokalisation von FATP1, FABP1 und DGAT2 zwischen *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren (Abb. 3.21). FATP1 lag sowohl im Darmepithel von

Kontroll- als auch von *Knockout*-Tieren an der apikalen Membran der Enterozyten vor (weiße Pfeile in Abb. 3.21, linke Spalte), FABP1 war in Zellen beider Genotypen intrazellulär über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 3.21, mittlere Spalte) und DGAT2 im Epithel beider Genotypen vor allem im Bereich des Golgi-Apparates nachzuweisen (weiße Pfeile in Abb. 3.21, rechte Spalte).

3.3.6 ARFRP1 spielt für die Aufnahme von Nahrungslipiden in die Darmepithelzelle keine Rolle

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit in den *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen die Aufnahme der Nahrungslipide in die epitheliale Zelle oder der Transport von Lipiden aus der Zelle gestört ist. Um zunächst zu prüfen, ob Lipide aus der Nahrung prinzipiell vom *Arfrp1^{vil/-}*-Epithel aufgenommen werden, wurde der Darm der Tiere nach oraler Applikation mit Olivenöl genauer untersucht. Durch eine *Oil-Red-O*-Färbung von Kryoschnitten des Jejunums von Tieren drei Stunden nach Ölapplikation wurde deutlich, dass sowohl in Darmzellen der Kontroll- als auch der *Knockout*-Tiere eine Akkumulation von Lipiden stattfand (Abb. 3.22A). In Enterozyten bilden sich, ähnlich wie in Fettzellen, bei nahrungsbedingter Fettsäureaufnahme zytosolische Lipidtropfen (Lee *et al.*, 2009). Die Lipidtropfen sind von Proteinen der PAT-Familie (Perilipin, ADRP und TIP47) umhüllt. Färbte man zum Beispiel TIP47, welches neben ADRP an zytosolische Lipidtropfen der Enterozyten bindet, mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, zeigte sich, dass es sowohl in Enterozyten der *Arfrp1^{flox/flox}*-Tiere, als auch in denen der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere zur Bildung zytosolischer, TIP47-ummantelter Lipidtropfen kommt (Abb. 3.22B). Eine Bestimmung der Triglyceride im Darmgewebe nach Ölapplikation zeigte zudem, dass die aufgenommene Menge an Triglyceriden nicht signifikant verändert war ($0,721 \pm 0,074 \mu\text{g TG} / \mu\text{g Protein}$ in *Arfrp1^{flox/flox}*- zu $0,646 \pm 0,044 \mu\text{g TG} / \mu\text{g Protein}$ in *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren). Die Aufnahme von Triglyceriden in die Epithelzelle des Darms scheint durch das Ausschalten von *Arfrp1* nicht beeinflusst.

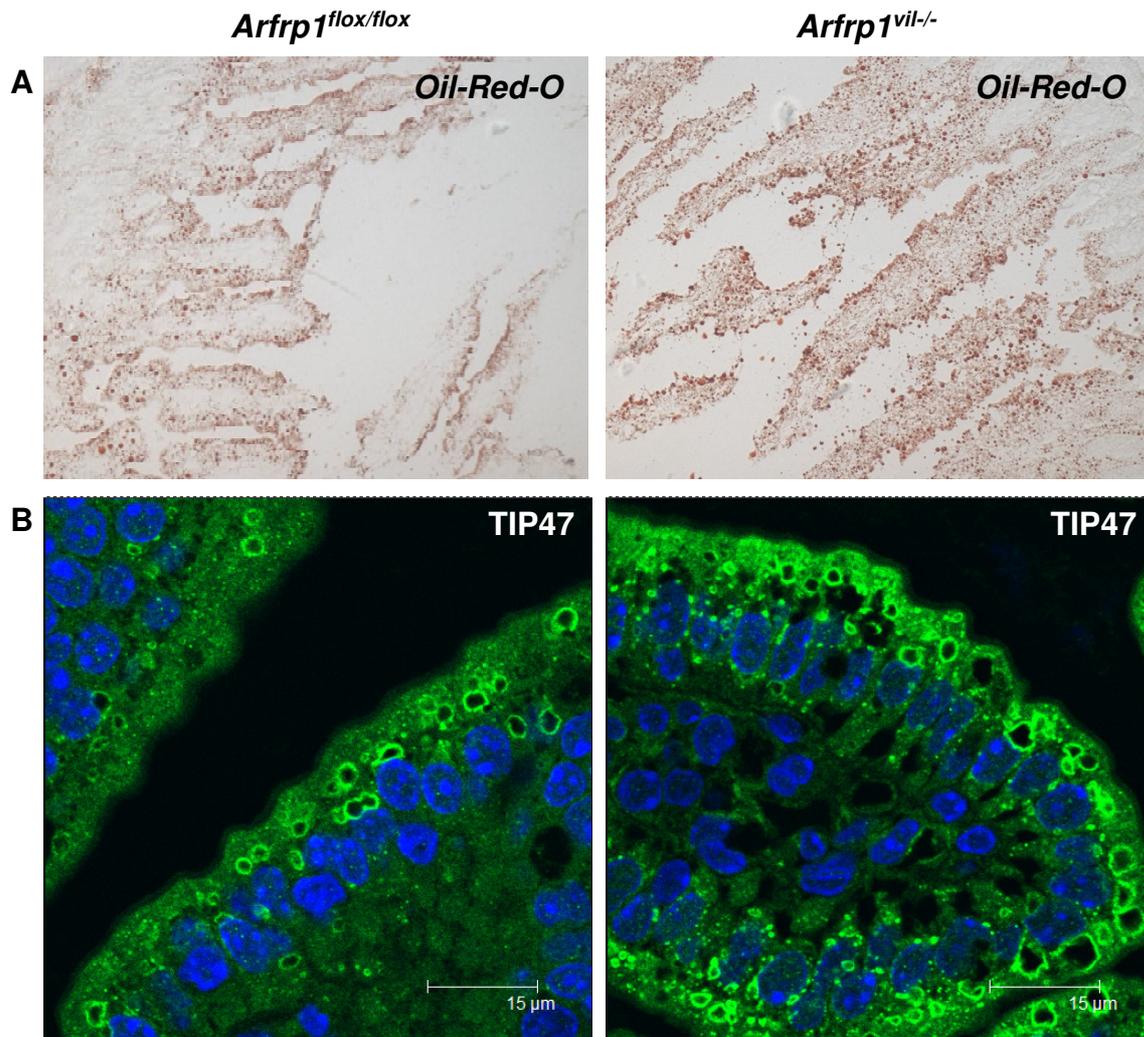


Abbildung 3.22: Nachweis zytosolischer Lipidtropfen in Enterozyten von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren

(A) Von Jejunum der Kontroll- und *Knockout*-Tiere, die drei Stunden nach einem Ölbolus getötet wurden, wurden Kryoschnitte hergestellt, die mit *Oil-Red-O* gefärbt wurden. (B) Jejunum-Schnitte vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren (drei Stunden nach Ölbolus) wurden immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper gegen TIP47 gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am Lichtmikroskop (A) bzw. am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (B).

3.4 Deletion von *Arfrp1* im Darm führt zu einer veränderten Expression von Rab-GTPasen

ARFRP1 reguliert über ARL1 die Rekrutierung von *GRIP*-Domäne-Proteinen (Zahn *et al.*, 2006), welche zusätzlich zur Interaktion mit ARL1 auch Bindungen mit diversen Rab-Proteinen eingehen können (Sinka *et al.*, 2008). Für die *GRIP*-Proteine Golgin-97, Golgin-245, GCC88 und GCC185 wurde eine Bindung von Rab2, 6, 19 und 30 nachgewiesen.

Um zu überprüfen, ob es in Abwesenheit von ARFRP1 im Darmepithel zu einer Beeinträchtigung von Rab-Proteinen kommt, die an *GRIP*-Proteine binden, wurde

zunächst die Expression mehrerer Rab-Proteine genauer untersucht. Mittels qRT-PCR wurden die Transkripte von Rab2, 6, 19 und 30, sowie von Rab8 und Rab18, für die keine Interaktion mit GRIP-Proteinen nachgewiesen wurde, untersucht. Sowohl die mRNA-Spiegel von *Rab2* als auch von *Rab6* waren im Jejunum der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere signifikant erhöht. Die Expressionen von *Rab19* bzw. *Rab30*, sowie von *Rab8* und *Rab18* waren hingegen unverändert. Rab8 wurde untersucht, da bekannt ist, dass es im Darm essentiell für den Transport von Proteinen an die apikale Membran von Enterozyten ist (Sato 2007), deren Fehlverteilung zu einer Absorptionsstörung führt. Für Rab18 ist bekannt, dass es mit Lipidtropfen assoziiert (Murphy *et al.*, 2001; Olofsson *et al.*, 2008b) und wurde aufgrund der Lipid-Aufnahmestörung der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere mitgeführt.

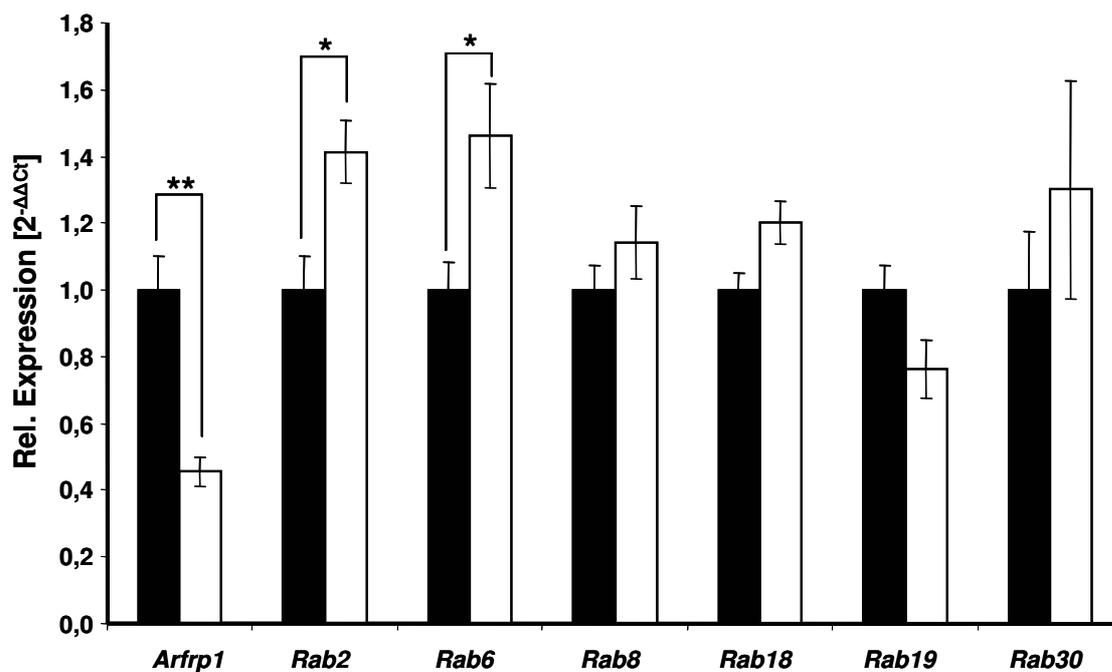


Abbildung 3.23: mRNA-Expression verschiedener Rab-Proteine im Jejunum von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen

Dargestellt ist die Analyse der Transkripte von *Arfrp1* und angegebener Rab-Proteine. Die quantitative Ermittlung erfolgte mittels qRT-PCR aus Jejunum von sieben Kontroll- und neun *Knockout*-Tieren. Mittelwert \pm SEM; $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **.

Da sich für die beiden GTPasen Rab2 und Rab6 eine veränderte Expression in der qRT-PCR gezeigt hatte, wurden diese Proteine immunhistochemisch genauer analysiert. Beide Proteine, Rab2 und Rab6 wiesen eine veränderte Lokalisation in der Darmepithelzelle der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere auf. Während Rab2 in Kontrolltieren kaum nachweisbar war, zeigte sich in Zellen der *Knockout*-Tiere eine starke Färbung im

gesamten Bereich zwischen Kern und apikaler Membran, wo Rab2 an vesikulären Strukturen verteilt vorlag (siehe weiße Pfeile in Abb. 3.24 oben). Rab6 zeigte in Zellen beider Genotypen eine primär zytosolische Verteilung, wobei es in Zellen der *Arfrp1*^{vil/-}-Tiere zusätzlich apikal der Kerne, also im Bereich des Golgi-Apparates nachgewiesen wurde (siehe weiße Pfeile in Abb. 3.24 unten). Für Rab8 und Rab18 wurden in der immunhistochemischen Analyse keine Veränderungen beobachtet (Abb. 3.25).

