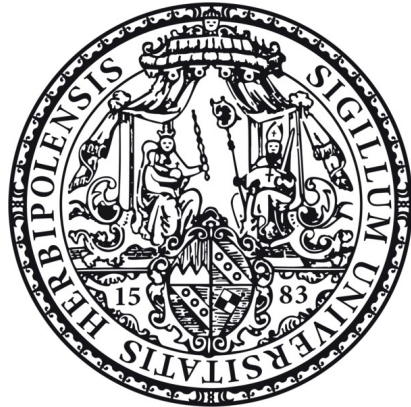


Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Lorenz



Charakterisierung pharmakologischer Phosphoglykolatphosphatase-Inhibitoren

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Alexandra Annika Nadine Kaestner
aus Walluf

Würzburg, Oktober 2021

Referentin: Prof. Dr. Antje Gohla

Koreferentin: Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung | 1 |
| 1.2 | HAD-Phosphatasen | 2 |
| 1.3 | Struktur der Phosphoglykolatphosphatase | 5 |
| 1.4 | Substrate der PGP | 6 |
| 1.4.1 | Tyrosin-phosphorylierte Peptide und Proteine | 8 |
| 1.4.2 | 2-Phosphoglykolat | 8 |
| 1.4.3 | 4-Phospho-D-Erythronat und 2-Phospho-L-Laktat | 10 |
| 1.4.4 | Glycerol-3-Phosphat | 11 |
| 1.5 | Physiologische Funktionen und pathophysiologische Bedeutungen der PGP | 12 |
| 1.5.1 | Einfluss auf die Proliferation und Aufteilung von Glycerolipiden | 12 |
| 1.5.2 | Effekte auf den EGF-induzierten Zytoskeletttumbau | 13 |
| 1.5.3 | Bedeutung für den Glucose- und Fettstoffwechsel | 13 |
| 1.6 | Möglichkeiten der experimentellen Enzymregulation | 15 |
| 1.6.1 | Vor- und Nachteile genetischer und pharmakologischer Methoden | 15 |
| 1.6.2 | Charakterisierung von reversiblen Enzyminhibitoren | 16 |
| 1.6.3 | Phosphatase-Inhibitoren | 17 |
| 1.6.4 | Regulation der PGP-Aktivität | 18 |
| 1.7 | Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit | 19 |
| 1.7.1 | Biochemische Charakterisierung möglicher PGP-Inhibitoren | 20 |
| 1.7.2 | Ziel der Arbeit | 22 |
| 2 | Material und Methoden | 23 |
| 2.1 | Material | 23 |
| 2.1.1 | Antikörper | 23 |
| 2.1.2 | Chemikalien und Reagenzien | 23 |
| 2.1.3 | Enzyme | 25 |
| 2.1.4 | Kits | 25 |
| 2.1.5 | Lösungen und Puffer | 25 |
| 2.1.6 | Software | 29 |
| 2.1.7 | Technische Geräte | 29 |
| 2.1.8 | Verbrauchsmaterialien | 30 |
| 2.1.9 | Zellkulturmedien | 30 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.1.10 | Zelllinie | 31 |
| 2.2 | Methoden | 32 |
| 2.2.1 | Bestimmung der Phosphatase-Aktivität | 32 |
| 2.2.2 | Pufferabhängige PGP-Aktivität | 33 |
| 2.2.3 | Zelllinie | 34 |
| 2.2.4 | Endogene PGP-Aktivität in GC1-Zelllysaten | 34 |
| 2.2.5 | Hemmung der endogenen PGP-Aktivität | 35 |
| 2.2.6 | TAG-Bestimmung | 38 |
| 2.2.7 | Lebend-/Tod-Diskriminierung mittels Durchflusszytometrie | 39 |
| 2.2.8 | Bestimmung der InhibitorKonzentration in GC1-Zellen | 41 |
| 2.2.9 | Inhibitionskinetik von Inhibitor # 48 | 43 |
| 2.2.10 | Selektivitätsuntersuchungen | 44 |
| 2.2.11 | Proteinanalytik | 46 |
| 2.2.12 | Statistische Analysen | 48 |
| 3 | Ergebnisse | 49 |
| 3.1 | Endogene PGP-Aktivität in GC1-Zellen und deren Hemmung | 49 |
| 3.1.1 | Hemmung der endogenen PGP-Aktivität in GC1-Zelllysaten durch Inhibitor # 1 und # 48 | 49 |
| 3.1.2 | Hemmung der endogenen PGP-Aktivität in GC1-Zellen durch Inhibitor # 1-Behandlung | 50 |
| 3.2 | Bestimmung der Viabilität von GC1-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analysen | 54 |
| 3.3 | Veränderung der TAG-Konzentrationen in GC1-Zellen durch Inhibitor # 1-Behandlung | 56 |
| 3.4 | Messung der InhibitorKonzentration pro Zelle | 57 |
| 3.5 | Charakterisierung der PGP-Hemmung durch Inhibitor # 48 | 60 |
| 3.6 | Selektivitätsuntersuchungen | 62 |
| 3.6.1 | Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase (LHPP) | 62 |
| 3.6.2 | Phospho 2 | 63 |
| 3.6.3 | Polynukleotid Kinase Phosphatase (PnkP) | 64 |
| 3.6.4 | Magnesium-abhängige Phosphatase 1 (MDP1) | 64 |
| 3.6.5 | Zusammenfassung und Vergleich der Selektivitätsuntersuchungen | 66 |
| 4 | Diskussion | 69 |
| 4.1 | Implementierung der Inhibitor # 1-Behandlung in der Zellkultur | 69 |
| 4.1.1 | Einfluss von Zellkulturmedien auf die Wirksamkeit der Inhibitorbehandlung | 70 |
| 4.1.2 | Einfluss von Moleküleigenschaften des Inhibitors auf die Zellpermeabilität | 72 |
| 4.1.3 | Untersuchung von bekannten zellbiologischen Effekten | 72 |
| 4.1.4 | Analyse von Off-Target-Effekten | 74 |
| 4.1.5 | Messung der Inhibitor # 1-Konzentration in GC1-Zellen | 75 |
| 4.2 | Inhibitor # 48 - ein vielversprechender PGP-Inhibitor? | 77 |
| 4.2.1 | Unkompetitive PGP-Hemmung durch Inhibitor # 48 | 77 |
| 4.2.2 | Erste Selektivitätstestungen | 77 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2.3 | Denkbare weiterführende Untersuchungen | 78 |
| 4.3 | Mögliche Anwendung der PGP-Inhibitoren | 79 |
| 4.3.1 | Tumorthherapie | 79 |
| 4.3.2 | Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel | 81 |
| 5 | Zusammenfassung | 83 |
| 6 | Anhang | 85 |
| 6.1 | Genetische PGP-Modifikationen | 85 |
| 6.2 | Getestete HAD-Phosphatasen | 86 |
| 6.3 | Abhängigkeit der PGP-Aktivität von verschiedenen Puffern | 88 |
| | Literaturverzeichnis | 91 |
| | Appendix | |
| I | Abkürzungsverzeichnis | |
| II | Abbildungsverzeichnis | |
| III | Tabellenverzeichnis | |
| IV | Eidesstattliche Erklärung/Affidavit | |
| V | Danksagung | |
| VI | Lebenslauf | |
| VII | Eigene Veröffentlichungen | |

1 Einleitung

1.1 Posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Posttranslationale Modifikation führt zu einer Vervielfältigung der Diversität von Genprodukten auf Proteinebene (Walsh et al., 2005). Die häufigste posttranslationale Modifikation ist die Phosphorylierung (Khoury et al., 2011). Durch Kinasen wird das Übertragen einer γ -Phosphat-Gruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf eine Hydroxylgruppe und die Bildung eines Phosphorsäureesters katalysiert (Fabbro et al., 2015). Die entgegengesetzte Reaktion, die Hydrolyse der Phosphorylgruppe, wird durch Phosphatasen vermittelt (Hunter, 1995). Zahlreiche zelluläre Prozesse und Funktionen werden durch reversible Phosphorylierung reguliert (Cohen, 2001). Das Einbringen oder Entfernen einer negativ geladenen Phosphat-Gruppe steuert Prozesse wie die Transkription, das Zellwachstum und die Zellteilung. Es kann zu Veränderungen in den Interaktionen mit anderen Molekülen, der Enzymaktivität, der intrazellulären Lokalisation sowie weiterer wichtiger Funktionen kommen (Needham et al., 2019).

Während die über 500 Kinasen eine der größten Proteinfamilien bilden, enthält das menschliche Proteom nur etwa 200 Phosphatasen (M. J. Chen et al., 2017), was lange zu der Annahme führte, dass diese weniger spezifisch seien. Durch Assoziation der Phosphatasen mit regulatorischen Untereinheiten existiert jedoch eine ähnlich große Zahl an humanen Phosphatasen, die zu der erforderlichen Spezifität, Selektivität, Lokalisation und Regulation führen (Ubersax und Ferrell, 2007, und Virshup und Shenolikar, 2009). Es ist allerdings noch vieles über die Substrate, Funktionen und Regulierungen dieser beiden relevanten Enzymfamilien unbekannt: zum Beispiel vermitteln 80 % der beschriebenen Kinasen die Phosphorylierung von nur 20 % der bekannten Substrate (Needham et al., 2019) und für circa ein Viertel der bekannten Phosphatasen ist bislang kein Substrat beschrieben (M. J. Chen et al., 2017).

Die Dysregulation von Kinasen und Phosphatasen ist mit dem Auftreten vieler Krankheiten assoziiert, beispielsweise metabolischen Störungen wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 (Bae et al., 2012), neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz (Gong et al., 2006) und verschiedenen malignen Tumorerkrankungen (Singh et al., 2017). Kinasen stehen deswegen schon lange - insbesondere in der Krebstherapie - als therapeutisches Ziel im Fokus der Forschung und gehören zu den häufigsten Zielstrukturen von Medikamenten (Bhullar et al., 2018). Während Phosphatasen lange als „undruggable“ galten, haben neuere Ansätze zur erfolgreichen Entwicklung von Medikamenten geführt, die gegen Phosphatasen gerichtet sind (Köhn, 2020).

1.2 HAD-Phosphatasen

Phosphatasen werden anhand ihrer Phosphatasen-Domäne in sechs Superfamilien eingeteilt (Liberti et al., 2013). Neuere Studien klassifizieren die bekannten Proteine mit einer Phosphatasen-Domäne nach ihrer Faltung in zehn unterschiedliche Gruppen, welche weiter in verschiedene Familien und Subfamilien unterteilt werden (M. J. Chen et al., 2017). Diese Arbeit beschäftigt sich mit Phosphatasen vom Haloazid Dehalogenase (HAD)-Typ, die zur ubiquitär vorkommenden Superfamilie der HAD-Hydrolasen gehören und mit etwa 79 % den größten Anteil in dieser Familie bilden (Allen und Dunaway-Mariano, 2009).

Obwohl die Aminosäuresequenz-Identität zwischen allen HAD-Phosphatasen insgesamt eher gering ist (<15 %), lassen sich die Mitglieder anhand von vier charakteristischen Motiven im aktiven Zentrum identifizieren, welche in einer modifizierten Rossmann-Faltung angeordnet sind, einem speziellen Aufbau aus α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen. **Abbildung 1.1** verdeutlicht diesen Aufbau schematisch, wobei auf die C2-Cap-Domäne erst weiter unten eingegangen wird. Motiv I hat folgende konservierte Sequenz hhhDXDX(T/V)(L/V)h (h = hydrophober Rest, D = Aspartat, X = beliebige Aminosäure, T = Threonin, V = Valin). Durch das erste Aspartat (Asp) kommt es zu einem nukleophilen Angriff auf die Phosphoryl-Gruppe des Substrates und zur Bildung eines Phosphoaspartly-Enzym-Intermediats sowie dem Lösen der Substrat-Abgangsgruppe (siehe **Abb. 1.2**). Im zweiten Schritt wird mittels nukleophilen Angriff durch ein Wassermolekül das Phosphat abgespalten und das Aspartat dadurch wieder regeneriert. Das zweite benachbarte Aspartat (Asp+2) protoniert im ersten Schritt die Substrat-Abgangsgruppe und deprotoniert im zweiten Schritt das Wassermolekül. Beide koordinieren außerdem den obligaten Cofaktor

Mg^{2+} , welcher durch elektrostatische Stabilisierung die Annäherung des Nukleophils und Substrats ermöglicht und für die korrekte Positionierung des Nukleophils und der Phosphorylgruppe des Substrats notwendig ist. Motiv II, III und IV helfen bei der Substratorientierung, Stabilisierung des Intermediats und Koordination des Co-faktors (Allen und Dunaway-Mariano, 2009, und Seifried et al., 2013).

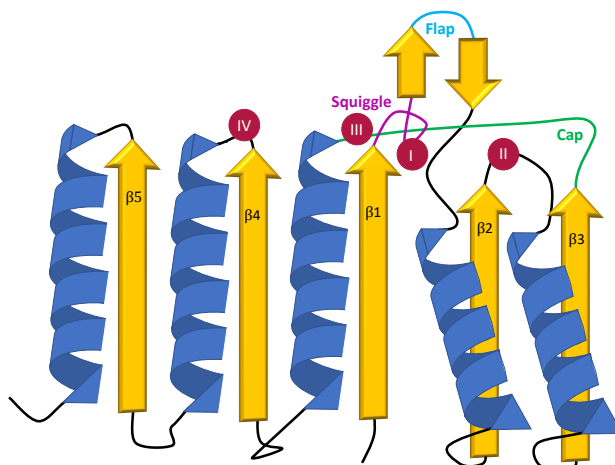


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Rossmann-Faltung bei HAD-Phosphatasen mit C2-Cap-Domäne

Die Abbildung zeigt die Anordnung der rosmannoide Faltung aus α -Helix- (in blau) und β -Faltblatt-Strukturen (in gelb), die die Kerndomäne der HAD-Phosphatasen bilden. Die Position der charakteristischen Motive I-IV (in dunkelrot) ist gekennzeichnet, genauso wie die des Flaps (in hellblau) und des Squiggles (in magenta). Die C2-Cap-Domäne ist vereinfacht als grüne Linie dargestellt.

Die Abbildung ist angelehnt an die Darstellung von Allen und Dunaway-Mariano, 2009.

Für die beschriebene Katalyse sind zwei gegensätzliche Bedingungen erforderlich: Im ersten Schritt der Reaktion ist zunächst ein Wasserausschluss notwendig, um den nukleophilen Angriff auf das Substrat zu unterstützen. Anschließend wird im zweiten Schritt die Anwesenheit von Wasser für die Hydrolyse benötigt (vgl. **Abb. 1.2**). Der Wechsel zwischen einem offenen und einem geschlossenen Zustand des aktiven Zentrums durch Konformationsänderungen führt zum Lösungsmittelausschluss bzw. zur Verfügbarkeit des Lösungsmittels. Zwei konservierte strukturelle Motive im aktiven Zentrum sind für die Beweglichkeit mitverantwortlich: Die Veränderung der Konformation des „Squiggles“ (engl. für Schnörkel), einer einzelnen helikalen Drehung, zwischen enger und lockerer Wicklung führt zur Positionsänderung des „Flaps“, (engl. für Klappe), einer β -Haarnadelschleife, die das katalytische Zentrum teilweise bedeckt und so gegenüber der Umgebung abschirmen kann (Burroughs et al., 2006, und Seifried et al., 2013). Die Position dieser beiden Strukturelemente in der Core Domain ist in **Abbildung 1.1** gezeigt.

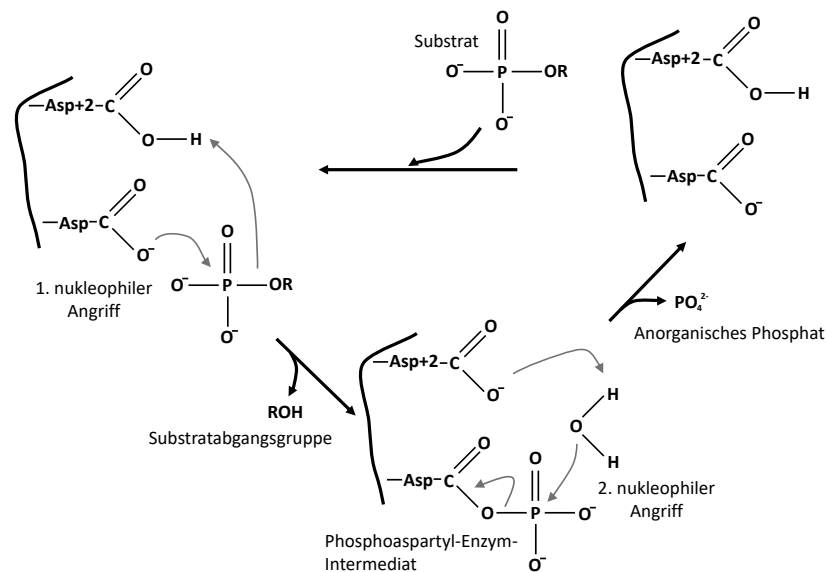


Abbildung 1.2 Reaktionsmechanismus der HAD-Phosphatasen

Die Dephosphorylierung des Substrats erfolgt über die Bildung eines Phosphoaspartyl-Enzym-Intermediats. Weitere Details zum katalytischen Mechanismus der HAD-Phosphatasen sind im Text beschrieben.

Die Abbildung ist angelehnt an die Darstellung von Seifried et al., 2013.

Neben diesen hoch konservierten Strukturen sind die sog. Cap-Domänen (engl. für Deckel) ein stark diversifiziertes Element der Enzymfamilie, welche zu großflächiger Abschirmung des aktiven Zentrums im Vergleich zur Flap-Struktur führen. Sie tragen zur Substratelektivität bei und können an der Bildung von Oligomeren beteiligt sein. Die Cap-Domänen werden nach ihrer Größe, Struktur und Position in drei Gruppen eingeteilt: C0, C1 und C2. **Abbildung 1.3** zeigt zur Veranschaulichung jeweils einen Vertreter dieser drei Gruppen. C0-Cap-Domänen sind deutlich kleiner als die anderen Cap-Domänen und haben eine einfache Struktur. Das aktive Zentrum ist dadurch für makromolekulare Substrate leicht zugänglich, welche hauptsächlich durch Phosphatasen mit C0-Cap-Domäne dephosphoryliert werden. Durch das Substrat selbst wird das aktive Zentrum gegenüber der Umgebung abgeschirmt (Seifried et al., 2013). Eine andere Möglichkeit der Abschirmung ist das „Pseudocapping“ durch die Bildung von Oligomeren (Lu et al., 2009). C1- und C2-Cap-Domänen schränken aufgrund ihrer Größe den Zugang zum aktiven Zentrum ein, sodass Phosphatasen mit diesen Domänen vor allem kleinere Substrate dephosphorylieren. C1-Cap-Domänen bestehen aus unterschiedlich großen α -Helices. C2-Cap-Domänen, welche wiederum in C2a- und C2b-Cap-Domänen unterteilt werden, enthalten eine Kombination aus α -Helices und β -Faltblattstrukturen (Allen und Dunaway-Mariano, 2009, und Seifried et al., 2013).

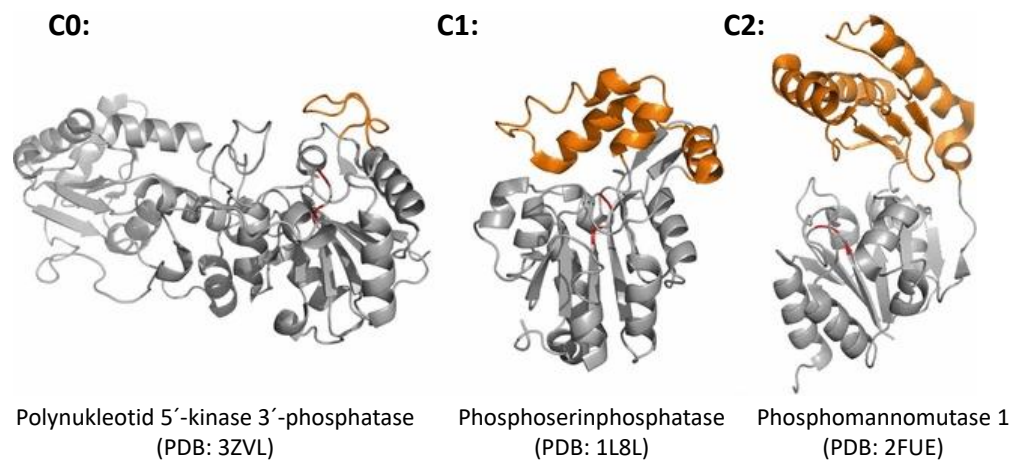


Abbildung 1.3 Diversität der Cap-Domänen von HAD-Phosphatasen

Exemplarische Darstellung von drei HAD-Phosphatasen mit den verschiedenen Cap-Domänen C0, C1 und C2. Die Cap-Domänen sind jeweils in orange eingefärbt. Details sind im Text beschrieben.

Die Abbildung ist ursprünglich im FEBS Journal veröffentlicht worden (Seifried et al., 2013).

1.3 Struktur der Phosphoglykolatphosphatase

Die Phosphoglykolatphosphatase (PGP) gehört zu den HAD-Phosphatasen mit C2a-Cap-Domäne. Seifried und Kollegen haben mittels Datenbankrecherche das Gen, welches für die PGP kodiert, als Paralog der Pyridoxalphosphat-Phosphatase (PDXP, auch bekannt als Chronophin) identifiziert: 45 % der murinen und 47 % der humanen Aminosäuresequenz sind identisch (Seifried et al., 2014). Aufgrund der initialen biochemischen Charakterisierung wurde die PGP AUM (Aspartat-basierte, ubiquitäre, Mg^{2+} -abhängige Phosphatase) genannt (Seifried et al., 2014). Western Blot-Analysen zeigten das Vorkommen der Phosphatase in allen untersuchten Maus- bzw. Rattengeweben mit der höchsten Expression im Hoden (Seifried et al., 2014, bzw. Mugabo et al., 2016).

Bislang ist es nicht gelungen, die murine oder humane PGP in voller Länge zu kristallisieren. Die erfolgreiche Kristallisation des sog. CAC-Hybrids, bei dem die PGP Cap-Domäne in das aktive Zentrum von PDXP eingefügt wurde, konnte erste Erkenntnisse über die Struktur der Cap-Domäne der PGP liefern. Es zeigte sich eine große Übereinstimmung der strukturellen Elemente und der Faltung der PGP Cap-Domäne im Vergleich zur PDXP Cap-Domäne (Seifried et al., 2014). Der Austausch

der Cap-Domänen resultierte in einer Veränderung der Substratspezifität (sowohl beim CAC-, als auch beim ACA-Hybrid, bei dem die PDXP Cap-Domäne in das aktive Zentrum von PGP eingefügt wurde). Dies verdeutlicht die Bedeutung der Cap-Domänen für die Substratspezifität (Seifried et al., 2014).

1.4 Substrate der PGP

Die Phosphatase-Aktivität von gereinigter muriner PGP ließ sich zunächst gegenüber der organischen Verbindung para-Nitrophenylphosphat (pNPP) nachweisen (Seifried et al., 2014). Für die PGP sind mittlerweile folgende Substrate beschrieben: Phosphoglykolat, 2-Phospho-L-Laktat, 4-Phospho-D-Erythronat und Glycerol-3-Phosphat (Seifried et al., 2016, Mugabo et al., 2016 und Collard et al., 2016). Zudem ist die Dephosphorylierung von Tyrosin-phosphorylierten Peptiden und Proteinen durch die PGP beschrieben (Seifried et al., 2014). **Abbildung 1.4** gibt einen Überblick über die Herkunft der Substrate und deren Rolle in dem jeweiligen Stoffwechselweg. **Tabelle 1.1** zeigt die enzymkinetischen Konstanten der verschiedenen Substrate. Diese helfen beim Verständnis der Enzymfunktion und ermöglichen den Vergleich der verschiedenen Substrate eines Enzyms.

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) entspricht der Substratkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Geschwindigkeit erreicht ist bzw. bei der die Hälfte aller Enzyme in einem Enzym-Substrat-(ES-)Komplex gebunden ist. Sie ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat sowie für die Stabilität des ES-Komplexes (je kleiner die K_M , desto höher die Affinität und Stabilität). Die K_M ist unabhängig von der Enzym- und Substratkonzentration. Die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) der Reaktion wird erreicht, wenn alle katalytischen Zentren des Enzyms mit Substrat besetzt sind. Bei vollständiger Sättigung wird die Wechselzahl oder katalytische Konstante (k_{kat}) bestimmt. Diese beschreibt, wie viele Substratmoleküle pro Zeiteinheit durch ein Enzym in das Produkt umgewandelt werden können.

Die Enzymaktivität wird in der Regel unter Sättigungsbedingungen gemessen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Substratkonzentration allerdings meistens deutlich geringer (meist kleiner als die K_M). Es wird also deutlich weniger Substrat umgesetzt als k_{kat} beschreibt. Um dies zu berücksichtigen, wird die sog. katalytische Effizienz, der Quotient $\frac{k_{kat}}{K_M}$, zur Charakterisierung der Enzymaktivität verwendet (Berg et al., 2018).

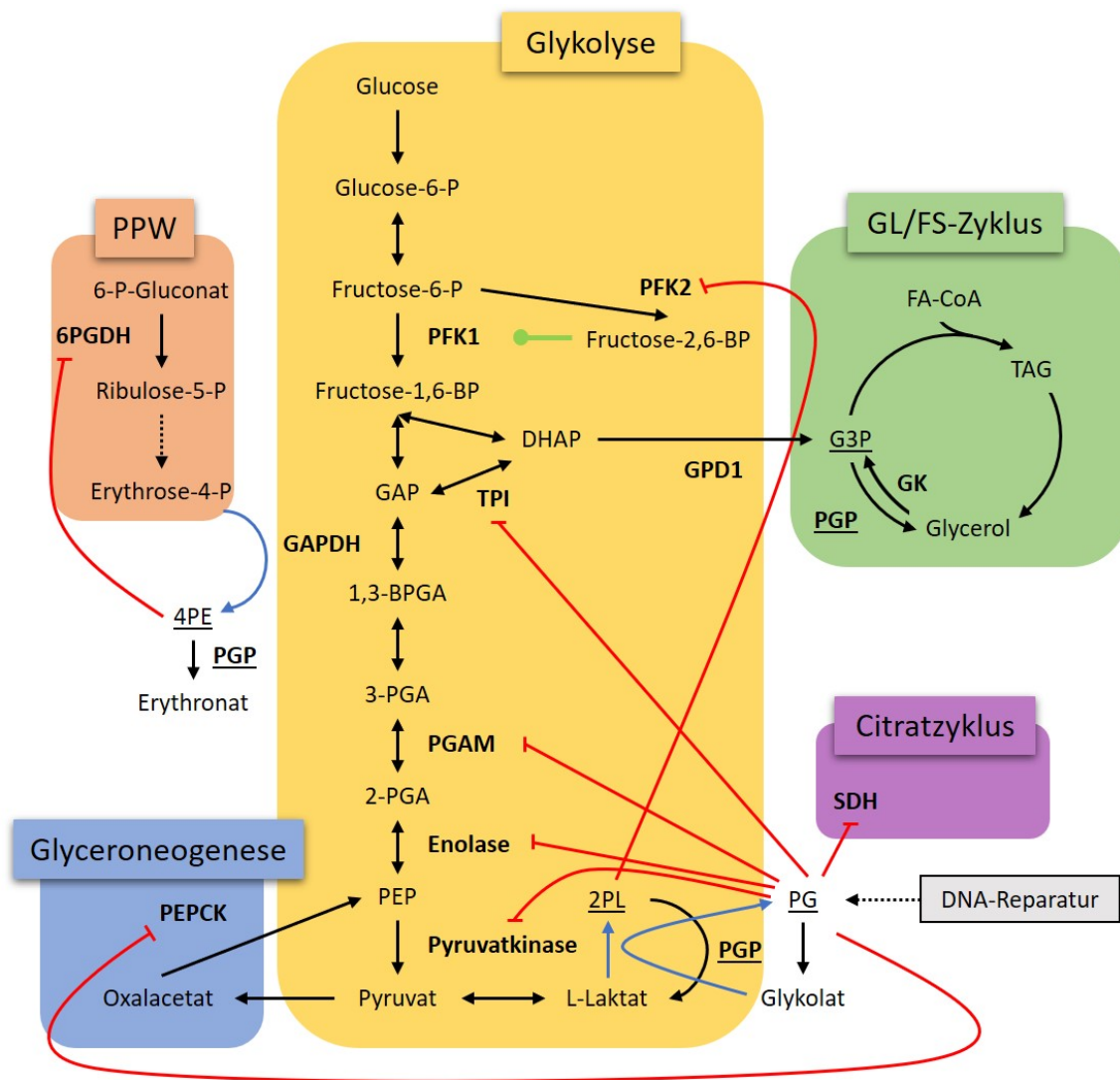


Abbildung 1.4 Überblick über die Substrate der PGP und deren Herkunft

1,3-BPGA = 1,3-Bisphoglycerat, 2PL = 2-Phospho-L-Laktat, 2-/3-PGA = 2-/3-Phosphoglycerat, 4PE = 4-Phospho-D-Erythronat, 6PGDH = 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase, BP = Bisphosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, FA-CoA = aktivierten Fettsäuren, G3P = Glycerol-3-Phosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, GPD1 = Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, GK = Glycerolkinase, GL/FS-Zyklus = Glycerolipid/Fettsäuren-Zyklus, P = Phospho/Phosphat, PEP = Phosphoenolpyruvat, PEPCK = Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, PFK1/2 = Phosphofruktokinase 1/2, PG = Phosphoglykolat, PGAM = Phosphoglyceratmutase, PGP = Phosphoglykolatphosphatase, PPW = Pentose-Phosphat-Weg, SDH = Succinat-Dehydrogenase, TAG = Triacyglyceride, TPI = Triosephosphatisomerase. Enzyme sind fett gedruckt, die PGP und ihre Substrate sind unterstrichen. Schwarze Pfeile stellen katalytische Reaktionen dar, gepunktete Pfeile stehen für einen oder mehrere Zwischenschritte und blaue Pfeile weisen auf eine Nebenreaktionen hin. Rote Linien markieren die Inhibition des jeweiligen Enzyms durch den Metaboliten, grüne Linien stellen die Aktivierung dar. Details sind im Text beschrieben.

Die Abbildung ist mit Modifikationen angelehnt an die Darstellungen von Collard et al., 2016, und Possik et al., 2017.

Tabelle 1.1 Michaelis-Menten-Konstante (K_m), Wechselzahl (k_{kat}) und katalytische Effizienz (k_{kat}/K_m) verschiedener Substrate der murinen PGP

2PL = 2-Phospho-L-Laktat, 4PE = 4-Phospho-D-Erythronat, G3P = Glycerol-3-Phosphat und PG = Phosphoglykolat.

| Substrat | K_M [μM] | k_{kat} [s^{-1}] | k_{kat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$] | |
|----------|-------------------------|-------------------------------|--|-----------------------|
| G3P | 1290 ± 420 | 0.10 ± 0.01 | 78 | Mugabo et al., 2016 |
| PG | 300 ± 50 | 2.13 ± 0.10 | 7100 | Seifried et al., 2016 |
| PG | 766 ± 68 | 6.56 ± 0.44 | 8564 | |
| 4PE | 247 ± 25 | 3.23 ± 0.18 | 13078 | Collard et al., 2016 |
| 2PL | 174 ± 55 | 1.82 ± 0.34 | 10460 | |

1.4.1 Tyrosin-phosphorylierte Peptide und Proteine

Seifried und Kollegen konnten in einem Assay mit verschiedenen Phosphopeptiden eine Dephosphorylierung von Tyrosin-phosphorylierten Peptiden durch die PGP nachweisen und in einem Phosphatase Overlay-Assay zeigte die PGP eine Phosphatase-Aktivität gegenüber Tyrosin-phosphorylierten Proteinen aus epithelialen Zervixkarzinom-Zellen (HeLa-Zellen) (Seifried et al., 2014). In der murinen spermatogonialen Zelllinie GC1-spg (von hier an GC1-Zellen genannt) konnte beobachtet werden, dass Zellen mit durch RNA-Interferenz herabregulierter PGP-Aktivität nach Stimulation durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, welcher die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten an Proteinen induziert) mehr hyperphosphorylierte Banden aufweisen als die Kontroll-Zellen (Seifried et al., 2014). Es sind jedoch bislang keine direkten PGP-Proteinsubstrate gefunden worden. Segerer und Kollegen konnten einen indirekten Zusammenhang zwischen der Menge an Tyrosin-phosphorylierten Proteinen und der PGP-Aktivität herstellen (siehe 1.5.2; Segerer et al., 2018).

1.4.2 2-Phosphoglykolat

In Pflanzen spielt die Umwandlung von Phosphoglykolat (PG) zu Glykolat durch die PGP eine wichtige Rolle, die gut verstanden und beschrieben ist (Bauwe et al., 2010). Für Säugetiere sind dagegen nach wie vor viele Aspekte der Entstehung und physiologischen Rolle von PG weitgehend unbekannt, denn PG ist nicht Bestandteil eines bekannten Stoffwechselweges (Gerin et al., 2019) und die PG-Konzentration ist

aufgrund der oft sehr niedrigen Konzentration in Zellen mit vielen Methoden nicht zuverlässig messbar (Gohla, 2019).

Erstmals wurde das Vorhandensein einer humanen Phosphatase mit spezifischer PG-Aktivität in Erythrozyten beschrieben (Badwey, 1977) und Seifried und Kollegen konnten zeigen, dass PG durch gereinigte murine PGP *in vitro* effizient dephosphoryliert werden kann (vgl. **Tab. 1.1**; Seifried et al., 2016). In humanen kolorektalen Zellen (HCT116-Zellen) mit PGP-Knockout mittels CRISPR/Cas9 konnten allerdings keine erhöhten PG-Konzentrationen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen mit GC/MS-Analysen (Kopplung von Gaschromatographie- und Massenspektrometrie-Analyse) gemessen werden (Collard et al., 2016). Nach Behandlung dieser Zellen mit 5 mM Glykolat, einem Vorläufermolekül von PG, ließen sich wiederum statistisch signifikant höhere PG-Konzentrationen in den Knockout-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen nachweisen (Gerin et al., 2019).

Der Entstehungsort von PG in Säugetieren ist unklar (Gohla, 2019). Für Muskelzellen von Kaninchen, humane Erythrozyten sowie humane HTC116-Zellen ist eine Glykolatkinase-Aktivität der Pyruvatkinase, die aus Glykolat PG bildet, beschrieben (Kayne, 1974, Fujii und Beutler, 1985, und Gerin et al., 2019). Allerdings scheint diese Aktivität in Erythrozyten aufgrund der berechneten enzymkinetischen Parameter nicht für die beschriebene Menge an PG verantwortlich zu sein (Fujii und Beutler, 1985). Neuere Versuche in HTC116-Zellen ließen dagegen darauf schließen, dass der Großteil des gebildeten PGs durch die Nebenaktivität der Pyruvatkinase entsteht, wenn die Zellen mit 5 mM Glykolat behandelt werden. Ein kleiner Teil des PGs soll zudem durch die Glykolatkinase-Aktivität der Glyceratkinase gebildet werden (Gerin et al., 2019). PG entsteht darüber hinaus möglicherweise während der Reparatur von DNA-Schäden. Oxidative DNA-Schäden durch endogene Faktoren und exogene Reize führen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen unter anderem mit 3'-Phosphat (3'-P) sowie 3'-Phosphoglykolat-Enden (3'-PG). Diese Enden verhindern die DNA-Reparatur und müssen daher enzymatisch zu den benötigten 3'-Hydroxygruppen (3'-OH) verarbeitet werden (Povirk, 2012, und Iyama und Wilson, 2013). Die Apyriminic/Apyrimidinic Endonuklease 1 und 2 (APE1 und APE2) spalten PG vor allem von Einzelstrangbrüchen mit 3'-PG-Enden ab (Suh et al., 1997, Wilson, 2003, T. Zhou et al., 2009, und Povirk, 2012). Des Weiteren ist die Aktivität gegenüber 3'-PG-Enden für Aprataxin beschrieben (Takahashi et al., 2007). Es ist unklar, wie relevant der Anteil des gebildeten PGs im Rahmen der DNA-Reparatur ist. Gerin und Kollegen konnten beispielsweise keine Erhöhung der PG-Konzentration nach Behandlung mit Bleomycin oder ionisierender Strahlung in HCT116-Zellen sowie

in humanen epithelialen Osteosarkomzellen (U2OS) mit PGP-Knockout nachweisen (Gerin et al., 2019).

