



**Einfluss der Phosphoglykolat-Phosphatase auf den
Metabolismus von Signal-, Membran- und Speicherlipiden in
murinen Embryonen und Lymphozyten**

**Role of phosphoglycolate phosphatase in the
metabolism of signaling, membrane and storage lipids in
murine embryos and lymphocytes**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Matthias Zundler
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

Würzburg, 2018

Eingereicht am: _____

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

1. Betreuer: Prof. Dr. Antje Gohla

2. Betreuer: Prof. Dr. Carsten Hoffmann

3. Betreuer: Dr. Agnes Fekete

Erstgutachterin: Prof. Dr. Antje Gohla

Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Geier

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunden ausgehändigt am: _____

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kinasen und Phosphatasen regulieren das Ausmaß der Substrat-Phosphorylierung	1
1.2	Klassifikation der Phosphatasen.....	2
1.3	Charakterisierung der Phosphoglykolat-Phosphatase	4
1.3.1	Potentielle Substrate der PGP	4
1.3.1.1	Tyrosylphosphorylierte Proteine und Nukleotide	4
1.3.1.2	Glycerin-3-phosphat.....	5
1.3.1.3	Phosphoglykolat.....	6
1.3.1.4	Phosphoerythronat und Phospholactat	11
1.4	Rolle der PGP in vivo	12
1.4.1	Targeting-Strategie	12
1.4.2	Ganzkörperinaktivierung der PGP verzögert das embryonale Wachstum und ist embryonal letal	13
1.4.3	Inaktivierung der PGP hemmt die Zellproliferation unter normoxischen Bedingungen	15
1.4.4	Inaktivierung der PGP verringert die Aktivität der TPI	15
2	Ziel der Arbeit.....	17
3	Material.....	18
3.1	Chemikalien und Reagenzien	18
3.2	Technische Geräte.....	19
3.3	Verbrauchsmaterialien	20
3.4	DNA- und Proteinleitern	20
3.5	Kommerzielle Kits	20
3.6	Kommerzielle Puffer	21
3.7	Mausmodelle.....	21
3.8	Zellkulturmedien	21
3.9	Antikörper	21
3.10	Enzyme	22
3.11	Interne Standards.....	22
3.12	Lösungen und Puffer	22
3.13	Software und Datenbanken	24

4	Methoden	25
4.1	Züchtung PGP-inaktiverter Mäuse	25
4.2	Genotypisierung der Mäuse mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese.....	25
4.3	Entnahme und Aufbereitung der Embryonen	27
4.4	Entnahme sekundärer lymphatischer Organe	27
4.5	Isolierung und Zählen der Lymphozyten	29
4.6	Glycerin-3-phosphat-Assay	30
4.6.1	Prinzip	30
4.6.2	Etablierung des Versuchs	31
4.6.3	Aufbereitung, Messung und Auswertung der Proben.....	32
4.7	Lymphozytenaktivierung	33
4.8	Lipidomics	34
4.8.1	Extraktion des Lipidoms mit Methyl-tert-butylether	34
4.8.2	Non-targeted Analyse	35
4.8.2.1	Metabolite fingerprinting und Identifikation von Marker-Ionen zur Hypothesen-Generierung.....	36
4.8.2.2	Profiling	39
4.8.3	Targeted Analyse	40
4.9	Statistische Auswertung.....	41
5	Ergebnisse.....	42
5.1	Ganzkörperinaktivierung der PGP in E8.5-Embryonen verursacht DG-, TG- und SM-Anhäufung und PC-Abnahme.....	42
5.2	Auswirkungen der PGP-Inaktivierung in Endothelzellen und in Zellen des hämatopoetischen Systems.....	48
5.2.1	Pgp ^{flx/flx} ; Tie2-Cre ^{+/-} -Mäuse sind lebensfähig.....	48
5.2.2	Keine erhöhte G3P-Konzentration in PGP-inaktivierten Lymphozyten ohne metabolische Überflussbedingungen	49
5.2.3	DG-, PC-, TG- und SM-Level sind in PGP-inaktivierten Lymphozyten nicht signifikant verändert.....	51
5.2.4	Erhöhte Phosphatidylglycerin- und Cardiolipin-Level in PGP-inaktivierten Lymphozyten.....	54
6	Diskussion	61
6.1	Glycero- und Sphingolipidlevel in E8.5-Pgp ^{D34N/D34N} -Embryonen	61
6.1.1	Wie lässt sich das aberrante Lipidmuster in Pgp ^{D34N/D34N} -Embryonen erklären?	61

6.1.2	Welche PGP-Aktivitäten sind vor dem Hintergrund der LC-MS-Ergebnisse von besonderer Bedeutung?.....	64
6.1.3	Mögliche Effekte der aberranten Lipidzusammensetzung auf den Phänotyp PGP-inaktivierter Embryonen.....	66
6.2	Die metabolische Konstellation in Lymphozyten von Pgp ^{flxflx} ; Tie2-Cre ^{+/-} -Mäusen.....	69
6.2.1	Wie lässt sich das Metabolitmuster in PGP-inaktivierten Lymphozyten erklären?	69
6.2.2	Mögliche Effekte erhöhter PG*- und CL-Level in PGP-inaktivierten Lymphozyten.....	73
7	Zusammenfassung/Summary.....	76
7.1	Zusammenfassung	76
7.2	Summary	77
8	Literaturverzeichnis	78
9	Anhang.....	92
9.1	Curriculum vitae.....	92
9.2	Eidesstattliche Erklärung/Affidavit	94
9.2.1	Eidesstattliche Erklärung.....	94
9.2.2	Affidavit	94
9.3	Danksagung.....	95

Abbildungen

Abbildung 1: PG und der Übergang zwischen Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus.....	10
Abbildung 2: <i>Pgp</i> Targeting-Strategie.	13
Abbildung 3: Murine Lymphknoten.	28
Abbildung 4: Etablierung eines geeigneten Lymphozytenlyseverfahrens für den G3P-Assay.....	32
Abbildung 5: 2D-Kartierung der mittels non-targeted Analyse detektierten Vorläufer-Ionen.	36
Abbildung 6: Überprüfung des Fragmentationsmusters eines Marker-Ions.....	38
Abbildung 7: rt-m/z-Streudiagramm.....	40
Abbildung 8: PGP-Inaktivierung beeinflusst Glycerolipidlevel in E8.5-Embryonen.	44
Abbildung 9: Sphingomyeline in murinen E8.5-Embryonen.	47
Abbildung 10: PCR- und Agarose-Gelelektrophorese-basierte Genotypisierung.	48
Abbildung 11: G3P-Assay.	50
Abbildung 12: Kein relevanter Einfluss der PGP auf DG-, PC- und TG-Level in Lymphozyten.....	52
Abbildung 13: Sphingomyeline in murinen Lymphozyten.	53
Abbildung 14: Die Konstitutionsisomere PG*(34:1) und BMP(34:1).	55
Abbildung 15: Phosphatidylglycerine (PG*s) in murinen Lymphozyten.	56
Abbildung 16: Cardiolipine (CLs) in murinen Lymphozyten.....	58
Abbildung 17: PGP-abhängige PG*- und CL-Spiegel in aktivierten Lymphozyten unter metabolischen Überflussbedingungen.	60
Abbildung 18: Stoffwechselwege, die zu dem Lipidmuster in PGP-inaktivierten Embryonen beigetragen haben könnten.....	64
Abbildung 19: Stoffwechselwege, die zu dem Lipidmuster in PGP-inaktivierten Lymphozyten beigetragen haben könnten....	72

Abkürzungen

2,3-BPG	2,3-Bisphosphoglycerat
ACSL	Fettsäure-CoA Ligase
ADP	Adenosindiphosphat
AGPAT	<i>sn</i> -1-Acyl-glycerin-3-phosphat-Acyltransferase
APE	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease</i>
AS	Aminosäure
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve von engl. <i>area under the curve</i>
AUM	<u>A</u> spartat-basierte, <u>u</u> biquitäre, <u>Mg</u> ²⁺ -abhängige Phosphatase
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphat
CD	Zelluläres Oberflächenmerkmal, von engl. <i>cluster of differentiation</i>
CDP	Cytidindiphosphat
CDS	CDP-DG-Synthase
cGDH	zytosolische Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
CL	Cardiolipin
CoA	Coenzym A
CPT	Cholin-Phosphotransferase
Cre	Rekombinase genetischen Materials von engl. <i>causes recombination</i> oder <i>cyclization recombinase</i>
CSV	von engl. <i>comma-separated values</i>
DG	Diacylglycerin
DGAT	Diacylglycerin-Acyltransferase
DGK	Diacylglycerin-Kinase
DGL	Diacylglycerin-Lipase
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch

E	embryonales Alter in Tagen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ESB	Einzelstrangbruch
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
FCS	Fetales Kälberserum
FlpE	von engl. <i>recombinase flippase, eighth generation</i>
FRT	von engl. <i>flippase recognition target</i>
FS	Fettsäure
G3P	Glycerin-3-phosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GC1-spg	Zelllinie aus murinen Spermatogonien
GDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
gefloxt	von loxP-Stellen flankiert
GL/FS-Zyklus	Glycerolipid/Fettsäuren-Zyklus
GPAT	<i>sn</i> -Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
H ₃ O ⁺	Oxoniumion
HAD	Haloazid Dehalogenase
Hb	Hämoglobin
HE	von engl. <i>high energy</i>
HeLa-Zellen	Zelllinie aus menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, Spenderin: <u>Henrietta Lacks</u>
HSL	Hormonsensitive Lipase
LC-MS	Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie
LE	von engl. <i>low energy</i>
Ln.	<i>Lymphonodus</i>
Lnn.	<i>Lymphonodi</i>
loxP	DNA-Erkennungssequenz von engl. <i>locus of X-over P1</i>

LPA	Lysophosphatidat
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPCAT	Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MEFs	Embryonale Maus-Fibroblasten von engl. <i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MeOH	Methanol
MG	Monoacylglycerin
MGAT	Monoacylglycerin-Acyltransferase
MGCL	Monoacylglycerin
mGDH	mitochondriale Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
MGL	Monoacylglycerin-Lipase
MLCL	Monolysocardiolipin
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
MS-MS	Tandem Massenspektrometrie/Massenspektrometer
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NAD ⁺	Nicotinamadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamadenindinukleotid, reduzierte Form
NP-40	Polyethylenglycol(40)-nonylphenoether
ns	nicht signifikant
Nudix	<u>N</u> ukleosid <u>d</u> iphosphat, gebunden an einen Rest „ <u>X</u> “ Hydrolase
PA	Phosphatidat
pA	Polyadenylierungssequenz
PAP	Phosphatidat-Phosphatase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung von engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDXP	Pyridoxalphosphat-Phosphatase
PE	Phosphatidylethanolamin
PEP	Phosphoenolpyruvat

PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PG	Phosphoglykolat
PG*	Phosphatidylglycerin
PGK	Promoter der Phosphoglyceratkinase
PGK-Neo-pA	Neomycin-Resistenzkassette
PGP	Phosphoglykolat-Phosphatase
PGP*	Phosphatidylglycerinphosphat
PI	Phosphatidylinositol
PK	Pyruvatkinase
PKC	Proteinkinase C
PLA, PLB, PLC, PLD	Phospholipase A, -B, -C, -D
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
PPMs	Metall-abhängige Protein-Phosphatasen
PPPs	Phosphoprotein-Phosphatasen
PS	Phosphatidylserin
PTPs	Protein-Tyrosin-Phosphatasen
qTOF-MS	<i>Time-of-flight</i> Massenspektrometer mit Quadrupol m/z-Filter
RBC	von engl. <i>red blood cell</i>
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RLA	von engl. <i>rapid lipid annotation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Drehzahl von engl. <i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rt	Retentionszeit
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	Sphingomyelin
SMS	Sphingomyelin-Synthase
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TDP1	Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1
TG	Triacylglycerin

TPI	Triosephosphatisomerase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
v/v	Volumenverhältnis von engl. <i>volume per volume</i>
w/v	Massenkonzentration von engl. <i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g \approx 9.81 \text{ m/s}^2$)

1 Einleitung

1.1 Kinasen und Phosphatasen regulieren das Ausmaß der Substrat-Phosphorylierung

Reversible Phosphorylierung ist die häufigste posttranslationale Modifikation intrazellulärer Proteine (Khoury 2011) und reguliert das Leben der Zelle auf nahezu jede erdenkliche Art und Weise (Cohen 2002). Häufig beeinflussen Phosphorylierung und Dephosphorylierung enzymatische Aktivität und damit verschiedenste nachgeschaltete Signalkaskaden. Wie mit einem molekularen Schalter ermöglichen sie so die Kontrolle unterschiedlicher zellulärer Prozesse: Zellwachstum, Differenzierung, Migration und metabolische Homöostase sind nur einige Beispiele. Zu welchem Anteil ein Substrat phosphoryliert ist, wird durch Kinasen und Phosphatasen reguliert, deren katalytische Prozesse sich entgegengesetzt auswirken. Dysfunktionen spezifischer Kinasen oder Phosphatasen sind mit zahlreichen Krankheitsbildern assoziiert; darunter verschiedene maligne Tumorerkrankungen, kardiovaskuläre und neurologische Erkrankungen und metabolische Störungen wie Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ 2 (Zhao et al. 2015, Bae et al. 2012).

Kinasen katalysieren die Phosphorylierung, indem sie die γ -Phosphatgruppe von Nukleosidtriphosphaten - fast immer von Adenosintriphosphat (ATP) - auf bestimmte Aminosäuren (AS) von Proteinen oder auf freie Hydroxylgruppen kleiner Moleküle wie Kohlenhydrate, Nukleoside oder Lipide übertragen (Fabbro et al. 2015). Kinasen bilden eine der größten bekannten Proteinfamilien – mit über 100 homologen Enzymen bei der Hefe und über 550 beim Menschen (Berg et al. 2014). Demgegenüber kodiert das menschliche Genom zwar nur für etwa 200 katalytische Untereinheiten von Phosphatasen (Sacco et al. 2012; Liberti et al. 2013; Chen et al. 2017); diese bilden durch Komplexbildung mit verschiedenen targeting- und spezifitätsdeterminierenden Untereinheiten jedoch eine ähnlich große Klasse von Enzymen wie die Kinasen (Ubersax & Ferrell Jr 2007; Virshup & Shenolikar 2009; Bollen et al. 2010). Phosphatasen vermitteln

ihrerseits die Dephosphorylierung, indem sie die Phosphorylgruppe (PO_3)²⁻ ihres Substrats hydrolysieren.

Im Hinblick auf die entscheidende Rolle, die Phosphatasen in der Kontrolle der Signaltransduktion einnehmen, kommen sie als medikamentöse Angriffspunkte in Frage (Nguyen et al. 2013, He et al. 2014).

1.2 Klassifikation der Phosphatasen

Die ca. 200 beim Menschen identifizierten Phosphatasen unterscheiden sich in den Aminosäuresequenzen ihrer katalytischen Domänen und lassen sich je nach Übereinstimmungsgrad in sechs Enzymfamilien eingruppierten (Sacco et al. 2012).

Den Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) werden als größte Gruppe ca. die Hälfte aller Phosphatasen zugeordnet.

Metall-abhängige Protein-Phosphatasen (PPMs) und Phosphoprotein-Phosphatasen (PPPs) dephosphorylieren ihre Proteinsubstrate an den Aminosäuren Serin und/oder Threonin. Zusammen repräsentieren sie knapp 15 % aller Phosphatasen.

Phosphatasen vom Haloazid Dehalogenase-Typ (HAD-Phosphatasen) stellen eine große, ubiquitär vorkommende Enzymfamilie dar, die sich strukturell und mechanistisch von den übrigen Phosphatasen unterscheidet. Die biologischen Funktionen dieser Enzyme sind bislang noch weitgehend unerforscht. Im menschlichen Genom wurden >40 Mitglieder der Enzymfamilie detektiert (Seifried et al. 2013). Eines davon ist die Phosphoglykolat-Phosphatase, die Gegenstand dieser Arbeit ist.

Obwohl die Vertreter der Enzymfamilie bei Betrachtung ihrer gesamten Primärstruktur nur geringe Übereinstimmungen zeigen, so können sie dennoch anhand von vier charakteristischen Aminosäuresequenzen des aktiven Zentrums identifiziert werden. Erkennungssequenz 1 lautet hhhDXDXT/V (h, hydrophober Rest; D, Aspartat; X, beliebige AS; T, Threonin; V, Valin) und beinhaltet die Aminosäure Aspartat, die als Nukleophil für die Funktion der HAD-Phosphatasen unerlässlich ist, da sie den Phosphoryltransfer katalysiert: Die Dephospho-

rylierung eines Substrats erfolgt über die Bildung eines Phosphoaspartat-Zwischenprodukts. Der folgende nukleophile Angriff durch ein Wassermolekül an diesem Zwischenprodukt bewirkt die Freisetzung von Phosphat und die Wiederherstellung des Aspartatrests. Die Aminosäure Aspartat koordiniert zusammen mit dem zweiten Aspartat aus Erkennungssequenz 1 den obligatorischen Cofaktor Mg^{2+} im aktiven Zentrum. Ein weiteres Erkennungsmerkmal aller HAD-Phosphatasen ist eine modifizierte Rossmann-Faltung der katalytischen Region.

Die Lipid-Phosphatasen (LPs) bilden drei Klassen mit insgesamt 37 Mitgliedern (Liberti et al. 2013). Sie können bestimmte Phospholipide bzw. Lyso-phospholipide, wie beispielsweise Sphingosin-1-phosphat, dephosphorylieren (Sigal et al. 2005).

Die sechste Gruppe der Phosphatasen ist die der NUDT- oder auch Nudix-Phosphatasen. Sie werden so bezeichnet, da sie Nukleosiddiphosphate hydrolysieren, die an einen anderen Rest „X“ gebunden sind (Bessman et al. 1996; Gabelli et al. 2002).

In weiteren aktuellen Studien werden die >200 Proteine des Menschen mit einer Phosphatase-spezifischen katalytischen Domäne gemäß ihrer Faltung gruppiert und weiter in Enzymfamilien unterteilt (Chen et al. 2017). Demnach gehören die Phosphatasen mit einer bereits bekannten Phosphatase-Aktivität zehn unterschiedlichen Faltungen, darunter z.B. auch die der Histidin-Phosphatasen, und insgesamt 21 Enzymfamilien an.

1.3 Charakterisierung der Phosphoglykolat-Phosphatase

Pgp, das für die Phosphoglykolat-Phosphatase (PGP) kodierende Gen, wurde mittels Datenbankrecherche und phylogenetischer Analysen als Paralog der Pyridoxalphosphat-Phosphatase (PDXP, auch bekannt als Chronophin), identifiziert (Seifried et al. 2014). PGP wurde ursprünglich aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften AUM (für Aspartat-basierte, ubiquitäre, Mg²⁺-abhängige Phosphatase) genannt, denn es nutzt als Phosphatase vom HAD-Typ einen Aspartatrest als Nukleophil im aktiven Zentrum, der den Transfer der Phosphatgruppe katalysiert. Die katalytische Aktivität wurde in Bezug auf das künstliche Substrat *para*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP) getestet. Während es von PGP^{WT} dephosphoryliert werden konnte, war die Punktmutante (Austausch des katalytisch essentiellen Aspartats gegen Asparagin an Position 34 der HAD-Erkennungssequenz 1, PGP^{D34N}) Phosphatase-inaktiv (Seifried et al. 2014). Auf eine ubiquitäre Expression der PGP konnte durch Western-Blot-Analysen unterschiedlicher Gewebeproben geschlossen werden. Die Aufhebung der katalytischen Aktivität durch den Mg²⁺-Chelator EDTA verdeutlicht, dass die für HAD-Phosphatasen typische Abhängigkeit von Mg²⁺ als Cofaktor auch bei der PGP vorliegt (Seifried et al. 2014). Das murine Protein hat ein Molekulargewicht von 34,5 kDa und besteht aus 321 Aminosäuren.

1.3.1 Potentielle Substrate der PGP

Phosphatasen vom HAD-Typ weisen ein bemerkenswert vielfältiges Spektrum an kleinen und großen Substratmolekülen auf (Burroughs et al. 2006). Die Bandbreite reicht von Metaboliten, Lipiden über DNA bis hin zu an Serin/Threonin- oder an Tyrosinresten phosphorylierten Proteinen (Seifried et al. 2014). Auch für die PGP sind bereits unterschiedliche Substrate beschrieben.

1.3.1.1 Tyrosylphosphorylierte Proteine und Nukleotide

Eine potentielle Substratpräferenz der PGP gegenüber Phosphopeptiden wurde *in vitro* mit Array-Assays, die insgesamt 720 unterschiedliche Phosphopeptide

umfassten, untersucht. Während keine Aktivität gegenüber Ser(P)- oder Thr(P)-Peptiden detektiert wurde, dephosphorylierte die PGP einen kleinen Teil (~3.5 %) der Tyr(P)-Peptide. Darüber hinaus zeigten Phosphatase Overlay-Assays, dass die PGP an Tyrosinresten phosphorylierte Proteine aus HeLa-Zellen direkt hydrolysiert (Seifried et al. 2014). In der murinen Spermatogonien-Zelllinie GC1-spg führte PGP-Verlust durch RNA-Interferenz nach Stimulation mit Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) zu einer Zunahme tyrosylphosphorylierter Proteine. Dies lässt vermuten, dass die PGP als Tyrosinphosphatase in durch EGF induzierte Signalkaskaden involviert ist. Physiologische Tyr(P)-Substrate der PGP sind jedoch bislang noch unbekannt. Außerdem kann die PGP *in vitro* auch Nukleotide dephosphorylieren ($ADP > ATP \approx GDP \approx GTP$) (Seifried et al. 2014).

1.3.1.2 Glycerin-3-phosphat

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass murine PGP (mPGP) *in vitro* als Glycerin-3-phosphat (G3P)-Phosphatase fungieren kann (Mugabo et al. 2016) und die Autoren weisen in PGP-inaktivierten Hepatozyten der Ratte erhöhte G3P-Spiegel nach. Die Veröffentlichung zeigt darüber hinaus, dass die PGP den Glukose- und Lipidmetabolismus in Hepatozyten und β -Zellen des Pankreas unter metabolischen Überflussbedingungen beeinflusst. Als Grund dafür wird die spezifische Aktivität der PGP gegenüber G3P angesehen. Die Kenngrößen der Enzymkinetik sind für die Hydrolyse von G3P durch mPGP mit einer Michaeliskonstante (K_M) von 1.29 ± 0.42 mM, einer Wechselzahl (k_{cat}) von 0.10 ± 0.01 s⁻¹ und einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) von ~100 nmol/min/mg Protein angegeben.

Demgegenüber wird Phosphoglykolat (PG), ein weiteres Substrat der PGP (siehe Kap. 1.3.1.3), durch mPGP mit einer K_M von 0.3 ± 0.05 mM, einer k_{cat} von 2.13 ± 0.1 s⁻¹ und einer V_{max} von ~2400 nmol/min/mg Protein hydrolysiert (Seifried et al. 2016).

Der 4.3-fach niedrigere $1/K_M$ -Wert für G3P verglichen mit dem für PG als Substrat gibt näherungsweise eine niedrigere Affinität der PGP gegenüber G3P an. Zudem scheint mPGP G3P weitaus ineffizienter zu dephosphorylieren als PG,

was durch die für G3P 21.3-fach niedrigere k_{cat} verdeutlicht wird. Und auch V_{max} als Maß für die maximale Umsatzgeschwindigkeit ist für G3P ~24-fach niedriger als für PG.

Da die Level von G3P in Hepatozyten aber ~175-mal höher sind als die von PG, schlussfolgern Mugabo et al., dass G3P trotz der hohen K_M des Enzyms ein physiologisch relevantes PGP-Substrat ist (Mugabo et al. 2016).

1.3.1.3 Phosphoglykolat

Wie Seifried et al. 2016 mit *in vitro* Phosphatase-Assays erstmals zeigen konnten, wird Phosphoglykolat (PG) durch hoch gereinigte, rekombinante murine PGP effizient dephosphoryliert ($k_{\text{cat}} = 2.13 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$), wohingegen sowohl durch PGP^{D34N} als auch durch PDXP keine nachweisbare Hydrolyse von PG stattfand. Auch in Lysaten aus E8.5-*Pgp*^{WT/WT}-Embryonen war die Phosphatase-Aktivität gegenüber PG nachweisbar. Sie ist abgeschwächt in heterozygoten *Pgp*^{WT/D34N}-Embryonen und in PGP-inaktivierten *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen kaum nachweisbar (Segerer et al. 2016).

Phosphoglykolat ist ein 2-Desoxyribose-Fragment, das bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden freigesetzt wird (**Abb. 1**). Das Leben unter aeroben Bedingungen begünstigt die Bildung endogener und exogener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die fortwährend DNA-Schäden verursachen. Sie erzeugen Einzel- oder Doppelstrangbrüche der DNA (ESBs, DSBs) unter anderem mit einem 3'-Phosphat- oder einem 3'-Phosphoglykolat (3'-PG)-Ende (Povirk 2012, Iyama & Wilson 2013). Pro Zelle kommt es täglich allein zu zehntausenden an ESBs (Vilenchik & Knudson 2000), deren 3'-Enden zu einem Anteil von 10 - 25 % PG tragen (Chen et al. 2007, Bertoncini & Mene 1995). Diese 3'-Enden müssen entfernt werden, um die DNA-Reparatur zu ermöglichen. Es ist noch nicht vollständig verstanden, wie DNA-Schäden mit PG-tragenden 3'-Enden repariert werden (Parsons et al. 2004). Unterschiedliche Enzyme scheinen 3'-PG-Enden jedoch abhängig von der Konfiguration des DNA-Strangbruchs spalten zu können.

Außer der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) sind bislang keine weiteren Enzyme bekannt, die hervorstehende 3'-PG-Enden von DSBs direkt spalten

können (Inamdar et al. 2002; Zhou et al. 2005). Zwar nicht direkt, aber zusammen mit einigen wenigen terminalen Nukleotiden kann auch die Nuklease Artemis überstehende 3'-PG-Enden von DSBs abspalten (Povirk et al. 2006).

Zwei apurinische/apyrimidinische Endonukleasen, APE1 und APE2, sind darüber hinaus in menschlichen Zellen bekannt, durch deren Phosphodiesterase-Aktivität 3'-PG-Enden hydrolysiert werden (Hadi & Wilson 2000). Es wird dabei PG freigesetzt (Winters et al. 1994), das im Zytosol durch die PGP hydrolysiert werden kann. An den 3'-Enden bleiben Hydroxylgruppen zurück.

APE1 ist in der Lage, 3'-PG-Enden von ESBs effektiv, zurückgezogene 3'-PG-Enden von DSBs weniger effektiv, stumpfe 3'-PG-Enden von DSBs kaum und hervorstehende 3'-PG-Enden von DSBs gar nicht abzuspalten (Suh et al. 1997; Wilson 2003). Trotzdem macht die Phosphodiesterase-Aktivität der APE1 gegenüber 3'-PG, basierend auf dem Vergleich der k_{cat}/K_M -Werte, bestenfalls 1 % ihrer Endonuklease-Aktivität aus (Suh et al. 1997). Umgekehrt zeigt die APE2 bei schwacher Endonuklease-Aktivität jedoch eine robuste Phosphodiesterase-Aktivität, die sich durch *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) zusätzlich steigern lässt (Unk et al. 2001; Burkovics et al. 2006; Burkovics et al. 2009). APE2 scheint deshalb, auch wenn die kinetischen Parameter noch nicht genau bestimmt wurden, ein vielversprechender Kandidat der PG-Abspaltung zu sein (Povirk 2012).

Darüber hinaus konnte in vitro gezeigt werden, dass PG in einer Nebenreaktion der Pyruvatkinase (PK) durch Phosphorylierung von Glykolat ATP-abhängig gebildet werden kann (Kayne 1974).

In Pflanzen ist PG ein wichtiges Intermediat der Photorespiration. Es wird durch die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) gebildet, wenn das CO₂ in der ersten Reaktion der photosynthetischen CO₂-Fixation durch O₂ ersetzt wird. Die PGP hydrolysiert PG daraufhin zu Glykolat, das über mehrere Reaktionsschritte als Phosphoglycerat wieder dem Calvin-Zyklus zugeführt wird (Bauwe et al. 2010).