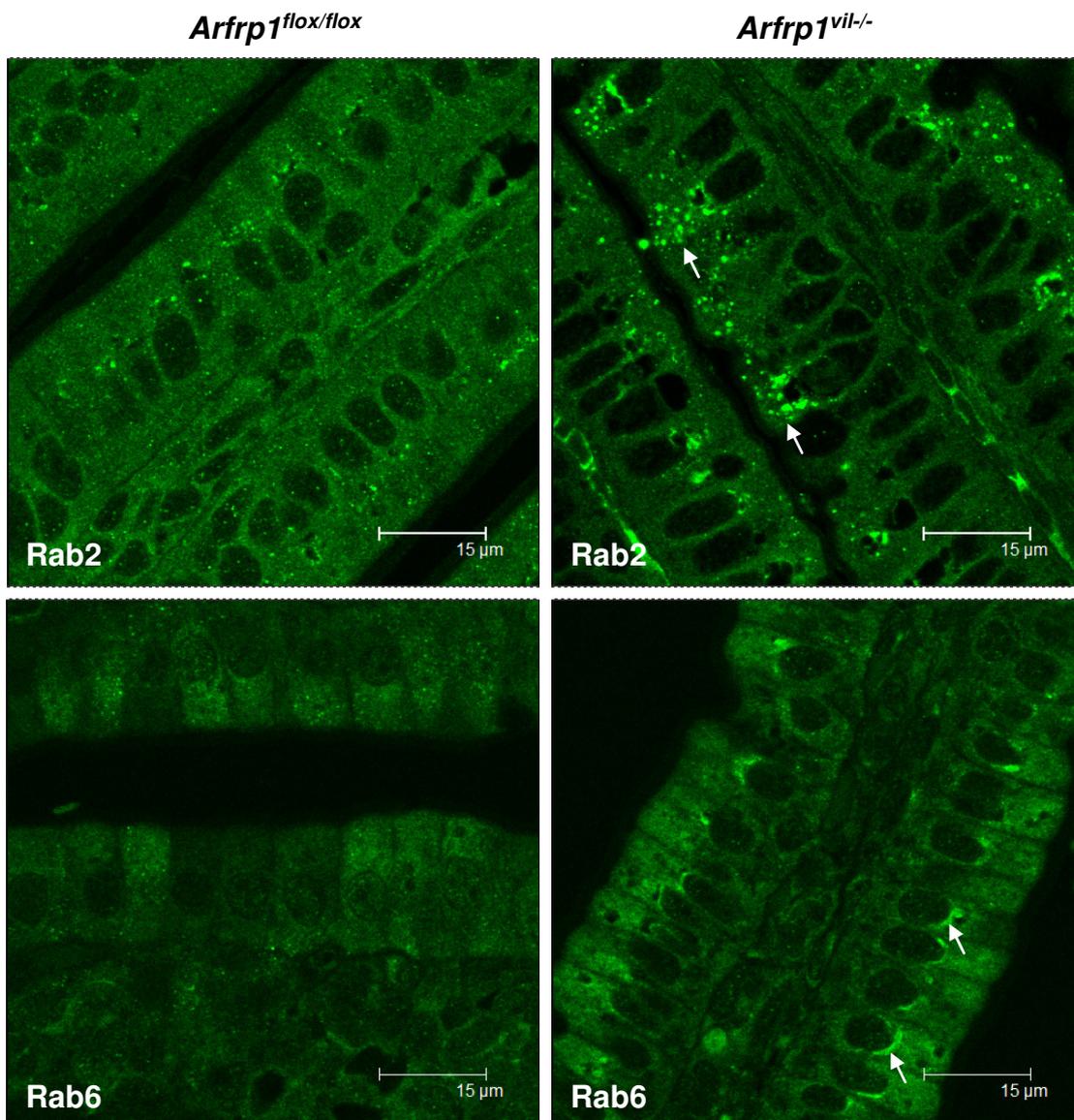


Abbildung 3.24: Immunhistochemischer Nachweis von Rab2 und Rab6 im Jejunum von *Arfrp1*^{flox/flox}- und *Arfrp1*^{vil/-}-Mäusen

Jejunum-Schnitte vier Wochen alter *Arfrp1*^{flox/flox}- und *Arfrp1*^{vil/-}-Tiere wurden immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen Rab2 oder Rab6 gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Weiße Pfeile weisen auf Rab2 an vesikulären Strukturen (obere Reihe) bzw. auf Rab6 im Bereich des Golgi-Apparates (untere Reihe) hin.

Rab8 liegt in den Darmzellen beider Tiergruppen zytosolisch vor, Rab18 wies zusätzlich zur zytosolischen Lokalisation eine leichte perinukleäre Färbung auf, die aber sowohl in Kontroll- als auch in *Knockout*-Tieren zu erkennen war.

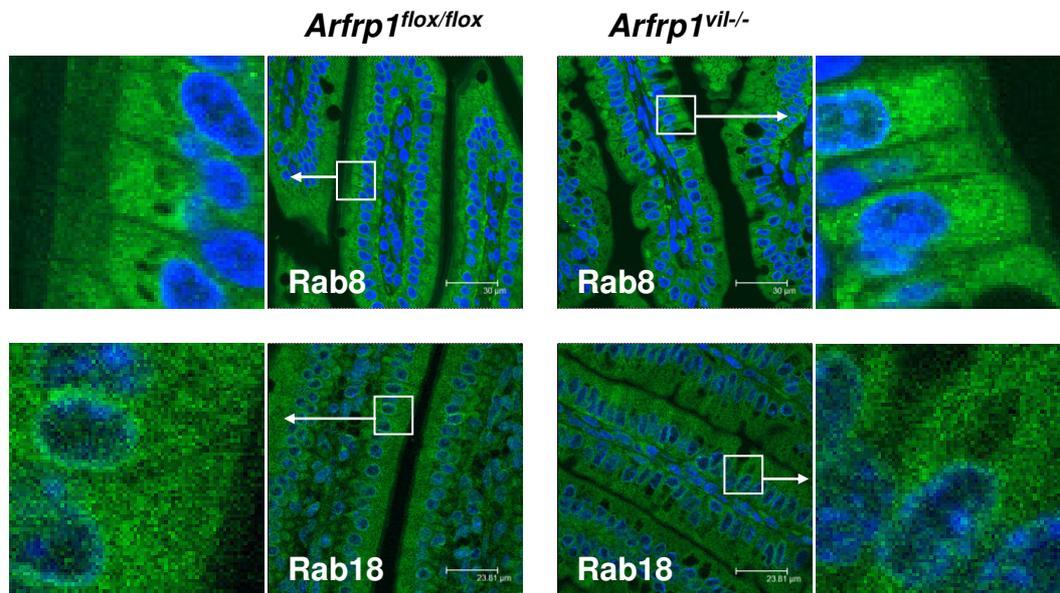


Abbildung 3.25: Immunhistochemischer Nachweis von Rab8 bzw. Rab18 im Jejunum von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen

Jejunum-Schnitte vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren wurden immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen Rab8 oder Rab18 gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

In *Westernblot*-Analysen (Abb. 3.26) wurde für Rab2 zudem ein verändertes Laufverhalten nach gelelektrophoretischer Trennung beobachtet, was auf eine modifizierte Prozessierung dieses Proteins hindeuten könnte. Die Menge an Rab8 und Rab18 in Lysaten der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere war jedoch vermindert.

Bisherige Ergebnisse (qRT-PCR, Immunhistologie und *Westernblot*-Analyse) hatten jeweils deutliche Unterschiede in Expression und subzellulärer Lokalisation von Rab2 gezeigt, so dass im Folgenden die genaue subzelluläre Verteilung von Rab2 mittels Ko-Färbungen mit Markern mehrerer zellulärer Kompartimente untersucht wurde. Die Ko-Färbung von Rab2 und TGN38 (Abb. 3.27) zeigte im Darmepithel von Kontrollmäusen, dass Rab2 nicht mit TGN38 ko-lokalisiert ist, also sich nicht im *trans*-Golgi befand. Die Färbung der *Arfrp1^{vil/-}*-Schnitte bestätigte, dass in Abwesenheit von ARFRP1, TGN38 kaum nachweisbar war. Allerdings war in einigen Zellen der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere eine TGN38-Färbung ähnlich der Kontrolltiere zu erkennen, was vermuten lässt, dass in diesen Zellen *Arfrp1* nicht effizient ausgeschaltet wurde.

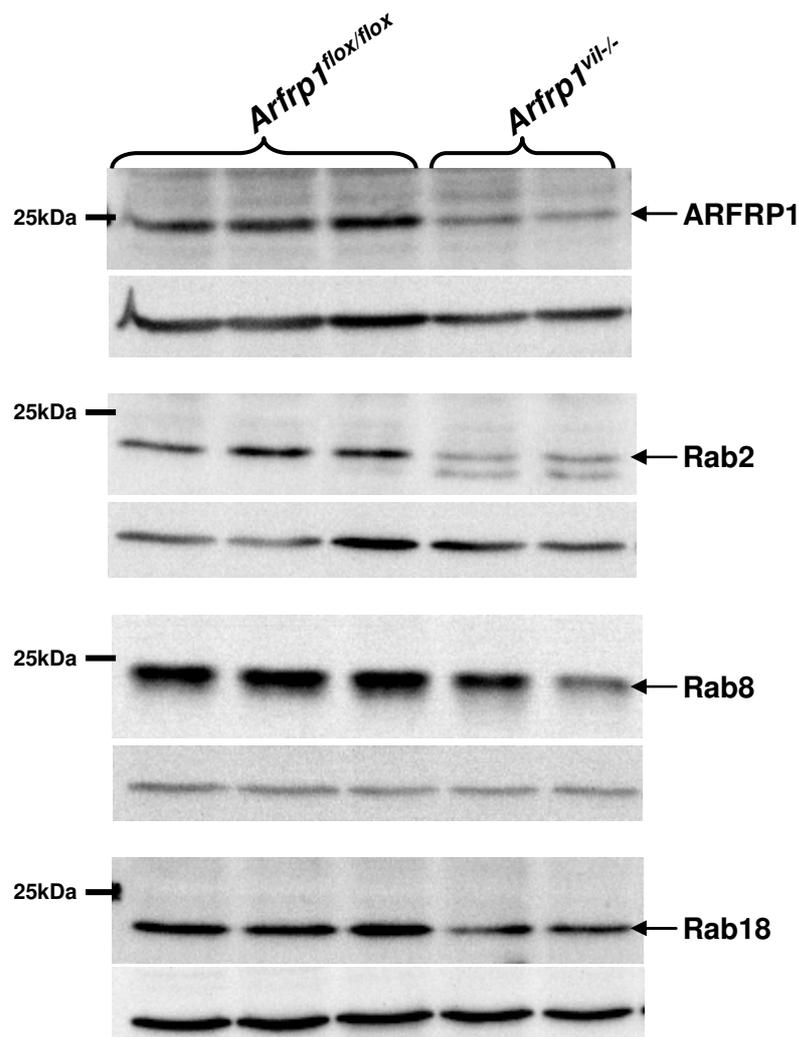


Abbildung 3.26: Nachweis der Proteinmengen von ARFRP1, sowie Rab2, 8 und 18 im Jejunum von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vit-/-}*-Mäusen

Lysate des Jejunums vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vit-/-}*-Tiere wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Rab2, 8 und 18 inkubiert. Als Ladekontrolle wurde jeweils zusätzlich GAPDH nachgewiesen.

Interessanterweise wurde eine veränderte subzelluläre Verteilung von Rab2 in den *Knockout*-Tieren nur in Zellen nachgewiesen, in denen TGN38 nicht angefärbt wurde. Dies bedeutet, dass Rab2 tatsächlich nur in Zellen ohne ARFRP1 eine veränderte Verteilung aufwies.

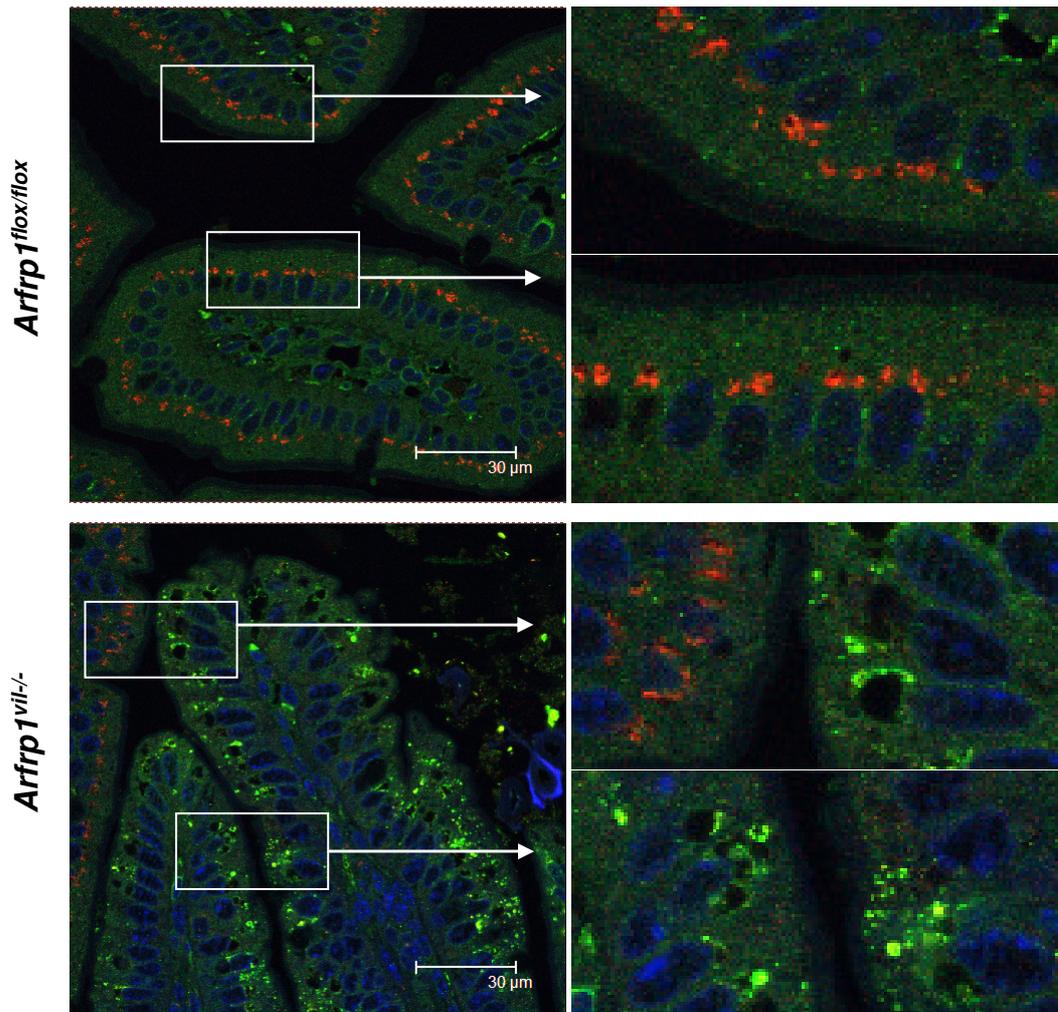


Abbildung 3.27: Immunhistochemischer Nachweis von Rab2 und TGN38 im Jejunum von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen

Jejunum-Schnitte vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere wurden immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen Rab2 (grün) und TGN38 (rot) gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

Mit Hilfe einer Ko-Färbung von Rab2 mit Lamp1, einem lysosomalen Protein, sollte gezeigt werden, ob in *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren Rab2 lysosomal abgebaut wurde. Wie in Abb. 3.28A ersichtlich, zeigte sich in *Arfrp1^{vil/-}*-Zellen keine Ko-Färbung von Rab2 und Lamp1, so dass geschlossen werden kann, dass das akkumulierte Rab2 nicht dem lysosomalen Abbau zugeführt wird. Der Vergleich zwischen Kontroll- und *Knockout*-Tieren zeigt außerdem, dass die Färbung von Lamp1 in *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren schwächer und wesentlich ungeordneter war als in den *Arfrp1^{flox/flox}*-Tieren. Da Rab2 unter anderem als Bindungspartner von p115 identifiziert werden konnte (Short *et al.*, 2001a) und wir für E-Cadherin gezeigt hatten, dass es im *Arfrp1^{vil/-}*-Epithel zum Teil im *cis*-Golgi verbleibt, wurde eine Ko-Färbung von Rab2 mit p115, einem *cis*-Golgi-Marker, durchgeführt.