Neben dem Entstehungsort ist auch die Funktion von PG im Stoffwechsel nicht ausreichend geklärt. Es ist eine Hemmung verschiedener Enzyme, die vor allem im Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind, durch PG beschrieben. Wolfenden, 1969, konnte zeigen, dass PG den Übergangszustand der Triosephosphatisomerase (TPI) bindet und die TPI-Aktivität dadurch vermindert. Passend dazu konnte eine Reduktion der TPI-Aktivität um 34% in Lysaten von Mäuse-Embryonen mit PGP-Inaktivierung gemessen werden. Die PG-Konzentration der Lysate ließ sich jedoch nicht bestimmen (Segeber et al., 2016). Die TPI ist für die reversible Umwandlung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) in der Glykolyse verantwortlich. Während GAP durch die GAP-Dehydrogenase (GAPDH) im Rahmen der Glykolyse weiter verstoffwechselt wird, kann DHAP durch die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPD1) zu Glycerol-3-Phosphat (G3P) umgewandelt werden. G3P bildet das Kohlenhydratgerüst für Triglyceride (TAGs), die durch Veresterung von G3P und aktivierten Fettsäuren (FA-CoA) entstehen, sodass die TPI an der Schnittstelle zwischen dem Kohlenhydrat- und dem Lipidstoffwechsel liegt. Darüber hinaus ist eine *in vitro* Hemmung durch PG für die Pyruvatkinase (Dougherty und Cleland, 1985), die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) (Stiffin et al., 2008), die Enolase sowie für die Succinat-Dehydrogenase beschrieben (Gerin et al., 2019) (siehe auch **Abb. 1.4**). Des Weiteren sind verschiedene Effekte von PG auf die Aktivität der Phosphoglyceratmutase (PGAM) beobachtet worden (Rose und Liebowitz, 1970, Somoza und Beutler, 1983, und Gerin et al., 2019).

1.4.3 4-Phospho-D-Erythronat und 2-Phospho-L-Laktat

Die meisten Enzyme katalysieren zusätzlich zu ihrer Hauptfunktion mit einer deutlich geringeren katalytischen Effizienz sog. Nebenreaktionen mit Substraten, die den physiologischen Substraten strukturell ähneln. Die dabei entstehenden Produkte können durch Akkumulation andere Reaktionen beeinflussen und Probleme verursachen. Es sind viele Enzyme entdeckt worden, die diesen potentiellen Problemen entgegenwirken, indem sie die Nebenprodukte beseitigen (Bommer et al., 2020). Collard und Kollegen konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die PGP 4-Phospho-D-Erythronat (4PE) und 2-Phospho-L-Laktat (2PL) dephosphorylieren kann, zwei potentiell toxische Metabolite, die in Nebenreaktionen von an der Glykolyse beteiligten Enzymen gebildet werden und nicht Teil eines bekannten Stoffwechselwegs sind. Sie bezeichnen die PGP daher auch als metabolisches Reparaturenzym (Collard et al., 2016).

Durch die Nebenaktivität der GAPDH, die im Rahmen der Glykolyse GAP zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPGA) umwandelt, entsteht 4PE aus Erythrose-4-Phosphat. Erhöhte 4PE-Konzentrationen in PGP-Knockout-Zellen waren assoziiert mit einer Akkumulation von 6-Phospho-Glukonat, vereinbar mit der Inhibition der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6PGDH), welche im Pentose-Phosphat-Weg (PPW) 6-Phospho-Glukonat zu Ribulose-5-Phosphat umwandelt. Collard und Kollegen schließen daher, dass die Dephosphorylierung von 4PE zu Erythronat durch die PGP die Coexistenz von Glykolyse und PPW sicherstellt (Collard et al., 2016).

Daneben konnten erhöhte 2PL-Konzentrationen in PGP-Knockout-Zellen gemessen werden und es zeigte sich, dass die PGP 2PL dephosphorylieren kann. 2PL entsteht vermutlich durch die Nebenaktivität der Pyruvatkinase, die zusätzlich zu Phosphoenolpyruvat (PEP) L-Laktat zu 2PL verstoffwechseln kann (Ash et al., 1984). Es ließ sich eine Hemmung bestimmter Isoenzyme der Phosphofruktokinase-2 (PFK-2) durch Akkumulation von 2PL nachweisen. Die PFK-2 synthetisiert Fructose-2,6-Bisphosphat (Fructose-2,6-BP), was die PFK-1, das Schlüsselenzym der Glykolyse, aktiviert. Aufgrund des beobachteten verminderten glykolytischen Flusses in Zellen mit PGP-Inaktivierung sehen die Autoren die PGP durch den Abbau von 2PL als relevantes Enzym in der Aufrechterhaltung der Glykolyse an (Collard et al., 2016).

1.4.4 Glycerol-3-Phosphat

Mugabo und Kollegen konnten zeigen, dass die murine PGP eine Glycerol-3-Phosphat-Phosphatase-(G3PP-)Aktivität besitzt, die für die Bildung von Glycerol mitverantwortlich ist (Mugabo et al., 2016). Glycerol entsteht hauptsächlich während der Lipolyse. G3P wird, wie in 1.4.2 beschrieben, in der Glykolyse durch die Aktivität der GPD1, die DHAP zu G3P umwandelt, gebildet und stellt das Kohlenhydratgerüst der TAGs dar. Des Weiteren kann die Glycerolkinase, die vor allem in der Leber und den Nieren vorhanden ist, aus Glycerol G3P herstellen und im Rahmen der Glyceroneogenese kann G3P aus Pyruvat und Aminosäuren synthetisiert werden (Prentki und Madiraju, 2008).

In Hepatozyten der Ratte sowie GC1-Zellen mit durch RNA-Interferenz herabregulierter PGP-Aktivität wurden nach Inkubation mit 25 mM Glucose, was metabolische Überflussbedingungen mit hohem glykolytischen Fluss imitieren soll, erhöhte G3P-Spiegel gemessen (Mugabo et al., 2016, und Segerer et al., 2018). In Maus-Embryonen mit PGP-Inaktivierung durch Ganzkörper-Knockin der Phosphatase-inaktiven PGP-D34N-Variante ließen sich erhöhte G3P-Level messen; vereinbar mit

der Hemmung der TPI durch PG und damit einhergehenden erhöhten DHAP-Konzentrationen und/oder mit einer verminderten G3PP-Aktivität (Segeberer et al., 2016). Im Gegensatz dazu ließen sich keine erhöhten G3P-Konzentrationen in HTC116-Zellen mit PGP-Knockout messen (Gerin et al., 2019). Die katalytische Effizienz der PGP gegenüber G3P ist im Vergleich zu PG, 4PE und 2PL deutlich geringer (vgl. **Tab. 1.1**), jedoch sind die G3P-Konzentrationen in Hepatozyten ca. 250-fach höher als die PG-Konzentrationen (Mugabo et al., 2016).

1.5 Physiologische Funktionen und pathophysiologische Bedeutungen der PGP

Wie bereits in 1.4 beschrieben, hat die PGP eine wichtige Rolle in der Entgiftung von potentiell schädlichen Nebenprodukten, die in der Glykolyse und möglicherweise auch während der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden entstehen. Zudem hat die PGP Einfluss auf die Proliferation, den Kohlenhydrat- sowie Fettstoffwechsel und spielt eine wichtige Rolle in der Übertragung von EGF-induzierten Signalen.

1.5.1 Einfluss auf die Proliferation und Aufteilung von Glycerolipiden

Erste Hinweise auf die physiologische Rolle der PGP ergaben sich durch die globale Inaktivierung der PGP in Mäusen (Gohla, 2019). Die PGP-Inaktivierung durch Ganzkörper-Knockin der Phosphatase-inaktiven PGP-D34N-Variante führten zu intrauterinem Wachstumsstopp sowie zur Entwicklungsverzögerung ab dem Embryonaltag 8.5 und zum embryonalen Tod (Segeberer et al., 2016). Die nähere Untersuchung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) mit PGP-Inaktivierung zeigte, dass die Proliferation der Zellen durch Vorhandensein von normoxische Bedingungen in der Zellkultur (ca. 20 % O₂) gehemmt wurde. Unter hypoxischen Zellkulturbedingungen (ca. 1 % O₂) zeigten die Zellen dagegen ein normales Proliferationsverhalten, sodass geschlussfolgert wurde, dass die Anwesenheit von Sauerstoff durch vermehrten oxidativen Stress in embryonalen Zellen mit PGP-Inaktivierung zu einer verminderten Proliferation führt (Segeberer et al., 2016).

Des Weiteren zeigte sich eine gestörte Aufteilung der Glycerolipide in Embryonen und MEFs mit PGP-Inaktivierung im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Es waren erhöhte TAG- und verminderte Phosphatidylcholin-Level (ein wichtiges Phospholipid in Zellmembranen) nachweisbar, welche sich unter hypoxischen Bedingun-

gen normalisierten (Segerer et al., 2016).

1.5.2 Effekte auf den EGF-induzierten Zytoskelettbau

Aufgrund der beobachteten erhöhten phosphorylierten Tyrosin-Reste in EGF-stimulierten Zellen, deren PGP-Aktivität mittels RNA-Interferenz herabreguliert wurde, wurde der PGP initial eine Beteiligung an der EGF-Rezeptor-(EGFR-)vermittelten Signalkaskade zugeschrieben (Seifried et al., 2014). Segerer und Kollegen konnten zeigen, dass die PGP indirekt Einfluss auf Tyrosin-phosphorylierte Proteine hat. GC1-Zellen mit durch RNA-Interferenz herabregulierter PGP-Aktivität wiesen neben erhöhten G3P-Konzentrationen (siehe 1.4) einen gesteigerten TAG-Umsatz mit Erhöhung der TAG-Konzentration sowie eine Lipolyse-abhängige Akkumulation von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) auf (Segerer et al., 2018). Es wurde eine aktivierende Hyperphosphorylierung an Tyrosin-Resten des EGFR sowie der PLC γ 1 nach Stimulation mit EGF beobachtet. Diese könnte durch Bildung von PIP2/EGFR-Nanoclustern entstehen, die zu Liganden-induzierter Phosphorylierung von EGFR führen (vgl. Y. Wang et al., 2014). Es ließ sich weder eine in vitro Phosphatase-Aktivität der PGP gegenüber Phosphoinositolen noch eine direkte Dephosphorylierung von EGFR und PLC γ 1 nachweisen, sodass ein indirekter PGP-Einfluss wahrscheinlich ist (Segerer et al., 2018).

Die anschließende Untersuchung des EGF-induzierten Zytoskelettbbaus zeigte in den GC1-Zellen mit PGP-Inaktivierung im Vergleich zu den Kontroll-Zellen eine vermehrte Anzahl an Zellen mit Circular Dorsal Ruffles (CDRs, engl. für zirkuläre dorsale Kräuselung) sowie eine vermehrte Anzahl an CDRs pro Zelle nach EGF-Stimulation (Segerer et al., 2018). CDRs sind wachstumsfaktor-induzierte, F-Aktinreiche, transiente, ringförmige Membranausstülpungen, die einerseits der Internalisierung von Substraten, Rezeptoren sowie Membranen und andererseits der Zellbeweglichkeit dienen (Hoon et al., 2012). Die PGP-Inaktivierung könnte durch den gesteigerten TAG-Umsatz, den damit einhergehenden erhöhten PIP2-Konzentrationen, welche zur Hyperphosphorylierung und damit zur Aktivierung des EGFR-Signalweges führen, zur vermehrten CDR-Bildung beitragen (Segerer et al., 2018).

1.5.3 Bedeutung für den Glucose- und Fettstoffwechsel

Mugabo und Kollegen konnten unter metabolischen Überflussbedingungen erhöhte G3P-Konzentrationen, die den TAG-Umsatz und dadurch auch die Produktion von Lipidsignalen steigern, mit einer gesteigerten glucosestimulierten Insulinsekretion in

der Zelllinie INS832/12 β -Zellen und in isolierten Inselzellen aus Ratten mit durch RNA-Interferenz herabregulierter PGP-Aktivität in Zusammenhang bringen (Mugabo et al., 2016). Außerdem wurden Hinweise gefunden, dass die vermehrte Bildung von Lipiden zu einer erhöhten Glucolipotoxizität führt. Es zeigte sich weiterhin ein gesteigerter O_2 -Verbrauch und eine gesteigerte ATP-Produktion in PGP-inaktiven Zellen. Die Überexpression der PGP zeigte jeweils umgekehrte Effekte (Mugabo et al., 2016).

In Hepatozyten mit durch RNA-Interferenz herabregulierter PGP-Aktivität konnte unter metabolischen Überflussbedingungen ein vermehrter Laktatgehalt sowie eine gesteigerte Laktatfreisetzung gemessen werden, ein Indikator für eine gesteigerte Glykolyse (Mugabo et al., 2016). Unter Bereitstellung von Glycerol bzw. Pyruvat und Laktat wurde außerdem eine erhöhte Gluconeogenese beobachtet. Die β -Oxidation zeigte sich dagegen reduziert. Die Auswirkungen traten in Hepatozyten mit überexprimierter PGP jeweils entgegengesetzt auf. Die Autoren beschreiben darüber hinaus, dass die PGP Einfluss auf den Redox-Zustand der Zellen hat (Mugabo et al., 2016). Die Veränderung der PGP-Expression hat dementsprechend entscheidende Konsequenzen für den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Die von Mugabo und Kollegen beobachtete gesteigerte Glykolyse (Mugabo et al., 2016) steht im Kontrast zu der von Collard und Kollegen beschriebenen Hemmung der Glykolyse durch Akkumulation von 2PL in PGP-inaktiven Zellen (vgl. 1.4.3; Collard et al., 2016).

Des Weiteren konnten Mugabo und Kollegen folgende Einflüsse durch eine in vivo Überexpression der PGP in Hepatozyten von Ratten (durch Einbringen eines adenoviralen Vektors, codierend für die humane PGP) beobachten: Es kam nach einem Tag zu einer 10 %-igen Gewichtsreduktion, einer reduzierten Nahrungsaufnahme und es wurde eine verminderte Glucoseproduktion aus Glycerol im Vergleich zu den Tieren mit Kontroll-Vektor gemessen (Mugabo et al., 2016). Es ließen sich nach einer Woche erhöhte Glycerol-Konzentrationen, verminderte TAG- sowie erhöhte HDL- und nicht signifikant verminderte LDL-Level im Plasma der Ratten mit überexprimierter PGP im Vergleich zur Kontrollgruppe bestimmen (Mugabo et al., 2016). Des Weiteren konnte eine Veränderung der PGP-Expression in weißen und braunen Fettgewebe von Mäusen abhängig vom Ernährungszustand beobachtet werden (Mugabo et al., 2016).

1.6 Möglichkeiten der experimentellen Enzymregulation

Durch die experimentelle Regulation der Enzymaktivität lassen sich Erkenntnisse über die Rolle von Enzymen im zellulären Stoffwechsel generieren. Hierfür stehen - neben der Veränderung der Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Redox-Status) - verschiedene genetische und pharmakologische Methoden zur Verfügung, die zum Beispiel durch Veränderung der Enzymkonformation oder -expression zu einer reversiblen oder irreversiblen Veränderung der Aktivität führen. Bei der Anwendung müssen jeweils verschiedene Vor- und Nachteile bedacht werden, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Die Charakterisierung sowie Verwendung von Phosphatase-Inhibitoren und die bereits untersuchten experimentellen PGP-Regulierungen werden anschließend thematisiert.

1.6.1 Vor- und Nachteile genetischer und pharmakologischer Methoden

Die Enzymregulation mittels verschiedener genetischer und pharmakologischer Ansätze muss nicht zwangsläufig zu übereinstimmenden Beobachtungen führen, da es häufig zu Kompensationsmechanismen und Off-Target-Effekten kommt. In Studien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Knockout und Knockdown desselben Gens zu unterschiedlichen Phänotypen führt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang unzureichend verstanden. Häufig scheinen Knockout-Phänotypen im Gegensatz zu Knockdown-Phänotypen aufgrund kompensatorischer Effekte normal (El-Brolosy und Stainier, 2017). Knockdown-Phänotypen können jedoch nicht nur als Ergebnis der Herabregulation der Enzymaktivität entstehen, sondern auch durch unspezifische, teilweise toxische Off-Target-Effekte zum Beispiel durch Bindung weiterer Sequenzen neben der Zielstruktur, Aktivierung einer Immunantwort oder durch Beeinflussung des endogenen micro-RNA-Stoffwechsels (Jackson und Linsley, 2010, Seok et al., 2018, und Zimmer et al., 2019). Des Weiteren muss bedacht werden, dass es durch Knockdown häufig nicht zu einem kompletten Funktionsverlust kommt und dadurch physiologischen Aufgaben erhalten bleiben können (Zimmer et al., 2019).

Auch die Regulierung der Enzymaktivität durch inhibitorische Moleküle muss - im Vergleich zum Knockdown (Weiss et al., 2007) und Knockout (Knight und Shokat, 2007) - nicht den gleichen Phänotyp aufweisen. Der Protein-Protein-Interaktion wird hierbei eine wichtige Rolle zugeschrieben, denn ein Enzym, welches durch einen Inhi-

bitor gehemmt wird, kann nach wie vor als Gerüst dienen, was wichtig für biologische Funktionen sein kann (Weiss et al., 2007). Die Möglichkeit mittels inhibitorischer Moleküle die Wirkdauer mit einem schnellen Beginn und schnellen Ende der Wirkung nach Zugabe bzw. Entfernen des Inhibitors zu regulieren und somit das Enzym reversibel zu hemmen, hat im Gegensatz zu der Regulation durch Knockout und Knockdown einige Vorteile - vor allem in der Analyse akuter Effekte (Cohen, 2009). Außerdem können Zellen untersucht werden, die sich nicht für genetische Manipulationen eignen. Für die erfolgreiche Anwendung von Inhibitoren zur Erforschung von zellulären Prozessen ist eine selektive Hemmung der Zielstruktur essentiell. Auch wenn Off-Target-Effekte in der klinischen Anwendung von Medikamenten teilweise aufgrund der erweiterten Anwendungsmöglichkeiten vorteilhaft sind, können sie in der Forschung zu einer Fehlinterpretation von Daten führen (Miyazawa, 2011). Die oft fehlende Selektivität der Moleküle wird als große Limitation des pharmakologischen Ansatzes gesehen (Cohen, 2009, und He et al., 2013). Für die beobachteten Inhibitoreffekte sollten daher die Kausalitäten bestätigt bzw. Off-Target-Effekte aufgedeckt werden (Weiss et al., 2007). Auf die Kriterien zur Analyse von Off-Target-Effekten wird in 4.1.4 näher eingegangen.

Genetische und pharmakologische Ansätze müssen demzufolge als sich ergänzende Methoden verstanden werden, die biologische Systeme in unterschiedlicher Weise verändern und nur gemeinsam umfassende Informationen über die Zielstruktur liefern können.

1.6.2 Charakterisierung von reversiblen Enzyminhibitoren

Reversible Inhibitoren können, wie im Folgenden erläutert, die Enzym-Substrat-Interaktion kompetitiv, unkompetitiv und nicht-kompetitiv hemmen. Zudem gibt es Inhibitoren, die ein gemischtes Inhibitionsverhalten aufweisen (Berg et al., 2018). Die unterschiedlichen Mechanismen zeigen charakteristische Veränderungen von K_M und V_{max} mit steigender Inhibitorkonzentration, sodass durch Analyse dieser die Art der Hemmung durch einen Inhibitor beschrieben werden kann. **Abbildung 1.5 B-D** verdeutlicht den Mechanismus der Hemmung und die Auswirkungen auf die kinetischen Konstanten im Vergleich zur ungehemmten Enzymaktivität (**Abb. 1.5 A**).

Kompetitive Inhibitoren ähneln strukturell dem Substrat und konkurrieren daher um die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Wirkung eines kompetitiven Inhibitors kann aufgehoben werden, indem die Substratkonzentration gesteigert wird. Die K_M erhöht sich deswegen mit steigender Inhibitorkonzentration, wogegen

die V_{max} des Enzyms unverändert bleibt (siehe **Abb. 1.5 B**). Ein unkompetitiver Inhibitor kann nur an den ES-Komplex binden, sodass weniger ES-Komplexe, die das Substrat umwandeln können, zur Verfügung stehen (siehe **Abb. 1.5 C**). Die V_{max} wird dadurch reduziert. Da weniger Substrat für die verringerte Menge an freien ES-Komplexe benötigt wird, sinkt die K_M mit steigender Inhibitorkonzentration (Berg et al., 2018). Die dritte Möglichkeit der reversiblen Enzymhemmung ist die nicht-kompetitive Hemmung (siehe **Abb. 1.5 D**). Diese Inhibitoren können sowohl an das freie Enzym als auch an den ES-Komplex binden. Durch die Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, was zur Inaktivierung des Enzyms führt. Es stehen daher weniger funktionsfähige Enzyme zur Verfügung, die V_{max} nimmt mit steigender Inhibitorkonzentration ab. Da die Substratbindung nicht eingeschränkt ist, bleibt die K_M gleich. Die Wirkung eines unkompetitiven und eines nicht-kompetitiven Inhibitors kann nicht durch Steigerung der Substratkonzentration aufgehoben werden (Berg et al., 2018). Charakteristisch für gemischte Inhibitoren ist eine verringerte V_{max} und steigende K_M mit steigender Inhibitorkonzentration. Der Inhibitor bindet ähnlich wie ein nicht-kompetitiver Inhibitor an das Enzym, der ESI-Komplex hat aber im Gegensatz zur Hemmung durch einen nicht-kompetitiven Inhibitor eine enzymatische Restaktivität (Berg et al., 2018).

Ein wichtiger Wert zur Beschreibung der Enzymhemmung durch ein Molekül ist die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}). Diese gibt die Inhibitorkonzentration an, bei der die Enzymaktivität auf die Hälfte reduziert ist (Berg et al., 2018).

1.6.3 Phosphatase-Inhibitoren

Der initiale Fokus in der Erforschung von Phosphatase-Inhibitoren lag in der Entwicklung von kompetitiven Inhibitoren. Dies führte einerseits zu nicht-selektiven Inhibitoren aufgrund der konservierten aktiven Zentren und andererseits zur schlechten Bioverfügbarkeit dieser Moleküle, da zur festen Bindung an das aktive Zentrum meist negativ geladene Verbindungen notwendig sind (Fahs et al., 2016, und Köhn, 2020). Seit Mitte der 2010er Jahre führte der Ansatz der allosterischen Hemmung zur Entwicklung spezifisch wirkender Phosphatase-Inhibitoren (Köhn, 2020). Im Mittelpunkt der Suche nach Phosphatase-Inhibitoren standen vor allem Protein-Tyrosin- und Phosphoprotein-Phosphatasen. Inhibitoren, die Phosphatasen anderer Superfamilien hemmen, sind kaum vorhanden (Fahs et al., 2016).

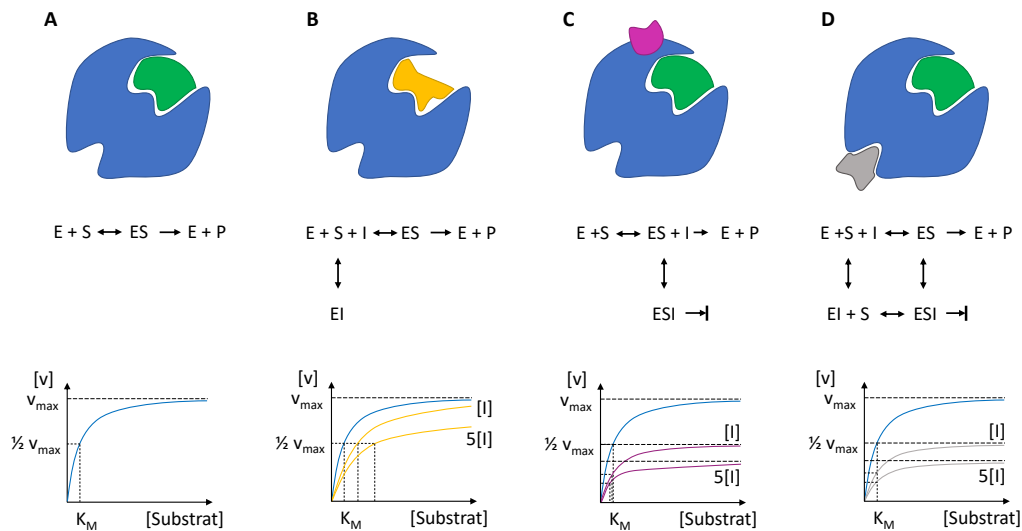


Abbildung 1.5 Arten der reversiblen Enzymhemmung

Schematische Darstellung der Enzyminhibition und deren Einfluss auf die enzymkinetischen Parameter K_M (Michaelis-Menten-Konstante) und V_{max} (Maximalgeschwindigkeit): Enzym (E) in blau, Inhibitoren (I): kompetitiver Inhibitor in orange, unkompetitiver Inhibitor in lila und nicht-kompetitiver Inhibitor in grau, Substrat (S) in grün. Produkt (P). Details sind im Text beschrieben. Die Grafik ist mit Modifikationen angelehnt an die Darstellung von Berg et al., 2018.

1.6.4 Regulation der PGP-Aktivität

Bei der *in vitro* Charakterisierung HAD-typischer Eigenschaften der PGP ließ sich die Phosphatase-Aktivität der PGP durch BeF_3^- , mit dem strukturell das Phosphoaspartat-Intermediat imitiert wird, komplett blockieren sowie konzentrationsabhängig durch Orthovanadat hemmen, welches aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Phosphat die Aktivität kompetitiv beeinflusst (Yan et al., 1999, Cho et al., 2001, und Seifried et al., 2014). Es ließ sich keine Hemmung durch Okadainsäure und Calyculin A, zwei Typ 1 und 2A Serin/Threonin-Proteinphosphatase-Inhibitoren, beobachten (Seifried et al., 2014). Die Hemmung der PGP-Aktivität durch die Inkubation mit dem Mg^{2+} -Chelator EDTA (5 mM) sowie durch Ca^{2+} ($\text{IC}_{50} = 0,5 \text{ mM}$), was zur Verdrängung des Mg^{2+} im aktiven Zentrum führt, bestätigen zudem die Notwendigkeit des Co-Faktors (Seifried et al., 2014).

Die PGP-Aktivität lässt sich auch durch reversible Oxidation verändern (Seifried et al., 2016). Die Regulation der Enzymaktivität durch Veränderung des Redox-Status ist ein wichtiger Regulationsmechanismus, der für Protein-Tyrosin-Phosphatasen ausführlich untersucht und beschrieben ist. Diese enthalten einen konservierten

Cystein-Rest im aktiven Zentrum, der den nukleophilen Angriff auf das Substrat ausübt. Durch reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 kann es zur Oxidation dieses Cystein-Rests kommen, was zur Aufhebung der Phosphatase-Aktivität führt (Rhee et al., 2000, und Tonks, 2006). Obwohl die Katalyse der HAD-Phosphatasen Aspartat-abhängig ist, ließ sich unter oxidativen Bedingungen eine Hemmung der PGP-Aktivität nachweisen sowie anschließend eine entgegengesetzte Aktivitätssteigerung in Anwesenheit von Reduktionsmitteln. Es wurden drei Cystein-Reste identifiziert, die für die beobachtete Redox-Abhängigkeit verantwortlich sind. Außerdem wurde ein weiterer Cystein-Rest gefunden, der für die redox-abhängige PGP-Oligomerization bedeutend ist (Seifried et al., 2016). Es ist jedoch herausfordernd, mit diesem regulatorischen Ansatz konsekutive zelluläre Effekte zu untersuchen, unter anderem weil es schwierig ist den Redox-Status aller Moleküle zu einem Zeitpunkt festzuhalten und die Veränderungen zu analysieren (Klomsiri et al., 2011).

1.7 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit ist Teil eines Projektes, welches sich mit der gezielten pharmakologischen Inhibition der PGP beschäftigt, um ein umfassenderes Verständnis über die Stellung der PGP im physiologischen und pathophysiologischen Stoffwechsel zu erhalten, denn die Beobachtung der PGP-Funktionen erfolgte bislang nur mit Hilfe genetischer Methoden (Gen-Knockout, Knockin einer inaktiven Mutante sowie Knockdown), die, wie in 1.6.1 beschrieben, Vor- und Nachteile mit sich bringen. **Tabelle 6.1** im Anhang zeigt die in der Literatur beschriebenen genetischen PGP-Modifikationen.

Neben der erleichterten Durchführung von funktionellen Analysen, vor allem von akuten Effekten der Inhibition (vgl. auch 1.6.1), könnte ein selektiver PGP-Inhibitor möglicherweise auch in der therapeutischen Anwendung von Tumorerkrankungen Verwendung finden. Der „Warburg-Effekt“ beschreibt die für Tumorzellen charakteristische Veränderung des Glucose-Stoffwechsels, die einerseits mit einer vermehrten Glucose-Aufnahme und andererseits mit der sog. aeroben Glykolyse (d. h. bevorzugte Energiegewinnung durch den Abbau von Glucose zu Laktat in Anwesenheit von Sauerstoff) einhergeht (Warburg, 1956a, Warburg, 1956b, und Ganapathy-Kanniappan und Geschwind, 2013). Die Nutzung der im Gegensatz zur oxidativen Phosphorylierung energetisch weniger effizienten aeroben Glykolyse hat für die Tumorzellen neben der schnellen Energiebereitstellung den Vorteil, dass die entstehenden Zwischenprodukte den PPW fördern und damit die Bereitstellung von NADPH, welches für die

Regeneration des Antioxidans Glutathion benötigt wird, sowie von essentiellen Substraten für die Synthese von Lipiden und Nukleinsäuren (Ganapathy-Kanniappan und Geschwind, 2013). Die von Collard und Kollegen beschriebene Hemmung der Glykolyse und des PPWs durch Akkumulation von 4PE und 2PL in PGP-inaktiven Zellen (vgl. 1.4.3) lässt daher eine therapeutische Hemmung der PGP interessant erscheinen (Collard et al., 2016).

1.7.1 Biochemische Charakterisierung möglicher PGP-Inhibitoren

Folgende Vorarbeiten sind im Rahmen des Projektes durch die eigene Arbeitsgruppe gemacht worden: In Kooperation mit dem Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie wurden 41.000 Verbindungen auf eine mögliche Hemmung der Phosphatase-Aktivität der murinen PGP gegenüber 6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferylphosphat (DiFMUP) gescreent. DiFMUP ist ein artifizielles Substrat, welches, nachdem es dephosphoryliert wurde, sein Fluoreszenzverhalten verändert (Gee et al., 1999). Es konnten 37 Verbindungen identifiziert werden, deren IC_{50} zur Hemmung der PGP-vermittelten Dephosphorylierung von DiFMUP unter $50 \mu\text{M}$ lag und die die PDXP-Aktivität gegenüber DiFMUP nicht veränderten. Diese Moleküle wurden von Dr. Elisabeth Jeanclos mittels Malachit Grün Assays auf ihre Wirksamkeit gegenüber der murinen PGP-vermittelten Dephosphorylierung des physiologischen Substrats PG sowie der PDXP-vermittelten Dephosphorylierung von Pyridoxalphosphat (PLP) getestet. Malachit Grün ist ein Reagenz, welches zum Stoppen der Reaktion hinzugegeben wird und mit welchem durch Komplexbildung und konsekutiver Farbentwicklung das freigewordene anorganische Phosphat kolorimetrisch gemessen werden kann (siehe auch 2.2.1). Die Testung des PGP-Paralogs PDXP erfolgte, um eine Inhibitorwirkung auszuschließen und dadurch erste Hinweise auf die Selektivität der Inhibitoren zu erhalten.

Fünf vielversprechende Verbindungen wurden identifiziert, die die PGP-Aktivität um mindestens 50 % inhibierten und keinen relevanten Effekt auf die PDXP-Aktivität zeigten. Diese Inhibitoren, fortfolgend Inhibitor # 1, # 2, # 9 und # 48 genannt (siehe **Abb. 1.6**), wurden im Rahmen des Projektes näher untersucht. Das fünfte Molekül, Inhibitor # 51, wurde aufgrund der beobachteten Lichtempfindlichkeit frühzeitig ausgeschlossen (Engelmann, 2019). Für die Quantifizierung der PGP-Inhibition wurde von Engelmann, 2019, und Frankenbach, 2017, die IC_{50} mit muriner PGP und $200 \mu\text{M}$ PG bestimmt (siehe **Tab. 1.2**). Anschließend wurde die Inhibitionsart charakterisiert (vgl. 1.6.2). Die Ergebnisse von Engelmann, 2019, ließen für Inhi-

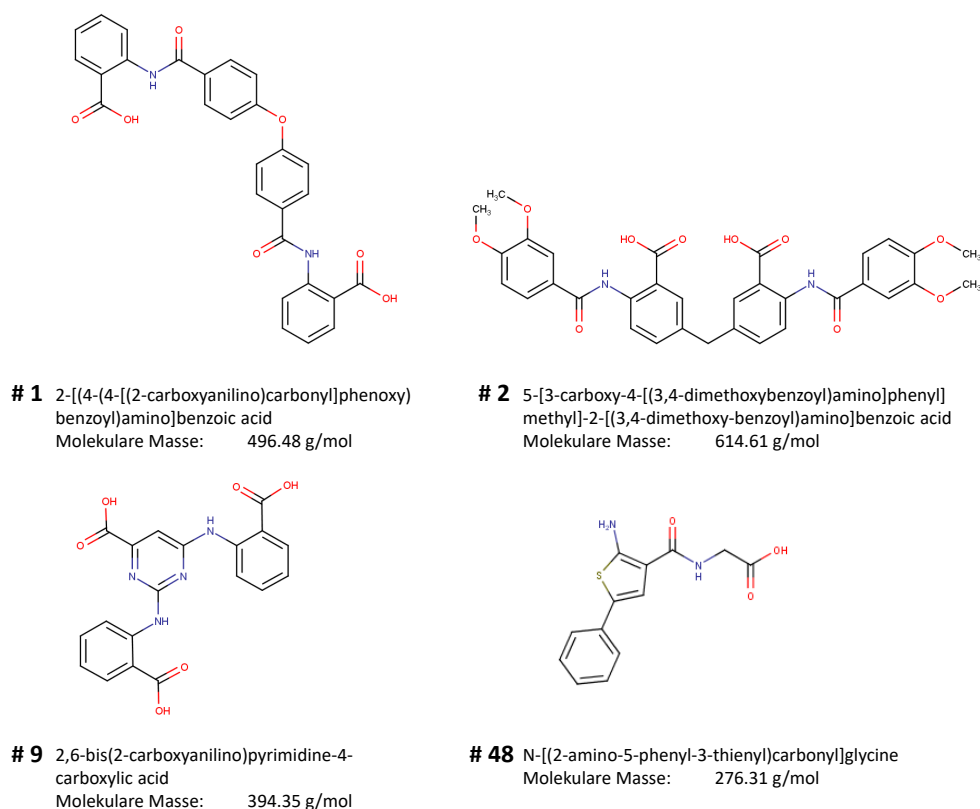


Abbildung 1.6 Strukturformeln der Inhibitoren # 1, # 2, # 9 und # 48.

bitor # 1 auf eine Kombination aus nicht-kompetitiver und kompetitiver Inhibition schließen. Die Veränderungen von K_M und V_{max} durch steigende Inhibitor # 2 und # 9-Konzentrationen waren vereinbar mit einer kompetitiven Inhibition (Engelmann, 2019). Um die Selektivität der Inhibitoren genauer zu untersuchen, wurde die Wirkung der Inhibitoren # 1, # 2 und # 9 auf verschiedenen HAD-Phosphatasen von Frankenbach, 2017, und Yesilyurt, 2017, getestet.