Die Funktionen von PG und Glykolat in Säugetieren sind noch weitgehend unbekannt. Die PGP wurde erstmals aus Erythrozyten des Menschen aufgereinigt und biochemisch charakterisiert (Badwey 1977, Zecher & Wolf 1980,

Rose 1981) und man glaubte, dass PG die Bisphosphoglyceratmutase-abhängige Hydrolyse von 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) 1600-fach beschleunigt (Rose & Liebowitz 1970). 2,3-BPG ist für die Regulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins (Hb) von großer Bedeutung und führt zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve.

Wie Somoza & Beutler 1983 entgegen der früheren Vermutung jedoch zeigen konnten, korrelieren 2,3-BPG-Level in vivo nicht mit der Aktivität der PGP, was eine physiologische Relevanz der PGP oder von PG bezüglich der Beeinflussung der Sauerstoffaffinität von Hb in Frage stellt.

Darüber hinaus wird PG in vitro als kompetitiver Inhibitor der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) (Meyer et al. 1989, Stiffin et al. 2008, Nowak & Mildvan 1970), der PK (Dougherty & Cleland 1985) und der Triosephosphatisomerase (TPI) (Hartman et al. 1975) beschrieben. Die PEPCK katalysiert mittels GTP den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Glukoneogenese: Die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat. Die Pyruvatkinase überträgt im Rahmen der Glykolyse eine Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat auf ADP, wodurch Pyruvat und ATP entstehen.

Die TPI ist ein sehr schnell arbeitendes Enzym, das ebenfalls einen Teilschritt der Glykolyse katalysiert: Die Umwandlung der beiden Triosephosphate Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) ineinander (**Abb. 1**). Diese Isomerisationsreaktion erfolgt über ein cis-Endiol-Zwischenprodukt im aktiven Zentrum der TPI. Das Enzym kontrolliert die Schnittstelle zwischen Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus. Während im Rahmen der Glykolyse nur GAP weiter verstoffwechselt wird, wird DHAP letztendlich zum Kohlenhydrat-Rückgrat vieler unterschiedlicher Lipidklassen.

DHAP kann durch die zytosolische Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (cGDH) in G3P umgewandelt werden, das zusammen mit als Acylreste an Coenzym A (CoA) gebundenen Fettsäuren (FS) den Glycerolipid/Fettsäuren (GL/FS)-Zyklus speist (Prentki & Madiraju 2012). Über den anabolen Zweig des Zyklus (Lipogenese) werden durch Veresterung von Fettsäuren Triacylglycerine (TG) gebildet. Dabei entstehen Lysophosphatidat (LPA), Phosphatidat (PA) und Diacylglycerin (DG). Ausgehend von PA und DG können Phospholipide wie

beispielsweise Phosphatidylglycerin (PG*), Cardiolipin (CL) und Phosphatidylcholin (PC) synthetisiert werden. Im katabolen Zweig des Zyklus (Lipolyse) wird TG durch Hydrolyse wieder zu FS und Glycerin abgebaut. Auf diesem Weg entstehen DG und Monoacylglycerin (MG).

Das katalytische Gleichgewicht der TPI liegt zwar stark auf der Seite von DHAP, da im Rahmen der Glykolyse jedoch nur GAP weiterreagiert und so aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird, katalysiert das Enzym bei Ablauf der Glykolyse diffusionsgetrieben die Umwandlung von DHAP in GAP. Die Reaktion in dieser Richtung wird deshalb als physiologische Vorwärtsreaktion bezeichnet (Blacklow et al. 1988, Wierenga et al. 2010).

PG hat hinsichtlich seiner Ladungsverteilung und Stereochemie große Ähnlichkeit mit dem cis-Endiol-Zwischenprodukt der Isomerisationsreaktion. Dies wird als Grund dafür angesehen, dass PG über 100-mal stärker an die TPI bindet als DHAP oder GAP (Lolis & Petsko 1990) und so als starker, kompetitiver Inhibitor des Enzyms fungiert.

Die physiologischen Auswirkungen der Beeinflussung der TPI-Aktivität durch PG und die PGP sind besonders deswegen interessant, da das Enzym eine Schnittstelle zwischen Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus kontrolliert (**Abb. 1**).

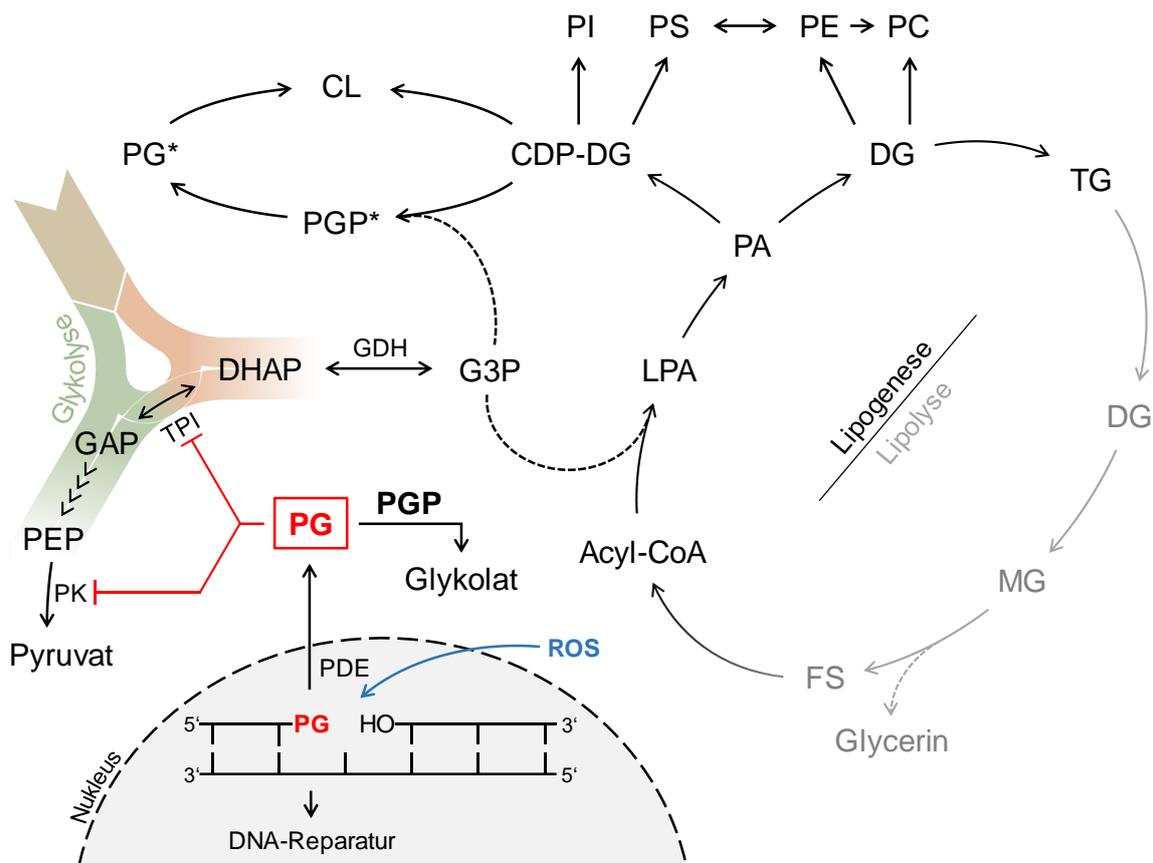


Abbildung 1: PG und der Übergang zwischen Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus. Details siehe Text. ROS: Reaktive Sauerstoffspezies, PDE: Phosphodiesterase, PG: Phosphoglykolat, PGP: Phosphoglykolat-Phosphatase, PK: Pyruvatkinase, PEP: Phosphoenolpyruvat, TPI: Triosephosphatisomerase, GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, G3P: Glycerin-3-phosphat, LPA: Lysophosphatidat, PA: Phosphatidat, DG: Diacylglycerin, TG: Triacylglycerin, MG: Monoacylglycerin, FS: Fettsäure, CoA: Coenzym A, CDP: Cytidindiphosphat, PGP*: Phosphatidylglycerinphosphat, PG*: Phosphatidylglycerin, CL: Cardiolipin, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserin, PE: Phosphatidylethanolamin, PC: Phosphatidylcholin.

1.3.1.4 Phosphoerythronat und Phospholactat

Neue Erkenntnisse sehen die PGP als metabolisches Reparaturenzym, das die potentiell toxischen Nebenprodukte der Glykolyse, Phosphoerythronat (P-Erythronat) und Phospholactat (P-Lactat), abbaut (Collard et al. 2016). Diesen Erkenntnissen zufolge weist murine PGP gegenüber P-Erythronat und P-Lactat im Vergleich zu PG eine ähnliche katalytische Effizienz auf (**Tab. 1**). Das glykolytische Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) katalysiert die oxidative Phosphorylierung von GAP zu 1,3-Bisphosphoglycerat. In einer Nebenreaktion wandelt das Enzym, wenn auch mit 3500-fach geringerer Effizienz, Erythrose-4-phosphat, ein Intermediat des Pentosephosphatwegs, in P-Erythronat um. Die molekularen Details dieser Nebenreaktion sind noch unklar. Das Nebenprodukt, P-Erythronat, ist als Hemmstoff der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH), einem Enzym des Pentosephosphatwegs, bekannt (Pasti et al. 2003). PGP-Inaktivierung führte deshalb, wie in der humanen Zelllinie des kolorektalen Karzinoms HCT116 gezeigt wurde, zur Akkumulation von P-Erythronat und von 6-Phosphogluconat, dem Substrat der 6PGDH.

P-Lactat, ein weiteres Nebenprodukt der Glykolyse, das möglicherweise in einer Nebenreaktion der PK entsteht (Ash et al. 1984), führt durch Hemmung bestimmter Phosphofruktokinase (PFK)2-Formen zu erniedrigten Fructose-2,6-bisphosphat-Leveln. Da Fructose-2,6-bisphosphat ein allosterischer Aktivator des glykolytischen Enzyms PFK1 ist (Rider et al. 2004) und da unter PGP-Inaktivierung ein reduzierter glykolytischer Fluss detektiert wurde, sehen die Autoren die Aufrechterhaltung der Glykolyse durch Abbau von P-Lactat als eine wichtige Aufgabe der PGP an (Collard et al. 2016).

Substrate muriner PGP	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
G3P	1290 \pm 420	0.10 \pm 0.01	78	Mugabo et al. 2016
PG	300 \pm 50	2.13 \pm 0.10	7100	Seifried et al. 2016
PG	766 \pm 68	6.56 \pm 0.44	8564	
P-Erythronat	247 \pm 25	3.23 \pm 0.18	13078	Collard et al. 2016
P-Lactat	174 \pm 55	1.82 \pm 0.34	10460	

Tabelle 1: Enzymkinetische Parameter für unterschiedliche Substrate muriner PGP.

1.4 Rolle der PGP in vivo

1.4.1 Targeting-Strategie

Bislang wurden zwei unterschiedliche Mausmodelle entwickelt, um die physiologischen Auswirkungen der PGP zu untersuchen. Es wurde jeweils ein Cre/loxP-basierter konditionaler *Pgp*-Knockout Ansatz verwendet, der mit dem Knockin eines für die Phosphatase-inaktive *Pgp*-Punktmutante kodierenden Minigens (*Pgp*^{D34N}, Austausch des katalytisch essentiellen Aspartats gegen Asparagin) in den endogenen *Pgp*-Lokus von C57BL/6J Mäusen gekoppelt wurde (Seifried et al. 2014; Segerer et al. 2016).

Nach FLPe-vermittelter Exzision der Neomycin-Resistenzkassette und Cre-vermittelter Entfernung des geflochtenen *Pgp* wird *Pgp*^{D34N} unter der Kontrolle des endogenen *Pgp*-Promoters exprimiert. Durch den Einsatz unterschiedlicher, gewebsspezifischer Cre-Mauslinien können verschiedene konditional Phosphatase-inaktive Mausmodelle erzeugt werden.

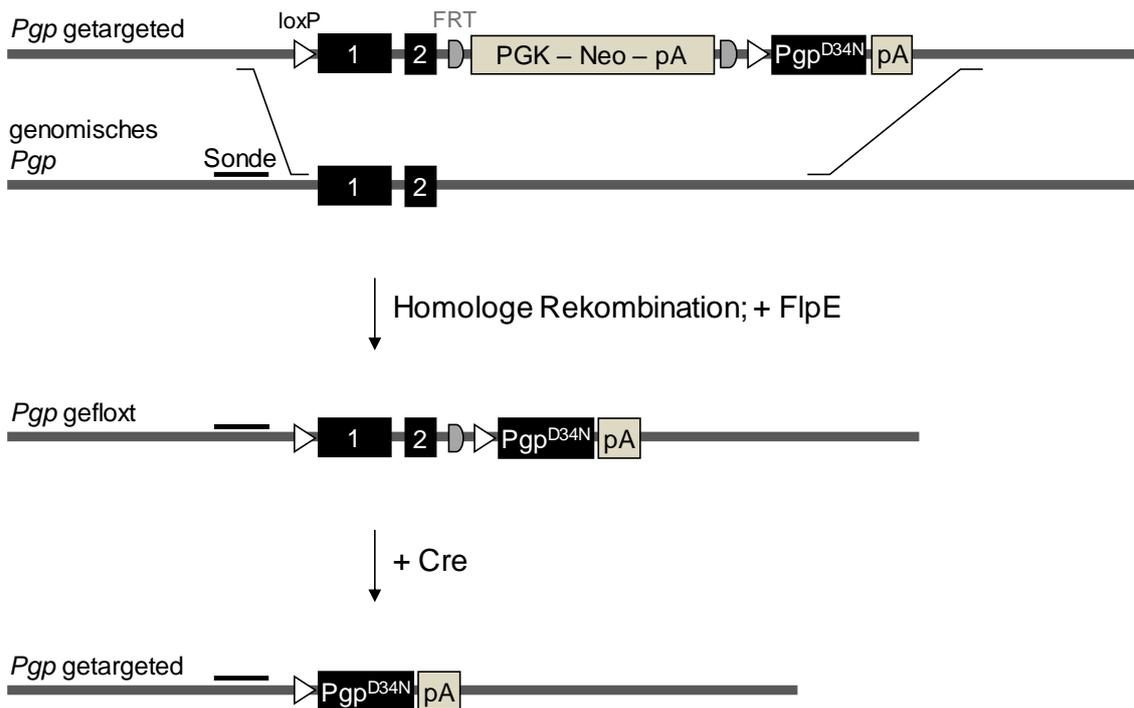


Abbildung 2: *Pgp* Targeting-Strategie.

Für Details siehe Text weiter oben. PGK: Promoter der Phosphoglyceratkinase. pA: Polyadenylierungssequenz. Abb. adaptiert nach Segerer et al. 2016.

Zwei Cre-Mauslinien wurden bislang verwendet. Die Verpaarung von *Pgp^{flx/flx}*-Mäusen mit dem Ganzkörper-Cre-Deleter-Stamm E1a-Cre führte zu einer ubiquitären *Pgp*-Inaktivierung in allen Gewebearten (*Pgp^{flx/flx}; E1a-Cre*). Die Verpaarung der *Pgp^{flx/flx}*-Mäuse mit der Tie2-Cre-Driver-Mauslinie führte zu einer *Pgp*-Inaktivierung in Endothelzellen und in Zellen des hämatopoetischen Systems, darunter Erythrozyten und Lymphozyten (*Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}*).

1.4.2 Ganzkörperinaktivierung der PGP verzögert das embryonale Wachstum und ist embryonal letal

Heterozygot PGP-inaktivierte *Pgp^{flx/flx}; E1a-Cre*-Mäuse (*Pgp^{WT/D34N}*) lassen sich, was Wachstum und Fruchtbarkeit angeht, nicht von ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern unterscheiden. Kerstin Hadamek in der AG Gohla analysierte > 600 Embryonen aus Kreuzungen zwischen *Pgp^{WT/D34N}*-Mäusen zu unterschiedlichen Gestationsstadien. Zwischen E8.5 und E11.5 stimmte das

Häufigkeitsverhältnis zwischen den Genotypen mit der erwarteten Mendelschen Verteilung überein. An E12.5 wurde aber nur ein homozygoter Embryo gefunden (4 %). Geboren wurden heterozygote (~64 %) und Wildtyp-Nachkommen (~36 %), aber es kamen keine homozygoten *Pgp*^{D34N/D34N}-Mäuse zur Welt. Größenvergleiche zwischen *Pgp*^{D34N/D34N}- und *Pgp*^{WT/WT}-Embryonen in unterschiedlichen Gestationsstadien und eine verspätete Achsendrehung der *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen machten ein verzögertes Wachstum PGP-inaktivierter Embryonen ab E8.5 deutlich. Zudem lagen in Embryonen aller Genotypen an E8.5 noch gleiche Anzahlen an Somitenpaaren vor. Die weitere Somitogenese stagnierte jedoch in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen. Homozygote *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen scheinen also ab E8.5 langsamer zu wachsen und bis E12.5 zu sterben. Dies deutet auf eine wesentliche Funktion der PGP bereits vor der Geburt hin. Zwischen E8.5 und E12.5 ist das murine Wachstum von einer regulären Entwicklung der Plazenta und des kardiovaskulären Systems abhängig, die eine ausreichende embryonale Versorgung mit Nährstoffen und O₂ sichern. An E10.5 war unter PGP-Inaktivierung die Dichte embryonaler Gefäße im Labyrinth der Plazenta zwar erniedrigt, da die Entwicklungsverzögerung der *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen jedoch schon vor Beginn der Plazentavaskularisation in Erscheinung trat, scheint der abweichende Aufbau des Labyrinths eher Folge als Ursache der embryonalen Entwicklungsverzögerung zu sein. Einige *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen zeigten darüber hinaus kraniale, dorsale und abdominale Blutungen. Die gezielte PGP-Inaktivierung in hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen hatte jedoch nicht den Tod der Embryonen zur Folge. *Pgp*^{flx/flx}; *Tie2-Cre*^{+/-}-Mäuse kamen der zu erwartenden Mendelschen Verteilung entsprechend auf die Welt. Sie zeigten keine Hämorrhagien und glichen den Wildtyp-Mäusen in Lebensfähigkeit, Wachstum und Fertilität (Segerer et al. 2016).

1.4.3 Inaktivierung der PGP hemmt die Zellproliferation unter normoxischen Bedingungen

Vor der Ausbildung eines funktionstüchtigen uteroplazentaren Gefäßsystems dominieren im embryonalen Gewebe niedrige O₂-Level (physiologische Hypoxie). Mit der Entwicklung des kardiovaskulären Systems und der Plazenta steigt der Sauerstoffanteil auf Normoxie-Niveau (2-9 % O₂) an (Simon & Keith 2008). Da die beobachtete Wachstumsverzögerung der *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen zeitlich mit der Entwicklung des kardiovaskulären Systems und der Plazenta zusammenfällt, wurde von Dr. Gabriela Segerer aus der AG Gohla der Einfluss von Sauerstoff auf die PGP-abhängige Zellproliferation untersucht. Während unter „normoxischen“ Bedingungen (~20 % O₂) die Proliferation PGP-inaktivierter muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) im Vergleich zu Wildtyp-MEFs signifikant vermindert war, so verschwand dieser Unterschied unter hypoxischen Bedingungen (~1 % O₂) (Segerer et al. 2016).

1.4.4 Inaktivierung der PGP verringert die Aktivität der TPI

Ein Mausembryo durchläuft in seiner Entwicklung einen Wandel des Intermediärstoffwechsels: Im Einzellstadium sind im Embryo wie auch in der Eizelle hauptsächlich oxidative Stoffwechselwege aktiv. Allmählich erfolgt während der Präimplantationsphase jedoch ein Wechsel des Metabolismus hin zur Aufnahme von Glukose und zu deren anaerobem Abbau zu Lactat. Ab E6 in der Postimplantationsphase wird die oxidative Metabolisierung zunehmend wieder aufgenommen und parallel zur Glykolyse betrieben (Johnson et al. 2003). Unter anderem durch bei oxidativem Metabolismus entstehende ROS werden vermehrt DNA-Schäden verursacht. Bei der Reparatur dieser Schäden setzen PDEs PG frei, indem sie die 3'-PG Enden von ESBs oder DSBs spalten (siehe Kap. 1.3.1.3).

Diese Enzyme werden in murinen Embryonen schon in frühen Entwicklungsstadien (E8.5-E11.5) exprimiert (Jaroudi & SenGupta 2007). Auch in Eizellen ist die Expression dieser Enzyme beschrieben (Menezo et al. 2007), was dafür spricht, dass sie auch in diesem Kontext zur Reparatur der im

Einzelstadium unter oxidativem Metabolismus entstehenden DNA-Schäden zur Verfügung stehen und PG bilden.

Da bisherige Versuche, endogene PG-Level in Embryos zu bestimmen, erfolglos blieben, wurde von Dr. Gabriela Segerer untersucht, ob die Inaktivierung der PGP PG-abhängige Funktionen (siehe Kap. 1.3.1.3) beeinflusst.

Zu erhöhten PG-Spiegeln passend führte PGP-Inaktivierung tatsächlich zu einer Reduktion der TPI-Aktivität um ~25 % in Erythrozyten von *Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}*-Mäusen im Vergleich zu *Pgp^{flx/flx}*-Mäusen. In Lysaten aus *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen war die TPI-Aktivität gegenüber *Pgp^{WT/WT}*-Embryonen an E8.5 um ~34 % inhibiert. Diese Auswirkung war unter hypoxischen Bedingungen nicht nachweisbar.

Hemmung der TPI erhöht DHAP-Level, dessen Bildung thermodynamisch bevorzugt wird (Ciriacy & Breitenbach 1979; Hollán et al. 1993; Shi et al. 2005; Orosz et al. 2006; Ralser et al. 2007). DHAP kann mittels zytosolischer Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH) zu G3P, dem Vorläufer von Glycerolipid-Rückgraten, reduziert werden. Die Reaktion lässt sich durch die FAD-abhängige mitochondriale GDH umkehren, wodurch zwei Elektronen in die Atmungskette geschleust werden (Mráček et al. 2013).

In Übereinstimmung mit aus PG-vermittelter TPI-Hemmung resultierenden erhöhten DHAP-Spiegeln wurden ebenso erhöhte G3P-Konzentrationen in Lysaten aus *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen gefunden (Segerer et al. 2016). Diese könnten allerdings auch mit der direkt G3P-dephosphorylierenden Aktivität der PGP zusammenhängen (Mugabo et al. 2016, Seifried et al. 2016).

2 Ziel der Arbeit

Die Phosphoglykolat-Phosphatase PGP (früher auch als AUM bezeichnet) wurde in dem Labor, in dem diese Arbeit entstand, als ein Mitglied der Phosphatasen vom HAD-Typ identifiziert. Neue Erkenntnisse schreiben dem Enzym neben einer Aktivität gegenüber Phosphoglykolat auch Aktivitäten gegenüber Glycerin-3-phosphat (G3P), P-Erythronat und P-Lactat zu. Die genetische Inaktivierung des Enzyms im gesamten Mausorganismus führt ab E8.5 zu einer Wachstumsverzögerung muriner Embryonen und bis E12.5 schließlich zu deren Tod. Im Gegensatz dazu sind Mäuse mit einer PGP-Inaktivierung in hämatopoetischen Zellen und im Endothel lebensfähig und phänotypisch unauffällig. Die beschriebenen Phosphatase-Aktivitäten legen eine wichtige Rolle des Enzyms für die Beeinflussung des Metabolismus und von Signalwegen nahe. Die genaue metabolische Funktion, die exakten Signalkaskaden sowie deren Auswirkungen sind bislang jedoch weitgehend unklar.

Ziel dieser Arbeit war es, die PGP-abhängigen Spiegel von Signal-, Membran- und Speicherlipiden in Mausembryonen und adulten murinen Lymphozyten mithilfe massenspektrometrischer Methoden *in vivo* zu untersuchen, da G3P als Kohlenhydrat-Rückgrat ein wichtiger Bestandteil vieler Lipide ist. Drei zentrale Fragen wurden adressiert:

- (1) Welchen Einfluss hat die PGP-Aktivität auf die Lipidzusammensetzung muriner Embryonen am Embryonaltag 8.5?
- (2) Fungiert die PGP auch in Lymphozyten als Glycerin-3-phosphat-Phosphatase?
- (3) Welchen Einfluss hat die PGP-Aktivität auf die Lipidzusammensetzung muriner adulter Lymphozyten?

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Propanol	Biosolve
Agarose (Gene Technology Quality, GTQ)	Carl Roth
Acetonitril	Biosolve
Ammoniumacetat	Biosolve
Ammoniumchlorid (NH ₄ CL)	Carl Roth
Aprotinin	Sigma Aldrich
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen
DMEM	PAN Biotech GmbH
EDTA	Merck
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromidlösung (1 %)	Carl Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH
Glukose	Merck Millipore
Glycerin-3-phosphat (G3P) Bis(cyclohexylammonium)-Salz	Sigma Aldrich
Glycin	Sigma Aldrich
Hydrazinhydratlösung (24 %)	Sigma Aldrich
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃)	AppliChem
Leupeptin	Carl Roth
L-Glutamin	PAN Biotech GmbH
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumdesoxycholat	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
Nicotinamadeninindinukleotid (NAD)	Sigma Aldrich

Orange G	Carl Roth
Pefabloc SC	Roche
Penicillin G Natriumsalz	PAN Biotech GmbH
Pepstatin	Sigma Aldrich
Polyethylenglycol(40)-nonylphenoether (NP-40)	Fluka
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH
Schweinegelatine	Sigma Aldrich
Streptomycinsulfat	PAN Biotech GmbH
TRIS Base	Carl Roth
TRIS-HCl	Carl Roth
Trypanblau	Sigma Aldrich

3.2 Technische Geräte

5424 R Zentrifuge	Eppendorf
5804 Zentrifuge	Eppendorf
Analysenwaage ABS-N/ABJ-NM	Kern
BBD 6220 CO ₂ Brutschrank	Heraeus
BDK Laminar-Flow Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
EnVision 2104 Multilabel Plate Reader	Perkin Elmer
Labovert FS Microscope	Leitz
MM 301 Mixer Mill	Retsch GmbH
MR Hei-Mix L Magnetic Stirrer	Heidolph
MZ 2C NT +AK+EK Vakuumpumpe	Vacuubrand
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
RVC 2-25 CDplus Rotational Vacuum Concentrator	Christ
Sonorex TK 52 Ultraschallbad	Bandelin
System V-150 Autoklav	Systemec
Thermomixer comfort 1.5 ml	Eppendorf
UPLC-Quattro Premier MS	Waters

UPLC-Synapt G2 HDMS	Waters
UVT28-ME UV-Transilluminator	Herolab
VORTEX-GENIE 2	Scientific Industries

3.3 Verbrauchsmaterialien

12-Well-Zellkulturschalen mit Nunclon Delta Oberfläche	Nunc
300 µl Fixed Insert Vials, Clear, Screw Top	Chromacol
96-Well-Platten mit Nunclon Delta Oberfläche	Thermo Scientific
BD Falcon Conical Tubes	BD Biosciences
BD Falcon Round-Bottom Tubes	BD Biosciences
Cell Scraper	Biologix
Cell Strainer (70 µm)	Corning
Einmal-Skalpelle	B. Braun
Einmalspritzen	B. Braun
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Mikro-Schraubröhren 2 ml mit Verschluss	Sarstedt
PCR-Reaktionsgefäße	Hartenstein
Petrischalen mit Nunclon Delta Oberfläche	Nunc
Superfrost Plus-Deckgläser	Thermos Scientific

3.4 DNA- und Proteinleitern

100 bp DNA-Leiter	NEB
-------------------	-----

3.5 Kommerzielle Kits

Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
-----------------------------	-------------------

3.6 Kommerzielle Puffer

5X AccuPrime GC-Rich Buffer A

Invitrogen

3.7 Mausmodelle

B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J (Tie2-Cre)

The Jackson Laboratory

B6.FVB-Tg(Ella-cre)C5379Lmgd/J

The Jackson Laboratory

C57Bl/6J-Mäuse

Charles River Laboratories

C57Bl/6-*Pgp^{tm1Goh}*-Mäuse

Ozgene Ltd.