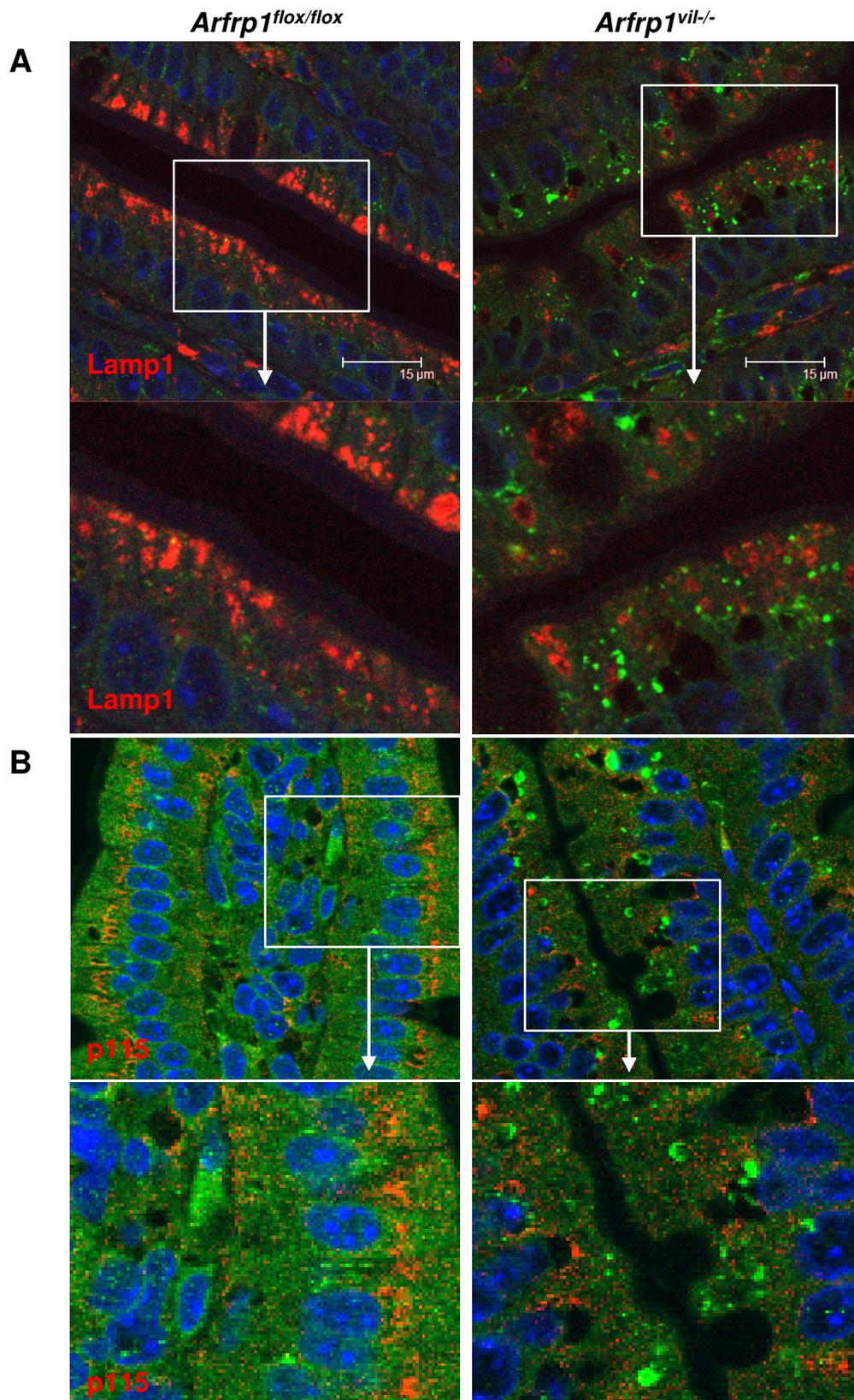


Abbildung 3.28: Immunhistochemischer Nachweis von Rab2 und Lamp1 bzw. Rab2 und p115 im Jejunum von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Mäusen

Jejunum-Schnitte vier Wochen alter *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren wurden immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen Rab2 (grün) und TGN38 (rot) (A) oder Rab2 (grün) und p115 (rot) (B) gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

Diese zeigte in Enterozyten der Kontrolltiere eine schwache Ko-Lokalisation von p115 und Rab2. Rab2 zeigte in *Knockout*-Zellen keine Ko-Lokalisation mit p115 und lag somit nicht am *cis*-Golgi vor (Abb. 3.28B). Zudem zeigte auch p115 ähnlich wie GM130 ein leicht verändertes Muster. Trotz verschiedener Ko-Färbungen wurde das Kompartiment, in dem sich Rab2 in Epithelzellen der *Arfp1^{vil/-}*-Mäusen befindet, nicht identifiziert.

4 Diskussion

4.1 Absorption von Makronährstoffen durch das Darmepithel der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse

ARFRP1 ist eine monomere GTPase, die die Rekrutierung einiger Proteine an den *trans*-Golgi reguliert und somit an vesikulären Transportprozessen beteiligt zu sein scheint. Die Darm-spezifische *Arfrp1*-Nullmutante, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, zeigte eine frühe postnatale Wachstumsretardierung. *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse waren lebensfähig und bei der Geburt nicht von ihren Wurfgeschwistern zu unterscheiden, zeigten jedoch bereits am Tag drei ein signifikant reduziertes Körpergewicht (3.3.1, Abb 3.9). Ziel war es, die zugrunde liegenden Ursachen dieser Wachstumsretardierung aufzuklären. Während der Glucosetransport und die Aufnahme von Peptiden und Aminosäuren in *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren nicht beeinträchtigt waren, zeigten sie eine Fettmalabsorption, die für die Wachstumsretardierung der Tiere verantwortlich gemacht werden konnte. Die Deletion von *Arfrp1* im Darmepithel der Maus führte aufgrund veränderter Sortierung von Rab-GTPasen zu einer veränderten Organisation des Golgi-Apparates, was offensichtlich den Vesikeltransport beeinträchtigte und vermutlich die Chylomikronenbildung oder den Austransport von Chylomikronen aus dem Darmepithel behinderte.

4.1.1 Uneingeschränkte Aufnahme von Glucose durch das Darmepithel der *Arfrp1^{vil/-}*-Maus

Verminderte Konzentrationen von Blutglucose, sowie Triglyceriden und freien Fettsäuren im Plasma der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere (3.3.4, Tab. 1) legten die Vermutung einer Malabsorption nahe. Aufgrund dieser Tatsache wurde der Transport von Makronährstoffen näher untersucht. Der Transport von Monosacchariden durch die Enterozyten des Darms wird hauptsächlich durch die Glucosetransporter SGLT1 und GLUT2 realisiert, wobei der aktive Natrium-abhängige Glucosetransporter SGLT1 die Glucoseaufnahme aus dem Darmlumen katalysiert (Wright *et al.*, 2007). Da SGLT1 neben Glucose auch Galaktose in die Zelle transportiert, führt eine eingeschränkte Funktionalität von SGLT1, zum Beispiel durch Mutationen im *SLC5A1*-Gen, zu einer Glucose-Galaktose-Malabsorption und nahrungsbedingten Diarrhöe (Wright *et al.*, 2002). Ebenso zeigte sich nach Deletion von *Slc5a1* in der Maus eine stark

verminderte Glucoseabsorption, so dass diese Mäuse nur auf einer Kohlenhydratfreien Diät überlebten (Prof. Koepsell, persönliche Kommunikation). Der Export der Monosaccharide aus der Epithelzelle ins Blut erfolgt über den passiven Glucosetransporter GLUT2 (Cheeseman, 1993). Diese Funktion scheint jedoch von anderen Glucosetransportern wie GLUT5 oder GLUT1 übernommen werden zu können, da die *Slc2a2* (GLUT2)-Nullmutante keine Einschränkungen der Glucoseabsorption des Darms zeigt (Guillam *et al.*, 1997). Ebenso führten Mutationen im humanen *SLC2A2*-Gen nicht zu einer Absorptionsstörung, sondern zum seltenen Fanconi-Bickel-Syndrom, das mit einer Glykogen-Speicherstörung der Leber einhergeht (Leturque *et al.*, 2009; Santer *et al.*, 1997).

Die *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere zeigten keine Unterschiede in der Protein- oder mRNA-Expression der Glucosetransporter SGLT1 und GLUT2 (3.3.5.2, Abb. 3.13). Auch immunhistochemische Untersuchungen hatten keine Veränderung der Lokalisierung von SGLT1 und GLUT2 im Darm der *Knockout*-Tiere ausgemacht (3.3.5.2, Abb. 3.14). Demnach scheint ARFRP1 nicht wie beim Adhäsionsprotein E-Cadherin (Zahn *et al.*, 2008) für das *Targeting* von Glucosetransportern im Darm benötigt zu werden. Da schließlich orale Glucose-Toleranztests eine unveränderte Aufnahme von Glucose ins Blut der Tiere zeigten (3.3.5.2, Abb.3.15), konnte ein Defekt der Glucoseaufnahme in die Enterozyten sowie des Weitertransports von Glucose ins Blut ausgeschlossen und belegt werden, dass die Wachstumsretardierung der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere nicht durch eine Beeinträchtigung der Kohlenhydrat-Absorption zustande kommt.

4.1.2 Normale Absorption von Peptiden und Aminosäuren durch das Darmepithel der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere

Die Resorption von Proteinen erfolgt nach Verdau zu Aminosäuren und kleineren Peptiden über Aminosäuretransporter (z.B. *Slc1a1*, *Slc3a1*, *Slc6a19*, *Slc36a1* oder *Slc38a1*) oder Peptidtransporter (*PepT1*). Nach vollständiger Hydrolyse der Peptide gelangen freie Aminosäuren ins Blut (Adibi *et al.*, 1967), wobei die eingeschränkte Funktionalität der Transporter hier zu veränderten Aminosäure-Konzentrationen führt. So zeigen sich zum Beispiel bei der Hartnup-Krankheit aufgrund von Mutationen des *SLC6A19*-Gens reduzierte Konzentrationen von Tryptophan im Blut (Jonas & Butler, 1989; Scriver *et al.*, 1987).

Die Bestimmung der freien Aminosäuren im Plasma von Kontroll- und *Knockout*-Tieren zeigte jedoch keine Reduktion einzelner Aminosäuren in den *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren (3.3.5.3, Abb. 3.16). Da sich eine Einschränkung der Funktionalität von Transportern aufgrund veränderter Prozessierung oder Sortierung an die apikale oder basolaterale Membran der Enterozyten in einer verminderten Menge von freien Aminosäuren im Plasma der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere manifestieren müsste, kann der Schluss gezogen werden, dass die Absorption von Peptiden und Aminosäuren und ihre Bereitstellung für den Organismus im Darm der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere nicht beeinflusst wird. In der Tat waren einige der Aminosäuren im Plasma der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse sogar leicht erhöht, was auf eine gesteigerte Proteolyse zurückzuführen sein könnte, um z.B. den erniedrigten Blutglucosewerten durch Induktion der Gluconeogenese entgegenzuwirken. Die erhöhten Spiegel einiger Aminosäuren lassen jedoch kein Muster erkennen, so waren sowohl einzelne glucogene als auch ketogene sowie essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren erhöht.

4.1.3 Die Malabsorption von Fettsäuren in der *Arfrp1^{vil/-}*-Maus

Entgegen der Ergebnisse für die Absorption von Glucose und Aminosäuren zeigten *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere bei der Absorption von Nahrungslipiden und deren Weiterleitung über die Lymphe ins Blut eine massive Beeinträchtigung. Erste Hinweise darauf ergab bereits ein Fütterungsversuch mit einer Kohlenhydrat-freien Hochfettdiät, bei dem nur 14% der *Knockout*-Tiere eine 30-tägige Diätintervention (im Vergleich zu 91% der Kontrolltiere) überlebten, während 47% der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere auf der Haltdiät überlebten (3.3.5.1, Abb. 3.12). Der Phänotyp der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere hatte sich also nach Gabe einer hauptsächlich aus Fetten bestehenden Energiequelle massiv verschlechtert (3.3.5.1, Abb. 3.12).

Tatsächlich zeigte sich im oralen Fett-Toleranztest (3.3.5.4, Abb. 3.17), dass mittels Schlundsonde verabreichtes Öl nicht in Form von Triglyceriden im Blut der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere detektiert werden konnte. Wurden die Tiere nach der Ölapplikation zusätzlich mit Tyloxapol behandelt, um die Lipoproteinlipase zu hemmen und dadurch die Aufnahme von Fettsäuren ins Gewebe zu unterbinden, war nur in *Arfrp1^{flox/flox}*-Tieren ein kontinuierlicher Anstieg der Triglyceridkonzentration im Plasma nachweisbar, während die *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere auch hier deutlich niedrigere Triglyceridkonzentrationen aufwiesen (3.3.5.4, Abb. 3.18).

Dieser Befund warf die Frage auf, ob in *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren (1) die Fettsäuren nicht vom Darmepithel aufgenommen, (2) diese in den Epithelzellen nicht korrekt prozessiert oder (3) nicht in die Lymphe abgegeben werden.

4.1.3.1 Mechanismen der gestörten Lipidaufnahme der *Arfrp1^{vil/-}*-Maus

Die Absorption von Lipiden durch die Enterozyten des Darms ist ein streng regulierter Prozess, da frei vorliegende Fettsäuren im Inneren der Zelle ein hohes Risiko für die Integrität von intrazellulären Membranen darstellen. Die Aufnahme von Fettsäuren in die Enterozyten des Darms erfolgt entweder über Diffusion durch die apikale Membran oder wird durch FATP4 bzw. FAT/CD36 vermittelt. Die *Fatp4*-Nullmutante weist aufgrund einer Störung der Haut eine perinatale Letalität auf (Herrmann *et al.*, 2003). Durch Expression von FATP4 - vermittelt durch einen Keratinozyten-spezifischen Promotor - wurden Mäuse generiert, die keinen Hautdefekt zeigten, aber in den restlichen Geweben noch *Fatp4*-defizient waren. In diesen Tieren war keine Beeinträchtigung der Aufnahme von Fettsäuren in die Enterozyten beobachtet worden (Shim *et al.*, 2009). Die Rolle von CD36 bei der Absorption von Fettsäuren im Darm wird sehr kontrovers diskutiert. Während die Gruppe von Voshol zeigte, dass die Lipidabsorption von radioaktiv markierter Palmitinsäure in der *Cd36*-Nullmutante nicht beeinflusst war (Goudriaan *et al.*, 2002), beobachtete die Gruppe um Abumrad, dass Lipide in Enterozyten der *Cd36*-Nullmutante akkumulierten, die Aufnahme also nicht gestört war. Jedoch waren in diesen Tieren die Formation und Sekretion von Chylomikronen in Abwesenheit von CD36 eingeschränkt (Drover *et al.*, 2005; Nauli *et al.*, 2006). Neuere Untersuchungen zeigten, dass die akute Aufnahme von Fettsäuren (90 Minuten nach Applikation) im proximalen Dünndarm durch das Fehlen von CD36 stark beeinträchtigt war, während nach fünf Stunden keine Unterschiede zu beobachten waren. Somit scheint CD36 im proximalen Teil des Dünndarms durchaus an der Absorption von Fettsäuren beteiligt zu sein (Nassir *et al.*, 2007).