Tabelle 1.2 Mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Inhibitoren # 1, # 2, # 9, # 48 und # 51

Bestimmung der IC_{50} der Inhibitoren # 1, # 2, # 9 und # 51 (Engelmann, 2019) sowie # 48 (Frankenbach, 2017) mit muriner PGP und PG. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.E.M. aus $n = 3$ (für # 1, # 48 und # 51) bzw. $n = 4$ (für # 2 und # 9) unabhängigen Versuchen.

| Inhibitor | # 1 | # 2 | # 9 | # 48 | # 51 |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| IC_{50} (in μM) | 0.37 ± 0.03 | 1.49 ± 0.17 | 0.86 ± 0.07 | 1.29 ± 1.44 | 2.04 ± 0.67 |

1.7.2 Ziel der Arbeit

In den letzten zehn Jahren konnten wichtige Erkenntnisse über die zellulären und physiologischen Funktionen der HAD-Phosphatase PGP gewonnen werden. Die Beschreibung der Phosphatase-Aktivität gegenüber der potentiell toxischen Metaboliten PG, 2PL und 4PE führte zu der Bezeichnung „metabolite repair enzyme“ was bedeutet, dass die PGP essentiell für den Zellerhalt ist - konkret für die Aufrechterhaltung der Glykolyse und des PPWs. Die Charakterisierung als G3PP legt eine Wirkung an der Schnittstelle zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel nahe. Zelluläre Studien konnten Hinweise auf die Regulierung des EGF-induzierten Zytoskelettumbaus durch die PGP liefern und durch die Untersuchung von Mäusen mit PGP-Inaktivierung zeigte sich ein entscheidender Einfluss der PGP auf die Zellproliferation und embryonale Entwicklung.

Die Untersuchung der PGP-Funktionen erfolgte bislang nur mit Hilfe genetischer Methoden. Um ein umfassenderes Verständnis über die Zusammenhänge der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutungen der PGP zu erhalten, ist diese Arbeit Teil eines Projektes, welches sich mit der gezielten pharmakologischen Inhibition der PGP beschäftigt, denn genetische und pharmakologische Ansätze der Enzymregulation können, aber müssen nicht zu gleichen Effekten führen. Die Ansätze sollten daher als sich ergänzende Methoden verstanden werden. Durch die Identifizierung eines selektiven PGP-Inhibitors könnten vor allem akute Effekte der PGP-Inhibition analysiert und die Hemmung in Zellen, die sich nicht für genetische Modifikationen eignen, untersucht werden. Darüber hinaus ist eine selektive PGP-Inhibition möglicherweise in der Therapie von Tumorerkrankungen aufgrund der „metabolite repair“-Funktion interessant.

Ziel dieser Arbeit ist

1. Die Implementierung der Inhibitor # 1 -Behandlung in der Zellkultur und die Bestimmung erster zellbiologischer Effekte dieser Behandlung.
2. Die Charakterisierung der PGP-Hemmung durch Inhibitor # 48.
3. Die Testung der Selektivität von Inhibitor # 48 und ein Vergleich der Ergebnisse mit den bereits erfolgten Selektivitätstestungen mit den Inhibitoren # 1, # 2 und # 9.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

| | |
|---|--|
| Anti-PGP, polyklonale Antikörper aus Kaninchen gegen rekombinante, gereinigte murine PGP | Charles River siehe Seifried et al., 2014 |
| Anti-Tubulin, monoklonale Antikörper aus Mäusen (DM1A) | Sigma-Aldrich |
| Anti-Kaninchen, Anti-Maus, polyklonale, sekundäre Antikörper, Horseradish Peroxidase-(HRP-)konjugiert aus Ziegen | Thermo Scientific |

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|--|-------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0.8 %) | Roth |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma-Aldrich |
| Aprotinin | Sigma-Aldrich |
| Biomol Green | Enzo Life Science |
| Bovine Serum Albumin (BSA) Fraktion V | Thermo Scientific |
| Bromphenolblau | Merck |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Merck |
| CAPS [3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid] | Sigma-Aldrich |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | AppliChem |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich |
| D-Ribose-5-Phosphat | Sigma-Aldrich |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | PAN Biotech GmbH |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | Invitrogen |
| Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS), ohne MgCl ₂ /CaCl ₂ | PAN Biotech GmbH |
| Essigsäure | Roth |
| Ethanol | Roth |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Merck |

Material und Methoden

| | |
|---|-------------------|
| Fetales Kälberserum (FCS) | PAN Biotech GmbH |
| Glucose | Merck |
| Glycerol | AppliChem |
| Glycin | Roth |
| Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) | Gibco |
| HEPES [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure] | AppliChem |
| Imidazol | Fluka |
| Inhibitor # 1 | ChemDiv |
| Inhibitor # 48 | ChemDiv |
| Leupeptin | Sigma-Aldrich |
| L-Glutamin | PAN Biotech GmbH |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | AppliChem |
| MES [2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure] | Sigma-Aldrich |
| Methanol | Roth |
| Milchpulver | Roth |
| MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid] | Sigma-Aldrich |
| N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth |
| Natriumazid (NaN ₃) | Merck |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth |
| Natriumdesoxycholat | Sigma-Aldrich |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Roth |
| Nonyl Phenoxy polyethoxyethanol (NP-40) | Fluka |
| <i>para</i> -Nitrophenol (pNP) | Merck |
| Pefabloc SC-Protease Inhibitor [4-(2-Aminoethyl)-benzylsulfonylfluorid-Hydrochlorid] | Roth |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco |
| Pepstatin A | AppliChem |
| Phosphoglykolat (PG) | Sigma-Aldrich |
| PIPES [Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)] | AppliChem |
| PnkP 20-mer, Sequenz: 5' -ATT ACG AAT GCC CAC ACC GC- 3'-Phosphat | Eurofins genomics |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich |
| Precision Plus Protein Standards Dual Color | Bio-Rad |
| Propidiumiodid (PI) | Sigma-Aldrich |
| Puromycin | Calbiochem |
| Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) | Sigma-Aldrich |

| | |
|---|---------------|
| Pyrophosphat (PPi) | Sigma-Aldrich |
| Salzsäure (HCl) | Roth |
| Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (STI) | Sigma-Aldrich |
| Triethanolamin (TEA) | AppliChem |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl) | Roth |
| Triton X-100 | Merck |
| Trypsin-EDTA | Gibco |
| Tween-20 | AppliChem |
| Zitronensäure | Roth |
| <i>beta</i> -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich |

2.1.3 Enzyme

| | |
|--|----------|
| Magnesium-abhängige Phosphatase 1 (MDP1) | AG Gohla |
| Phospho 2 | Origene |
| Phosphoglykolatphosphatase (PGP) | AG Gohla |
| Polynukleotidase 5'-Kinase/3'-Phosphatase (PnkP) | Origene |
| Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase (LHPP) | AG Gohla |

2.1.4 Kits

| | |
|--|-------------------|
| Adipogenesis Assay Kit (MAK040) | Sigma-Aldrich |
| Micro BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific |
| Pierce BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific |
| Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate | Thermo Scientific |

2.1.5 Lösungen und Puffer

SDS-PAGE

| | | |
|--------------------|------------|--------------------------|
| Laufpuffer: | 25 mM | Tris |
| | 200 mM | Glycine |
| | 1 % (w/v) | SDS |
| | pH 8.7 | |
| Lämmli-Puffer, 4x: | 62.5 mM | Tris-HCl |
| | 10 % (v/v) | Glycerol |
| | 5 % (v/v) | β -Mercaptoethanol |
| | 2 % (w/v) | SDS |

| | | |
|------------------------------|--|---|
| | 0.02 % (w/v) pH 6.8 | Bromophenol Blau |
| Sammelgel: | 4 % (w/v) 0.02 % (v/v) 0.002 % (v/v) 0.1 % (w/v) 125 mM pH 6.8 | Acrylamid APS TEMED SDS Tris-HCl |
| Trenngel: | 12 % (w/v) 0.05 % (v/v) 0.003 % (v/v) 0.1 % (w/v) 375 mM pH 8.8 | Acrylamid APS TEMED SDS Tris-HCl |
| Immunoblot | | |
| Anodenpuffer I: | 0.3 M 40 % (v/v) | Tris Methanol |
| Anodenpuffer II: | 25 mM 40 % (v/v) | Tris Methanol |
| Antikörperverdünnungslösung: | 10 mM 0.5 M 1 % (w/v) 0.2 % (w/v) 0.02 % (w/v) pH 7.4 | HEPES NaCl BSA Tween-20 NaN ₃ |
| Blotto Puffer: | 50 mM 2 mM 80 mM 5 % (w/v) 0.2 % pH 8.0 | Tris-HCl CaCl ₂ NaCl Milchpulver NP-40 |

| | | |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| Kathodenpuffer: | 25 mM | Tris |
| | 40 mM | Glycine |
| | 10 % (v/v) | Methanol |
| Färbelösung | | |
| Ponceau S Lösung: | 0.1 % (w/v) | Ponceau S |
| | 5 % (v/v) | Essigsäure |
| Lyse- und Reaktionspuffer | | |
| Acetat-Puffer: | 50 mM | Essigsäure |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | DTT |
| | pH 5.2 | |
| CAPS-Puffer: | 50 mM | CAPS |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | DTT |
| | pH 10.2; 10.7; 11 | |
| Citrat-Puffer: | 50 mM | Zitronensäure |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | DTT |
| | pH 4.3; 4.7; 6.4 | |
| HEPES-Puffer: | 50 mM | HEPES |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | DTT |
| | pH 7.7; 8.4 | |
| Immidazol-Puffer: | 50 mM | Immidazol |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | DTT |
| | pH 7.3 | |
| MES-Puffer: | 50 mM | MES |
| | 5 mM | MgCl ₂ |

Material und Methoden

| | | |
|-------------------------------|--------------|---------------------|
| | 5 mM | DTT |
| | pH 6.6 | |
| MOPS-Puffer: | 50 mM | MOPS |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | DTT |
| | pH 6.8 | |
| Phospho2-Reaktionspuffer: | 50 mM | Imidazol |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 0.01 % (v/v) | Triton X-100 |
| | 5 % (v/v) | Glycerol |
| PIPES-Puffer: | 50 mM | PIPES |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | DTT |
| | pH 6.8 | |
| RIPA-Lyse-Puffer: | 50 mM | Tris |
| | 150 mM | NaCl |
| | 1 % (v/v) | Triton X-100 |
| | 0.1 % (w/v) | SDS |
| | 0.5 % (w/v) | Natriumdesoxycholat |
| TMN-Reaktionspuffer: | 30 mM | TEA |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 30 mM | NaCl |
| | 0.01 % (v/v) | Triton X-100 |
| | 5 mM | DTT |
| | pH 7.5 | |
| TMN-Reaktionspuffer ohne DTT: | 30 mM | TEA |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 30 mM | NaCl |
| | 0.01 % (v/v) | Triton X-100 |
| | pH 7.5 | |

| | | |
|------------------|-------------|-------------------|
| TMN-Lysepuffer: | 30 mM | TEA |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 30 mM | NaCl |
| | 0.2% (v/v) | Triton X-100 |
| | 5 ng/ml | Aprotinin |
| | 5 ng/ml | Leupeptin |
| | 1 mM | Pefabloc |
| | 1 ng/ml | Pepstatin |
| | pH 7.5 | |
| Tris-HCl-Puffer: | 50 mM | Tris-HCl |
| | 5 mM | MgCl ₂ |
| | 5 mM | DTT |
| | pH 8.4; 8.8 | |
| | | |

2.1.6 Software

| | |
|-----------------------------|----------------------------------|
| FlowJo v10 | Becton Dickinson (BD) Bioscience |
| GraphPadPrism version 8.4.3 | GraphPad software |
| ImageJ version 1.53e | NIH |

2.1.7 Technische Geräte

| | |
|--|--------------------|
| Analysenwaage ABS-N/ABJ-NM | Kern |
| BDK laminarflow | Thermo Scientific |
| Centrifuge 5424 | Eppendorf |
| Centrifuge 5424 R | Eppendorf |
| Centrifuge 5804 | Eppendorf |
| CLARIOstar | BMG Labtech |
| FACS Calibur flow cytometer | BD Biosciences |
| Hera cell 240 | Heraeus |
| ImageQuant LAS 4010 Digital Imaging System | GE Healthcarre |
| Lab 850 pH meter | Schott Instruments |
| Labovert type 090-122.012 | Leitz |
| Mini-PROTEAN Tetra Cell electrophoresis system | Bio-Rad |
| Mixing Block MB-102 | BIOER |
| MR Hei-Standard magnetic stirrer | Heideloph |
| Neubauer counting chamber | Marienfeld |

| | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Rotilabo-mini-centrifuge | Roth |
| SpectraMax Plus 384 | Molecular Devices |
| Synergy Neo2 | BioTek |
| Thermo-Mixer compact | Eppendorf |
| Trans-Blot SD semi-dry transfer cell | Bio-Rad |
| Unimax 1010 | Heidolph |
| VORTEX-GENIE 2 vortex mixer | Scientific Industries |

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|----------------|
| Falcon Conical Tube (15 und 50 ml) | Corning |
| Falcon Round-Bottom Polystyrene Tubes 5 ml | Corning |
| Pipettenspitzen | SurPhob |
| Reaktionsgefäße (0.5, 1.5 und 2.0 ml) | Eppendorf |
| Roti-Nylon plus | Roth |
| Spritze und Nadel: Omnifix-F 1 ml (25 G x 5/8 Zoll) | Braun |
| TC-Platte 96 Well, Standard, F | Sarstedt |
| TC-Schale, Standard (35 und 100 mm) | Sarstedt |
| Whatman Papier | A. Hartenstein |
| Zellkultschalen Nunclon Delta (35 und 100 mm) | Nunc |
| Zellschaber | Biologix |

2.1.9 Zellkulturmedien

| | | | |
|----------------------|----------|------------|--------------|
| Vollmedium: | DMEM mit | 4.5 g/l | Glucose |
| | | 10 % (v/v) | FCS |
| | | 2 mM | L-Glutamin |
| | | 100 U/mL | Penicillin |
| | | 100 µg/mL | Streptomycin |
| | | 1 µg/mL | Puromycin |
| Hungermedium: | DMEM mit | 4.5 g/l | Glucose |
| | | 2 mM | L-Glutamin |
| | | 100 U/mL | Penicillin |
| | | 100 µg/mL | Streptomycin |
| Medium ohne Glucose: | DMEM mit | 2 mM | L-Glutamin |
| | | 10 % (v/v) | FCS |

| | |
|-----------|--------------|
| 100 U/mL | Penicillin |
| 100 µg/mL | Streptomycin |

2.1.10 Zelllinie

GC1 spg

ATCC

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

Für die *in vitro* Bestimmung der Phosphatase-Aktivität wurde BIOMOL Green zur Detektion des freigesetzten anorganischen Phosphats verwendet. BIOMOL Green ist eine Abwandlung des klassischen Malachit Grün-Reagenz, bei dem im Gegensatz zu anderen Malachit Grün-basierten Assays vor der Verwendung eine Mischung von verschiedenen Lösungen nicht notwendig ist. Malachit Grün, eine Molybdat-Verbindung, bildet in Anwesenheit von freiem Phosphat einen Phosphomolybdat-Komplex. Es kommt zu einer Farbentwicklung von gelb nach grün, welche kolorimetrisch detektiert werden kann (Itaya und Ui, 1966, und Baykov et al., 1988).

Alle Malachit Grün-Experimente wurden in einer 96-Well Platte mit einem Reaktionsvolumen von 50 μl bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst ist die Enzymaktivität im zeitlichen Verlauf gemessen worden, um lineare Bedingungen der Substratumwandlung zu bestimmen (entspricht dem Beginn einer Reaktion, wenn hauptsächlich die Hinreaktion stattfindet und die Rückreaktion vernachlässigbar ist, siehe Berg et al., 2018). Hierfür wurde das Enzym in die einzelnen Wells verteilt und zum Starten der Reaktion das Substrat zu unterschiedlichen Zeitpunkten hinzugegeben. Die verwendete Enzym- sowie Substrat-Konzentration ist in 2.2.2, 2.2.9 und 2.2.10 angegeben. Anschließend wurden die Reaktionen zeitgleich mit einer Mehrkanalpipette mit 100 μl BIOMOL Green gestoppt und die Bildung des Phosphomolybdat-Komplex im CLARIOstar über einen Zeitraum von 20 Minuten (1 Messung pro Minute) bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Für die Bestimmung des Hintergrundes wurde auf den Enzym-Puffer-Mix zunächst BIOMOL Green und im Anschluss das Substrat hinzugegeben. Aufbauend auf den Ergebnissen der Zeitreihen wurde eine Inkubationszeit festgelegt, die innerhalb des linearen Bereiches der Zeitreihe lag und für weitere Experimente verwendet wurde.

Es wurde eine Standardkurve mit einer vom Hersteller zur Verfügung gestellten Phosphatlösung nach dem Protokoll von BIOMOL Green erstellt, mit welcher die gemessene optische Dichte (OD) in die entsprechend freigesetzte Phosphatkonzentration umgerechnet werden konnten (siehe **Abb. 2.1**).

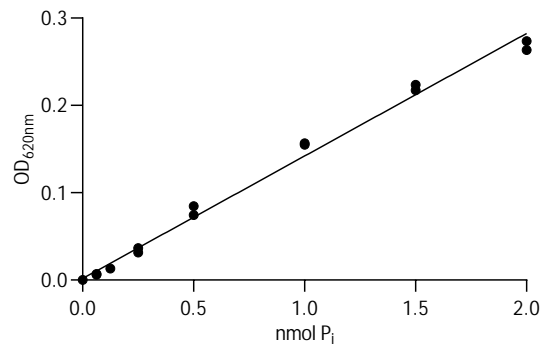


Abbildung 2.1 Phosphat-Standardgerade mit BIOMOL Green

Die Standardkurve dient der Umwandlung der gemessenen Optischen Dichte (OD) einer Phosphatase-Aktivitätsmessung mit BIOMOL Green in die entsprechend freigesetzte Phosphatkonzentration. Es wurde eine serielle Verdünnungsreihe in Duplikaten mit dem Phosphatstandard verdünnt in TMN-Puffer erstellt (50 μ l pro Well): von 2 nmol ($\hat{=}$ 40 μ M) bis 0.063 nmol ($\hat{=}$ 1.25 μ M) anorganisches Phosphat (P_i). Die Absorptionswerte wurden bei einer Wellenlänge von 620 nm im Mikrotiterplattenmessgerät CLARIOstar gemessen. Gezeigt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen, in Duplikaten durchgeführten Messungen, welche jeweils als Punkte dargestellt sind. Mittels linearer Einfachregression wurde eine Regressionsgerade erstellt ($y = 0.1404x + 0.001746$; $R^2 = 0.9916$).

2.2.2 Pufferabhängige PGP-Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit wurden optimale Pufferbedingungen für die PGP-abhängige PG-Dephosphorylierung gesucht. Hierfür wurde die Enzymaktivität des gereinigten Proteins mittels Zeitreihe im TMN-Puffer getestet und eine Inkubationszeit für die Testung der Enzymaktivität mit verschiedenen Puffern festgelegt: Pro Well wurden 10 ng PGP verwendet und mit 200 μ M PG für drei Minuten inkubiert. Enzym und Substrat wurden in Acetat-, CAPS-, Citrat-, HEPES-, Imidazol-, MES-, MOPS-, PIPES-, Tris-HCl-Puffer sowie zum Vergleich in TMN-Reaktionspuffer verdünnt. Die Zusammensetzung der Puffer ist in 2.1.5 beschrieben. Die einzelnen Bedingungen wurden jeweils in technischen Duplikat untersucht (Anzahl der Versuche $n = 2$). Aufgrund der im Vergleich zu vorherigen Experimenten relativ niedrigen Absorptionswerten im TMN-Puffer wurde die Aktivität erneut mit derselben Substratkonzentration und der doppelten PGP-Menge (20 ng pro Well) getestet ($n = 2$), um auszuschließen, dass die in den getesteten Puffern gemessenen niedrigen OD-Werte durch die geringe PGP-Aktivität erklärt werden können. Hierfür wurde die PGP in Acetat-, HEPES-, MES-, MOPS-, PIPES-, TNM- und Tris-HCl-Puffer verdünnt. Auf die Erstellung von Phosphat-Standardkurven für die jeweiligen Puffer zur Umwandlung der gemessenen OD in die entsprechende Phosphatkonzentration wurde in diesem Experiment auf Grund der geringen Enzymaktivität verzichtet.

2.2.3 Zelllinie

Für diese Arbeit wurden Versuche mit der murinen spermatogonialen Zelllinie GC1-spg (GC1-Zellen) durchgeführt. Mittels RNA-Interferenz wurde die Untersuchung von Zellen mit normaler und herabgesetzter PGP-Expression ermöglicht. Wie bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben (Seifried et al., 2014, und Segerer et al., 2018), wurden Zellen verwendet, die mit lentiviralen Partikeln infiziert wurden und dadurch sogenannte short hairpin RNA (shRNA) enthalten. Eine dieser shRNAs ist gegen PGP gerichtet (MISSION shRNA Program SHCLND-NM_025954). Als Kontrolle wurde eine shRNA verwendet (MISSION non-targeting shRNA control SHC002), deren Sequenz zu keiner bekannten humanen oder murinen Gensequenz passt, da die Sequenz eine mindestens vier Basenpaare lange Fehlpaarung zu jeder bekannten humanen oder murinen Gensequenz enthält (Seifried et al., 2014). Als Wachstumsmedium wurde Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) verwendet, zu dem 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin sowie Penicillin, Streptomycin und Puromycin hinzugefügt wurden (von hier an DMEM-Vollmedium genannt, siehe auch 2.1.9). Die Zellen wurden bei 37°C, einer CO₂ Konzentration von 7 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % im Inkubator in Zellkulturschalen kultiviert.

2.2.4 Endogene PGP-Aktivität in GC1-Zellysaten

Herstellung der Lysate: Die GC1-Zellen wurden auf eine 3 cm Zellkulturschale ausgesät (ca. 320.000 Zellen pro Schale mit PGP-shRNA und ca. 300.000 Zellen pro Schale mit Kontroll-shRNA), sodass sie am folgenden Tag konfluent waren. Die Zellen wurden zwei Mal mit 1 ml 0.9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen, anschließend mit 200 μ l eiskaltem TMN-Lysepuffer benetzt und mit einem Zellschaber von der Schale abgekratzt. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und, um das Zellysat weiter aufzuschließen, wurden sie 15-mal durch eine 1 ml Einmalspritze (25 G x 5/8 Zoll) gezogen. Nachdem das Lysat für 15 Minuten mit 15.000 rpm bei 4°C zentrifugiert wurde, ist der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt worden.

Messung der PGP-Aktivität: Die Bestimmung der Phosphatfreisetzung im zeitlichen Verlauf erfolgte mittels BIOMOL Green Lösung analog zu den Versuchen mit gereinigtem Protein (siehe 2.2.1). Pro Well wurden 2.5 μ l Lysat in 22.5 μ l TMN-Reaktionspuffer verdünnt. Zum Starten der Reaktion wurden 25 μ l PG in TMN-Reaktionspuffer (finale PG-Konzentration in 50 μ l: 200 μ M) hinzugefügt und die Reaktion jeweils nach 2.5, 5, 10, 15 und 20 Minuten mit 100 μ l BIOMOL Green gestoppt. Für die Bestimmung des Hintergrundes wurde das Substrat nach Zugabe

von BIOMOL Green hinzugegeben. Die Messungen erfolgten in Duplikaten. Das Experiment ist in **Abbildung 2.2 A** schematisch dargestellt. Pro Experiment wurde die Aktivitätsmessung beim ersten Mal zweimal mit je $2.5\ \mu\text{l}$ des Lysats und beim zweiten und dritten Mal dreimal durchgeführt. Anschließend wurde der Mittelwert aus diesen zwei bzw. drei Messungen für das jeweilige Experiment bestimmt (Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente $n = 3$). Um die Aktivität pro μg Gesamtproteinmenge zu berechnen, wurde die Proteinkonzentration im Lysat unter Verwendung des Pierce BCA Protein Assay Kits bestimmt (siehe 2.2.11).

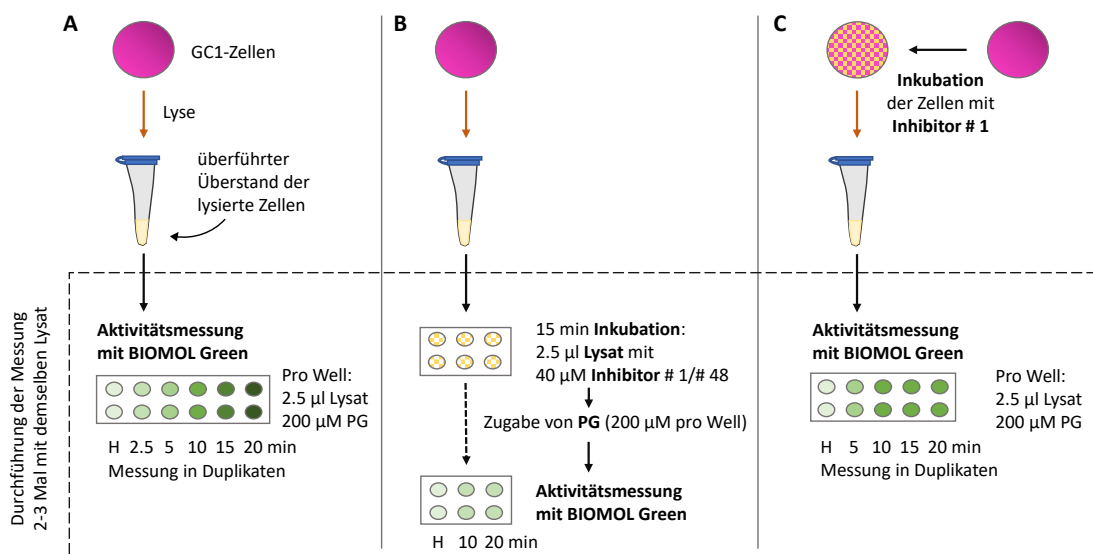


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Versuche zur Messung und Hemmung der endogenen PGP-Aktivität mit BIOMOL Green

A: Messung der endogenen PGP-Aktivität in GC1-Zellysaten **B:** Wirkung der Inhibitoren # 1 und # 48 im Zellysate **C:** Wirkung des Inhibitors # 1 auf GC1-Zellen. **A-C:** H = Hintergrundmessung. Die ausführliche Beschreibung der Versuche befindet sich in 2.2.4 bzw. 2.2.5.

2.2.5 Hemmung der endogenen PGP-Aktivität

Wirkung der Inhibitoren # 1 und # 48 im Zellysate: Um zu untersuchen, ob durch die Inhibitoren # 1 und # 48 die endogene PGP-Aktivität im hergestellten GC1-Zellysate gehemmt werden kann, wurden die Zellysate zunächst mit den Inhibitoren inkubiert und anschließend das Substrat PG hinzugefügt. Als erstes wurden $5\ \mu\text{l}$ einer $400\ \mu\text{M}$ Inhibitorlösung (# 1 und # 48, Stammkonzentration $10\ \text{mM}$ verdünnt in TMN-Reaktionspuffer, Endkonzentration: $40\ \mu\text{M}$) und als Kontrolle DMSO, das Lösungsmittel der Inhibitoren, in der gleichen Verdünnung ($\hat{=}$ 10 % DMSO)

in die 96-Well Platte verteilt. Anschließend wurden $2.5 \mu\text{l}$ Lysat mit $37.5 \mu\text{l}$ TMN-Reaktionpuffer verdünnt, zum vorgelegten Inhibitor hinzugefügt und für 15 Minuten mit diesem inkubiert. Zum Starten der Reaktion wurden mit einer Multikanalpipette $5 \mu\text{l}$ einer 2 mM PG-Lösung (PG-Konzentration im Reaktionsvolumen: $200 \mu\text{M}$) verteilt und die Reaktion nach 10 bzw. 15 Minuten mit $100 \mu\text{l}$ BIOMOL Green beendet. Die gebildete Phosphatkonzentration wurde bestimmt (siehe 2.2.1) und pro μg Gesamtproteinmenge der Lysate berechnet. Die Gesamtproteinmenge wurde mittels Pierce BCA Protein Assay Kit ermittelt (siehe 2.2.11). Jede Bedingung wurde in Duplikaten mit Inhibitor # 1 in $n = 3$ bzw. mit Inhibitor # 48 in $n = 2$ unabhängigen Versuchen getestet. Pro Experiment wurde die Inkubation mit den Inhibitoren und die anschließende Aktivitätsmessung beim ersten Mal zweimal mit je $2,5 \mu\text{l}$ des Lysats und beim zweiten und dritten Mal dreimal durchgeführt. Anschließend wurde der Mittelwert aus diesen zwei bzw. drei Messungen für das jeweilige Experiment bestimmt. Das Experiment ist in **Abbildung 2.2 B** schematisch gezeigt.

Wirkung des Inhibitors #1 auf GC1-Zellen: Es wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die den Einfluss einer Behandlung der GC1-Zellen mit Inhibitor #1 auf die PGP-Aktivität näher untersuchten. Getestet wurden unterschiedliche Zellkulturmedien, Inhibitorkonzentrationen und Inkubationszeiten. Die verschiedenen Behandlungen der Zellen sind in **Tabelle 2.1** angegeben. Die Zusammensetzung der Medien ist in 2.1.9 beschrieben. Außerdem wurden erste Versuche zur Reversibilitätstestung gemacht.

Tabelle 2.1 Wirkung des Inhibitors # 1 auf GC1-Zellen: Übersicht über die getesteten Bedingungen

| Medium | Inhibitorkonzentration in μM | DMSO-Kontrolle in % | Inkubationszeit in Minuten |
|-------------------|---|---------------------|----------------------------|
| DMEM-Vollmedium | | | |
| DMEM-Hungermedium | 100 | 0.1 | 60 |
| HBSS mit 1 % BSA | | | |
| | 50 | 0.05 | |
| HBSS | 100 | 0.1 | 60 |
| | 200 | 0.2 | |
| | | | 15 |
| HBSS | 200 | 0.2 | 30 |
| | | | 45 |

Die GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA wurden auf 3 cm Zellkulturschalen ausgesät, sodass sie am nächsten Tag konfluent waren (ca. 300.000 Zellen pro Schale). Das DMEM-Vollmedium wurde abgesaugt, der konfluente Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen und 1 ml frisches Medium, versetzt mit Inhibitor # 1 bzw. DMSO als Solvenskontrolle, auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen lysiert (siehe 2.2.4) und die PGP-Aktivität in $2.5 \mu\text{l}$ Lysat gegenüber $200 \mu\text{M}$ PG untersucht. Analog zu den vorangegangenen Versuchen wurde mittels BIOMOL Green die Menge des freigesetzten Phosphats bestimmt (siehe auch **Abb. 2.2 C**). Unter Verwendung des Pierce BCA Protein Assay Kits wurde die Proteinkonzentration der Lysate und damit die gebildete Phosphatmenge pro μg Gesamtproteinmenge berechnet (siehe 2.2.11). Die PGP-Aktivitätsmessung der GC1-Zellen, die mit Inhibitor # 1 bzw. DMSO, gelöst in DMEM-Vollmedium, DMEM-Hungermedium (enthält DMEM-Medium mit 4.5 g Glucose pro Liter, zu dem kein FCS hinzugefügt wird) und HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) mit 1% BSA, behandelt wurden, wurde zweimal mit demselben Zelllysate in Duplikaten durchgeführt ($n = 1$). Die Inhibitorbehandlung zur Testung verschiedener Inhibitorkonzentrationen in HBSS wurde mit $n = 3$ unabhängigen Experimenten durchgeführt. Zur Testung verschiedener Inkubationszeiten mit Inhibitor # 1 in HBSS wurde die Inhibitorbehandlung mit $n = 5$ unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wiederholt. Die Aktivitätsmessung wurde pro Lysat dreimal in Duplikaten wiederholt und der Mittelwert aus diesen drei Messungen für das Experiment bestimmt.

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Hemmung der PGP-Aktivität verändert, wenn die Zellen nach der Inhibitorbehandlung mit PBS gewaschen und in HBSS ohne Inhibitor inkubiert werden, wurde das folgende Experiment gemacht. Es wurden drei Bedingungen verglichen: eine 30-minütige Behandlung mit Inhibitor # 1 ($200 \mu\text{M}$ in HBSS), die gleiche Behandlung mit anschließendem Waschen und 10 bzw. 30 Minuten Inkubation in HBSS ohne Inhibitor. Als Kontrolle wurden die Zellen mit 0.2% DMSO behandelt (zur Verdeutlichung der Behandlung dient **Abb. 2.3**). Die jeweilige Bedingung wurde im Duplikat in $n = 3$ unabhängigen Experimenten getestet. Pro Lysat wurde die Aktivitätsmessung dreimal in Duplikaten mit demselben Lysat durchgeführt und der Mittelwert aus diesen drei Messungen bestimmt.

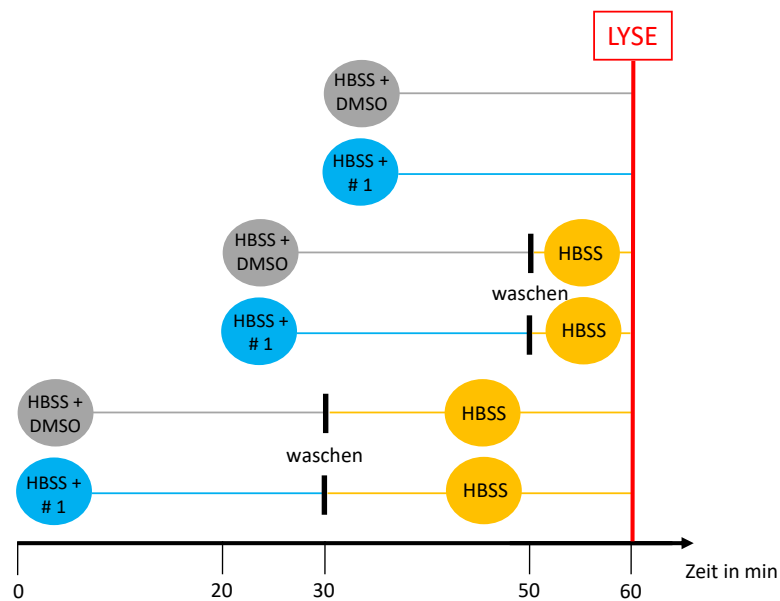


Abbildung 2.3 Testung der Reversibilität

Es sind die verschiedenen Behandlungsschritte der GC1-Zellen dargestellt, welche gemacht wurden, um die Reversibilität der Hemmung durch Inhibitor # 1 zu untersuchen.

2.2.6 TAG-Bestimmung

Für die Bestimmung der TAG-Konzentration in GC1-Zellen nach Behandlung der Zellen mit Inhibitor # 1 bzw. DMSO wurde das Adipogenesis Assay Kit verwendet. Die Zellen wurden auf 3 cm Zellkulturschalen ausgesät, sodass sie nach zwei Tagen konfluent waren (ca. 170.000 Zellen pro Schale mit PGP-shRNA und ca. 160.000 Zellen pro Schale mit Kontroll-shRNA). Nach dem Waschen mit 1 ml PBS wurden die Zellen mit 50 μ M und 200 μ M Inhibitor # 1 bzw. 0.1 % DMSO in HBSS für 60 Minuten behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Die Proben wurden nach Empfehlungen des Herstellers verarbeitet: Um die Lipide zu lösen wurden 150 μ l Lipidextraktionspuffer auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden von der Zellkulturschale abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei 90-100 °C inkubiert. Für die Hydrolyse der TAG in Glycerol und freie Fettsäuren wurden die homogenisierten Proben mit 2 μ l Lipaselösung gemischt. Nach 10 Minuten wurde der Masterreaktionsmix, bestehend aus Enzym-Mix, Puffer und Indikator, hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dadurch oxidiert das entstandene Glycerol und es kommt zu einem Farbumschlag des Indikators, welcher proportional zur gebildeten TAG-Menge ist und kolorimetrisch bei A_{570} im SpectraMax, einem Mikroplattenlesegerät, gemessen wurde. Mit dem im Assay Kit enthaltenen TAG-Standard

wurde eine Standardgerade erstellt. Anhand dieser wurden die Absorptionswerte der gemessenen Proben in die entsprechende Menge TAG umgerechnet. Die Proben wurden im Duplikat gemessen. Das Experiment wurde mit $n = 4$ unabhängig voneinander behandelten Zellpräparationen wiederholt. Die Gesamtproteinmenge der Proben wurde unter Verwendung des Pierce BCA Protein Assay Kits bestimmt, um die TAG-Menge pro μg Gesamtproteinmenge zu ermitteln (siehe 2.2.11).