3.8 Zellkulturmedien

DMEM (Vollmedium)

DMEM mit:

4.5 g/l Glukose

10 % FCS

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

RPMI

RPMI mit:

2.0 g/l Glukose

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

3.9 Antikörper

α-CD3 Anti-Maus, monoklonal (DaA3)

ImmunoTools GmbH

α-CD28 Anti-Maus, monoklonal (37.51)

ImmunoTools GmbH

3.10 Enzyme

AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase	Invitrogen
α -Glycerophosphate Dehydrogenase	Sigma Aldrich

3.11 Interne Standards

1,2-ditetradecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>sn</i> -glycerol)	Avanti Polar Lipids
1',3'-bis-(1,2-ditetradecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho)- <i>sn</i> -glycerol	Avanti Polar Lipids

3.12 Lösungen und Puffer

UPLC-Lösungsmittel:

Lösungsmittel A	10 mM	Ammoniumacetat in H ₂ O _{dest.} /Acetonitril (60/40, v/v)
Lösungsmittel B	10 mM	Ammoniumacetat in 2-Propanol/Acetonitril (90/10, v/v)

Gewebe- und Zellysepuffer:

Verdauungspuffer	25 mM	NaOH
	0.2 mM	EDTA
Neutralisationspuffer	40 mM	TRIS-HCl pH 5.5
RBC-Lysepuffer	155 mM	NH ₄ Cl
	12 mM	KHCO ₃
	0.1 mM	EDTA pH 7.3

RIPA-Puffer	50 mM	TRIS-HCl
	150 mM	NaCl
	1 %	NP-40
	1 % (w/v)	SDS
	0.5 %	Natriumdesoxycholat
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
	10 µg/ml	Pepstatin
	1 mM	Pefabloc
		pH 8.0

Andere:

TAE	40 mM	TRIS Base
	20 mM	CH ₃ CO ₂ H
	1 mM	EDTA
		pH 8.5

Trypanblau-Lösung	0.4 %	Trypanblau in PBS (w/v)
-------------------	-------	-------------------------

Hydrazin-/Glycin-Puffer	1 M	Hydrazin
	0.2 M	Glycin
	2 mM	MgCl ₂
		pH 9.7

NAD ⁺ -Lösung	0.05 M	NAD ⁺ in H ₂ O _{dest.}
--------------------------	--------	---

GDH-Lösung	6 mg/ml	GDH in H ₂ O _{dest.}
------------	---------	--

G3P-Lösung	1 mM	G3P in H ₂ O _{dest.}
------------	------	--

3.13 Software und Datenbanken

ChemSketch v14.01	Advanced Chemistry Development
E.A.S.Y Win32 Gel-Documentation System	Herolab
EnVision Multilabel Reader Software 1.12	PerkinElmer
MassLynx v4.1	Waters
MSe Data Viewer v1.0	Waters
Prism 5	GraphPad
QuantLynx v4.1	Waters
RLA-Tool (beta)	Entwickelt von Dr. Agnes Fekete und Prof. Dr. Dr. Martin J. Müller, Julius-von-Sachs-Institut, Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
SoftMax Pro 6.2.2	Molecular Devices
The METLIN Metabolomics Database	https://metlin.scripps.edu/landing_page.php? pgcontent=mainPage
TransOmics*	Waters

*Die Software wurde mittlerweile in „Progenesis Q1“ umbenannt.

4 Methoden

4.1 Züchtung PGP-inaktivierter Mäuse

Ozgene Pty Ltd., Australien, erzeugte gefloxt *Pgp*-Mäuse (*Pgp*^{tm1Goh}; *Pgp*^{flx/flx}) (**Abb. 2**) mit dem genetischen Hintergrund von C57Bl/6J-Mäusen. Die Neomycin-Resistenz-Kassette wurde durch Verpaaren mit dem globalen „FLPe deleter strain B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor<tm1(FLP1)Dym>/RainJ“ entfernt. Ganzkörper- oder für hämatopoetische-/Endothelzellen spezifische PGP-Inaktivierung wurde durch Kreuzung mit transgenen B6.FVB-Tg(Ella-cre)C5379Lmgd/J (Ella-Cre)- bzw. B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J (Tie2-Cre)-Mäusen erreicht. Transgene Mäuse wurden von „Jackson Laboratory“ bezogen. Die Experimente an Mäusen wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt. Alle Untersuchungen wurden in strenger Übereinstimmung mit den in Deutschland und der EU geltenden Rechtsvorschriften bezüglich der Behandlung und Nutzung von Labortieren durchgeführt.

4.2 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Um genomische DNA zu isolieren, wurden Stanzbiopsien des Ohrs von *Pgp*^{flx/flx}- oder *Pgp*^{flx/flx}, *Tie2-Cre*^{+/-}-Mäusen 60 min bei 98 °C und 500 rpm im Thermomixer in 35 µl Verdauungspuffer lysiert. Die Lysate wurden mit 35 µl Neutralisationspuffer neutralisiert und unlösliches Material durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 4000 x g entfernt. Die PCR erfolgte unter Verwendung zweier unterschiedlicher Primersätze. Die Primer IC324 vorwärts (5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3') und IC324 rückwärts (5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3') dienten der internen Positivkontrolle und führten zur Amplifikation eines 324 bp langen DNA-Fragments. Durch die Primer Cre-1084 vorwärts (5'-GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC-3') und Cre-1085 rückwärts (5'-GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT-3') ließen sich *Pgp*^{flx/flx}, *Tie2-Cre*^{+/-}-

Mäuse anhand einer zusätzlichen Bande mit einer Länge von 100 bp identifizieren. Zur Amplifikation wurde die thermostabile AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase verwendet.

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die PCR:

4 µl	5 x AccuPrime™ GC-Rich Buffer A
0.5 µl	20 µM IC324 forward
0.5 µl	20 µM IC324 reverse
0.5 µl	20 µM Cre-1084 forward
0.5 µl	20 µM Cre-1085 reverse
1 µl	DNA
0.4 µl	AccuPrime™ GC-Rich DNA Polymerase
12.6 µl	steriles H ₂ O _{dest.}

PCR-Protokoll:

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initialisierung:	95	3 min	-
Denaturierung:	98	20 s	} 35
Primerhybridisierung:	51	15 s	
Elongation:	72	25 s	
Final Hold:	12	∞	-

Bei Ella-Cre-Mäusen erfolgte die PCR wie von Segerer et al. 2016 beschrieben. Hier detektieren die Primer (vorwärts: 5'-AAT GAG CGT CCC GGA GGC-3'; rückwärts: 5'-AAA CCC AAG CGC CTT AGC-3') das Wildtyp-Allel mit 212 bp und das „getargetete“ Allel mit 163 bp.

Nach der PCR erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe durch Agarose-Gelelektrophorese bei einer konstanten Spannung von 80 V. Für das benötigte Gel wurden 2.5 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer geschmolzen, der später auch als Elektrophoresepuffer diente. Bevor das Gel gegossen wurde,

wurden 0.005 % Ethidiumbromid hinzugefügt. Um den Fortschritt der elektrophoretischen Auftrennung überwachen zu können, wurden die Proben mit jeweils 3 µl Orange G versehen. Anschließend wurden die Geltaschen befüllt. Als unabhängiger Größenmaßstab für die PCR-Produktbanden wurde ein 100 bp DNA-Leiterstandard verwendet. Die Visualisierung der Banden wurde durch den UV-Transilluminator eines Gel-Dokumentationssystems ermöglicht.

4.3 Entnahme und Aufbereitung der Embryonen

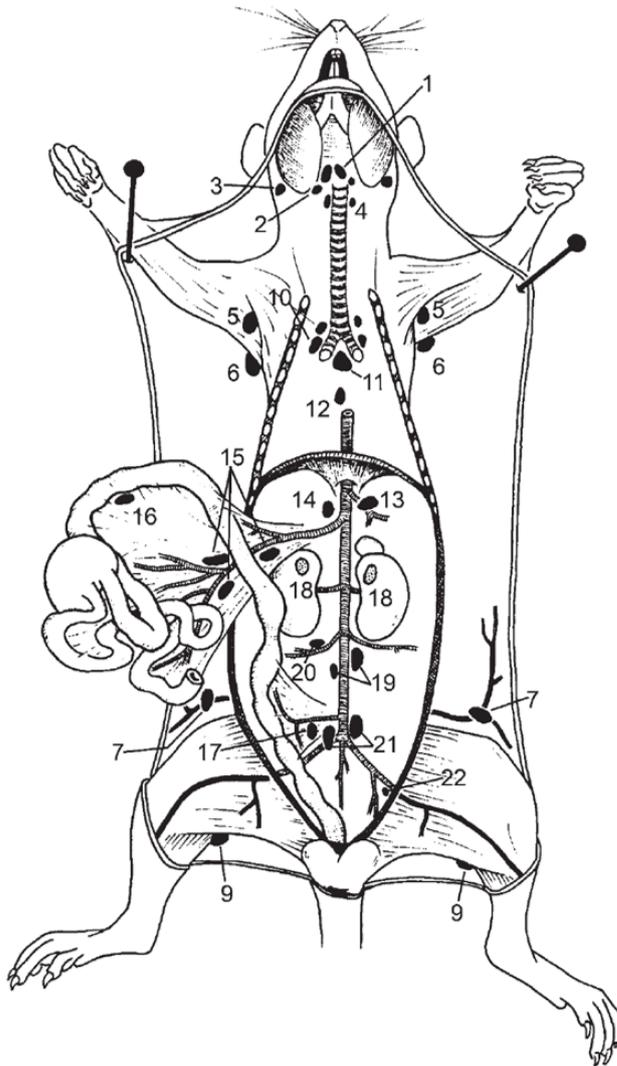
Embryonen von *Pgp^{flx/flx}*- bzw. *Pgp^{flx/flx}; Ella-Cre*-Mäusen wurden an Tag 8.5 der Embryogenese explantiert und in mit 0.1 % Schweinegelatine beschichteten 24-Well-Kulturschalen in vollinhaltlichem DMEM in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Pro Versuch wurden je zehn dieser *Pgp^{WT/WT}*- bzw. *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen gepoolt und in 600 µl eiskaltes 100%iges Methanol aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Extraktion des Lipidoms, aber mindestens 24 h lang, bei -80 °C gelagert.

4.4 Entnahme sekundärer lymphatischer Organe

Für die Untersuchungen des Lipidoms wurden *Pgp^{flx/flx}*- und *Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}*-Mäusen folgende Lymphknoten entnommen und in RPMI gewaschen: Ln. mandibularis, Ln. mandibularis accessorius, Ln. parotideus superficialis, Ln. axillaris proprius, Ln. axillaris accessorius, Ln. subiliacus, Lnn. jejunales, Ln. colicus und Ln. iliacus medialis (**Abb. 3**).

Für den Glycerin-3-phosphat (G3P)-Assay wurde den Mäusen, um ausreichend hohe Zellzahlen zu erhalten, die Milz als lymphozytenreiches lymphatisches Organ entnommen.

Unmittelbar im Anschluss an die Entnahme erfolgte die Isolierung der Lymphozyten aus dem jeweiligen Gewebe.



Nr. Offizieller Name

- 1 Ln. mandibularis*
- 2 Ln. mandibularis accessorius*
- 3 Ln. parotideus superficialis*
- 4 Ln. cervicalis profundus cranialis
- 5 Ln. axillaris proprius*
- 6 Ln. axillaris accessorius*
- 7 Ln. subiliacus*
- 8 Ln. ischiadicus (nicht sichtbar)
- 9 Ln. popliteus
- 10 Lnn. mediastinales craniales
- 11 Ln. tracheobronchialis
- 12 Ln. mediastinalis caudalis
- 13 Ln. gastricus
- 14 Ln. pancreaticoduodenalis
- 15 Lnn. jejunales*
- 16 Ln. colicus*
- 17 Ln. mesentericus caudalis
- 18 Ln. renalis
- 19 Ln. lumbalis aorticus
- 20 Ln. iliacus lateralis
- 21 Ln. iliacus medialis*
- 22 Ln. iliacus externus

Abbildung 3: Murine Lymphknoten.

Schematische Zeichnung der anatomischen Verteilung muriner Lymphknoten; frei nach Van den Broeck et al. 2006. Die für unsere Versuche entnommenen Lymphknoten sind mit (*) gekennzeichnet.

4.5 Isolierung und Zählen der Lymphozyten

Die Lymphknoten wurden mithilfe des Kolbens einer sterilen 2 ml-Spritze homogenisiert und so gewonnene Zellen wurden durch ein auf einem 50 ml-Falconröhrchen befestigtes Zellsieb mit einer Porengröße von 70 μm gefiltert. Das Sieb wurde fünf Mal mit jeweils 1 ml RPMI gespült und die erhaltene Zellsuspension für 8 min bei 800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml 37 °C warmen RBC-Lysepuffers resuspendiert und für 8 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Erythrozytenlyse wurde durch Zugabe von 9 ml RPMI gestoppt und die Suspension erneut für 8 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Lymphozyten in 10 % FCS enthaltendem RPMI resuspendiert.

Von jeder Lymphozytensuspension wurde anschließend manuell die Zellzahl bestimmt. Dafür wurden 10 μl Zellsuspension entnommen, verdünnt und mit Trypanblau gefärbt. Nach Befüllen einer Neubauer-Zählkammer wurden alle vier großen Eckquadrate ausgezählt und die Lymphozytenkonzentration der Suspension nach der Formel $\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahlen der Eckquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$ bestimmt.

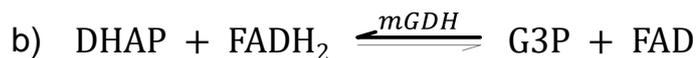
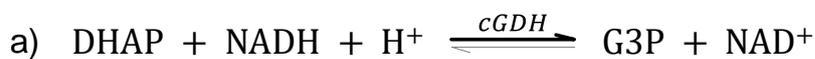
Suspensionen gleicher Lymphozytenzahl wurden für 8 min bei 800 x g zentrifugiert, die Zellen in 125 μl RPMI aufgenommen, in 2 ml-Schraubdeckelgefäße überführt und in 375 μl eiskalten 100%igen Methanols gelöst. Die Proben wurden auf Eis gesammelt und bis zur Extraktion des Lipidoms bei -80 °C gelagert.

Für den G3P-Assay erfolgte die Extraktion der Lymphozyten aus der Milz mit wenigen Abweichungen auf dieselbe Vorgehensweise: Der Schritt der Erythrozytenlyse wurde unter Verwendung von 4 ml 37 °C warmen RBC-Lysepuffers zwei Mal durchgeführt. Die Pellets gleicher Lymphozytenzahl wurden darüber hinaus nicht mit Methanol, sondern mit 240 μl RIPA-Puffer lysiert. Weitere Behandlungsschritte folgten unmittelbar im Anschluss und sind in Kap. 4.6.3 beschrieben.

4.6 Glycerin-3-phosphat-Assay

4.6.1 Prinzip

Die Bestimmung der relativen, intrazellulären G3P-Konzentration von Lymphozyten wurde in Anlehnung an die Vorgehensweise von Hans-Jürgen Hohorst durchgeführt (Hohorst 1962). Seine Methode beruht auf der Reaktion der cGDH (Formel 1 a). Dieses Enzym kann sowohl die Reduktion von DHAP als auch die Oxidation von G3P katalysieren (Koekemoer et al. 1995).

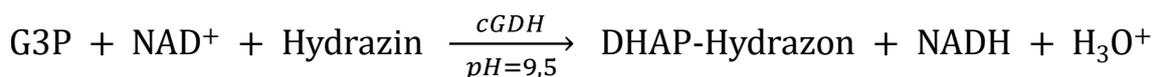


Formel 1: Reaktionen des G3P-Shuttles.

Reduktion von DHAP durch die cGDH (a) und Oxidation von G3P durch die mGDH (b).

Das Gleichgewicht dieser Reaktion (Formel 1 a) liegt weit auf der rechten Seite und die umgekehrte Reaktion (Formel 1 b, Oxidation von G3P) wird unter physiologischen Bedingungen im Rahmen des G3P-Shuttles durch die FAD-abhängige mGDH katalysiert (Mráček et al. 2013).

Unter adaptierten Bedingungen gelingt es jedoch, dass auch die Oxidation von G3P durch die cGDH unter Entstehung von NADH katalysiert wird. Dafür werden DHAP durch einen Hydrazin-Puffer und Protonen durch ein alkalisches Milieu aus dem Gleichgewicht entfernt (Formel 2).



Formel 2: Oxidation von G3P durch die cGDH.

So kann das bei dieser Reaktion entstehende und bei 340 nm photometrisch detektierbare NADH direkt mit der ursprünglich vorhandenen G3P-Menge korreliert werden.

4.6.2 Etablierung des Versuchs

An der von Hohost beschriebenen Methode wurden einige Änderungen vorgenommen, um die Methode an die zu untersuchende Fragestellung anzupassen. Anstatt separate Extinktionswerte aus Küvetten zu ermitteln, verwendeten wir 96-Well-Platten und einen Multilabel Plate Reader. Auf diese Weise wurde die Extinktion alle 30 s bei 340 nm kolorimetrisch bestimmt und ihr Verlauf über 9 min vor und 38 min nach Enzymzugabe gemessen. In unseren Proben aus in begrenztem Maß zur Verfügung stehendem Lymphozytenmaterial kam es unter Verwendung von zur Enteiweißung angeratenen Perchlorsäure nach Enzymzugabe nicht zu einem Anstieg der Extinktion (**Abb. 4**). Deshalb wurde anstelle der Perchlorsäure RIPA-Puffer eingesetzt, worunter die Extinktion sowohl vor als auch nach Enzymzugabe anstieg. Erst die Kombination von RIPA-Puffer und thermischer Denaturierung führte zu einer konstanten Ausgangsextinktion und einem Extinktionsanstieg nach Zugabe der cGDH.

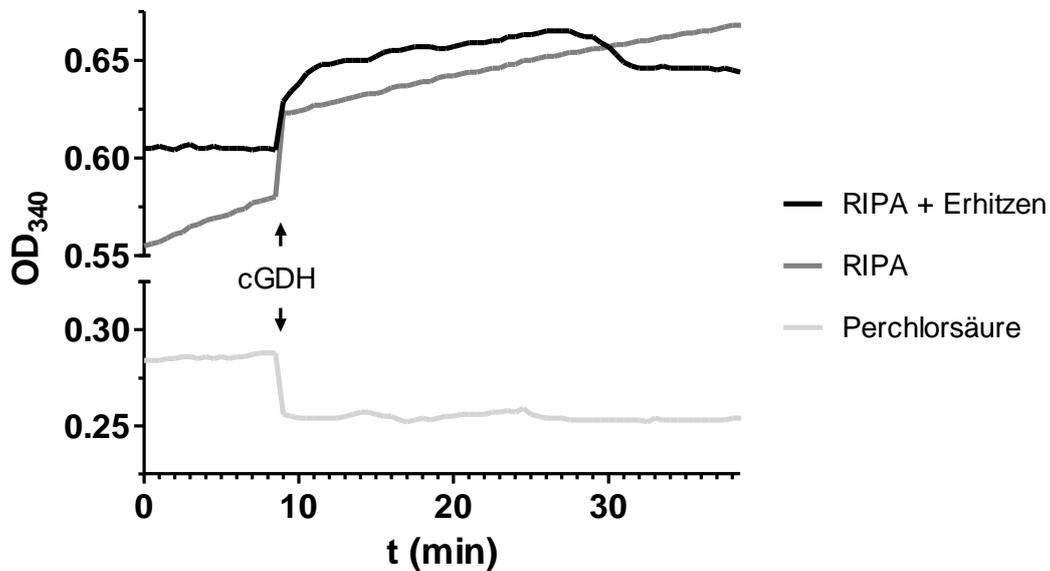


Abbildung 4: Etablierung eines geeigneten Lymphozytenlyseverfahrens für den G3P-Assay. Einfluss der Behandlung von Lymphozytenproben mit Perchlorsäure, RIPA oder RIPA + Erhitzen auf den Verlauf der Extinktion bei 340 nm (OD_{340}). Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der cGDH-Zugabe an. Bei zuvor konstanter Extinktion ist eine Extinktionszunahme nach Enzymzugabe auf die Produktion von NADH zurückzuführen. Es wurden jeweils 20 Mio. Lymphozyten eingesetzt, die in diesem Schritt der Etablierung noch aus Lymphknoten isoliert wurden.

4.6.3 Aufbereitung, Messung und Auswertung der Proben

Die Lymphozytenlysate (siehe Kap. 4.5) wurden 15 min bei 4 °C geschwenkt und unlösliche Komponenten durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 20 000 x g und 4 °C entfernt. Der Überstand wurde anschließend für 30 min bei 62 °C erhitzt. Die Proteine und damit auch NADH produzierende bzw. konsumierende Enzyme wurden dadurch thermisch denaturiert und die Proben durch Protein-Präzipitation leicht trüb. Bei Raumtemperatur erfolgte deshalb eine letzte Zentrifugation für 5 min bei 20 000 x g. Auch für die G3P-Verdünnungen der Standardgerade wurde RIPA-Puffer verwendet. Sie wurden gleichzeitig mit den Lymphozytenproben im Thermomixer erhitzt.

Die Wells wurden mit 90 µl Hydrazin/Glycin-Puffer, 7.5 µl NAD^+ -Lösung und 100 µl der Lymphozytenprobe bzw. der jeweiligen Verdünnung für die Standardgerade befüllt. Die Proben aus PGP-inaktivierten bzw. Wildtyp-Lymphozyten

wurden dabei in Duplikate aufgeteilt. Nach Erreichen der Raumtemperatur und vor Enzymzugabe erfolgte über 9 min alle 30 s die Bestimmung der Extinktion im Multilabel Reader. Nach Hinzufügen von 1.5 µl der cGDH-Lösung wurden die Extinktionswerte über 38 min hinweg ebenfalls alle 30 s aufgezeichnet (**Abb. 11 a und b**).

Anstelle des Extinktionsunterschiedes ΔE wurde die Steigung als Maß für die G3P-Konzentration verwendet. Sie wurde aus dem aufgezeichneten Extinktionsverlauf ab 3 min nach Enzymzugabe anhand von 20 Messwerten berechnet (**Abb. 11 c und d**).

4.7 Lymphozytenaktivierung

12-Well-Kulturschalen wurden für 2 h mit α -CD3-Antikörpern in PBS (5 µg/ml, 500 µl/Well) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die so mit α -CD3-Antikörpern beschichteten Wells wurden anschließend mit PBS gewaschen. Vier Millionen Lymphozyten in RPMI + 10 % FCS (2 Mio. Zellen/ml) wurden pro Well zusammen mit α -CD28 (5 µg/ml) und Glukose (20 mmol/l) ausgesät und in 18-stündiger Inkubation aktiviert. Danach wurden die Lymphozyten erneut gezählt und gleiche Zellzahlen lysiert.

4.8 Lipidomics

4.8.1 Extraktion des Lipidoms mit Methyl-*tert*-butylether

Die Methyl-*tert*-butylether (MTBE)-basierte Extraktion der Gesamtlipide erfolgte – geringfügig modifiziert – gemäß publizierter Verfahren (Matyash et al. 2008, Chen et al. 2013). Die Lymphozytenlysate (~40 Mio. Lymphozyten/ml bzw. ~1 mg Protein/ml) wurden in Schraubdeckelgefäßen mit 5 mm Zirconiumdioxid-Kugeln versehen und über 5 min bei 21 Hz in einer Kugelmühle bearbeitet. Ein ml MTBE wurde hinzugefügt. Die Proben wurden 1 h bei Raumtemperatur auf einem Thermomixer geschüttelt. 250 µl destillierten Wassers wurden hinzugefügt und die Proben für 1 min gevortext. Um die Phasentrennung zu unterstützen, folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 9 400 x g. Die obere Phase wurde im Rotationsverdampfer durch eine Vakuumpumpe entfernt und die zurückbleibenden Lipide in 50 µl Isopropanol aufgelöst.

Bei der Aufbereitung aktivierter Lymphozytenproben wurden dem MTBE jeweils 1 µg/ml der internen Standards 1,2-ditetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*sn*-glycerol) und 1',3'-bis-(1,2-ditetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho)-*sn*-glycerol beigefügt. Der Proteingehalt der aktivierten Lymphozytenproben wurde mittels Micro BCA Protein Assay Kit bestimmt. Die Proben dafür wurden entnommen, bevor das Extraktionsmedium den aktivierten Lymphozytenlysaten hinzugefügt wurde.

Bis auf die Zugabe von 200 µl destillierten Wassers vor der Bearbeitung in der Kugelmühle wurden die Lipide der Embryoproben auf die gleiche Weise extrahiert wie die der nicht aktivierten Lymphozytenproben.

4.8.2 *Non-targeted* Analyse

Mittels Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) und anschließender massenspektrometrischer Analyse durch ein Hybrid Quadrupol Orthogonal Flugzeit-Massenspektrometer wurde die ungerichtete Erfassung aller extrahierter Lipide angestrebt. Alle Lösungsmittel entsprachen dem LC-MS-Reinheitsgrad. Die Messung erfolgte prinzipiell so wie von Schiebel et al. 2013 publiziert. Jedoch wurde neben negativer Elektrospray-Ionisation (ESI) auch der positive ESI-Modus verwendet (Kapillarspannung ± 0.8 kV, Innenringspannung [„*cone voltage*“] ± 25 V). Die ESI-Einheit koppelt den Chromatographen mit dem Massenspektrometer und führt nach chromatographischer Auftrennung der im Lösemittel enthaltenen Metabolite zu deren Überführung in die Gasphase und Ionisation (es entstehen sog. Vorläufer-Ionen). In der Kollisionszelle des Massenspektrometers führt die Anlage einer Spannung durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) zur Fragmentation der Vorläufer-Ionen. Die Spannung wurde alternierend alle 9 ms angelegt (semi-simultaner Fragmentationsprozess), sodass nach Passage des *time-of-flight* (TOF)-Analysators annähernd gleichzeitig die Masse-Ladungsverhältnisse (m/z) der Vorläufer-Ionen in einer *Low-Energy* (LE)-Spur (**Abb. 5**) und ihrer Fragment-Ionen in einer *High-Energy* (HE)-Spur detektiert werden konnten. Bei der Messung der ersten Lymphozytenproben beschränkte sich die Datenerfassung auf den m/z -Bereich von 50-1200. Für die Messung weiterer Lymphozytenproben und der Embryoproben wurde die Spanne auf 50-1500 erweitert, um auch die m/z einfach deprotonierter CL-Spezies zu erfassen.

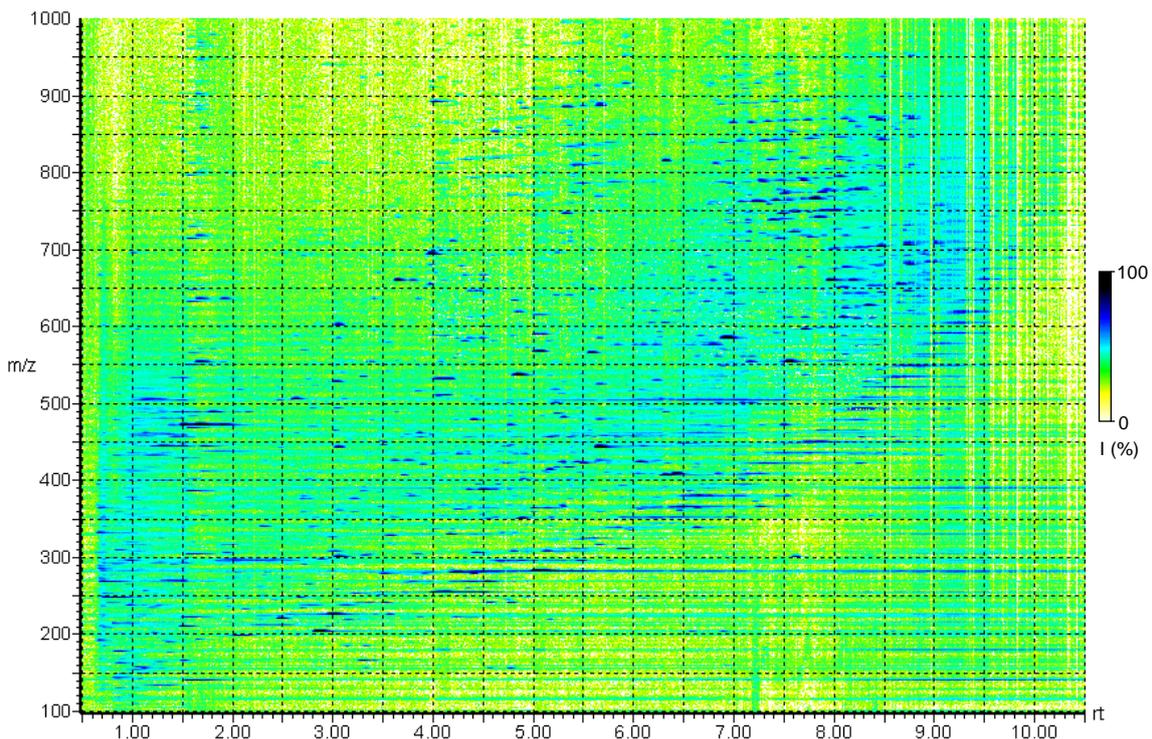


Abbildung 5: 2D-Kartierung der mittels non-targeted Analyse detektierten Vorläufer-Ionen. Anhand von WT-Lymphozytenprobe Nr. 1 sind beispielhaft Retentionszeit (rt), Masse-Ladungsverhältnis (m/z) und Intensität der Vorläufer-Ionen aus der LE-Spur des positiven ESI-Modus dargestellt. Analog dazu wurden die Fragmente der Vorläufer-Ionen in der HE-Spur detektiert. Zudem wurden auch im negativen ESI-Modus die Messdaten von Vorläufer-Ionen und ihren Fragmenten bestimmt. Der gezeigte m/z-Bereich (Y-Achse) ist auf 100-1000 beschränkt; die rt von 0.5 bis 10.5 ist auf der x-Achse dargestellt; die Intensität (I, in %) der detektierten Ionen ist farblich kodiert (siehe Skala rechts).