Die Aufnahme von Fettsäuren in die Epithelzelle scheint in den *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren nicht beeinträchtigt zu sein, da zum einen die Expression der Transkripte der an der Lipidaufnahme im Darm beteiligten Proteine FATP4 und CD36 durch die Deletion von *Arfrp1* nicht beeinflusst wurden (3.3.5.7, Abb. 3.20). Zum anderen war nach oraler Applikation von Öl sowohl in Enterozyten der Kontroll- als auch der *Knockout*-Tiere die Bildung von intrazellulären Lipidtropfen zu beobachten (3.3.6, Abb. 3.22)

und die Menge an Triglyceriden im Darmepithel ebenfalls unverändert (3.3.6). Das Fehlen von ARFRP1 scheint also keine Auswirkungen auf die Funktion von CD36 oder FATP4 und die über Diffusion erfolgte Lipidaufnahme zu haben.

FABPs, die den Transport von Fettsäuren zum endoplasmatischen Retikulum (ER) gewährleisten, scheinen in den *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren ebenfalls nicht verändert zu sein, da sowohl die mRNA-Expression als auch die Lokalisation der FABP-Proteine in der Zelle keine Unterschiede zwischen Kontroll- und *Knockout*-Tieren zeigte (3.3.5.7). Für DGAT1, das einen Schritt der Triglycerid-Synthese katalysiert, wurde gezeigt, dass es nicht direkt für die Synthese von Triglycerid-reichen Chylomikronen benötigt wird. Zwar zeigten *Dgat1*-Nullmutanten nach chronischer Hochfettapplikation eine Akkumulation von intrazellulären Lipiden in den Enterozyten des Darms und eine reduzierte postabsorptive Chylomikronensekretion, sie wiesen jedoch im Gegensatz zu *Arfrp1^{vil/-}*-Mäusen keine reduzierten Triglyceridkonzentrationen im Plasma auf. Es wird vermutet, dass das Fehlen von DGAT1 durch die Aktivität von DGAT2 und die Diacylglycerol-Transacylase kompensiert werden kann (Buhman *et al.*, 2002). Über die Beteiligung von DGAT2 an der Lipidabsorption im Darm kann nur spekuliert werden. Zwar wiesen *Dgat2*-Nullmutanten stark reduzierte Konzentrationen von Triglyceriden und freien Fettsäuren im Plasma sowie reduzierte Mengen an Triglyceriden in allen Geweben auf, starben jedoch aufgrund einer Störung der Barrierefunktion der Haut schon zwei bis 24 Stunden nach der Geburt (Stone *et al.*, 2004). Aufgrund der erniedrigten Triglyceridkonzentrationen im Plasma der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse ist eine Beteiligung von DGAT1 an der Malabsorption der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse unwahrscheinlich. Auch die Lokalisation von DGAT2 war in Kontroll- und *Knockout*-Tieren unverändert (3.3.5.7, Abb. 3.21). Dies lässt den Schluss zu, dass die Malabsorption der *Knockout*-Tiere nicht durch Veränderungen von DGAT1 oder 2 zustande kommt.

Wurde nach Ölapplikation durch Tyloxapol die Spaltung von Triglyceriden und damit die Aufnahme von Fettsäuren ins Gewebe gehemmt, akkumulierten die *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse deutlich weniger Triglycerid-reiche Partikel im Plasma als die *Arfrp1^{flox/flox}*-Tiere (3.3.5.5, Abb. 3.18). Dies zeigte, dass der fehlende Anstieg der Triglyceridkonzentration im Plasma der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere im oralen Fett-Toleranztest nicht das Resultat einer gesteigerten Aufnahme von Fettsäuren in periphere Gewebe war, sondern, dass die Menge an Triglycerid-reichen Chylomikronen, die vom Darm sekretiert werden, deutlich reduziert war. *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere weisen also offensichtlich

eine Störung (1) der Chylomikronen-Prozessierung, (2) des Chylomikronen-Transports oder (3) der Exozytose von Chylomikronen auf.

Bisher sind noch nicht alle Schritte der Generierung und des Transports von Chylomikronen hinreichend geklärt. Bekannt ist, dass der Austritt der Prächylomikronen aus dem ER der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Sekretion von Chylomikronen aus den Enterozyten ist (Mansbach & Dowell, 2000), der Transport zwischen ER und Golgi wirft jedoch noch einige Fragen auf. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in *Sar1b*, einer GTPase, die an der Knospung von ER-Membranen beteiligt ist, zur Anderson-Krankheit (*CMRD, chylomicron retention disease*) führen, in der Chylomikronen nicht vom ER zum Golgi-Apparat transportiert werden können und im ER akkumulieren (Charcosset *et al.*, 2008; Shoulders *et al.*, 2004). Hierbei wurde gezeigt, dass die Rekrutierung der COPII Coat-Proteine essentiell für das *Budding* von Vesikeln, die Chylomikronen vom ER zum Golgi transportieren, ist. Sar1 bindet nach Aktivierung durch den Nukleotidaustauschfaktor Sec12 an Membranen des ER und rekrutiert das Heterodimer Sec23/24 durch eine Interaktion mit Sec23, was schließlich zur Umverteilung der COPII-Proteine Sec13/31 an ER-Membranen führt. Bindet das Heterotetramer Sec13/31 an Membranen des ER, wird die Knospung von COPII-Vesikeln initiiert. Der sekretorische Transport von Proteinen vom ER zum Golgi-Apparat erfolgt in diesen COPII-Vesikeln. Für größere, makromolekulare Komplexe, wie zum Beispiel Prokollagen wurde gezeigt, dass das Knospen entsprechender Transportvesikel zwar Sar1-abhängig ist, diese Vesikel jedoch im Gegensatz zu den kleineren COPII-Vesikeln keine COPII-Hülle aufweisen (Shoulders *et al.*, 2004). Dies geht einher mit Befunden, dass die COPII-Hülle aufgrund ihrer Geometrie die Größe der Transportvesikel auf maximal 100 nm beschränkt (Stagg *et al.*, 2008). Daher postulierte die Arbeitsgruppe um Mansbach die Existenz von Prächylomikronen-Transport-Vesikeln (PCTV), die eine Größe von 350-500 nm aufweisen (Siddiqi *et al.*, 2003). Diese benötigten COPII-Proteine zwar für die Fusion der PCTV an die Golgi-Membran, jedoch nicht für das Knospen der PCTV an ER-Membranen, ein Schritt der Sar1-unabhängig ist (Siddiqi *et al.*, 2009; Siddiqi *et al.*, 2003). Neueste Ergebnisse zeigten, dass der *Budding*-Komplex für PCTV am ER des Darms mehrere Proteine wie VAMP7 (*vesicle associated membrane protein 7*), L-FABP, ApoB48, CD36 und COPII-Proteine, sowie eine PKC ζ -Aktivität benötigt (Neeli *et al.*, 2007; Siddiqi *et al.*, 2010; Siddiqi & Mansbach, 2008). Für die Fusion von PCTV mit *cis*-Golgi-Membranen fungiert VAMP7 als v-

SNARE und bildet zusammen mit Syntaxin5, Bet1 und Vti1a einen *Docking*-Komplex an *cis*-Golgi-Membranen (Siddiqi *et al.*, 2006b). Zudem ist Sec24, ein Protein des COPII-Komplexes, essentiell für die Fusion von PCTV mit *cis*-Golgi-Membranen (Siddiqi *et al.*, 2009).

4.1.3.2 Mögliche Rolle von Rab-GTPasen beim Chylomikronentransport im Darmepithel

Die genaue Regulation des *Buddings*, sowie der Sortierung von Vesikeln zwischen ER und Golgi-Apparat und der Fusion mit *cis*-Golgi-Membranen ist nicht hinreichend geklärt. Ein wichtiges Protein für die Regulation des Transports zwischen ER und *cis*-Golgi ist die GTPase Rab2. Die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante oder die Überexpression von Rab2-Wildtypprotein verminderte den anterograden Transport vom ER zum Golgi und führte zu einer Akkumulation von Vesikeln in prä-Golgi-Kompartimenten (Buffa *et al.*, 2008; Tisdale *et al.*, 1992; Tisdale *et al.*, 1999).

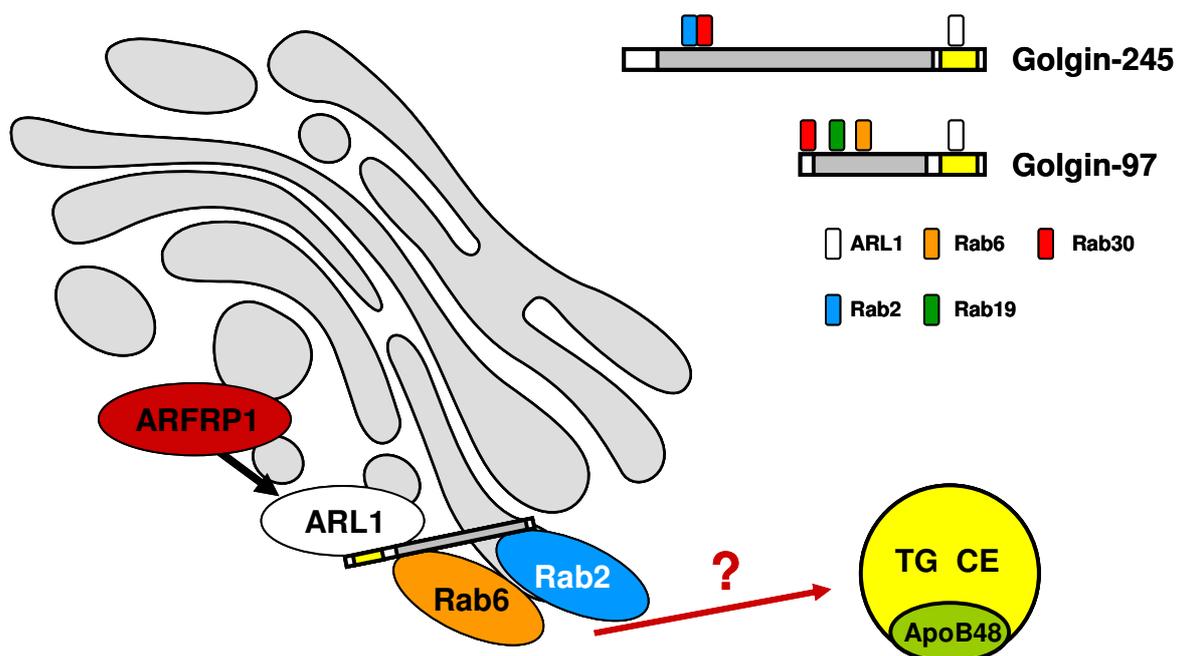


Abbildung 4.1: Einfluss von ARFRP1 auf die Verteilung von Rab-GTPasen

Schematische Darstellung der direkten Verbindung von ARFRP1 über ARL1 und GRIP-Domain-Proteinen zu Rab2 und Rab6 und deren mögliche Auswirkung auf den Transport von Chylomikronen durch die Epithelzelle. Gelbe Bereiche des GRIP-Domain-Proteins entsprechen der GRIP-Domäne, graue Bereiche den *Coiled-Coil*-Regionen. Zusätzlich dargestellt sind exemplarisch Golgin-245 und Golgin-97 mit ihren Bindestellen für ARL1 und spezifischen Rab-Proteinen (modifiziert nach Sinka *et al.*, 2008). TG = Triglycerid; CE = Cholesterolester.

Tatsächlich war in der vorliegenden Arbeit eine modifizierte Verteilung von Rab2 in Epithelzellen des Darms von *Arfrp1*^{vil/-}-Tieren beobachtet worden (3.4, Abb. 3.24). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass in den Epithelzellen der Kontrolltiere

ARFRP1 die Assoziation von ARL1 mit dem *trans*-Golgi reguliert und so indirekt die Rekrutierung von GRIP-*Domain*-Proteinen kontrolliert (Panic *et al.*, 2003; Zahn *et al.*, 2006). GRIP-*Domain*-Proteine interagieren mit ihrer C-terminalen GRIP-Domäne mit ARL1 und binden über spezifische Stellen ihrer *Coiled-Coil*-Region an diverse Rab-Proteine wie Rab2, Rab6, Rab19 und Rab30 (Sinka *et al.*, 2008). Es lässt sich also eine direkte Verbindung von ARFRP1 über ARL1 und GRIP-*Domain*-Proteine zu Rab2 ziehen. Nicht nur Rab2, sondern auch Rab6 zeigte bezüglich seiner Expression und Lokalisation in den Epithelzellen der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere Unterschiede zu den Kontrolltieren, wohingegen Rab-Proteine, die nicht mit GRIP-*Domain*-Proteinen interagieren, wie etwa Rab8 oder Rab18, keine Veränderungen aufwiesen (3.4, Abbildungen 3.23-3.26).

Die in *Arfrp1^{vil/-}*-Zellen veränderte Lokalisation von Rab2 nimmt scheinbar auch Einfluss auf die Interaktionen, die Rab2 mit anderen Proteinen eingeht. So bindet Rab2 in seiner aktiven Form an Proteine des *cis*-Golgi-Apparates, wie zum Beispiel GM130 oder p115 (Short *et al.*, 2001b). Eine Ko-Lokalisation von Rab2 und p115 ist jedoch nur in Epithelzellen der *Arfrp1^{flox/flox}*-, nicht aber in den Zellen der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere zu beobachten (3.4, Abb. 3.28). Eine weitere Tatsache, die Rab2 für den Transport von PCTV interessant macht, ist die, dass Rab2 mit atypischen Proteinkinasen C interagiert. Dies wurde bisher zwar nicht für PKC ζ gezeigt, aber die Interaktion von Rab2 mit PKC ι/λ ist mehrfach beschrieben worden, wobei diese unter anderem essentiell für die Rab2-regulierte Rekrutierung von β -COP sein soll (Fugier *et al.*, 2009; Tisdale, 2000; Tisdale *et al.*, 2009). Die Möglichkeit einer Interaktion von Rab2 und PKC ζ ist somit nicht auszuschließen und könnte neben der Sortierung von Vesikeln im Bereich zwischen ER und Golgi eine weitere Möglichkeit sein, wie Rab2 Einfluss auf den Transport von Chylomikronen zum *cis*-Golgi nehmen kann.