2.2.7 Lebend-/Tod-Diskriminierung mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie kann verwendet werden, um die Viabilität von Zellen zu untersuchen. Die behandelten Zellen wurden nach der Behandlung in Suspension gebracht und mit Propidium Iodid (PI) inkubiert. PI kann die permeable Zellmembran von toten Zellen überwinden und als Nukleinsäureinterkalator die geschädigten Zellen färben. Das FACS Calibur flow cytometer wurde für die Analyse der Zellen verwendet und die Daten wurden mittels FlowJo ausgewertet. **Abbildung 2.4** verdeutlicht beispielhaft die Auswertung. Durch das sogenannte Gating wird entschieden, welche Zellen analysiert werden (schwarze Umrandung in **Abb. 2.4 A**). Mittels verschiedener Detektoren wird die Intensität der Fluoreszenz gemessen. **Abbildung 2.4 B** zeigt einen Dot-Plot, bei dem die gemessene Fluoreszenz von zwei verschiedenen Detektoren aufgetragen ist (FL1 misst den maximal erreichten grünen Fluoreszenzwert einer Zelle, FL2 den maximal erreichten roten Fluoreszenzwert einer Zelle). Es lassen sich zwei Populationen unterscheiden: eine, die nicht rot fluoresziert (entspricht den lebendigen Zellen), und eine, die ein intensives rotes Fluoreszenzmuster zeigt (entspricht den toten Zellen, die mit PI angefärbt wurden). Beide Populationen zeigen keine grüne Fluoreszenz. In **Abbildung 2.4 C** ist für die erreichten roten Fluoreszenzwerte die jeweils gemessene Anzahl an Zellen aufgetragen. Es lassen sich wieder die beiden Populationen abgrenzen, deren prozentualer Anteil mit Hilfe dieser Histogramme bestimmt wurde.

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die in der Arbeitsgruppe verwendeten Zellkulturmedien (DMEM-Vollmedium, DMEM-Hungermedium und DMEM-Medium ohne Glucose, für die genaue Zusammensetzung der Medien siehe 2.1.9) auf die Integrität der Zellen haben und ob es einen Unterschied zwischen GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA und PGP-shRNA gibt. Anschließend wurde der Einfluss des Inhibitors # 1 gelöst in HBSS auf die Überlebensrate der Zellen analysiert.

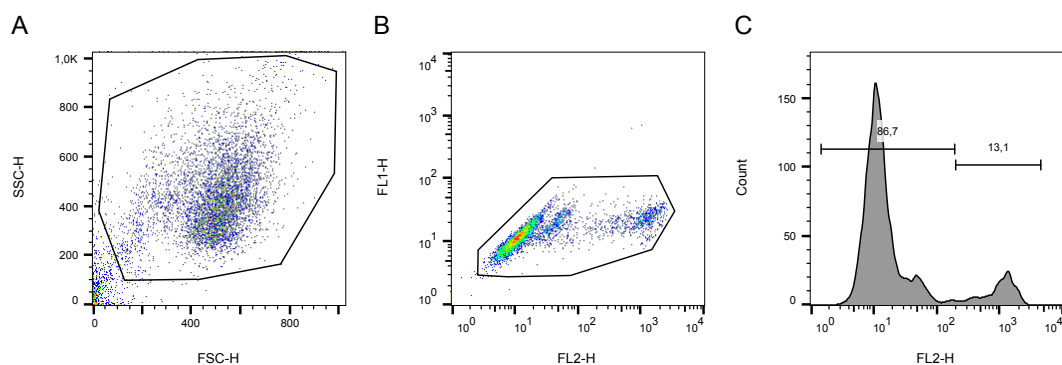


Abbildung 2.4 Beispielfhafte Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen
A: Beispiel-Dot-Plot einer Probe mit GC1-Zellen. Jeder Punkt entspricht einer Zelle. FSC = Forward Scatter (engl. für Vorwärtsstreuung, Maß für die Zellgröße), SSC = Side Scatter (engl. für Seitwärtsstreuung, Maß für die Granularität der Zellen). **B:** Dot-Plot, der die Intensität der Fluoreszenz (FL) der analysierten Zellen zeigt. Umrandung der Zellen, die in **C** dargestellt sind. **C:** Die erstellten Histogramme wurden zur Analyse der Viabilität der Zellen verwendet: Aufgetragen ist die jeweilige Anzahl an Zellen, die den gleichen roten Fluoreszenzwert zeigen. Es lassen sich zwei Populationen abgrenzen, deren prozentualer Anteil in der Abbildung angegeben ist. **A, B und C:** Erstellung der Abbildung mittels FlowJo. Weitere Details sind im Text beschrieben.

Einfluss verschiedener Zellkulturmedien: Die GC1-Zellen wurden in einer 96-Well Platte (ca. 8.000 Zellen pro Well mit Kontroll-shRNA, ca. 9.600 Zellen pro Well mit PGP-shRNA) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 150 μ l PBS gewaschen und jeweils 100 μ l Medium auf die Zellen gegeben. Jede Bedingung wurde im Duplikat untersucht. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium eines Wells jeweils in ein FACS-Falcon überführt, um keine abgelösten Zellen zu verlieren. Die Zellen wurden mit 100 μ l warmen PBS gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde gesammelt. Auf die Zellen wurde anschließend für 10 Minuten warmes Trypsin gegeben, um die Zellen von der Platte zu lösen. Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor wurde im Verhältnis 1:10 mit warmem PBS gemischt und von dieser Mischung wurden 250 μ l ins Well gegeben. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren in Suspension gebracht und anschließend in das zugehörige FACS-Falcon überführt. Vor der jeweiligen Messung wurden 5 μ l PI (Endkonzentration: 1 μ g/ μ l) hinzugegeben und pro Bedingung ca. 5.000 Zellen gezählt (Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Versuche $n = 3$).

Einfluss der Behandlung mit Inhibitor # 1: Analog zur Untersuchung der verschiedenen Zellkulturmedien, wurden für die Testung des Inhibitoreinflusses die Zellen mit Kontroll- und PGP-shRNA in einer 96-Well Platte ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die konfluenten Zellen mit 150 μ l PBS gewaschen und im Duplikat für

60 Minuten mit 100 sowie 200 μM Inhibitor # 1 bzw. der entsprechenden Konzentration der Solvenskontrolle DMSO (0.1 sowie 0.2%) gelöst in 100 μl HBSS behandelt. Das Überführen ins Falcon, Färben sowie Messen der Zellen erfolgte ebenfalls analog zu dem Experiment, welches den Einfluss der Zellkulturmedien auf die Zellviabilität untersuchte. Die Anzahl der unabhängig durchgeführten Experimente beträgt $n = 3$ für GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA und $n = 2$ für GC1-Zellen mit PGP-shRNA.

2.2.8 Bestimmung der Inhibitorkonzentration in GC1-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Absorptionsmessungen versucht, die Konzentration des Inhibitors in den Zellen zu berechnen, um zu bestimmen, wie viel von dem im Medium verdünnten Inhibitor # 1 sich nach der Inkubationszeit in den behandelten Zellen befindet. Zunächst wurden die Absorptionseigenschaften des Inhibitors untersucht. Anschließend wurde eine Standardgerade berechnet, welche für die Umrechnung der Absorptionswerte der behandelten Zellsate in μg Inhibitor # 1 diene.

Bestimmung des Absorptionsmaximums und Erstellung einer Standardgeraden: Der Inhibitor # 1 (Stammkonzentration: 10 mM) wurde in 100 μl Zellysate (Herstellung des Zellysats s. u.) auf eine Konzentration von 200 μM verdünnt. Im Duplikat wurde im Synergy Neo2, einem Mikrotiterplattenlesegerät, die Absorption in 1 nm-Schritten in einem Wellenlängenbereich von 280-350 nm gemessen und ein Absorptionsspektrum erstellt. Um den unspezifischen Absorptionshintergrund zu berücksichtigen, wurden zwei Wells mit Zellysate ohne Inhibitor gemessen und vom Signal mit Inhibitor subtrahiert. Das dort bestimmte absolute Absorptionsmaximum bei 290 nm sowie das lokale Maximum von 310 nm wurden verwendet, um jeweils eine Standardgerade des im Zellysate verdünnten Inhibitors # 1 zu berechnen. Mittels serieller 1:2-Verdünnung wurden Konzentrationen von 12.5 bis 200 μM hergestellt und je 100 μl pro Well im Duplikat gemessen. Auch hier erfolgte, wie oben beschrieben, eine Hintergrundbestimmung, die in den Berechnungen berücksichtigt wurde. Die Verdünnungsreihe wurde sowohl im Mikrotiterplattenlesegerät CLARIOstar als auch im Synergy Neo2 gemessen, um mögliche Unterschiede zwischen den Geräten zu erfassen. Aufgrund der geringfügig höheren OD bei 290 nm und den geringen Unterschieden im Synergy Neo2 und CLARIOstar, wurden alle weiteren Messungen bei dieser Wellenlänge im CLARIOstar durchgeführt. Außerdem wurde, um eine mögliche Beeinflussung der Absorption durch das Lösungsmittel DMSO zu testen, analog zu der Erstellung der Standardgeraden, eine Verdünnungsreihe nur mit DMSO erstellt und das Signal bei 290 nm gemessen. Für jede Messung wurde

der Inhibitor in 70 μl Zellysat verdünnt und die OD der Standardgeraden bestimmt. Mittels linearer Einfachregression wurde aus insgesamt zwölf verschiedenen Messungen eine Standardgerade erstellt und für die Umrechnung verwendet (s. u.).

Herstellung des Zellysats für die Bestimmung der Standardgerade: Die auf einer 10 cm Zellkulturschale konfluent gewachsenen GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA wurden, nachdem das Medium abgesaugt wurde, mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 1 ml Trypsin-EDTA für fünf Minuten im Inkubator inkubiert, um die Zellen von der Zellkulturschale zu lösen. Das Trypsin-EDTA wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden in 5 ml DMEM-Medium resuspendiert. Mittels Neubauer Zählkammer wurden die Zellen gezählt und eine bestimmte Anzahl in ein neues Falcon überführt. Die Zellen wurden bei 1050 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde mit 3 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut für fünf Minuten bei 1050 rpm zentrifugiert. Nachdem das PBS abgesaugt wurde, wurde das Zellpellet in eiskaltem RIPA-Lyse-Puffer resuspendiert (500 μl Puffer pro 1 Millionen Zellen). Das Lysat wurde bei 4 °C mit 15.000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieser zum Verdünnen des Inhibitors verwendet.

Bestimmung der Inhibitorkonzentration in behandelten GC1-Zellen: Die GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA wurden für die Versuche auf eine 3 cm Zellkulturschale ausgesät, sodass sie zwei Tage später konfluent waren (ca. 160.000 Zellen pro Schale). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden vor der Behandlung mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Medium mit Inhibitor # 1, bzw. DMSO als Kontrolle, auf die Zellen gegeben. Die unterschiedlichen Bedingungen der Behandlung sind in **Tabelle 2.2** angegeben. Nach der Behandlung wurden die Zellen erneut mit 1 ml PBS gewaschen und 200 μl eiskalter RIPA-Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst, die Suspension wurde mit einem Vortexer geschüttelt und anschließend bei 4 °C mit 15.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von jeder Probe wurden 70 μl pro Well im Duplikat in eine 96-Well-Platte gegeben, die Standardgerade erstellt (s. o.) und die Absorption bei 290 nm gemessen. Mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit wurde die Gesamtproteinmenge der Proben bestimmt (siehe 2.2.11). Für die mit Inhibitor # 1 gelöst in DMEM-Vollmedium und HBSS behandelten Zellen wurde die gemessene OD mit der Standardgeraden in μg Inhibitor # 1 pro μg Gesamtproteinmenge umgerechnet. Vor der Umrechnung wurde die OD der DMSO-Kontrolle abgezogen.

Tabelle 2.2 Messung der Inhibitor # 1-Konzentration in GC1-Zellen: Übersicht über die getesteten Bedingungen

Hungerm. = Hungermedium, Vollm. = Vollmedium, für die Zusammensetzung der Medien siehe 2.1.9.

| Medium | Inkubationszeit in Std. | Inhibitorkonzentration in μM | DMSO-Kontrolle in % | Anzahl der Versuche |
|---------------|-------------------------|---|---------------------|---------------------|
| DMEM-Vollm. | 2 | 100 | 0.1 | 6 |
| DMEM-Vollm. | 3 | 100 | 0.1 | 8 |
| DMEM-Hungerm. | 3 | 100 | 0.1 | 2 |
| HBSS | 1 | 100 | 0.1 | 3 |
| HBSS | 1 | 200 | 0.2 | 3 |

2.2.9 Inhibitionskinetik von Inhibitor # 48

Um Hinweise auf die Art der PGP-Hemmung durch Inhibitor # 48 zu bekommen, wurde die Umsatzgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen für verschiedene Inhibitorkonzentrationen untersucht. Es wurde zunächst mittels Zeitreihe eine passende Enzymkonzentration sowie eine geeignete Inkubationszeit bestimmt (vgl. 2.2.1). Für die Testung wurde eine Reaktionszeit von drei Minuten festgelegt. Pro Well wurden 30 ng murine PGP ($\hat{=}$ 13.78 nM) in 35 μl TMN-Reaktionspuffer zunächst für 15 Minuten mit 5 μl Inhibitor inkubiert. Für die Bestimmung des Hintergrundes wurden 35 μl TMN-Reaktionspuffer ohne Enzym auf den Inhibitor gegeben. Es wurden jeweils 16 Wells mit derselben Inhibitorkonzentration gefüllt. Anschließend wurden in jeweils zwei Wells pro Inhibitorkonzentration 10 μl von einer der acht PG-Konzentration gegeben, um die Reaktion zu starten. **Abbildung 2.5** zeigt das Pipettierschema. Die Reaktion wurde nach der festgelegten Reaktionszeit (drei Minuten) mit BIOMOL Green gestoppt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Durch eine nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten wurden die K_M sowie die V_{max} für die jeweilige Inhibitorkonzentration bestimmt. Außerdem wurde mit V_{max} und der molaren Masse der murinen PGP von 43.541 kDa die k_{kat} berechnet, um so die katalytische Effizienz (k_{kat}/K_M) angeben zu können.

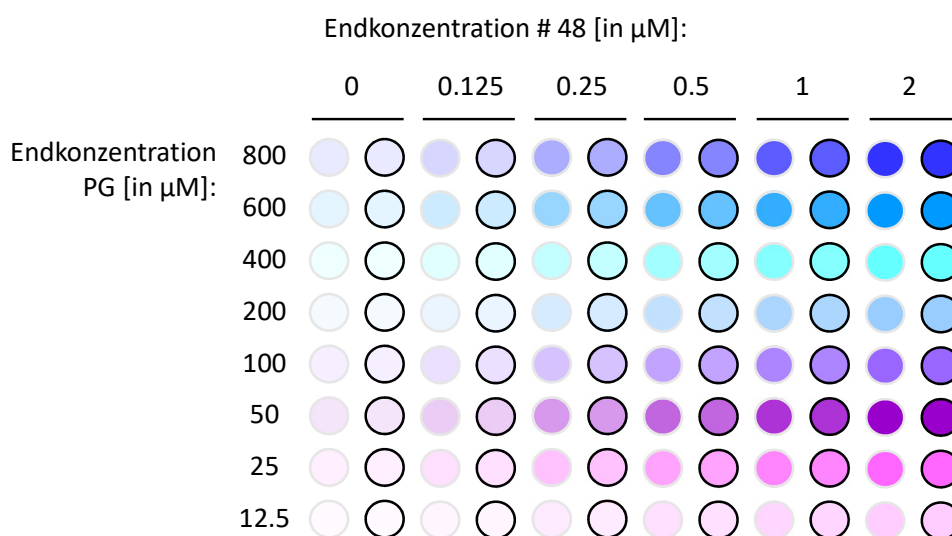


Abbildung 2.5 Pipettierschema zur Bestimmung der Inhibitionskinetik von Inhibitor # 48

96-Well Platte mit Veränderung der Substrat- und Inhibitorkonzentrationen in vertikaler bzw. horizontaler Richtung. Schwarz umkreiste Wells enthielten Inhibitor, Enzym und Substrat. Grau umkreiste Wells enthielten für die Hintergrundbestimmung Inhibitor und Substrat, jedoch kein Enzym.

2.2.10 Selektivitätsuntersuchungen

Um die Selektivität der biochemisch charakterisierten PGP-Inhibitoren zu untersuchen (vgl. Engelmann, 2019, und Frankenbach, 2017), beschäftigt sich ein Teil dieser Arbeit mit der Bestimmung der Inhibitorenwirkung auf andere HAD-Phosphatasen. Es wurde die Wirkung des Inhibitors # 48 auf die HAD-Phosphatasen Magnesium-abhängige Phosphatase 1 (MDP1), Phospho 2, Polynukleotidase 5'-Kinase/3'-Phosphatase (PnkP) und Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase (LHPP) untersucht. Zum Vergleich wurde die Wirkung der Inhibitoren # 1, # 2 und # 9 erneut getestet, welche bereits in vorhergehenden Arbeiten untersucht wurden (siehe Frankenbach, 2017, und Yesilyurt, 2017).

Für die Experimente wurde zunächst die Enzymaktivität im zeitlichen Verlauf als Unikat bestimmt, um dann eine Inkubationszeit, welche im linearen Bereich der Zeitreihe lag, auszuwählen (vgl. 2.2.1). Diese wurde für die Testung der Inhibitorenwirkung auf das jeweilige Enzym genutzt. Für die Charakterisierung der Wirkung wurden die Inhibitoren, sowie DMSO als Solvenskontrolle, in die 96-Well Platte verteilt (wie bei 2.2.5). Das Enzym wurde im Reaktionspuffer verdünnt, zum vorgeleg-

ten Inhibitor hinzugefügt und für 15 Minuten mit diesem inkubiert. Zum Starten der Reaktion wurde das Substrat mit der Multikanalpipette verteilt und die Reaktion nach der ermittelten Inkubationszeit mit BIOMOL Green gestoppt. Alle Inhibitoren wurden bei einer Endkonzentration von $40 \mu\text{M}$ getestet. Für die Bestimmung des Hintergrundes wurde auch hier das Substrat nach Zugabe von BIOMOL Green hinzugegeben. Die gemessene OD wurde mittels Standardgerade in nmol Phosphat umgerechnet und ist pro mg Protein angegeben. Jede Bedingung wurde im Duplikat in $n = 3$ unabhängigen Experimenten untersucht.

MDP1: Für die Bestimmung der Inhibitorenwirkung auf die MDP1 wurde für die Zeitreihe $0.1 \mu\text{g}$ Enzym ($\hat{=} 0.11 \mu\text{M}$) mit 4mM D-Ribose-5-Phosphat pro Well für 0 (zur Hintergrundbestimmung), 3, 5 und 8 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Menge Enzym mit den Inhibitoren # 1 und # 48 behandelt und für vier Minuten mit 4mM D-Ribose-5-Phosphat in Duplikaten inkubiert. Die Versuche wurden in TMN-Reaktionspuffer durchgeführt.

Phospho 2: Mit $1 \mu\text{g}$ Phospho 2 ($\hat{=} 0.72 \mu\text{M}$) und 0.5mM Pyridoxalphosphat (PLP) pro Well wurde die Enzymaktivität im zeitlichen Verlauf in Phospho 2-Reaktionspuffer untersucht und dafür die Reaktion nach 0 (zur Hintergrundbestimmung), 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten gestoppt. Für die Bestimmung der Inhibitorwirkungen der Inhibitoren # 1, # 9 und # 48 wurden zu der jeweiligen Enzym-Inhibitor-Mischung nach 15-minütiger Inkubation $5 \mu\text{l}$ PLP (Endkonzentration: 0.5mM) hinzugegeben und nach der ermittelten Reaktionsdauer von zwei Minuten die Reaktion mit BIOMOL Green beendet.

PnkP: Es wurden für die Testung der PnkP $0.01 \mu\text{g}$ Enzym ($\hat{=} 3.5 \text{nM}$) mit $10 \mu\text{M}$ 20mer für 0 (zur Hintergrundbestimmung), 5, 10 und 20 Minuten inkubiert. Das verwendete Substrat 20mer ist ein artifizielles Substrat, ein Oligonukleotid, welches ähnlich einem DNA-Fragment am 3'-Ende phosphoryliert ist (Sequenz von 20-mer: 5' -ATT ACG AAT GCC CAC ACC GC- 3'-Phosphat). Für die Untersuchung der Inhibitorenwirkung von Inhibitor # 1 und # 48 wurde eine Reaktionszeit von vier Minuten verwendet. Die Reaktionen fanden in TMN-Reaktionspuffer ohne DTT statt.

LHPP: Die Testung der LHPP erfolgte mit zwei verschiedenen Substraten: Imidodiphosphat (PNP) und anorganischem Pyrophosphat (PPi). Für die Zeitreihe wurden $0.25 \mu\text{g}$ Enzym ($\hat{=} 0.17 \mu\text{M}$) pro Well mit entweder 2mM PPi oder 0.125mM PNP

für 0 (zur Hintergrundbestimmung), 5, 10, 20 und 30 Minuten inkubiert. Die Wirkung der Inhibitoren # 1, # 2, # 9 und # 48 auf die Phosphatase wurde in den oben genannten Konzentrationen untersucht und die Reaktionen nach 20 Minuten beendet. Enzym und Substrat wurden in TMN-Reaktionspuffer verdünnt.

2.2.11 Proteinanalytik

Bestimmung der Gesamtproteinmenge von Lysaten mittels BCA-Assay

Die Gesamtproteinmenge der hergestellten Zellysate wurde mittels Micro BCA Protein Assay Kits bestimmt. Zweiwertige Kupferionen werden unter alkalischen Bedingungen proportional zu der vorhandenen Proteinkonzentration zu einwertigen Kupferionen reduziert (Biuret Reaktion). Zwei Bicinchoninsäuremoleküle bilden mit diesen einwertigen Kupferionen einen violetten Farbstoffkomplex, welcher kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann.

Das zu bestimmende Lysat (wenn nicht anders angegeben, in Duplikaten bestimmt), sowie der vom Hersteller zur Verfügung gestellte BSA-Standard, wurden in PBS verdünnt und in die 96-Well-Platte verteilt (Gesamtvolumen 150 μ l). Lösung A, B und C des BCA-Assay-Kits wurden im Verhältnis 25:24:1 gemischt und pro Well wurden 150 μ l auf das vorgelegte Lysat sowie den BSA-Standard verteilt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Absorption im Mikrotiterplattenlesegerät CLARIOstar bei 562 nm gemessen. Der BSA-Standard diente zur Erstellung einer Standardgeraden (0-10 μ g/ μ l), mit welcher die Absorptionswerte der Lysate in die entsprechende Proteinkonzentration umgerechnet wurden.

Sulfododecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Sulfododecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird verwendet, um Proteine nach ihrer molekularen Masse aufzutrennen (Laemmli, 1970). Die Zellysate wurden mit Laemmli-Puffer gemischt und für drei Minuten auf 95°C erhitzt. Die Proteine werden durch die Hitze und die Wirkung des im Probenpuffer enthaltenen SDS und β -Mercaptoethanol denaturiert. Die Proben wurden im Sammelgel zunächst bei konstanter elektrischer Spannung von 75 V konzentriert. Anschließend erfolgte die Separierung im Trenngel bei konstanten 150 V. Durch das Maskieren der Eigenladung durch Anlagerung des stark negativ geladenen Detergens SDS wandern die Proteine abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch das verwendete 12%-ige Polyacrylamidgel in Richtung Anode. Um anschließend die Größe der Proteine zu ermitteln, wurde zusätzlich der Marker Precision

Plus Protein Dual Color Standards aufgetragen, welcher rekombinant hergestellte Proteine bekannter Molekülmasse enthält.

Western-Blot und Immundetektion

Die mit der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit einem Semi-Dry-Blot von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dafür wurden Whatman-Filterpapiere, die Membran und das Gel in verschiedenen Puffern getränkt und gestapelt. Den Boden bilden zwei Whatman-Filterpapiere, welche im Anodenpuffer I inkubiert wurden, darauf folgte ein Filterpapier, inkubiert im Anodenpuffer II. Die Nitrozellulosemembran, welche auf diese drei Filterpapiere gelegt wurde, wurde erst in destilliertem Wasser (dH₂O) eingeweicht und dann mit Anodenpuffer II benetzt. Darauf wurden das Gel und drei Whatman-Filterpapiere gelegt, welche vorher im Kathodenpuffer getränkt wurden. Die elektrophoretische Übertragung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 70 mA und einer Spannung von maximal 25 V für 60 Minuten. Die Nitrozellulosemembran wurde mit Ponceau S gefärbt, um den Erfolg der Proteinübertragung zu überprüfen, und diese zur Dokumentation gescannt.

Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurde die Membran für 15 Minuten unter konstanter Bewegung in Blotto Puffer inkubiert. Anschließend wurde sie mit dH₂O gewaschen und über Nacht unter konstanter Rotation bei 4 °C mit dem gegen PGP gerichteten primären Antikörper (1:1.000 verdünnt in Antikörperverdünnungslösung) inkubiert. Die Membran wurde am nächsten Tag gründlich mit dH₂O gewaschen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter konstanter Bewegung mit dem sekundären Antikörper (1:10.000 verdünnt in Blotto Puffer, anti-Kaninchen) inkubiert. Anschließend wurde die Membran für drei Minuten mit einer 1:1-Mischung aus der SuperSignal West Pico Stable Peroxide Lösung und der Luminol/Enhancer Lösung benetzt. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) katalysiert die Reduktion des enthaltenen Peroxids und die freiwerdenden Protonen oxidieren das Chromogen Luminol. Das Chemilumineszenzsignal wurde mit ImageQuant LAS 4010 Digital Imaging System detektiert und mit Image J densitometrisch analysiert. Für die Bestimmung der Tubulin-Expression wurde die Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter konstanter Bewegung in einem primären Antikörper gegen Tubulin (1:10.000 verdünnt in Antikörperverdünnungslösung) inkubiert, gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus) für 60 Minuten inkubiert.

2.2.12 Statistische Analysen

Die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente ist jeweils im Methodenteil sowie in der Abbildungslegende angegeben. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler (S.E.M.). Die Auswertung, um die Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu analysieren, erfolgte mittels ungepaartem t-Test. Die Auswertung der Ergebnisse zur Untersuchung verschiedener Inkubationszeiten von Inhibitor # 1 und der Reversibilitätstestung der Inhibitorbehandlung wurde mittels Einstichproben-t-Test mit einem theoretischen Mittelwert von 1 berechnet (vgl. 3.1.2). Die Phosphat-Standardgerade (vgl. 2.1), die Inhibitorstandardgerade (vgl. 2.2.8 und 3.6) sowie die BSA-Standardgerade (vgl. 2.2.11) wurde mittels linearer Einfachregression erstellt. Die Werte der Messungen der Inhibitionskinetik von Inhibitor # 48 wurden mittels nicht-linearer Regression nach Michaelis-Menten aufgetragen (siehe 2.2.9 und 3.7). Die statistische Signifikanz wird folgendermaßen angegeben: * für $p < 0.05$, ** für $p < 0.01$, *** für $p < 0.001$, **** für $p < 0.0001$ bzw. "ns" (nicht signifikant) für $p > 0,05$. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Microsoft Excel und Graphpad Prism 8. Die Regressionsanalysen wurden mit Graphpad Prism 8 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Endogene PGP-Aktivität in GC1-Zellen und deren Hemmung

3.1.1 Hemmung der endogenen PGP-Aktivität in GC1-Zelllysaten durch Inhibitor # 1 und # 48

Zunächst stellte sich die Frage, ob die Inhibitoren # 1 und # 48, deren hemmendes Potential auf gereinigte murine PGP von Engemann, 2019, und Frankenbach, 2017, charakterisiert wurde, Einfluss auf die endogene PGP-Aktivität in GC1-Zellen hat. GC1-Zellen sind eine etablierte Zelllinie zur Untersuchung von PGP-Funktionen (siehe auch Seifried et al., 2013, und Segerer et al., 2018). Aus den kultivierten GC1-Zellen mit PGP- und Kontroll-shRNA wurden zunächst Zelllysate hergestellt und deren Phosphatase-Aktivität gegen PG mit BIOMOL Green gemessen (siehe 2.2.1 und 2.2.4). **Abbildung 3.1 A** zeigt eine annähernd lineare Freisetzung von anorganischem Phosphat pro μg Gesamtproteinmenge im zeitlichen Verlauf durch die endogene PGP in GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA. Im direkten Vergleich ist die Herabregulation der Aktivität in den Zellen mit PGP-shRNA dargestellt. Anschließend wurden dieselben GC1-Zelllysate mit Kontroll-shRNA mit Inhibitor # 1 und # 48 sowie mit DMSO, dem Lösungsmittel der Inhibitoren, als Kontrolle behandelt und die endogene PGP-Aktivität gemessen (siehe 2.2.5). Es ließ sich eine Aktivitätsminderung um 79.7 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle durch Inhibitor # 1 nach 10 Minuten nachweisen (** $p=0.0004$) sowie eine vollständige Hemmung durch Inhibitor # 48 (**** $p<0.0001$). Nach 15-minütiger Reaktionszeit mit PG zeigte sich durch beide Inhibitoren eine vollständige Hemmung (siehe **Abb. 3.1 B**).

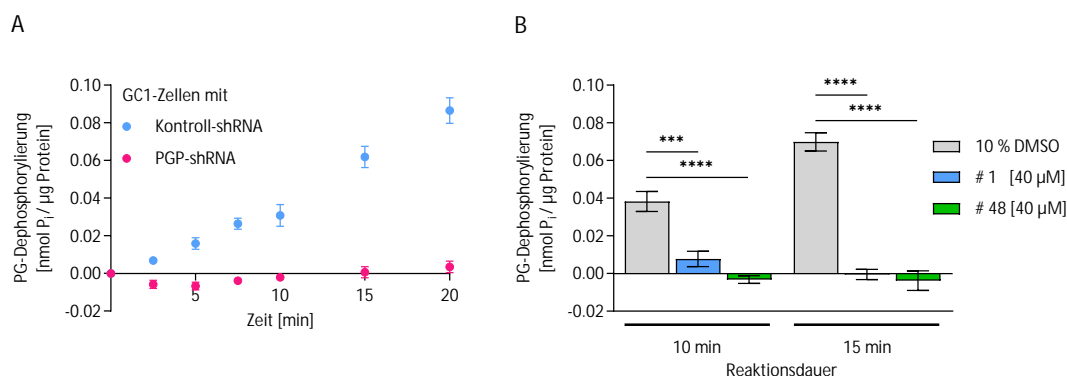


Abbildung 3.1 Endogene PGP-Aktivität in GC1-Zelllysaten und in vitro-Aktivitätshemmung durch die Inhibitoren # 1 und # 48

A: Bestimmung der endogenen PGP-Aktivität in GC1-Zelllysaten mit PGP- und Kontroll-shRNA mittels BIOMOL Green. Darstellung der gebildeten Phosphatkonzentration aus 200 μM PG pro μg Gesamtproteinmenge im zeitlichen Verlauf. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurde das hergestellte Lysat genutzt, um beim ersten Mal zweimal in Duplikaten mit je 2,5 μl Lysat und beim zweiten und dritten Mal dreimal die Zeitreihe durchzuführen und zu messen. Aus diesen Versuchen wurde pro Experiment der Mittelwert berechnet. Aufgrund der deutlich herabgesetzten Aktivität der GC1-Zellen mit PGP-shRNA wurden bei 30 von 56 Messungen durch den Abzug der Hintergrundbestimmung negative Werte berechnet. **B:** Inkubation des GC1-Zelllysats mit Kontroll-shRNA mit 40 μM Inhibitor # 1 und # 48 bzw. 10 % DMSO für 15 Minuten. Anschließend Starten der Reaktion mit Zugabe von PG, Beendigung der Reaktion nach 10 bzw. 15 Minuten und Bestimmung der gebildeten Phosphatmenge mittels BIOMOL Green. Die Daten stammen aus drei bzw. für Inhibitor # 48 aus zwei unabhängigen Lysat-Experimenten. Die Durchführung der einzelnen Experimente erfolgte wie in **A** beschrieben. Auch hier wurden negative Werte (13 von 44) berechnet. **A und B:** Dargestellt ist der berechnete Mittelwert \pm S.E.M. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3.1.2 Hemmung der endogenen PGP-Aktivität in GC1-Zellen durch Inhibitor # 1-Behandlung

Nach der erfolgreichen Hemmung der PGP-Aktivität in den Zelllysaten wurde die Behandlung der GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA mit Inhibitor # 1 untersucht (siehe 2.2.5). Die 60-minütige Behandlung der GC1-Zellen mit 100 μM Inhibitor # 1 wurde in verschiedenen Zellkulturmedien durchgeführt. Die Zusammensetzung der Medien ist in 2.1.9 beschrieben. Es zeigte sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keine statistisch signifikante Hemmung der PGP-Aktivität gegenüber PG durch Inkubation der Zellen mit Inhibitor # 1 in DMEM-Vollmedium, DMEM-Hungermedium und HBSS mit 1% BSA (siehe **Abb. 3.2 A-C**).

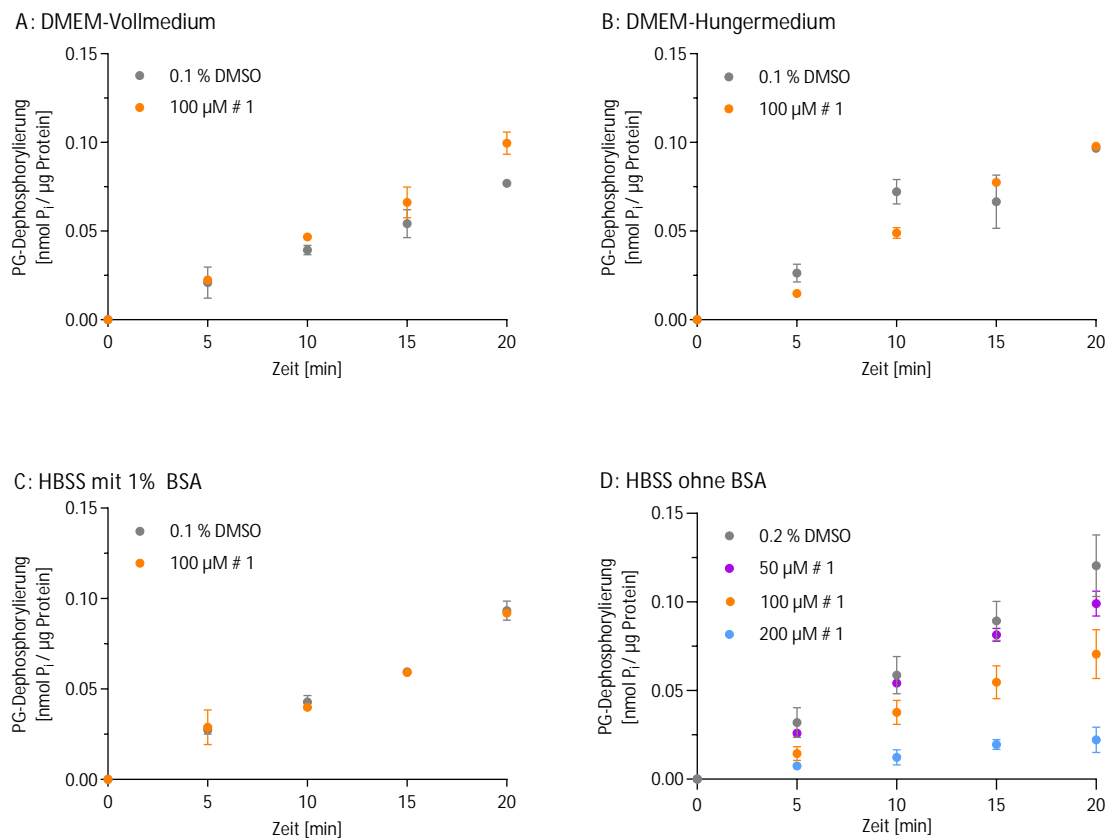


Abbildung 3.2 Einfluss verschiedener Zellkulturmedien und Inhibitorkonzentrationen auf die Hemmung der endogenen PGP-Aktivität von GC1-Zellen

A-D: 60-minütige Behandlung der GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA mit 100 µM Inhibitor # 1 bzw. 0.1 % DMSO als Kontrolle gelöst in DMEM-Vollmedium (**A**), welches 4.5 g/l Glucose und 10 % FCS enthält, serumfreies DMEM-Hungermedium mit 4.5 g/l Glucose (**B**), HBSS mit 1% BSA (**C**) sowie HBSS ohne BSA (**D**), jeweils mit 1 g/l Glucose. Anschließend Lyse der Zellen und Messung der Phosphatase-Aktivität gegenüber 200 µM PG mittels BIOMOL Green. **D:** Zusätzlich Untersuchung des Effekts einer 60-minütigen Behandlung mit 50 und 200 µM Inhibitor # 1 in HBSS ohne BSA. Unterschiedliche Konzentrationen des Lösungsmittels DMSO (verdünnt analog zu 50, 100 und 200 µM Inhibitor # 1) zeigten keinen Einfluss auf die PGP-Aktivität (nicht dargestellt), sodass die Verdünnung analog zu 200 µM Inhibitor # 1 ($\hat{=}$ 0.2 % DMSO) als Referenz dargestellt ist.