4.8.2.1 Metabolite fingerprinting und Identifikation von Marker-Ionen zur Hypothesen-Generierung

Um aus der Fülle an detektierten und unkomprimiert als Kontinuumdaten abgespeicherten Ionen diejenigen sog. Marker-Ionen herauszufiltern, deren Intensitäten sich zwischen WT und PGP-inaktivierten Proben signifikant unterscheiden (*metabolite fingerprinting*), wurden die gespeicherten Datensätze in das Programm TransOmics (Version 1.0; Waters) importiert und dort analysiert. Da geringe Abweichungen der Retentionszeit (rt) zwischen den Messdurchläufen der Proben zur Inkongruenz der Peaks führen, wurden ihre Positionen von der Software durch eine Alignmentfunktion in Übereinstimmung gebracht. Die Detektion der Peaks erfolgte durch *Peak Picking*. Detektierte Peaks wurden mit ANOVA analysiert, um signifikante Unterschiede zwischen den

Genotypen zu identifizieren. Marker-Ionen (im Folgenden nur Marker) waren lediglich durch ihr m/z und ihre rt charakterisiert. Der sich hinter ihnen verbergende Stoff musste erst identifiziert werden. Diejenigen Marker, deren Detektion und Intensitätsunterschied sich in den Messdaten weiterer Proben reproduzieren ließ, wurden wie folgt identifiziert: Mit MassLynx wurde das m/z des Markers überprüft und präzisiert. Die genaueren m/z erlaubten eine gezieltere Datenbankrecherche (Toleranz 3 mDa). Wir verwendeten die METLIN Datenbank unter Berücksichtigung von $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-2H_2O]^+$, $[M+2H]^{2+}$ und $[M+CH_3OH+H]^+$ -Addukten für Marker der positiven ESI-Messung und $[M-H]^-$, $[M-H_2O-H]^-$, $[M-2H]^-$ und $[M+CH_3COO]^-$ -Addukten für Marker der negativen ESI-Messung. Das m/z eines Markers stimmte z.T. mit dem mehrerer bei der Recherche gefundener Substanzen überein. Für jede gefundene Substanz wurde hinterfragt, ob die angegebene Art des Addukts zu ihrem üblichen Ionisationsverhalten und ob die rt des Markers zu ihrer Polarität passt. Darüber hinaus wurde mit MassLynx anhand der Isotopenverteilung die elementare Zusammensetzung des Markers berechnet. Stimmte sie mit der eines in der Datenbankrecherche für das entsprechende m/z gefundenen Stoffes überein, wurde überprüft, ob das Fragmentationsmuster des Markers auch die Fragmente des vermeintlichen Stoffs enthält (**Abb. 6**). Bei Übereinstimmung wurde ein Profiling (Kap. 4.8.2.2) der gesamten Stoffklasse durchgeführt. Außerdem wurde das m/z der vermeintlichen Substanz seiner bevorzugten Adduktbildung entsprechend für den umgekehrten Ionisationsmodus berechnet und es wurde geprüft, ob es sich im Massenspektrum dieses ESI-Modus auch bei gleicher rt detektieren lässt.

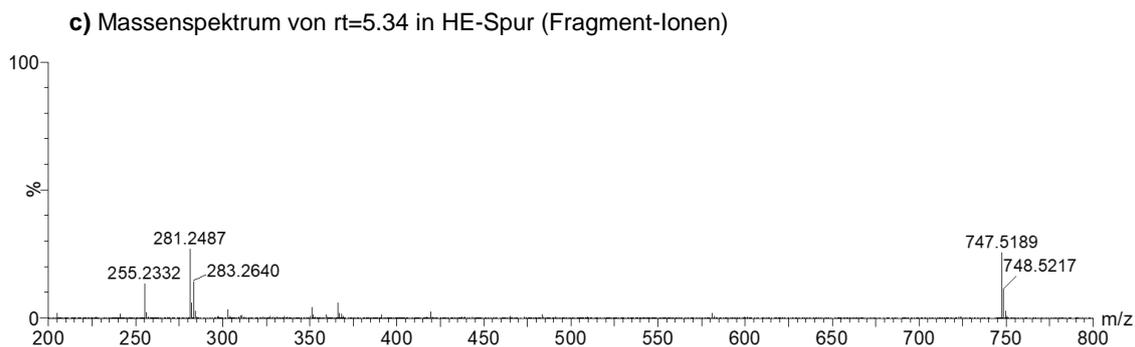
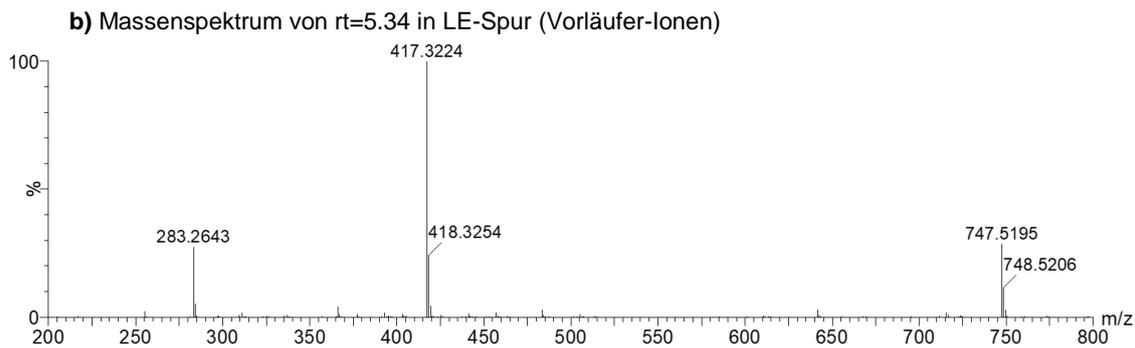
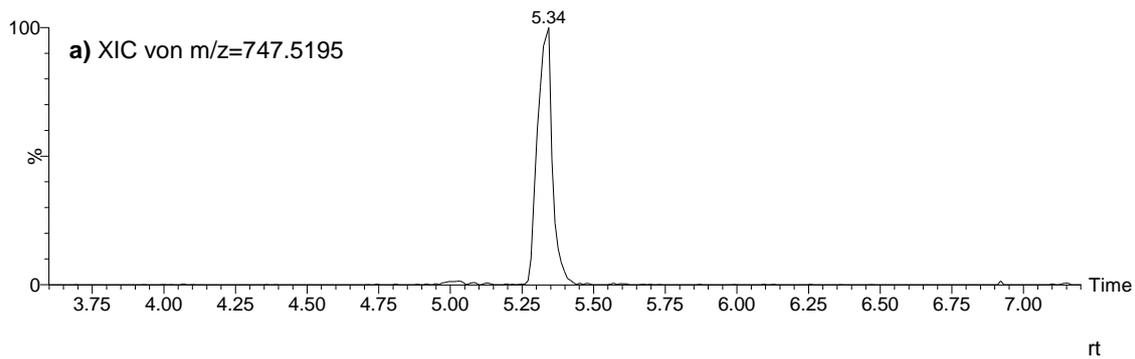


Abbildung 6: Überprüfung des Fragmentationsmusters eines Marker-Ions.

Für den im negativen ESI-Modus detektierten Marker mit einer rt von 5.34 min und einem m/z von 747.5195 ergab die METLIN Datenbankrecherche $PG^*(34:1)$ in deprotonierter Form als sich vermeintlich dahinter verbergende Substanz. Da die von MassLynx ermittelte elementare Zusammensetzung ($C_{40}H_{76}O_{10}P$) auch mit der des mutmaßlichen Phosphatidylglycerins übereinstimmte, wurde das Fragmentationsmuster des Markers in Lymphozytenprobe Nr. 1 einer $Pgp^{fix/fix}$; $Tie2-Cre^{+/-}$ -Maus untersucht. (a) zeigt das Extracted Ion Chromatogramm (XIC) des m/z von 747.5195 mit der rt von 3.6 bis 7.2 auf der X-Achse und der Intensität in % auf der Y-Achse. Der Peak des Stoffes mit dem m/z von 747.5195 ist bei der rt von 5.34 min zu sehen. (b) und (c) zeigen das Massenspektrum des Peaks in der LE- bzw. in der HE-Spur. Der m/z -Bereich auf der X-Achse ist jeweils auf 200-800 beschränkt. Die Y-Achse zeigt die Intensität in % von Vorläufer-Ionen (b) bzw. von Fragment-Ionen (c). Im Massenspektrum der Fragment-Ionen werden die m/z 255.2332 und 281.2487 für die Fettsäuren (16:0) und (18:1) detektiert, während sie im Massenspektrum der Vorläufer-Ionen nicht vorkommen. Dieses Fragmentationsmuster bestätigt die Anfangsvermutung nach Datenbankrecherche und Berechnung der elementaren Zusammensetzung, da die beiden Fettsäuren zwei integrale Bestandteile von $PG^*(34:1)$ sind.

4.8.2.2 Profiling

Unter Verwendung des MSe DataViewers wurden die LE- und HE-Spur des Kontinuum-Datensatzes des gewünschten ESI-Modus einer Probe präprozessiert und alle m/z-rt-Paare der Vorläufer-Ionen (aus der LE-Spur) und der Fragment-Ionen (aus der HE-Spur) aufgelistet. Diese Listen wurden als *comma-separated value* (CSV)-Dateien exportiert und waren die Basis des Lipid-Profiling. Das Profiling einer gewünschten Lipidklasse erfolgte auf etabliertem Weg über phpMyAdmin und MySQL. Ergänzend dazu wurde die hausintern neu entwickelte Software RLA-Tool (Dr. Agnes Fekete und Prof. Dr. Dr. Martin J. Müller, unpubliziert) getestet, die das bisherige Standardverfahren zukünftig ersetzen soll. Die CSV-Dateien aus LE- und HE-Spur wurden dementsprechend sowohl nach bisher üblichem Verfahren als auch unter Verwendung des RLA-Tools importiert und mit den hinterlegten Datenbanken abgeglichen. Ein Lipid wurde jeweils nur dann identifiziert, wenn sein exaktes m/z in der LE-Datei und bei gleicher rt mit einer Fehlertoleranz von 3 mDa die m/z zweier seiner integralen Fragmente (Fettsäure-Seitenreste) in der HE-Datei vorlagen. Die Identifikation der Lipidspezies wurde durch Überprüfung der von Hermansson et al. 2005 und Hummel et al. 2011 beschriebenen systematischen Verteilung ihrer m/z und rt bestätigt (**Abb. 7**). Die identifizierten Lipidspezies wurden mit m/z und rt in eine Methodendatei übertragen, mit deren Hilfe das in MassLynx eingebettete Programm QuantLynx automatisiert die passenden Peakflächen integrierte. Mit einer verkürzten, numerischen Schreibweise wurden unterschiedliche Vertreter einer Lipidklasse derselben elementaren Zusammensetzung (und bei gleicher Ladung folglich auch desselben m/z) wie beispielsweise PC(18:2/18:2) und PC(16:0/20:4) unter PC(36:4) zusammengefasst. Die Zahlen in der Klammer beziehen sich bei dieser verkürzten Schreibweise auf die Summe der Kohlenstoffatome und die Summe der Doppelbindungen aller Fettsäure-Seitenketten des Lipids (Fahy et al. 2008).

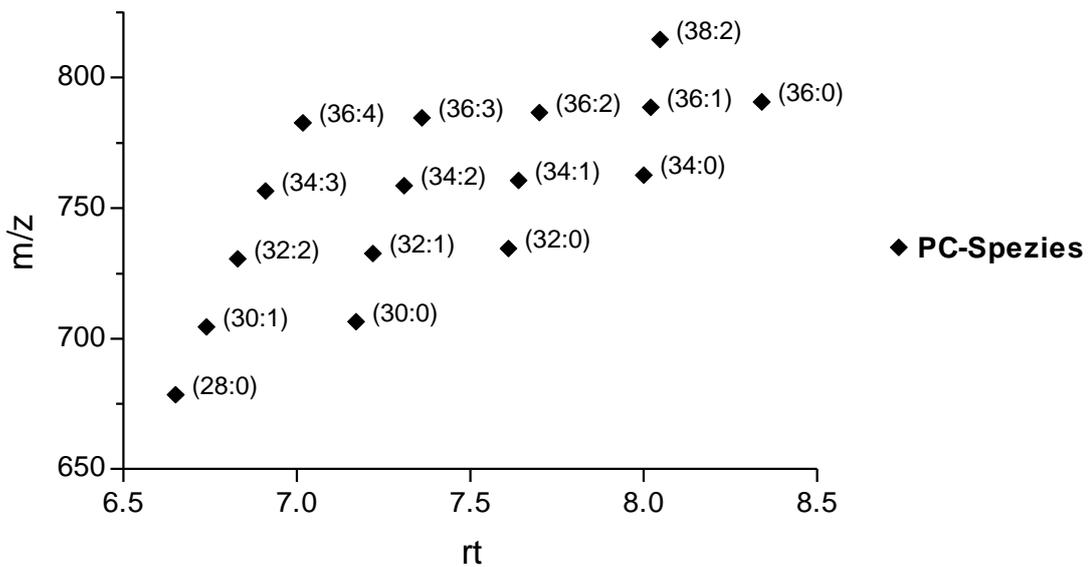


Abbildung 7: rt-m/z-Streudiagramm.

Systematische Verteilung von m/z und rt am Beispiel der Phosphatidylcholine (PCs) aus Pgp^{WT/WT}-Embryolysat. Es wurde in Messung 1 des positiven ESI-Modus nach [M+H]⁺-Addukten der PCs gesucht. Weitere beim Profiling gefundene PC-Spezies, die nicht in dieses System passten, wurden als falsch identifiziert gewertet und entfernt. Die Zahlen in der Klammer beziehen sich auf die Summe der Kohlenstoffatome und die Summe der Doppelbindungen der Fettsäure-Seitenketten der PCs.

4.8.3 Targeted Analyse

Die gezielte, hypothesengetriebene Analyse der Cardiolipin-Spezies erfolgte mit Unterstützung durch Dr. Markus Krischke wie von Ott et al. 2012 beschrieben unter Einsatz eines Flüssigkeitschromatographs (Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatograph) gekoppelt an ein Tandem-Massenspektrometer (Waters Micromass Quattro Premier triple-quadrupole mass spectrometer, Milford, MA) mit einer ESI-Schnittstelle.

4.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und GraphPad Prism 5. Für den G3P-Assay wurde mittels Einstichproben-t-Test geprüft, ob sich der Mittelwert der relativen G3P-Konzentrationen in PGP-inaktivierten Lymphozyten signifikant vom Wert 1 unterscheidet. Die Auswertung der Lipidomics-Versuche erfolgte mittels t-Test (*unpaired, two-tailed*). Die Diagramme der Embryo- versuche zeigen Mittelwert \pm Standardabweichung dreier technischer Replikate aus zehn gepoolten und lysierten E8.5-Embryonen pro Genotyp. Die Diagramme der Lymphozytenversuche zeigen Mittelwert \pm Standardfehler dreier biologischer Replikate. Die statistische Signifikanz wird mit * für $p < 0.05$, ** für $p < 0.01$, *** für $p < 0.001$ bzw. „ns“ (nicht signifikant) für $p > 0.05$ angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Ganzkörperinaktivierung der PGP in E8.5-Embryonen verursacht DG-, TG- und SM-Anhäufung und PC-Abnahme

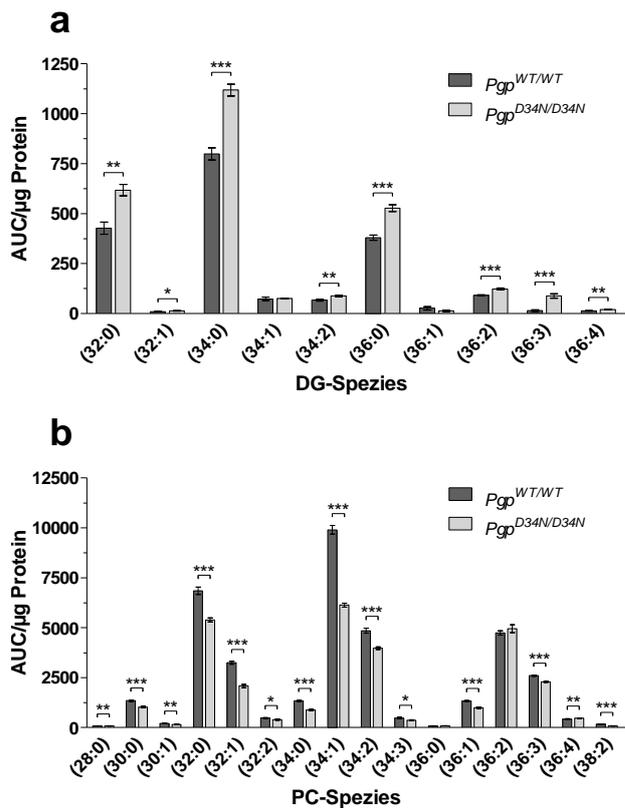
G3P stellt das aktivierte Kohlenhydrat-Rückgrat der Glycerolipide dar. Nachdem in PGP-inaktivierten Embryonen unter Normoxie eine reduzierte TPI-Aktivität und erhöhte G3P-Level gemessen wurden (siehe Kap. 1.4.4), wurde die Lipidzusammensetzung von *Pgp*^{WT/WT}- und *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen am Embryonaltag 8.5 mittels UPLC-qTOF-MS untersucht. Mit *non-targeted* Messungen und anschließendem *metabolite fingerprinting* wurde zunächst eine hypothesengenerierende Herangehensweise gewählt, um Marker-Ionen zu definieren. Die beiden in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen statistisch am relevantesten erhöhten Marker wurden als DG(32:0) und DG(34:0) identifiziert. Erhöhte DGs in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen konnten in einem weiteren unabhängigen Versuch durch Profiling der Lipidklasse bestätigt werden. Das Spektrum so identifizierter DG-Spezies stimmt überwiegend mit dem unterschiedlicher Säugetierzellen bzw. -gewebe überein (Lee et al. 1991; Laurin et al. 1998; Li et al. 2007; Leiker et al. 2011; Lanekoff et al. 2016). Die Häufigkeitsverteilung der DG-Spezies unterscheidet sich jedoch zwischen den verschiedenen Zell- und Gewebetypen. So machten die gesättigten DG-Spezies DG(32:0), DG(34:0) und DG(36:0), anders als z.B. in murinen Lymphozyten (siehe Kap. 5.2.3), in Makrophagen aus murinem Knochenmark (Leiker et al. 2011) oder in menschlichen Neuroblasten (Lee et al. 1991), in murinen E8.5-Embryonen den Großteil der Gesamt-DGs aus (**Abb. 8 a**). Dies spricht für eine hohe in den Embryonen stattfindende *de novo* DG-Biosynthese (Segeer et al. 2016). Doch auch weitere Stoffwechselwege wie z.B. Phospholipase D vermittelter Abbau gesättigter PCs (Hodgkin et al. 1998) oder Sphingomyelin (SM)-Synthese können zur Bildung gesättigter DG-Spezies führen.

In *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen fanden sich erniedrigte Level unterschiedlicher PC-Spezies (**Abb. 8 b**), deren Zusammensetzung der verschiedener Säugetier-

zellen bzw. -gewebe ähnelt (Takamura et al. 1986; Lee et al. 1991; Booker et al. 1992; Isaac et al. 2003).

Das detektierte Spektrum an TG-Spezies sowie im Großen und Ganzen auch das Muster ihrer Häufigkeitsverteilung stimmten mit Literaturangaben aus Rattenmyokard (Han & Gross 2001) bzw. menschlichem Blut (Gao et al. 2017) überein. Die meisten TG-Spezies waren in *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen gegenüber Wildtyp-Embryonen erhöht (**Abb. 8 c**). Einige, auffälligerweise die gesättigteren Spezies gleicher Gesamtkettenlänge, waren in PGP-inaktivierten Embryonen jedoch erniedrigt (durch blaue Signifikanzangabe hervorgehoben). Trotz dieser Unterschiede zwischen den molekularen TG-Spezies war ihre Summe in *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen insgesamt ~1.25-fach gesteigert (**Abb. 8 d**).

Mit einer unabhängigen, auf enzymatischer Quantifizierung beruhenden, Versuchsreihe konnten diese Ergebnisse für PCs und TGs von Dr. Gabriela Segerer bereits bestätigt werden. Darüber hinaus wurden durch eine Lipidtröpfchenfärbung 26.4 % an *Pgp^{D34N/D34N}-mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) aus E8.5-Embryonen mit durchschnittlich 47.8 Lipidtröpfchen/Zelle markiert, während an *Pgp^{WT/WT}*-MEFs nur 22 % mit 35.8 Lipidtröpfchen/Zelle markiert wurden (Segerer et al. 2016).



c siehe nächste Seite

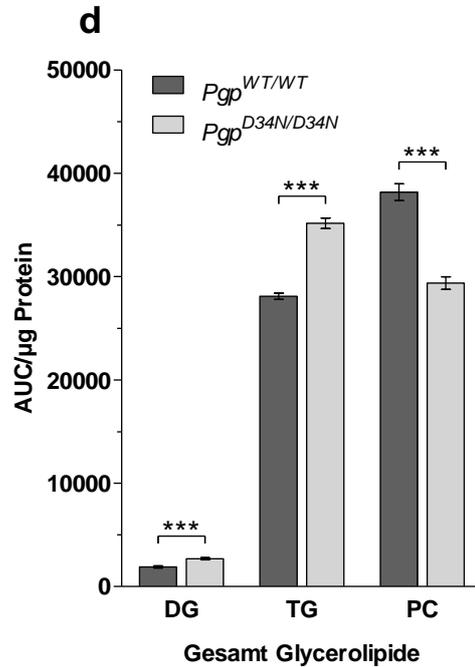
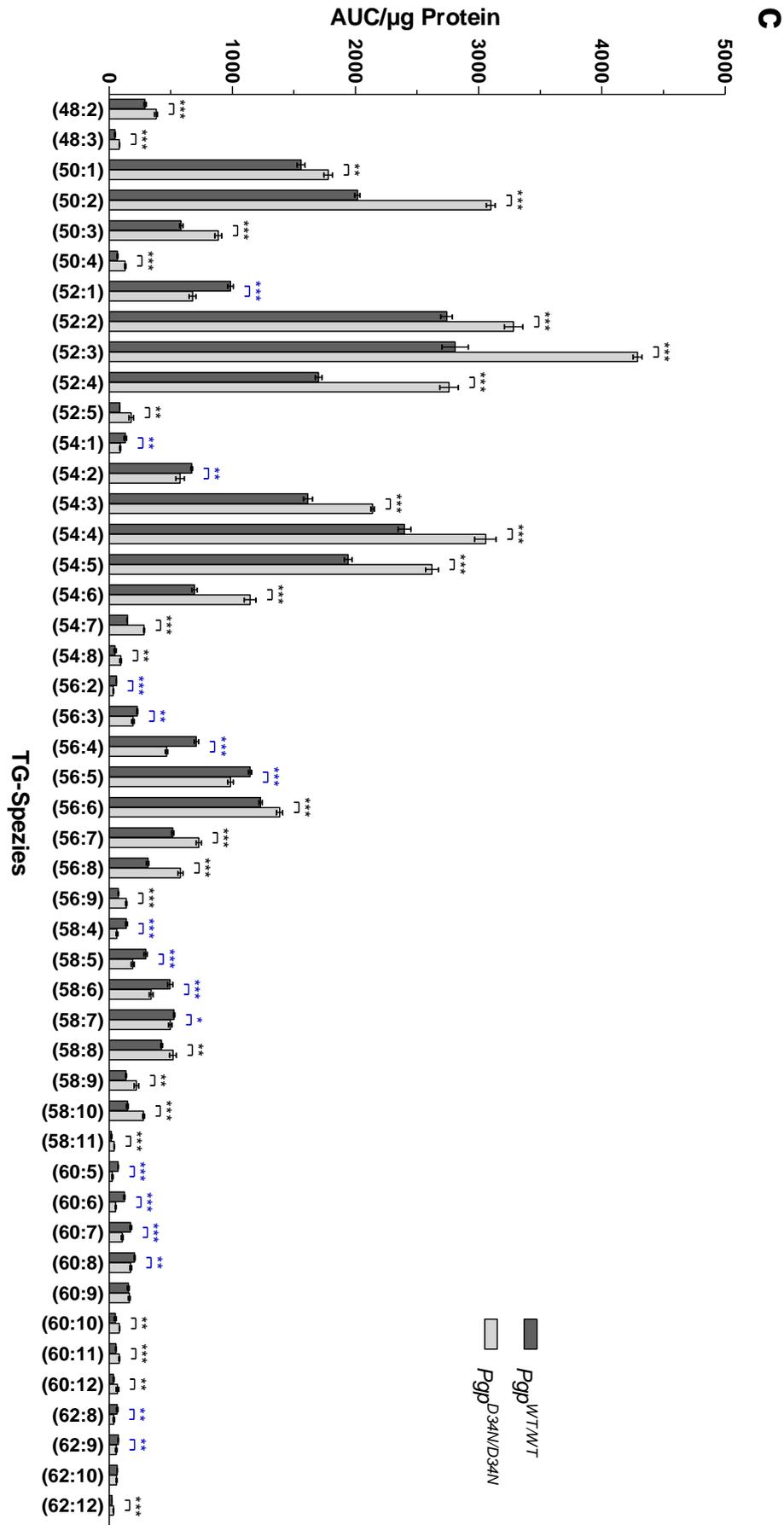


Abbildung 8: PGP-Inaktivierung beeinflusst Glycerolipidlevel in E8.5-Embryonen. UPLC-qTOF-MS-basierte Bestimmung einzelner Diacylglycerin (DG)-Spezies (a), Phosphatidylcholin (PC)-Spezies (b), Triacylglycerin (TG)-Spezies (c) in Lipidextrakten aus 10 gepoolten E8.5-Embryonen pro Genotyp. Zusammenfassend zeigt (d) jeweils die gesamte Glycerolipidklasse als Summe der in (a)-(c) abgebildeten Spezies. Das Profiling der Lipide erfolgte im positiven ESI-Modus gemäß ihrer bevorzugten Ionisation (TGs und DGs als NH_4 -Addukt, PCs in protonierter Form). Es sind die auf die Proteinmenge normalisierten Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) von 3 technischen Replikaten \pm Standardabweichung dargestellt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$



Sphingomyeline (SMs) sind die häufigsten Sphingolipide (Voet et al. 2016) und ein wichtiger Bestandteil von Membranen eukaryotischer Zellen. Abhängig vom untersuchten Gewebe machen sie 2-15 % aller Phospholipide aus (Koval & Pagano 1991).

Anders als die Glycerolipide besitzt SM als Sphingolipid kein G3P-Rückgrat. Es besteht aus einem Ceramid und Phosphorylcholin (**Abb. 9 a**) und ist damit das Analogon zum Glycerolipid Phosphatidylcholin.

Das Ceramid besteht wiederum aus einem Sphingoid, meist Sphingosin, das über eine Amidbindung mit einem Fettsäurerest verbunden ist. Der Fettsäurerest ist typischerweise gesättigt oder einfach ungesättigt und besteht meist aus 16 bis 24 Kohlenstoffatomen (Ramstedt & Slotte 2002).