Rab6 reguliert durch Interaktion mit SNARE-Komplexen diverse Transportprozesse in und aus dem Golgi-Apparat (Darchen & Goud, 2000; Opdam *et al.*, 2000), sowie den *intra*-Golgi-Transport (Martinez & Goud, 1998; Short *et al.*, 2002; Starr *et al.*, 2010) und den Mikrotubuli-abhängigen Transport vom Golgi zur Plasmamembran (Grigoriev *et al.*, 2007). Zudem stabilisiert Rab6 die ARL1-abhängige Interaktion des GRIP-*Domain*-Proteins GCC185 (Burguete *et al.*, 2008). Da Rab6 in Enterozyten der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere ebenfalls eine veränderte Lokalisation aufweist (3.4, Abb. 3.24), könnte es auch als Ursache für einen verminderten Transport von Chylomikronen

durch den Golgi-Apparat und zur basalen Membran der Enterozyten in Frage kommen.

Letztendlich darf man auch die Rolle von ApoB48 nicht außer Betracht lassen. Mit den vorliegenden Antikörpern war es bis jetzt leider nicht möglich, ApoB48 auf Kryo- oder Paraffinschnitten des Jejunums von *Arfrp^{flox/flox}*- oder *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren nachzuweisen, so dass keine Aussage dazu getroffen werden kann, ob durch eine spezifische Störung im Transport von Chylomikronen eine intrazelluläre Akkumulation von ApoB48 vorliegt. Durch den Nachweis der ApoB48-Proteinmengen im Plasma von Kontroll- und Knockout-Tieren nach Tyloxapol-Behandlung könnte man aber zumindest eine Aussage darüber treffen, ob die Sekretion von Chylomikronen oder die Triglyceridbeladung der Lipoproteinpartikel gestört ist. Da der Triglyceridgehalt im Plasma nach oralem Ölbolus und Tyloxapol-Behandlung in *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren drastisch reduziert war, würde eine verringerte Menge von ApoB48 auf eine reduzierte Sekretion von Chylomikronen hindeuten, wohingegen bei gleichen ApoB48-Mengen eher von einer Störung der Triglyceridbeladung während der Chylomikronen-Synthese ausgegangen werden kann, da jedes Chylomikron nur ein Molekül ApoB48 beinhaltet (Phillips *et al.*, 1997).

4.1.4 Ausblick auf weiterführende Versuchsansätze zur Klärung der Malabsorption von Fettsäuren in Abwesenheit von *Arfrp1*

Die vorliegenden Ergebnisse belegen deutlich, dass es in den *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren in Abwesenheit von ARFRP1 im Epithel des Darms zu einer Störung der Bereitstellung von Triglyceriden aus Nahrungslipiden kommt. Diese Malabsorption ist die Ursache für die stark verminderten Plasmaparameter der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere und somit auch für ihre Wachstumsretardierung. Weitere Ergebnisse, wie die verminderten relativen Lebergewichte (3.3.3 Abb.3.11) und die reduzierte Ketonkörperproduktion als Antwort auf eine Fastenperiode dürften ebenfalls sekundäre Effekte sein, die ihre Ursache in der Malabsorption der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere haben. So könnte die Ursache der reduzierten Lebergewichte in einer verminderten Speicherung von Glykogen und Triglyceriden liegen. Dies würde ebenfalls die fehlende fasteninduzierte Ketonkörperproduktion erklären, da in den *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren bei reduzierten Triglyceridspeichern der Leber aus Mangel an Substrat für die β -Oxidation keine langfristige Bereitstellung von Ketonkörpern möglich wäre. Zur Klärung dieser

Hypothese sollen in zukünftigen Arbeiten der Triglycerid- und Glykogengehalt der Lebern von *Arfrp1^{flox/flox}*- und *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren bestimmt werden.

Da in den bisherigen Versuchen kein Transport von Triglyceriden in die Lymphe nachgewiesen werden konnte, muss der Verbleib der Lipide näher untersucht werden. Dazu soll der Lipidgehalt im Epithel der Tiere im Zeitverlauf nach Ölbolus untersucht werden. Dieser Ansatz soll klären, ob der Transport der Chylomikronen in die Lymphe in *Arfrp1^{vil/-}*-Tieren verlangsamt ist, die zytosolischen Lipidtropfen über einen längeren Zeitraum im Darmepithel der Tiere verbleiben oder als freie Fettsäuren wieder in den Darm der Tiere abgegeben werden. Hierzu sollen Versuche mit oral appliziertem radioaktiv markiertem Triolein durchgeführt werden, so dass zu unterschiedlichen Zeiten nach Bolus die Verteilung der Menge an Radioaktivität quantitativ bestimmt und somit eine genaue Aussage über den Verbleib der markierten Fettsäuren in den Fäzes bzw. dem Darminhalt, im Epithel und im Plasma der Tiere getätigt werden kann.

Zur weiteren Klärung der Mechanismen, die zur eingeschränkten Bildung oder des Transportes von Chylomikronen beitragen, sollte zudem der SNARE-Komplex der PCTVs am *cis*-Golgi-Apparat näher untersucht werden. Dabei ist die Lokalisation der Komplexpartner VAMP7, Syntaxin5, Bet1 und Vti1a nach Applikation von Öl von besonderer Bedeutung.

Zudem soll eine Diätintervention mit einer Fett-freien Diät bzw. einer Diät mit sehr wenig Fett durchgeführt werden, um die Überlebensrate der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere zu erhöhen. Dies ermöglicht eine klare Abgrenzung primärer Effekte der Deletion von *Arfrp1* gegenüber den sekundären Effekten der Fett-Malabsorption.

4.2 Veränderte subzelluläre Verteilung von E-Cadherin im Darmepithel der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse

Darmepithelzellen der *Arfrp1^{vil/-}*-Mäuse zeigten eine veränderte subzelluläre Verteilung von E-Cadherin. Während E-Cadherin in den Epithelzellen der Kontrolltiere ausschließlich in den basolateralen Membranen vorlag, konnte es in den Zellen der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere zusätzlich an intrazellulären Membranen nachgewiesen werden (3.1.1, Abb. 3.2). Diese Situation konnte bereits in ähnlicher Weise in den Embryonen der konventionellen *Arfrp1*-Nullmutante beobachtet werden (Zahn *et al.*, 2008). ARFRP1 ist scheinbar in den exozytotischen Transport von E-Cadherin an die Plasmamembran involviert. Dies zeigte jedoch keine Auswirkungen auf die Expression von E-Cadherin (3.1.1, Abb. 3.2 B und C).

E-Cadherin ist das prototypische Mitglied der klassischen Cadherin-Familie und wird in allen Epithelzellen exprimiert. Es ist Hauptbestandteil der *adherens junctions* (AJ) und vermittelt Zell-Zell-Adhäsion durch Calcium-abhängige, homophile Bindung zweier E-Cadherin-Moleküle benachbarter Epithelzellen (Angst *et al.*, 2001). E-Cadherin liegt an der Plasmamembran in einem Komplex mit Cateninen vor, hierbei bindet β -Catenin an das intrazelluläre, C-terminale Ende von E-Cadherin und verbindet über α -Catenin und EPLIN/Lima-1 den Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett (Abe & Takeichi, 2008; Drees *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2005). Zusätzlich bindet das regulatorische p120^{ctn} an einen nahe der Membran gelegenen intrazellulären Teil von E-Cadherin (Yap *et al.*, 1998) und wirkt regulatorisch auf Exo- und Endozytose von E-Cadherin (Chen *et al.*, 2003; Fukumoto *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2003). Die Bindung von E-Cadherin und β -Catenin erfolgt hierbei schon kurz nach der Biosynthese von E-Cadherin im ER (Chen *et al.*, 1999).

Tatsächlich konnte im Epithel der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere nachgewiesen werden, dass neben E-Cadherin auch dessen Bindungspartner β -Catenin nicht korrekt sortiert wird (3.1.2, Abb. 3.3). Im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) findet eine Prozessierung von E-Cadherin durch Glykosylierungen und Phosphorylierungen statt (Lock & Stow, 2005). Der Transport von E-Cadherin vom TGN zur Plasmamembran erfolgt über Rab11-positive *Recycling* Endosomen (Desclozeaux *et al.*, 2008; Lock & Stow, 2005). Dieser war im Darmepithel der *Arfrp1^{vil/-}*-Tiere stark beeinträchtigt, was ein spezifischer Effekt von ARFRP1 auf E-Cadherin zu sein schien, da eine direkte Interaktion von ARFRP1 mit dem E-Cadherin/Catenin-Komplex nachgewiesen wurde

(3.1.4, Abb. 3.5). Dies spiegelte sich zudem in einer Ko-Lokalisation von ARFRP1 und E-Cadherin sowohl am *trans*-Golgi als auch an der Plasmamembran (3.1.4, Abb. 3.5) wider.

Die Deletion von *Arfrp1* führte nicht zu einer allgemein fehlerhaften Sortierung von Proteinen an die Plasmamembran bzw. spezifisch an laterale Membranen der Epithelzellen, da die Sortierung der Glucosetransporter SGLT1 und GLUT2 an die apikale bzw. die laterale Membran der Enterozyten durch die Deletion von *Arfrp1* nicht beeinträchtigt war (3.3.5.2, Abb. 3.14).

Weiterhin wurden im Gegensatz zu *in-vitro*-Experimenten, bei denen nach Depletion von *Arfrp1* Adhäsionsstörungen aufgrund einer veränderten Sortierung von E-Cadherin nachgewiesen werden konnten (Zahn *et al.*, 2008), im Epithel der *Arfrp1*^{vil/-}-Tiere kein offensichtlicher Adhäsionsdefekt beobachtet. Hierfür könnten andere im Darm exprimierte Adhäsionsproteine wie Integrine oder LI-Cadherin verantwortlich sein (Angres *et al.*, 2001; Lussier *et al.*, 2000).

Gründe für eine fehlerhafte Sortierung von E-Cadherin könnten (1) ein gestörter Transport von E-Cadherin vom ER zum Golgi-Apparat, (2) eine Störung in der Prozessierung von E-Cadherin im TGN oder (3) ein eingeschränkter Transport vom TGN zur Plasmamembran sein. Für letzteres spricht, dass die Interaktion von ARFRP1 neben E-Cadherin und β -Catenin auch zu α -Catenin und p120ctn nachgewiesen wurde, die beide erst auf dem Weg vom TGN zur Plasmamembran an den Komplex binden (Hinck *et al.*, 1994; Miranda *et al.*, 2003), so dass ARFRP1 im *post trans*-Golgi-Transport von E-Cadherin involviert sein könnte. Zudem zeigte sich in myc-ARFRP1 exprimierenden MDCK-Zellen eine Ko-Lokalisation von ARFRP1 und E-Cadherin sowohl am Golgi-Apparat als auch an der Plasmamembran. Gegen eine Störung der Prozessierung im TGN spricht, dass in *Westernblot*-Analysen kein verändertes Laufverhalten von E-Cadherin der *Arfrp1*^{vil/-}-Tiere beobachtet wurde. Ein verändertes Laufverhalten wäre sichtbar, wenn die proteolytische Spaltung des E-Cadherin *Precursor*-Proteins gestört wäre oder eine veränderte Glykosylierung von E-Cadherin erfolgen würde. Für Punkt (1) spricht, dass in Epithelzellen der *Arfrp1*^{vil/-}-Mäuse E-Cadherin teilweise im *cis*-Golgi akkumulierte (3.1.5, Abb. 3.6) und scheinbar nur ein verzögerter Weitertransport erfolgte. Ursache könnte ein verzögerter Transport durch den Golgi-Apparat oder ein gestörter Transport von E-Cadherin zum *cis*-Golgi in Abwesenheit von ARFRP1 sein. Beides könnte durch einen veränderten Rab2- bzw. Rab6-vermittelten Transport geschehen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ARFRP1 eine entscheidende Rolle für die korrekte Sortierung von E-Cadherin an die Zelloberfläche spielt und somit an der spezifischen Regulation des Verteilungsmusters von E-Cadherin involviert ist.

5 Zusammenfassung/*Abstract*

5.1 Zusammenfassung

Die GTPase ARFRP1 (*ARF-related protein 1*) ist ein ubiquitär exprimiertes Mitglied der ARF (*ADP ribosylation factor*)-Familie, die als GTP-abhängige, molekulare Schalter in der Regulation des intrazellulären Transports und der Golgi-Funktion beteiligt sind. Aktives ARFRP1 assoziiert mit Membranen des *trans*-Golgi und kontrolliert die Rekrutierung von ARL1 und seinen Effektoren, den GRIP-*domain* Proteinen, an dieses Kompartiment.

Die Darm-spezifische Deletion von *Arfrp1* in der Maus führte zu einer frühen, postnatalen Wachstumsretardierung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Darm-spezifischen *Arfrp1*-Nullmutante bezüglich der Wachstumsretardierung und der Absorption von Nährstoffen. Zusätzlich sollte die Rolle von ARFRP1 für die Translokation von E-Cadherin an die Plasmamembran epithelialer Zellen untersucht werden.

Arfrp^{vil-/-}-Mäuse zeigten erniedrigte Blutglucosespiegel, sowie reduzierte Konzentrationen an Triglyceriden und freien Fettsäuren im Plasma, was auf eine Malabsorption als Ursache der Wachstumsretardierung hinwies.

Mehrere Experimente zeigten, dass die Absorption von Glucose und Proteinen durch die Abwesenheit von ARFRP1 nicht beeinflusst war. Im Gegensatz dazu wurde mit Hilfe eines oralen Fett-Toleranztests eine eingeschränkte Lipidaufnahme der *Arfrp1*^{vil-/-}-Tiere nachgewiesen, obwohl sie nach oraler Ölgabe Fettsäuren ins Darmepithels aufnahmen und dort als Lipidtropfen akkumulierten. Demnach scheint ARFRP1 an der Formation oder Sekretion von Chylomikronen beteiligt zu sein.

Der Mangel von ARFRP1 in den Enterozyten der *Arfrp1*^{vil-/-}-Mäusen beeinflusste die Rekrutierung von Proteinen an den *trans*-Golgi und dessen Organisation, da ARL1 ausschließlich im Zytosol der *Arfrp1*^{vil-/-}-Enterozyten vorlag und der *trans*-Golgi-Marker TGN38 in immunhistochemischen Analysen nicht nachweisbar war. Im Gegensatz dazu war die Organisation des *cis*-Golgis nicht beeinträchtigt. Interessanterweise zeigten die Rab-Proteine Rab2 und Rab6, als Interaktionspartner der Effektoren von ARL1, den GRIP-*domain* Proteinen, eine veränderte Expression und Lokalisation in *Arfrp1*^{vil-/-}-Enterozyten. Dies zeigt, dass eine direkte Kaskade ARFRP1-ARL1-GRIP-Rab2/6 für die Synthese und/oder die Sekretion von Chylomikronen benötigt wird.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von ARFRP1 in der Regulation der Translokation von E-Cadherin an die Plasmamembran in den Epithelzellen des Darms bestätigt. In *Arfrp1^{vil-/-}*-Tieren verblieben große Teile von E-Cadherin in intrazellulären Membranen des Darmepithels und lagen partiell mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 ko-lokalisiert vor. Mit Hilfe von Ko-Immunopräzipitationen wurde eine direkte Interaktion von ARFRP1 mit dem E-Cadherin/ β -Catenin Komplex nachgewiesen. Dies zeigt eine essentielle Rolle von ARFRP1 für die korrekte Sortierung von E-Cadherin durch den Golgi-Apparat und somit für die Lokalisation des E-Cadherin/ β -Catenin Komplexes an der Zelloberfläche.