A-D: Dargestellt ist die Freisetzung von anorganischem Phosphat aus PG pro µg Gesamtproteinmenge im zeitlichen Verlauf. Die Ergebnisse stammen aus einem (für A, B und C) bzw. drei (für D) unabhängigen Versuchen. Aus den hergestellten Lysaten wurde jeweils zweimal (für A, B und C) bzw. dreimal (für D) in Duplikaten der Effekt der Inhibitorbehandlung gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.E.M. Nicht sichtbare Fehlerbalken werden durch die Symbole verdeckt.

In **Abbildung 3.2 D** ist der Effekt auf die Phosphatase-Aktivität des in HBSS ohne BSA gelösten Inhibitors dargestellt. Es zeigt sich tendenziell eine konzentrationsabhängige Verminderung der Aktivität, wobei nur die Hemmung mit 200 μM Inhibitor # 1 statistisch signifikant ist. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ließ sich nach 20 Minuten Reaktionszeit der behandelten Zellysate mit PG eine durchschnittliche Reduktion um 17.7 % mit 50 μM Inhibitor # 1 ($p=0.3175$), um 41.4 % mit 100 μM Inhibitor # 1 ($p=0.0879$) und um 81.6 % mit 200 μM Inhibitor # 1 (** $p=0.0064$) bestimmen.

Um den Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten zu untersuchen, wurden die Zellen für 15, 30, 45 und 60 Minuten mit 200 μM Inhibitor # 1 behandelt. Es ist die Aktivität gegenüber PG in % im Vergleich zu der Aktivität nach einer 30-minütigen Behandlung mit DMSO dargestellt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine längere Inkubationszeit zu einer stärkeren Hemmung der PGP-Aktivität führt (siehe **Abb. 3.3 A**). Es zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung der PGP-Aktivität um durchschnittlich 49.9 % nach 15 Minuten (** $p<0.0005$, berechnet mittels Einstichproben-t-Test). Verglichen zu der 15-minütigen Behandlung zeigt die gemessene Hemmung um 68.1 % nach 60 Minuten Inkubation einen statistisch signifikanten Unterschied (* $p=0.0183$, berechnet mittels ungepaartem t-Test). Der Unterschied nach 15 und 30 Minuten sowie nach 15 und 45 Minuten ist statistisch nicht signifikant ($p=0.3421$ sowie $p=0.0542$). Jedoch fällt auf, dass die PGP-Aktivität in diesem Experiment durch eine 60-minütige Inkubation mit 200 μM Inhibitor # 1 im Vergleich zu dem vorherigen Experiment durchschnittlich um 13 % weniger stark gehemmt wurde (68.1 % gegenüber 81.6 %).

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen im Anschluss an eine halbstündige Inhibitorbehandlung gewaschen und weitere 10 bzw. 30 Minuten in HBSS ohne Inhibitor inkubiert, um zu testen, ob die beobachtete PGP-Hemmung reversibel ist (vgl. **Abb. 2.3**). Die Messungen lassen auf eine reversible Hemmung durch Inhibitor # 1 schließen. Es zeigte sich nach 30 Minuten Inkubation mit Inhibitor # 1 eine um 81.2 % reduzierte Aktivität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (** $p=0.0028$, berechnet mittels Einstichproben-t-Test). Nach 10 Minuten Inkubation ohne Inhibitor war die Aktivität um 55.8 % und nach 30 Minuten um 9.8 % reduziert (siehe **Abb. 3.3 B**). Beide Werte unterscheiden sich statistisch signifikant von der gemessenen Hemmung nach 30 Minuten Inkubation mit Inhibitor # 1 (* $p=0.0331$ bzw. *** $p=0.0001$, berechnet mittels ungepaartem t-Test).

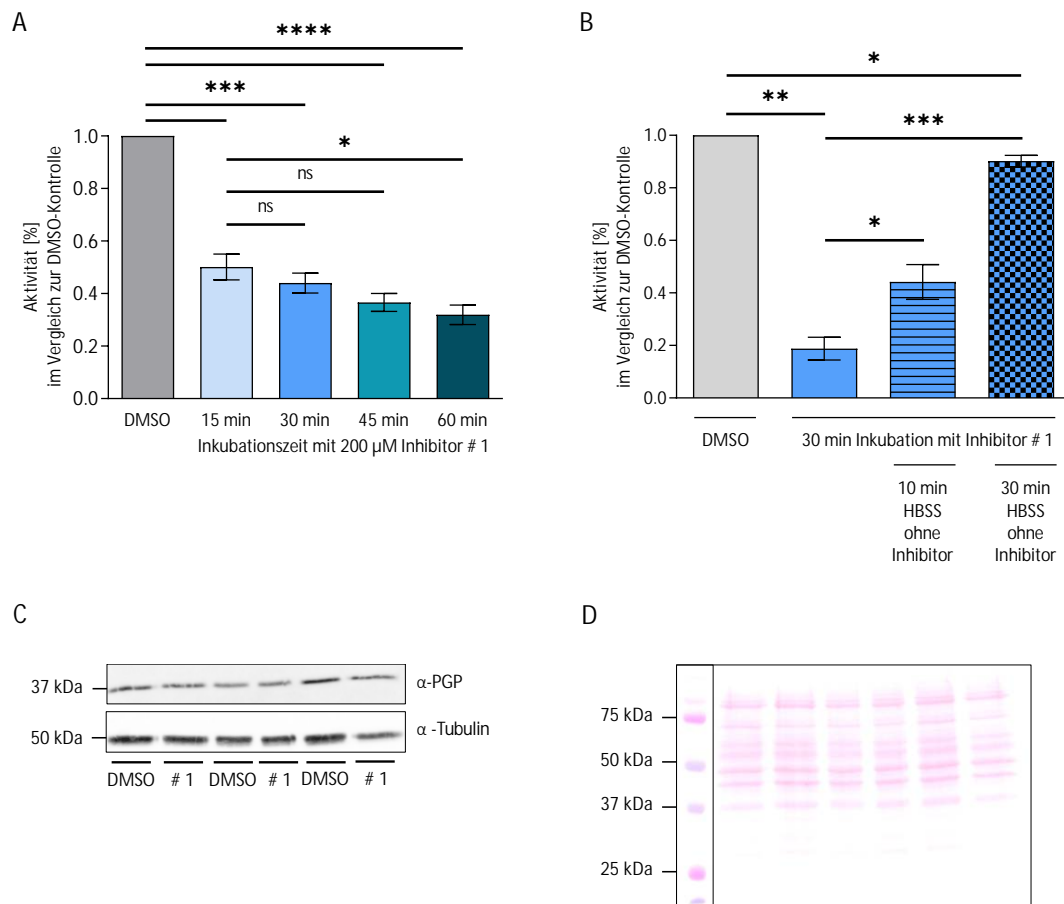


Abbildung 3.3 Einfluss verschiedener Inkubationszeiten auf die endogene PGP-Aktivität von GC1-Zellen und Darstellung der Reversibilität der Inhibitorwirkung

A: Behandlung der GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA mit Inhibitor # 1 in HBSS ohne BSA für 15, 30, 45 und 60 Minuten. Als Kontrolle wurden die Zellen 30 Minuten mit 0.2 % DMSO behandelt. **B:** Inkubation der GC1-Zellen für 30 Minuten mit 200 μ M Inhibitor # 1 und als Kontrolle mit 0.2 % DMSO in HBSS ohne BSA. Anschließend für einen Teil der Zellen: Entfernung des Mediums mit Inhibitor und Behandlung der Zellen für 10 bzw. 30 Minuten mit HBSS-Medium ohne Inhibitor. **A und B:** Anschließend Lyse der behandelten Zellen und Phosphatase-Aktivitätsmessung mittels BIOMOL Green nach einer 15-minütigen Reaktionszeit mit 200 μ M PG. Abgebildet ist die gemessene Aktivität der mit Inhibitor behandelten Zellen (Phosphatfreisetzung pro μ g Gesamtproteinmenge) im Verhältnis zur jeweils mit DMSO behandelten Kontrolle. Die Ergebnisse stammen aus fünf (für **A**) bzw. drei (für **B**) unabhängigen Experimenten. Pro Lysat wurde dreimal in Duplikaten der Effekt gemessen und der Mittelwert bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.E.M. ns = nicht signifikant, * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. **C:** Western Blot-Analyse der lysierten und mit 200 μ M Inhibitor # 1 bzw. 0.2 % DMSO in HBSS ohne BSA für 60 Minuten behandelten Zellen. Aufgetragen sind drei Paare aus unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Verwendet wurden ein gegen PGP und als Ladekontrolle gegen Tubulin gerichteter primärer Antikörper. kDa = Kilodalton. Densidometrische Analyse mittels ImageJ. **D:** Ponceau-S-Färbung der in C abgebildeten Nitrozellulosemembran.

Die durchgeführte Western-Blot-Analyse der behandelten Lysate zeigt in der densitometrischen Auswertung eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der PGP-Expression von 12 % in den mit Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen ($p=0.5895$, siehe **Abb. 3.3 C**).

3.2 Bestimmung der Viabilität von GC1-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analysen

Abbildung 3.4 A zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen der GC1-Zellen, welche zur Beurteilung der Viabilität mit PI-Färbung gefärbt wurden (siehe 2.2.7). Die Zellen wurden über Nacht in den Zellkulturmedien DMEM-Vollmedium, welches 4.5 g/l Glucose und 10 % FCS enthält, DMEM-Hungermedium, welches 4.5 g/l Glucose und kein FCS enthält, sowie DMEM-Medium ohne Glucose mit 10 % FCS inkubiert. Diese Medien werden in der Arbeitsgruppe standardmäßig für die Zellkultur bzw. für die Durchführung von Experimenten verwendet (vgl. Seifried et al., 2014, und Segerer et al., 2018). Um einen möglichen Einfluss der verschiedenen Medien auf die Viabilität der Zellen festzustellen, wurden diese zunächst untersucht. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil der toten GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA in DMEM-Vollmedium und DMEM-Hungermedium ($*p=0.012$). Der Einfluss von DMEM-Medium ohne Glucose auf die GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA ist im Vergleich zu DMEM-Vollmedium statistisch nicht signifikant ($p=0.5423$). Der Anteil der toten Zellen in GC1-Zellen mit PGP-shRNA im Vergleich zu GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA unterscheidet sich in den getesteten Medien statistisch nicht signifikant ($p=0.4451$ für DMEM-Vollmedium, $p=0.0782$ für DMEM-Hungermedium, $p=0.3461$ für DMEM-Medium ohne Glucose).

Die 60-minütige Inhibitorbehandlung mit 100 bzw. 200 μM Inhibitor # 1 gelöst in HBSS ohne BSA zeigte im Vergleich zu der Kontroll-Behandlung mit 0.1 bzw. 0.2 % DMSO keinen Einfluss auf die Viabilität der GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA ($p=0.6628$ für 100 μM Inhibitor # 1 und $p=0.9065$ für 200 μM Inhibitor # 1). Auch ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil der toten GC1-Zellen mit PGP-shRNA und mit Kontroll-shRNA nachweisbar ($p=0.9033$ in HBSS mit 0.1 % DMSO, $p=0.4663$ in HBSS mit 100 μM Inhibitor # 1, $p=0.8826$ in HBSS mit 0.2 % DMSO und $p=0.3917$ mit 200 μM Inhibitor # 1, siehe **Abb. 3.4 B**).

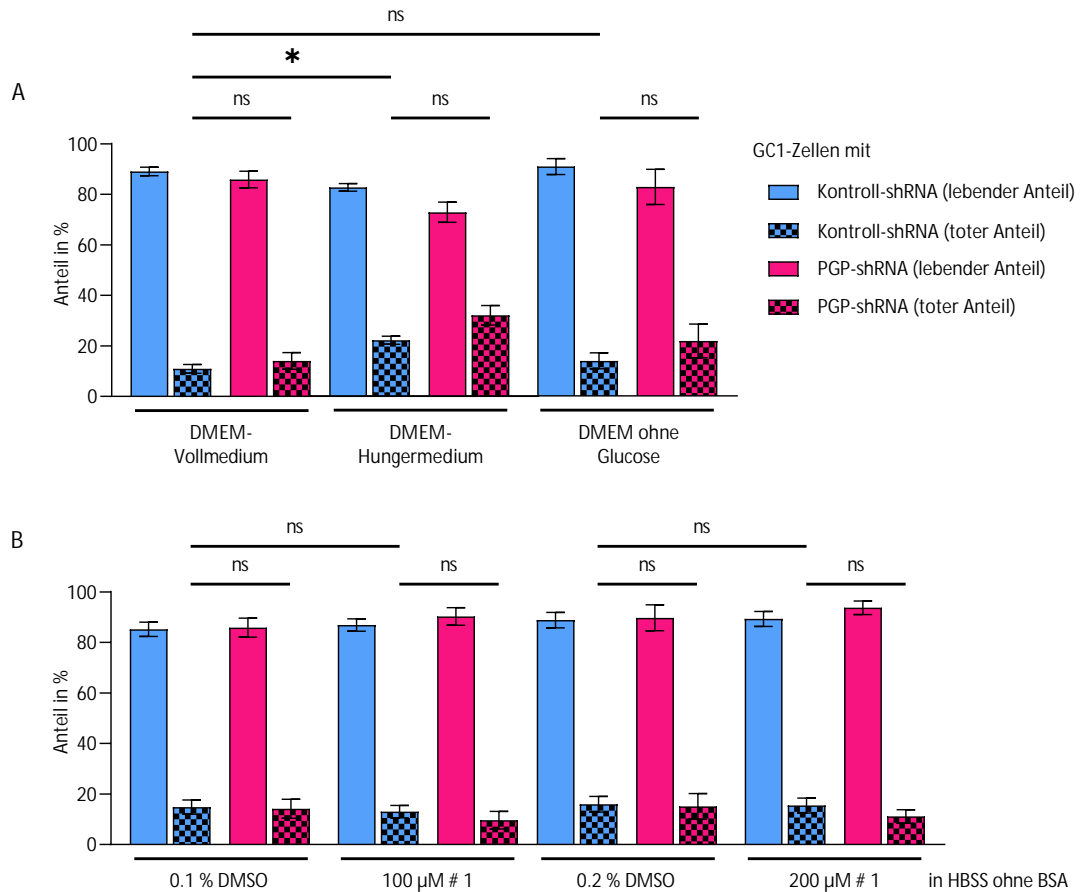


Abbildung 3.4 Einfluss verschiedener Zellkulturmedien und der Inhibitor # 1-Behandlung auf die Viabilität von GC1-Zellen

A: Anteil der lebenden und toten GC1-Zellen mit PGP- und Kontroll-shRNA nach Inkubation in DMEM-Vollmedium, DMEM-Hungermedium und DMEM-Medium ohne Glucose über Nacht. Für die Zusammensetzung der Medien siehe auch 2.1.9. **B:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der behandelten GC1-Zellen mit 100 und 200 μM Inhibitor # 1 und vergleichend mit 0.1 und 0.2 % DMSO für 60 Minuten in HBSS ohne BSA. **A und B:** Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellen vorsichtig von der Zellkulturplatte gelöst und mittels Propidium Iodid (PI) gefärbt, welches als Nukleinsäureinterkalarator die toten Zellen markiert, da es die geschädigte und dadurch permeable Zellmembran überwinden kann. Die Werte stammen jeweils aus drei bzw. für die in HBSS behandelten GC1-Zellen mit PGP-shRNA aus zwei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden jeweils zwei Wells gleich behandelt und der Mittelwert berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus den drei Experimenten \pm S.E.M., ns = nicht signifikant, * $p < 0.05$.

Aufgrund der unterschiedlich langen Inkubationszeiten (über Nacht im Vergleich zu 60 Minuten) lässt sich der Einfluss der HBSS-Behandlung auf die Zellen nur beschränkt mit dem Effekt der getesteten Zellkulturmedien vergleichen.

3.3 Veränderung der TAG-Konzentrationen in GC1-Zellen durch Inhibitor # 1-Behandlung

Die PGP ist als G3PP an der Schnittstelle zwischen Glucose- und Lipidstoffwechsels beteiligt (Mugabo et al., 2016). Mugabo und Kollegen beschreiben in ihrer Arbeit unter metabolischen Überflussbedingungen sowohl in β -Zellen des Pankreas als auch in Hepatozyten, in denen mittels RNA-Interferenz die PGP-Aktivität herabreguliert wurde, erhöhte TAG im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Mugabo et al., 2016). Dieses Ergebnis ließ sich in GC1-Zellen mit PGP-shRNA reproduzieren (Segeer et al., 2018). Es stellte sich die Frage, ob die TAG-Level in GC1-Zellen durch eine Behandlung mit Inhibitor # 1 beeinflussbar sind. Die GC1-Zellen mit PGP- und Kontroll-shRNA wurden für 60 Minuten mit 50 bzw. 200 μ M Inhibitor # 1 in HBSS ohne BSA und als Kontrolle mit 0.1 % DMSO behandelt. Zur Bestimmung der TAG wurde das Adipogenesis Assay Kit verwendet (vgl. auch 2.2.6).

In **Abbildung 3.5** sind die Ergebnisse gezeigt. In den mit DMSO-behandelten GC1-Zellen mit PGP-shRNA lässt sich die 1.88-fache TAG-Menge im Vergleich zu den GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA messen (* $p=0.0218$). Dieser Unterschied ist bei den mit Inhibitor behandelten Zellen nicht mehr nachweisbar ($p=0.8345$ für 50 μ M Inhibitor # 1 und $p=0.8929$ für 200 μ M Inhibitor # 1). Beim Vergleich der gemessenen TAG-Konzentrationen in den unterschiedlich behandelten GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA lässt sich nach 60-minütiger Inkubation mit 50 μ M Inhibitor # 1 eine nicht statistisch signifikante 1.99-fache Erhöhung der TAG-Level im Vergleich zur DMSO-Kontrolle berechnen ($p=0.0969$). Mit 200 μ M Inhibitor # 1 zeigt sich eine statistisch signifikante Erhöhung um das 2.69-fache (* $p=0.0169$). Für die GC1-Zellen mit PGP-shRNA lässt sich durch die Inhibitor-Behandlung kein statistisch signifikanter Effekt messen (1.06-fache Menge im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, $p=0.9575$ für 50 μ M bzw. 1.41-fache Menge, $p=0.1438$ 200 μ M Inhibitor # 1).

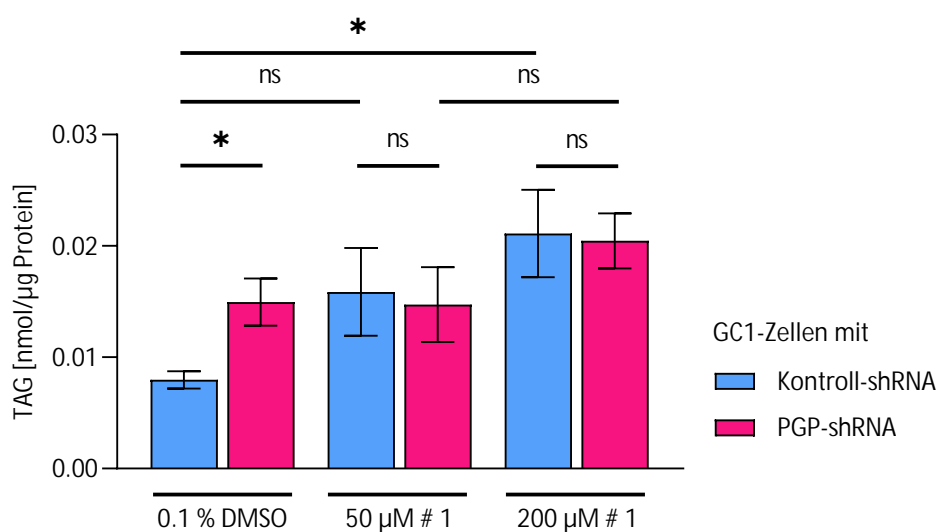


Abbildung 3.5 Einfluss der Inhibitor #1-Behandlung auf die TAG-Konzentration in GC1-Zellen

A: 60-minütige Behandlung der GC1-Zellen (PGP- und Kontroll-shRNA) mit 50 μM und 200 μM # 1 bzw. 0.1 % DMSO in HBSS ohne BSA. Verarbeitung der Proben und Bestimmung der TAG-Konzentration mittels Adipogenesis Assay Kit (vgl. 2.2.6). Berechnung des TAG-Gehaltes pro Gesamtproteinmenge. Die Werte stammen aus vier unabhängigen Experimenten mit in Duplikaten erhobenen Messungen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.E.M. ns = nicht signifikant, * $p < 0.1$.

3.4 Messung der InhibitorKonzentration pro Zelle

Die beschriebenen Experimente lassen vermuten, dass sich die endogene PGP-Aktivität gegenüber PG in GC1-Zellen effektiv mit Inhibitor # 1 hemmen lässt und möglicherweise die TAG-Konzentrationen beeinflusst. Es stellte sich die Frage, ob bestimmbar ist, wie viel von dem im Medium verdünnten Inhibitor in die Zellen gelangt.

Zunächst wurden hierfür die Absorptionseigenschaften des in Zelllysat verdünnten Inhibitors # 1 im Mikrotiterplattenlesegerät Synergy Neo2 analysiert (siehe auch 2.2.8). **Abbildung 3.6 A** zeigt das gemessene Absorptionsspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 290 nm sowie einem lokalen Maximum bei 310 nm. Eine Verdünnungsreihe des Inhibitors # 1 in Zelllysat wurde mittels serieller 1:2-Verdünnung hergestellt und in die einzelnen Wells verteilt (von 200 μM bis 12.5 μM $\hat{=}$ 6.95 μg bis 0.43 μg in 70 μl Lysat). Die OD wurde bei den beiden Wellenlängen in zwei Mikrotiterplattenlesegeräten (CLARIOstar und Synergy Neo2) gemessen und jeweils eine Standardgerade berechnet. Aufgrund der leicht erhöhten

OD-Werte bei 290 nm und der geringfügigen Unterschiede zwischen den Plattenlesegeräten (nicht gezeigt), wurden alle weiteren Lysate bei 290 nm im CLARIOstar gemessen. **Abbildung 3.6 B** zeigt die Standardgerade, welche mittels linearer Einfachregression aus zwölf unabhängigen Messungen berechnet wurde. Eine serielle Verdünnung mit DMSO, dem Lösungsmittel der Inhibitoren, zeigte in äquivalenten Konzentrationen vernachlässigbar niedrige Absorptionswerte ohne konzentrationsabhängigen Effekt (nicht dargestellt).

Die GC1-Zellen wurden mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und in verschiedenen Kulturmedien unterschiedlich lange behandelt (siehe **Tab. 2.2**) und die OD der Lysate wurde anschließend gemessen. In **Abbildung 3.6 C** ist die gemessene OD pro Gesamtproteinmenge in μg der mit DMSO und Inhibitor # 1 behandelten Zelllysate gezeigt. Passend zu der unveränderten Phosphataseaktivität der PGP mit Inhibitor # 1 in DMEM-Vollmedium, DMEM-Hungermedium und DMEM ohne Glucose (vgl. **Abb. 3.2 A-C**), konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Inhibitor # 1 und den mit DMSO behandelten GC1-Zellen gemessen werden ($p=0.7800$ für DMEM-Vollmedium 2 h, $p=0.8552$ für DMEM-Vollmedium 3 h, $p=0.4151$ für DMEM-Hungermedium 3 h, $p=0.5514$ für DMEM ohne Glucose 3 h). Die GC1-Zellen, die eine Stunde lang mit $200 \mu\text{M}$ Inhibitor # 1 in HBSS behandelt wurden, zeigten in der Konzentrationsbestimmung des Inhibitors im Vergleich zur DMSO-Kontrolle einen signifikanten Unterschied ($*p=0.0465$). Im Gegensatz dazu zeigte die einstündige Behandlung mit $100 \mu\text{M}$ Inhibitor # 1 in HBSS keinen signifikanten Unterschied ($p=0.1235$), passend zu den Ergebnissen, die in **Abbildung 3.2 D** gezeigt sind.

Die OD-Werte der in DMEM-Vollmedium und HBSS behandelten Zellen wurden mit Hilfe der Standardgeraden in μg Inhibitor # 1 pro μg Gesamtproteinmenge umgerechnet. Vor der Umrechnung wurden die OD-Werte der jeweiligen DMSO-Kontrolle abgezogen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen, die 60 Minuten mit $200 \mu\text{M}$ Inhibitor # 1 in HBSS behandelt wurden, und den Zellen, die zwei bzw. drei Stunden mit $100 \mu\text{M}$ Inhibitor # 1 in DMEM-Vollmedium behandelt wurden ($*p=0.0196$ bzw. $**p=0.0077$). Der Unterschied zwischen den Zellen, die in HBSS mit 100 bzw. $200 \mu\text{M}$ Inhibitor # 1 behandelt wurden, ist statistisch nicht signifikant ($p=0.0549$, siehe **Abb. 3.6 D**). Da bei drei von vier Lysaten der mit DMSO behandelten Zellen in DMEM-Hungermedium und DMEM ohne Glucose negative Werte nach Abzug des Hintergrundes berechnet wurden (vgl. **Abb. 3.6 C**), wurden sie nicht in μg Inhibitor # 1 umgerechnet.

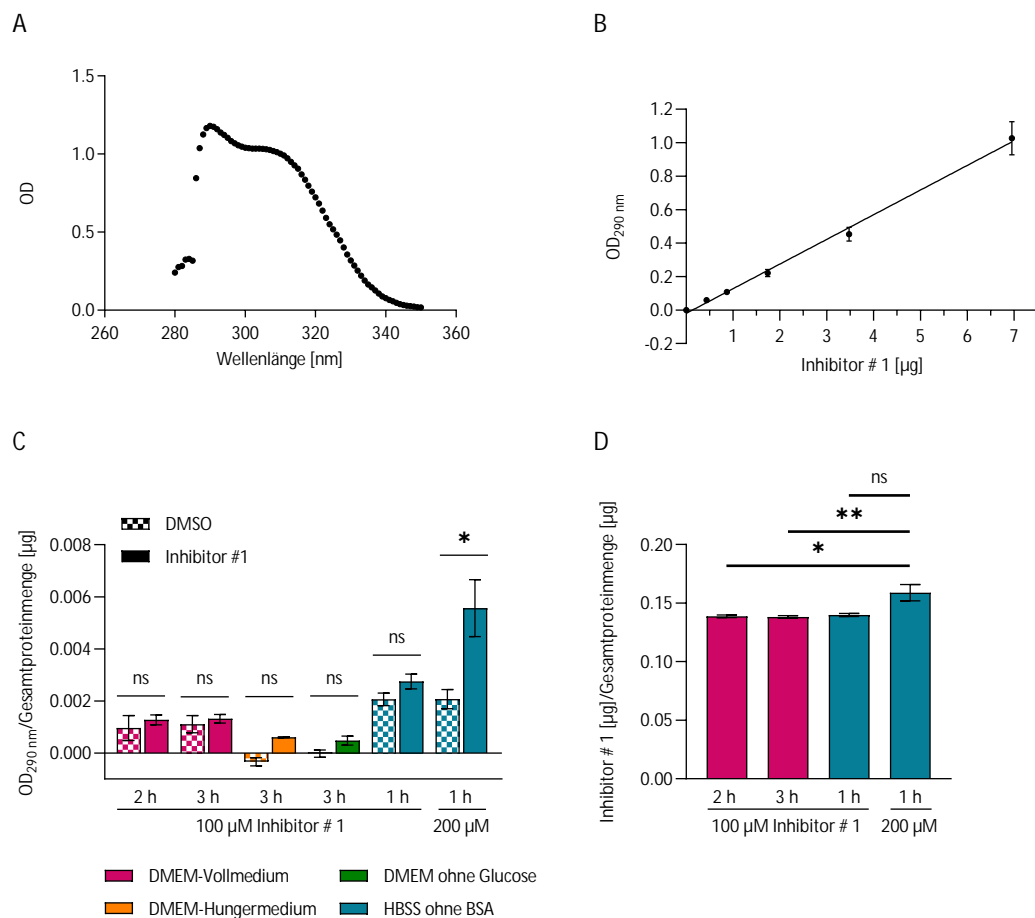


Abbildung 3.6 Bestimmung der InhibitorKonzentration in GC1-Zellen mittels Absorptionmessungen

A: Absorptionsspektrum von 200 µM Inhibitor #1 verdünnt in GC1-Zellysat. Die OD wurde zwischen 280 und 350 nm in 1 nm Schritten im Mikrotiterplattenlesegerät Synergy Neo2 gemessen. **B:** Standardgerade des in Zellysat verdünnten Inhibitors #1, welche bei 290 nm im CLARIOstar gemessen und mittels linearer Einfachregression aus insgesamt zwölf Messungen erstellt wurde ($y = 0.1474x - 0.01993$; $R^2 = 0.8408$). **C:** Behandlung der GC1-Zellen mit 100 bzw. 200 µM und als Kontrolle mit 0.1 bzw. 0.2 % DMSO für die in der Abbildung angegebene Zeit (1-3 Stunden) in verschiedenen Zellkulturmedien (für die Zusammensetzung der Medien siehe 2.1.9). Anschließend Lyse der Zellen und Messung der Absorption bei 290 nm. Berechnung der OD pro µg Gesamtproteinmenge, welche mittels BCA-Assay bestimmt wurde. Anzahl der durchgeführten Experimente: $n = 6$ für DMEM 2 h, $n = 8$ für DMEM 3 h, $n = 2$ für DMEM-Hungermedium 3 h, $n = 3$ für DMEM ohne Glucose 3 h, $n = 3$ für HBSS 1 h mit 100 sowie 200 µM Inhibitor #1. **D:** Umrechnung der gemessenen OD in µg Inhibitor #1 pro µg Gesamtproteinmenge mit der Standardgeraden für die mit DMEM und HBSS behandelten Zellen. Vor der Umrechnung wurde die OD der DMSO-Kontrolle abgezogen und 2 von 6 bzw. 3 von 8 gemessene Werte der Zellen, die zwei bzw. drei Stunden mit Inhibitor #1 in DMEM behandelt wurden, wurden aufgrund negativer Werte vor der Umrechnung ausgeschlossen. **B-D:** Darstellung des Mittelwerts \pm S.E.M. aus in Duplikaten gemessenen Versuchen. Nicht sichtbare Fehlerbalken werden durch die Symbole verdeckt. **C und D:** ns = nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.5 Charakterisierung der PGP-Hemmung durch Inhibitor # 48

Die Berechnung der enzymkinetischen Parameter K_M , V_{max} , k_{kat} und der katalytischen Effizienz dient zur Charakterisierung der Enzymfunktion und die Veränderung der Parameter mit steigender Inhibitorkonzentration lässt auf die Art der Enzymhemmung schließen (siehe 1.4 und 1.6.2). Als Ergänzung zu den Arbeiten von Engelmann, 2019, und Frankenbach, 2017, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt von steigenden Inhibitor # 48-Konzentrationen auf die murine PGP-Aktivität untersucht (siehe auch 2.2.9). **Abbildung 3.7** zeigt die Kurvenverläufe der mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen gehemmten PGP-Aktivität. Die für jede Inhibitorkonzentration berechnete K_M und V_{max} sowie die daraus berechnete k_{kat} und katalytische Effizienz sind in **Tabelle 3.1** angegeben. Während die Maximalgeschwindigkeit mit steigender Inhibitorkonzentration abnimmt, verringert sich auch die Michaelis-Menten-Konstante mit steigender Inhibitorkonzentration. Die Ergebnisse sind vereinbar mit einer unkompetitiven Hemmung der PGP durch Inhibitor # 48 (vgl. **Abb. 1.5**).

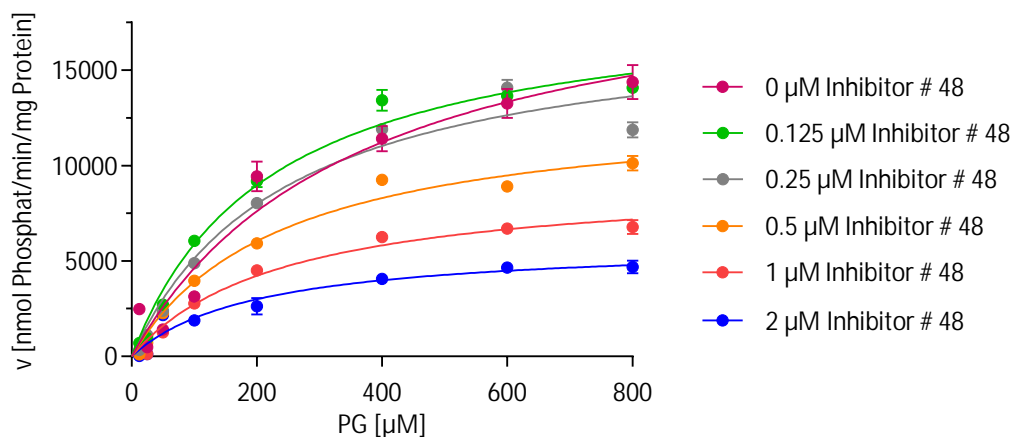


Abbildung 3.7 Inhibitionskinetik von Inhibitor # 48

A: Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit mit verschiedenen Substratkonzentrationen für verschiedene Inhibitorkonzentrationen (Pipettierschema siehe **Abb. 2.5**). Inkubation von muriner PGP mit Inhibitor # 48 für 15 Minuten, Zugabe von PG und Stoppen der Reaktion nach drei Minuten sowie Bestimmung des gebildeten Phosphates mit BIOMOL Green. Als Hintergrund wurde für jede Inhibitorkonzentration die Absorption des TNM-Puffers mit Inhibitor ohne Enzym bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.E.M. von $n = 3$ unabhängigen Experimenten gemessen in Duplikaten. Nicht sichtbare Fehlerbalken sind durch die Symbole verdeckt.

Tabelle 3.1 Enzymkinetische Parameter der PG-Dephosphorylierung durch die PGP in Anwesenheit des Inhibitors # 48

Durch nicht-lineare Regression wurde die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) sowie die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) für die jeweilige Inhibitorkonzentration berechnet. Angegeben ist der berechnete Wert mit Standardfehler und 95%-Konfidenzintervall (95%-KI). Die Wechsellzahl (k_{kat}) wurde mit V_{max} und der Molekulare Masse von 43.541 kDa für die murine PGP berechnet. k_{kat}/K_M beschreibt die katalytische Effizienz des Enzyms.

| Inhibitor # 48 [μM] | 0 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| K_M [μM] | 363.1 \pm 93.11 | 222.4 \pm 26.33 | 247.7 \pm 42.24 | 240.1 \pm 30.97 | 243.2 \pm 36.08 | 198.5 \pm 50.06 |
| 95%-KI | 170 - 556.2 | 167.8 - 277 | 160.1 - 335.3 | 175.9 - 304.3 | 168.3 - 318 | 94.67 - 302.3 |
| V_{max} [nmol/min/mg] | 21 405 \pm 2 431 | 18 947 \pm 827 | 17 858 \pm 1 168 | 13 279 \pm 650 | 9 356 \pm 529 | 5 969 \pm 533 |
| 95%-KI | 16 364 - 26 447 | 17 231 - 20 663 | 15 436 - 20 280 | 11 932 - 14 626 | 8 259 - 10 452 | 4 862 - 7 075 |
| k_{kat} [s^{-1}] | 12.3 \pm 1.3 | 10.9 \pm 0.5 | 10.3 \pm 0.7 | 7.6 \pm 0.4 | 5.4 \pm 0.3 | 3.4 \pm 0.3 |
| k_{kat}/K_M [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$] | 3.39 x 10 ⁴ | 4.90 x 10 ⁴ | 4.15 x 10 ⁴ | 3.18 x 10 ⁴ | 2.21 x 10 ⁴ | 1.73 x 10 ⁴ |

Vor der Durchführung dieses Versuches wurde zudem die pufferabhängige PG-De-phosphorylierung durch die PGP untersucht, um sicher zu gehen, dass im TMN-Puffer die höchste PGP-Aktivität gemessen wird (siehe 2.2.2). Im Vergleich zeigte sich die Aktivität in allen getesteten Puffern deutlich vermindert, sodass der TMN-Reaktionspuffer für die Charakterisierung der Inhibitorwirkung von Inhibitor # 48 sowie weitere in vitro PGP-Analysen verwendet wurde. Die Ergebnisse sind im Anhang 6.3 dargestellt.