Da eine vermehrte SM-Synthese eine Erklärung für die erniedrigten PC-Spiegel darstellen könnte, wurden die Messdaten auf SMs untersucht. SM wird von der Sphingomyelin-Synthase (SMS) aus PC und Ceramid unter Entstehung von DG gebildet. Die häufigste SM-Spezies in murinen E8.5-Embryonen war SM(d34:1) (**Abb 9 b**). Dies trifft auch für die SM-Analyse von Eigelb zu (Ramstedt et al. 1999). Für sieben der neun detektierten SM-Spezies ergab der t-Test (*unpaired, two-tailed*) signifikante Unterschiede. Nach Addition der Peakflächen aller SM-Spezies ergaben sich für die Gesamt-SMs ~1.3-fach höhere Level in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen (**Abb. 9 c**). Während das detektierte Gesamt-SM in WT-Lymphozyten ~27.1 % des Gesamt-PC-Spiegels ausmacht, kommt es in *Pgp*^{WT/WT}-Embryonen nur auf einen Anteil von 5.6 %. Möglicherweise ist die SM-Synthese in diesem Entwicklungsstadium noch limitiert. Vor ihrer Implantation konnten in murinen Embryonen (Morula- und Blastozystenstadium) mittels Dünnschichtchromatographie von mit [Methyl-³H]-Cholin markierten Lipiden noch keine Sphingomyeline detektiert werden (Pratt 1980).

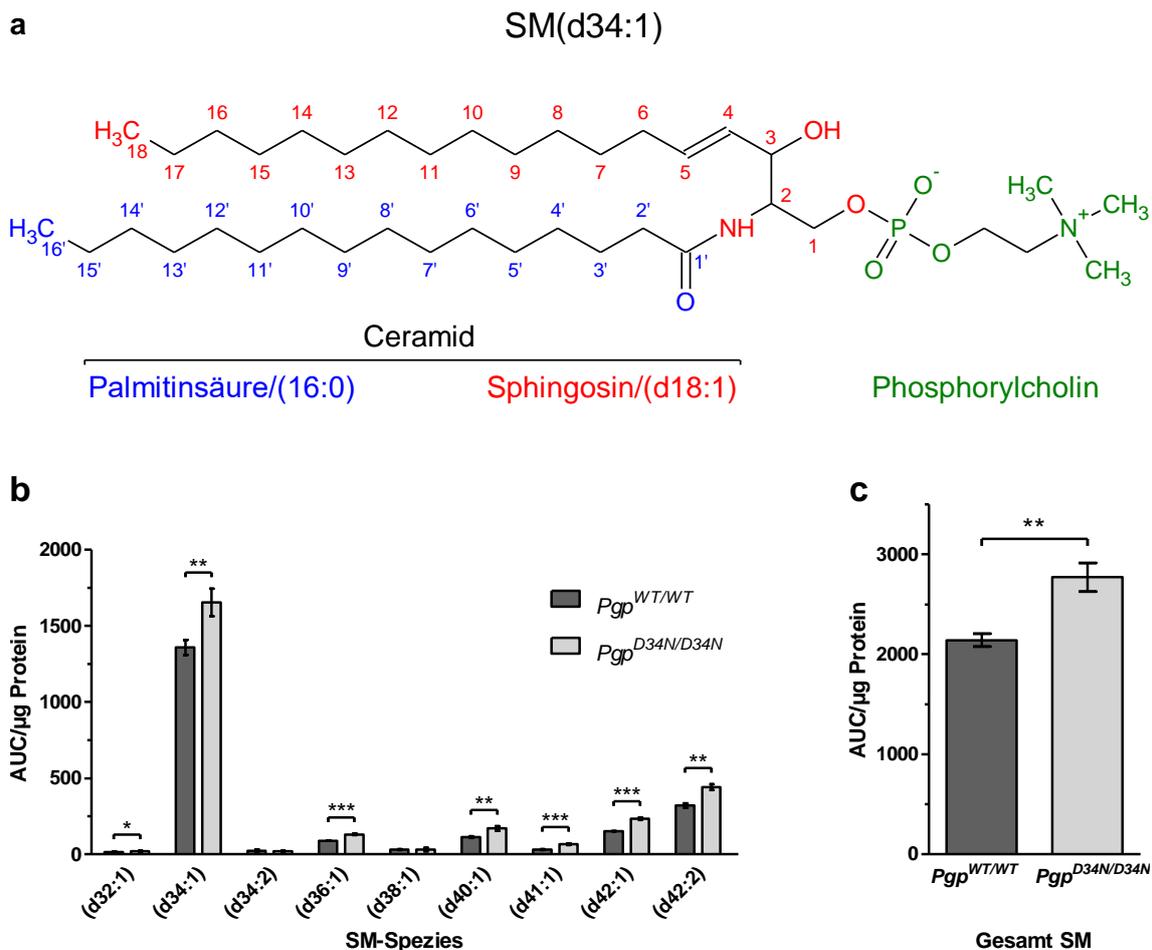


Abbildung 9: Sphingomyeline in murinen E8.5-Embryonen.

(a) zeigt den Aufbau der SMs am Beispiel von SM(d18:1/16:0) oder kurz SM(34:1). SMs bestehen aus einem Ceramid und Phosphorylcholin (grün). Das Ceramid setzt sich wiederum aus einem Sphingoid und einer FS zusammen. Als häufigstes Sphingoid ist in Rot Sphingosin oder kurz (d18:1) gezeigt. In Blau ist der Rest der Palmitinsäure oder kurz (16:0) gezeigt. Die Kohlenstoffatome von Sphingosin sind von 1-18, die der Palmitinsäure von 1'-16' durchnummeriert. (b) zeigt die UPLC-qTOF-MS-basierte Bestimmung einzelner SM-Spezies in Lipidextrakten aus 10 gepoolten E8.5-Embryonen pro Genotyp. Die Detektion erfolgte im positiven ESI-Modus in protonierter Form. (c) zeigt das Gesamt-SM als Summe der einzelnen SM-Spezies. Es sind die auf die Proteinmenge normalisierten Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) von 3 technischen Replikaten \pm Standardabweichung dargestellt. d = dihydroxy. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5.2 Auswirkungen der PGP-Inaktivierung in Endothelzellen und in Zellen des hämatopoetischen Systems

5.2.1 $Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}$ -Mäuse sind lebensfähig

Die in hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen von $Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}$ -Mäusen Tie2-assoziiert heterozygot exprimierte *cyclization recombinase* (Cre) führt zur Exzision des von loxP-Stellen flankierten Wildtyp- Pgp ($Pgp^{flx/flx}$), sodass nur PGP-inaktiviertes Pgp^{D34N} exprimiert wird. Unter Verwendung von genomischer DNA aus Lymphozyten wurde dies durch Allel-spezifische PCR bestätigt (Segerer 2015). Die PGP-Inaktivierung in $Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}$ -Mäusen konnte durch Analyse der Phosphatase-Aktivität in Erythrozytenlysaten nachgewiesen werden (Segerer et al. 2016). Dennoch waren Mäuse, deren PGP gezielt in Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen inaktiviert wurde, im Gegensatz zu ganzkörperinaktivierten $Pgp^{D34N/D34N}$ -Mäusen lebensfähig. Sie zeigten keine Hämorrhagien und glichen $Pgp^{flx/flx}$ -Mäusen hinsichtlich Überlebensfähigkeit, Wachstum und Fruchtbarkeit. Dies deutet darauf hin, dass die vitale Bedeutung der PGP nicht ihrer Funktion in Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen zukommt, sondern der in einem anderen Gewebe. Die Verpaarung von $Pgp^{flx/flx}$ -Mäusen mit $Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}$ -Mäusen führte erwartungsgemäß wiederum und im gleichen Verhältnis zu $Pgp^{flx/flx}$ - und $Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}$ -Nachkommen. Sie wurden wie in Kapitel 4.2 beschrieben genotypisiert.

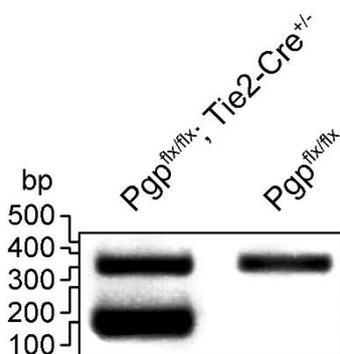


Abbildung 10: PCR- und Agarose-Gelelektrophorese-basierte Genotypisierung. Die 324 bp-Bande diente der Positivkontrolle. $Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}$ -Mäuse wurden anhand der 100 bp-Bande identifiziert.

5.2.2 Keine erhöhte G3P-Konzentration in PGP-inaktivierten Lymphozyten ohne metabolische Überflussbedingungen

Neuen Erkenntnissen zufolge fungiert die PGP auch als spezifische G3P-Phosphatase und PGP-Überexpression führt in Hepatozyten der Ratte zu erniedrigten G3P-Spiegeln, während es durch PGP-Knockdown und unter gesteigertem Glukoseangebot (25 mM) zu erhöhten G3P-Spiegeln kommt (Mugabo et al. 2016). Zudem wurden in PGP-inaktivierten E8.5-Embryonen signifikant erhöhte G3P-Spiegel registriert (Segeer et al. 2016). Um zu untersuchen, ob die PGP-Aktivität auch in weiteren Geweben Auswirkungen auf die G3P-Spiegel hat, wurden sie PGP-abhängig in Lymphozyten adulter Mäuse bestimmt. Die Isolierung der Lymphozyten aus der Milz von *Pgp^{flx/flx}*- bzw. *Pgp^{flx/flx}; Tie2Cre^{+/-}*-Mäusen erfolgte unter Verwendung von 2 g/l (11.1 mM) Glukose enthaltendem RPMI-Zellkulturmedium. Über diese gebräuchliche Glukosekonzentration hinaus wurden die Lymphozyten keinem gesteigerten Glukoseangebot ausgesetzt und es erfolgte keine Inkubation. Vor diesem Hintergrund ergibt sich aus **Abb. 11 d** und **e** für *Pgp^{flx/flx}*-Mäuse eine absolute G3P-Konzentration von ~3.6 nmol/60 Mio. Zellen und für *Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}*-Mäuse von ~4.1 nmol/60 Mio. Zellen. Die Proteinbestimmung mittels BCA-Assay stimmte mit den manuell erhobenen Lymphozytenzahlen überein und ergab einen Proteingehalt von ~20 µg Protein/Mio. Lymphozyten. Für die auf die Proteinmenge bezogene G3P-Konzentration ergibt sich somit für *Pgp^{flx/flx}*-Mäuse ein Wert von ~3.0 nmol/mg Protein und für *Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}*-Mäuse von ~3.4 nmol/mg Protein. Etwas höhere G3P-Konzentrationen von ~5 nmol/mg Protein bzw. ~11 nmol/mg Protein bei einem Glukoseangebot von 5 mM bzw. 25 mM wurden in Hepatozyten von Ratten detektiert (Mugabo et al. 2016). Nach drei unabhängigen Versuchen zeigten sich in Lysaten PGP-inaktivierter Lymphozyten für das relativ geringe und nur während der Lymphozytenisolierung bestehende Glukoseangebot von 11.1 mM keine signifikant erhöhten relativen G3P-Konzentrationen (**Abb. 11 f**).

Mithilfe eines kommerziellen G3P Colorimetric Assay Kits (Biovision) konnte dieses Ergebnis mittlerweile von Dr. Gabriela Segerer bestätigt werden. Signifikant erhöhte G3P-Konzentrationen in $Pgp^{flx/flx}; Tie2Cre^{+/-}$ gegenüber $Pgp^{flx/flx}$ -Mäusen ergaben sich erst unter metabolischen Überflussbedingungen mit 20 mM Glukose (unpubliziert).

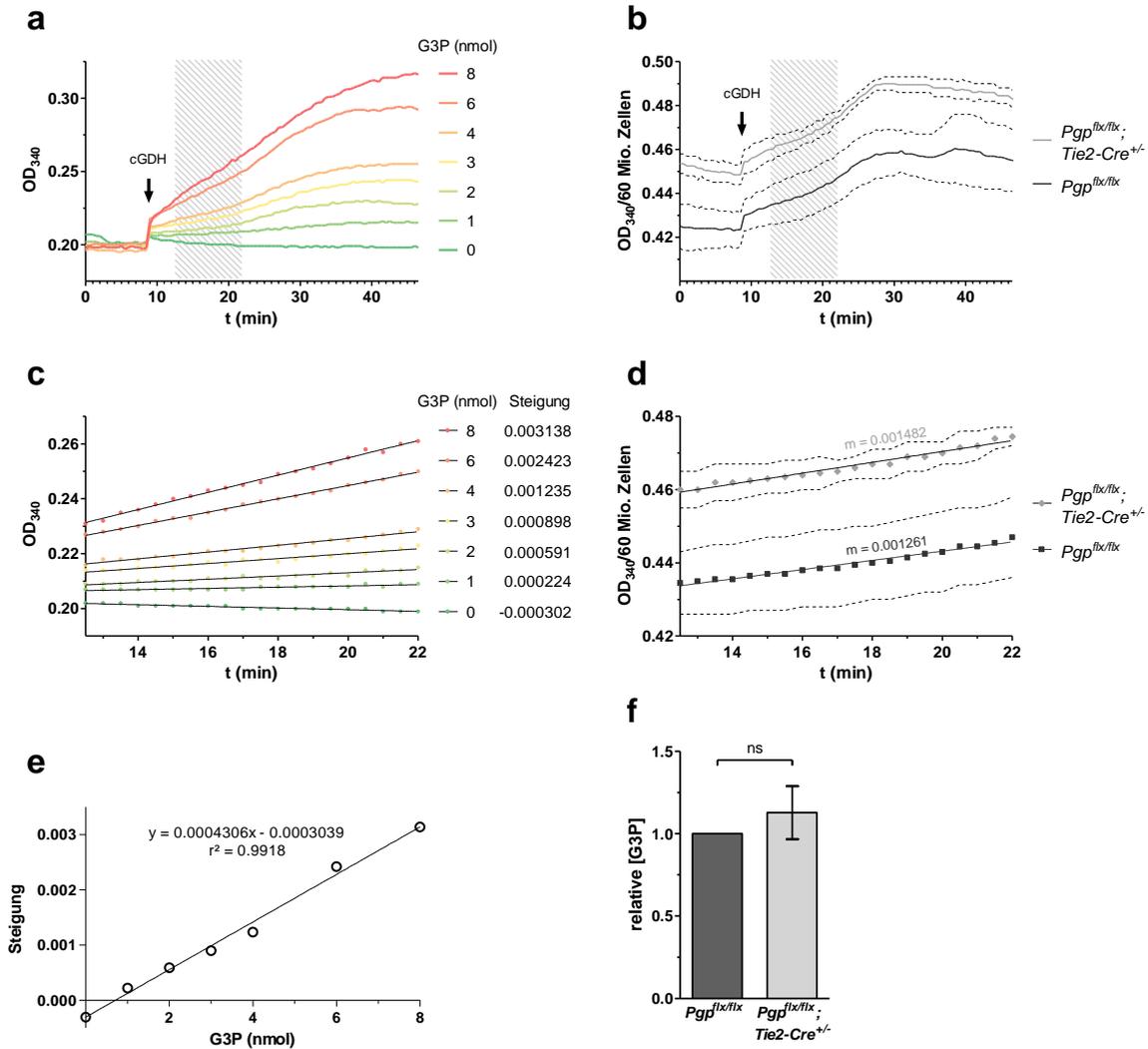


Abbildung 11: G3P-Assay.

Der Extinktionsverlauf der Verdünnungen für die Standardgerade (a) und der Lymphozytenproben (b) wurde über 9 min vor und 38 min nach Enzymzugabe aufgezeichnet. Aus 20 Messwerten ab 3 min nach Enzymzugabe (grau hinterlegter Bereich) wurde jeweils die Steigung ermittelt (c und d). Mithilfe der Standardgerade (e) wurde auf die G3P-Konzentration der Lymphozytenproben geschlossen. (f) zeigt die relative G3P-Konzentration in PGP-inaktivierten Lymphozyten nach drei unabhängigen Versuchen. ns = nicht signifikant.

5.2.3 DG-, PC-, TG- und SM-Level sind in PGP-inaktivierten Lymphozyten nicht signifikant verändert

Analog zu den Versuchen an E8.5-Embryonen ($Pgp^{WT/WT}$ und $Pgp^{D34N/D34N}$) wurden DG-, PC-, TG- und SM-Level auch in Lymphozyten von adulten $Pgp^{flx/flx}$ - bzw. $Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}$ -Mäusen bestimmt. Das Profiling der Lipidklassen erfolgte, obwohl nach *metabolite fingerprinting* keiner der identifizierten Marker diesen Lipidklassen angehörte. Somit war bereits zu erwarten, dass die Quantifizierung der Lipidspezies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen zeigt. In Übereinstimmung mit anderen Studien (Lee et al. 1991; Laurin et al. 1998; Li et al. 2007; Leiker et al. 2011; Lanekoff et al. 2016), aber anders als in E8.5-Embryonen, waren die Level ungesättigter DG-Spezies in Lymphozyten höher als die der gesättigten (**Abb. 12 a**), was für eine geringere ausgeprägte *de novo* Lipogenese in Lymphozyten spricht. DG(18:0/20:4) wird beispielsweise bei Phospholipase C (PLC)-vermitteltem Abbau des häufigsten Phosphatidylinositols PI(18:0/20:4) (Wood & Harlow 1969; Holub et al. 1970) gebildet und ist in Kardiomyozyten und in *N. ischiadicus*-Gewebeproben der Ratte als häufigste DG-Spezies beschrieben (Eskildsen-Helmond 1998; Zhu & Eichberg 1990). Auch das in Lymphozyten am häufigsten detektierte DG(38:4) könnte sich überwiegend aus DG(18:0/20:4) zusammensetzen.

Zwar zeigte der t-Test (*unpaired, two-tailed*) die Level für PC(28:0), PC(30:0), PC(32:0), PC(32:2) und PC(40:6) in $Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}$ -Mäusen als signifikant erniedrigt an (**Abb. 12 b**), für die Summe aller PC-Spezies ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (**Abb. 12 d**). TGs zeigten in PGP-inaktivierten Lymphozyten ähnliche Level wie in Wildtyp-Lymphozyten (**Abb. 12 c**).

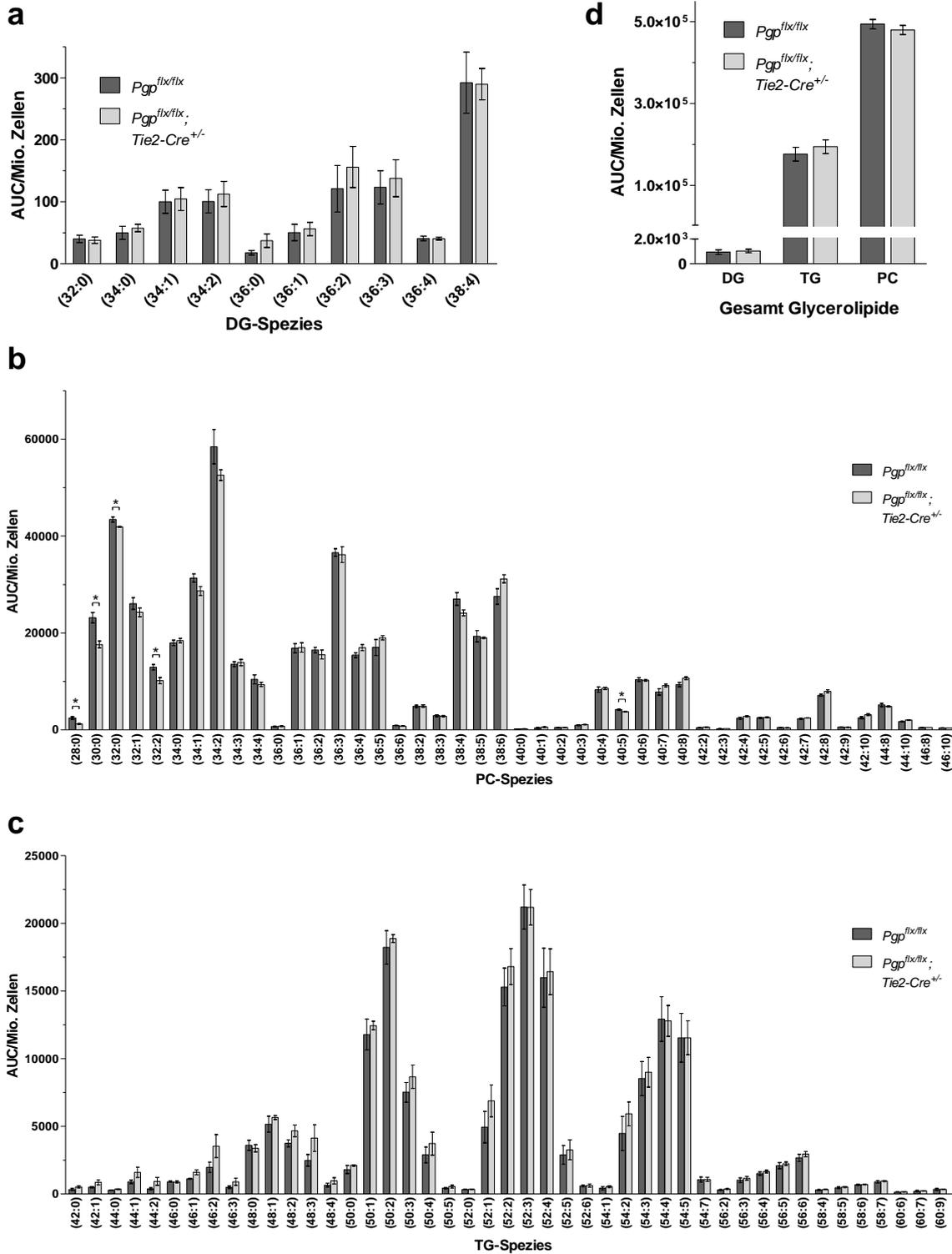


Abbildung 12: Kein relevanter Einfluss der PGP auf DG-, PC- und TG-Level in Lymphozyten. UPLC-qTOF-MS-basierte Bestimmung einzelner Diacylglycerin (DG)-Spezies (a), Phosphatidylcholin (PC)-Spezies (b), Triacylglycerin (TG)-Spezies (c) in Lipidextrakten aus Lymphozyten. Diese wurden aus den Lymphknoten von 3 Mäusen pro Genotyp isoliert. Zusammenfassend zeigt (d) jeweils die gesamte Glycerolipidklasse als Summe der in (a)-(c)

abgebildeten Spezies. Das Profiling der Lipide erfolgte im positiven ESI-Modus gemäß ihrer bevorzugten Ionisation (TGs und DGs als NH_4 -Addukt, PCs in protonierter Form). Es sind die auf die Zellzahl normalisierten Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) von 3 biologischen Replikaten \pm Standardfehler dargestellt. * $p < 0.05$

Auch die in E8.5-Embryonen gezeigte PGP-abhängige Beeinflussung der SMs, war in Lymphozyten nicht nachweisbar (**Abb. 13 a** und **b**). Während SM(d34:1) in murinen Embryonen die häufigste SM-Spezies war, kam SM(d42:2) in Lymphozyten etwas häufiger vor (**Abb. 13 a**). Unter der Annahme, dass Sphingosin (d18:1) das Sphingoid stellt, besteht die Fettsäure-Seitenkette von SM(d42:2) aus Nervensäure (24:1). In Rattenleber sind SMs mit Acylgruppen einer Länge von 24 Kohlenstoffatomen ebenfalls als häufigste molekulare SM-Spezies beschrieben (Tserng & Griffin 2003).

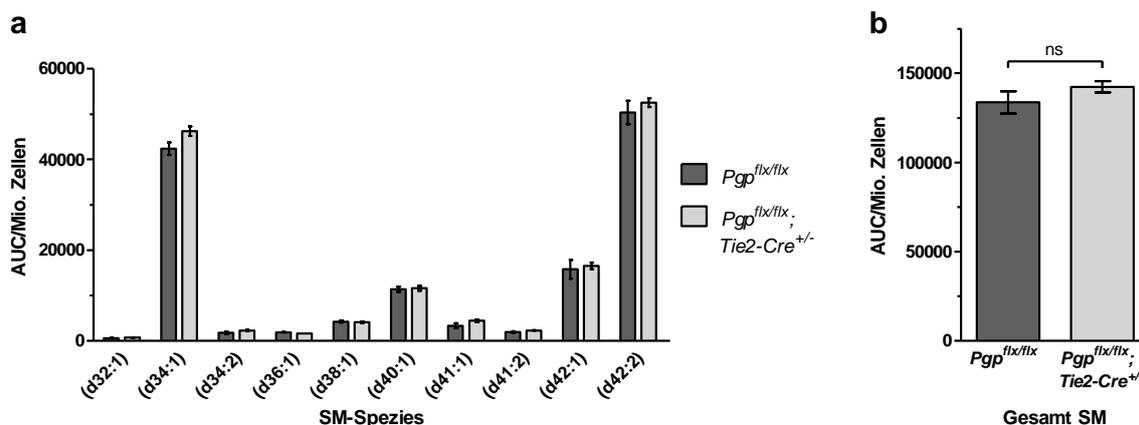


Abbildung 13: Sphingomyeline in murinen Lymphozyten.

(a) zeigt die UPLC-qTOF-MS-basierte Bestimmung einzelner SM-Spezies in 3 Lipidextrakten aus Lymphozyten pro Genotyp. Diese wurden aus den Lymphknoten von 3 Mäusen pro Genotyp isoliert. Die Detektion erfolgte im positiven ESI-Modus in protonierter Form. (b) zeigt das Gesamt-SM als Summe der einzelnen SM-Spezies. Es sind die auf die Zellzahl normalisierten Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) von 3 biologischen Replikaten \pm Standardfehler dargestellt. d = dihydroxy, ns = nicht signifikant.

5.2.4 Erhöhte Phosphatidylglycerin- und Cardiolipin-Level in PGP-inaktivierten Lymphozyten

Metabolite fingerprinting zeigte in PGP-inaktivierten Lymphozyten signifikant erhöhte Werte für die im negativen ESI-Modus detektierten und durch rt und m/z definierten Marker-Ionen 5.34_747.5182, 5.41_773.5338 und 7.17_724.4867. Elementarkompositionen ($C_{40}H_{76}O_{10}P$ und $C_{42}H_{78}O_{10}P$), Datenbankrecherche und Fragmentationsmuster für die ersten beiden Marker waren konform mit der jeweils deprotonierten Form von $PG^*(34:1)$ und $PG^*(36:2)$ bzw. ihren Isomeren Bis(monoacylglycero)phosphat ($BMP(34:1)$ und $BMP(36:2)$) (**Abb. 14**). Da sich PG^* s und BMP s aber chromatographisch trennen lassen (Hankin et al. 2015), wurden in einer gesonderten Messung PG^* - und BMP -Standards analysiert und um ~ 0.3 min geringere Retentionszeiten für BMP s festgestellt. In einer weiteren Messung aktivierter und mit 20 mM Glukose stimulierter Lymphozyten wurden Lipide gleicher Häufigkeitsverteilung unter Verwendung interner Standards eindeutig als PG^* s identifiziert (**Abb. 17 a**). Es ist deshalb davon auszugehen, dass es sich bei den ersten beiden Markern in ruhenden Lymphozyten und bei den anschließend durch Profiling detektierten 14 weiteren Ionen dieser Lipidklasse ebenfalls um PG^* s handelt.

Außerdem geben aktuelle Studien an Makrophagen für BMP s eine andere Häufigkeitsverteilung mit $BMP(36:2)$ als häufigster BMP -Spezies an, während $PG(34:1)$ in Übereinstimmung mit dieser Arbeit als häufigste PG^* -Spezies genannt wird (Luquain-Costaz et al. 2013). Acht der 16 PG^* -Spezies erwiesen sich in PGP-inaktivierten Lymphozyten als signifikant erhöht (**Abb. 15 a**). Insgesamt waren PG^* -Level in ruhenden Lymphozyten von $Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}$ -Mäusen ~ 1.8 -fach angehoben (**Abb. 15 b**).