5.2 Abstract

The GTPase ARFRP1 (ARF-related protein 1) is a member of the family of ADP-ribosylation factors (ARFs) that operate as GTP-dependent molecular switches in the regulation of intracellular protein traffic and Golgi function. It associates with *trans*-Golgi membranes and controls the recruitment of ARL1 and its effectors, GRIP-domain proteins such as golgin-245. Conditional deletion of *Arfrp1* in the intestinal epithelium of mice (*Arfrp1^{vil/-}*) as achieved by crossing *Arfrp1^{fllox/fllox}* mice with transgenic mice expressing the Cre-recombinase under the villin promoter, resulted in an early postnatal growth retardation.

The aim of the present work was to characterise the intestine-specific *Arfrp1* nullmutant in respect to the growth retardation and to study its nutrient absorption. In addition, the specific role of ARFRP1 for the targeting of E-cadherin to the cell surface of epithelial cells should be evaluated.

Arfrp^{vil/-} mice revealed decreased levels of blood glucose as well as triglyceride and free fatty acid concentrations in the plasma, indicating that their growth retardation is the consequence of a malabsorption. Several experiments revealed, that glucose and aminoacid absorption was not affected in *Arfrp^{vil/-}* mice. In contrast, lipid uptake elucidated by oral fat tolerance tests was impaired in *Arfrp1^{vil/-}* mice. However, *Arfrp1^{vil/-}* mice transported fatty acids into the intestinal epithelium and accumulated lipid droplets in epithelial cells after an oil bolus. This indicates that ARFRP1 is required either in chylomicron formation or their release.

The lack of ARFRP1 in enterocytes of *Arfrp1^{vil/-}* mice impaired the recruitment of proteins to the *trans*-Golgi and altered *trans*-Golgi organisation, as ARL1 was exclusively located in the cytosol of *Arfrp1^{vil/-}* cells and the *trans*-Golgi marker TGN38 was not detectable by immunohistochemistry. In contrast, the organisation of the *cis*-Golgi was unaffected as detected by staining with antibodies for GM130 and p115. Interestingly, the Rab proteins Rab2 and Rab6 as interaction partners of the ARL1 effector GRIP-domain proteins, exhibited an altered expression and distribution in *Arfrp1^{vil/-}* enterocytes suggesting that a ARFRP1-ARL1-GRIP-Rab2/6 cascade is required for intestinal chylomicron production and/or release.

In the second part of the present work the role of ARFRP1 in the regulation of targeting of E-cadherin to the plasma membrane was confirmed for the intestinal epithelium. *Arfrp1^{vil/-}* mice exhibited a retention of E-cadherin in intracellular membranes partially colocalising with the *cis*-Golgi marker GM130 in epithelial cells

of the small intestine. In addition, a direct interaction of ARFRP1 with the E-cadherin/catenin complex was demonstrated by co-immunoprecipitation experiments. These data indicate that ARFRP1 is essential for the correct trafficking of E-cadherin through the Golgi and thereby required for the correct cell surface targeting of the E-cadherin complex.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Übersicht über die Aufnahme von Fettsäuren durch den Enterozyten im Darm	4
Abbildung 3.1: Reduzierter mRNA- und Proteingehalt in Darmabschnitten der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäuse	38
Abbildung 3.2: Veränderte Lokalisation von E-Cadherin im Darmepithel der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Maus	39
Abbildung 3.3: Immunhistochemischer Nachweis der Lokalisation von E-Cadherin und β -Catenin im Ileum von Kontroll- und <i>Knockout</i> -Tieren	40
Abbildung 3.4: Immunzytochemischer Nachweis der Lokalisation von E-Cadherin und ARFRP1 in myc-ARFRP1 exprimierenden MDCK-Zellen	41
Abbildung 3.5: ARFRP1 ko-immunopräzipitiert mit Proteinen des E-Cadherin/Catenin-Komplexes.....	42
Abbildung 3.6: Immunhistochemischer Nachweis von GM130 und E-Cadherin im Ileum von Kontroll- und <i>Knockout</i> -Tieren	44
Abbildung 3.7: Untersuchung der Lokalisation und Expression von ARL1 im Ileum von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tieren.....	45
Abbildung 3.8: Immunhistochemischer Nachweis von TGN38 und elektronenmikroskopische Analyse des Golgi-Apparates im Darm der Kontroll- und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäuse	47
Abbildung 3.9: Nachweis der Wachstumsretardierung der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tiere	48
Abbildung 3.10: Körperzusammensetzung der <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tiere im Alter von vier Wochen	49
Abbildung 3.11: Verminderte Darmlänge und Gewichte von Lebern und Nieren in <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tieren.....	51
Abbildung 3.12: Überlebenskurve von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen auf Haltungsdiät bzw. Kohlenhydrat-freier Hochfett-Diät	54
Abbildung 3.13: Die Proteinexpression und Transkriptmenge von Glucosetransportern im Darm wird durch die Deletion von <i>Arfrp1</i> nicht beeinflusst.....	55
Abbildung 3.14: Deletion von <i>Arfrp1</i> im Darm hatte keinen Einfluss auf die Verteilung von SGLT1 und GLUT2 in Enterozyten	56
Abbildung 3.15: Untersuchung der Glucose-Absorption der <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Maus mit Hilfe eines oralen Glucose-Toleranztests.....	57
Abbildung 3.16: Quantifizierung freier Aminosäuren im Plasma von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tieren.....	58
Abbildung 3.17: Untersuchung der Plasma-Triglyceridkonzentration der <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäuse im oralen Fett-Toleranztest	59
Abbildung 3.18: Verlauf der Triglyceridkonzentration im Plasma von Kontroll- und <i>Knockout</i> -Tieren nach Ölbolus und Tyloxapolinjektion.....	60
Abbildung 3.19: Bestimmung der β -Hydroxybutyrat-Konzentrationen im Plasma von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen	61
Abbildung 3.20: mRNA-Spiegel verschiedener, für die Lipid-Absorption wichtiger Gene im Jejunum von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen	62
Abbildung 3.21: Immunhistochemische Analyse von FATP1, FABP1 und DGAT2 im Jejunum von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tieren	63

Abbildung 3.22: Nachweis zytosolischer Lipidtropfen in Enterozyten von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tieren	65
Abbildung 3.23: mRNA-Expression verschiedener Rab-Proteine im Jejunum von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen.....	66
Abbildung 3.24: Immunhistochemischer Nachweis von Rab2 und Rab6 im Jejunum von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen	67
Abbildung 3.25: Immunhistochemischer Nachweis von Rab8 bzw. Rab18 im Jejunum von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen	68
Abbildung 3.26: Nachweis der Proteinmengen von ARFRP1, sowie Rab2, 8 und 18 im Jejunum von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen	69
Abbildung 3.27: Immunhistochemischer Nachweis von Rab2 und TGN38 im Jejunum von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen	70
Abbildung 3.28: Immunhistochemischer Nachweis von Rab2 und Lamp1 bzw. Rab2 und p115 im Jejunum von <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Mäusen.....	71
Abbildung 4.1: Einfluss von ARFRP1 auf die Verteilung von Rab-GTPasen.....	79

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Primärantikörper und -antisera	13
Tabelle 2.2: Verwendete Sekundärantikörper	14
Tabelle 2.3: Verwendete Taqman Gene Expression Assays	15
Tabelle 2.4: Verwendete Reaktionskits.....	16
Tabelle 2.5: Zusammensetzung der verwendeten Diäten	17
Tabelle 3.1: Metabolische Parameter der <i>Arfrp1^{flox/flox}</i> - und <i>Arfrp1^{vil/-}</i> -Tiere	52

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
®	eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ARFRP1	<i>ARF-Related Protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B6	<i>C57 Black, C57BL/6</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
CA	<i>California</i>
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CFD	Kohlenhydrat-freie Hochfettdiät
cm	Zentimeter
Cre	<i>causes recombination</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FAM	Fluorescein
FCS	Foetales Kälberserum
FS	Fettsäure(n)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GEF	<i>guanine-nucleotide-exchange factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HCl	Chlorwasserstoff
HD	Haltungsdiet
IgG	Immunglobulin G
IL	<i>Illinois</i>
kb	Kilobase(n)
KG	Körpergewicht
l	Liter
MDCK -Zellen	Madin Darby Canine Kidney-Zellen
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MO	<i>Missouri</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Picomol
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time PCR</i>
s	<i>Sekunde(n)</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler
SGLT	Natrium-abhängiger Glucosetransporter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Triglycerid (e)
TM	<i>Trade Mark</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>

V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
W	Watt
w/v	<i>weight/volume</i>
WB	<i>Western blot</i>
WI	<i>Wisconsin</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

9 Literaturverzeichnis

- Abe K., and Takeichi M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13-9.
- Abumrad N. A. (2005). CD36 may determine our desire for dietary fats. *J Clin Invest* **115**: 2965-7.
- Adibi S. A., Gray S. J., and Menden E. (1967). The kinetics of amino acid absorption and alteration of plasma composition of free amino acids after intestinal perfusion of amino acid mixtures. *Am J Clin Nutr* **20**: 24-33.
- Angres B., Kim L., Jung R., Gessner R., and Tauber R. (2001). LI-cadherin gene expression during mouse intestinal development. *Dev Dyn* **221**: 182-93.
- Angst B. D., Marcozzi C., and Magee A. I. (2001). The cadherin superfamily. *J Cell Sci* **114**: 625-6.
- Askjaer P., Galy V., Hannak E., and Mattaj I. W. (2002). Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol Biol Cell* **13**: 4355-70.
- Ayabe T., Satchell D. P., Pesendorfer P., Tanabe H., Wilson C. L., Hagen S. J., and Ouellette A. J. (2002). Activation of Paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine. *J Biol Chem* **277**: 5219-28.
- Barlowe C., Orci L., Yeung T., Hosobuchi M., Hamamoto S., Salama N., Rexach M. F., Ravazzola M., Amherdt M., and Schekman R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**: 895-907.
- Beghin A., Honore S., Messana C., Matera E. L., Aim J., Burlinchon S., Braguer D., and Dumontet C. (2007). ADP ribosylation factor like 2 (Arl2) protein influences microtubule dynamics in breast cancer cells. *Exp Cell Res* **313**: 473-85.
- Behnia R., Panic B., Whyte J. R., and Munro S. (2004). Targeting of the Arf-like GTPase Arl3p to the Golgi requires N-terminal acetylation and the membrane protein Sys1p. *Nat Cell Biol* **6**: 405-13.
- Bernards A., and Settleman J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* **14**: 377-85.
- Berriot-Varoqueaux N., Dannoura A. H., Moreau A., Verthier N., Sassolas A., Cadiot G., Lachaux A., Munck A., Schmitz J., Aggerbeck L. P., and Samson-Bouma M. E. (2001). Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease. *Gastroenterology* **121**: 1101-8.
- Bi X., Corpina R. A., and Goldberg J. (2002). Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* **419**: 271-7.
- Bishop A. L., and Hall A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**: 241-55.
- Bonen A., Han X. X., Habets D. D., Febbraio M., Glatz J. F., and Luiken J. J. (2007). A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**: E1740-9.
- Bonifacino J. S., and Glick B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**: 153-66.

- Bostrom P., Andersson L., Rutberg M., Perman J., Lidberg U., Johansson B. R., Fernandez-Rodriguez J., Ericson J., Nilsson T., Boren J., and Olofsson S. O. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* **9**: 1286-93.
- Bourne H. R., Sanders D. A., and McCormick F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-27.
- Buffa L., Fuchs E., Pietropaolo M., Barr F., and Solimena M. (2008). ICA69 is a novel Rab2 effector regulating ER-Golgi trafficking in insulinoma cells. *Eur J Cell Biol* **87**: 197-209.
- Buhman K. K., Smith S. J., Stone S. J., Repa J. J., Wong J. S., Knapp F. F., Jr., Burri B. J., Hamilton R. L., Abumrad N. A., and Farese R. V., Jr. (2002). DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J Biol Chem* **277**: 25474-9.
- Burant C. F., Takeda J., Brot-Laroche E., Bell G. I., and Davidson N. O. (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem* **267**: 14523-6.
- Burd C. G., Strohlic T. I., and Gangi Setty S. R. (2004). Arf-like GTPases: not so Arf-like after all. *Trends Cell Biol* **14**: 687-94.
- Burguete A. S., Fenn T. D., Brunger A. T., and Pfeffer S. R. (2008). Rab and Arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185. *Cell* **132**: 286-98.
- Charcosset M., Sassolas A., Peretti N., Roy C. C., Deslandres C., Sinnett D., Levy E., and Lachaux A. (2008). Anderson or chylomicron retention disease: molecular impact of five mutations in the SAR1B gene on the structure and the functionality of Sar1b protein. *Mol Genet Metab* **93**: 74-84.
- Chavrier P., Parton R. G., Hauri H. P., Simons K., and Zerial M. (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**: 317-29.
- Cheeseman C. I. (1993). GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology* **105**: 1050-6.
- Chen X., Kojima S., Borisy G. G., and Green K. J. (2003). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* **163**: 547-57.
- Chen Y. T., Stewart D. B., and Nelson W. J. (1999). Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **144**: 687-99.
- Cheng D., Nelson T. C., Chen J., Walker S. G., Wardwell-Swanson J., Meegalla R., Taub R., Billheimer J. T., Ramaker M., and Feder J. N. (2003). Identification of acyl coenzyme A:monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption. *J Biol Chem* **278**: 13611-4.
- Cheng H., and Leblond C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* **141**: 537-61.
- Cherfils J., and Chardin P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 306-11.
- Colicelli J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* **2004**: RE13.

- Daenzer M., Petzke K. J., Bequette B. J., and Metges C. C. (2001). Whole-body nitrogen and splanchnic amino acid metabolism differ in rats fed mixed diets containing casein or its corresponding amino acid mixture. *J Nutr* **131**: 1965-72.
- Darchen F., and Goud B. (2000). Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie* **82**: 375-84.
- Desclozeaux M., Venturato J., Wylie F. G., Kay J. G., Joseph S. R., Le H. T., and Stow J. L. (2008). Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**: C545-56.
- Drees F., Pokutta S., Yamada S., Nelson W. J., and Weis W. I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**: 903-15.
- Drover V. A., Ajmal M., Nassir F., Davidson N. O., Nauli A. M., Sahoo D., Tso P., and Abumrad N. A. (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest* **115**: 1290-7.
- D'Souza-Schorey C., Li G., Colombo M. I., and Stahl P. D. (1995). A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* **267**: 1175-8.
- Etienne-Manneville S., and Hall A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-35.
- Fugier E., Salcedo S. P., de Chastellier C., Pophillat M., Muller A., Arce-Gorvel V., Fourquet P., and Gorvel J. P. (2009). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab 2 are crucial for Brucella replication. *PLoS Pathog* **5**: e1000487.
- Fukumoto Y., Shintani Y., Reynolds A. B., Johnson K. R., and Wheelock M. J. (2008). The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane. *Exp Cell Res* **314**: 52-67.
- Gillingham A. K., and Munro S. (2007). The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 579-611.
- Goodlad R. A., and Wright N. A. (1984). The effects of starvation and refeeding on intestinal cell proliferation in the mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **45**: 63-73.
- Goudriaan J. R., Dahlmans V. E., Febbraio M., Teusink B., Romijn J. A., Havekes L. M., and Voshol P. J. (2002). Intestinal lipid absorption is not affected in CD36 deficient mice. *Mol Cell Biochem* **239**: 199-202.
- Gregorieff A., Pinto D., Begthel H., Destree O., Kielman M., and Clevers H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* **129**: 626-38.
- Grigoriev I., Splinter D., Keijzer N., Wulf P. S., Demmers J., Ohtsuka T., Modesti M., Maly I. V., Grosveld F., Hoogenraad C. C., and Akhmanova A. (2007). Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell* **13**: 305-14.
- Gu H., Marth J. D., Orban P. C., Mossmann H., and Rajewsky K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**: 103-6.
- Guillam M. T., Hummler E., Schaerer E., Yeh J. I., Birnbaum M. J., Beermann F., Schmidt A., Deriaz N., and Thorens B. (1997). Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* **17**: 327-30.
- Haramis A. P., Begthel H., van den Born M., van Es J., Jonkheer S., Offerhaus G. J., and Clevers H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* **303**: 1684-6.

- He W., Barak Y., Hevener A., Olson P., Liao D., Le J., Nelson M., Ong E., Olefsky J. M., and Evans R. M. (2003). Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15712-7.
- Heasman S. J., and Ridley A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 690-701.
- Herrmann T., van der Hoeven F., Grone H. J., Stewart A. F., Langbein L., Kaiser I., Liebisch G., Gosch I., Buchkremer F., Drobnik W., Schmitz G., and Stremmel W. (2003). Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp 4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermopathy. *J Cell Biol* **161**: 1105-15.
- Hesse D., Hommel A., Jaschke A., Moser M., Bernhardt U., Zahn C., Kluge R., Wittschen P., Gruber A. D., Al-Hasani H., Joost H. G., and Schürmann A. (2010). Altered GLUT4 trafficking in adipocytes in the absence of the GTPase Arfrp1. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Hinck L., Nathke I. S., Papkoff J., and Nelson W. J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* **125**: 1327-40.
- Hommel A. (Dissertation, 2007). Die Rolle der GTPase ARFRP1 in der Embryonal- und Fettgewebsentwicklung, Universität Potsdam.
- Hommel A., Hesse D., Volker W., Jaschke A., Moser M., Engel T., Bluher M., Zahn C., Chadt A., Ruschke K., Vogel H., Kluge R., Robenek H., Joost H. G., and Schürmann A. (2010). The ARF-like GTPase ARFRP1 is essential for lipid droplet growth and is involved in the regulation of lipolysis. *Mol Cell Biol* **30**: 1231-42.
- Hsu K. T., and Storch J. (1996). Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem* **271**: 13317-23.
- Jacobs S., Schilf C., Fliegert F., Koling S., Weber Y., Schürmann A., and Joost H. G. (1999). ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4, 6, and 7 represent a subgroup of the ARF family characterization by rapid nucleotide exchange and a nuclear localization signal. *FEBS Lett* **456**: 384-8.
- Jonas A. J., and Butler I. J. (1989). Circumvention of defective neutral amino acid transport in Hartnup disease using tryptophan ethyl ester. *J Clin Invest* **84**: 200-4.
- Kahn R. A., Cherfils J., Elias M., Lovering R. C., Munro S., and Schürmann A. (2006). Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *J Cell Biol* **172**: 645-50.
- Kahn R. A., Volpicelli-Daley L., Bowzard B., Shrivastava-Ranjan P., Li Y., Zhou C., and Cunningham L. (2005). Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics. *Biochem Soc Trans* **33**: 1269-72.
- Kane J. P., Hardman D. A., and Paulus H. E. (1980). Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 2465-9.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lee B., Zhu J., Wolins N. E., Cheng J. X., and Buhman K. K. (2009). Differential association of adipophilin and TIP47 proteins with cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes during dietary fat absorption. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 1173-80.
- Leturque A., Brot-Laroche E., and Le Gall M. (2009). GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**: E985-92.

- Lewandoski M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2**: 743-55.
- Li H. Y., Cao K., and Zheng Y. (2003). Ran in the spindle checkpoint: a new function for a versatile GTPase. *Trends Cell Biol* **13**: 553-7.
- Lin C. Y., Huang P. H., Liao W. L., Cheng H. J., Huang C. F., Kuo J. C., Patton W. A., Massenburg D., Moss J., and Lee F. J. (2000). ARL4, an ARF-like protein that is developmentally regulated and localized to nuclei and nucleoli. *J Biol Chem* **275**: 37815-23.
- Lin C. Y., Li C. C., Huang P. H., and Lee F. J. (2002). A developmentally regulated ARF-like 5 protein (ARL5), localized to nuclei and nucleoli, interacts with heterochromatin protein 1. *J Cell Sci* **115**: 4433-45.
- Livak K. J., and Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-8.
- Lock J. G., and Stow J. L. (2005). Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell* **16**: 1744-55.
- Lowe S. L., Wong S. H., and Hong W. (1996). The mammalian ARF-like protein 1 (Arl1) is associated with the Golgi complex. *J Cell Sci* **109** (Pt 1): 209-20.
- Lu L., and Hong W. (2003). Interaction of Arl1-GTP with GRIP domains recruits autoantigens Golgin-97 and Golgin-245/p230 onto the Golgi. *Mol Biol Cell* **14**: 3767-81.
- Lussier C., Basora N., Bouatrouss Y., and Beaulieu J. F. (2000). Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc Res Tech* **51**: 169-78.
- Madison B. B., Braunstein K., Kuizon E., Portman K., Qiao X. T., and Gumucio D. L. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* **132**: 279-89.
- Madison B. B., Dunbar L., Qiao X. T., Braunstein K., Braunstein E., and Gumucio D. L. (2002). Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem* **277**: 33275-83.
- Mansbach C. M., 2nd, and Gorelick F. (2007). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**: G645-50.
- Mansbach C. M., 2nd, and Nevin P. (1998). Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine. *J Lipid Res* **39**: 963-8.
- Mansbach C. M., and Dowell R. (2000). Effect of increasing lipid loads on the ability of the endoplasmic reticulum to transport lipid to the Golgi. *J Lipid Res* **41**: 605-12.
- Mansbach C. M., and Siddiqi S. A. (2010). The biogenesis of chylomicrons. *Annu Rev Physiol* **72**: 315-33.
- Martinez O., and Goud B. (1998). Rab proteins. *Biochim Biophys Acta* **1404**: 101-12.
- Matsuoka K., Orci L., Amherdt M., Bednarek S. Y., Hamamoto S., Schekman R., and Yeung T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**: 263-75.
- Mattson F. H., and Beck L. W. (1955). The digestion in vitro of triglycerides by pancreatic lipase. *J Biol Chem* **214**: 115-25.
- Mattson F. H., and Beck L. W. (1956). The specificity of pancreatic lipase for the primary hydroxyl groups of glycerides. *J Biol Chem* **219**: 735-40.

- Mattson F. H., and Volpenhein R. A. (1968). Hydrolysis of primary and secondary esters of glycerol by pancreatic juice. *J Lipid Res* **9**: 79-84.
- Miranda K. C., Joseph S. R., Yap A. S., Teasdale R. D., and Stow J. L. (2003). Contextual binding of p120ctn to E-cadherin at the basolateral plasma membrane in polarized epithelia. *J Biol Chem* **278**: 43480-8.
- Mueller A. G., Moser M., Kluge R., Leder S., Blum M., Buttner R., Joost H. G., and Schürmann A. (2002). Embryonic lethality caused by apoptosis during gastrulation in mice lacking the gene of the ADP-ribosylation factor-related protein 1. *Mol Cell Biol* **22**: 1488-94.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-73.
- Murphy D. J., The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. (2001). *Prog Lipid Res* **40**: 325-438.
- Nassir F., Wilson B., Han X., Gross R. W., and Abumrad N. A. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem* **282**: 19493-501.
- Nauli A. M., Nassir F., Zheng S., Yang Q., Lo C. M., Vonlehmden S. B., Lee D., Jandacek R. J., Abumrad N. A., and Tso P. (2006). CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* **131**: 1197-207.
- Neeli I., Siddiqi S. A., Siddiqi S., Mahan J., Lagakos W. S., Binas B., Gheyi T., Storch J., and Mansbach C. M., 2nd (2007). Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **282**: 17974-84.
- Olofsson S. O., Bostrom P., Andersson L., Rutberg M., Levin M., Perman J., and Boren J. (2008a). Triglyceride containing lipid droplets and lipid droplet-associated proteins. *Curr Opin Lipidol* **19**: 441-7.
- Opdam F. J., Echard A., Croes H. J., van den Hurk J. A., van de Vorstenbosch R. A., Ginsel L. A., Goud B., and Fransen J. A. (2000). The small GTPase Rab6B, a novel Rab6 subfamily member, is cell-type specifically expressed and localised to the Golgi apparatus. *J Cell Sci* **113 (Pt 15)**: 2725-35.
- Panic B., Whyte J. R., and Munro S. (2003). The ARF-like GTPases Arl1p and Arl3p act in a pathway that interacts with vesicle-tethering factors at the Golgi apparatus. *Curr Biol* **13**: 405-10.
- Pasqualato S., Renault L., and Cherfils J. (2002). Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep* **3**: 1035-41.
- Pereira-Leal J. B., and Seabra M. C. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* **313**: 889-901.
- Phillips M. L., Pullinger C., Kroes I., Kroes J., Hardman D. A., Chen G., Curtiss L. K., Gutierrez M. M., Kane J. P., and Schumaker V. N. (1997). A single copy of apolipoprotein B-48 is present on the human chylomicron remnant. *J Lipid Res* **38**: 1170-7.
- Pinto D., Gregorieff A., Begthel H., and Clevers H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* **17**: 1709-13.
- Repasky G. A., Chenette E. J., and Der C. J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* **14**: 639-47.

- Sabesin S. M., Clark S. B., and Holt P. R. (1977). Ultrastructural features of regional differences in chylomicron secretion by rat intestine. *Exp Mol Pathol* **26**: 277-89.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., and Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-4.
- Santer R., Schneppenheim R., Dombrowski A., Gotze H., Steinmann B., and Schaub J. (1997). Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat Genet* **17**: 324-6.
- Scheffzek K., and Ahmadian M. R. (2005). GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci* **62**: 3014-38.
- Schmidt A., and Hall A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**: 1587-609.
- Schrack J. J., Vogel P., Abuin A., Hampton B., and Rice D. S. (2006). ADP-ribosylation factor-like 3 is involved in kidney and photoreceptor development. *Am J Pathol* **168**: 1288-98.
- Schürmann A., Koling S., Jacobs S., Saftig P., Krauss S., Wennemuth G., Kluge R., and Joost H. G. (2002). Reduced sperm count and normal fertility in male mice with targeted disruption of the ADP-ribosylation factor-like 4 (Arl4) gene. *Mol Cell Biol* **22**: 2761-8.
- Schürmann A., Massmann S., and Joost H. G. (1995). ARP is a plasma membrane-associated Ras-related GTPase with remote similarity to the family of ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem* **270**: 30657-63.
- Schürmann A., Schmidt M., Asmus M., Bayer S., Fliegert F., Koling S., Massmann S., Schilf C., Subauste M. C., Voss M., Jakobs K. H., and Joost H. G. (1999). The ADP-ribosylation factor (ARF)-related GTPase ARF-related protein binds to the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor cytohesin and inhibits the ARF-dependent activation of phospholipase D. *J Biol Chem* **274**: 9744-51.
- Schwartz S. L., Cao C., Pylypenko O., Rak A., and Wandinger-Ness A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* **120**: 3905-10.
- Scriver C. R., Mahon B., Levy H. L., Clow C. L., Reade T. M., Kronick J., Lemieux B., and Laberge C. (1987). The Hartnup phenotype: Mendelian transport disorder, multifactorial disease. *Am J Hum Genet* **40**: 401-12.
- Shen F., and Seabra M. C. (1996). Mechanism of digeranylgeranylation of Rab proteins. Formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein. *J Biol Chem* **271**: 3692-8.
- Shim J., Moulson C. L., Newberry E. P., Lin M. H., Xie Y., Kennedy S. M., Miner J. H., and Davidson N. O. (2009). Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice. *J Lipid Res* **50**: 491-500.
- Shin H. W., Kobayashi H., Kitamura M., Waguri S., Suganuma T., Uchiyama Y., and Nakayama K. (2005). Roles of ARFRP1 (ADP-ribosylation factor-related protein 1) in post-Golgi membrane trafficking. *J Cell Sci* **118**: 4039-48.
- Short B., Preisinger C., Korner R., Kopajtich R., Byron O., and Barr F. A. (2001a). A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. *J Cell Biol* **155**: 877-83.
- Short B., Preisinger C., Korner R., Kopajtich R., Byron O., Barr F. A., Tisdale E. J., Bourne J. R., Khosravi-Far R., Der C. J., Balch W. E., Sol E. R., Hovsepyan M., Bergsten P., Azizi F., Artalejo C. R., Dong C., Wu G., Chun D. K., McEwen J. M., Burbea M., and Kaplan J. M. (2001b). A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic

- Short B., Preisinger C., Schaletzky J., Kopajtich R., and Barr F. A. (2002). The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr Biol* **12**: 1792-5.
- Shoulders C. C., Stephens D. J., and Jones B. (2004). The intracellular transport of chylomicrons requires the small GTPase, Sar1b. *Curr Opin Lipidol* **15**: 191-7.
- Siddiqi S., Saleem U., Abumrad N., Davidson N., Storch J., Siddiqi S. A., and Mansbach C. M., 2nd (2010). A Novel Multi-protein Complex Is Required for the Generation of the Pre-chylomicron Transport Vesicle from Intestinal ER. *J Lipid Res*.
- Siddiqi S., Siddiqi S. A., and Mansbach C. M., 2nd (2009). SEC24C is required for the docking of the pre-chylomicron transport vesicle with the Golgi. *J Lipid Res*.
- Siddiqi S. A., Gorelick F. S., Mahan J. T., and Mansbach C. M., 2nd (2003). COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* **116**: 415-27.
- Siddiqi S. A., Mahan J., Siddiqi S., Gorelick F. S., and Mansbach C. M., 2nd (2006a). Vesicle-associated membrane protein 7 is expressed in intestinal ER. *J Cell Sci* **119**: 943-50.
- Siddiqi S. A., and Mansbach C. M., 2nd (2008). PKC zeta-mediated phosphorylation controls budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* **121**: 2327-38.
- Siddiqi S. A., Siddiqi S., Mahan J., Peggs K., Gorelick F. S., and Mansbach C. M., 2nd (2006b). The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle. *J Biol Chem* **281**: 20974-82.
- Sinka R., Gillingham A. K., Kondylis V., and Munro S. (2008). Golgi coiled-coil proteins contain multiple binding sites for Rab family G proteins. *J Cell Biol* **183**: 607-15.
- Sivars U., Aivazian D., and Pfeffer S. R. (2003). Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* **425**: 856-9.
- Soldati T., Shapiro A. D., Svejstrup A. B., and Pfeffer S. R. (1994). Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**: 76-8.
- Stagg S. M., LaPointe P., Razvi A., Gurkan C., Potter C. S., Carragher B., and Balch W. E. (2008). Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell* **134**: 474-84.
- Starr T., Sun Y., Wilkins N., and Storrie B. (2010). Rab33b and Rab6 Are Functionally Overlapping Regulators of Golgi Homeostasis and Trafficking. *Traffic*.
- Stone S. J., Myers H. M., Watkins S. M., Brown B. E., Feingold K. R., Elias P. M., and Farese R. V., Jr. (2004). Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* **279**: 11767-76.
- Storch J., and Corsico B. (2008). The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr* **28**: 73-95.
- Stralfors P. (1990). Autolysis of isolated adipocytes by endogenously produced fatty acids. *FEBS Lett* **263**: 153-4.
- Tisdale E. J. (2000). Rab2 requires PKC iota/lambda to recruit beta-COP for vesicle formation. *Traffic* **1**: 702-12.
- Tisdale E. J., Azizi F., and Artalejo C. R. (2009). Rab2 utilizes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein kinase C{iota} to associate with microtubules and to recruit dynein. *J Biol Chem* **284**: 5876-84.
- Tisdale E. J., Bourne J. R., Khosravi-Far R., Der C. J., and Balch W. E. (1992). GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol* **119**: 749-61.

- Tisdale E. J., Bourne J. R., Khosravi-Far R., Der C. J., and Balch W. E. (1999). A Rab2 mutant with impaired GTPase activity stimulates vesicle formation from pre-Golgi intermediates
- GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Mol Biol Cell* **10**: 1837-49.
- Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4.
- Ullrich O., Stenmark H., Alexandrov K., Huber L. A., Kaibuchi K., Sasaki T., Takai Y., and Zerial M. (1993). Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem* **268**: 18143-50.
- Van Valkenburgh H., Shern J. F., Sharer J. D., Zhu X., and Kahn R. A. (2001). ADP-ribosylation factors (ARFs) and ARF-like 1 (ARL1) have both specific and shared effectors: characterizing ARL1-binding proteins. *J Biol Chem* **276**: 22826-37.
- Vetter I. R., and Wittinghofer A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-304.
- Villalonga P., and Ridley A. J. (2006). Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* **24**: 159-64.
- Weis K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**: 441-51.
- Weiske J., and Huber O. (2005). Fate of desmosomal proteins in apoptotic epidermal cells. *Methods Mol Biol* **289**: 175-92.
- Weiske J., Schoneberg T., Schroder W., Hatzfeld M., Tauber R., and Huber O. (2001). The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem* **276**: 41175-81.
- Wennerberg K., Rossman K. L., and Der C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**: 843-6.
- Wood I. S., and Trayhurn P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* **89**: 3-9.
- Wright E. M. (1998). I. Glucose galactose malabsorption. *Am J Physiol* **275**: G879-82.
- Wright E. M., Hirayama B. A., and Loo D. F. (2007). Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med* **261**: 32-43.
- Wright E. M., Turk E., and Martin M. G. (2002). Molecular basis for glucose-galactose malabsorption. *Cell Biochem Biophys* **36**: 115-21.
- Xiao K., Allison D. F., Buckley K. M., Kottke M. D., Vincent P. A., Faundez V., and Kowalczyk A. P. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* **163**: 535-45.
- Yamada S., Pokutta S., Drees F., Weis W. I., and Nelson W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**: 889-901.
- Yamaguchi R., and Newport J. (2003). A role for Ran-GTP and Crm1 in blocking re-replication. *Cell* **113**: 115-25.
- Yap A. S., Niessen C. M., and Gumbiner B. M. (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* **141**: 779-89.
- Yen C. L., and Farese R. V., Jr. (2003). MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine. *J Biol Chem* **278**: 18532-7.

- Yen C. L., Stone S. J., Cases S., Zhou P., and Farese R. V., Jr. (2002). Identification of a gene encoding MGAT1, a monoacylglycerol acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8512-7.
- Zahn C. (Dissertation 2007). Rolle der GTPase ARFRP1 für die Golgi-Funktion und die Differenzierung epithelialer Zellen des Darms, Universität Potsdam.
- Zahn C. (Dissertation, 2007). Rolle der GTPase ARFRP1 für die Golgi-Funktion und die Differenzierung epithelialer Zellen des Darms, Universität Potsdam.
- Zahn C., Hommel A., Lu L., Hong W., Walther D. J., Florian S., Joost H. G., and Schürmann A. (2006). Knockout of Arfrp1 leads to disruption of ARF-like1 (ARL1) targeting to the trans-Golgi in mouse embryos and HeLa cells. *Mol Membr Biol* **23**: 475-85.
- Zahn C., Jaschke A., Weiske J., Hommel A., Hesse D., Augustin R., Lu L., Hong W., Florian S., Scheepers A., Joost H. G., Huber O., and Schürmann A. (2008). ADP-ribosylation factor-like GTPase ARFRP1 is required for trans-Golgi to plasma membrane trafficking of E-cadherin. *J Biol Chem* **283**: 27179-88.
- Zerial M., and McBride H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 107-17.
- Zhou C., Cunningham L., Marcus A. I., Li Y., and Kahn R. A. (2006). Arl2 and Arl3 regulate different microtubule-dependent processes. *Mol Biol Cell* **17**: 2476-87.

10 Anhang

mRNA-Expression [$2^{-\Delta\Delta C_t}$] von Glucosetransportern im Jejunum von *Arfrp1*^{vil/-}- und *Arfrp1*^{flox/flox}-Tieren (Werte zu Abb. 3.13).

	<i>Arfrp1</i> ^{flox/flox}	<i>Arfrp1</i> ^{vil/-}
<i>Arfrp1</i>	1,00 ± 0,10	0,52 ± 0,07
<i>Slc5a1</i>	1,00 ± 0,27	0,91 ± 0,14
<i>Slc2a2</i>	1,00 ± 0,14	0,69 ± 0,08
<i>Slc2a5</i>	1,00 ± 0,02	0,94 ± 0,12

Verlauf der Blutglucosekonzentration [mmol/l] während des Glucose-Toleranztests (Werte zu Abb. 3.15).

Zeitpunkt [min]	basal	7,5	15	30	60	120	150
<i>Arfrp1</i> ^{flox/flox}	4,2 ± 0,5	12,4 ± 1,5	16,5 ± 0,9	11,9 ± 2,6	7,8 ± 2,0	4,1 ± 0,2	4,1 ± 0,4
<i>Arfrp1</i> ^{vil/-}	3,3 ± 0,4	9,4 ± 3,8	13,5 ± 1,7	13,7 ± 2,2	7,7 ± 2,4	3,5 ± 0,5	4,1 ± 0,6

Verlauf der Triglyceridkonzentrationen [µg/ml] während des Fett-Toleranztests (Werte zu Abb. 3.17).

Zeitpunkt [h]	basal	2	3	4	6	12
<i>Arfrp1</i> ^{flox/flox}	560 ± 128	886 ± 176	697 ± 206	519 ± 117	526 ± 82	329 ± 49
<i>Arfrp1</i> ^{vil/-}	217 ± 72	308 ± 79	362 ± 78	357 ± 119	316 ± 106	304 ± 72

mRNA-Expression [$2^{-\Delta\Delta C_t}$] der an der Lipidabsorption beteiligten Proteine (Werte zu Abb. 3.20).

	<i>Arfrp1</i> ^{flox/flox}	<i>Arfrp1</i> ^{vil/-}
<i>Arfrp1</i>	1,00 ± 0,10	0,52 ± 0,07
<i>Slc27a4</i>	1,00 ± 0,09	0,89 ± 0,09
<i>Fabp1</i>	1,00 ± 0,11	0,88 ± 0,08
<i>Fabp2</i>	1,00 ± 0,13	1,03 ± 0,12
<i>Dgat1</i>	1,00 ± 0,07	0,94 ± 0,11
<i>Dgat2</i>	1,00 ± 0,13	1,08 ± 0,20
<i>Cd36</i>	1,00 ± 0,13	0,73 ± 0,13
<i>Apob</i>	1,00 ± 0,09	0,83 ± 0,08

mRNA-Expression [$2^{-\Delta\Delta C_t}$] von Rab-Proteinen im Jejunum von *Arfrp1*^{vil/-}- und *Arfrp1*^{flox/flox}-Tieren (Werte zu Abb. 3.13).

	<i>Arfrp1</i> ^{flox/flox}	<i>Arfrp1</i> ^{vil/-}
<i>Arfrp1</i>	1,00 ± 0,10	0,46 ± 0,04
<i>Rab2</i>	1,00 ± 0,10	1,41 ± 0,09
<i>Rab6</i>	1,00 ± 0,08	1,46 ± 0,16
<i>Rab8</i>	1,00 ± 0,07	1,14 ± 0,11
<i>Rab18</i>	1,00 ± 0,05	1,20 ± 0,06
<i>Rab19</i>	1,00 ± 0,08	0,76 ± 0,09
<i>Rab30</i>	1,00 ± 0,17	1,30 ± 0,33

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die durch ihre Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. A. Schürmann danke ich für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Labor, ihre stete Gesprächsbereitschaft, exzellente Betreuung und den wirkungsvollen Einsatz von „Zuckerbrot und Peitsche“.

Herrn Prof. Dr. Dr. H.G. Joost danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine konstruktive Kritik.

Herrn Dr. R. Kluge danke ich besonders für die Einführung in die tierexperimentellen Arbeiten, sowie für seine stete Hilfsbereitschaft bei allen Problemen rund um die Maus. Für die Hilfestellung bei der Zucht und Haltung der Mäuse möchte ich allen Mitarbeitern des Max-Rubner-Laboratoriums danken.

Danken möchte ich auch meinen aktuellen und ehemaligen ARFRP1-Mitstreitern, Claudia, Angela und Deike für den alltäglichen und regen Austausch rund um die Welt der GTPasen.

Bei der gesamten Abteilung Pharmakologie / Experimentelle Diabetologie bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und die unzähligen großen und kleinen Hilfestellungen während meiner Laborzeit und die zahlreichen Gespräche die geholfen haben die Motivation im Laboralltag beizubehalten.

Meinen ehemaligen und aktuellen Bürokollegen Deike, Daniel und Verena danke ich dafür, dass sie meine Launen immer ertragen haben und jederzeit für eine fröhlich Arbeitsatmosphäre sorgten. Deike möchte ich zudem danken für die unzähligen kleinen Hilfen im Labor-, Büro- und Tierhausalltag.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, sowie meiner wunderbaren Freundin Maïke, die mich während meiner gesamten Doktorandenzeit motiviert und unterstützt hat und speziell in der Endphase kaum wiedergutzumachende technische Hilfe einbrachte.

Publikationen

Originalarbeiten:

*Zahn C., *Jaschke A., Weiske J., Hommel A., Hesse D., Augustin R., Lu L., Hong W., Florian S., Scheepers A., Joost H. G., Huber O., and Schürmann A. (2008). ADP-ribosylation factor-like GTPase ARFRP1 is required for trans-Golgi to plasma membrane trafficking of E-cadherin. *J Biol Chem* 283: 27179-88.

* Beide Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

Hommel A., Hesse D., Volker W., Jaschke A., Moser M., Engel T., Bluher M., Zahn C., Chadt A., Ruschke K., Vogel H., Kluge R., Robenek H., Joost H. G., and Schürmann A. (2010). The ARF-like GTPase ARFRP1 is essential for lipid droplet growth and is involved in the regulation of lipolysis. *Mol Cell Biol* 30: 1231-42.

Hesse D., Hommel A., Jaschke A., Moser M., Bernhardt U., Zahn C., Kluge R., Wittschen P., Gruber A. D., Al-Hasani H., Joost H. G., and Schürmann A. (2010). Altered GLUT4 trafficking in adipocytes in the absence of the GTPase *Arfrp1*. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;394(4):896-903.

Als Abstract publizierte Kongressvorträge:

Jaschke A., Zahn C., Hommel A., Weiske J., Moser M., Augustin R., Huber O., and Schürmann A. (2008). ARF-related protein1 (ARFRP1) is required for sufficient targeting of E-cadherin to the cell surface. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377 (Suppl. 1).

Jaschke A., Hesse D., Zahn C., Petzke K.J., Moser M., Koepsell H., and Schürmann A. (2010). Impaired absorption of dietary lipids in mice lacking *Arfrp1* in intestinal epithelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 381 (Suppl. 1).

Weitere Kongressvorträge:

Jaschke A., Zahn C., Hommel A., Weiske J., Moser M., Augustin R., Huber O., and Schürmann A.. ARF-related protein1 (ARFRP1) is required for sufficient targeting of E-cadherin to the cell surface. 4. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe "Biochemische Pharmakologie und Toxikologie" in Günzburg. September, 2009.

Posterpräsentationen:

Mice lacking ARFRP1 in the intestine are growth retarded due to abnormal intestinal epithelia with impaired differentiation of goblet and Paneth cell lineage. 5th European Nutrigenomics Conference in Potsdam, 02.-05. September 2008.

The role of ARFRP1 in cell proliferation and differentiation in liver and intestine. C.N.R.S Jaques Monod Conference "Regulation and function of small GTPases" in Aussois, Frankreich, 17.-21. Juni 2009.