3.6 Selektivitätsuntersuchungen

Um die Selektivität der Inhibitoren genauer zu untersuchen, wurde die Wirkung der Inhibitoren # 1, # 2, # 9 und # 48 auf andere HAD-Phosphatasen getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ergänzungsversuche zu den Selektivitätsuntersuchungen von Frankenbach, 2017, und Yesilyurt, 2017, mit MDP1, LHPP, Phospho 2 und PnkP durchgeführt, um einerseits den Effekt von Inhibitor # 48 zu testen und um andererseits durch erneute Testung der Inhibitoren # 1, # 2 und # 9 die Zuverlässigkeit der Methode einschätzen zu können.

3.6.1 Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase (LHPP)

Der Einfluss der Inhibitoren auf die Phosphatase-Aktivität von LHPP wurde mit den zwei Substraten PNP und PPi in TMN-Reaktionspuffer getestet. In **Abbildung 3.8 A** ist die Zeitreihe der Reaktion von $0.17 \mu\text{M}$ LHPP und $0.125 \mu\text{M}$ PNP bzw. $2 \mu\text{M}$ PPi abgebildet. Für die Testung der Inhibitoren wurde jeweils eine Inkubationszeit von 20 Minuten festgelegt. **Abbildung 3.8 B** zeigt den gemessenen, nicht signifikanten Einfluss der Inhibitoren auf die LHPP-Aktivität gegenüber PPi im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Es ließ sich eine leichte Inhibition der Aktivität durch Inhibitor # 1 (-8 %, $p=0.0513$) und # 48 (-7 %, $p=0.2665$), eine leichte Aktivitätssteigerung durch Inhibitor # 2 (+19 %, $p=0.2127$) und keine Veränderung der Aktivität durch Inhibitor # 9 (± 0 %, $p=0.9665$) bestimmen. In **Abbildung 3.8 C** ist der Effekt der Inhibitoren auf die LHPP-Aktivität gegenüber PNP dargestellt. Für die Inhibitoren # 1, # 9 und # 48 war keine statistisch signifikante Änderung der Aktivität messbar: -4 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit Inhibitor # 1 ($p=0.7067$), -2 % mit Inhibitor # 9 ($p=0.5826$) sowie +5 % mit Inhibitor # 48 ($p=0.1601$). Durch Inhibitor # 2 ließ sich eine statistisch signifikante Aktivitätssteigerung bestimmen (+13 %, $p=0.0193$ für Inhibitor # 2).

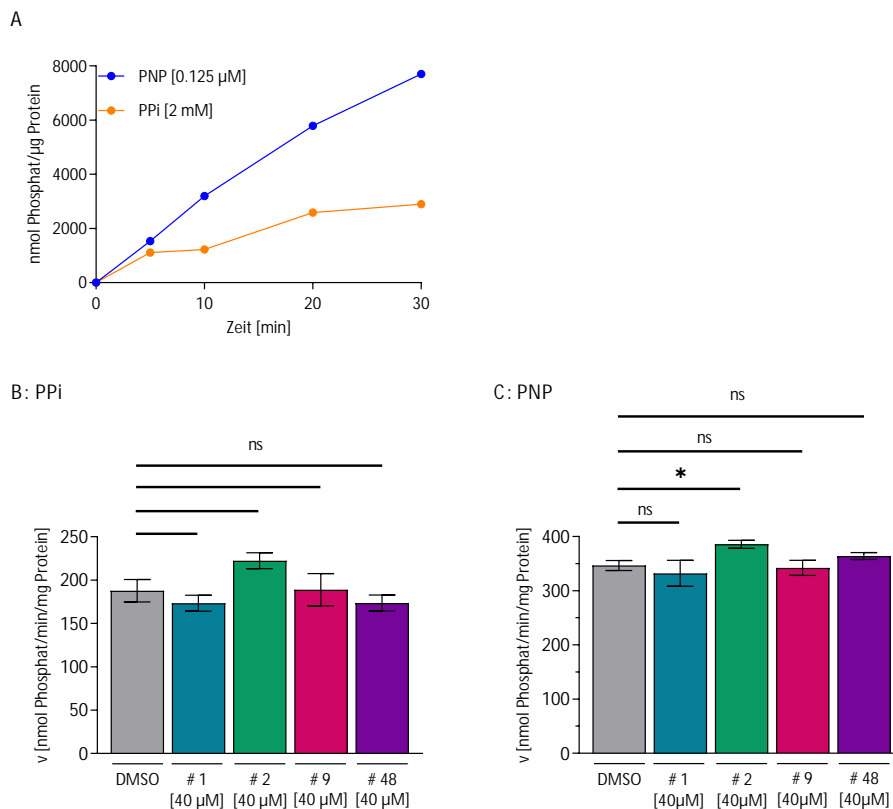


Abbildung 3.8 Wirkung der Inhibitoren # 1, # 2, # 9 und # 48 auf die Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase (LHPP)

A: In vitro-Aktivitätsmessung von $0.25 \mu\text{g}$ LHPP ($\hat{=} 0.17 \mu\text{M}$) gegenüber $0.125 \mu\text{M}$ PNP sowie $2 \mu\text{M}$ PPI im zeitlichen Verlauf in TMN-Reaktionspuffer. Die Messpunkte stammen aus einem Experiment. **B und C:** Bestimmung des Effekts von Inhibitor # 1, # 2, # 9 und # 48 und als Kontrolle 10 % DMSO auf die Phosphatase-Aktivität von LHPP gegenüber PPI (**B**) und PNP (**C**). Zugabe des jeweiligen Substrates nach 15-minütiger Inkubation mit den Inhibitoren. Stoppen der Reaktion nach 20 Minuten und Bestimmung der gebildeten Phosphatmenge mit BIOMOL Green. Dargestellt ist die gemessene Phosphatkonzentration pro Minute und μg Protein. Die Daten stammen aus $n=3$ unabhängigen Experimenten mit in Duplikaten erhobenen Messungen, abgebildet ist der Mittelwert \pm S.E.M., ns = nicht signifikant, $*p<0.05$.

3.6.2 Phospho 2

Die Zeitreihe der Reaktion von $0.72 \mu\text{M}$ Phospho 2 und 0.5mM PLP in Phospho2-Reaktionspuffer ist in **Abbildung 3.9 A** zu sehen. Es wurde eine Inkubationszeit von zwei Minuten ausgewählt. Die Inhibitoren # 1 und # 9 hatten keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Phospho 2-Aktivität: jeweils +9 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit Inhibitor # 1 ($p=0.4572$) und mit Inhibitor # 9 ($p=0.3129$). Durch Inhibitor # 48 ließ sich eine statistisch signifikante Aktivitätssteigerung messen (+133 %, $***p<0.0001$). Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3.9 B** dargestellt.

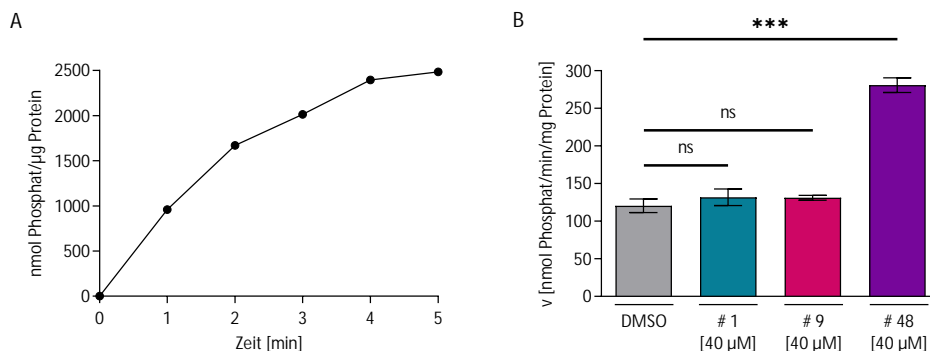


Abbildung 3.9 Wirkung der Inhibitoren # 1, # 9 und # 48 auf Phospho 2

A: Bestimmung der Phosphatase-Aktivität von 1 μg Phospho 2 ($\cong 0.72 \mu\text{M}$) gegenüber 0.5 mM PLP im zeitlichen Verlauf in Phospho2-Reaktionspuffer. Die dargestellten Werte stammen aus einem Experiment. **B:** Wirkung der Inhibitoren # 1, # 9 und # 48 auf die Phosphatase-Aktivität von Phospho 2. Inkubation von Phospho 2 mit dem Inhibitor und als Kontrolle mit 10 % DMSO für 15 Minuten, anschließende Reaktionsdauer von zwei Minuten mit PLP. Verwendung von BIOMOL Green zum Stoppen der Reaktion und zur Bestimmung der gebildeten Phosphatmenge. Abgebildet ist die gemessene Phosphatkonzentration pro Minute und μg Protein. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit in Duplikaten erhobenen Messungen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.E.M., ns = nicht signifikant, *** $p < 0.001$.

3.6.3 Polynukleotid Kinase Phosphatase (PnkP)

Die Aktivität von 3.5 nM PnkP und 10 μM 20mer in TMN-Reaktionspuffer ohne DTT im zeitlichen Verlauf ist in **Abbildung 3.10 A** dargestellt. Als Inkubationszeit wurden 20 Minuten festgesetzt. Die Ergebnisse der Testung (siehe **Abb. 3.10 B**) ergaben eine leichte Aktivitätssteigerung (+8 %) mit Inhibitor # 1 und eine Aktivitätsminderung (-19 %) mit Inhibitor # 48. Der gemessene Effekt ist statistisch nicht signifikant ($p = 0.6221$ für Inhibitor # 1, $p = 0.0763$ für Inhibitor # 48).

3.6.4 Magnesium-abhängige Phosphatase 1 (MDP1)

Abbildung 3.11 A zeigt die Zeitreihe der Reaktion von 0.11 μM MDP1 und 4 mM D-Ribose-5-Phosphat pro Well in TMN-Reaktionspuffer. Es wurde eine Inkubationszeit von vier Minuten festgelegt. **Abbildung 3.11 B** zeigt die tendenzielle Verminderung der MDP1-Aktivität durch die beiden Inhibitoren im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, die jedoch statistisch nicht signifikant ist (-16 %, $p = 0.2545$ für Inhibitor # 1 und -19 %, $p = 0.0986$ für Inhibitor # 48).

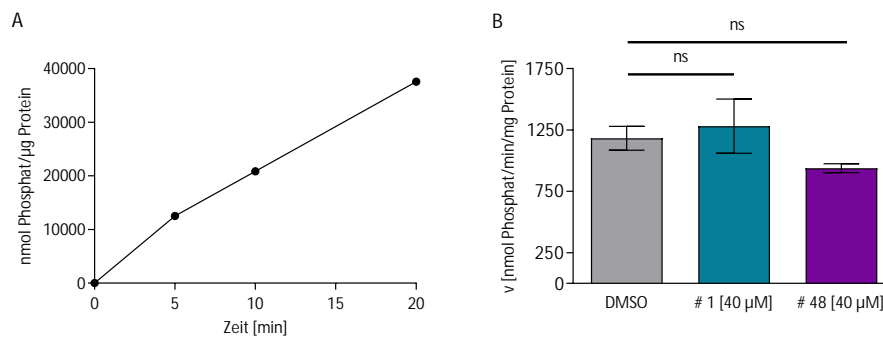


Abbildung 3.10 Wirkung der Inhibitoren # 1 und # 48 auf die Polynukleotid Kinase Phosphatase (PnkP)

A: Aktivitätsbestimmung der PnkP ($0.01 \mu\text{g}$ pro Well $\hat{=}$ 3.5 nM) gegenüber dem Oligonukleotid 20mer ($10 \mu\text{M}$ pro Well) im zeitlichen Verlauf. Die Ergebnisse stammen aus einem Experiment. **B:** Messung des Effekts von Inhibitor # 1 bzw. # 48 und als Kontrolle 10 % DMSO auf die PnkP-Aktivität gegenüber 20mer in TMN-Reaktionspuffer ohne DTT. Inkubation der Phosphatase mit dem Inhibitor für 15 Minuten, anschließende Reaktionsdauer mit dem Substrat 20mer von 20 Minuten. Stoppen der Reaktion und Bestimmung der gebildeten Phosphatkonzentration mit BIOMOL Green. Gezeigt ist die gemessene Phosphatkonzentration pro Minute und μg Protein. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit in Duplikaten erhobenen Messungen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.E.M., ns = nicht signifikant.

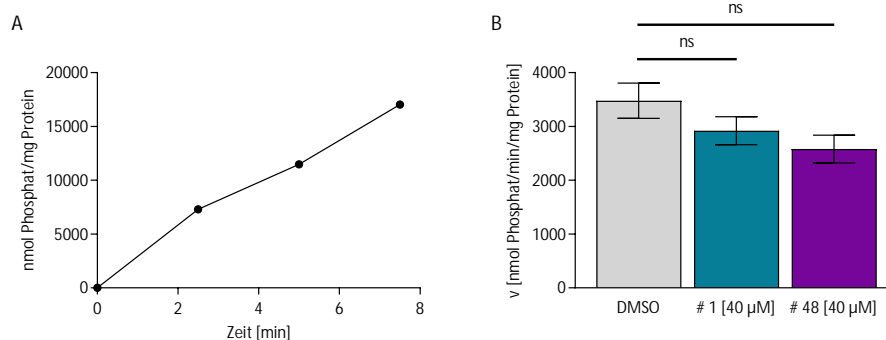


Abbildung 3.11 Wirkung der Inhibitoren # 1 und # 48 auf die Magnesium-abhängige Phosphatase 1 (MDP1)

A: In vitro-Messung der MDP1-Aktivität ($0.1 \mu\text{g}$ $\hat{=}$ $0.11 \mu\text{M}$ pro Well) gegenüber 4 mM D-Ribose-5-Phosphat im zeitlichen Verlauf in TMN-Reaktionspuffer. Die Daten stammen aus einem Experiment. **B:** Inkubation von MDP1 mit Inhibitor # 1 und # 48 und als Kontrolle mit 10 % DMSO für 15 Minuten, anschließend Zugabe von D-Ribose-5-Phosphat und Stoppen der Reaktion nach vier Minuten. Bestimmung der gebildeten Phosphatmenge mittels BIOMOL Green und Darstellung der gebildeten Phosphatkonzentration pro Minute und μg Protein. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit in Duplikaten erhobenen Messungen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.E.M., ns = nicht signifikant.

3.6.5 Zusammenfassung und Vergleich der Selektivitätsuntersuchungen

Tabelle 3.2 fasst die Reaktionsbedingungen der durchgeführten Experimente sowie die Ergebnisse der Phosphataseaktivitätsänderungen durch die Inhibitoren zusammen. Durch Inhibitor #48 konnte kein signifikanter Effekt auf die Aktivität der HAD-Phosphatasen MDP1, LHPP und PnkP beobachtet werden. Dagegen zeigte sich eine signifikante Aktivitätssteigerung von Phospho 2 durch die Inhibitorbehandlung. In **Tabelle 3.3** sind die Ergebnisse der Inhibitorwirkung von #1, #2 und #9 auf die Aktivität der HAD-Phosphatasen MDP1, LHPP, Phospho 2 und PnkP zusammengefasst, die von Frankenbach, 2017, und Yesilyurt, 2017, durchgeführt wurden. Damit sie mit den gemessenen Effekten dieser Arbeit verglichen werden können, sind diese in der Tabelle zusätzlich aufgeführt. Mögliche Ursachen für die gemessenen Unterschiede werden in 4.2.2 diskutiert.

Tabelle 3.2 Wirkung der Inhibitoren auf die HAD-Phosphatasen MDP1, LHPP, Phospho 2 und PnkP

Die Tabelle zeigt alle getesteten Bedingungen, die einzeln in den **Abbildungen 3.8, 3.9, 3.10 und 3.11** dargestellt sind, sowie den Effekt der Inhibitorbehandlung auf die Phosphatasenaktivität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle angegeben als Prozentsatz. Alle Inhibitoren wurden mit 40 μM getestet.

E-Konz. = Enzymkonzentration, LHPP = Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase, MDP1 = Magnesium-abhängige Phosphatase 1, PLP = Pyridoxal 5'Phosphat, PnkP = Polynukleotidase 5'-Kinase/3'-Phosphatase, PNP = Imidodiphosphat, PPi = anorganisches Pyrophosphat, R-5-P = D-Ribose-5-Phosphat, RZ = Reaktionszeit, S-Konz. = Substratkonzentration; ns = nicht signifikant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

| Enzym | E-Konz. (μM) | Substrat | S-Konz. (mM) | Inhibitor | RZ (min) | Effekt |
|-----------|---------------------------|----------|--------------|-----------|----------|----------------|
| MDP1 | 0.11 | R-5-P | 4 | # 1 | 4 | -16 % (ns) |
| MDP1 | 0.11 | R-5-P | 4 | # 48 | 4 | -19 % (ns) |
| LHPP | 0.17 | PNP | 0.125 | # 1 | 20 | -4 % (ns) |
| LHPP | 0.17 | PNP | 0.125 | # 2 | 20 | +13 % (*) |
| LHPP | 0.17 | PNP | 0.125 | # 9 | 20 | -2 % (ns) |
| LHPP | 0.17 | PNP | 0.125 | # 48 | 20 | +5 % (ns) |
| LHPP | 0.17 | PPi | 2 | # 1 | 20 | -8 % (ns) |
| LHPP | 0.17 | PPi | 2 | # 2 | 20 | +19 % (ns) |
| LHPP | 0.17 | PPi | 2 | # 9 | 20 | ± 0 % (ns) |
| LHPP | 0.17 | PPi | 2 | # 48 | 20 | -7 % (ns) |
| Phospho 2 | 0.72 | PLP | 0.5 | # 1 | 2 | +9 % (ns) |
| Phospho 2 | 0.72 | PLP | 0.5 | # 9 | 2 | +9 % (ns) |
| Phospho 2 | 0.72 | PLP | 0.5 | # 48 | 2 | +133 % (***) |
| PnkP | 0.0035 | 20 mer | 0.01 | # 1 | 20 | +8 % (ns) |
| PnkP | 0.0035 | 20 mer | 0.01 | # 48 | 20 | -19 % (ns) |

Tabelle 3.3 Übersicht der gemessenen Inhibitoreffekte von Frankenbach, 2017, und Yesilyurt, 2017, sowie Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der gemessenen Inhibitoreffekte von Frankenbach, 2017, auf die HAD-Phosphatasen MDP1 und LHPP und von Yesilyurt, 2017, auf Phospho 2 und PnkP (Effekt [TF/ DY]). Damit die beschriebenen Werte mit den Ergebnisse dieser Arbeit verglichen werden können, sind die Ergebnisse in der letzten Spalte aufgeführt (Effekt [AK]). Die Reaktionszeit sowie Enzym-, Substrat- und Inhibitorkonzentration unterscheiden sich für MDP1 und Phospho 2 nicht von den in **Tabelle 3.2** angegebenen Werten. Für die Testung der Inhibitoreffekte auf die LHPP wurde die Reaktion mit PNP nach 30 Minuten und mit PPi nach 15 Minuten gestoppt (statt wie in dieser Arbeit jeweils nach 20 Minuten). Die Testung der Effekte auf die PnkP-Aktivität wurde mit 0.05 mM 20mer durchgeführt und die Reaktion wurde nach vier Minuten gestoppt (statt wie in dieser Arbeit mit 0.01 mM 20mer und einer Reaktionszeit von 20 Minuten).

LHPP = Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase, MDP1 = Magnesium-abhängige Phosphatase 1, PLP = Pyridoxal 5'-Phosphat, PnkP = Polynukleotidase 5'-Kinase/3'-Phosphatase, PNP = Imidodiphosphat, PPi = anorganisches Pyrophosphat, R-5-P = D-Ribose-5-Phosphat; ns = nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

| HAD-Phosphatase | Substrat | Inhibitor | Effekt [TF/ DY] | Effekt [AK] |
|-----------------|----------|-----------|-----------------|----------------|
| MDP1 | R-5-P | # 1 | +15 % (*) | -16 % (ns) |
| MDP1 | R-5-P | # 2 | ns | |
| MDP1 | R-5-P | # 9 | ns | |
| LHPP | PNP | # 1 | +16 % (*) | -4 % (ns) |
| LHPP | PNP | # 2 | +18 % (**) | +13 % (*) |
| LHPP | PNP | # 9 | +7 % (*) | -2 % (ns) |
| LHPP | PPi | # 1 | +30 % (*) | -8 % (ns) |
| LHPP | PPi | # 2 | +25 % (*) | +19 % (ns) |
| LHPP | PPi | # 9 | ns | ± 0 % (ns) |
| Phospho 2 | PLP | # 1 | erhöht (*) | +9 % (ns) |
| Phospho 2 | PLP | # 2 | ns | +9 % (ns) |
| Phospho 2 | PLP | # 9 | ns | |
| PnkP | 20 mer | # 1 | erhöht (**) | +8 % (ns) |
| PnkP | 20 mer | # 2 | ns | |
| PnkP | 20 mer | # 9 | erhöht (**) | |

4 Diskussion

Das derzeitige Wissen über die physiologischen Funktionen der PGP stammt ausschließlich aus genetischen Studien. Genetische Ansätze der Enzymregulation gehen häufig mit Kompensationsmechanismen (v.a. bei Gen-Knockout) und Off-Target-Effekten (v.a. bei Gen-Knockdown) einher (vgl. 1.6.1). Zellulär wirksame HAD-Phosphatase-Inhibitoren fehlen bislang weitestgehend. Diese sind aber notwendig, um akute Effekte der Enzymhemmung zu untersuchen und dadurch neue Erkenntnisse über die Enzymfunktion zu gewinnen. Diese Arbeit beschäftigt sich daher - als Teil eines Projektes - mit der pharmakologischen Inhibition der PGP und liefert erste Erkenntnisse über die Anwendung des PGP-Inhibitors # 1 in der Zellkultur. Darüber hinaus wurde die Art der PGP-Hemmung durch Inhibitor # 48 analysiert und es wurden erste Selektivitätstestungen mit Inhibitor # 48 durchgeführt. Viele weitere Experimente zur Charakterisierung der PGP-Inhibitoren und zur Untersuchung und Bestätigung von Inhibitoreffekten sind nötig, um mittels pharmakologischer Hemmung ein umfassenderes Verständnis über die Rolle der PGP im zellulären Stoffwechsel zu erhalten.

4.1 Implementierung der Inhibitor # 1-Behandlung in der Zellkultur

Inhibitor # 1 stellte aufgrund der biochemischen Charakterisierung den potentesten und damit vielversprechendsten Inhibitor der getesteten Moleküle dar (Engelmann, 2019). Erste Selektivitätstestungen zeigten keine vergleichbare Hemmung anderer HAD-Phosphatasen durch Inhibitor # 1 (Frankenbach, 2017, und Yesilyurt, 2017), sodass sich die Frage stellte, ob Inhibitor # 1 für die Hemmung der PGP in eukaryotischen Zellen geeignet ist.

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass Inhibitor # 1 in der Lage ist, die endogene PGP in GC1-Zelllysaten zu hemmen (siehe **Abb. 3.1**). Bei der

Inhibitor-Behandlung der GC1-Zellen mit anschließender Quantifizierung der PGP-Hemmung traten folgende Auffälligkeiten auf: Es ließ sich keine Hemmung der PGP durch Inhibitor # 1, gelöst in den Zellkulturmedien DMEM-Vollmedium, DMEM-Hungermedium sowie HBSS mit 1% BSA, nach 60 Minuten Inkubation beobachten. Die Inkubation der GC1-Zellen mit in HBSS ohne BSA gelöstem Inhibitor # 1 führte zur bestimmaren Inhibition der PGP-Aktivität (vgl. **Abb. 3.2**). Die bestimmare PGP-Hemmung verstärkte sich tendenziell mit Erhöhung der Inhibitorkonzentration sowie Verlängerung der Inkubationszeit (siehe **Abb. 3.2 D** und **3.3 A**). Des Weiteren konnte eine Reversibilität der Inhibition beobachtet werden (siehe **Abb. 3.3 B**). Eine Western Blot-Analyse von mit Inhibitor # 1 behandelten Zellen konnte keine signifikante Veränderung der PGP-Expression im Vergleich zur DMSO-Behandlung nachweisen (vgl. **Abb. 3.3 C**).

4.1.1 Einfluss von Zellkulturmedien auf die Wirksamkeit der Inhibitorbehandlung

Ein Grund für die unterschiedliche Wirksamkeit der Inhibitorbehandlung in den verschiedenen Zellkulturmedien könnte die Bindung des Inhibitors an Bestandteile des Mediums sein.

DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) mit 4.5 g Glucose pro Liter, ein viel verwendetes Zellkulturmedium, ist eine Weiterentwicklung des BMEs (basal medium Eagle) und enthält neben verschiedenen anorganischen Salzen im Vergleich zu BME die vierfache Konzentration an Vitaminen und Aminosäuren (Eagle, 1955, und Dulbecco und Freeman, 1959). Durch Zusatz von Penicillin und Streptomycin soll die Kontamination verhindert werden und L-Glutamin wird als wichtige Stickstoff-Quelle für wachsende, sich teilende Zellen zum Medium hinzugegeben (Schmitz, 2011). Der Unterschied zwischen DMEM-Vollmedium und DMEM-Hungermedium besteht in der Ergänzung von 10 % FCS zum Vollmedium, das vom Hersteller empfohlene und in der Arbeitsgruppe verwendete Wachstumsmedium für GC1-Zellen (vgl. 2.1.9 und 2.2.3). FCS ist eine wichtige Nahrungsquelle für Zellen und enthält eine Mischung aus wachstumsfördernden Bestandteilen: Hormone, Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Aminosäuren, Peptide, Proteine und an Proteine gebundene Lipide (Schmitz, 2011).

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) ist eine Salzlösung mit 1 g Glucose pro Liter, die in der Regel als Puffer-System für die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes in Zellkulturmedien verwendet wird (Hanks, 1975) sowie für das Waschen

und Transportieren von Zellen. Darüber hinaus wird HBSS dazu genutzt, durch das Nachahmen von Hungerbedingungen autophagische Prozesse in Zellen zu induzieren und diese Prozesse zu untersuchen (siehe beispielsweise Hu et al., 2018). Ohne den Zusatz von Nährstoffen eignet sich HBSS daher nicht zur längerfristigen Kultivierung von Zellen: Eine 16-stündige Aufbewahrung von mesenchymalen Stammzellen aus murinem Fettgewebe in HBSS zeigte zum Beispiel bereits eine verminderte Zellviabilität und geringere Proliferationsrate im Vergleich zur Kontroll-Aufbewahrung in DMEM mit 10 % FCS (Nahar et al., 2018). Ähnliche Effekte von HBSS auf GC1-Zellen konnten in Vorversuchen für die in dieser Arbeit präsentierten Experimente beobachtet werden. Für die Inkubationszeit des Inhibitors gelöst in HBSS wurde mit maximal 60 Minuten eine deutlich kürzere Behandlungszeit gewählt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen ergaben, dass dies keinen Einfluss auf die Zellviabilität hat - sowohl im Vergleich zur DMSO-Behandlung (siehe **Abb. 3.4**) als auch im Vergleich zu einer dreistündigen Inkubation der GC1-Zellen mit 0.1 % DMSO verdünnt in DMEM-Vollmedium. Die Ergebnisse der dreistündigen Inkubation stammen aus eigenhändig durchgeführten Vorversuchen, deren Ergebnisse nicht detailliert in diese Arbeit aufgenommen wurden.

Die Untersuchung der Bindung von Substanzen an Plasmaproteine stellt einen wichtigen Aspekt in der Medikamentenentwicklung dar, da dies entscheidenden Einfluss auf die Pharmakokinetik und -dynamik hat (Vuignier et al., 2010, Howard et al., 2010, und Wanat et al., 2018). Ein Fokus liegt auf der Analyse der Bindung mit humanem Serumalbumin, welches mit bis zu 60 % das häufigste im Blut vorkommende Protein ist (Dargó et al., 2020). Es gibt verschiedene Methoden, die dieses Phänomen untersuchen und mit denen die Bindung zwischen Medikamenten und Proteinen abgeschätzt werden kann. Diese können in separierende, physikalische, chromatografische sowie elektrophoretische Methoden unterteilt werden. In den letzten Jahren sind zudem computergestützte Verfahren entwickelt worden (Wanat et al., 2018). Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung von DMEM und HBSS sowie der nicht vorhandenen Hemmung der PGP in HBSS mit 1% BSA im Vergleich zu HBSS ohne BSA ist eine Proteinbindung von Inhibitor # 1 und damit die Verhinderung der Wirkung zu erwarten. Dieser Aspekt sollte in der weiteren Charakterisierung von Inhibitor # 1 bedacht und untersucht werden.

4.1.2 Einfluss von Moleküleigenschaften des Inhibitors auf die Zellpermeabilität

Da die Zellen nach der Inhibitorbehandlung in serumfreiem DMEM-Hungermedium jedoch auch keine Hemmung der PGP-Aktivität zeigten, sind weitere Aspekte zu berücksichtigen. Insbesondere die chemischen Eigenschaften des Inhibitors können die Wirksamkeit beeinflussen. Diese haben entscheidenden Einfluss auf die Art und Weise wie Moleküle die Plasmamembran überwinden, um an ihre intrazellulären Zielstrukturen zu gelangen. Mit Hilfe der Lipinski-Regeln können Vorhersagen über die Absorption und Permeabilität von Molekülen getroffen werden (Lipinski et al., 1997). Eine molekulare Masse unter 500 kDa, weniger als 5 Wasserstoffbrückendonatoren (die Anzahl lässt sich mit Hilfe der Summe aus -OH und -NH-Bindungen abschätzen), weniger als 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren (die Anzahl lässt sich mit Hilfe der Summe aus -Ns und -Os abschätzen) sowie ein Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (gemessen als $\log(P)$) kleiner als 5 erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül mittels passiver Diffusion die Lipiddoppelschicht überwindet (Lipinski et al., 1997, und Berg et al., 2018). Für viele Moleküle lässt sich anhand dieser Richtlinien eine erfolgreiche Prognose stellen. Es gibt jedoch auch Moleküle, deren Eigenschaften von den Kriterien abweichen und die trotzdem eine gute Permeabilität und Bioverfügbarkeit haben. Inhibitor # 1 ist ein Benzoesäurederivat, dessen Größe (496.48 kDa) und Polarität (4 Wasserstoffbrückendonatoren und 9 -akzeptoren) sich im oberen Bereich der definierten Grenzen befindet (vgl. **Abb. 1.6**). Der Ionisierungsgrad der einzelnen funktionellen Gruppe ist pH-abhängig (Berg et al., 2018). Daher hat sowohl der intra- als auch der extrazelluläre pH-Wert entscheidenden Einfluss auf die Ladung des Inhibitors # 1 und damit auf dessen pharmakokinetische Eigenschaften (Manallack et al., 2013) und sollte deswegen Berücksichtigung finden.

Um die Zellpermeabilität von Molekülen näher zu untersuchen, gibt es Lipiddoppelschicht-Modelle, mit welchen eine passive Diffusion quantifiziert werden kann (engl. parallel artificial membrane permeation assay (PAMPA)). Mit Zellmonolayer beispielsweise aus colorektalen Caco-2- oder renalen MDCK-Zelllinien kann außerdem der passive und aktive Transport durch Kanäle und Transporter analysiert werden (Kansy et al., 1998, Sugano et al., 2010, und Yang und Hinner, 2015).

4.1.3 Untersuchung von bekannten zellbiologischen Effekten

Die beschriebenen Ergebnisse der Inhibitorbehandlung (**Abb. 3.2** und **Abb. 3.3**) lassen nicht sicher schlussfolgern, dass der Inhibitor die Zellmembran der GC1-Zellen

überwunden hat, da die Zellen nach der Inkubation mit Inhibitor # 1 lysiert und erst anschließend die PGP-Aktivität gegenüber PG gemessen wurde (vgl. 2.2.5). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit erste zelluläre Effekte der PGP-Inhibition durch Inhibitor # 1 untersucht. Wie in 1.5.1 und 1.5.3 beschrieben, ist eine verminderte PGP-Aktivität durch genetische Modifikation mit einem erhöhten TAG-Umsatz sowie TAG-Gehalt assoziiert. Die 60-minütige Behandlung mit $200 \mu\text{M}$ Inhibitor # 1 führte zur Steigerung der TAG-Konzentration in GC1-Zellen mit Kontroll-shRNA um das 2.69-fache. Im Gegensatz dazu wurde in GC1-Zellen mit PGP-shRNA eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der TAG-Konzentration um das 1.41-fache gemessen (siehe **Abb. 3.5**).

Vergleicht man die in dieser Arbeit gemessenen TAG-Konzentrationen der mit DMSO behandelten GC1-Zellen mit den von Segerer und Kollegen publizierten Ergebnissen der unbehandelten GC1-Zellen (Segerer et al., 2018) fällt auf, dass das Verhältnis der TAG-Level in den GC1-Zellen mit PGP-shRNA im Vergleich zu denen mit Kontroll-shRNA ähnlich ist (siehe **Abb. 4.1 A**). **Abbildung 4.1 B** zeigt den pro μg Protein gemessenen TAG-Gehalt in GC1-Zellen mit PGP-shRNA und mit Kontroll-shRNA. Die gemessenen Werte sind in dieser Arbeit deutlich geringer als bei Segerer und Kollegen (Segerer et al., 2018).

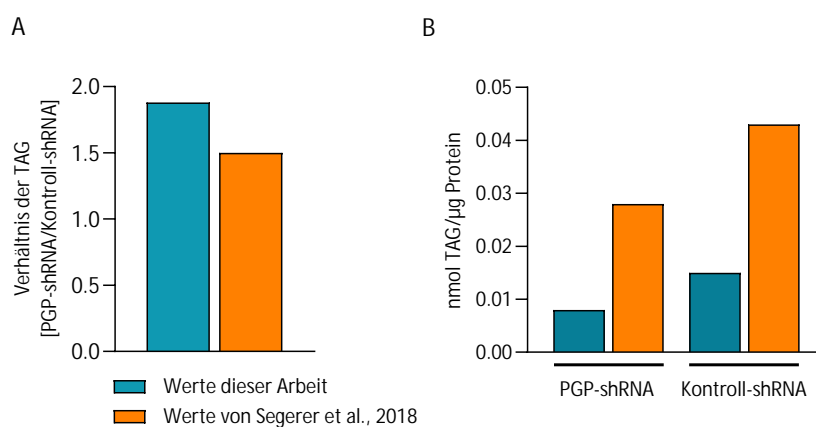


Abbildung 4.1 Vergleich der TAG-Konzentrationen in GC1-Zellen mit PGP- und Kontroll-shRNA

A: Verhältnis der TAG-Konzentrationen in GC1-Zellen mit PGP- und Kontroll-shRNA.

B: TAG-Konzentration in GC1-Zellen mit PGP- und Kontroll-shRNA.