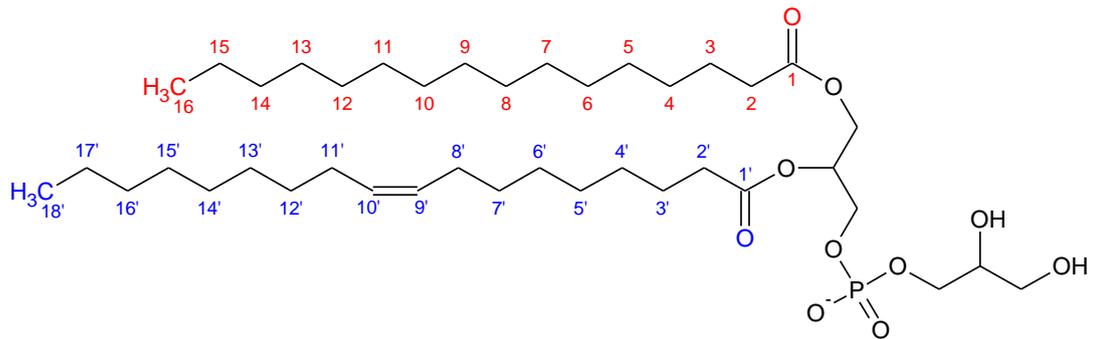
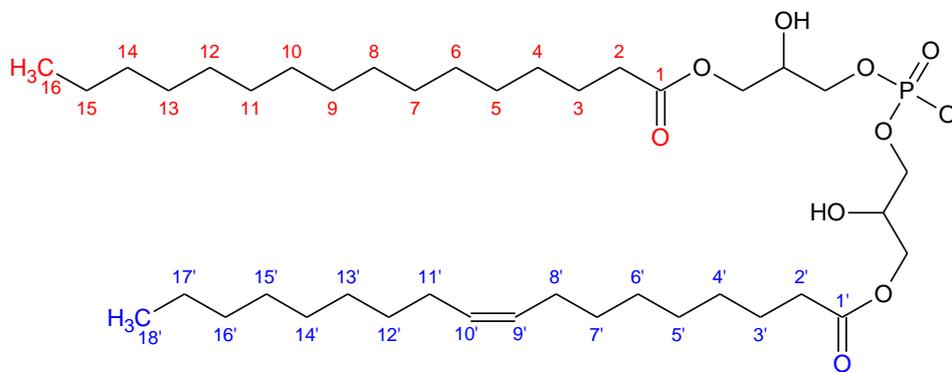
a**PG*(34:1)****b****BMP(34:1)**

Abbildung 14: Die Konstitutionsisomere PG*(34:1) und BMP(34:1).

PG*(34:1) (a) und BMP(34:1) (b) sind zwei Phospholipide mit unterschiedlichen Funktionen, aber gleicher Summenformel, gleicher Ladung und damit gleichem m/z . PG*s und BMPs unterscheiden sich durch die Positionen an ihren Glycerinmolekülen, mit denen die FS-Reste, hier Palmitoylrest (rot) und Oleylrest (blau), verestert sind.

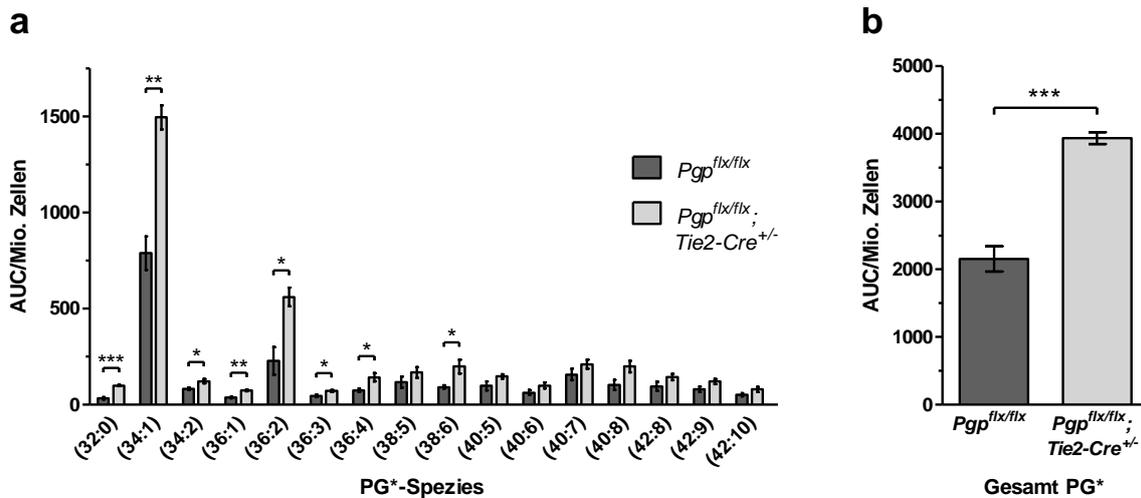


Abbildung 15: Phosphatidylglycerine (PG*s) in murinen Lymphozyten.

(a) zeigt die UPLC-qTOF-MS-basierte Bestimmung einzelner PG*-Spezies in 3 Lipidextrakten aus Lymphozyten pro Genotyp. Diese wurden aus den Lymphknoten von 3 Mäusen pro Genotyp isoliert. Die Detektion erfolgte im negativen ESI-Modus in deprotonierter Form. (b) zeigt das Gesamt-PG* als Summe der einzelnen PG*-Spezies. Es sind die auf die Zellzahl normalisierten Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) von 3 biologischen Replikaten \pm Standardfehler dargestellt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Die detektierten Ionen und Ihre Isotope ließen in den Massenspektren fast ausschließlich Muster mit ganzen m/z-Abständen zwischen einander erkennen, da der Großteil der in den Lipidextrakten enthaltenen Verbindungen nach ESI einfach geladen war. Eine Isotopenverteilung zweifach geladener Ionen weist dagegen halbe m/z-Abstände zwischen den Isotopen auf. Das Marker-Ion 7.17_724.4867 verfügte über ein solches Isotopenmuster mit halben m/z-Abständen (**Abb. 16 a**) und wurde als zweifach deprotonierte Form von CL(72:7) identifiziert. Durch Profiling der auf diese Weise ionisierten CLs konnten außer CL(72:7) keine weiteren Spezies detektiert werden. CL(72:7) war in PGP-inaktivierten Lymphozyten jedoch ~3.2-fach und signifikant erhöht (**Abb. 16 b**). Da für die UPLC-qTOF-MS-Messung dieser Lymphozytenproben der standardmäßige m/z-Erfassungsrahmen von 50-1200 voreingestellt war, die m/z einfach deprotonierter und damit einfach negativ geladener CLs jedoch jenseits

von 1200 liegen, konnte aus den Daten dieser Messung kein Profiling für CLs in dieser Ionisationsform durchgeführt werden. Deshalb wurde das nach UPLC-qTOF-MS-Messung noch verbleibende Probenvolumen mittels UPLC-MS-MS gezielt nach CLs untersucht. Außer für CL(74:6) waren die Unterschiede zwischen den Genotypen jedoch nicht signifikant (**Abb. 16 c**). Die Summe der CLs ergab für PGP-inaktivierte Lymphozyten gegenüber Wildtyp-Lymphozyten eine ~1.6-fache, insignifikante Erhöhung (**Abb. 16 d**).

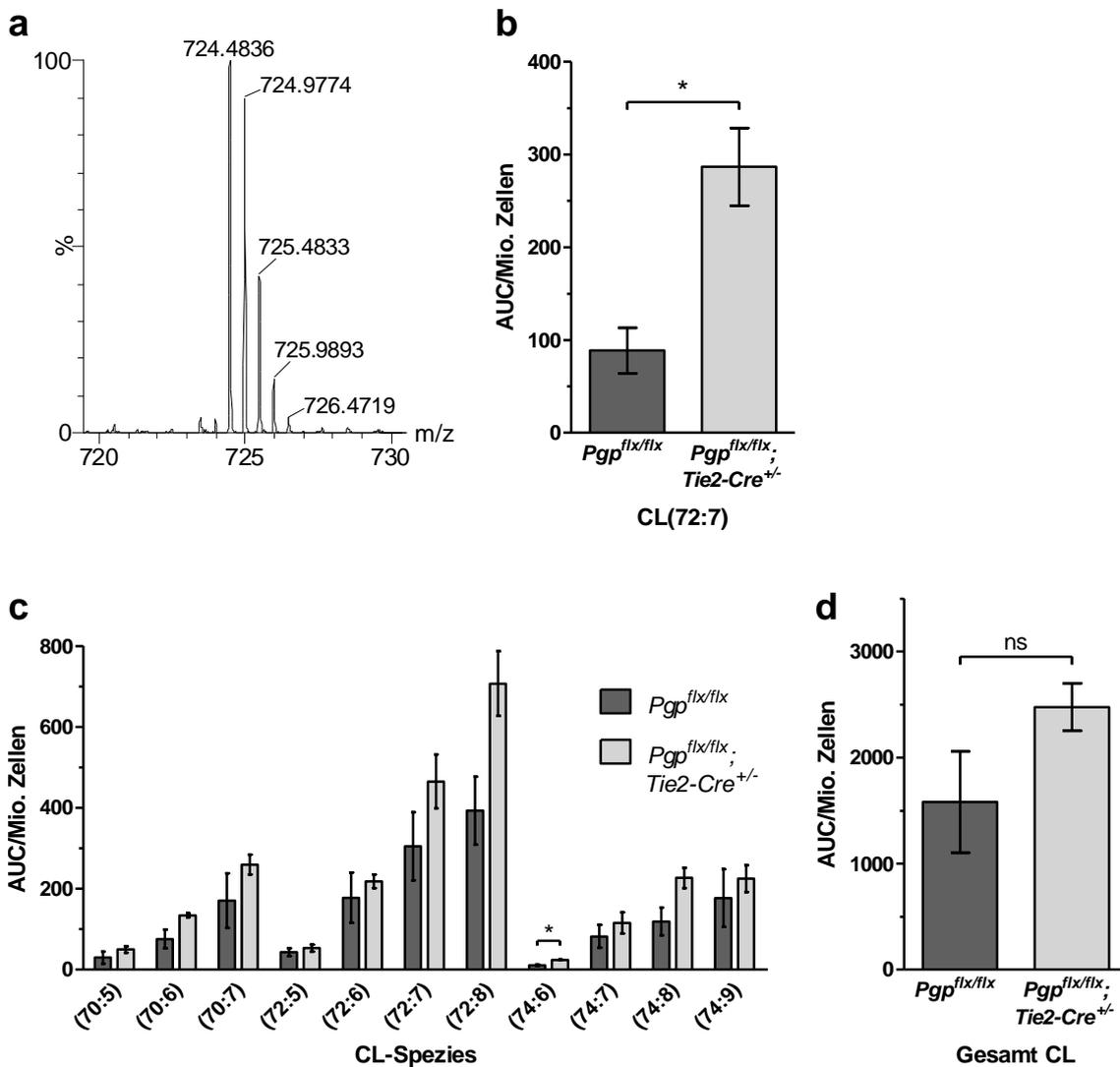


Abbildung 16: Cardiolipine (CLs) in murinen Lymphozyten.

(a) Das Massenspektrum von $rt = 7.17$ min zeigt das Marker-Ion mit $m/z = 724.4836$ (3 mDa Toleranz) und seine Isotope in PGP-inaktivierter Lymphozytenprobe Nr. 1 im negativen ESI-Modus. Typisch für doppelt geladenen Ionen ist die Isotopenverteilung in 0.5 m/z-Abständen. Auf der Y-Achse ist die Intensität in % angegeben; die X-Achse zeigt den m/z-Bereich von 720-730. (b) zeigt die UPLC-qTOF-MS-basierte Bestimmung des als zweifach deprotonierte Form von CL(72:7) identifizierten Markers in den Lipidextrakten der Lymphozyten von jeweils 3 Mäusen pro Genotyp. (c) zeigt die UPLC-MS-MS-basierte Bestimmung einzelner CL-Spezies aus den nach UPLC-qTOF-MS-Analyse übrigen Probenvolumina. Die Detektion erfolgte im negativen ESI-Modus in deprotonierter Form. (d) zeigt das Gesamt-CL als Summe der einzelnen CL-Spezies. Es sind die auf die Zellzahl normalisierten Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC) von 3 biologischen Replikaten \pm Standardfehler dargestellt. * $p < 0.05$, ns = nicht signifikant

Mit Lipidextrakten aus durch α -CD3- und α -CD28-Antikörper aktivierten und unter Zusatz von Glukose (20 mmol/l) inkubierten Lymphozyten wurde ein weiterer unabhängiger Versuch durchgeführt. Um CLs in einfach negativ geladener Form detektieren zu können, wurde der m/z-Erfassungsrahmen der UPLC-qTOF-MS-Messung auf 50-1500 erhöht. Die Messung erfolgte unter Einsatz der internen Standards 1,2-ditetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*sn*-glycerol) und 1',3'-bis-(1,2-ditetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho)-*sn*-glycerol, um die absoluten PG*- und CL-Spiegel quantifizieren zu können. Während sich für PG*-Spezies zwischen den Genotypen aktivierter und 20 mM Glukose ausgesetzter Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede ergaben (**Abb. 17 a**), waren unter diesen Bedingungen 7 der 13 detektierten CL-Spezies in Lymphozyten aus *Pgp^{flx/flx}; Tie2-Cre^{+/-}*-Mäusen signifikant erhöht (**Abb. 17 b**).

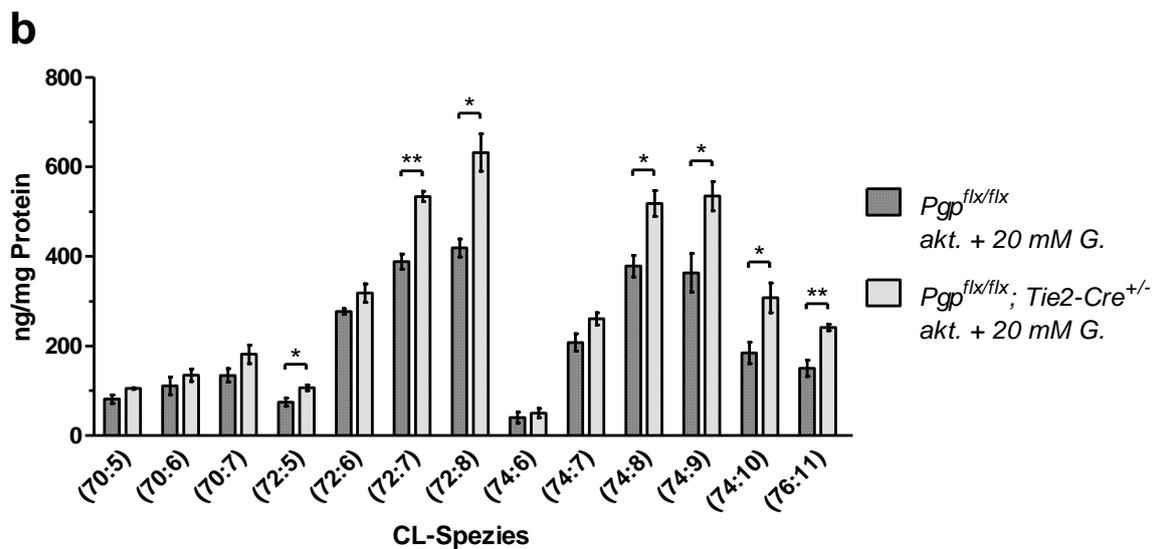
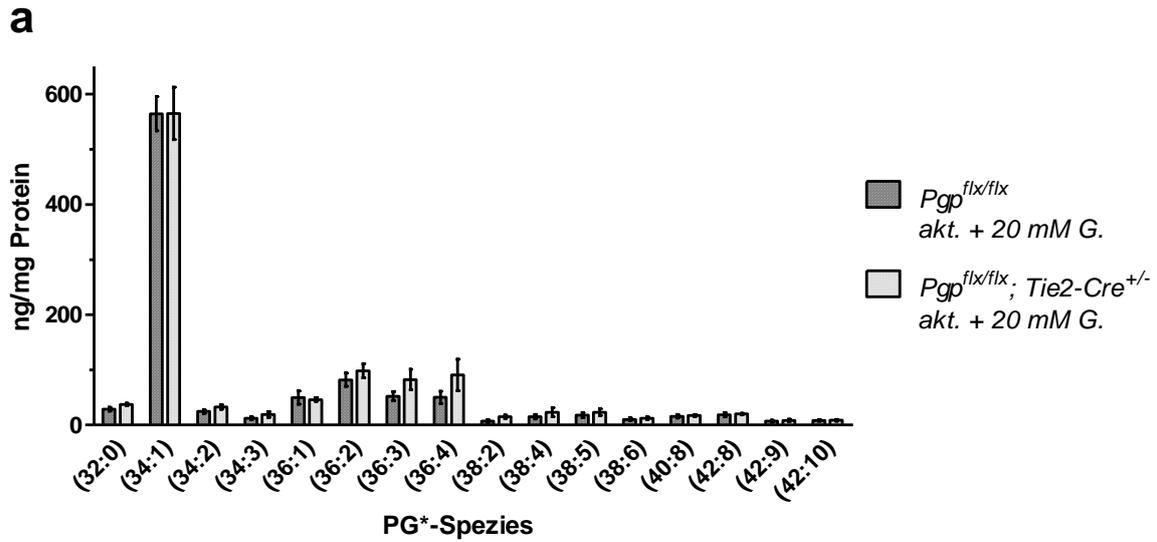


Abbildung 17: PGP-abhängige PG*- und CL-Spiegel in aktivierten Lymphozyten unter metabolischen Überflussbedingungen.

UPLC-qTOF-MS-basierte Bestimmung einzelner PG*- (a) und CL-Spezies (b) in 3 Lipidextrakten aus den Lymphozyten von jeweils 3 Mäusen pro Genotyp. Die Detektion erfolgte im negativen ESI-Modus in deprotonierter Form. Unter Verwendung interner Standards wurden PG*- und CL-Konzentrationen berechnet. Sie sind als Mittelwert von 3 biologischen Replikaten \pm Standardfehler dargestellt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

6 Diskussion

6.1 Glycero- und Sphingolipidlevel in E8.5- *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen

6.1.1 Wie lässt sich das aberrante Lipidmuster in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen erklären?

Die in PGP-inaktivierten Embryonen veränderten Lipidlevel decken neue Funktionen der PGP für die Regulation des Lipidmetabolismus auf. In Übereinstimmung mit Untersuchungen zur PGP an Hepatozyten der Ratte unter metabolischen Überflussbedingungen (Mugabo et al. 2016) traten DGs und TGs auch in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen vermehrt auf. Darüber hinaus waren PCs in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen erniedrigt (**Abb. 8 d**) und SMs erhöht (**Abb. 9 c**). Weitere Studien zur Rolle der PGP *in vivo* konnten bereits eine Hemmung der TPI und erhöhte G3P-Level in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen nachweisen (Segeer et al. 2016). Der erhöhte G3P-Spiegel lässt sich durch eine gesteigerte *de novo* Lipidsynthese mit den erhöhten Spiegel an DGs und TGs in Verbindung bringen (**Abb. 18**). Für eine in murinem embryonalen Gewebe stark ausgeprägte *de novo* Lipidbiosynthese durch *sn*-Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (GPAT) und *sn*-1-Acyl-glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (AGPAT) spricht zudem, dass hier im Wesentlichen die gesättigten DG-Spezies DG(32:0), DG(34:0) und DG(36:0) vorkamen.

Der GPAT1 aus der Gruppe der GPATs wird ein großer Einfluss auf die Regulation der TG-Synthese zugeschrieben. Das Enzym bevorzugt gesättigte Acyl-CoAs, insbesondere Palmitoyl-CoA, und katalysiert den Transfer des Fettsäurerestes an die *sn*-1 Position von G3P (Coleman & Mashek 2011; Yamashita et al. 2014). AGPATs übertragen einen Fettsäurerest auf die *sn*-2 Position von G3P und haben eine geringere Spezifität für Acylspender, darunter auch ungesättigte Acyl-CoAs. Nach Abspalten des Phosphatrests von PA durch Phosphatidat-Phosphatasen (PAPs) entstehen so neben gesättigten auch ungesättigte *sn*1,2-DGs, aus denen durch Diacylglycerin-Acyltransferasen

(DGATs) TGs oder z.B. PCs durch Diacylglycerin-Cholin-Phosphotransferasen (CPTs) synthetisiert werden können. TG-Synthese und -Speicherung werden durch vermehrte DGAT2-Expression gesteigert und der DGAT2 wird von den beiden DGATs in dieser Hinsicht eine größere Bedeutung zugeschrieben (Stone et al. 2004). In PGP-inaktivierten E8.5-Embryonen wurde gegenüber Wildtyp-Embryonen bereits eine erhöhte DGAT2-Expression nachgewiesen (Segeer et al. 2016). Dies könnte auf Kosten der PCs zu einer bevorzugten Umwandlung potentiell toxischer *sn1,2*-DGs in TGs führen und so die Lipidverteilung zwischen PCs und TGs modifizieren.

Es stellt sich jedoch die Frage, wie sich aus gesättigten DGs die auf den ersten Blick widersprüchliche Häufigkeitsverteilung zwischen den molekularen TG-Spezies in *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen mit erniedrigten Leveln gesättigterer TGs und erhöhten Leveln ungesättigterer TGs ergibt. Diese TG-speziesspezifischen Unterschiede sind möglicherweise auch auf die vermehrte DGAT2-Expression zurückzuführen. Als Akzeptormolekül dient der DGAT2 vorrangig *sn1,3*-DG, das an *lipid droplets* Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL)-vermittelt durch Abspaltung des Fettsäurerests an *sn2*-Position von TGs entsteht (Eichmann et al. 2012). Da die DGAT2 außer Endoplasmatisches Retikulum (ER)-Membran-assoziiert auch an *lipid droplets* vorkommt, deutet dies zusammen mit der Bevorzugung von *sn1,3*-DGs, wie von anderen Autoren bereits angenommen, auf ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen DGAT2 und ATGL hin, welches letztendlich ein TG-remodeling der *sn2*-Position bedeutet (Eichmann & Lass 2015). Da für die DGAT2 bisher noch keine Präferenz gegenüber Acyl-CoAs eines bestimmten Sättigungsgrads festgestellt wurde (Cases et al. 2001), GPAT- und AGPAT-vermittelt dem Acyl-CoA-Pool bei gesteigerter Lipogenese aber vermehrt gesättigte und einfach ungesättigte Acyl-CoAs entnommen und die entsprechenden Fettsäurereste mit den *sn1*- und der *sn2*-Positionen der G3Ps verestert werden (Coleman & Mashek 2011; Yamashita et al. 2014), könnte das TG-remodeling der *sn2*-Position mit der Zeit auf Kosten gesättigterer TGs zur Bildung ungesättigterer TGs führen. Der ATGL-/DGAT2-vermittelte Fettsäureumbau der TGs kann auch an *sn1*-Position erfolgen, die ursprünglich meist durch einen gesättigten Acylrest besetzt ist (Eichmann & Lass 2015).

Es sind weitere Studien erforderlich, um zu klären, ob auch andere Mechanismen mit in die Entstehung der veränderten Lipidmuster in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen (DG↑, PC↓, TG↑, SM↑) verwickelt sind. Das Muster selbst könnte jedoch als erstes Anzeichen dafür angesehen werden, dass auch ein vermehrter PC-Abbau stattfindet. PCs können Phospholipase A (PLA)-, Phospholipase B (PLB)-, Phospholipase C (PLC)-, Phospholipase D (PLD)-, Phosphatidylserin-Synthase (PSS)- oder SMS-vermittelt abgebaut werden (Fagone & Jackowski 2013). Die SMS katalysiert den Phosphocholin-Transfer von PC auf Ceramid, wodurch SM und DG gebildet werden (Taniguchi & Okazaki 2014). Erniedrigte PCs und erhöhte DGs und SMs in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen könnten also auch mit vermehrter SM-Synthese in Verbindung gebracht werden (**Abb. 18**).

Auch der PC-Abbau durch PC-PLC oder durch PLD kann die erniedrigten PC- und erhöhten DG-Spiegel verursacht haben. Während DGs bei PC-PLC-vermitteltem PC-Abbau direkt entstehen, können sie PLD- und PAP-vermittelt auch indirekt über PA als Zwischenprodukt entstehen. Da auch auf diese Weise Ca²⁺-unabhängig gebildetes sn1,2-DG wichtige Funktionen in der Signaltransduktion – u.a. über nPKCs – einnehmen kann, wäre es sinnvoll durch weitere Studien zu prüfen, ob die Aktivität von Effektorproteinen wie der PKC in PGP-inaktiviertem, embryonalem Gewebe erhöht ist.

Um zu klären, welche Mechanismen tatsächlich zu dieser Lipidverteilung führen, bzw. ob beschriebene und/oder mögliche noch unbekannte Faktoren alleinig oder gemeinschaftlich zu dieser Verteilung beitragen, sind weitere Studien erforderlich.

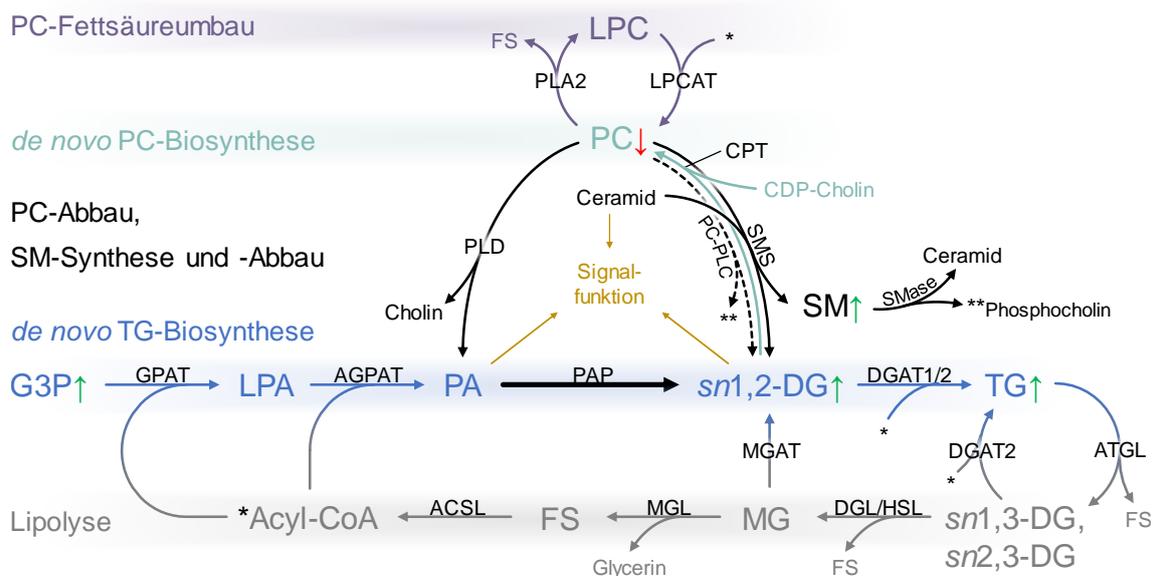


Abbildung 18: Stoffwechselwege, die zu dem Lipidmuster in PGP-inaktivierten Embryonen beigetragen haben könnten.

Details siehe Text. GPAT: sn-Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase, AGPAT: sn-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase, PAP: Phosphatidat-Phosphatase, DGAT: Diacylglycerin-Acyltransferase, ATGL: Adipozyten-Triglycerid-Lipase, DGL: Diacylglycerin-Lipase, HSL: Hormonsensitive Lipase, MGL: Monoacylglycerin-Lipase, MGAT: Monoacylglycerin-Acyltransferase, ACSL: Acyl-CoA-Synthetase (long-chain), CPT: Cholin-Phosphotransferase, PLA, PLC, PLD: Phospholipase A, -C, -D, LPC: Lysophosphatidylcholin, LPCAT: Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase, SMS: Sphingomyelin-Synthase.

6.1.2 Welche PGP-Aktivitäten sind vor dem Hintergrund der LC-MS-Ergebnisse von besonderer Bedeutung?

Für die PGP sind Aktivitäten gegenüber unterschiedlichen Substraten beschrieben worden, insbesondere gegenüber PG (Seifried et al. 2016), G3P (Mugabo et al. 2016) sowie P-Erythronat und P-Lactat (Collard et al. 2016) (siehe Kap. 1.3.1).

In *S. cerevisiae* konnten durch Knockout ihres Pgp-Orthologs, *Pho13*, erhöhte PG-Level detektiert werden (Bommer et al. 2016). In Säugern wurden PG-Konzentrationen bislang in PGP-inaktivierten HCT116-Zellen und Hepatozyten der Ratte untersucht. Dort wurden im Vergleich zu den jeweiligen WT-Zellen jedoch keine erhöhten PG-Konzentrationen detektiert. In Hepatozyten ermittelte PG-Konzentrationen lagen bei ~0.02 mM (Mugabo et al. 2016) und damit ~15-fach unter der K_M muriner PGP für PG ($K_M = 0.3 \pm 0.05$ mM) (Seifried et al.