In beiden Experimenten wurde das Adipogenesis Assay Kit zur Messung der TAG verwendet. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlich hohen TAG-Konzentrationen, die in **Abbildung 4.1 B** dargestellt sind, könnten die unterschiedlichen Zellkulturmedien sein, in denen die Zellen vor der Probenaufbereitung inkubiert wur-

den. Von Segerer und Kollegen wurde DMEM-Vollmedium verwendet und in dieser Arbeit HBSS ohne BSA (Segerer et al., 2018). Durch das im DMEM-Vollmedium enthaltene FCS stehen den Zellen Lipide zur Verfügung, welche sie aufnehmen und verstoffwechseln können.

Interessant wäre es in weiteren Experimenten zu testen, wie sich die TAG-Konzentration durch eine Inhibitorbehandlung unter metabolischen Überflussbedingungen verändert und welche Effekte die Inhibitorbehandlung in GC1-Zellen mit überexprimierter PGP erzielt (vgl. Mugabo et al., 2016). Darüber hinaus wäre es wichtig in weiteren Versuchen zu testen, ob sich die Auswirkungen auch in anderen Zelllinien beobachten lassen, da Inhibitorwirkungen auch von zellulären Kontexten abhängig sein können (vgl. Miyazawa, 2011).

4.1.4 Analyse von Off-Target-Effekten

Wie bereits in 1.6.1 erwähnt, ist für die erfolgreiche Anwendung von Inhibitoren zur Erforschung zellulärer Prozesse eine selektive Hemmung der Zielstruktur essentiell, denn die Beobachtung von Off-Target-Effekten kann zu Fehlinterpretationen führen (Miyazawa, 2011). Zur Bestätigung von Inhibitoreffekten beziehungsweise zur Aufdeckung von Off-Target-Effekten hat Cohen sechs essentielle Kriterien vorgeschlagen, die im Folgenden aufgeführt werden (Cohen, 2009). Er bezieht sich in seiner Arbeit auf die Untersuchung von Proteinkinaseinhibitoren. Die Kriterien können aber verallgemeinert werden und sind dann auch auf andere Enzymklassen anwendbar (Cohen, 2009).

- Die Selektivität des Inhibitors sollte gegen andere Kinasen (möglichst ≥ 100) getestet worden sein.
- Die Effekte sollten für mindestens zwei strukturell unverwandte Inhibitoren beobachtet worden sein.
- Die zellulären Wirkungen des Inhibitors sollten bei einer Konzentration beobachtet werden, die ähnlich der Konzentration ist, die die Phosphorylierung eines etablierten physiologischen Substrats der Proteinkinase verhindert.
- Wenn Analoga verfügbar sind, sollte die Rangfolge ihrer Potenz bei der Vermittlung des zellulären Effekts der Rangfolge ihrer Potenz bei der Hemmung der Phosphorylierung eines physiologischen Ziels der Proteinkinase entsprechen.

- Außerdem sollten Analoga, die die *in vitro* Phosphorylierung nicht hemmen, keine zellulären Effekte zeigen.
- Die chemische Struktur des Inhibitors sollte bekannt sein, damit die Versuche von anderen Arbeitsgruppen reproduziert werden können.

Darüber hinaus wurden zwei weitere wünschenswerte Kriterien von Cohen formuliert (Cohen, 2009):

- Die beobachteten Effekte sollten nicht in Zellen, die eine resistente Mutante exprimieren, durch eine Inhibitorbehandlung hervorgerufen werden.
- Die beobachteten Effekte sollten nicht in Zellen, in denen die Zielstruktur nicht vorhanden ist, durch eine Inhibitorbehandlung hervorgerufen werden.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche wurden verhältnismäßig hohe Inhibitorkonzentrationen verwendet. Hohe Inhibitorkonzentrationen erhöhen jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass neben dem Ziel-Protein andere Proteine gehemmt werden und Off-Target-Effekte auftreten (vgl. Weiss et al., 2007). Dies sollte bei der Interpretation der TAG-Konzentrationsmessungen berücksichtigt werden. Die Bedingungen für nachfolgende Experimente sollten so angepasst werden, dass geringere Inhibitorkonzentrationen für das Erzielen von zellulären Effekten ausreichend sind. Wenn durch die RNA-Interferenz die PGP in den GC1-Zellen vollständig herabreguliert ist (vgl. 1.6.1), könnte durch die Untersuchung der Inhibitoreffekte auf die TAG-Konzentration in GC1-Zellen mit PGP-shRNA bereits eines der wünschenswerten Kriterien erfüllt sein. Neben der Testung der Inhibitoreffekte auf andere Zellen (vgl. 4.1.3), sollte auch für die anderen Inhibitoren eine Inhibitorbehandlung in der Zellkultur implementiert werden, sodass im Idealfall durch die Analyse der Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren Off-Target-Effekte aufgedeckt beziehungsweise Inhibitoreffekte bestätigt werden können. Darüber hinaus sind die Selektivitätstestungen, die im Vorfeld zu dieser Arbeit mit Inhibitor # 1 von Frankenbach, 2017, und Yessilyurt, 2017, durchgeführt wurden, noch nicht ausreichend, um eine verlässliche Aussage über die Selektivität von Inhibitor # 1 treffen zu können. Sie sollten daher durch weitere Experimente ergänzt werden (siehe auch 4.2.2).

4.1.5 Messung der Inhibitor # 1-Konzentration in GC1-Zellen

Es sind häufig signifikante Unterschiede zwischen der biochemischen und der zellulären Wirkung von Substanzen beobachtbar, sodass es oft nicht möglich ist anhand von biochemischen Ergebnissen zelluläre Effekte vorherzusagen (Hann und Simpson,

2014). Das Messen der intrazellulären Substanzkonzentration soll daher zur besseren Vorhersagbarkeit und zum Verständnis der zellulären Wirksamkeit beitragen (Chu et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von spektroskopischen Analysen untersucht, wie viel von dem im Medium gelösten Inhibitor in die behandelten Zellen gelangt. Die UV-Spektroskopie findet als ein einfaches, schnelles und kostengünstiges Verfahren in der pharmazeutisch-chemischen Analyse von Verbindungen Verwendung. Die Grundlage zur quantitativen Bestimmung bildet das Lambert-Beer Gesetz, welches besagt, dass die Menge des absorbierten Lichtes proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz ist (Müllertz et al., 2016). Es wurden zunächst die Absorptionseigenschaften des Inhibitors # 1 analysiert und anschließend die OD der mit Inhibitor # 1 bzw. DMSO behandelten GC1-Zellen bei dem bestimmten Absorptionsmaximum gemessen. Mittels erstellter Standardgerade wurde die OD in μg Inhibitor pro μg Gesamtproteinmenge umgerechnet (siehe auch 2.2.8 und 3.4). Nach einstündiger Behandlung der GC1-Zellen mit $200 \mu\text{M}$ Inhibitor # 1 in HBSS konnten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant höhere OD-Werte gemessen werden (siehe **Abb. 3.6 C-D**). Passend zu den Aktivitätsmessungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Inhibitor # 1 und den mit DMSO behandelten Zellen in DMEM-Vollmedium, DMEM-Hungermedium und DMEM-Medium ohne Glucose. Auch die Messung nach der einstündigen Behandlung mit $100 \mu\text{M}$ Inhibitor # 1 in HBSS ergab keinen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle (vgl. **Abb. 3.2** und **Abb. 3.6 C**).

Instrumentelle Faktoren, beispielsweise Streulicht, und chemische Aspekte, zum Beispiel hohe Substanzkonzentrationen, können Abweichungen vom Lambert-Beer Gesetz bedingen (Müllertz et al., 2016). Berechnet man anhand der bestimmten Inhibitormenge pro Gesamtproteinmenge die Inhibitorkonzentration pro Zelle, liegt diese bei 18.5 mmol . Für die Berechnung wurden Angabe zu einem durchschnittlichen Volumen und Proteingehalt von HeLa-Zellen verwendet ($2,6 \text{ pl}$ und 150 pg ; Volpe und Eremenko-Volpe, 1970, Luciani et al., 2001, und Finka und Goloubinoff, 2013). Es ist unklar, inwiefern dieser Wert mit der tatsächlichen Konzentration übereinstimmt. Einerseits kann die Messung durch nicht-spezifische Bindung des Inhibitors # 1 an das Zelläußere sowie das Plastik der 96-well Platte verfälscht werden, andererseits könnten Metabolite, welche durch eine nicht-selektive Wirkung des Inhibitors # 1 gebildet werden, die Absorptionsmessung stören. Um dies genauer zu untersuchen, gibt es aufwändigere und genauere Verfahren zur Bestimmung der intrazellulären,

nicht-gebundenen Substanzkonzentration zum Beispiel mittels Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (Colletti et al., 2008, Mateus et al., 2013, und Mateus et al., 2017). Die Lokalisation bzw. Verteilung der Substanz in der Zelle, die entscheidenden Einfluss auf die Interaktion mit der Zielstruktur hat, lässt sich mit diesen Verfahren jedoch nicht bestimmen und bedarf weiterer Untersuchungen (Hann und Simpson, 2014).

4.2 Inhibitor # 48 - ein vielversprechender PGP-Inhibitor?

Inhibitor # 48 zeigte in der Testung mit gereinigter muriner PGP ein unkompetitives Hemmverhalten. Sowohl die V_{max} als auch die K_M nahmen mit steigender Inhibitorkonzentration ab (siehe **Tab. 3.1** und **Abb. 3.7**). In den anschließenden Selektivitätstestungen mit den HAD-Phosphatasen MDP1, LHPP und PnkP konnte keine signifikante Veränderung der Aktivität durch die getesteten Inhibitoren nachgewiesen werden (vgl. **Abb. 3.11, 3.8** und **3.10**). Die Versuche mit Phospho 2 zeigten dagegen eine signifikante Aktivitätssteigerung (um den Faktor 2.3) durch die Behandlung mit Inhibitor # 48 (siehe **Abb. 3.9**).

4.2.1 Unkompetitive PGP-Hemmung durch Inhibitor # 48

Die Charakterisierung von Inhibitor # 48 als unkompetitiver PGP-Inhibitor lässt vermuten, dass Inhibitor # 48 an einer anderen Stelle der PGP bindet als Inhibitor # 1, der als gemischter Inhibitor (kompetitiv und nicht-kompetitiv) charakterisiert wurde, und als die Inhibitoren # 2 und # 9, die ein kompetitives Hemmverhalten zeigten (Engelmann, 2019). Zwischenzeitlich von der Arbeitsgruppe durchgeführte strukturelle Studien (Co-Kristallisation der PGP mit Inhibitor # 1 bzw. Inhibitor # 48) konnten die Bindungsstelle und den wahrscheinlichen Wirkmechanismus von Inhibitor # 1 und # 48 aufdecken. Diese Ergebnisse passen zu den biochemisch charakterisierten Inhibitionsarten der Inhibitoren. Die erfolgreiche Co-Kristallisation ermöglichte zudem die Analyse der Proteinstruktur der PGP (Ergebnisse bislang unveröffentlicht).

4.2.2 Erste Selektivitätstestungen

Die Resultate der Selektivitätstestungen mit Inhibitor # 48 stellen erste wichtige Erkenntnisse dar. Durch die exemplarische Testung von HAD-Phosphatasen mit verschiedenen Cap-Domänen (MDP1 und PnkP besitzen eine C0-Cap-Domäne, Phos-

pho 2 eine C1-Cap-Domäne und LHPP eine C2a-Cap-Domäne, für weitere Informationen zu den getesteten Phosphatasen siehe Anhang 6.2) konnte initial ein breites Spektrum an potentiellen Inhibitortargets untersucht werden. Beim Vergleich der Inhibitoreffekte von # 1, # 2 und # 9 auf die HAD-Phosphatasen MDP1, LHPP, PnkP und Phospho 2, die initial von Frankenbach, 2017, und Yesilyurt, 2017, getestet wurden und im Rahmen dieser Arbeit neben der erstmaligen Testung von Inhibitor # 48 erneut getestet wurden, fällt auf, dass die initial beschriebenen Effekte nicht alle reproduziert werden konnten (siehe **Tab. 3.3**). Ursächlich dafür könnten, neben den teilweise unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, eine veränderte Enzymaktivität sowie Mess- und Pipettierfehler sein. Es lässt sich aber festhalten, dass die Aktivität der getesteten Enzyme nicht in vergleichbarer Weise wie die PGP-Aktivität durch die Inhibitoren gehemmt wird. Für die Selektivitätstestung wurde eine relativ hohe Inhibitorkonzentration von $40 \mu\text{M}$ verwendet. Die bestimmte IC_{50} der Inhibitoren mit muriner PGP liegt zwischen $0.37 \mu\text{M}$ und $2.04 \mu\text{M}$ und ist damit deutlich niedriger als die verwendeten $40 \mu\text{M}$ (für die bestimmten IC_{50} vgl. **Tab. 1.2**). Für die getesteten Phosphatasen ist daher keine weitere Charakterisierung der Aktivitätsänderung durch die Inhibitoren notwendig. Die gemessene Aktivitätssteigerung von Phospho 2 durch Inhibitor # 48 ist aufgrund des katalytischen Mechanismus der HAD-Phosphatasen eher ungewöhnlich (siehe auch 4.3.2). Eine weitere Charakterisierung der Inhibitorwirkung auf Phospho 2 könnte helfen, zwischen einem methodischen Fehler und einer tatsächlichen Aktivierung zu unterscheiden.

Um die Selektivität von Inhibitor # 48 weiter zu charakterisieren, sollten die Inhibitoreffekte auf weitere HAD-Phosphatasen sowie Phosphatasen anderer Superfamilien und im nächsten Schritt anderer Enzymklassen analysiert werden (siehe auch 4.1.4 bzw. Cohen, 2009). Die Untersuchung weiterer HAD-Phosphatasen bringt dabei die Schwierigkeit mit sich, dass viele der bekannten HAD-Phosphatasen nicht kommerziell verfügbar sind. Um die Wirkung auf möglichst viele Enzyme zu untersuchen, sollte das Screening von Enzymlibliotheken als Option erwogen werden (siehe beispielsweise Miduturu et al., 2011).

4.2.3 Denkbare weiterführende Untersuchungen

Neben ergänzenden Selektivitätstestungen sind weitere Experimente notwendig, um Off-Target-Effekte auszuschließen bzw. zu charakterisieren. Darüber hinaus ist die Inhibitor # 48-Behandlung in der Zellkultur zu implementieren (siehe auch 4.1). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass eine Hemmung der endogenen PGP in GC1-Zelllysaten durch Inhibitor # 48 möglich ist (siehe **Abb. 3.1**).

Außerdem wurden die Inhibitoren bislang nur auf die Hemmung der PG-Dephosphorylierung untersucht. Eine weitere interessante und wichtige Frage ist, ob und inwiefern die charakterisierten Inhibitoren auch die Dephosphorylierung der beschriebenen PGP-Substrate G3P, 2PL und 4PE beeinflussen (Collard et al., 2016, und Mugabo et al., 2016).

4.3 Mögliche Anwendung der PGP-Inhibitoren

Die beschriebenen Auswirkungen durch Veränderung der PGP-Aktivität lassen auf eine potentielle Rolle in der Entstehung von Krankheiten wie Diabetes Mellitus Typ 2, Adipositas und Tumorerkrankungen schließen (Possik et al., 2017, und Gohla, 2019). Ein selektiver PGP-Inhibitor ist nicht nur ein erfolgversprechendes Tool, um mehr über die Funktionen der PGP im physiologischen und pathophysiologischen Stoffwechsel zu erfahren, sondern könnte möglicherweise auch als Therapeutikum verwendet werden.

4.3.1 Tumorthherapie

Eine Hemmung der PGP durch einen selektiven Inhibitor könnte möglicherweise das Tumorzellwachstum verlangsamen. Dies würde zu Untersuchungen passen, die zeigten, dass die PGP-Aktivität für die Zellproliferation von embryonalen Zellen essentiell zu sein scheint (siehe 1.5.1; Seifried et al., 2016). Die PGP dephosphoryliert als „metabolite repair enzyme“ die in der Glykolyse entstehenden Nebenprodukte 2PL und 4PE. Dies verhindert die Akkumulation dieser beiden Produkte und gewährleistet die Aufrechterhaltung des PPWs und der Glykolyse, die durch Akkumulation von 2PL und 4PE gehemmt werden (siehe 1.4.3). Besonders für das Wachstum von Tumorzellen ist es wichtig, dass genügend Energie sowie Substrate für erforderliche Zellbestandteile zur Verfügung gestellt werden. Tumorzellen zeigen deswegen, wie in 1.7 beschrieben, charakteristische Veränderungen des Glucose-Stoffwechsels, unter anderem eine gesteigerte aerobe Glykolyse. Zudem gibt es Hinweise, dass diese gesteigerte Glykolyse mit einer verminderten Sensitivität gegenüber einer Radio- sowie Chemotherapie assoziiert ist (Pitroda et al., 2009, und Y. Zhou et al., 2012), sodass eine PGP-Inhibition die Tumorthherapie zusätzlich positiv beeinflussen könnte.

Insbesondere Tumore, in denen die PGP überexprimiert ist, stellen ein potentiell interessantes Ziel dar, da die Überexpression Ausdruck eines gesteigerten Bedarfs an der Beseitigung der entstehenden Nebenprodukte sein könnte. Präliminäre Analysen zeigen eine Amplifikation der PGP in einem Teil der untersuchten Tu-

morgewebe von Pankreas-, Prostata-, Mamma-, Gebärmutter- und Nebennierenrindenzinomen sowie von Melanomen (siehe **Abb. 4.2**). **Abbildung 4.2** wurde mit Hilfe der Plattform cBioPortal for Cancer Genomics erstellt (<http://cbioportal.org>, Cerami et al., 2012, und Gao et al., 2013). Diese Plattform bietet die Möglichkeit, große Datensätze von verschiedenen Tumor-Genomstudien zu visualisieren und zu analysieren. Bei der Erstellung der Abbildung wurden insgesamt 181 Studien mit 47 571 Proben von 45 142 Patientinnen und Patienten berücksichtigt. Gezeigt sind nur die Studien, in denen die PGP in mindestens 3 % der Proben verändert ist und in denen mindestens 50 Fälle untersucht wurden. Auch wenn die Amplifikation der PGP in diesen Tumoren zum aktuellen Zeitpunkt von unbekannter Bedeutung ist, stellt die Analyse der Tumor-Genom-Daten einen ersten Anhaltspunkt für weitere Arbeiten dar. Sie verschafft einen Überblick über Tumorentitäten bei denen eine genetisch definierte Subgruppe möglicherweise von einem PGP-Inhibitor profitieren könnten. Weiterführende Analysen müssen folgen, um die Relevanz der PGP-Amplifikation für die Tumorentstehung und für das Tumorwachstum einschätzen und verstehen zu können.

Eine erste weiterführende Analyse wurde von Lounis und Kollegen durchgeführt (Lounis et al., 2021). Um die Bedeutung der PGP-Expression in Tumorzellen besser zu verstehen, wurden Proben von Prostatakarzinomen aus Biodatenbanken immunhistochemisch untersucht und mit klinischen Endpunkten der Patientendaten verglichen. Die retrospektive Analyse konnte zeigen, dass eine hohe epitheliale PGP-Expression in Prostatakarzinomen mit einem erhöhten Risiko für ein biochemisches Rezidiv (Prostata-spezifisches Antigen (PSA) > 0.2 ng/ml) und dem Auftreten von Knochenmetastasen sowie mit einer höheren tumorspezifischen Mortalität assoziiert ist (Lounis et al., 2021).

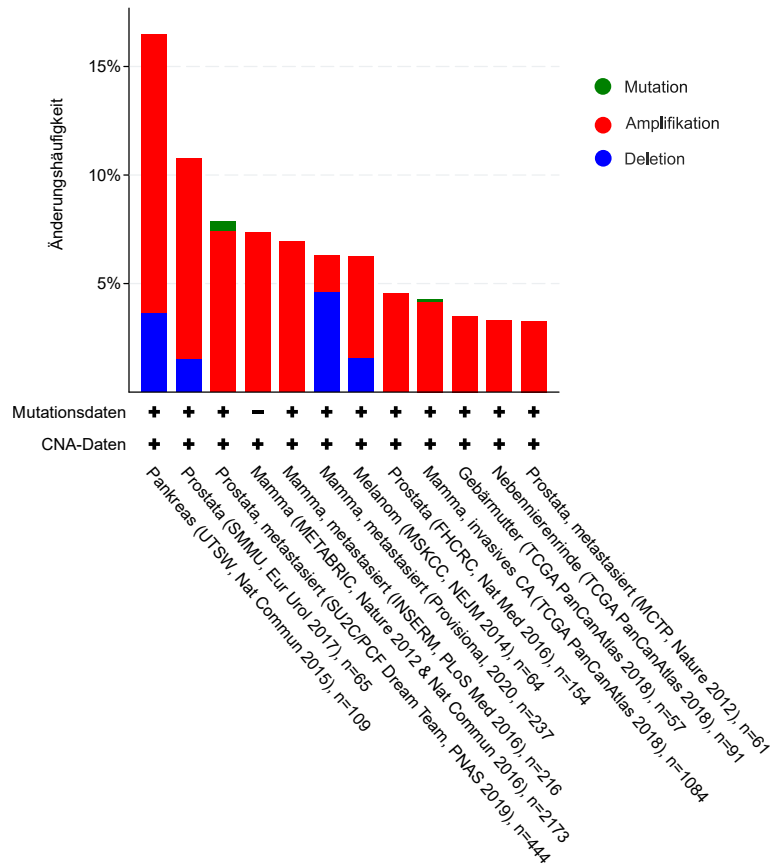


Abbildung 4.2 Änderungshäufigkeit einer veränderten PGP-Expression in Tumoren

Die Abbildung wurde mit Hilfe der Plattform cBioPortal for Cancer Genomics erstellt und anschließend ins Deutsche übersetzt. Teilweise wurden Informationen ergänzt, z.B. Fallzahlen. CNA-Daten = copy number alterations, engl. für Änderung der Kopienanzahl. Weitere Details sind im Text beschrieben.

4.3.2 Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel

Die PGP ist über die oben genannten Bereiche hinaus ein potentiell interessantes Ziel für die Therapie von metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas (Mugabo et al., 2016, und Possik et al., 2017). Der Überfluss an Nährstoffen erhöht den Umsatz im GL/FS-Zyklus. Dadurch werden unter anderem mehr Lipidsignale produziert, die beispielsweise zu einer erhöhten glucosestimulierten Insulinsekretion führen. Die PGP hat eine entscheidende Rolle an der Schnittstelle zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel (vgl. 1.4.4). Durch die G3PP-Aktivität kann die Verfügbarkeit von G3P reguliert werden und damit der Umsatz im GL/FS-Zyklus (Mugabo et al., 2016).

Mugabo und Kollegen konnten in β -Zellen und Hepatozyten mit PGP-Überexpression eine verminderte Glucotoxizität und eine verminderte glucosestimulierte Insulinse-

kretion sowie eine vermehrte Freisetzung von sowohl Glycerol als auch freien Fettsäuren nachweisen (siehe auch 1.5.3; Mugabo et al., 2016). In Hepatozyten wurde zudem eine verminderte Gluconeogenese beobachtet (Mugabo et al., 2016). Erste Experimente an Ratten mit in vivo PGP-Überexpression in der Leber durch Einbringen eines adenoviralen Vektors zeigten unter anderem eine Gewichtsreduktion der Tiere, erhöhte Glycerol- und verminderte TAG-Plasma-Level (siehe auch 1.5.3, Mugabo et al., 2016). Die Herabregulation der PGP zeigte jeweils entgegengesetzte Effekte.

Ein PGP-Aktivator erscheint aufgrund der beschriebenen Ergebnisse potentiell interessant für die Therapie von metabolischen Erkrankungen. Jedoch sollte bedacht werden, dass eine Enzymüberexpression zu einer Veränderung des Substratspektrums führen kann und nicht immer mit einer Aktivierung gleichzusetzen ist (Gohla, 2019). Außerdem sollte für das Finden eines Aktivators der exakte Enzymmechanismus bekannt sein, vor allem hinsichtlich der physiologischen Enzymregulation. Zum Beispiel wäre es hilfreich Informationen über möglicherweise existierende Faktoren zu haben, die zu einem schnelleren Öffnen und Schließen des aktiven Zentrums führen, oder über die Interaktion mit potentiell vorhandenen inhibitorischen Regulator-Proteinen, die verhindert werden könnte (Fahs et al., 2016).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit geht es um die Phosphoglykolatphosphatase (PGP), die als Phosphatase vom Haloazid Dehalogenase-Typ (HAD-Phosphatase) zu der ubiquitär vorkommenden Superfamilie der HAD-Hydrolasen gehört. In der Literatur ist eine *in vitro* Phosphatase-Aktivität gegenüber 2-Phospho-L-Laktat (2PL), 4-Phospho-D-Erythronat (4PE), Phosphoglykolat (PG) und Glycerol-3-Phosphat (G3P) beschrieben. 2PL und 4PE entstehen in Nebenreaktionen während der Glykolyse und hemmen bei Akkumulation die Glykolyse bzw. den Pentosephosphatweg. PG kann auch in einer Nebenreaktion während der Glykolyse oder im Rahmen der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden entstehen. G3P entsteht aus Dihydroxyacetonphosphat und bildet das Kohlenhydratgerüst der Triacylglyceride (TAG). Zelluläre Studien konnten Hinweise auf die Regulierung des epidermalen wachstumsfaktor-(EGF-)induzierten Zytoskelettumbaus durch die PGP liefern und die Untersuchung von Mäusen mit PGP-Inaktivierung zeigte einen Einfluss auf die Zellproliferation und embryonale Entwicklung. Die Regulation der PGP-Expression führte zu Veränderungen im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel.

Die Untersuchung der PGP-Funktionen erfolgte bislang ausschließlich mit genetischen Ansätzen. Aufgrund von möglichen Kompensationsmechanismen und Off-Target-Effekten müssen genetische und pharmakologische Methoden als sich ergänzende Ansätze verstanden werden. Um die Funktionen der PGP besser zu verstehen, fokussiert sich die vorliegende Arbeit auf die gezielte pharmakologische PGP-Inhibition. In Vorarbeiten wurden 41.000 Moleküle gescreent und fünf potentielle Inhibitoren identifiziert. Ziele dieser Arbeit waren zum einen die Implementierung der Inhibitor #1-Behandlung in der Zellkultur, zum anderen die Charakterisierung der PGP-Hemmung durch Inhibitor #48 und die Durchführung erster Selektivitätstestungen mit Inhibitor #48.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Inhibitor #1 in der Lage ist, die endogene PGP in Zelllysaten der murinen spermatogonialen Zelllinie (GC1)

zu hemmen. Unter bestimmten Bedingungen führte die Inhibitor # 1-Behandlung der GC1-Zellen zur Hemmung der PGP. Erste Analysen zellulärer Inhibitoreffekte konnten eine Steigerung der TAG-Konzentration in behandelten GC1-Zellen nachweisen. Die PGP-Hemmung durch Inhibitor # 48 wurde als unkompetitive Inhibition charakterisiert und es zeigten sich keine relevanten Inhibitoreffekte auf die HAD-Phosphatasen Magnesium-abhängige Phosphatase 1 (MDP1), Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase (LHPP) und Polynukleotidase 5'-Kinase/3'-Phosphatase (PnkP). Dagegen konnte eine Aktivitätssteigerung von Phospho 2 beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit liefert somit erste Erkenntnisse über die Anwendung des PGP-Inhibitors # 1 in der Zellkultur und schafft die Grundlage für nachfolgende Untersuchungen mit Inhibitor # 48. Weitere Experimente sind notwendig, die die Inhibitorbehandlung in der Zellkultur optimieren und die Selektivität weiter charakterisieren, um mithilfe der Inhibitoren neue Erkenntnisse über die physiologische und pathophysiologische Rolle der PGP gewinnen zu können.

6 Anhang

6.1 Genetische PGP-Modifikationen

Tabelle 6.1 Genetische PGP-Modifikationen

Die Tabelle zeigt die in der Literatur beschriebenen Methoden der genetischen PGP-Regulation.

| Method | Zelllinie/Organismus | Literatur |
|------------------------|--|--|
| Knockout | | |
| CRISPR/Cas9 | HCT116 | Collard et al., 2016 Gerin et al., 2019 |
| CRISPR/Cas9 | U2OS | Gerin et al., 2019 |
| Knockin | | |
| Cre/loxP | Mäuse | Segerer et al., 2016 |
| Knockdown | | |
| shRNA | GC1-spg | Seifried et al., 2014 |
| | Inselzellen des murinen Pankreas und murine Hepatozyten | Mugabo et al., 2016 |
| | GC1-spg | Segerer et al., 2018 |
| siRNA | INS832/13 | Mugabo et al., 2016 |
| Überexpression | | |
| pCMV-basierte Plasmide | INS832/13 | Mugabo et al., 2016 |
| Adenovirale Infektion | Inselzellen des murinen Pankreas, murine Hepatozyten und Ratten | Mugabo et al., 2016 |

6.2 Getestete HAD-Phosphatasen

Im folgenden Abschnitt sind die beschriebenen Substrate, die derzeit bekannten physiologischen Bedeutungen sowie Krankheitsassoziationen der getesteten HAD-Phosphatasen MDP1, LHPP, Phospho 2 und PnkP zusammengefasst.

MDP1: Die HAD-Phosphatase MDP1 gehört zur der Untergruppe mit C0-Cap-Domäne (Selengut und Levine, 2000, Selengut, 2001, und Peisach et al., 2004). Das physiologisches Substrat der MDP1 ist bislang unbekannt. Initial konnte eine in vitro Aktivität der MDP1 gegenüber Arabinose-5-Phosphat, Ribose-5-Phosphat, Fructose-6-Phosphat und 2-Desoxyribose-5-Phosphat gezeigt werden. Fortpied und Kollegen identifizierten Protein-gebundenes Fructosamin-6-Phosphat (FN6P), das durch spontane Glykosylierung von Aminen mit Glucose-6-Phosphat entsteht, als Substrat der MDP1. Durch die Dephosphorylierung von FN6P entstehen Fructosamine, deren Entfernung anschließend durch die Fructosamin-3-Kinase durchgeführt wird (Fortpied et al., 2006). Dieser Mechanismus spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Reparatur von Proteinen (Selengut und Levine, 2000, Selengut, 2001, und Fortpied et al., 2006).

In einer retrospektiven Studie mit immunohistochemischer Analyse von Magenkarzinomen korrelierte eine verminderte MDP1-Expression mit geringer differenzierten Tumoren, höherem Tumorstadium sowie vermindertem krankheitsfreien Überleben und vermindertem Gesamtüberleben (Y. Chen et al., 2017). Zudem gibt es Hinweise, dass eine verminderte MDP1-Expression mit einer höheren Magenkarzinomen-Rezidivrate zusammenhängen könnte (Zhu et al., 2019).

PnkP: Die PnkP gehört zu den HAD-Phosphatasen mit C0-Cap-Domäne und ist ein Multidomänen-Enzym mit einer C-terminalen Kinase- und Phosphatase-Aktivität, wobei die Phosphatase-Aktivität höher ist als die der Kinase (Dobson und Allinson, 2006). Die N-terminale Forkhead-box-assoziierte Domäne dient der Interaktion mit anderen Proteinen (Weinfeld et al., 2011, und Seifried et al., 2013). Wie bereits in 1.4.2 beschrieben, müssen manche DNA-Schäden zunächst verarbeitet werden, damit fehlende Basen ersetzt und die DNA-Stränge wieder ligiert werden können. Die PnkP wandelt 3'-P- und 5'-OH-Enden an Einzel- und Doppelstrangbrüchen zu 3'-OH und 5'-P-Enden um (Weinfeld et al., 2011).

In Neuronen ist die Stabilität des Genoms von besonderer Bedeutung, sodass Muta-

tionen der PnkP, die die DNA-Reparatur stören, zu unterschiedlichen neurologischen Syndromen führen, die entweder die Entwicklung des Nervensystems betreffen oder mit einer abnormen Neurodegeneration einhergehen (Shen et al., 2010, Poulton et al., 2013, Bras et al., 2015, Pedroso et al., 2015, und Dumitrache und McKinnon, 2017). In Tumorzellen führte die *in vitro* Herabregulation der PnkP mittels RNA-Interferenz bzw. einem identifizierten Inhibitor zu einer verstärkter Wirkung von ionisierenden Strahlen und Chemotherapeutika wie Topoisomerase-Inhibitoren, was klinische Vorteile in der Behandlung von Tumoren bringen könnte (Bernstein et al., 2008, und Freschauf et al., 2009).

Phospho 2: Es stehen wenige Informationen über Phospho 2, eine HAD-Phosphatase mit C1-Cap-Domäne (Seifried et al., 2013), zur Verfügung. Roberts und Kollegen beschreiben eine Phosphatase-Aktivität gegenüber PLP (Roberts et al., 2005). In einer Studie, die sich mit Fusionsgenen in Magenkarzinom-Zellen beschäftigt, korreliert die Expression des Fusionsgens aus PHOSPHO2-KLHL23 (Kelch-Like Family Member 23) mit der Lauren-Klassifikation und perineuraler Invasion, sodass dieses Fusionsgen in Zusammenhang mit der Entwicklung von Tumoren stehen könnte (Choi et al., 2016).

LHPP: Die LHPP gehört, wie die PGP, zu den HAD-Phosphatasen mit C2a-Cap-Domäne (Seifried et al., 2013). Die LHPP kann sowohl Sauerstoff-Phosphat- als auch Stickstoff-Phosphat-Bindungen spalten. Es ist eine *in vitro* Phosphatase-Aktivität gegenüber PPI, PNP, 3-Phosphohistidine und 6-Phospholysin beschrieben (Hiraishi et al., 1998). Es ist jedoch bislang kein *in vivo*-Substrat bekannt.

In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen der LHPP als Risikofaktor für eine Major Depression gefunden (Neff et al., 2009, Knowles et al., 2016, und Consortium, 2015). Weitere GWAS stellen einen Zusammenhang anderer LHPP-Varianten mit riskantem Sexualverhalten und Alkoholabhängigkeit (Polimanti et al., 2017), einem erhöhten Krebsrisiko für Mundboden- und Rachenkarzinom (Lesseur et al., 2016), für Hodentumore (Z. Wang et al., 2017) sowie für B-Zell-Vorläufer-ALL (Vijayakrishnan et al., 2017) her. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die LHPP ein Tumorsuppressor ist (Hindupur et al., 2018). In darauffolgenden Untersuchungen von Zervix- (Zheng et al., 2018), Blasen- (Li et al., 2019), kolorektalen (Hou et al., 2020), Pankreas- (Wu et al., 2020) und papillären Schilddrüsen-Karzinomen (Sun et al., 2020) konnten herabgesetzte LHPP-Expressionslevel in den jeweiligen Tumoren nachgewiesen werden. Eine Überexpres-

sion von LHPP in den erwähnten Studien war mit einem reduzierten Zellwachstum und einer verminderter Proliferation assoziiert.

6.3 Abhängigkeit der PGP-Aktivität von verschiedenen Puffern

Die murine PGP-Aktivität wurde gegenüber PG in verschiedenen Puffern gemessen (vgl. 2.2.2). Als Referenz wurde der in der Arbeitsgruppe standardmäßig eingesetzte TMN-Puffer verwendet, welcher aus Triethanolamin (TEA), $MgCl_2$, NaCl, Triton X-100 und Dithiothreitol (DTT) besteht (siehe 2.1.5). Zu den getesteten Puffern wurde jeweils, aufgrund der Magnesiumabhängigkeit der HAD-Phosphatasen, $MgCl_2$ hinzugegeben sowie das Reduktionsmittels DTT, da gezeigt wurde konnte, dass DTT die Reaktionsbedingungen der PGP-abhängigen PG-Dephosphorylierung verbessert (Engelmann, 2019). Im Vergleich zur Aktivität in TNM-Reaktionspuffer ist die PG-Dephosphorylierung jedoch in allen getesteten Puffern deutlich vermindert (siehe **Abb. 6.1 A**). Da die gemessene PGP-Aktivität der ersten Messreihe in TMN-Puffer im Vergleich zu anderen Messungen deutlich verringert war, wurde das gleiche Experiment mit der doppelten Menge PGP (20 statt 10 ng) in ausgewählten Puffern wiederholt (siehe **Abb. 6.1 B**). Trotz kleinerer Unterschiede zwischen den beiden Messungen zeigte sich die PGP-Aktivität in allen getesteten Puffern im Vergleich zur Aktivität in TNM-Puffer um $\geq 78\%$ reduziert. Aufgrund der geringen Aktivität wurde auf die Erstellung von Standardgeraden für die jeweiligen Puffer verzichtet, sodass die gemessene OD pro ng PGP dargestellt ist.

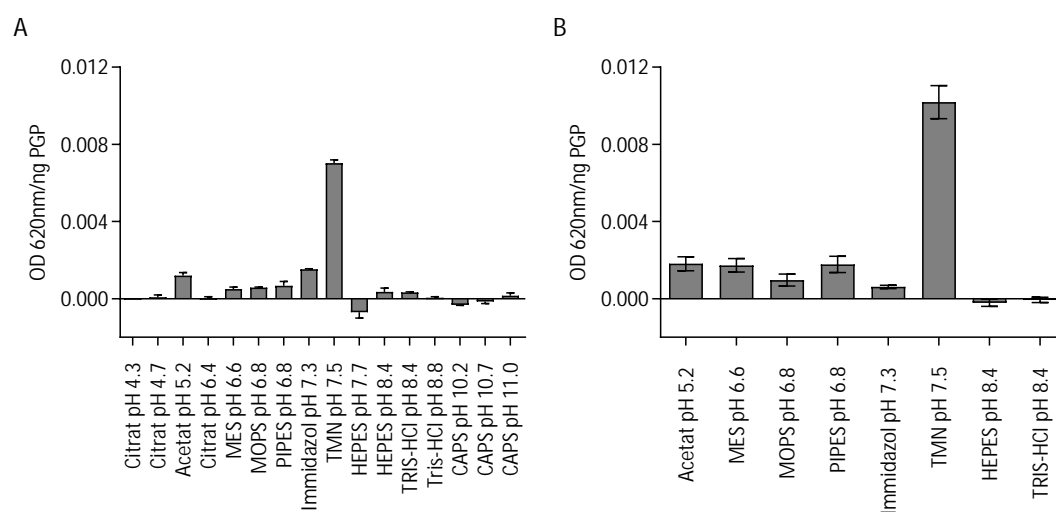


Abbildung 6.1 Testung der PGP-Aktivität in verschiedenen Puffern

A: Testung der Phosphataseaktivität mit 10 ng muriner PGP pro Well mit 200 μ M PG in verschiedenen Puffern in Duplikaten. Beendigung der Reaktion nach 3 Minuten und Messung des gebildeten Phosphates mit BIOMOL Green. **B:** Erneute Testung mit der doppelten PGP-Menge (20 ng pro Well) in Duplikaten für eine kleinere Auswahl an Puffern. **A und B:** Darstellung des Mittelwertes \pm S.E.M der optischen Dichte (OD) pro ng PGP aus 2 unabhängigen Experimenten. Aufgrund der deutlich herabgesetzten Aktivität in einigen Puffern wurden bei 14 von 52 gemessenen Werten durch den Abzug der Hintergrundbestimmung negative Werte berechnet.

Literaturverzeichnis

- Allen, K. N. und D. Dunaway-Mariano (2009). „Markers of fitness in a successful enzyme superfamily“. In: *Curr Opin Struct Biol* 19.6, S. 658–65.
- Ash, D. E., P. J. Goodhart und G. H. Reed (1984). „ATP-dependent phosphorylation of alpha-substituted carboxylic acids catalyzed by pyruvate kinase“. In: *Arch Biochem Biophys* 228.1, S. 31–40.
- Badwey, J. A. (1977). „Phosphoglycolate phosphatase in human erythrocytes“. In: *J Biol Chem* 252.7, S. 2441–3.
- Bae, K. H., W. K. Kim und S. C. Lee (2012). „Involvement of protein tyrosine phosphatases in adipogenesis: new anti-obesity targets?“ In: *BMB Rep* 45.12, S. 700–6.
- Bauwe, H., M. Hagemann und A. R. Fernie (2010). „Photorespiration: players, partners and origin“. In: *Trends Plant Sci* 15.6, S. 330–6.
- Baykov, A. A., O. A. Evtushenko und S. M. Awaeva (1988). „A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay“. In: *Anal Biochem* 171.2, S. 266–70.
- Berg, Jeremy M. et al. (2018). „Enzyme: Grundlegende Konzepte und Kinetik“. In: *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 255–297.
- Bernstein, N. K. et al. (2008). „Polynucleotide kinase as a potential target for enhancing cytotoxicity by ionizing radiation and topoisomerase I inhibitors“. In: *Anticancer Agents Med Chem* 8.4, S. 358–67.
- Bhullar, K. S. et al. (2018). „Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions“. In: *Mol Cancer* 17.1, S. 48.
- Bommer, G. T., E. Van Schaftingen und M. Veiga-da-Cunha (2020). „Metabolite Repair Enzymes Control Metabolic Damage in Glycolysis“. In: *Trends Biochem Sci* 45.3, S. 228–243.
- Bras, J. et al. (2015). „Mutations in PNKP cause recessive ataxia with oculomotor apraxia type 4“. In: *Am J Hum Genet* 96.3, S. 474–9.
- El-Brolosy, M. A. und D. Y. R. Stainier (2017). „Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms“. In: *PLoS Genet* 13.7, e1006780.

- Burroughs, A. M. et al. (2006). „Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes“. In: *J Mol Biol* 361.5, S. 1003–34.
- Cerami, Ethan et al. (2012). „The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data“. In: *Cancer Discovery* 2.5, S. 401–404.
- Chen, M. J., J. E. Dixon und G. Manning (2017). „Genomics and evolution of protein phosphatases“. In: *Sci Signal* 10.474.
- Chen, Y. et al. (2017). „Expression and prognostic roles of magnesium-dependent phosphatase-1 in gastric cancer“. In: *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21.11, S. 2617–2625.
- Cho, H. et al. (2001). „BeF(3)(-) acts as a phosphate analog in proteins phosphorylated on aspartate: structure of a BeF(3)(-) complex with phosphoserine phosphatase“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.15, S. 8525–30.
- Choi, E. S. et al. (2016). „Overexpression of KLHL23 protein from read-through transcription of PHOSPHO2-KLHL23 in gastric cancer increases cell proliferation“. In: *FEBS Open Bio* 6.11, S. 1155–1164.
- Chu, X. et al. (2013). „Intracellular drug concentrations and transporters: measurement, modeling, and implications for the liver“. In: *Clin Pharmacol Ther* 94.1, S. 126–41.
- Cohen, P. (2001). „The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture“. In: *Eur J Biochem* 268.19, S. 5001–10.
- (2009). „Guidelines for the effective use of chemical inhibitors of protein function to understand their roles in cell regulation“. In: *Biochem J* 425.1, S. 53–4.
- Collard, F. et al. (2016). „A conserved phosphatase destroys toxic glycolytic side products in mammals and yeast“. In: *Nat Chem Biol* 12.8, S. 601–7.
- Colletti, L. M. et al. (2008). „Methods to measure the intracellular concentration of unlabeled compounds within cultured cells using liquid chromatography/tandem mass spectrometry“. In: *Anal Biochem* 383.2, S. 186–93.
- Consortium, C. (2015). „Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder“. In: *Nature* 523.7562, S. 588–91.
- Dargó, G. et al. (2020). „Human Serum Albumin Binding in a Vial: A Novel UV-pH Titration Method To Assist Drug Design“. In: *J Med Chem* 63.4, S. 1763–1774.
- Dobson, C. J. und S. L. Allinson (2006). „The phosphatase activity of mammalian polynucleotide kinase takes precedence over its kinase activity in repair of single strand breaks“. In: *Nucleic Acids Res* 34.8, S. 2230–7.

- Dougherty, T. M. und W. W. Cleland (1985). „pH studies on the chemical mechanism of rabbit muscle pyruvate kinase. 2. Physiological substrates and phosphoenol-alpha-ketobutyrate“. In: *Biochemistry* 24.21, S. 5875–80.
- Dulbecco, R. und G. Freeman (1959). „Plaque production by the polyoma virus“. In: *Virology* 8.3, S. 396–7.
- Dumitrache, L. C. und P. J. McKinnon (2017). „Polynucleotide kinase-phosphatase (PNKP) mutations and neurologic disease“. In: *Mech Ageing Dev* 161.Pt A, S. 121–129.
- Eagle, H. (1955). „Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture“. In: *Science* 122.3168, S. 501–14.
- Engelmann, D. (2019). „Regulation of Mammalian Phosphoglycolate Phosphatase“. In: *Doctor Medicinae (Dr. med.) Doctoral dissertation, University of Würzburg, Germany*.
- Fabbro, D., S. W. Cowan-Jacob und H. Moebitz (2015). „Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14“. In: *Br J Pharmacol* 172.11, S. 2675–700.
- Fahs, S., P. Lujan und M. Kohn (2016). „Approaches to Study Phosphatases“. In: *ACS Chem Biol* 11.11, S. 2944–2961.
- Finka, A. und P. Goloubinoff (2013). „Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis“. In: *Cell Stress Chaperones* 18.5, S. 591–605.
- Fortpiet, J. et al. (2006). „Magnesium-dependent phosphatase-1 is a protein-fructosamine-6-phosphatase potentially involved in glycation repair“. In: *J Biol Chem* 281.27, S. 18378–85.
- Frankenbach, T. (2017). „Characterization of new Inhibitors of Haloacid Dehalogenase – Type Phosphatases: Kinetic analyses and cellular effects“. In: *B.Sc. (Bachelor of Science), University of Würzburg, Germany*.
- Freschauf, G. K. et al. (2009). „Identification of a small molecule inhibitor of the human DNA repair enzyme polynucleotide kinase/phosphatase“. In: *Cancer Res* 69.19, S. 7739–46.
- Fujii, S. und E. Beutler (1985). „Glycolate kinase activity in human red cells“. In: *Blood* 65.2, S. 480–3.
- Ganapathy-Kanniappan, S. und J. F. Geschwind (2013). „Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects“. In: *Mol Cancer* 12, S. 152.
- Gao, J. et al. (2013). „Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal“. In: *Sci Signal* 6.269, p11.

- Gee, K. R. et al. (1999). „Fluorogenic substrates based on fluorinated umbelliferones for continuous assays of phosphatases and beta-galactosidases“. In: *Anal Biochem* 273.1, S. 41–8.
- Gerin, I. et al. (2019). „Phosphoglycolate has profound metabolic effects but most likely no role in a metabolic DNA response in cancer cell lines“. In: *Biochem J* 476.4, S. 629–643.
- Gohla, A. (2019). „Do metabolic HAD phosphatases moonlight as protein phosphatases?“ In: *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866.1, S. 153–166.
- Gong, C. X. et al. (2006). „Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer’s disease: a therapeutic target“. In: *J Biomed Biotechnol* 2006.3, S. 31825.
- Hanks, John H. (1975). „Hanks’ balanced salt solution and pH control“. In: *TCA manual / Tissue Culture Association* 1.1, S. 3–4.
- Hann, M. M. und G. L. Simpson (2014). „Intracellular drug concentration and disposition—the missing link?“ In: *Methods* 68.2, S. 283–5.
- He, R. et al. (2013). „Small molecule tools for functional interrogation of protein tyrosine phosphatases“. In: *Febs j* 280.2, S. 731–50.
- Hindupur, S. K. et al. (2018). „The protein histidine phosphatase LHPP is a tumour suppressor“. In: *Nature* 555.7698, S. 678–682.
- Hiraishi, H., F. Yokoi und A. Kumon (1998). „3-phosphohistidine and 6-phospholysine are substrates of a 56-kDa inorganic pyrophosphatase from bovine liver“. In: *Arch Biochem Biophys* 349.2, S. 381–7.
- Hoon, J. L., W. K. Wong und C. G. Koh (2012). „Functions and regulation of circular dorsal ruffles“. In: *Mol Cell Biol* 32.21, S. 4246–57.
- Hou, B. et al. (2020). „Tumor suppressor LHPP regulates the proliferation of colorectal cancer cells via the PI3K/AKT pathway“. In: *Oncol Rep* 43.2, S. 536–548.
- Howard, M. L. et al. (2010). „Plasma protein binding in drug discovery and development“. In: *Comb Chem High Throughput Screen* 13.2, S. 170–87.
- Hu, S. et al. (2018). „Autophagy induces transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition in hepatocarcinoma cells through cAMP response element binding signalling“. In: *J Cell Mol Med* 22.11, S. 5518–5532.
- Hunter, T. (1995). „Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling“. In: *Cell* 80.2, S. 225–36.
- Itaya, K. und M. Ui (1966). „A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate“. In: *Clin Chim Acta* 14.3, S. 361–6.

- Iyama, T. und 3rd Wilson D. M. (2013). „DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells“. In: *DNA Repair (Amst)* 12.8, S. 620–36.
- Jackson, A. L. und P. S. Linsley (2010). „Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application“. In: *Nat Rev Drug Discov* 9.1, S. 57–67.
- Kansy, M., F. Senner und K. Gubernator (1998). „Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes“. In: *J Med Chem* 41.7, S. 1007–10.
- Kayne, F. J. (1974). „Pyruvate kinase catalyzed phosphorylation of glycolate“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 59.1, S. 8–13.
- Khoury, G. A., R. C. Baliban und C. A. Floudas (2011). „Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database“. In: *Sci Rep* 1.
- Klomsiri, C., P. A. Karplus und L. B. Poole (2011). „Cysteine-based redox switches in enzymes“. In: *Antioxid Redox Signal* 14.6, S. 1065–77.
- Knight, Z. A. und K. M. Shokat (2007). „Chemical genetics: where genetics and pharmacology meet“. In: *Cell* 128.3, S. 425–30.
- Knowles, E. E. et al. (2016). „Genome-wide linkage on chromosome 10q26 for a dimensional scale of major depression“. In: *J Affect Disord* 191, S. 123–31.
- Köhn, M. (2020). „Turn and Face the Strange: A New View on Phosphatases“. In: *ACS Cent Sci* 6.4, S. 467–477.
- Laemmli, U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“. In: *Nature* 227.5259, S. 680–5.
- Lesseur, C. et al. (2016). „Genome-wide association analyses identify new susceptibility loci for oral cavity and pharyngeal cancer“. In: *Nat Genet* 48.12, S. 1544–1550.
- Li, Y. et al. (2019). „LHPP suppresses bladder cancer cell proliferation and growth via inactivating AKT/p65 signaling pathway“. In: *Biosci Rep* 39.7.
- Liberti, S. et al. (2013). „HuPho: the human phosphatase portal“. In: *FEBS J* 280.2, S. 379–87.
- Lipinski, C. A. et al. (1997). „Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings“. In: *Adv Drug Deliv Rev* 46.1-3, S. 3–26.
- Lounis, Mohamed Amine et al. (2021/03// 2021). *Elevated Expression of Glycerol-3-Phosphate Phosphatase as a Biomarker of Poor Prognosis and Aggressive Prostate Cancer*. Electronic Article.

- Lu, Z. et al. (2009). „Structure-function analysis of 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononate-9-phosphate phosphatase defines specificity elements in type C0 haloalkanoate dehalogenase family members“. In: *J Biol Chem* 284.2, S. 1224–33.
- Luciani, A. M. et al. (2001). „Changes in cell volume and internal sodium concentration in HeLa cells during exponential growth and following lonidamine treatment“. In: *Eur J Cell Biol* 80.2, S. 187–95.
- Manallack, D. T. et al. (2013). „The significance of acid/base properties in drug discovery“. In: *Chem Soc Rev* 42.2, S. 485–96.
- Mateus, A., P. Matsson und P. Artursson (2013). „Rapid measurement of intracellular unbound drug concentrations“. In: *Mol Pharm* 10.6, S. 2467–78.
- Mateus, A. et al. (2017). „Prediction of intracellular exposure bridges the gap between target- and cell-based drug discovery“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 114.30, E6231–e6239.
- Miduturu, C. V. et al. (2011). „High-throughput kinase profiling: a more efficient approach toward the discovery of new kinase inhibitors“. In: *Chem Biol* 18.7, S. 868–79.
- Miyazawa, K. (2011). „Encountering unpredicted off-target effects of pharmacological inhibitors“. In: *J Biochem* 150.1, S. 1–3.
- Mugabo, Y. et al. (2016). „Identification of a mammalian glycerol-3-phosphate phosphatase: Role in metabolism and signaling in pancreatic beta-cells and hepatocytes“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 113.4, E430–9.
- Müllertz, A., Y. Perrie und T. Rades (2016). *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*. Springer New York.
- Nahar, S. et al. (2018). „A Comparison of the Preservation of Mouse Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Using the University of Wisconsin Solution and Hank’s Balanced Salt Solution“. In: *Stem Cells Int* 2018, S. 1625464.
- Needham, E. J. et al. (2019). „Illuminating the dark phosphoproteome“. In: *Sci Signal* 12.565.
- Neff, C. D. et al. (2009). „Evidence for HTR1A and LHPP as interacting genetic risk factors in major depression“. In: *Mol Psychiatry* 14.6, S. 621–30.
- Pedroso, J. L. et al. (2015). „Mutation in PNKP presenting initially as axonal Charcot-Marie-Tooth disease“. In: *Neurol Genet* 1.4, e30.
- Peisach, E. et al. (2004). „X-ray crystal structure of the hypothetical phosphotyrosine phosphatase MDP-1 of the haloacid dehalogenase superfamily“. In: *Biochemistry* 43.40, S. 12770–9.

- Pitroda, S. P. et al. (2009). „STAT1-dependent expression of energy metabolic pathways links tumour growth and radioresistance to the Warburg effect“. In: *BMC Med* 7, S. 68.
- Polimanti, R. et al. (2017). „The Interplay Between Risky Sexual Behaviors and Alcohol Dependence: Genome-Wide Association and Neuroimaging Support for LHPP as a Risk Gene“. In: *Neuropsychopharmacology* 42.3, S. 598–605.
- Possik, E., S. R. M. Madiraju und M. Prentki (2017). „Glycerol-3-phosphate phosphatase/PGP: Role in intermediary metabolism and target for cardiometabolic diseases“. In: *Biochimie* 143, S. 18–28.
- Poulton, C. et al. (2013). „Progressive cerebellar atrophy and polyneuropathy: expanding the spectrum of PNKP mutations“. In: *Neurogenetics* 14.1, S. 43–51.
- Povirk, L. F. (2012). „Processing of damaged DNA ends for double-strand break repair in mammalian cells“. In: *ISRN Mol Biol* 2012.
- Prentki, M. und S. R. Madiraju (2008). „Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease“. In: *Endocr Rev* 29.6, S. 647–76.
- Rhee, S. G. et al. (2000). „Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation“. In: *Sci STKE* 2000.53, pe1.
- Roberts, S. J. et al. (2005). „Probing the substrate specificities of human PHOSPHO1 and PHOSPHO2“. In: *Biochim Biophys Acta* 1752.1, S. 73–82.
- Rose, Z. B. und J. Liebowitz (1970). „2,3-diphosphoglycerate phosphatase from human erythrocytes. General properties and activation by anions“. In: *J Biol Chem* 245.12, S. 3232–41.
- Schmitz, Sabine (2011). *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. Der Experimentator. <https://katalog.ub.uni-leipzig.de/Record/0-644471786>. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Segerer, G. et al. (2016). „An essential developmental function for murine phosphoglycolate phosphatase in safeguarding cell proliferation“. In: *Sci Rep* 6, S. 35160.
- Segerer, G. et al. (2018). „A phosphoglycolate phosphatase/AUM-dependent link between triacylglycerol turnover and epidermal growth factor signaling“. In: *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1863.6, S. 584–594.
- Seifried, A., J. Schultz und A. Gohla (2013). „Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease“. In: *FEBS J* 280.2, S. 549–71.
- 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“. In: *J Biol Chem* 289.6, S. 3416–31.

- Seifried, A. et al. (2016). „Reversible oxidation controls the activity and oligomeric state of the mammalian phosphoglycolate phosphatase AUM“. In: *Free Radic Biol Med* 97, S. 75–84.
- Selengut, J. D. (2001). „MDP-1 is a new and distinct member of the haloacid dehalogenase family of aspartate-dependent phosphohydrolases“. In: *Biochemistry* 40.42, S. 12704–11.
- Selengut, J. D. und R. L. Levine (2000). „MDP-1: A novel eukaryotic magnesium-dependent phosphatase“. In: *Biochemistry* 39.28, S. 8315–24.
- Seok, H. et al. (2018). „Evaluation and control of miRNA-like off-target repression for RNA interference“. In: *Cell Mol Life Sci* 75.5, S. 797–814.
- Shen, J. et al. (2010). „Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair“. In: *Nat Genet* 42.3, S. 245–9.
- Singh, V. et al. (2017). „Phosphorylation: Implications in Cancer“. In: *Protein J* 36.1, S. 1–6.
- Somoza, R. und E. Beutler (1983). „Phosphoglycolate phosphatase and 2,3-diphosphoglycerate in red cells of normal and anemic subjects“. In: *Blood* 62.4, S. 750–3.
- Stiffin, R. M. et al. (2008). „Differential inhibition of cytosolic PEPCK by substrate analogues. Kinetic and structural characterization of inhibitor recognition“. In: *Biochemistry* 47.7, S. 2099–109.
- Sugano, K. et al. (2010). „Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport“. In: *Nat Rev Drug Discov* 9.8, S. 597–614.
- Suh, D., 3rd Wilson D. M. und L. F. Povirk (1997). „3'-phosphodiesterase activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends“. In: *Nucleic Acids Res* 25.12, S. 2495–500.
- Sun, W. et al. (2020). „LHPP inhibits cell growth and migration and triggers autophagy in papillary thyroid cancer by regulating the AKT/AMPK/mTOR signaling pathway“. In: *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 52.4, S. 382–389.
- Takahashi, T. et al. (2007). „Aprataxin, causative gene product for EAOH/AOA1, repairs DNA single-strand breaks with damaged 3'-phosphate and 3'-phosphoglycolate ends“. In: *Nucleic Acids Res* 35.11, S. 3797–809.
- Tonks, N. K. (2006). „Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 7.11, S. 833–46.
- Ubersax, J. A. und Jr. Ferrell J. E. (2007). „Mechanisms of specificity in protein phosphorylation“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8.7, S. 530–41.
- Vijayakrishnan, J. et al. (2017). „A genome-wide association study identifies risk loci for childhood acute lymphoblastic leukemia at 10q26.13 and 12q23.1“. In: *Leukemia* 31.3, S. 573–579.

- Virshup, D. M. und S. Shenolikar (2009). „From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover“. In: *Mol Cell* 33.5, S. 537–45.
- Volpe, P. und T. Eremenko-Volpe (1970). „Quantitative studies on cell proteins in suspension cultures“. In: *Eur J Biochem* 12.1, S. 195–200.
- Vuignier, K. et al. (2010). „Drug-protein binding: a critical review of analytical tools“. In: *Anal Bioanal Chem* 398.1, S. 53–66.
- Walsh, C. T., S. Garneau-Tsodikova und Jr. Gatto G. J. (2005). „Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications“. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 44.45, S. 7342–72.
- Wanat, K., E. Brzezińska und A. W. Sobańska (2018). „Aspects of Drug-Protein Binding and Methods of Analyzing the Phenomenon“. In: *Curr Pharm Des* 24.25, S. 2974–2985.
- Wang, Y. et al. (2014). „Regulation of EGFR nanocluster formation by ionic protein-lipid interaction“. In: *Cell Res* 24.8, S. 959–76.
- Wang, Z. et al. (2017). „Meta-analysis of five genome-wide association studies identifies multiple new loci associated with testicular germ cell tumor“. In: *Nat Genet* 49.7, S. 1141–1147.
- Warburg, O. (1956a). „On respiratory impairment in cancer cells“. In: *Science* 124.3215, S. 269–70.
- (1956b). „On the origin of cancer cells“. In: *Science* 123.3191, S. 309–14.
- Weinfeld, M. et al. (2011). „Tidying up loose ends: the role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair“. In: *Trends Biochem Sci* 36.5, S. 262–71.
- Weiss, W. A., S. S. Taylor und K. M. Shokat (2007). „Recognizing and exploiting differences between RNAi and small-molecule inhibitors“. In: *Nat Chem Biol* 3.12, S. 739–44.
- Wilson D. M., 3rd (2003). „Properties of and substrate determinants for the exonuclease activity of human apurinic endonuclease Ape1“. In: *J Mol Biol* 330.5, S. 1027–37.
- Wolfenden, R. (1969). „Transition state analogues for enzyme catalysis“. In: *Nature* 223.5207, S. 704–5.
- Wu, F., Y. Chen und J. Zhu (2020). „LHPP suppresses proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis in pancreatic cancer“. In: *Biosci Rep* 40.3.
- Yan, D. et al. (1999). „Beryll fluoride mimics phosphorylation of NtrC and other bacterial response regulators“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96.26, S. 14789–94.

- Yang, N. J. und M. J. Hinner (2015). „Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins“. In: *Methods Mol Biol* 1266, S. 29–53.
- Yesilyurt, D. (2017). „Analysis of specificity of new inhibitors acting on murine haloacid dehalogenase type phosphatases“. In: *B.Sc. (Bachelor of Science), University of Würzburg, Germany*.
- Zheng, J. et al. (2018). „Down-regulation of LHPP in cervical cancer influences cell proliferation, metastasis and apoptosis by modulating AKT“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 503.2, S. 1108–1114.
- Zhou, T. et al. (2009). „Tyrosyl-DNA phosphodiesterase and the repair of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double-strand breaks“. In: *DNA Repair (Amst)* 8.8, S. 901–11.
- Zhou, Y. et al. (2012). „Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells“. In: *Cancer Res* 72.1, S. 304–14.
- Zhu, J. et al. (2019). „Magnesium-dependent Phosphatase (MDP) 1 is a Potential Suppressor of Gastric Cancer“. In: *Curr Cancer Drug Targets* 19.10, S. 817–827.
- Zimmer, A. M. et al. (2019). „Loss-of-function approaches in comparative physiology: is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing?“ In: *J Exp Biol* 222.Pt 7.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| # 1 | Inhibitor # 1 |
| # 2 | Inhibitor # 2 |
| # 9 | Inhibitor # 9 |
| # 48 | Inhibitor # 48 |
| # 51 | Inhibitor # 51 |
| 2PL | 2-Phospho-L-Laktat |
| 4PE | 4-Phospho-D-Erythronat |
| 6PGDH | 6-Phosphoglykonat-Dehydrogenase |
| °C | Grad Celsius |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μM | Mikromolar |
| ALL | Akute Lymphatische Leukämie |
| APE | Apurinic/Apyrimidinic Endonuklease |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AUM | Aspartat-basierte, ubiquitäre, Mg^{2+} -abhängige Phosphatase |
| BP | Bisphosphat |
| BPGA | Bisphosphoglycerat |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CDR | Circular Dorsal Ruffles, engl. für zirkuläre dorsale Kräuselung |
| Cys | Cystein |
| D | Aspartat |
| DAG | Diacylglycerol |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DHAP | Dihydroxyacetonphosphat |
| DiFMUP | 6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferylphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiolthreitol |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor |
| EGFR | Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor |
| ES-Komplex | Enzym-Substrat-Komplex |
| ESI-Komplex | Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex |
| FA | Fettsäure |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FN6P | Fructosamin-6-Phosphat |
| G3P | Glycerol-3-Phosphat |
| G3PP | Glycerol-3-Phosphat-Phosphatase, siehe PGP |
| GAP | Glycerinaldehyd-3-Phosphat |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GC1 | murine spermatogoniale Zelllinie |
| GC/MS | Gaschromatographie/Massenspektrometrie |
| GK | Glycerolkinase |
| GL/FS-Zyklus | Glycerolipid/Fettsäure-Zyklus |
| GPD1 | Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GWAS | Genomweite Assoziationsstudie |
| g/mol | Molare Masse |
| h | hydrophober Rest |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HAD | Haloazid Dehalogenase |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| HeLa-Zellen | epitheliale Zervixkarzinom-Zellen |
| His | Histidin |
| HRP | Horseradish Peroxidase, engl. für Meerrettich Peroxidase |
| HTC116 | Humane kolorektale Karzinomzellen |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| IP3 | Inositoltrisphosphat |
| k_{kat} | Wechselzahl, katalytische Konstante |
| kDa | Kilodalton |
| KI | Konfidenzintervall |
| K_M | Michaelis-Menten-Konstante |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| Leu | Leucin |
| LHPP | Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase |

| | |
|----------------|--|
| LP | Lipid-Phosphatase |
| MDP1 | Magnesium-abhängige Phosphatase 1 |
| MEFs | murinen embryonalen Fibroblasten |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NUDT | Nukleosid-Diphosphat-X-gekoppelte Transferasen |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| nmol | Nanomol |
| ns | nicht signifikant |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OD | Optische Dichte |
| OH | Hydroxy |
| P | Phospho/Phosphat |
| PDXP | Pyridoxalphosphatphosphatase |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| PEPCK | Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase |
| PFK | Phosphofruktokinase |
| pNPP | para-Nitrophenylphosphat |
| PGA | Phosphoglycerat |
| PGAM | Phosphoglyceratmutase |
| PG | Phosphoglykolat |
| PGP | Phosphoglykolatphosphatase |
| P _i | anorganisches Phosphat |
| PI | Propidium Iodid |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC γ | Phospholipase C γ |
| PLP | Pyridoxalphosphat |
| PnkP | Polynukleotidase 5'-Kinase/3'-Phosphatase |
| PNP | Imidodiphosphat |
| PPi | anorganisches Pyrophosphat |
| PPM | Metall-abhängige Protein-Phosphatase |
| PPP | Phosphoprotein-Phosphatase |
| PPW | Pentosephosphatweg |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| PTP | Protein-Tyrosin-Phosphatase |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rotations per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| SDH | Succinat-Dehydrogenase |
| S.E.M. | standard error of the mean |
| shRNA | small hairpin RNA |
| siRNA | small interfering RNA |
| T | Threonin |
| TAG | Triacylglyceride |
| Tdp1 | tyrosyl-DNA Phosphodiesterase |
| TEA | Triethanolamin |
| TPI | Triosephosphatisomerase |
| U2OS | humane epitheliale Osteosarkomzellen |
| V | Valin |
| V_{max} | maximale Umsatzgeschwindigkeit |
| X | beliebige Aminosäure |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Schematische Darstellung der Rossmann-Faltung bei HAD-Phosphatasen mit C2-Cap-Domäne | 3 |
| 1.2 | Reaktionsmechanismus der HAD-Phosphatasen | 4 |
| 1.3 | Diversität der Cap-Domänen von HAD-Phosphatasen | 5 |
| 1.4 | Überblick über die Substrate der PGP und deren Herkunft | 7 |
| 1.5 | Arten der reversiblen Enzymhemmung | 18 |
| 1.6 | Strukturformeln der Inhibitoren # 1, # 2, # 9 und # 48 | 21 |
| 2.1 | Phosphat-Standardgerade mit BIOMOL Green | 33 |
| 2.2 | Schematische Darstellung der Versuche zur Messung und Hemmung der endogenen PGP-Aktivität mit BIOMOL Green | 35 |
| 2.3 | Testung der Reversibilität | 38 |
| 2.4 | Beispielhafte Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen . . . | 40 |
| 2.5 | Pipettierschema zur Bestimmung der Inhibitionskinetik von Inhibitor # 48 | 44 |
| 3.1 | Endogene PGP-Aktivität in GC1-Zellysaten und in vitro-Aktivitätshemmung durch die Inhibitoren # 1 und # 48 | 50 |
| 3.2 | Einfluss verschiedener Zellkulturmedien und Inhibitorkonzentrationen auf die Hemmung der endogenen PGP-Aktivität von GC1-Zellen | 51 |
| 3.3 | Einfluss verschiedener Inkubationszeiten auf die PGP-Aktivität und Darstellung der Reversibilität der Inhibitorwirkung | 53 |
| 3.4 | Einfluss verschiedener Zellkulturmedien und Inhibitor der # 1-Behandlung auf die Viabilität von GC1-Zellen | 55 |
| 3.5 | Einfluss der Inhibitor # 1-Behandlung auf die TAG-Konzentration in GC1-Zellen | 57 |
| 3.6 | Bestimmung der Inhibitorkonzentration in GC1-Zellen mittels Absorptionsmessungen | 59 |
| 3.7 | Inhibitionskinetik von Inhibitor # 48 | 60 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.8 | Wirkung der Inhibitoren # 1, # 2, # 9 und # 48 auf die Lysin-Histidin-Pyrophosphat-Phosphatase | 63 |
| 3.9 | Wirkung der Inhibitoren # 1, # 9 und # 48 auf Phospho 2 | 64 |
| 3.10 | Wirkung der Inhibitoren # 1 und # 48 auf die Polynukleotid Kinase Phosphatase (PnkP) | 65 |
| 3.11 | Wirkung der Inhibitoren # 1 und # 48 auf die Magnesium-abhängige Phosphatase 1 | 65 |
| 4.1 | Vergleich der TAG-Konzentrationen in GC1-Zellen mit PGP- und Kontroll-shRNA | 73 |
| 4.2 | Änderungshäufigkeit einer veränderten PGP-Expression in Tumoren . | 81 |
| 6.1 | Testung der PGP-Aktivität in verschiedenen Puffern | 89 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Michaelis-Menten-Konstante (K_m), Wechselzahl (k_{kat}) und katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) verschiedener Substrate der murinen PGP . . . | 8 |
| 1.2 | Mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Inhibitoren # 1, # 2, # 9, # 48 und # 51 | 21 |
| 2.1 | Wirkung des Inhibitors # 1 auf GC1-Zellen: Übersicht über die getesteten Bedingungen | 36 |
| 2.2 | Messung der Inhibitor # 1-Konzentration in GC1-Zellen: Übersicht über die getesteten Bedingungen | 43 |
| 3.1 | Enzymkinetische Parameter der PG-Dephosphorylierung durch die PGP in Anwesenheit des Inhibitors # 48 | 61 |
| 3.2 | Wirkung der Inhibitoren auf die HAD-Phosphatasen MDP1, LHPP, Phospho 2 und PnkP | 67 |
| 3.3 | Übersicht der gemessenen Inhibitoreffekte von Frankenbach, 2017, und Yesilyurt, 2017, sowie Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit | 68 |
| 6.1 | Genetische PGP-Modifikationen | 85 |

Eidesstattliche Erklärung/Affidavit

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

„Charakterisierung pharmakologischer Phosphoglykolat Phosphatase-Inhibitoren“

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 ich die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ort

Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Antje Gohla für die Möglichkeit an diesem interessanten Projekt im Rahmen meiner Doktorarbeit mitzuarbeiten und für die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit. Vielen Dank für die zahlreichen Diskussionen über das Projekt und meine Arbeit, für deine Zeit und Geduld.

Ich danke Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies und Prof. Dr. Andreas Geier für die Mitbetreuung meiner Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken für die labortechnischen Fähigkeiten, die ich dank ihnen erlernt habe, und für die Herzlichkeit, mit der ich in die Arbeitsgruppe aufgenommen wurde. Insbesondere Dr. Gabriela Segerer möchte ich für die kontinuierliche Betreuung während meiner Zeit im Labor danken.

Zuletzt danke ich meiner Familie und Jonas, die mich bei allem, was ich tue, unterstützen und hinter mir stehen, und Jakob, ohne den ich mit LaTeX definitiv verzweifelt wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Alexandra Annika Nadine Kaestner, geboren am 16. März 1995 in Wiesbaden

Beruf

| | |
|-----------------|--|
| 10/2021- | Universitätsklinikum Würzburg Zentrum für Innere Medizin II |
| 02/2021-09/2021 | Universitätsklinikum Ulm Zentrum für Innere Medizin I |

Studium

| | |
|-------------------|--|
| 10/2013 - 06/2020 | Julius-Maximilians-Universität Würzburg Humanmedizinstudium |
| 06/2020 | 3. Staatsexamen |
| 04/2019 | 2. Staatsexamen |
| 08/2015 | 1. Staatsexamen |

Schulbildung

| | |
|-------------|---|
| 2010 - 2013 | Oberstufengymnasium: Internatsschule Schloss Hansenberg |
| 2005 - 2010 | Gymnasium: St. Ursula Schule in Geisenheim |

Eigene Veröffentlichungen

Segerer, G., Engelmann, D., **Kaestner, A.**, Trötz Müller, M., Köfeler, H., Stigloher, C., Thiele, C., Jeanclos, E., & Gohla, A. (2018). A phosphoglycolate phosphatase/AUM-dependent link between triacylglycerol turnover and epidermal growth factor signaling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1863(6), 584–594. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.03.002>