2016). In murinen Embryonen wurden im Zusammenhang mit der PGP zwar noch keine PG-Konzentrationen bestimmt, PG wurde *in vitro* jedoch als *transition state*-Analogon und reversibler Inhibitor der TPI charakterisiert (Lolis & Petsko 1990; Schnackerz & Gracy 1991) und in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen konnte eine um ~34 % reduzierte Aktivität der PG-sensitiven TPI nachgewiesen werden (Segerer et al. 2016). Dieses glykolytische Enzym kontrolliert die Schnittstelle zwischen Glukose und Lipidmetabolismus und die Hemmung der TPI führt zu erhöhten Leveln an DHAP, dessen Bildung thermodynamisch bevorzugt wird (Ciriacy & Breitenbach 1979; Hollán et al. 1993; Shi et al. 2005; Orosz et al. 2006; Ralser et al. 2007). DHAP kann durch die GDH zu G3P reduziert werden, für das höhere Konzentrationen in Lysaten aus PGP-inaktivierten E8.5-Embryonen gefunden wurden (Segerer et al. 2016).

Die LC-MS-Ergebnisse der Embryoproben dieser Arbeit sprechen für eine unter PGP-Inaktivierung gesteigerte Lipogenese und ein größeres Lipogenese/Lipolyse-Verhältnis und lassen sich gut mit PG-vermittelter TPI-Hemmung und der resultierenden Umleitung des glykolytischen Flusses über DHAP und G3P hin zur Lipogenese in Einklang bringen. Die Ergebnisse könnten somit für eine physiologische Bedeutung der PGP-Aktivität gegenüber PG sprechen, obwohl in Säugetieren noch keine Klarheit über die Herkunft von PG herrscht und obwohl in den verschiedenen bisher untersuchten Gewebearten nur sehr niedrige PG-Konzentrationen von 4 bis 17 nmol/g vorliegen (Knight et al. 2012).

Vergleicht man die Aktivitäten muriner PGP gegenüber G3P und PG basierend auf ihren k_{cat}/K_M -Werten, so hat das Enzym gegenüber G3P eine ~92-fach geringere Aktivität. G3P-Konzentrationen sind gegenüber PG-Konzentrationen in Säugetieren jedoch vergleichsweise hoch und liegen, z.B. mit ~2 mM in Hepatozyten der Ratte, im Bereich des relativ hohen K_M -Werts muriner PGP für G3P ($K_M = 1.29$ mM) (Mugabo et al. 2016). Insofern kann auch die G3Pase-Aktivität der PGP von physiologischer Bedeutung sein und zu den veränderten Lipidleveln beigetragen haben, denn unter PGP-Inaktivierung erhöhte G3P-Level und eine gesteigerte Lipogenese lassen sich prinzipiell unmittelbar auf eine aufgehobene G3Pase-Aktivität zurückführen.

P-Erythronat und P-Lactat entstehen offenbar in Nebenreaktionen glykolytischer Enzyme und die katalytische Effizienz der PGP diesen Substraten gegenüber wird für vergleichbar mit der gegenüber PG gehalten (Collard et al. 2016). In HCT116-Zellen führte *Pgp*-Knockout durch Akkumulation von P-Erythronat zur Hemmung der 6PGDH, einem Enzym des Pentosephosphatwegs und durch Akkumulation von P-Lactat zur Hemmung der Glykolyse. Ein reduzierter metabolischer Fluss in diesen beiden Stoffwechselwegen ließe sich zwar mit einem folglich in Richtung Lipogenese umgeleiteten metabolischen Fluss in Verbindung bringen, nicht mit diesem Konzept in Einklang bringen lässt sich jedoch die Position innerhalb der Glykolyse, an der die Hemmung durch P-Lactat vermutet wird. Diese Hemmung könnte gemäß der Autoren über folgenden Mechanismus auf Höhe der PFK1 und damit noch vor der Abzweigung in Richtung Lipogenese stattfinden: Niedrige Fructose-2,6-bisphosphat-Level durch eine P-Lactat-vermittelte Hemmung der PFK2 könnten zu reduzierter Aktivität der glykolytischen PFK1 führen, da Fructose-2,6-bisphosphat ein allosterischer Regulator der PFK1 ist (Rider et al. 2004). Eine Hemmung der Glykolyse oberhalb der Abzweigung in Richtung Lipogenese widerspricht einer gesteigerten Lipogenese. Insofern muss es entweder weitere, bislang unbekannte Faktoren geben, die einen Zusammenhang zwischen der PGP-Aktivität gegenüber P-Lactat und den erhöhten G3P- und Lipidspiegeln herstellen können, oder die PGP-Aktivität gegenüber P-Lactat ist für die Entstehung der detektierten G3P- und Lipidlevel nur in geringerem Maße von Bedeutung.

6.1.3 Mögliche Effekte der aberranten Lipidzusammensetzung auf den Phänotyp PGP-inaktiverter Embryonen

Das Erscheinungsbild der Embryonen bei homozygoter PGP-Inaktivierung im gesamten Organismus wurde durch ein verzögertes Wachstum ab E8.5 und ihren bis E12.5 eintretenden Tod im Uterus dominiert. Ein klarer Kausalzusammenhang zwischen diesem Erscheinungsbild und den LC-MS-Ergebnissen ergibt sich bislang nicht. Für einige der untersuchten Lipidklassen

sind jedoch unterschiedliche Signalfunktionen beschrieben, die den Phänotyp möglicherweise beeinflussen.

DGs bestehen aus einem Glycerinmolekül, das über Esterbindungen mit zwei Fettsäuren verbunden ist. Neben ihrer Funktion als Intermediat des Lipidmetabolismus und Bestandteil biologischer Membranen dienen DGs auch als Second Messenger (Carrasco & Mérida 2007).

Die Signalfunktion beruht auf ihrer Bindung an Proteine, die eine sog. C1-Domäne aufweisen; cPKC- und nPKC-Isoenzyme beispielsweise beinhalten solche DG-sensitiven C1-Domänen (Almena & Mérida 2011). Durch die Bindung von DGs werden sie aktiviert, an Membranen verlagert und beeinflussen daraufhin durch Phosphorylierungen unterschiedliche Signalkaskaden (Eichmann & Lass 2015). Diese können Einfluss auf Proliferation und Differenzierung, Zellmotilität und das Überleben von Zellen haben (Isakov 2017). Ältere Studien zeigten, dass nur *sn1,2*-DG-Isoformen in der Lage sind, PKCs zu aktivieren (Rando & Young 1984; Boni & Rando 1985; Nomura et al. 1986). Außer in cPKC- und nPKC-Isoenzymen sind C1-Domänen mittlerweile auch in anderen DG-sensitiven Effektorproteinfamilien bekannt, darunter die der Proteinkinasen D (PKDs), der Chimerine, der *Mammalian uncoordinated homology* (Munc)13 und der Ras *guanyl-releasing proteins* (GRPs) (Almena & Mérida 2011). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass DG-vermittelte Signalkaskaden über ein oder mehrere Effektorprotein/e den Phänotyp begünstigt haben. Somit wäre es sinnvoll, in weiteren Studien den Zusammenhang zwischen PGP-assoziierter Lipidalteration und diesen Signalweg-Kandidaten detailliert zu untersuchen.

SMs bestehen aus einem Ceramid und einer Phosphocholin-Kopfgruppe und sind ein wichtiger Bestandteil von Membranen eukaryotischer Zellen. Abhängig vom untersuchten Gewebe machen sie 2-15 % aller Phospholipide aus (Koval & Pagano 1991). Durch Abbau von SM entsteht Ceramid, ein bioaktives Lipid und gleichzeitig Vorstufe anderer Signallipide wie Sphingosin-1-phosphat. Umgekehrt wird die Signaltransduktion bei der SM-Synthese aus Ceramid und PC reguliert, indem Ceramid-Level reduziert und DG-Level erhöht werden. Auf diese Weise können SMasen und SMSs wie ein Schalter zwischen

unterschiedlichen zellulären Signalen fungieren (Milhas et al. 2010). Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um zu klären, ob die SM-Akkumulation in *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen auf eine gesteigerte SM-Synthese oder einen verringerten SM-Abbau zurückzuführen ist und in welchem Ausmaß sich bioaktive Moleküle wie z.B. Ceramide nachweisen lassen. Denn mit der in dieser Arbeit beschriebenen Herangehensweise ließen sich Ceramide in Embryo- und Lymphozytenproben nicht sicher nachweisen. Möglicherweise liegt das daran, dass Ceramide in Mäusen nur in geringen Konzentrationen von je nach Gewebeart 50-250 pmol/mg vorkommen (Schiffmann et al. 2013).

Darüber hinaus interagiert SM mit Cholesterin (und anderen Sterinen), was zu einer Co-Lokalisierung von SM und Cholesterol und damit einer lateralen Heterogenität in Plasmamembranen führt (Slotte & Ramstedt 2007). Deshalb wird vermutet, dass Sphingolipide einschließlich SMs zusammen mit Cholesterin für die Bildung sog. *lipid rafts* verantwortlich sind (Simons & Ikonen 1997; Ramstedt & Slotte 2002). *Lipid rafts* sind kleine (< 200 nm), heterogene und dynamische Membrandomänen, die reich an Cholesterin und Sphingolipiden sind und eine funktionelle Plattform für die Regulation zellulärer Prozesse bilden. Direkte mechanistische Effekte von *lipid rafts* auf die Zellfunktion bzw. -dysfunktion sind jedoch unklar (Sezgin et al. 2017). Ob erhöhte SM-Level möglicherweise über *lipid raft*-vermittelte Reaktionen von physiologischer Bedeutung sind, muss deshalb in weiteren Studien geklärt werden.

Zellwachstum erfordert große Mengen an Phospholipiden, v.a. für die Expansion zellulärer Membranen (Liu et al. 2014). PC ist das häufigste Phospholipid aller Säugetierzelltypen und macht im Allgemeinen 40-50 % der gesamten zellulären Phospholipide aus (van der Veen et al. 2017). Somit könnten auch die erniedrigten PCs in *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen für eine unbeeinträchtigte embryonale Entwicklung limitierend sein.

6.2 Die metabolische Konstellation in Lymphozyten von *Pgp*^{flxflx}; *Tie2-Cre*^{+/-}-Mäusen

6.2.1 Wie lässt sich das Metabolitmuster in PGP-inaktivierten Lymphozyten erklären?

Aktuelle Studien, die die Auswirkungen der PGP-Inaktivierung in murinen Embryonen oder in HCT116-Zellen untersuchten, plädieren für einen verringerten glykolytischen Fluss in PGP-inaktivierten Zellen (Segerer et al. 2016; Collard et al. 2016).

Während sich eine Umleitung des metabolischen Flusses hin zur Lipogenese in *Pgp*^{D34N/D34N}-Embryonen in erhöhten G3P- (Segerer et al. 2016), DG- und TG-Leveln widerspiegelt, waren diese Metabolite in PGP-inaktivierten Lymphozyten unter Standardbedingungen (ohne gesteigertes Glukoseangebot) nicht signifikant erhöht. Auch für die PC- und SM-Level wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert. Dafür waren PG*-Level in ruhenden PGP-inaktivierten Lymphozyten signifikant auf das ~1.8-fache des WT-Mittelwerts angehoben. CLs waren ~1.6-fach erhöht, wobei dieser Unterschied, analysiert mit dem t-Test (*unpaired, two-tailed*), statistisch nicht signifikant war.

Als Erklärung für die hier gemessenen Metabolit-Level in ruhenden PGP-inaktivierten Lymphozyten (G3P→, DG→, TG→, PC→, SM→, PG*↑, CL[↑]) kommen folgende Ansätze infrage:

Obwohl PGP-abhängige G3P-Anstiege bereits nachgewiesen werden konnten (Mugabo et al. 2016; Segerer et al. 2016), kam es in ruhenden Lymphozyten womöglich deshalb nicht zu signifikant erhöhten G3P-Leveln, weil G3P in die PG*- bzw. CL-Synthese floss. Ältere Untersuchungen an Typ 2-Pneumozyten der Ratte folgerten bereits, dass sich die PG*-Synthese durch die intrazelluläre G3P-Konzentration regulieren lässt (Mason & Voelker 1988). In Säugetieren erfolgt die *de novo* PG*-Synthese ausgehend von CDP-DG in zwei Reaktionsschritten (**Abb. 19**). CDP-DG wird aus PA durch CDP-DG-Synthasen gebildet (Tamura et al. 2013) und an der inneren Mitochondrienmembran durch den PGP*-Synthase 1-vermittelten Austausch des CMP-Rests mit G3P in PGP* umgewandelt (Kawasaki et al. 2001). PGP* wird durch PGP*-Phosphatasen

rasch dephosphoryliert, wodurch PG* entsteht (El-Kouhen & Tremblay 2011; Claypool & Koehler 2012). CL wird an der inneren Mitochondrienmembran mittels CL-Synthase 1 durch die Zusammenführung von PG* und CDP-DG und die Abspaltung von Cytidinmonophosphat (CMP) gebildet (Houtkooper & Vaz 2008; Scherer & Schmitz 2011). Durch anschließendes Remodelling kommt es zur Modifikation der FS-Seitenketten und damit zur Bildung vorrangig ungesättigter CL-Spezies (Ye et al. 2016). Am CL-Abbau können unterschiedliche Phospholipasen beteiligt sein (Houtkooper & Vaz 2008), darunter die mitochondriale PLD, die bei der Hydrolyse von CL PA bildet (Choi et al. 2006). Prinzipiell könnten bei PLD-vermittelter Hydrolyse von CLs (vgl. CL-Spezies **Abb. 16 c** und **17 b**) auch PG*s entstehen, die nach CL-Remodelling erwartungsgemäß mehrfach ungesättigt wären. Da jedoch vorwiegend die wenig ungesättigten PG*-Spezies PG*(34:1) und PG*(36:2) detektiert wurden (**Abb. 15 a**), ist davon auszugehen, dass sie kein Abbauprodukt sind, sondern neu synthetisiert wurden. Auch die unter PGP-Inaktivierung erhöhten PG*-Spiegel beruhen demnach auf einer gesteigerten *de novo* PG*-Synthese (s.o.).

Möglicherweise wird PA in Lymphozyten und in sich entwickelnden Embryonen zu unterschiedlichen Anteilen in DG und CDP-DG portioniert und die CDP-DG-Synthese in Lymphozyten bevorzugt. Dies würde in Lymphozyten Substrat für die PG*- und CL-Synthese liefern und gleichzeitig erklären, warum hier PGP-abhängig kein signifikanter Unterschied des Gesamt-DG- und TG-Spiegels vorlag. In *Drosophila melanogaster* wird die Schnittstelle zwischen DG- und CDP-DG-Synthese durch die CDP-DG-Synthase (CDS) reguliert (Liu et al. 2014). Die Aufteilung könnte jedoch auch durch eine in Lymphozyten höhere DG-Kinase (DGK)-Aktivität bzw. durch eine niedrigere PAP-Aktivität beeinflusst werden.

Dass andere Ursachen für das Metabolitmuster ruhender, PGP-inaktivierter Lymphozyten verantwortlich sind, kann nicht ausgeschlossen werden. Auch eine gesteigerte Ether Glycerophospholipid-Synthese ausgehend von potentiell erhöhten DHAP-Leveln (**Abb. 19**) oder eine mGDH-vermittelte Nivellierung der

G3P-Spiegel im Rahmen des G3P-Shuttles könnten in Lymphozyten beispielsweise von Bedeutung sein.

Die Metabolitmuster in sich entwickelnden Embryonen und in Lymphozyten sprechen für verschiedene metabolische Konstellationen, die eine PGP-Inaktivierung unterschiedlich zur Geltung bringen. Durch Aktivierung durchlaufen T-Lymphozyten eine metabolische Umprogrammierung, die den glykolytischen Fluss und die Lactatproduktion steigert und auch die Produktion von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren erhöht (Maciolek et al. 2014). Diese Umprogrammierung wird „Warburg-Effekt“ genannt. Obwohl sich diese Bezeichnung ursprünglich auf die metabolische Transformation sich schnell teilender Krebszellen bezog (Warburg 1956), wurde mit dem Begriff in der Folge auch die metabolische Konstellation in anderen sich schnell teilenden Zellen beschrieben; darunter die in sich entwickelnden Embryonen (Redel et al. 2012; Krisher & Prather 2012) sowie die in proliferierenden Lymphozyten (Wang et al. 1976; Medzhitov 2015). Da PGP-inaktivierte Embryonen nicht lebensfähig waren und es PGP-abhängig zu einer Beeinflussung des Lipidmetabolismus kam, scheint die PGP unter „Warburg-Bedingungen“ von großer Bedeutung zu sein. Deshalb wurde das Lipidmuster in Lymphozyten mittels LC-MS auch nach Aktivierung mit α -CD3- und α -CD28-Antikörpern und 18-stündiger Inkubation in 20 mM Glukose untersucht.

Obwohl von Dr. Gabriela Segerer nach Inkubation mit 20 mM Glukose in PGP-inaktivierten Lymphozyten erhöhte G3P-Konzentrationen nachgewiesen wurden (unpubliziert), waren DG-, TG-, PC- und SM-Spiegel anders als in *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen jedoch nicht signifikant erhöht (nicht gezeigt). Die metabolische Konstellation in Lymphozyten konnte durch Aktivierung mit α -CD3- und α -CD28-Antikörpern und Inkubation mit 20 mM Glukose also nicht derart angepasst werden, dass die PGP hier zu einer Beeinträchtigung des Lipidmetabolismus mit ähnlich veränderten Lipidspiegeln wie in *Pgp^{D34N/D34N}*-Embryonen führt.

Während PG*-Spiegel in aktivierten Lymphozyten nach Inkubation mit 20 mM Glukose unter PGP-Inaktivierung gegenüber WT überraschenderweise unverändert waren, waren CLs signifikant erhöht. Dies spricht für eine gesteigerte CL-Synthese auf Kosten von PG*. Dass sich das Lipidmuster durch

Aktivierung und Inkubation mit 20 mM Glukose gegenüber dem ruhender Lymphozyten nur geringfügig veränderte und PG*-Level sogar auf WT-Niveau sanken, kann auch auf die durch T-Zell-Aktivierung induzierte Aktivität der mGDH zurückzuführen sein (Kamiński et al. 2012). Dadurch wird unter Reduktion von FAD zu FADH₂ G3P in DHAP umgewandelt und Elektronen von FADH₂ auf Coenzym Q übertragen (Mráček et al. 2013). Es wäre sinnvoll durch weitere Studien zu prüfen, ob dies in PGP-inaktivierten Lymphozyten womöglich zu erhöhten Spiegeln an Ether Glycerophospholipiden führt.

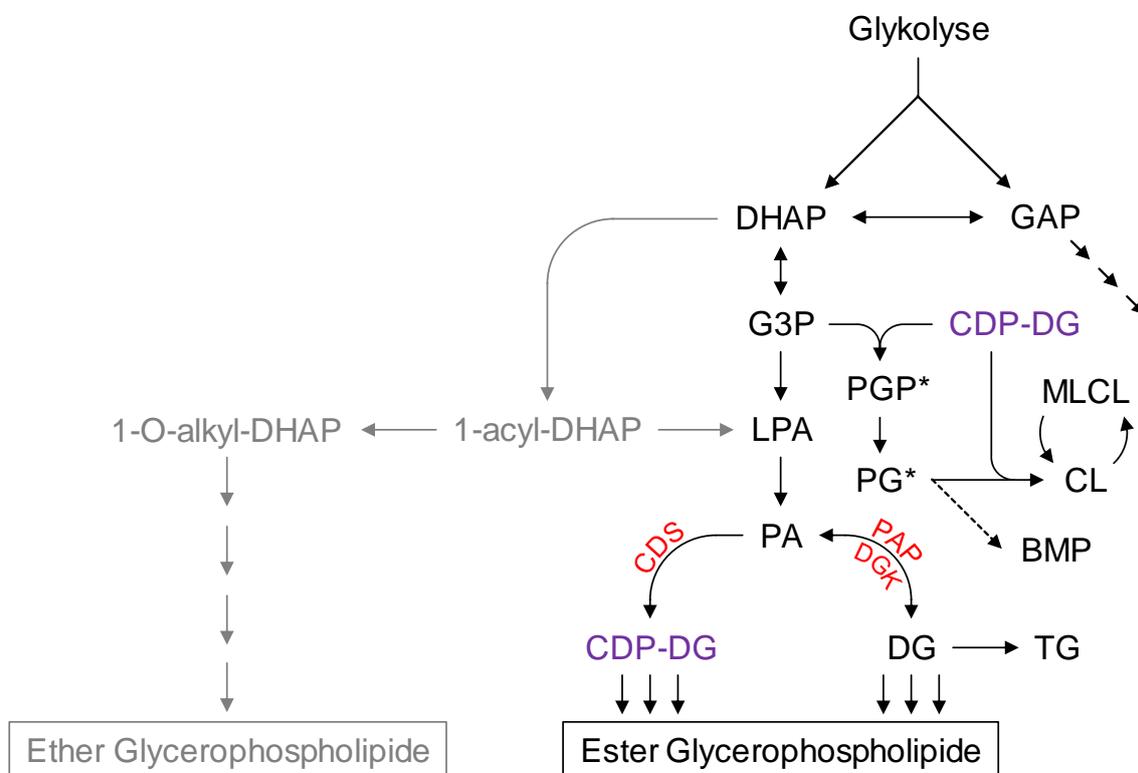


Abbildung 19: Stoffwechselwege, die zu dem Lipidmuster in PGP-inaktivierten Lymphozyten beigetragen haben könnten.

Details siehe Text. CDS: CDP-DG-Synthase, DGK: Diacylglycerin-Kinase, MLCL: Monolysocardiolipin, BMP: Bis(monoacylglycero)phosphat.

6.2.2 Mögliche Effekte erhöhter PG*- und CL-Level in PGP-inaktivierten Lymphozyten

Obwohl die anionischen Phospholipide CL und seine biologische Vorstufe PG* vergleichsweise geringe Anteile in Membranen ausmachen, so kommen sie dennoch in allen 3 Domänen des Lebens (Bakterien, Archaeen, Eukaryoten) vor; diese Tatsache deutet darauf hin, dass PG* und CL elementare biologische Funktionen erfüllen (Luévano-Martínez & Kowaltowski 2015; Furse 2017).

Die PG*-Erhöhung in ruhenden, PGP-inaktivierten Lymphozyten konnte in aktivierten und mit 20 mM Glukose stimulierten, PGP-inaktivierten Lymphozyten nicht reproduziert werden. Dennoch ist der Einfluss der PGP auf PG*-Level in ruhenden Lymphozyten ernst zu nehmen und muss durch weitere Studien untersucht werden. Möglicherweise heben die Aktivierung der Lymphozyten und die Stimulation mit 20 mM Glukose den Unterschied wieder auf, z.B. durch eine vermehrte CL-Synthese aus PG*.

PG* ist in Säugetieren mit einem Anteil von weniger als 1 % ein seltenes Phospholipid, das hauptsächlich in mitochondrialen und mikrosomalen Membranen lokalisiert ist (Morita & Terada 2015).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von Moesin, einem Mitglied der Ezrin-Radexin-Moesin (ERM)-Proteinfamilie, PG*-abhängig ist, dass die verantwortliche Moesin-Kinase die PKC- θ ist und dass die PKC- θ eine PG*-Präferenz aufweist (Pietromonaco et al. 1998). Dr. Gabriela Segerer detektierte in PGP-inaktivierten Lymphozyten eine erhöhte Aktivität der PKC und ein verstärktes Migrationsverhalten PGP-inaktivierter Lymphozyten. Letzteres fiel durch Hemmung der PKC- θ auf WT-Niveau zurück (Segerer 2015). Demzufolge könnten in PGP-inaktivierten Lymphozyten erhöhte PG*s über eine Aktivierung der PKC- θ zur Phosphorylierung von Moesin und Steigerung des Migrationsverhaltens der Lymphozyten führen. Denn die Proteine der ERM-Familie verbinden die Plasmamembran reversibel mit dem kortikalen Aktinnetzwerk und sind damit in der Lage, die Zellmigration zu beeinflussen (Parameswaran & Gupta 2013).

Außerdem könnten veränderte PG*-Spiegel Einfluss auf die Proliferation von Lymphozyten haben. In menschlichen Promyelozytenleukämiezellen (HL60-

Zellen) konnte gezeigt werden, dass bestimmte PG*-Spezies wie 1,2-Dioleoyl-PG* [PG*(36:2)] die nukleäre PKC- β_{II} aktivieren, die für den Eintritt der Zelle in die Mitose von großer Bedeutung ist (Murray & Fields 1998). In Keratinozyten der Maus wurde für die wenig ungesättigten PG*-Spezies PG*(34:1) und PG*(36:2) eine proliferative Wirkung auf Kosten der Zelldifferenzierung beschrieben; mehrfach ungesättigte PG*-Spezies wie PG*(36:4) hemmten hingegen die Proliferation der Keratinozyten (Xie et al. 2014). Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob die Lymphozytenproliferation PGP-abhängig beeinflusst wird. Es sind weitere Studien erforderlich, um zu klären, welche Rolle PG* in Abhängigkeit der PGP spielt.

CL (auch Diphosphatidylglycerin genannt) ist das Signaturphospholipid mitochondrialer Membranen und besitzt eine dimere Struktur bestehend aus zwei über ein Glycerinmolekül miteinander verbundenen Phosphatidatresten. Es macht in unterschiedlichen Geweben von Säugetieren 0.2–15 % aller Phospholipide aus und ist als mitochondriales Signaturlipid hauptsächlich auf die innere Mitochondrienmembran konzentriert (Morita & Terada 2015).

CL ist als stimulierender Cofaktor für mitochondriale Enzyme bekannt, darunter mGDH (Beleznai & Jancsik 1989) und Carnitin/Acylcarnitin-Translokase (Noël & Pande 1986) sowie Citrat-, Pyruvat- und ADP/ATP-Carrier (Bisaccia et al. 1990; Nalecz et al. 1986; Hoffmann et al. 1994).

Außerdem spielt CL eine wichtige Rolle für den Energiestoffwechsel, indem es die einzelnen Enzymkomplexe der Atmungskette stabilisiert und Cytochrom c, das Elektronen von Komplex III auf Komplex IV überträgt, im intermembranären Raum bindet (Houtkooper & Vaz 2008). Erhöhte CL-Level in PGP-inaktivierten Lymphozyten könnten aufgrund dieser Eigenschaften die mitochondriale ATP-Synthese begünstigen. PGP-abhängig wurde der ATP-Gehalt in Lymphozyten bislang zwar nicht untersucht, in PGP-inaktivierten Embryonen konnten gegenüber WT-Embryonen jedoch signifikant erhöhte ATP-Spiegel festgestellt werden (Segerer 2015). Hier ließen sich mittels LC-MS wiederum keine CLs detektieren.

Durch seine Assoziation mit Cytochrom c ist CL darüber hinaus mit mitochondrialen Apoptoseprozessen involviert: In Anwesenheit von ROS erlangt

der Cytochrom c-CL-Komplex durch eine Konformationsänderung eine CL-spezifische Peroxidase-Aktivität (Houtkooper & Vaz 2008). Die Oxidation von CL führt zu einem löslichen Cytochrom c-Pool, der durch Poren der äußeren Mitochondrienmembran ins Zytosol entweichen kann (Ott et al. 2002). Dort initiiert es die Bildung des Apoptosoms, das zur Aktivierung der Caspase-9 führt (Reubold & Eschenburg 2012). Ob und wie PGP-inaktivierte Lymphozyten durch CL-abhängige Funktionen beeinflusst werden, muss durch weitere Studien detailliert untersucht werden.

7 Zusammenfassung/Summary

7.1 Zusammenfassung

Die Phosphoglykolat-Phosphatase PGP (früher auch als AUM bezeichnet) wurde in unserem Labor als Mitglied der HAD-Typ-Phosphatasen identifiziert. Die genetische Inaktivierung des Enzyms im gesamten Mausorganismus führt ab E8.5 zu einer Wachstumsverzögerung muriner Embryonen und bis E12.5 schließlich zu deren Tod. Im Gegensatz dazu sind Mäuse mit einer PGP-Inaktivierung in hämatopoetischen Zellen und im Endothel lebensfähig und phänotypisch unauffällig. Neue Erkenntnisse schreiben dem Enzym neben einer Aktivität gegenüber Phosphoglykolat auch Aktivitäten gegenüber Glycerin-3-phosphat (G3P), P-Erythronat und P-Lactat zu. Da diese Phosphatase-Aktivitäten Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel nahelegen, wurde in der vorliegenden Arbeit mittels massenspektrometrischer Methoden der Einfluss der Phosphoglykolat-Phosphatase auf den Metabolismus von Signal-, Membran- und Speicherlipiden in murinen Embryonen und Lymphozyten untersucht.

Nach Inaktivierung der PGP im gesamten Organismus wurden in E8.5-Embryonen erhöhte Diacylglycerin (DG)-, Triacylglycerin (TG)- und Sphingomyelin (SM)-Spiegel gemessen, während niedrigere Phosphatidylcholin (PC)-Level vorlagen.

In PGP-inaktivierten Lymphozyten waren G3P-, DG-, TG-, PC- und SM-Level nicht verändert. Dafür kam es zu signifikanten Erhöhungen Phosphatidylglycerol (PG*)- und Cardiolipin (CL)-Spiegel.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die PGP in unterschiedlichen Geweben differenzielle Effekte auf die Spiegel verschiedener Lipide hat. Dies deckt neue Funktionen der PGP für die Regulation des Lipidmetabolismus auf. Die vorliegende Arbeit stellt somit die Grundlage für weitere Untersuchungen über die genauen Ursachen und Folgen dieser Regulation dar und lässt auf eine wichtige Rolle der PGP als metabolische Phosphatase im Organismus schließen.

7.2 Summary

Our laboratory has previously identified the mammalian phosphoglycolate phosphatase PGP (also referred to as AUM) as a member of the HAD-type superfamily of hydrolases. Whole-body PGP inactivation led to an intrauterine growth defect with developmental delay after E8.5, resulting in a gradual deterioration and death of *Pgp*^{D34N/D34N} embryos until E12.5.

In contrast, mice with a deficiency of PGP activity in endothelial and hematopoietic cells were viable and phenotypically normal.

Recent findings demonstrate catalytic activities of the PGP towards phosphoglycolate, glycerol-3-phosphate (G3P), P-erythronate and P-lactate. Since these catalytic activities suggest implications for the lipid metabolism, this thesis examined the PGP-dependent formation of signal-, membrane- and storage lipids in E8.5 embryos and adult lymphocytes of mice by means of mass spectrometry.

Following whole-body inactivation of PGP increased diacylglycerol (DG)-, triacylglycerol (TG)- and sphingomyeline (SM)-levels were detected in E8.5 embryos, whereas lower phosphatidylcholine (PC)-levels were present.

In PGP-deficient lymphocytes G3P-, DG-, TG-, PC- and SM-level were unaltered. However, levels of phosphatidylglycerol (PG*) and cardiolipine (CL) were significantly increased.

Taken together this thesis reveals new and tissue-dependent functions of PGP in the regulation of the lipid metabolism and indicates an important role of PGP as a metabolic phosphatase. It constitutes the basis for further studies on the exact roots and the physiological effects of the metabolic regulation by PGP.

8 Literaturverzeichnis

- Almena, M. & Mérida, I., 2011. Shaping up the membrane: Diacylglycerol coordinates spatial orientation of signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(11), pp.593–603.
- Ash, D.E., Goodhart, P.J. & Reed, G.H., 1984. ATP-Dependent Phosphorylation of α -Substituted Carboxylic Acids Catalyzed by Pyruvate Kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 228(1), pp.31–40.
- Badwey, J.A., 1977. Phosphoglycolate Phosphatase in Human Erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(7), pp.2441–2444.
- Bae, K.-H., Kim, W.K. & Lee, S.C., 2012. Involvement of protein tyrosine phosphatases in adipogenesis: New anti-obesity targets? *BMB Reports*, 45(12), pp.700–706.
- Bauwe, H., Hagemann, M. & Fernie, A.R., 2010. Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science*, 15(6), pp.330–336.
- Beleznai, Z. & Jancsik, V., 1989. Role of cardiolipin in the functioning of mitochondrial L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(1), pp.132–9.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2014. *Biochemie 7*. Aufl., Berlin: Springer Spektrum.
- Bertoncini, C.R.A. & Mene, R., 1995. DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleic Acids Research*, 23(15), pp.2995–3002.
- Bessman, M.J., Frick, D.N. & O'Handley, S.F., 1996. The MutT Proteins or "Nudix" Hydrolases, a Family of Versatile, Widely Distributed, "Housecleaning" Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), pp.25059–25062.
- Bisaccia, F. et al., 1990. Kinetic characterization of the reconstituted tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1019(3), pp.250–256.
- Blacklow, S.C. et al., 1988. Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. *Biochemistry*, 27(4), pp.1158–1165.
- Bollen, M. et al., 2010. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity.

- Trends in Biochemical Sciences*, 35(8), pp.450–458.
- Bommer, G., Baldin, F. & Van Schaftingen, E., 2016. Accumulation of metabolic side products might favor the production of ethanol in Pho13 knockout strains. *Microbial Cell*, 3(10), pp.495–499.
- Boni, L.T. & Rando, R.R., 1985. The nature of protein kinase C activation by physically defined phospholipid vesicles and diacylglycerols. *Journal of Biological Chemistry*, 260(19), pp.10819–10825.
- Booker, M.L. et al., 1992. Distribution of phosphatidylcholine molecular species between mixed micelles and phospholipid-cholesterol vesicles in human gallbladder bile: dependence on acyl chain length and unsaturation. *Journal of Lipid Research*, 33(10), pp.1485–1492.
- Van den Broeck, W., Derore, A. & Simoens, P., 2006. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *Journal of immunological methods*, 312(1–2), pp.12–9.
- Burkovics, P. et al., 2006. Human Ape2 protein has a 3'-5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs. *Nucleic Acids Research*, 34(9), pp.2508–2515.
- Burkovics, P. et al., 2009. Role of PCNA-dependent stimulation of 3'-phosphodiesterase and 3'-5' exonuclease activities of human Ape2 in repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 37(13), pp.4247–4255.
- Carrasco, S. & Mérida, I., 2007. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), pp.27–36.
- Cases, S. et al., 2001. Cloning of DGAT2, a Second Mammalian Diacylglycerol Acyltransferase, and Related Family Members. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), pp.38870–38876.
- Chen, B. et al., 2007. GC/MS Methods To Quantify the 2-Deoxypentose-4-ulose and 3'-Phosphoglycolate Pathways of 4' Oxidation of 2-Deoxyribose in DNA: Application to DNA Damage Produced by γ Radiation and Bleomycin. *Chemical Research in Toxicology*, 20(11), pp.1701–1708.
- Chen, M.J., Dixon, J.E. & Manning, G., 2017. Genomics and evolution of protein

- phosphatases. *Science Signaling*, 10(474), p.eaag1796.
- Chen, S. et al., 2013. Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1298, pp.9–16.
- Choi, S.-Y. et al., 2006. A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nature Cell Biology*, 8(11), pp.1255–1262.
- Ciriacy, M. & Breitenbach, I., 1979. Physiological effects of seven different blocks in glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 139(1), pp.152–160.
- Claypool, S.M. & Koehler, C.M., 2012. The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(1), pp.32–41.
- Coleman, R.A. & Mashek, D.G., 2011. Mammalian Triacylglycerol Metabolism: Synthesis, Lipolysis, and Signaling. *Chemical Reviews*, 111(10), pp.6359–6386.
- Collard, F. et al., 2016. A conserved phosphatase destroys toxic glycolytic side products in mammals and yeast. *Nature Chemical Biology*, 12(8), pp.601–607.
- Dougherty, T.M. & Cleland, W.W., 1985. pH studies on the chemical mechanism of rabbit muscle pyruvate kinase. 1. Alternate substrates oxalacetate, glycolate, hydroxylamine, and fluoride. *Biochemistry*, 24(21), pp.5870–5875.
- Eichmann, T.O. et al., 2012. Studies on the Substrate and Stereo/Regioselectivity of Adipose Triglyceride Lipase, Hormone-sensitive Lipase, and Diacylglycerol-O-acyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 287(49), pp.41446–41457.
- Eichmann, T.O. & Lass, A., 2015. DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol-stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(20), pp.3931–3952.
- El-Kouhen, K. & Tremblay, M.L., 2011. PTPMT1: Connecting cardiolipin biosynthesis to mitochondrial function. *Cell Metabolism*, 13(6), pp.615–617.

- Eskildsen-Helmond, Y., 1998. Phospholipid source and molecular species composition of 1,2-diacylglycerol in agonist-stimulated rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 40(1), pp.182–190.
- Fabbro, D., Cowan-Jacob, S.W. & Moebitz, H., 2015. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *British Journal of Pharmacology*, 172(11), pp.2675–2700.
- Fahy, E. et al., 2008. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *The Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), pp.S9–S14.
- Furse, S., 2017. Is phosphatidylglycerol essential for terrestrial life? *Journal of Chemical Biology*, 10(1), pp.1–9.
- Gabelli, S.B. et al., 2002. Mechanism of the Escherichia coli ADP-Ribose Pyrophosphatase, a Nudix Hydrolase †, ‡. *Biochemistry*, 41(30), pp.9279–9285.
- Gao, F. et al., 2017. Dynamic and temporal assessment of human dried blood spot MS/MSALL shotgun lipidomics analysis. *Nutrition & Metabolism*, 14(1), p.28.
- Hadi, M.Z. & Wilson, D.M., 2000. Second human protein with homology to the Escherichia coli abasic endonuclease exonuclease III. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36(4), pp.312–324.
- Han, X. & Gross, R.W., 2001. Quantitative Analysis and Molecular Species Fingerprinting of Triacylglyceride Molecular Species Directly from Lipid Extracts of Biological Samples by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 295(1), pp.88–100.
- Hankin, J.A. et al., 2015. Ion mobility and tandem mass spectrometry of phosphatidylglycerol and bis(monoacylglycerol) phosphate (BMP). *International Journal of Mass Spectrometry*, 378, pp.255–263.
- Hartman, F.C. et al., 1975. Influence of pH on the interaction of inhibitors with triosephosphate isomerase and determination of the pKa of the active-site carboxyl group. *Biochemistry*, 14(24), pp.5274–5279.
- He, R. et al., 2014. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(10), pp.1227–1246.

- Hermansson, M. et al., 2005. Automated Quantitative Analysis of Complex Lipidomes by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(7), pp.2166–2175.
- Hodgkin, M.N. et al., 1998. Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends in Biochemical Sciences*, 23(6), pp.200–204.
- Hoffmann, B. et al., 1994. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3), pp.1940–1944.
- Hohorst, H.-J., 1962. L-(—)-Glycerin-1-phosphat. In H.-U. Bergmeyer, ed. *Methoden der enzymatischen Analyse*. pp. 215–219.
- Hollán, S. et al., 1993. Hereditary triosephosphate isomerase (TPI) deficiency: two severely affected brothers one with and one without neurological symptoms. *Human Genetics*, 92(5), pp.486–90.
- Holub, B.J., Kuksis, A. & Thompson, W., 1970. Molecular species of mono-, di-, and triphosphoinositides of bovine brain. *Journal of Lipid Research*, 11(6), pp.558–564.
- Houtkooper, R.H. & Vaz, F.M., 2008. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(16), pp.2493–2506.
- Hummel, J. et al., 2011. Ultra Performance Liquid Chromatography and High Resolution Mass Spectrometry for the Analysis of Plant Lipids. *Frontiers in Plant Science*, 2(October), p.54.
- Inamdar, K. V. et al., 2002. Conversion of Phosphoglycolate to Phosphate Termini on 3' Overhangs of DNA Double Strand Breaks by the Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase hTdp1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), pp.27162–27168.
- Isaac, G. et al., 2003. Analysis of phosphatidylcholine and sphingomyelin molecular species from brain extracts using capillary liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neuroscience Methods*, 128(1–2), pp.111–119.
- Isakov, N., 2017. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Seminars in Cancer Biology*, (April).

- Iyama, T. & Wilson, D.M., 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8), pp.620–636.
- Jaroudi, S. & SenGupta, S., 2007. DNA repair in mammalian embryos. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 635(1), pp.53–77.
- Johnson, M.T., Mahmood, S. & Patel, M.S., 2003. Intermediary Metabolism and Energetics during Murine Early Embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), pp.31457–31460.
- Kamiński, M.M. et al., 2012. T cell Activation Is Driven by an ADP-Dependent Glucokinase Linking Enhanced Glycolysis with Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation. *Cell Reports*, 2(5), pp.1300–1315.
- Kawasaki, K. et al., 2001. Purification of phosphatidylglycerophosphate synthase from Chinese hamster ovary cells. *The Biochemical journal*, 354(Pt 1), pp.9–15.
- Kayne, F.J., 1974. Pyruvate Kinase Catalysed Phosphorylation of Glycolate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 59(1), pp.8–13.
- Knight, J., Hinsdale, M. & Holmes, R., 2012. Glycolate and 2-phosphoglycolate content of tissues measured by ion chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 421(1), pp.121–124.
- Koekemoer, T.C., Litthauer, D. & Oelofsen, W., 1995. Isolation and characterization of adipose tissue glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 27(6), pp.625–632.
- Koval, M. & Pagano, R.E., 1991. Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1082(2), pp.113–125.
- Krisher, R.L. & Prather, R.S., 2012. A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: Metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Molecular Reproduction and Development*, 79(5), pp.311–320.
- Lanekoff, I. et al., 2016. Trp53 deficient mice predisposed to preterm birth display region-specific lipid alterations at the embryo implantation site. *Scientific Reports*, 6(1), p.33023.
- Laurin, D.E. et al., 1998. Diacylglycerol Molecular Species in Plasma Membrane

- and Microsomes Change Transiently with Endothelin-1 Treatment of Glioma Cells. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 55(4), pp.189–207.
- Lee, C. et al., 1991. Quantitative analysis of molecular species of diacylglycerol and phosphatidate formed upon muscarinic receptor activation of human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(34), pp.22837–22846.
- Leiker, T.J., Barkley, R.M. & Murphy, R.C., 2011. Analysis of diacylglycerol molecular species in cellular lipid extracts by normal-phase LC-electrospray mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 305(2–3), pp.103–108.
- Li, Y.L. et al., 2007. Quantification of Diacylglycerol Molecular Species in Biological Samples by Electrospray Ionization Mass Spectrometry after One-Step Derivatization. *Analytical Chemistry*, 79(4), pp.1569–1574.
- Liberti, S. et al., 2013. HuPho: the human phosphatase portal. *FEBS Journal*, 280(2), pp.379–387.
- Liu, Y. et al., 2014. CDP-Diacylglycerol Synthetase Coordinates Cell Growth and Fat Storage through Phosphatidylinositol Metabolism and the Insulin Pathway K. Ashrafi, ed. *PLoS Genetics*, 10(3), p.e1004172.
- Lolis, E. & Petsko, G.A., 1990. Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5-Å resolution: implications for catalysis. *Biochemistry*, 29(28), pp.6619–6625.
- Luévano-Martínez, L.A. & Kowaltowski, A.J., 2015. Phosphatidylglycerol-derived phospholipids have a universal, domain-crossing role in stress responses. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 585, pp.90–97.
- Luquain-Costaz, C. et al., 2013. Bis(Monoacylglycero)Phosphate Accumulation in Macrophages Induces Intracellular Cholesterol Redistribution, Attenuates Liver-X receptor/ATP-Binding cassette transporter A1/ATP-Binding Cassette Transporter G1 Pathway, and Impairs Cholesterol Efflux. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), pp.1803–11.
- Maciolek, J. a., Alex Pasternak, J. & Wilson, H.L., 2014. Metabolism of activated T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 27, pp.60–74.
- Mason, R.J. & Voelker, D.R., 1988. Role of Intracellular Glycerol-3-Phosphate

- in the Synthesis of Phosphatidylglycerol by Freshly Isolated Adult Rat Alveolar Type II Cells. *American Review of Respiratory Disease*, 137(3), pp.519–524.
- Matyash, V. et al., 2008. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *The Journal of Lipid Research*, 49(5), pp.1137–1146.
- Medzhitov, R., 2015. Bringing Warburg to lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 15(10), pp.598–598.
- Menezo, Y. et al., 2007. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(11), pp.513–520.
- Meyer, C.R., Rustin, P. & Wedding, R.T., 1989. A kinetic study of the effects of phosphate and organic phosphates on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 271(1), pp.84–97.
- Milhas, D., Clarke, C.J. & Hannun, Y.A., 2010. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Letters*, 584(9), pp.1887–1894.
- Morita, S. & Terada, T., 2015. Enzymatic measurement of phosphatidylglycerol and cardiolipin in cultured cells and mitochondria. *Scientific Reports*, 5(June), p.11737.
- Mráček, T., Drahotka, Z. & Houštěk, J., 2013. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827, pp.401–410.
- Mugabo, Y. et al., 2016. Identification of a mammalian glycerol-3-phosphate phosphatase: Role in metabolism and signaling in pancreatic β -cells and hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(4), pp.E430–E439.
- Murray, N.R. & Fields, A.P., 1998. Phosphatidylglycerol Is a Physiologic Activator of Nuclear Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 273(19), pp.11514–11520.

- Nalecz, K.A. et al., 1986. The monocarboxylate carrier from bovine heart mitochondria: partial purification and its substrate-transporting properties in a reconstituted system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 851(1), pp.29–37.
- Nguyen, L.K. et al., 2013. Signalling by protein phosphatases and drug development: a systems-centred view. *FEBS Journal*, 280(2), pp.751–765.
- Noël, H. & Pande, S. V., 1986. An essential requirement of cardiolipin for mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase activity. Lipid requirement of carnitine acylcarnitine translocase. *European Journal of Biochemistry*, 155(1), pp.99–102.
- Nomura, H. et al., 1986. Stereospecificity of diacylglycerol for stimulus-response coupling in platelets. *Biochemical and biophysical research communications*, 140(3), pp.1143–1151.
- Nowak, T. & Mildvan, A.S., 1970. Stereoselective interactions of phosphoenolpyruvate analogues with phosphoenolpyruvate-utilizing enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 245(22), pp.6057–6064.
- Orosz, F., Oláh, J. & Ovádi, J., 2006. Triosephosphate isomerase deficiency: Facts and doubts. *IUBMB Life*, 58(12), pp.703–715.
- Ott, C. et al., 2012. Sam50 Functions in Mitochondrial Intermembrane Space Bridging and Biogenesis of Respiratory Complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 32(6), pp.1173–1188.
- Ott, M. et al., 2002. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), pp.1259–1263.
- Parameswaran, N. & Gupta, N., 2013. Re-defining ERM function in lymphocyte activation and migration. *Immunological Reviews*, 256(1), pp.63–79.
- Parsons, J.L., Dianova, I.I. & Dianov, G.L., 2004. APE1 is the major 3'-phosphoglycolate activity in human cell extracts. *Nucleic Acids Research*, 32(12), pp.3531–3536.
- Pasti, C. et al., 2003. Sugar derivatives as new 6-phosphogluconate dehydrogenase inhibitors selective for the parasite *Trypanosoma brucei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(7), pp.1207–1214.
- Pietromonaco, S.F. et al., 1998. Protein kinase C- θ phosphorylation of moesin

- in the actin-binding sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), pp.7594–7603.
- Povirk, L.F. et al., 2006. Processing of 3'-Phosphoglycolate-terminated DNA Double Strand Breaks by Artemis Nuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 282(6), pp.3547–3558.
- Povirk, L.F., 2012. Processing of Damaged DNA Ends for Double-Strand Break Repair in Mammalian Cells. *ISRN Molecular Biology*, 2012, pp.1–16.
- Prentki, M. & Madiraju, S.R.M., 2012. Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet β -cell function in health, obesity and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 353(1–2), pp.88–100.
- Ralser, M. et al., 2007. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology*, 6(4), p.10.
- Ramstedt, B. et al., 1999. Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography. *European Journal of Biochemistry*, 266(3), pp.997–1002.
- Ramstedt, B. & Slotte, J.P., 2002. Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Letters*, 531(1), pp.33–37.
- Rando, R.R. & Young, N., 1984. The stereospecific activation of protein kinase C. *Biochemical and biophysical research communications*, 122(2), pp.818–823.
- Redel, B.K. et al., 2012. Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg Effect. *Molecular Reproduction and Development*, 79(4), pp.262–271.
- Reubold, T.F. & Eschenburg, S., 2012. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cellular Signalling*, 24(7), pp.1420–1425.
- Rider, M.H. et al., 2004. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal*, 381(3), pp.561–579.
- Rose, Z.B., 1981. Phosphoglycolate Phosphatase from Red Blood. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 208(2), pp.602–609.
- Rose, Z.B. & Liebowitz, J., 1970. 2,3-Diphosphoglycerate Phosphatase from Human Erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(12),

- pp.3232–3241.
- Sacco, F. et al., 2012. The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Letters*, 586(17), pp.2732–2739.
- Scherer, M. & Schmitz, G., 2011. Metabolism, function and mass spectrometric analysis of bis(monoacylglycero)phosphate and cardiolipin. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(6), pp.556–562.
- Schiebel, J. et al., 2013. Structural Basis for the Recognition of Mycolic Acid Precursors by KasA, a Condensing Enzyme and Drug Target from Mycobacterium Tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), pp.34190–34204.
- Schiffmann, S. et al., 2013. Ceramide metabolism in mouse tissue. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(8), pp.1886–1894.
- Schnackerz, K.D. & Gracy, R.W., 1991. Probing the catalytic sites of triosephosphate isomerase by ³¹P-NMR with reversibly and irreversibly binding substrate analogues. *European Journal of Biochemistry*, 199(1), pp.231–238.
- Segerer, G. et al., 2016. An essential developmental function for murine phosphoglycolate phosphatase in safeguarding cell proliferation. *Scientific Reports*, 6(October), p.35160.
- Segerer, G., 2015. *Characterization of cell biological and physiological functions of the phosphoglycolate phosphatase AUM*. Dissertation for a doctoral degree. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Seifried, A. et al., 2014. Evolutionary and Structural Analyses of Mammalian Haloacid Dehalogenase-type Phosphatases AUM and Chronophin Provide Insight into the Basis of Their Different Substrate Specificities. *Journal of Biological Chemistry*, 289(6), pp.3416–3431.
- Seifried, A. et al., 2016. Reversible oxidation controls the activity and oligomeric state of the mammalian phosphoglycolate phosphatase AUM. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, pp.75–84.
- Seifried, A., Schultz, J. & Gohla, A., 2013. Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS Journal*, 280(2), pp.549–571.

- Sezgin, E. et al., 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), pp.361–374.
- Shi, Y. et al., 2005. Genetic Perturbation of Glycolysis Results in Inhibition of de Novo Inositol Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51), pp.41805–41810.
- Sigal, Y.J., McDermott, M.I. & Morris, A.J., 2005. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochemical Journal*, 387(2), pp.281–293.
- Simon, M.C. & Keith, B., 2008. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 9(4), pp.285–296.
- Simons, K. & Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), pp.569–572.
- Slotte, J.P. & Ramstedt, B., 2007. The functional role of sphingomyelin in cell membranes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(10), pp.977–981.
- Somoza, R. & Beutler, E., 1983. Phosphoglycolate Phosphatase and 2,3-Diphosphoglycerate in Red Cells of Normal and Anemic Subjects. *Blood*, 62(4), pp.750–753.
- Stiffin, R.M. et al., 2008. Differential Inhibition of Cytosolic PEPCK by Substrate Analogues. Kinetic and Structural Characterization of Inhibitor Recognition ‡. *Biochemistry*, 47(7), pp.2099–2109.
- Suh, D., Wilson, D.M. & Povirk, L.F., 1997. 3'-Phosphodiesterase activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends. *Nucleic Acids Research*, 25(12), pp.2495–2500.
- Takamura, H. et al., 1986. Quantitative Analysis of Polyenoic Phospholipid Molecular Species by High Performance Liquid Chromatography. *Lipids*, 21(5), pp.356–361.
- Tamura, Y. et al., 2013. Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metabolism*, 17(5), pp.709–718.

- Tserng, K.-Y. & Griffin, R., 2003. Quantitation and molecular species determination of diacylglycerols, phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins with gas chromatography. *Analytical Biochemistry*, 323(1), pp.84–93.
- Ubersax, J. a & Ferrell Jr, J.E., 2007. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), pp.530–541.
- Unk, I. et al., 2001. 3'-Phosphodiesterase and 3' 5' Exonuclease Activities of Yeast Apn2 Protein and Requirement of These Activities for Repair of Oxidative DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), pp.1656–1661.
- van der Veen, J.N. et al., 2017. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(9), pp.1558–1572.
- Vilenchik, M.M. & Knudson, A.G., 2000. Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), pp.5381–5386.
- Virshup, D.M. & Shenolikar, S., 2009. From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover. *Molecular Cell*, 33(5), pp.537–545.
- Voet, D., Voet, J.G. & Pratt, C.W., 2016. *Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level* Fifth edit. D. Voet, J. G. Voet, & C. W. Pratt, eds., Wiley.
- Wang, T., Marquardt, C. & Foker, J., 1976. Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature*, 261(5562), pp.702–705.
- Warburg, O., 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), pp.269–270.
- Wierenga, R.K., Kapetaniou, E.G. & Venkatesan, R., 2010. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(23), pp.3961–3982.
- Wilson, D.M., 2003. Properties of and substrate determinants for the exonuclease activity of human apurinic endonuclease Ape1. *Journal of Molecular Biology*, 330(5), pp.1027–1037.
- Winters, T.A. et al., 1994. Removal of 3'-phosphoglycolate from DNA strand-

- break damage in an oligonucleotide substrate by recombinant human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Nucleic Acids Research*, 22(10), pp.1866–1873.
- Wood, R. & Harlow, R.D., 1969. Structural analyses of rat liver phosphoglycerides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 135(1), pp.272–281.
- Xie, D. et al., 2014. Distinct effects of different phosphatidylglycerol species on mouse keratinocyte proliferation. *PLoS ONE*, 9(9), p.e107119.
- Yamashita, A. et al., 2014. Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases. *Biology*, 3(4), pp.801–830.
- Ye, C., Shen, Z. & Greenberg, M.L., 2016. Cardiolipin remodeling: a regulatory hub for modulating cardiolipin metabolism and function. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48(2), pp.113–123.
- Zecher, R. & Wolf, H.U., 1980. Partial purification and characterization of human erythrocyte phosphoglycollate phosphatase. *Biochem. J*, 191, pp.117–124.
- Zhao, S., Sedwick, D. & Wang, Z., 2015. Genetic alterations of protein tyrosine phosphatases in human cancers. *Oncogene*, 34(30), pp.3885–3894.
- Zhou, T. et al., 2005. Deficiency in 3'-phosphoglycolate processing in human cells with a hereditary mutation in tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1). *Nucleic Acids Research*, 33(1), pp.289–297.
- Zhu, X. & Eichberg, J., 1990. 1,2-diacylglycerol content and its arachidonyl-containing molecular species are reduced in sciatic nerve from streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of neurochemistry*, 55(3), pp.1087–90.

9 Anhang

9.1 Curriculum vitae

9.2 Eidesstattliche Erklärung/Affidavit

9.2.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

„Einfluss der Phosphoglykolat-Phosphatase auf den Metabolismus von Signal-, Membran- und Speicherlipiden in murinen Embryonen und Lymphozyten“

eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, _____

Datum

Unterschrift

9.2.2 Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled

“Role of phosphoglycolate phosphatase in the metabolism of signaling, membrane and storage lipids in murine embryos and lymphocytes”

is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, _____

Date

Signature

9.3 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Prof. Dr. Antje Gohla für die Überlassung dieses interessanten und anspruchsvollen Projekts sowie für die zuverlässige Betreuung und stetige Unterstützung dieser Dissertation.

Darüber hinaus danke ich:

- Frau Dr. Agnes Fekete für die Anleitung der Lipidanalysen, wichtige Kenntnisse auf dem Gebiet der Massenspektrometrie und ihre Hilfsbereitschaft.
- Herr Prof. Dr. Carsten Hoffmann für die Begleitung und Aufsicht.
- Frau Dr. Gabriela Segerer für die gute Einarbeitung, Zusammenarbeit und für ihre Unterstützung bei vielen wichtigen Fragen.
- Frau Dr. Elisabeth Jeanclos insbesondere für hilfreiche Diskussionen.
- Dr. Markus Krischke für die Nutzung des UPLC-Tandem Massenspektrometers und die Unterstützung bei der gezielten CL-Analyse.
- Maria Lesch für ihre technische Unterstützung.
- Allen Mitgliedern der AG Gohla, die an diesem Projekt mitgearbeitet haben, für die professionelle technische Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre.