

**Dissertation**

**Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase-1 (GPAM)  
als Schlüsselfaktor der Tumorzellmigration**

**Clara Bettina Büttner**

Dortmund, 2015



## **Dissertation**

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

# **Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase-1 (GPAM) als Schlüsselfaktor der Tumorzellmigration**

erstellt in der Forschungs-Abteilung System-Toxikologie in der  
Arbeitsgruppe Cell Tox bei Frau Dr. Marchan  
am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung  
an der Technischen Universität Dortmund  
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

vorgelegt von

**Clara Bettina Büttner**

Dortmund, 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Jan G. Hengstler (IfADo)
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Wehner (TU Dortmund)



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2011 bis November 2012 sowie von Februar 2014 bis Juli 2015 am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der Technischen Universität Dortmund im Bereich System-Toxikologie unter der Leitung von Frau Dr. Marchan und Frau Dr. Stewart angefertigt. Stets habe ich dort eine sehr schöne Arbeitsatmosphäre vorgefunden. Mein Dank gilt daher allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit. Besonders die Unterstützung nach der Elternzeit für meine kleine Tochter Laura hat mich sehr gerührt. An dieser Stelle möchte ich einigen Personen besonders danken.

Prof. Dr. Jan Hengstler danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine Arbeit an einem exzellent ausgestatteten Institut durchführen durfte. Stets wurde ich mit allen Materialien und Reagenzien für eine hochwertige und effiziente Forschung ausgestattet. Auch in allen Fragen rund um das Projekt stand er mir jederzeit beratend zur Seite.

Bei Rosemarie Marchan und Joanna Stewart bedanke ich mich ganz herzlich für die Themenvergabe und die Begleitung meiner Arbeit. Ihre Ideen und ihre Anerkennung für meine Problemlösungen haben sehr zum Gelingen dieses Projektes beigetragen.

Silke Hankinson hat mir täglich wie eine mütterliche Freundin zur Seite gestanden und sehr geholfen mit ihrer Fähigkeit, bei kleinen Rückschlägen ausschließlich Positives zu gewinnen.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinem Ehemann. Er hat mich in den letzten drei Jahren zu überzeugen versucht, dass es im Leben wichtigere Dinge als „die Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase-1“ geben kann und mir für meine Arbeit doch stets den Rücken frei gehalten. Danke dafür!



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Krebs im 21. Jahrhundert.....	1
1.2 Veränderungen im Metabolismus bei der Transformation.....	2
1.3 Glycerophosphodiesterase EDI3 .....	3
1.4 Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferasen .....	4
1.4.1 GPAT1.....	6
1.4.2 GPAT2.....	6
1.4.3 GPAT3 und GPAT4 .....	7
1.5 Cholin kinase.....	7
1.6 Cholinmetabolismus .....	9
1.7 Metaboliten als Signalmoleküle.....	13
1.7.1 Diacylglycerin.....	14
1.7.2 Lysophosphatidsäure und Phosphatidsäure .....	14
1.8 Ziel der Arbeit .....	18
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	21
2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.2 Chemikalien und Reagenziengemische.....	23
2.1.3 Standardsubstanzen für die LC-MS/MS.....	25
2.1.4 Hergestellte Puffer und Lösungen .....	26
2.1.5 Verwendete Primer für Real-Time-PCR .....	28
2.2 Biologisches Material .....	28
2.2.1 Zell-Linien .....	28
2.2.2 Weiteres biologisches Material .....	31
2.3 Methoden.....	36
2.3.1 Kultivieren, Einfrieren und Wiederbeleben von Zellen.....	36
2.3.2 Zellwachstumsanalysen.....	37

2.3.3 Vitalitätskontrolle der Zellen .....	37
2.3.4 Analyse von RNA .....	38
2.3.5 Analyse von Proteinen .....	40
2.3.6 Reduktion der Genexpression mit siRNA.....	44
2.3.7 Migrationsversuche .....	45
2.3.8 Erhöhung der Genexpression.....	47
2.3.9 Bestimmung intrazellulärer Metaboliten .....	50
2.3.10 Statistische Datenbewertung.....	53
3. Ergebnisse.....	55
3.1 Die Reduzierung der Genexpression mittels Knockdown.....	55
3.2 Die Bedeutung von EDI3 für die Zellmigration.....	56
3.3 Die Bedeutung von GPAM für die Migration.....	61
3.3.1 Überprüfen der GPAM-Knockdown-Effizienz in MCF7-Zellen.....	61
3.3.2 Morphologie und Vitalität bei GPAM-Knockdown .....	63
3.3.3 Die G3P-Acyltransferase-Familie bei GPAM-Knockdown.....	64
3.3.4 GPAM-Knockdown hat Einfluss auf Zellmigration .....	66
3.3.5 Einfluss von GPAM-Überexpression auf die Migration.....	70
3.4 Metabolische Funktion des GPAM-Knockdowns .....	71
3.4.1 Veränderung der LPA-Konzentrationen bei GPAM-Modulation.....	71
3.4.2 Veränderung der G3P-Konzentration bei GPAM-Knockdown.....	74
3.5 Die Bedeutung von Cholinase für die Migration.....	75
3.5.1 Überprüfen der CHKA-Knockdown-Effizienz in MCF7-Zellen.....	75
3.5.2 Zellmorphologie und Vitalität bei CHKA-Knockdown.....	77
3.5.3 CHKA-Knockdown hat keinen Einfluss auf die Zellmigration.....	78
3.5.4 Metabolische Funktion des CHKA-Knockdowns.....	80
3.5.5 CHKA-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Zellmigration.....	81
3.6 Vergleich der Bedeutung von EDI3, GPAM und CHKA für die Migration.....	82
3.6.1 Migration von MCF7-Zellen bei EDI3- und GPAM-Knockdown.....	82
3.6.2 Migration von HeLa-Zellen bei EDI3- und GPAM-Knockdown.....	85



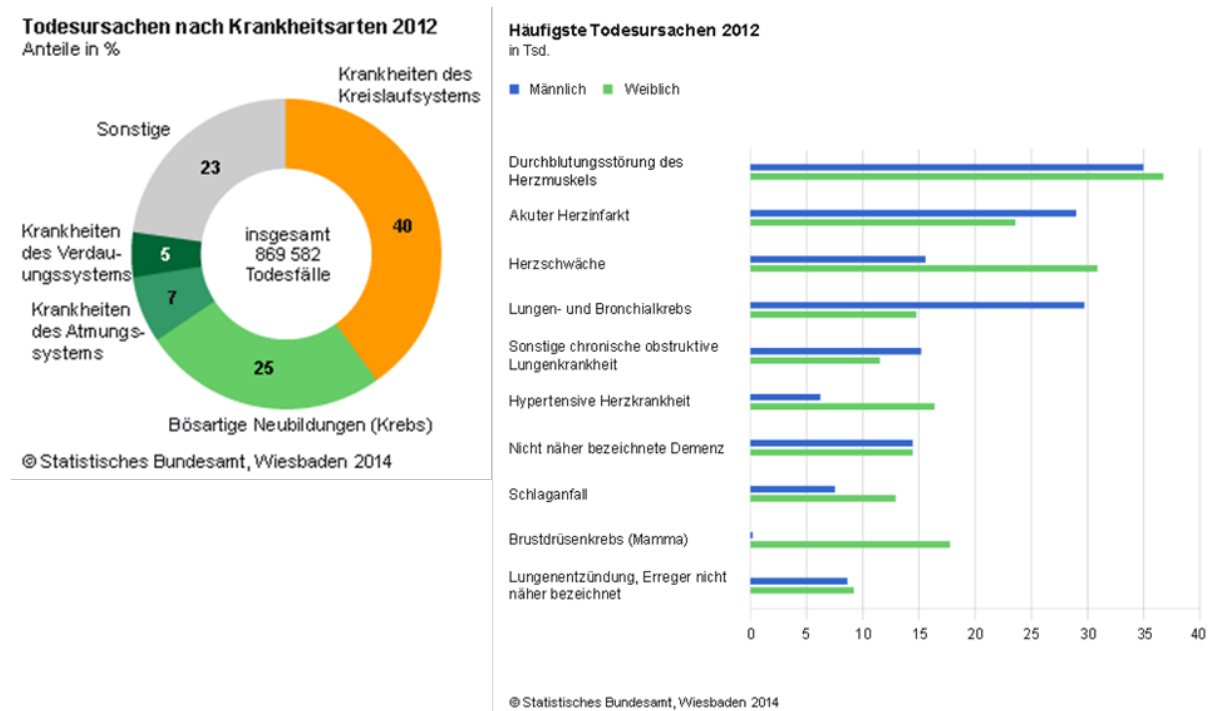
3.6.3 GPAM- und EDI3-Kd haben keinen additiven Effekt auf die Migration.....	87
3.7 Die Proliferation ist im Migrationsexperiment nicht beeinflusst. ....	89
3.8 Metabolische Veränderungen neben den erwarteten Enzymaktivitäten.....	92
3.8.1 Metabolische Veränderung bei GPAM-Knockdown.....	96
3.8.2 Metabolische Veränderung bei EDI3-Knockdown .....	97
3.8.3 Metabolische Veränderung bei CHKA-Knockdown.....	98
4. Diskussion .....	101
4.1 Die Enzyme EDI3 und GPAM unterstützen die Migration .....	102
4.2 Cholinase hat keinen Einfluss auf die Migration .....	105
4.3 Einfluss von CHKA auf die Proliferation .....	107
4.4 Metabolische Veränderungen.....	108
4.4.1 Veränderungen in den GPC-, Cholin- und PCho-Konzentrationen .....	110
4.4.2 Veränderungen in der G3P-Konzentration.....	114
4.4.3 Einfluss der LPA-Konzentration auf die Migration.....	115
4.4.4 Veränderungen in der PtdCho- und Triglycerid-Konzentration.....	121
4.5 GPAM und EDI3 als mögliche therapeutische Ziele.....	123
5. Zusammenfassung .....	125
6. Verzeichnisse.....	129
6.1 Verzeichnis der allgemeinen Abkürzungen .....	129
6.2 Bezeichnungen der Enzyme.....	131
6.3 Liste der Stoffwechselmetaboliten .....	132
6.4 Verzeichnis verwendeter Einheiten .....	133
6.5 Beschreibung der Kurzbezeichnungen von Firmen.....	134
6.6 Abbildungsverzeichnis .....	135
6.7 Tabellenverzeichnis .....	137
6.8 Glossar .....	138
6.9 Literaturverzeichnis .....	146

Anhang.....	158
A1 siRNA-Nukleotidsequenzen.....	158
A2 Standardreihen für die massenspektrometrischen Bestimmungen.....	167
A3 Intrazelluläre LPA-Konzentrationen .....	172
A4 Metabolische Veränderungen gemessen mit NMR-Spektroskopie .....	173
A5 Medium bei Experimenten zur Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten..	176
A6 $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -2D-Spektren zur Identifizierung der Metaboliten .....	178
A7 Chemische Verschiebung der quantifizierten Metaboliten.....	180

# 1. Einleitung

## 1.1 Krebs im 21. Jahrhundert

Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung zur Krebsvorsorge, Diagnose und Therapie sterben in Deutschland etwa 22000 Menschen jährlich an Krebs, davon mehr als 16000 Frauen mit Brustkrebs [DKFZ; Statistische Bundesamt Wiesbaden]. Krebs ist hiermit die zweithäufigste Todesursache in Deutschland.

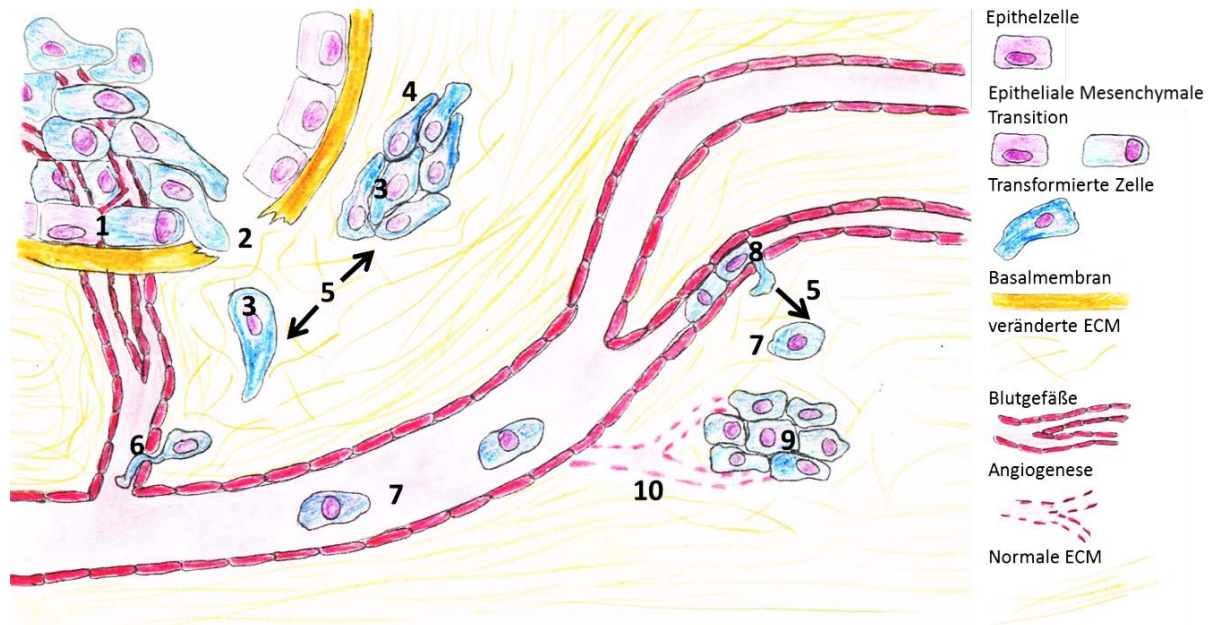


**Abb. 1.1 a/b: Todesstatistiken 2012 des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden**

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>

Krebs, die bösartige Gewebeneubildung, ist durch ungebremstes Wachstum immortalisierter Zellen gekennzeichnet. Ein Tumor ist immer ein komplexes individuelles Gemenge aus unterschiedlichen Zelltypen. Meist sind nicht die Primärtumore todesursächlich, sondern die Metastasen. Im Zuge der fortschreitenden Krebserkrankung verlassen einzelne Tumorzellen den Primärtumor, um neue Kolonien - die Metastasen - zu bilden. Dafür sind mehrere Fähigkeiten nötig, über die untransformierte Epithelzellen nicht verfügen: Die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT), das Durchbrechen der Basalmembran des Ursprungsgewebes, das Ablösen vom Tumor und das Einwandern in das umgebende

Gewebe. Hinzu kommt die Intravasion in Gefäße, verbunden mit dem Überleben ohne Zellverbund, die Extravasion aus den Gefäßen in „fremde“ Gewebe und das unabhängige Wachstum zu Mikrometastasen in diesen Zielgeweben und schließlich zu Sekundärtumoren mit eigener Angiogenese [Geiger et al., 2009].



**Abb. 1.2: Mechanismus der Metastasierung**

1: Epitheliale Mesenchymale Transition (EMT), 2: Durchbrechen der Basalmembran, 3: Ablösen vom Primärtumor, 4: Einwandern in das umgebende Gewebe, 5: Durchwandern der Extrazellulärmatrizes (ECM) verbunden mit deren Modifizierung, 6: Intravasion in Gefäße, 7: Überleben ohne Zellverbund, 8: Extravasion aus Gefäßen, 9: Wachstum im Zielgewebe zur Metastase, 10: Rekrutieren neuer Blutgefäße (Angiogenese). Modifiziert nach Geiger [Geiger et al., 2009].

Eine entscheidende Fähigkeit der Zellen für all diese Prozesse ist die zelluläre Migration. Betrachtet man Krebszelllinien, so ist eine schnelle Zellmigration eher mit aggressiven, invasiven Zelllinien verbunden - wie beispielsweise den epithelialen HeLa-Zellen -, während weniger aggressive Zellen ein geringeres Migrationspotenzial aufweisen, zum Beispiel die nicht invasiven MCF7-Brustkrebszellen.

## 1.2 Veränderungen im Metabolismus bei der Transformation

Während der zellulären Transformation zu malignen Tumorzellen werden verschiedene zelluläre Prozesse verändert, die normalerweise ein unkontrolliertes Zellwachstum bei gesunden Zellen verhindern. Auch der Metabolismus der Zelle wird stark verändert. Bestimmte Modifikationen werden immer wieder in Tumoren gefunden. Dazu gehören auch Veränderungen in der Glykolyse, bekannt als

Warbureffekt, gekoppelt mit erhöhter Glucose-Aufnahme ins Cytoplasma [Hanahan et al., 2011, Martinez-Outschoorn et al., 2014] sowie Veränderungen im Cholinmetabolismus der Krebszellen.

Diese Veränderungen führen zu einem erhöhten Gesamtcholinniveau [Glunde et al., 2006]. Das konnte nicht nur in Krebszelllinien gezeigt werden [Glunde et al., 2005] sondern auch *in vivo* [Esseridou et al., 2011] mit Hilfe moderner Magnetresonanzspektroskopie-Methoden [Iorio et al., 2013]. Bei Brust- und Eierstockkrebs sind die hohen Gesamtcholinmetaboliten vor allem auf eine starke Erhöhung von Phosphocholin (PCho) zurückzuführen [Granata et al., 2014], das sowohl Vorläufer als auch Abbauprodukt von Phosphatidylcholin (PtdCho), dem Hauptbestandteil der Zellmembran, ist. Veränderungen der Metaboliten im Cholinstoffwechsel wie auch erhöhte Expression der Enzyme im Cholinmetabolismus sind mit einer schlechten Prognose für Krebspatienten assoziiert. Dazu gehören die Glycerophosphodiesterase EDI3 [Stewart et al., 2012], die Cholinkinase CHKA [Glunde et al., 2005, Iorio et al., 2010, Gadiya et al., 2014] sowie die Phospholipase PLD1 [Gadiya et al., 2014]. Einige Schlüsselenzyme des Cholinmetabolismus werden im Folgenden näher beschrieben.

### 1.3 Glycerophosphodiesterase EDI3

Das Enzym EDI3, auch als GDE5 oder GPCPD1 bekannt (Gene ID: 56261; NM\_019593), gehört zur Familie der Glycerophosphodiesterasen und konnte in unserer Arbeitsgruppe eindeutig als Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase identifiziert werden [Stewart et al., 2012, Lesjak et al., 2014]. EDI3 ist die einzige Glycerophosphodiesterase, die ausschließlich im Cytosol vorkommt und sich zusätzlich durch eine Kohlenhydrat-Bindedomäne strukturell von den anderen sechs bisher gefundenen GDEs unterscheidet. Neben GDE5/EDI3 ist nur GDE2 in der Lage, Glycerophosphocholin zu Cholin und Glycerin-3-Phosphat (G3P) zu hydrolisieren. Substrate für die anderen GDEs sind beispielsweise für GDE1 und GDE3 Glycerophosphoethanolamin, Glycerophosphoinositol und Glycerophosphoserin [Zheng et al., 2003]. Glycero-Lysolipide sind Substrate für GDE4 und GDE7 [Corda et al., 2013], wobei beispielsweise aus Lyso-Phosphatidylcholin die Metaboliten Cholin und Lysophosphatidsäure (LPA) anstelle von Cholin und G3P gebildet werden. Die enzymatischen Funktionen der einzelnen GDEs legen eine entscheidende Rolle der Enzymfamilie im Energiestoffwechsel der Zellen nahe. Darüber hinaus konnte für einige GDEs deren Funktion bei der Differenzierung gezeigt werden: GDE2 kontrolliert das Neuritenwachstum [Yanaka et al., 2007], die enzymatische Funktion

von GDE3 ist für die Differenzierung von Osteoblasten notwendig [Corda et al., 2013], während für EDI3 eine inhibierende Wirkung auf die Skelettmuskelentwicklung gezeigt wurde, jedoch unabhängig von dessen enzymatischer Funktion [Okazaki et al., 2010]. Unsere Arbeitsgruppe ist nach wie vor die Einzige, die einen funktionellen Zusammenhang zwischen EDI3 und der Metastasierung von Krebs belegt hat [Stewart et al., 2012]. Durch Modulation von EDI3 wurden die Zellmigration [Stewart et al., 2012] und die Zelladhäsion [Lesjak et al., 2014] beeinflusst. Der Mechanismus konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden, aber eine Beteiligung von PKC $\alpha$  für die Veränderungen in der Adhäsion wurde gezeigt [Lesjak et al., 2014]. Die Modulation von EDI3 verändert das Verhältnis zwischen Glycerophosphocholin und Phosphocholin sowie die Konzentrationen an Lysophosphatidsäure und Phosphatidsäure [Stewart et al., 2012].

## 1.4 Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferasen

GPAM gehört zur Familie der Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferasen (GPATs). Sie übertragen eine langkettige Acylgruppe von Acyl-CoA auf Glycerin-3-Phosphat (G3P) zur Bildung von Lysophosphatidsäure (LPA) und katalysieren damit den limitierenden Schritt in der klassischen Triglycerid-Synthese [Hammond et al., 2002].

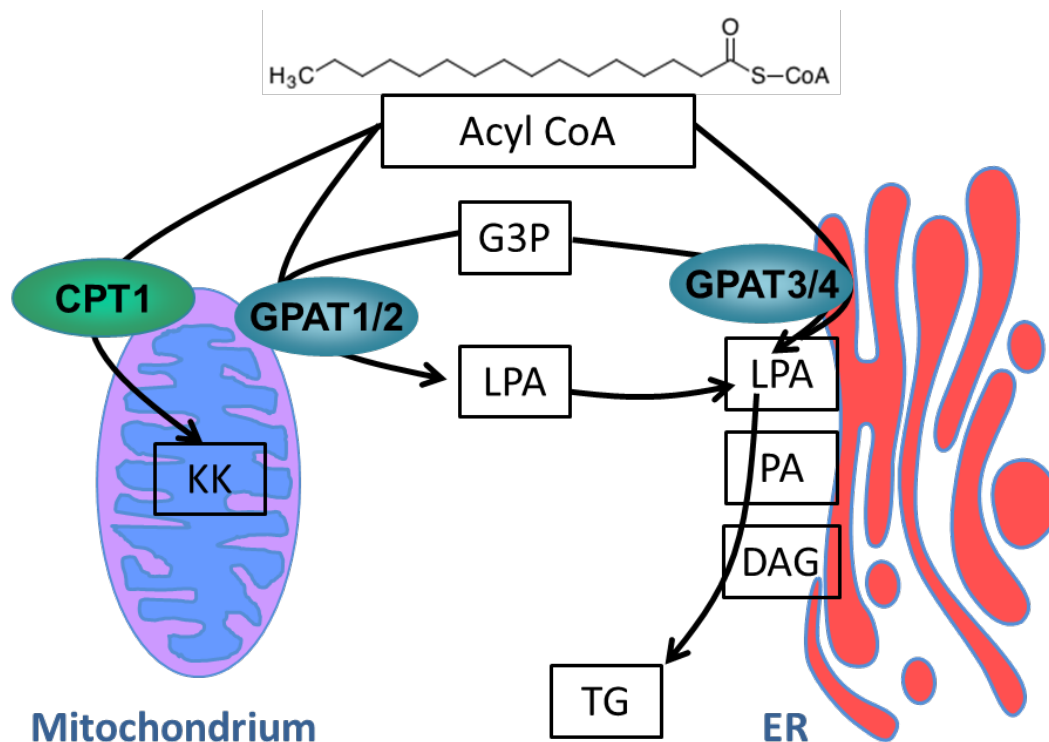


**Abb. 1.3: GPAT-Reaktion**

entnommen aus der KEGG Datenbank (<http://www.genome.jp>)

Bei Überschuss aus der Glykolyse dienen Triglyceride (TG) als Speicherfette zur Energiespeicherung. Alternativ können Triglyceride auch durch Acetylierung von Monoacylglycerin (MAG) aus der Nahrung oder durch die DHAP-Acyltransferase unabhängig von G3P synthetisiert werden [Gonzalez-Baro et al., 2007]. Bisher wurden vier GPATs gefunden: zwei mitochondriale GPATs (GPAT1 und GPAT2) und zwei GPATs, welche in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind, die so genannten mikrosomalen GPAT3 und GPAT4 [Gimeno et al., 2008]. Die mitochondrialen GPATs konkurrieren mit dem Carnitin-Palmityltransferasesystem um AcylCoA bei Energieüberschuss zur Bildung von Ketonkörpern im Mitochondrium. Der Transport von Fettsäuren vom Cytosol in die mitochondriale Matrix, den Ort der  $\beta$ -Oxidation, wird durch das Carnitin-

Palmityltransferasesystem katalysiert [Coleman, 2004]. Der Energiesensor AMPK reguliert das Gleichgewicht zwischen  $\beta$ -Oxidation, Ketonkörpersynthese im Mitochondrium und LPA-Bildung für die TG-Produktion am ER [Shaw, 2006].



**Abb. 1.4: Lokalisation und Funktion der GPATs in der Zelle**

AcylCoA wird am Mitochondrium zur LPA Synthese durch GPAT1 und GPAT2 und zur Ketonkörpersynthese durch Carnitin-Palmityltransferase verwendet. Die beiden mikrosomalen GPAT3 und GPAT4 in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verbrauchen ebenfalls AcylCoA für die LPA Synthese. LPA ist Ausgangsprodukt für die Bildung von PA, DAG und TG.

Abkürzungen: Carnitin-Palmityltransferase 1 (CPT1), Diacylglycerin (DAG), Glycerin-3-Phosphat (G3P), Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT), Ketonkörper (KK), Lysophosphatidsäure (LPA), Phosphatidsäure (PA); Triacylglycerin auch Triglycerid genannt (TG). Modifiziert nach Gonzalez-Baro [Gonzalez-Baro et al., 2007].

### 1.4.1 GPAT1

GPAT1 wird auch GPAM genannt und ist besonders in Adipozyten und in der Leber exprimiert, ist aber auch in den meisten peripheren Geweben zu finden. In der Leber trägt GPAM zu 30-50 % der GPAT-Enzymaktivität bei, während es in anderen Geweben nur etwa ein Anteil von 10 % ist [Cao et al., 2012a]. GPAM bevorzugt als Substrat ein AcylCoA mit gesättigten Fettsäuren zum Beispiel das 16:0-CoA [Coleman, 2004]. Im Promotor von GPAM befindet sich ein durch Kohlenhydrate aktiviertes Element. Der Insulinspiegel [Ericsson et al., 1997], die Kaseinkinase [Collison et al., 2006] und AMP-Kinase [Muoio et al., 1999] sind als regulatorische Faktoren von GPAM bekannt. In Mausexperimenten, in denen die Tiere zunächst fasten, ist nach einsetzender normaler Fütterung GPAM stärker exprimiert [Coleman et al., 2004]. Mäuse, die experimentell kein GPAM haben, sogenannte *Gpat1*<sup>-/-</sup> Knockout Mäuse, haben eine reduzierte Lebermasse. Geringere TG-Werte in der Leber dieser Mäuse und Veränderungen der Glycerophospholipide belegen funktionelle Veränderungen der Leber, die kein GPAM mehr hat [Hammond et al., 2002]. Darüber hinaus scheint GPAM auch für die Reifung von Thymocyten eine wichtige Rolle im Immunsystem zu spielen [Collison et al., 2008, Gulvady et al., 2013]. Die *Gpat*<sup>-/-</sup> Knockout Mäuse sind weniger empfänglich für Leberkrebs [Ellis et al., 2012]. Für GPAM wurde neben der Rolle für die Triglyceridsynthese auch eine Beteiligung am Phospholipidstoffwechsel in Brustkrebspatientinnen gezeigt [Brockmöller et al., 2012].

### 1.4.2 GPAT2

GPAT ist kürzlich als so genanntes „*cancer testis gene*“ identifiziert worden, das nach abgeschlossener Embryonalentwicklung normalerweise nur im Hoden vorliegt [Pellon-Maison et al., 2014]. In verschiedenen Krebsarten wie Lungen-, Prostata- oder Brustkrebs sowie in Melanomen wurde GPAT2 epigenetisch verstärkt gefunden. In Zellkultur führt eine verminderte GPAT2-Expression zu reduzierter Zellproliferation [Pellon-Maison et al., 2014]. In GPAM-Knockout Mäusen wird die Funktion von GPAM teilweise durch mehr GPAT2-Enzym kompensiert, die GPAT2-Transkription ist jedoch - im Gegensatz zur GPAM-Transkription - nicht durch Fasten beeinflusst [Cao et al., 2012a]. GPAT2 ist im MCF7-Zellmodell nicht exprimiert.



### 1.4.3 GPAT3 und GPAT4

GPAT3 ist vor allem in der Niere, im Herzen und Skelettmuskel vorhanden, weniger in der Leber und dient der TG-Synthese, nicht aber der Phospholipidbildung [Cao et al., 2006]. Im MCF7-Zellmodell ist GPAM deutlich stärker exprimiert als GPAT3.

GPAT4 ist vor allem im Fettgewebe der Brust exprimiert und unerlässlich für die Milchproduktion in der Stillzeit [Beigneux et al., 2006]. GPAT4 ist in MCF7-Brustkrebszellen gut exprimiert.

## 1.5 Cholin Kinase

Die Familie der Cholin/Ethanolamin Kinasen umfasst die Gene *CHKA* und *CHKB*, die für drei Enzyme codieren. *CHKA* kodiert ChoK $\alpha$ 1 (52 kDa) und ChoK $\alpha$ 2 (50 kDa). Die *CHKB* kodiert das Enzym ChoK $\beta$  (45 kDa). Cholin Kinase- $\alpha$ 1 und - $\alpha$ 2 sind bis auf 18 Aminosäuren identisch und entstehen durch alternatives Splicing der *CHKA*-mRNA. Bei Knockdown von *CHKA* werden immer beide Isoformen reduziert. Studien, die Experimente mit Überexpression enthalten, verstärken meist nur die Expression einer *CHKA*-Isoform. *CHKA* und *CHKB* besitzen Cholin Kinaseaktivität und Ethanolamin-Kinaseaktivität. Sie phosphorylieren als Homo- oder Heterodimere Cholin und Ethanolamin, wobei die Ethanolamin-Kinaseaktivität von *CHKB* doppelt so groß ist wie die von *CHKA* [Gallego-Ortega et al., 2009]. Die Cholin Kinase-Funktion ist bei  $\alpha/\alpha$ -Homodimeren stärker als bei  $\alpha/\beta$ -Heterodimeren und bei  $\beta/\beta$ -Homodimeren am geringsten [Aoyama et al., 2002]. Die Phosphorylierung von Cholin zu Phosphocholin (PCho) durch Cholin Kinasen ist der erste enzymatische Schritt, der notwendig ist für die Biosynthese von Phosphatidylcholin, dem Hauptbestandteil der Zellmembran [Li et al., 2014].

Für mehrere Onkogene, wie Ras, EGFR und c-Scr, wurde gezeigt, dass sie die Expression von Cholin Kinase erhöhen können und damit auch die intrazelluläre Konzentration von PCho. Cholin Kinase verstärkt auf bisher nicht vollkommen geklärte Weise die Onkogen getriebene Zelltransformation zu Tumorzellen [Lacal, 2001, Ramirez de Molina et al., 2002a, Ramirez de Molina et al., 2005, Miyake et al., 2012]. Dabei ist jeweils *CHKA* differentiell exprimiert, nicht *CHKB* [Ramirez de Molina et al., 2002b, Gallego-Ortega et al., 2011, Glunde et al., 2011b]. Generell ist *CHKB* in den meisten Geweben gleichmäßig exprimiert, während das *CHKA*-Protein vor allem in der Leber und im Hoden gefunden wird. Selbst Tumorzelllinien wie MCF7-Zellen weisen sehr wenig *CHKA* auf, während es in HEPG2 deutlich exprimiert ist. Schon 1989 konnte gezeigt werden, dass die Transformation von Zellen mit Onkogenen zu mehr PCho führt, welches durch Cholin Kinase produziert

wird [Macara, 1989]. Mittels Magnetresonanz-spektroskopie konnte bereits 1997 in Biopsien ein Unterschied im Cholinmetabolitengehalt von invasivem Brustkrebs im Vergleich zu frühen Krebsstadien gezeigt werden [Mackinnon et al., 1997]. Es wurde auch mehrfach belegt, dass immortalisierte Zellen bereits mehr intrazelluläres PCho besitzen und die Menge PCho hin zu transformierten Zellen weiter zunimmt [Aboagye et al., 1999, Yalcin et al., 2010]. Die Veränderung der Cholinmetaboliten in Tumorzellen wurde immer auf differentielle Expression in *CHKA* im Vergleich zu untransformierten Zellen zurückgeführt [Glunde et al., 2007, Ramirez de Molina et al., 2007, Ramirez de Molina et al., 2008, Hernando et al., 2009]. Jedoch konnten aktuelle Untersuchungen in Xenografttumoren zeigen, dass auch die *CHKB* Expression für Veränderungen in den Cholinmetaboliten verantwortlich ist [Moestue et al., 2010].

Darüber hinaus belegten mehrere Forschungsgruppen, dass eine Reduktion der Cholin-Kinaseaktivität durch siRNA oder Inhibitoren zu weniger Aktivierung der ERK-Kinase führt sowie zu verzögertem Tumorwachstum *in vitro* (soft Agar Experimente) und *in vivo* bei Maus-Xenograftmodellen [Ramirez de Molina et al., 2004, Chua et al., 2009, Yalcin et al., 2010]. Die wachstumshemmende Wirkung bei Reduktion von *CHKA* ist auf Tumorzellen beschränkt, während normale Zellen nicht beeinflusst zu sein scheinen [Mori et al., 2013]. Aufgrund dessen ist *CHKA* ein interessantes und viel erforschtes Zielgen für die Chemotherapie zur Behandlung von Krebs. Mit Inhibitoren wie MN58b konnten schon gute Erfolge erzielt werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass nicht die katalytische Funktion von *CHKA* ausschlaggebend für das Überleben von Krebszellen ist, sondern das Enzym selbst, das durch Komplexbildung, zum Beispiel mit EGFR, die Wachstumssignale verstärkt [Miyake et al., 2012, Falcon et al., 2013]. Zur Behandlung von Krebs befindet sich der Cholin-Kinase-Inhibitor TCD-717 in der klinischen Testphase 1 [April 2015 gelistet in <https://clinicaltrials.gov>].

## 1.6 Cholinmetabolismus

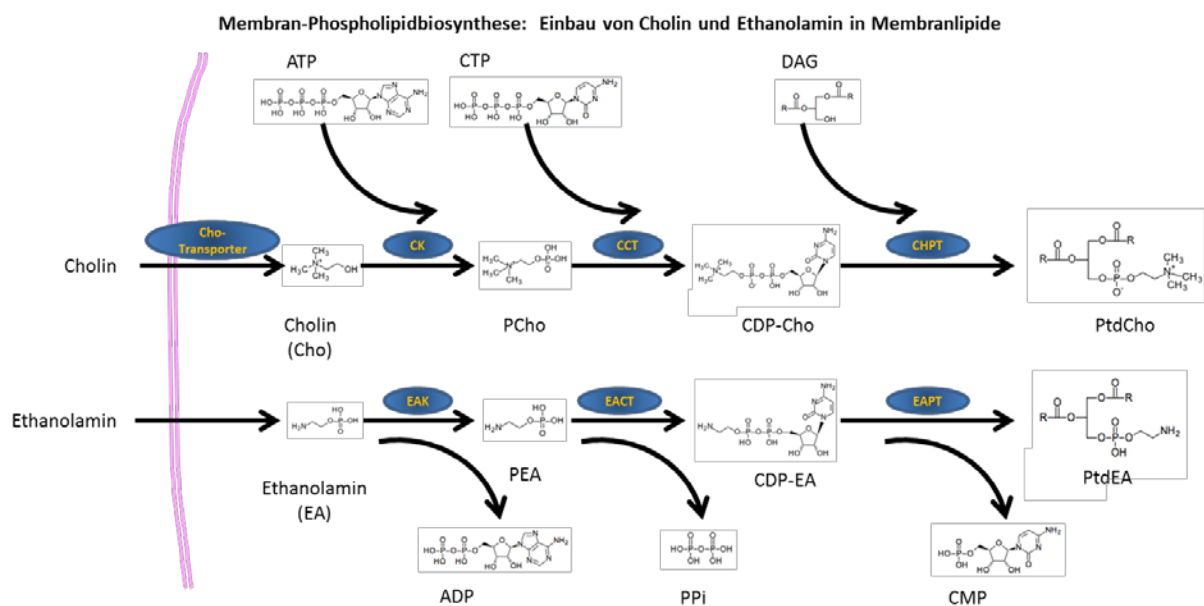
Cholin ist ein essenzieller Nahrungsbestandteil und liegt in der Zelle vor allem als Phosphatidylcholin vor. Nur 5 % des Cholins gibt es als freies Cholin oder in Form anderer Cholinmetaboliten wie Phosphocholin (PCho) und CDP-Cholin [Gibellini et al., 2010]. Unter Cholinmetabolismus fasst man die *de novo* Synthese von Membranphospholipiden (den Kennedy-Pathway) sowie das Recycling und Remodeling (den Landes Cycle) zusammen. Im Landes Cycle werden die bereits in die Zellmembran eingebauten Phospholipide durch bestimmte Phospholipasen und durch die Klasse der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen (LPLATs) derart umgebaut, dass die Membraneigenschaften den jeweiligen Erfordernissen angepasst werden. Dabei entfernen die Phospholipase A (PLA) eine Fettsäure an der sn-2-Position des Phospholipids und die LPLATs verestern eine neue Fettsäure an dieser Stelle. Durch die Verschiedenheit der Fettsäuren entstehen Membranlipide mit unterschiedlichen Eigenschaften [Soupene et al., 2008, Shindou et al., 2009]. Diese Modifizierung ist die Basis der Membranfunktionalität. Das Verändern der Membran wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In Abbildung 1.7 sind die Enzymklassen der für die Modifizierung zuständigen Enzyme angegeben und grün markiert. Die *de novo* Synthese von Membranphospholipiden ist als Kennedy-Pathway bekannt und wird im Folgenden genau geschrieben.

### Kennedy-Pathway

Als *Kennedy-Pathway* ist die *de novo* Biosynthese von Phosphatidylcholin (PtdCho) und Phosphatidylethanolamin (PtdEA) bekannt, seit dies Kennedy und Weiss 1956 in der Leber von Ratten zeigen konnten. Mehr als 50 % der Membranlipide sind PtdCho und PtdEA [Gibellini et al., 2010]. Neben seiner strukturellen Funktion in der Membran ist PtdCho Ausgangsprodukt für die Sphingomyelin-Synthese und die Quelle verschiedener Signalmoleküle wie das Diacylglycerin, die Phosphatidsäure und die Lysophosphatidsäure, deren Rollen später genauer erläutert werden.

Für die Bildung von Membranlipiden wird Cholin über verschiedene Transporter aktiv in die Zelle geschleust [Michel et al., 2006]. Im ersten Schritt wird Cholin dann sehr schnell durch Cholin kinasen (CK) zu PCho phosphoryliert. Der Anstieg von PCho ist ein Merkmal von Krebszellen (siehe Abschnitt 1.5 Cholin kinase Seite 7). Die anschließenden Reaktionen zur Bildung der hoch energetischen Intermediate Cytidine-5'-diphospho-Cholin (CDP-Cholin) bzw. CDP-Ethanolamin bestimmen die Geschwindigkeit der Reaktionskette. Die Cholinphosphat-Cytidyltransferase (CCT) überträgt Cytidintriphosphat (CTP) auf Phospho-Cholin. Die CTP-

Phosphoethanolamin-Cytidyltransferase (EACT) überträgt CTP auf Phosphoethanolamin (PEA). Die Enzyme EACT und CCT weisen dabei hohe Spezifität für ihr Substrat auf. Zum Schluss wird das CDP-tragende Molekül an 1,2-Diacyl-sn-Glycerin (Diacylglycerin, DAG) gekoppelt und so PtdCho durch die CHPT1 beziehungsweise PtdEA durch die EAPT gebildet [Gibellini et al., 2010]. Diese Reaktionen zur Bildung von Membranlipiden aus Cholin und Ethanolamin sind schematisch in der unten stehenden Abbildung dargestellt, ohne auf die Konformation und die aktiven Intermediate der Substratmoleküle einzugehen.



**Abb. 1.5: Kennedy Pathway I - Einbau der Kopfgruppe in Glycerophospholipide**

Cholin und Ethanolamin werden unter Verwendung der hoch energetischen Moleküle ATP und CTP aktiviert und zur Synthese der Glycerophospholipide Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Ethanolamin auf DAG übertragen.

Enzyme: CCT: Cholinphosphat-Cytidyltransferase (E.C. 2.7.7.15);

CHPT: Diacylglycerin-Cholinphosphotransferase 1 (E.C. 2.7.8.2); CK: Cholinkinase CHKA

und CHKB (E.C. 2.7.1.32 + E.C. 2.7.1.82); EACT: CTP-Phosphoethanolamin-Cytidyl-

Transferase (E.C. 2.7.7.14); EAK: Ethanolamin-Kinase (E.C. 2.7.1.82);

EAPT: Diacylglycerin-Ethanolamin-Phosphotransferase (E.C. 2.7.8.21 )

Metabolite: ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; CDP-Cho: Cytidin-5'-diphosphocholine; CDP-EA: Cytidin-5'-diphosphoethanolamin;

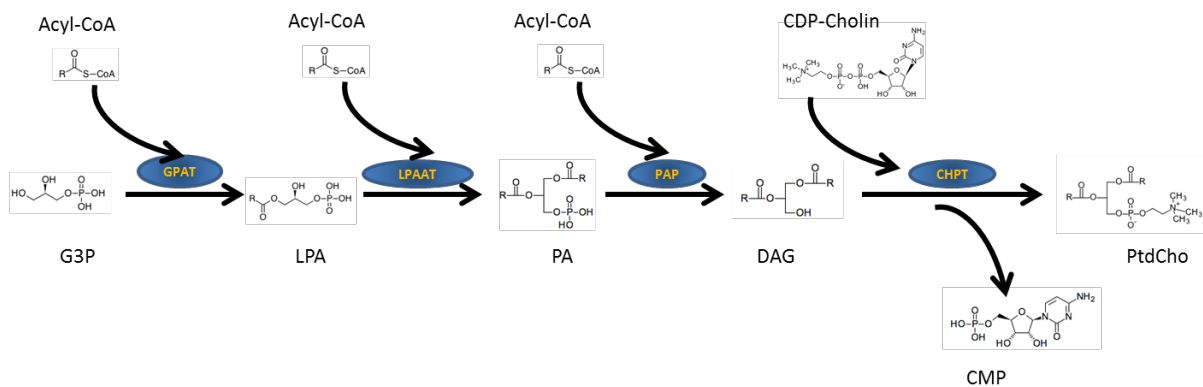
CMP: Cytidinmonophosphat; CTP: Cytidintriphosphat; DAG: 1,2-Diacyl-sn-Glycerin = Diacylglycerin; PCho: Phosphocholin; PEA: Phosphoethanolamin; PPI: ein Diphosphat,

PtdCho: Phosphatidylcholin. PtdEA: Phosphatidylethanolamin. Die chemischen

Strukturen für die Abbildung wurden aus KEGG Datenbank (<http://www.genome.jp>) entnommen.

Neben Cholin oder Ethanolamin für die polare Kopfgruppe der Membranlipide wird für die Synthese aber auch Diacylglycerin benötigt, das die Fettsäureketten trägt und das Gerüst des Moleküls bildet. Diacylglycerin ist beispielsweise ein Abbauprodukt von Phosphatidylcholin, wird aber im *Kennedy Pathway* auch *de novo* synthetisiert. Dazu werden ausgehend von Glycerin-3-Phosphat zwei Fettsäuren an das Glyceringerüst an den Positionen sn-1 und sn-2 verestert. Durch die Enzymklasse der Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferasen (GPATs; E.C. 2.3.1.15) entsteht 1-Acyl-sn-Glycerin-3-Phosphat (Lysophosphatidsäure, LPA), das durch die LPA-Acyltransferasen (LPAATs; E.C. 2.3.1.51) an der sn-2-Position weiter verestert wird zu 1,2-Diacyl-sn-Glycerin-3-Phosphat (Phosphatidsäure, PA). Es folgt die Dephosphorylierung von PA zu DAG durch die PA-Phosphatase (PAP; E.C. 3.1.3.4). DAG kann für die Triglyceridsynthese verwendet werden oder für die Bildung verschiedener Glycerophospholipide, die als Membranlipide dienen [Shindou et al., 2009, Yamashita et al., 2014]. Bei der Synthese von Membranlipiden verwenden die Enzyme Diacylglycerin-Cholin-Phosphotransferase (E.C. 2.7.8.2) und Diacylglycerin-Ethanolamin-Phosphotransferase (E.C. 2.7.8.21) das DAG direkt zur Bildung von Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Ethanolamin. Für die Synthese von Phosphatidyl-Inositol, Phosphatidyl-Glycerin und Cardiolipin ist hingegen die Aktivierung von DAG mit Cytidintriphosphat (CTP) zu CDP-DAG erforderlich [Coleman, 2004, Shindou et al., 2009]. Die Enzyme und chemischen Strukturen aller Substrate und Produkte zur Bildung von PtdCho aus DAG sind in Abbildung 1.6 dargestellt.

Membran-Phospholipidbiosynthese: Fettsäureveresterung der Membranlipide



**Abb. 1.6: Kennedy Pathway II – Einbau von DAG in Phosphatidyl-Cholin**

In der *de novo* Synthese von DAG wird G3P schrittweise zu PA verestert. PA wird anschließend durch die PA Phosphatase (PAP) zu DAG dephosphoryliert. Für die Synthese von Membranlipiden, wie beispielsweise PtdCho, wird die Kopfgruppe (hier Cholin) vom CDP-Intermediat auf DAG übertragen.

Enzyme:

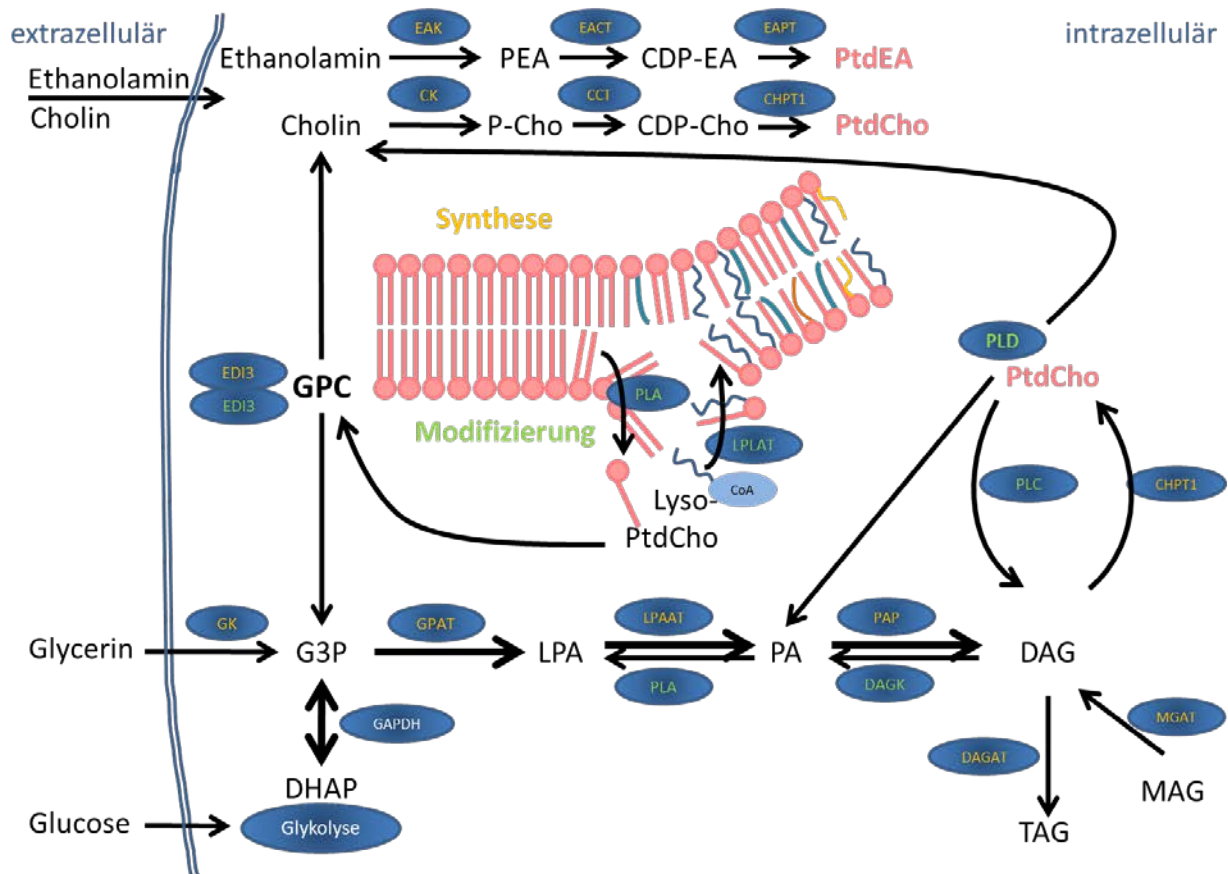
CHPT1: Diacylglycerin-Cholin-Phosphotransferase (E.C. 2.7.8.2); GPAT: G3P-Acyltransferase (GPAT1-4) (E.C. 2.3.1.15); LPAAT: LPA-Acyltransferase ( die AGPATs, PLAAT1/2 und LPCAT1) (E.C. 2.3.1.51); PAP: PA-Phosphatase (E.C. 3.1.3.4)

Metaboliten:

CMP: Cytidinmonophosphat; DAG: Diacylglycerin; G3P:Glycerin-3-Phosphat; LPA: Lysophosphatidsäure; PA: Phosphatidsäure; PtdCho: Phosphatidylcholin; R: Fettsäure

Die chemischen Strukturen für die Abbildung wurden aus KEGG Datenbank (<http://www.genome.jp>) entnommen.

Bei der Betrachtung des *Kennedy-Pathways* fällt auf, dass Teil I und Teil II durch das Enzym EDI3 über Glycerophosphocholin miteinander verbunden sind. GPC ist ein Abbauprodukt der Membranlipide, das durch die Lysophospholipase (LYPLA, E.C. 3.1.1.5) aus Lyso-Phosphatidylcholin gebildet wird. Ein menschlicher Glycerophosphocholin-Transporter, der extrazelluläres GPC für die intrazelluläre Phospholipidsynthese zur Verfügung stellt, wurde noch nicht gefunden. Solche Transporter sind, wie die GIT1 (Gene ID: 850462) in Hefe, bisher nur in eukaryotischen Pilzen bekannt [Patton-Vogt et al., 1998].



**Abb. 1.7: Der Cholinmetabolismus**

Bestehend aus *Kennedy-Pathway* (Synthese) und *Lands Cycle* (Modifizierung)

Aufnahme der Kopfgruppen Cholin und Ethanolamin zur Membranlipidsynthese im *Kennedy Pathway* (Enzymsymbole sind gelb gedruckt). Modifizierung von Membranlipiden im *Lands Cycle* (Enzymsymbole sind grün gedruckt). Die dicken Pfeile geben die vorrangigen Reaktionen an. Details siehe Text der Abschnitte „1.3 Glycerophosphodiesterase EDI3“ auf Seite 3, „1.4.1 GPAT1“ auf Seite 6 und Abschnitt „1.5 Cholin kinase“ auf Seite 7 sowie das Kapitel „1.6 Cholinmetabolismus“ auf Seite 9. Eine Liste aller Abkürzungen befindet sich im Kapitel „Verzeichnisse“.

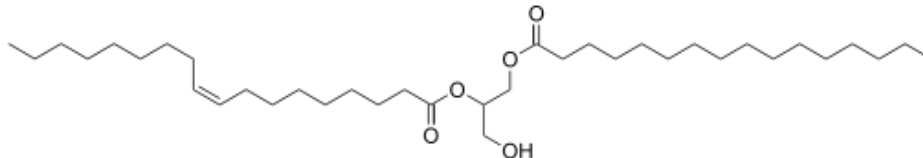
## 1.7 Metaboliten als Signalmoleküle

Phospholipide werden meist als strukturelle Komponenten der Zellmembran betrachtet. Im vergangenen Jahrzehnt mehren sich die Publikationen, die Phospholipide und deren Metaboliten als Signalmoleküle beschreiben. Die bei den Reaktionen im Cholinmetabolismus entstehenden Zwischenprodukte dienen nicht nur als Substrat für die nächste Reaktion. Sie sind gewissermaßen Kreuzungspunkte der metabolischen Richtungen und müssen zwischen Zellkompartimenten hin und her und über Membranen hinweg transportiert werden. Sie erfüllen essenzielle biologische Funktionen: Als Liganden für an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beeinflussen sie Wachstums- und Proliferationssignale (wie Lysophosphatidsäure,

LPA) oder rekrutieren Kinasen und andere Enzyme zu deren Aktivierung zur Zellmembran, wie Diacylglycerin (DAG) die Proteinkinase C (PKC). Phospholipide, und deren Metaboliten wie beispielsweise Phosphatidsäure (PA), bestimmen die Membranrigidität und nehmen somit auf all jene Prozesse Einfluss, die Membranfusionen benötigen. Aufgrund der Diversität und wegen des geringen intrazellulären Gehaltes der einzelnen Metaboliten sind diese Prozesse jedoch weitgehend noch unverstanden. Einige gut untersuchte Beispiele werden im Folgenden dargestellt.

### 1.7.1 Diacylglycerin

Diacylglycerin ist ein aus Glycerin bestehendes Glycerid, an das zwei Fettsäureketten konvalent durch Veresterung gebunden sind. Ein DAG-Molekül wie beispielsweise 1-Palmitin-2-Ölsäure-Glycerin hat die folgende chemische Struktur.



Durch Veresterung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren verschiedener Kettenlängen entstehen viele verschiedene DAGs, die nicht nur als Substrat für die Speicherung verschiedener Triglyceride dienen, sondern auch Vorläufer für Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin sind. Neben der Bedeutung von DAG als metabolischer Kreuzungspunkt sind DAGs auch als Signalmoleküle bekannt. So ist DAG, das durch PLC von der Plasmamembran abgespalten wird, in der Lage, die Proteinkinase C zur Plasmamembran zu rekrutieren, ein für die Aktivierung von PKC notwendiger Vorgang [Turban et al., 2011]. PKC spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Signalwegen, die unter anderem Zelladhäsion und Proliferation steuern. [Coleman et al., 2004]

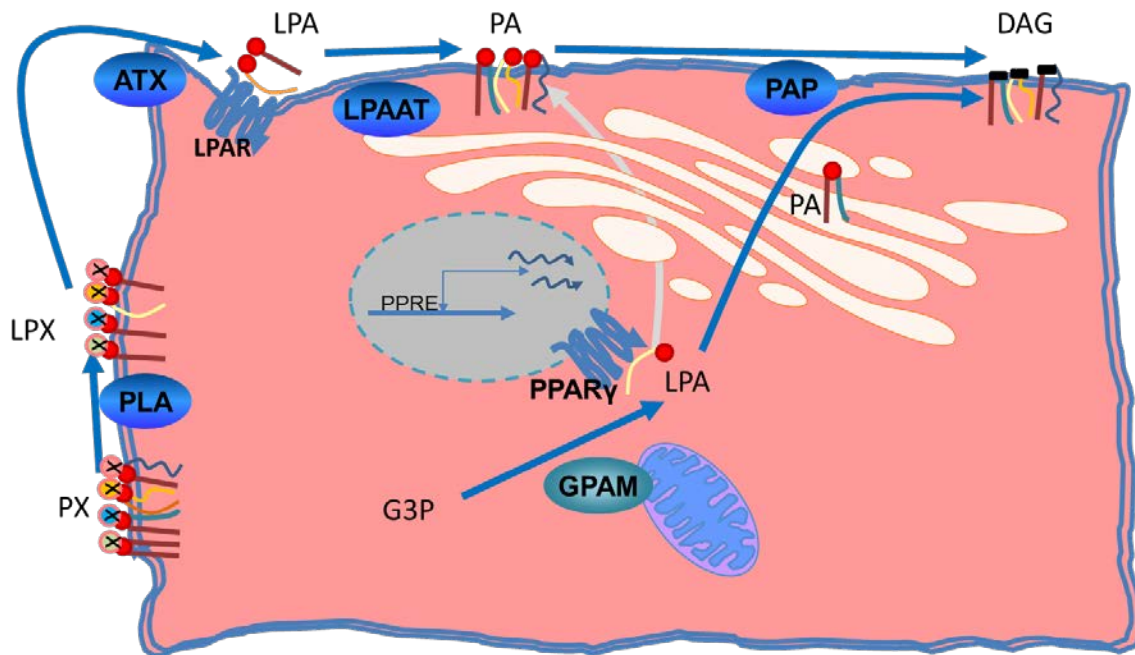
### 1.7.2 Lysophosphatidsäure und Phosphatidsäure

Lysophosphatidsäure und Phosphatidsäure sind Intermediate der Glycerophospholipidsynthese. Lysophosphatidsäuren werden als Signalmoleküle vor allem aus der Plasmamembran durch Phospholipasen (PLAs) in das Extrazellulärmedium entlassen. PLAs produzieren Lysophosphatidyl-Choline, Lysophosphatidyl-Ethanolamin und Lysophosphatidyl-Serin aus den Membran-Phospholipiden. Durch Abspaltung der Kopfgruppe von Lyso-Phospholipiden durch die Lysophospholipase ATX wird LPA gebildet [Aoki et al., 2002]. LPAs sind Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Zellmembran und steuern



Prozesse wie Überleben, Proliferation und Migration [Mills et al., 2003, Coleman, 2004]. So konnte an Ovarialkarzinom-Zellen ein die Proliferation stimulierender Effekt von LPA gezeigt werden. LPA ist im Bauchwasser von Patientinnen mit Ovarialkarzinom vorhanden und könnte als Biomarker dienen [Xu et al., 1998].

LPA ist aber auch ein Ligand für den Rezeptor  $PPAR\gamma$  in der Kernmembran [McIntyre et al., 2003], was darauf hinweist, dass LPA auch die Transkription von  $PPAR\gamma$ -Zielgenen steuern kann (siehe Abbildung 1.8).



**Abb. 1.8: Synthese und Lokalisation der Phospholipide und verantwortliche Proteine zur Bildung der Signalmoleküle LPA, PA und DAG**

Schwarz dünn gedruckt sind die Metaboliten:

Diacylglycerin (DAG); Phosphatidsäure (PA); Lysophosphatidsäure (LPA); Phospholipide mit X = Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol (PX).

Blau unterlegt sind die Enzyme: Autotaxin, Lyso PLD, ENPP2, E.C. 3.1.4.39 (ATX);

Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAM); LPA-Acyltransferase (LPAAT);

Phosphatidase (PAP) und Phospholipase A (PLA).

Der Zellkern ist grau dargestellt, das Endoplasmatische Retikulum weiß.

LPA, aus PX der Zellmembran gebildet, bindet an LPA-Rezeptoren (LPA-R) der Membran.

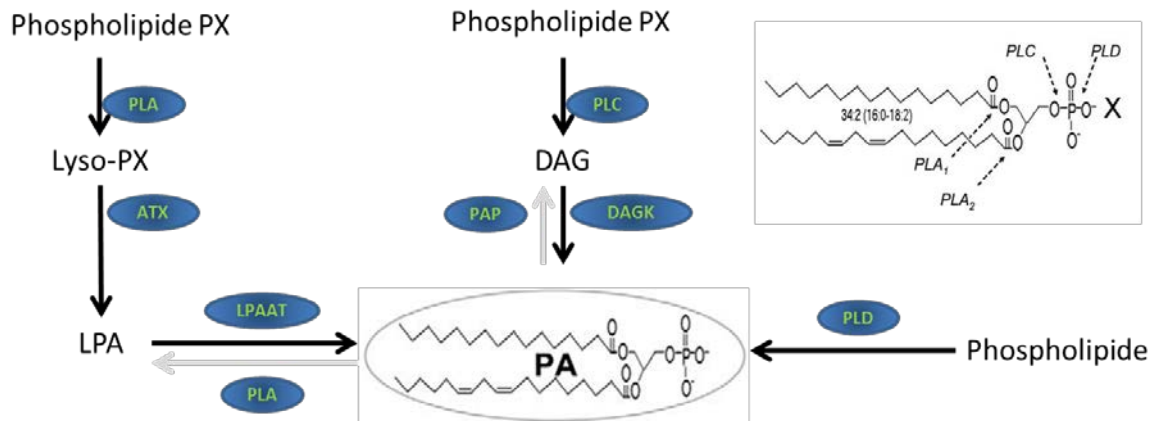
LPA, durch GPAM aus G3P hergestellt, bindet an  $PPAR\gamma$ -Rezeptor an der Kernmembran

und aktiviert die Transkription von Genen mit *PPA-response elements* (PPRE), LPA wird

durch die LPAAT in der ER-Membran zu PA acetyliert. Die PA-Phosphatase (PAP) dephosphoryliert PA zu DAG.

Phosphatidsäure ist ein Produkt der *de novo* Synthese von LPAAT und Abbauprodukt von Membranphospholipiden. Die Phospholipasen PLA-1 und PLA-2 spalten die Fettsäureketten; PLD und PLC spalten die Kopfgruppe ab. PLD

produziert direkt PA [Hancock, 2007], während durch PLC zunächst das Signalmolekül DAG entsteht, das bei der Phosphorylierung durch die DAG-Kinase (DAGK) zu PA umgewandelt wird [Wang et al., 2006]. PLD und PLC wurden mehrfach mit Krebs in Verbindung gebracht [Umezū-Goto et al., 2002, Zheng et al., 2006, Zhao et al., 2007, Spadaro et al., 2008, Toschi et al., 2009]



**Abb. 1.9: Produktion von PA aus Phospholipiden**

Die Phospholipide der Membran werden durch PLA zu Lysophospholipiden und durch ATX weiter zu LPA abgebaut. Durch die PLC entsteht DAG, welches weiter zu PA metabolisiert werden kann. Mit Hilfe der PLD entsteht PA direkt aus den Membran-Phospholipiden. PA und LPA sind durch Hinzufügen einer Fettsäure (durch LPAATs) und durch Abspalten von Fettsäureketten (durch PLAs) ineinander umwandelbar.

Abkürzungen: Phospholipide mit X= Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol (PX);

Lysophospholipase (ATX); Diacylglycerin (DAG); DAG-Kinase (DAGK);

Lysophosphatidsäure (LPA); LPA-Acyltransferase (LPAAT); Lysophospholipide (Lyso-PX);

Phosphatidsäure (PA); Phosphatidsäurephosphatase (PAP); Phospholipase A (PLA);

Phospholipase C (PLC); Phospholipase D (PLD).

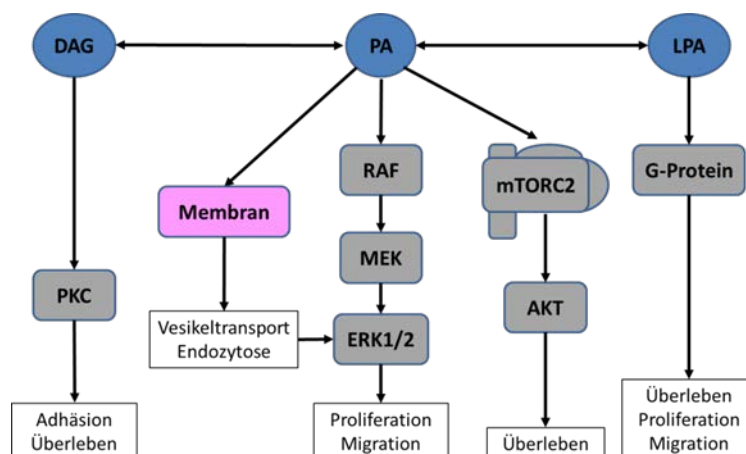
Modifiziert nach Xuemin Wang [Wang et al., 2006].

Verschiedene PA-Zielgene wurden gefunden wie: Phosphatasen, Kinasen, Proteine in G-Protein-gekoppelten Signalkaskaden, Proteine für Vesikeltransport und Enzyme des Metabolismus [Wang et al., 2006]. So kann PA auf viele zelluläre Prozesse Einfluss nehmen. Ein Zusammenhang mit PA konnte bei Wachstum, Proliferation, Hormonen und Insulin gefunden werden. Phosphatidsäure kann Proteine zur Membran rekrutieren, ihre Aktivität beeinflussen und die Membran strukturell verändern.

PA rekrutiert Kinasen wie Raf1 zur Plasmamembran, wo es mit Ras-GTP und anderen regulatorischen Komponenten interagiert [Andresen et al., 2002]. Bindemotive in Proteinen können PA erkennen [Horchani et al., 2014]. Zum Beispiel kann der Nukleotidaustauschfaktor Sos, der Ras-GTP in die aktive Ras-GDP Form

bringt, direkt an PA binden [Hancock, 2007]. Ein weiteres Beispiel für durch PA beeinflusste zelluläre Signale ist die mTOR Signaltransduktion. PA stabilisiert die Komplexe mTOR1 und mTOR2 [Foster, 2009, Toschi et al., 2009] und verstärkt auf diese Weise das Überleben von Zellen. In Hepatozyten führt eine Überexpression von GPAM zu mehr 16:0 LPA. Das daraus gebildete PA führt zur Dissoziation von mTOR2 aus dem aktiven RICTOR Komplex und schwächt auf diese Weise AKT-Überlebenssignale ab. Diese Daten legen nahe, dass PA, das durch PLD gebildet wird, sich nicht nur räumlich, sondern auch funktionell von *de novo* PA unterscheidet [Zhang et al., 2012].

Phosphatidsäure in der Membran ermöglicht auch die Ausbildung von einschichtigen Membranen, wie sie für die Endozytose nötig sind [Andresen et al., 2002, Kooijman et al., 2003]. Endozytose von Membranrezeptoren ist ein wichtiges Element zur Regulation der Signaltransduktion. Die Einflüsse der besprochenen Signalmoleküle sind in der folgenden Abbildung 1.10 zusammengefasst.



**Abb. 1.10: Intrazelluläre Signalfunktionen von DAG, PA und LPA**

Diacylglycerin (DAG) rekrutiert Proteinkinase C (PKC) für eine vollständige Aktivierung zur Plasmamembran. Der Phosphatidsäure (PA)-Gehalt der Membran beeinflusst deren Rigidität und somit Vesikeltransportprozesse. PA kann das RAS-Effektorprotein RAF-Kinase (RAF) rekrutieren, welches durch Phosphorylierung die MEK-Kinase (MEK) und damit die weiteren Kinasen ERK1/2 der Rezeptortyrosin-Kinase-Kaskade aktiviert. Weiterhin kann PA mTOR-Komplexe stabilisieren und so beispielsweise Einfluss auf die AKT-Kinase-Aktivierung nehmen. Lysophosphatidsäure (LPA) ist ein Ligand für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und moduliert auf diese Weise intrazelluläre Signale. Die Metaboliten sind blau, die Enzyme grau unterlegt.

## 1.8 Ziel der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe identifizierte *Endometrial Differential Cancer-3* (EDI3) als mit schlechter Prognose assoziiertes Gen in Patientinnen mit Endometriumkarzinom oder Ovarialkarzinom. Die weitere Charakterisierung von EDI3 zeigte, dass es sich bei dem Enzym um eine Glycerophosphodiesterase handelt, die die Hydrolyse von Glycerophosphocholin (GPC) zu Glycerin-3-Phosphat (G3P) und Cholin (Cho) katalysiert. Cho ist Ausgangsstoff der Phospholipidsynthese und wird durch Cholin kinasen zu Phosphocholin (PCho) phosphoryliert. Cholin kinase-alpha (CHKA) und das Reaktionsprodukt PCho ist in vielen Krebszelltypen erhöht [Aboagye et al., 1999, Ramirez de Molina et al., 2002b, Ramirez de Molina et al., 2004, Glunde et al., 2007, Gallego-Ortega et al., 2009, Gallego-Ortega et al., 2011, Glunde et al., 2011b, Bertilsson et al., 2012, Trousil et al., 2014]. Dies geht mit einer Verschiebung der Cholinmetaboliten zu PCho und Verringerung des GPC/PCho-Verhältnisses einher. Eine Inhibition von CHKA in Krebszellen verlangsamt deren Wachstum [Ramirez de Molina et al., 2004, Glunde et al., 2005, Yalcin et al., 2010, Clem et al., 2011, Miyake et al., 2012]. Daher ist CHKA ein viel versprechendes Zielgen der Chemotherapie [Lacal, 2001, Ramirez de Molina et al., 2005, Janardhan et al., 2006, Glunde et al., 2007, Ramirez de Molina et al., 2008, Ramirez de Molina et al., 2012]. Interessanter Weise zeigten die bisherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass auch EDI3 das GPC/PCho-Verhältnis reduziert [Stewart et al., 2012]. Durch Reduktion von Glycerophosphocholin (GPC) und Erhöhung von Phosphocholin (PCho) kann eine höhere EDI3-Expression in gleicher Weise wie CHKA das GPC/PCho-Verhältnis derart ändern, wie es in Krebszellen vielfach beobachtet wurde (siehe Einleitung Abschnitt „Cholin kinase“).

Weitere *in vitro*-Studien konnten zeigen, dass EDI3 jene biologischen Prozesse steuert, die entscheidend für die Metastasierung sind (siehe Einleitung Abschnitt Glycerophosphodiesterase EDI3). Es konnte bereits dargestellt werden, dass EDI3 einen positiven Einfluss auf die Zellmigration hat [Stewart et al., 2012]. Darüber hinaus verstärkt EDI3 die Zelladhäsion und die Ausbildung von Membranausstülpungen [Lesjak, 2014-Dissertation]. Neben der Zellmigration sind dies zwei weitere essentielle Prozesse für die Metastasierung von Krebszellen [Lesjak et al., 2014]. Durch die bisherige Charakterisierung wurde noch kein Mechanismus gefunden, der EDI3 in die Lage versetzt, die Zellmigration zu beeinflussen. Es liegt nahe, die metabolischen Veränderungen bei Modulation von EDI3 und die Bedeutung der Metaboliten näher zu betrachten und den Zusammenhang zwischen der enzymatischen Funktion von EDI3 und der zellulären Migration zu untersuchen.

EDI3 könnte als einzige cytosolische Glycerophosphocholindiesterase einen signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre Cholin-Konzentration haben. Ein Einfluss auf die Phosphocholin-Konzentration konnte bereits in Arbeiten unserer Gruppe gezeigt werden [Stewart et al., 2012]. Somit könnte EDI3 als Target zur Reversion des verschobenen GPC/PCho-Verhältnisses in Krebs angesehen werden. Ob das GPC/PCho-Verhältnis jedoch lediglich als ein Marker für transformierte Zellen dient oder aber eine Reduktion von PCho auch das Wachstum von Krebszellen hemmen kann ist noch unverstanden [Moestue et al., 2012]. Auch ein Einfluss auf die Migration durch CHKA war zum Zeitpunkt der Projektfindung noch nicht publiziert [Shah et al., 2010, Granata et al., 2014].

Neben seinem Einfluss auf die Cholinmetaboliten könnte EDI3 auch G3P für die Triglyceridsynthese zur Verfügung stellen und somit Einfluss auf den gesamten Lipidstoffwechsel der Zelle nehmen. Die Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase ist dabei jenes Enzym, das die initiiierende und limitierende Reaktion der Triglyceridsynthese katalysiert. Die Rolle von GPAM, einer Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase, ist bisher noch nie mechanistisch in Krebs untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit ist es zu erkennen, auf welchem Weg die Migration von Tumorzellen durch EDI3 beeinflusst wird. Eine systematische Analyse der Enzyme und ihrer enzymatischen Reaktionen, die direkt mit EDI3 in Verbindung stehen, wurde dafür durchgeführt.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Im folgenden Abschnitt sind die verwendeten Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien tabellarisch aufgeführt.

#### 2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätebezeichnung	Hersteller
Electrophorese-System Mini-PROTEAN Tetra	Bio-Rad
Fluoreszenz-Plattenlesegerät Spectra Fluor Plus	TECAN
Heizblock	PEQLAB-Biotechnology GmbH
Heizblock	Grant-Bio
Hemocytometer	Superior, Lauda-Königshofen
Inkubatoren für Zellkultur	Binder
Massenspektrometer AB Sciex Qtrap 5500 LC-MS/MS System CUR 30 psi; IS -4000 V; TEM 550 °C; GS1 40 psi; GS2 60 psi, CAD medium; EP 10 V, Scan mode MRM; Dwell time 150 msec; Ion Mode negativ; Detektor 2300 V; Analysesoftware Analyst 1.6.1	AB Sciex
Mikroskop, Axiovert 25, invertierte Optik	Zeiss
Mikroskop Nikon eclipse TS100 mit Nikon Digital Sight Kamera DSFi1 und Nikon Omron H7ET Xenon Laser	Nikon
NMR: BRUKER AVANCE III 600 Flüssigkeits- NMR-Spektrometer; 14,1 Tesla-Magnet; HPNC-5mm-Cryoprobenkopf Messfrequenz für <sup>1</sup> H: 600,35 MHz, Messfrequenz für <sup>31</sup> P: 243,07 MHz Software BRUKER TOPSPIN 3.2 PL 5	BRUKER
Orbital Shaker KS260 basic	IKA
Phasenkontrastmikroskop NIKON eclipse TS100	Nikon
Pipette für Volumina 2, 10, 100, 200, 1000 und 5000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Gerätebezeichnung	Hersteller
<i>Power Pack</i>	BioRad
<i>Power Pack P25</i>	Biometra
Real-Time-PCR System ABI 7500 Fast	Applied Biosystems
Schüttler Vortex	Heidolph REAX, Düsseldorf
Semi Dry Blot Fastblot B44	Biometra
Semi Dry Blot Trans Blot SD cell	BioRad
Spektrophotometer NanoDrop® 2000	ThermoScientific
Spektrophotometer V-530	Jasco
Sterilbank HERAsafe	Heraeus
Sterilbank	Thermo Electron Corporation
Thermocycler T3000	Biometra
Thermo-Shaker PHMT	Grant Instruments Ltd.
Ultraschallaufschlusssystem SONS Plus	Bandelin
Wasserbad für Zellkulturbedarf	GLF
WB-Detektionssystem: ChemiLux CSX-1400M	INTAS
WB-Detektionssystem: Digital Camera Color View II	Soft Imaging System, Münster
Zellzählautomat CASY Modell DT	CASY-Technology® SCHÄRFTE System
Zellzählautomat CASY Modell TT	CASY-Technology® Innovatis AG
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge Laborfuge 400R	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Kendro-Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0R	ThermoScientific
Zentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf

Standard Verbrauchsmaterial	Hersteller
<b>Zellkultur</b>	
<i>Cell Scrapers</i>	Sarstedt
Falcon Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Filtertips (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt
Multi-Well Platten (6-Well, 12-Well, 24-Well und 96-Well)	Sarstedt
Zellkultur Platten 150 x 20 mm	Sarstedt
Zellkulturflasche T175 (175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
Zellkulturflasche T25 (25 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
Zellkulturflasche T75 (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt



<b>Proteinbiochemie und Mikrobiologie</b>	
Multily- $\mu$ Strip Pro 8-strip	Sarstedt
Plastibrand Einwegküvetten	Brand
PVDF Membran	Perkin-Elmer
Safe Seal micro tube (0,5 ml)	Sarstedt
Safe Seal tube (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Proteinbiochemie und Mikrobiologie	
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Sterile Filter Filtropur S 0.2	Sarstedt
Whetman Paper 3 mm	Schleicher & Schuell
Spezielle Platten für Plate Reader und Real-Time-PCR	
Cell Culture Plates Black (96-Well)	ThermoScientific
microAMP optical 96-well plates	Applied Biosystems

### 2.1.2 Chemikalien und Reagenziengemische

Chemikalie	Hersteller
<b>Reagenzien in der Zellkultur</b>	
100x mem NEAA Aminosäurelösung	Gibco
FCS Sera Plus® (Hitze inaktiviert)	Sigma
Genetecin (G418)	Sigma
Gentamycin	Gibco
Insulin (recombinant, human)	Sigma (I9278)
L-Glutamin	Gibco
Transfektionsreagenz Lipofectaminee 2000	Invitrogen
Transfektionsreagenz Lipofectaminee-RNAiMax	Invitrogen
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Pan-Biotech
Serum reduziertes Medium für Transfektionen: Opti-MEM®	Gibco
Trypsin/EDTA	PAN Biotech
Transfektionsreagenz x-treme GENE-HP	ROCHE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 4,5 g/l Glucose)	PAN Biotech
<b>Sonstige allgemeine Chemikalien</b>	
2,3-Dihydroxy-1-4-dithiobutan (DTT)	Sigma
Aceton	Carl Roth
Acrylamid 30 % (v/v)	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth
Bromodeoxyuridin (BrdU)	Sigma
Bromophenolblau	Carl Roth

Chloroform	Carl Roth
<b>Sonstige allgemeine Chemikalien</b>	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Ethanol vergällt	Richter Chemie GmbH
Ethanol vergällt 70 %(Reinigungsmittel)	Carl Roth
Ethanol, absolut	Carl Roth
Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Fibronektin, human	BD Biosciences
Glycin	Carl Roth
Isopropanol, absolut	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kristallviolett	Sigma
Magnesiumchlorid	Carl Roth; Merck
Methanol	Carl Roth
Methanol $\geq 99,5$ %, Ph.Eur., reinst (für PAGE)	Carl Roth
Methanol 100 % optigrade (für Extrakte und HPLC-MS)	Promochem S0-9356
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumfluorid	Carl Roth
Natriumhydrogenchlorid	Carl Roth
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma Aldrich $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Lösung aktivieren durch mehrmaliges Aufkochen und Einstellen auf pH 10
Nonidet P-40	Sigma
Ponseau S	Carl Roth
Salzsäure HCl 32 %	Carl Roth
Tergitol (NP40)	ROCHE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Trichloressigsäure	Carl Roth
Tris-HCL	Carl Roth
Triton X-100	Sigma
Tryphanblau	Carl Roth
Tween 20	Sigma
Zinkchlorid	Sigma
$\beta$ -Mecaptoethanol	Carl Roth

<b>Spezielle Chemikalien/Chemikaliengemische und Reagenziensets</b>	
Amplex Red Phospholipase D Assay Kit	Invitrogen
BCA Protein Assay Kit	Pierce, ThermoScientific
cDNA Reverse-Transkription-Kit	Applied Biosystems
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser	Invitrogen
Differential Staining Kit	Polyscience
Echtzeit-PCR Kit QuantiTect SYBR Green	Qiagen
Ladepuffer (5fach)	Bio-Rad
Luminol-Lösung	Perkin Elmer
MagicMark XP Westernblot Proteinstandard	Invitrogen
Mitochondrienisolierungs Kit	MACS MiltenyiBiotec #130-094-532
Phosphatase-Inhibitor Cocktail II	Invitrogen
Phosphatase-Inhibitor Cocktail III	Invitrogen
Precision Plus Protein Dual Color	Bio-Rad
PrestoBlue® Zellvitalitätsfarbstoff	Invitrogen
Protease-Inhibitor Cocktail I	Invitrogen
Puffer-Konzentrate A & K für Semi Dry Westernblot	Carl Roth
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QiaShredder Kit	Qiagen
RNase-free DNase set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

### 2.1.3 Standardsubstanzen für die LC-MS/MS

- O-LPA = Oleoyl-L- $\alpha$ -Lysophosphatidsäure Natriumsalz  
Sigma (L7260)  
Stammlösung: 500  $\mu\text{g/ml}$  in einem Gemisch aus 72 % Chloroform, 23 % Methanol und 5 % konzentrierter Essigsäure
- P-LPA = 1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glycerin-3-Phosphat-Natriumsalz  
Avanti Polar Lipids (237545)  
Stammlösung: 250  $\mu\text{g/ml}$  in einem Gemisch aus 56 % Chloroform, 53,5 % Methanol und 0,5 % konzentrierter Essigsäure)
- H-LPA = 1-(10Z-Heptadecenoyl)-sn-Glycerin-3-Phosphat-Ammoniumsalm  
Avanti Polar Lipids (LM-1701)  
10,49  $\mu\text{g/ml}$  Methanol (fertig gelöst)

## 2.1.4 Hergestellte Puffer und Lösungen

10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung	0,5 g in 5 ml in Wasser gelagert bei 4 °C für Wochen oder bei -20 °C für Monate
10%ige Natriumdodecylsulfat-Lösung	0,5 g in 5 ml Wasser
10fache TAE-Lösung für Agarosegele	48,4 g Tris 20 ml Na <sub>2</sub> EDTA (0,5 M) 11,42 ml Eisessig in 1 l destilliertem Wasser lösen.
Agarosegel	0,8 g Agarose in 100 ml 1x TAE aufkochen, 10 min abkühlen lassen und 7 µl Ethidiumbromid zugeben, Gel gießen.
Ringerlösung (Fluka #96724)	zwei Tabletten auf 500 ml
10fache TBS-Lösung	265 g NaCl 60 g TRIS Auf 5 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen, mit HCl auf pH 7,4 einstellen.
10fache PBS-Lösung	10 g KCl 10 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 400 g NaCl 46 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH-Wert 7,4
TBS-T-Lösung	250 ml Wasser 250 ml 10fache TBS-Lösung 2,5 ml Tween-20 Mischen und mit Wasser auf 2,5 l Volumen bringen.
Blockierlösung 5 % BSA in TBS-T	5 g Bovine Serum Albumin (Albumin Fraktion V; Carl Roth) in 100 ml TBS-T
Blockierlösung 5 %milk solution	5 g Magermilchpulver in 100 ml TBS-T siehe oben
Anoden Puffer	350 ml Wasser 100 ml Methanol 50 ml Pufferkonzentrat A (Roth)
Kathoden Puffer	350 ml Wasser 100 ml Methanol 50 ml Pufferkonzentrat K (Roth)
Ladepuffer (5fach) für SDS-PAGE	2,25 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8 5 ml Glycerin 0,5 g 10 %SDS 5 mg Bromophenolblau 2,5 ml 1 M DTT-Lösung

Ponseau S Färbelösung	1 g Ponseau S in 500 ml 3%iger Trichloressigsäure
RIPA-Zellysepuffer (Protease-und Phosphatase Inhibitoren von SIGMA zusätzlich 1 µl auf 100 µl direkt vor der Verwendung zugeben.)	1 %(v/v) Tergitol 150 mM NaCl 20 mM Tris/HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA 10 mM NaF 1 mM ZnCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM NaVO <sub>4</sub> 10 % (v/v) Glycerin
Gelelektrophorese-Laufpuffer (10fache Lösung)	30,3 g Tris-Base 144,0 g Glycin 10,0 g SDS Auf 1 l mit Wasser auffüllen.
Gelelektrophorese-Laufpuffer	100 ml 10facher Laufpuffer auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen.
Trenngelpuffer (3 M Tris/HCl, pH 8,8)	363,4 g Tris in 100 ml Wasser, pH-Wert auf 8,8 mit HCl titrieren bei -20 °C lagern.
Sammelgelpuffer (0,47 M Tris-HCl, pH 6,7)	5,69 g Tris in 100 ml Wasser, pH- Wert auf 6,7 mit HCl titrieren bei - 20 °C lagern.
<i>Stripping</i> -Puffer	7,5 g Glycin, 0,5 g SDS, 5 ml Tween 20 in 500 ml dest. Wasser, pH 2,2
LB-Medium	LB Bouillon (SIGMA #L3022: 10 g/l Tryptone, 5 g/l Hefe- Extrakt, 5 g/l NaCl) 20 g in 1 l destilliertem Wasser 15 min bei 120°C autoklavieren
SOB-Medium für Bakterientransfektionen	LB Medium pH 7 10 ml sterilfiltriertes MgCl <sub>2</sub> (1 M)
LB-Agar	500 ml LB-Medium 7,5 g Agar-Agar Antibiotika nach Angabe

## 2.1.5 Verwendete Primer für Real-Time-PCR

ACTB ( $\beta$ -Actin)	QT01680476
CHKA (Cholin Kinase- $\alpha$ )	QT00013405
CHKB (Cholin Kinase- $\beta$ )	QT00218435
GPAM (GPAT1)	QT01668408
GPAT2	QT01668135
AGPAT9 (GPAT3)	QT00016870
AGPAT6 (GPAT4)	QT00042847
ITGA5	QT00080871
ITGA1	QT00093723
ITGA2	QT00086695
ITGB1	QT00068124
PCNA	QT00024633
PKCA	QT00095746
RPL37A	QT00051758

## 2.2 Biologisches Material

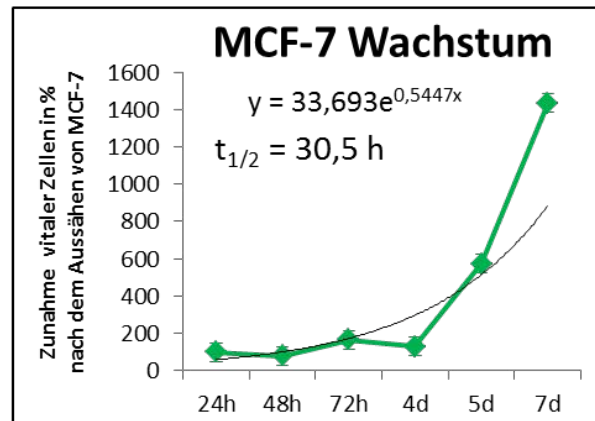
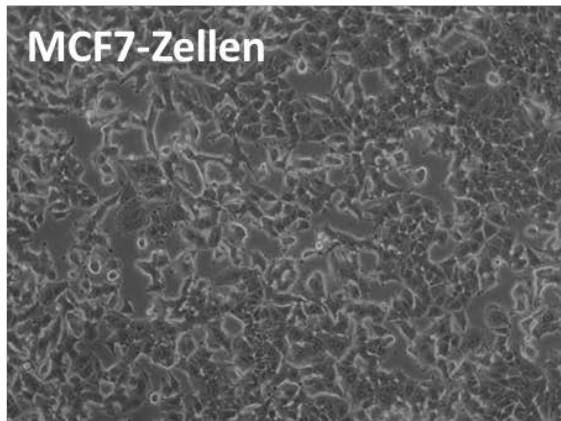
### 2.2.1 Zell-Linien

#### MCF7-Zellen

MCF7 ist eine nicht invasive, Östrogen-abhängige, HER2 positive, EGFR-negative, epitheliale Brustkrebszell-Linie und wurde von der Organisation *American Type Culture Collection* (ATCC) erhalten und authentifiziert. Die MCF7-Zell-Linie mit einer Verdopplungszeit von 48 h wächst in Monolayer und hat ein pflastersteinartiges Aussehen in konfluenter Kultur. MCF7-Zellen wurden kultiviert bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in DMEM-Medium (4,5 g Glucose/l, PAN P04-04500) mit folgenden Zusätzen:

10 %	Hitze-inaktiviertes FCS	<i>Sera Plus</i>
1 %	Pen/Strep	PAN P06-07100
1%	Natriumpyruvat	GIBCO (100 mM) 11360
0,1 %	MEM NEAA	GIBCO 100x 11140
0,1 %	Gentamycin	GIBCO 10 mg/ml 15710
0,1 %	Insulin	PAN 10 mg/ml P07-04100.

Für Transfektionen wurden die Zellen in Antibiotika-freiem Medium geerntet und replattiert mit durchschnittlich 88 % Vitalität (Zellen einer Größe von 7-12  $\mu\text{m}$  wurden als lebende Zellen gezählt). Die konfluente Kultur wurde alle 5 Tage 1:3 unter Verwendung von Trypsin gesplittet. Die mittlere Generationszeit unter diesen Kulturbedingungen betrug 30 h und wurde aus der exponentiellen Wachstumskurve ( $2t = t_1 \cdot e^{kt}$ ), deren Gleichung im unten stehenden Diagramm angegeben ist, nach der Formel  $t_{1/2} = \ln 2/k$  ermittelt.

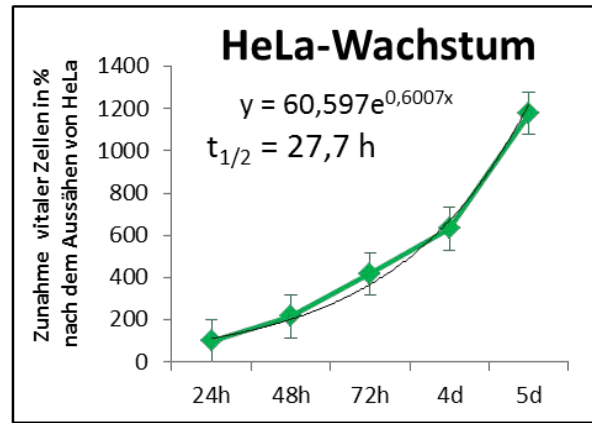
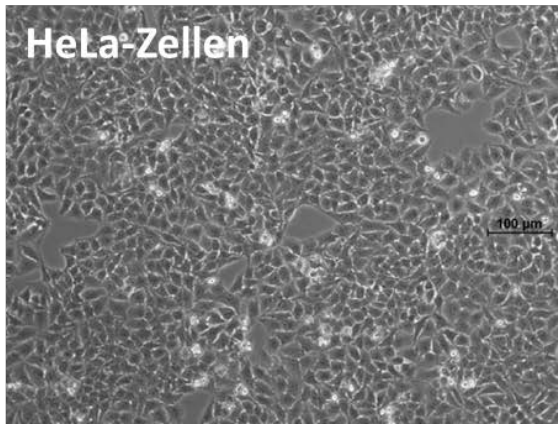


### HeLa-Zellen

HeLa ist eine invasive epitheliale Adenocarcinoma-Zelllinie und wurde als ATCC-HeLa authentifiziert. HeLa wachsen in Monolayer und haben ein pflastersteinartiges Aussehen in konfluenter Kultur. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in DMEM-Medium (4,5 g Glucose/l (PAN P04-04500) mit folgenden Zusätzen:

10 %	Hitze-inaktiviertes FCS	Sera Plus
1 %	Pen/Strep	PAN P06-07100.

Für Transfektionen wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin in Antibiotika-freiem Medium geerntet und replattiert mit durchschnittlich 92 % Vitalität (Zellen einer Größe von 7-11,5  $\mu\text{m}$  wurden als lebende Zellen gezählt). Die konfluente Kultur wurde alle drei Tage 1:10 gesplittet. Die mittlere Generationszeit unter diesen Kulturbedingungen betrug 24,5 h und wurde aus der exponentiellen Wachstumskurve ( $2t = t_1 \cdot e^{kt}$ ), deren Gleichung im unten stehenden Diagramm angegeben ist, nach der Formel  $t_{1/2} = \ln 2/k$  ermittelt.

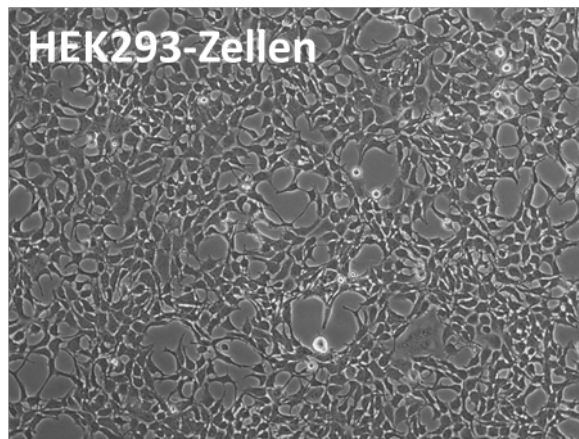


### HEK293-Zellen

HEK293 (*human embryonic kidney-293*) ist ein Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Abschnitten des Adenovirus 5. Sie ähneln Fibroblasten und wurden von ATCC (ATCC®CRL-1573™) erhalten. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM (4,5 g Glucose/l) mit folgenden Zusätzen:

10 %	Hitze-inaktiviertes FCS	Sera Plus
1 %	Pen/Strep	PAN P06-07100.

Für Transfektionen wurden die Zellen in Antibiotika-freiem Medium geerntet und replattiert mit durchschnittlich 96 % Vitalität (Zellen einer Größe von 710 µm wurden als lebende Zellen gezählt). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 24-30 h. HEK293-Zellen wachsen im Monolayer. Die konfluente Kultur wurde alle drei Tage 1:5 gesplittet durch Waschen mit PBS, Überspülen mit Trypsin und sanftem Suspendieren in frischem Medium.





## 2.2.2 Weiteres biologisches Material

### 2.2.2.1 siRNA-Oligos

Alle verwendeten siRNAs binden spezifisch an die jeweilige Ziel-mRNA und sind in den cDNA Sequenzen von CHKA, GPAM und EDI3 (GPCPD5) farbig markiert (siehe Anhang A1).

**Tab. 2.1: verwendete siRNA von Invitrogen aus der Serie „Stealth Select RNAi“**

wurden für die Knockdown-Experimente online bestellt:

<http://www.lifetechnologies.com/>

Bezeichnung	siRNA Produkt	Lot-Nummer	Bestellnummer
CHKA-A	CHKAHSS140690 Stealth™ RNAi	165419E05	Cat. # 1299001 [HSS140690]
CHKA-B	CHKAHSS140691 Stealth™ RNAi	165419E08 264114B09	Cat. # 1299001 [HSS140691]
CHKA-C	CHKAHSS141030 Stealth™ RNAi	165419E10	Cat. # 1299001 [HSS141030]
GPAM-A	GPAMHSS126649 Stealth™ RNAi	165419D12	Cat. # 1299001 [HSS126649]
GPAM-B	GPAMHSS126650 Stealth™ RNAi	165419E02 264114B07 271384E02	Cat. # 1299001 [HSS126650]
GPAM-C	GPAMHSS126651 Stealth™ RNAi	165419E04	Cat. # 1299001 [HSS126651]
EDI3-A	RP51022P6.2HSS125509 Stealth™ RNAi	134107D09	Cat. # 1299001 [HSS125509]
EDI3-B	RP51022P6.2HSS125510 Stealth™ RNAi	134107D11 267895B07	Cat. # 1299001 [HSS125510]
EDI3-C	RP51022P6.2HSS183474 Stealth™ RNAi	134107E01	Cat. # 1299001 [HSS183474]
Scr med	Stealth RNAi™ siRNA Negative Control, Med GC	1082140	[12935-300]
Scr med#2	Stealth RNAi™ siRNA Negative Control, Med GC #2	1138306	[12935-110]
Scr low	Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Low GC	1124422	[12935-200]
Scr low#2	Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Low GC Duplex #2	721118 1157019	[12935-110]

**Tab. 2.2: verwendete siRNA von Ambion aus der Serie „Silencer® Select siRNA“**  
wurden für die Knockdown-Experimente online bestellt:  
<http://www.lifetechnologies.com/>

Bezeichnung	Produkt	Lot-Nummer	Bestellnummer
NEG	Silencer®-Select Negative Control No. 1 siRNA	AS00PTIY	[4390844]
CHKA-E	Silencer®-Select validated CHKA siRNA	ASO0R68U ASO0YQIC	[4390824-s3008]
CHKA-F	Silencer®-Select pre designed CHKA siRNA	ASO0R9E7	[4392420-s3009]
EDI3-D	Silencer®-Select pre designed GPCPD1 siRNA	ASO0R6KE	[4392420-s32104]
EDI3-E	Silencer®-Select pre designed GPCPD1 siRNA	ASO0R6KF ASO0YQIE	[4392420-s32105]
EDI3-F	Silencer®-Select pre designed GPCPD1 siRNA	ASO0R6KF	[4392420-s32106]
GPAM-D	Silencer®-Select validated GPAM siRNA	ASO0R68R	[4390824-s33575]
GPAM-E	Silencer®-Select validated GPAM siRNA	ASO0R68V ASO0YQID	[4390824-s224483]
GPAM-F	Silencer®-Select validated GPAM siRNA	ASO0R68W	[4390824-s224484]

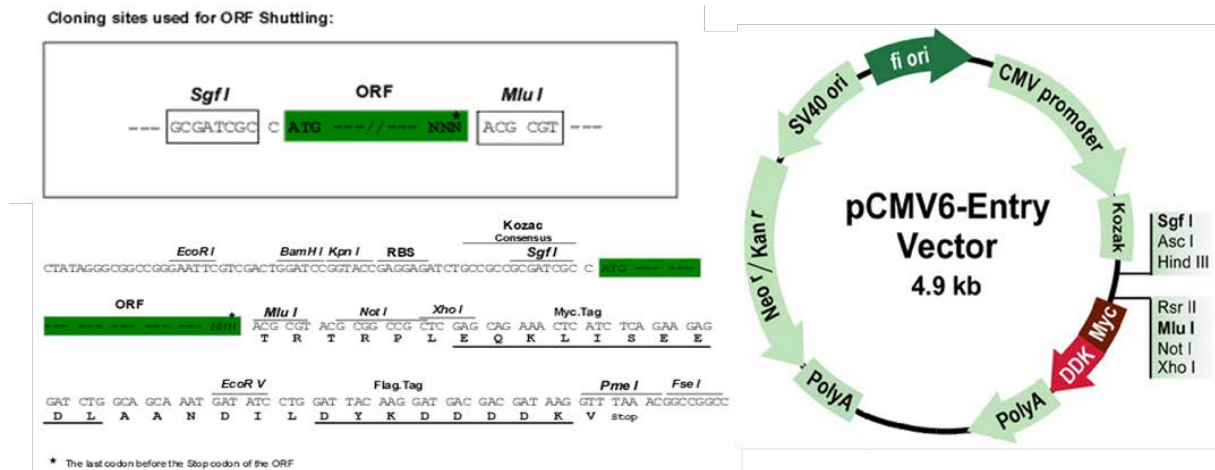
### 2.2.2.2 Vektoren

Ein Vektor ist ein Transportvehikel zur Übertragung einer Fremd-Nukleinsäure (hier cDNA der Gene GPAM und CHKA) in eine lebende Empfängerzelle durch Transfektion wie MCF7- oder HEK293-Zellen.

Die Vektoren zur transienten Überexpression wurden bei OriGene bestellt und entsprechen dem Kontrollvektor „pCMV6-Entry“ (ORIGENE-AMSBio #PS100001) erweitert durch die humane cDNA Sequenz für GPAM und CHKA2 im *Open reading frame* (ORF; Grün unterlegt in der unten stehenden Abbildung). Der pCMV6 Vektor wurde aus dem bakteriellen Cole1 Plasmid hergestellt und enthält, wie viele andere moderne Vektoren, die Sequenz des f1-Phagen ( $f_1$  Ori). Der Vektor verfügt über eine Kanamycin-Antibiotikaresistenz unter Kontrolle des SV40-Promotors zur Selektion der mit dem Vektor transduzierten Bakterien im Vermehrungsprozess. Der Cytomegalovirus-Promotor (CMV-Promotor) und die Kozak-Sequenz sind nötig für die Initialisierung der Transkription der cDNA von GPAM und CHKA2. Die Kozak-Sequenz ist die Nukleinbasen-Sequenz in der Messenger-RNA (mRNA) eukaryotischer Lebewesen. Sie stellt einen Konsens aus den am häufigsten vorkommenden Nukleinbasen in unmittelbarer Nähe des Startcodons AUG auf der mRNA dar. Die Kozak-Sequenz wird von den Ribosomen erkannt und übernimmt den Start der Translation. Der Myc-DDK-Tag ermöglicht die Detektion des cDNA-Produktes mit Antikörpern gegen das DDK-Peptid. PolyA enthält die Sequenz für

die Polyadenylierung des 3'-Endes der eukaryotischen mRNA. Dieser Poly(A)-Schwanz erleichtert den Export der mRNA in das Cytoplasma und schützt außerdem das 3'-Ende vor einem enzymatischen Abbau.

Über die Restriktionsschnittstellen SgfI und MluI wurden die cDNA-Sequenzen der Gene GPAM und CHKA2 von der Firma OriGene in den ORF des pCMV6 entry Vektors kloniert. Die Gene sind unter Kontrolle des CMV-Promotors und werden mit DDK-Tag und Poly-A-Schwanz translatiert.



**Abb. 2.1: Darstellung des pCMV6 entry Vector von ORIGENE-AMSBio #PS100001**

Graphische Darstellung des *pCMV6-entry*-Vectors mit den funktionellen Einheiten grün unterlegt: *open reading frame* (ORF), ein grauer Überstrich gibt die Restriktionsschnittstellen für Klonierungen an, schwarz unterstrichen sind verfügbare TAGs (kurze Peptide zur Detektion des Vektorproduktes).

## MATERIAL UND METHODEN

---

Die durch die Vektoren exprimierten Proteine sind im Folgenden dargestellt. Von der GPAM existieren zwei Varianten mRNA: NM\_001244949.1 und NM\_020918.5. Beide Transkriptvarianten von GPAM codieren exakt das gleiche, 862 Aminosäuren (aa) lange Produkt (NP\_065969.3 unten stehend) - das GPAM-Protein.

```
Referenzsequenz Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase-1: NP_065969.3; 828 aa
MDESALTTLGTIDVSYLPHSSEYSVGRCKHTSEEWGECEGFRPTIFRSATLKWKESLMSRKRPFVGRCCYSC
TPQSWDKFFNPSIPSLGLRNVIYINETHTRHRGWLARRLSYVLFIQERDVHKGMFATNVTENVLNSRVQ
EAIAEVAEALNPDGSAQQQSKAVNKVKKKAKRILQEMVATVSPAMIRLTGWVLLKLFNSFFWNIQIHKGQ
LEMVKAATETNLPLFLPVHRSHIDYLLLTFFILFCHNIKAPYIASGNNLNIPFSTLIHKLGFFIRRRRL
DETPDGRKDVLYRALLHGHIVELLRQQQFLEIFLEGTRSRSGKTSCARAGLLSVVVDTLSTNVIPDILII
PVGISYDRIIEGHYNGEQLGKPKKNESSLWSVARGVIRMLRKNYGCVRVDFAQPFFSLKEYLESQSQKPVSA
LLSLEQALLPAILPSRPSDAADEGRDTSINESRNATDESLRRRLIANLAEHILFTASKSCAIMSTHIVAC
LLLYRHRQGIDLSTLVEDFFVMKEEVLARDFDLGFSGNSEDEVVMHAIQLLGNCVTITHTSRNDEFFITPS
TTVPSVFELNFYSNGVLHVFIIMEAIIACSLYAVLNKRGLGGPTSTPPNLI SQEQLVRKAASLCYLLSNEG
TISLPCQTFYQVCHETVGKFIQYGILTVAEHDDQEDISPSLAEQQWDKKLPEPLSWRSDEEDEDSDFGEE
QRDCYLKVSQSKEHQFIFTLQRLGPLEAYSSAAIFVHNFSGPVPEPEYLQKLHKYLI TRTERNVAVY
AESATYCLVKNVAVKMFKDIGVFKETKQKRVSVLELSSTFLPQCNRQKLLEYILSFVVV
```

Translatiert man die im Vektor enthaltene cDNA, so fallen zwei Abweichungen zur Referenz-Proteinsequenz auf; diese sind im unten aufgeführten Produkt blau markiert. Die veränderten Aminosäuren befinden sich nicht in der katalytischen Domäne des Proteins [Heath et al., 1998, Dircks et al., 1999, Coleman et al., 2004, Beigneux et al., 2006, Cao et al., 2006, Xu et al., 2006, Gimeno et al., 2008, Nagle et al., 2008].

GPAM+DDK-Tag: translatierte GPAM -cDNA von Vector RC205509 [AMSBio], 862aa basierend auf NM\_020918.2

```
MDEYALTLGTIDVSYLPHSSEYSVGRCKHTSEEWGECEGFRPTIFRSATLKWKESLMSRKRPFVGRCCYSC
TPQSWDKFFNTSIPSLGLRNVIYINETHTRHRGWLARRLSYVLFIQERDVHKGMFATNVTENVLNSRVQ
EAIAEVAEALNPDGSAQQQSKAVNKVKKKAKRILQEMVATVSPAMIRLTGWVLLKLFNSFFWNIQIHKGQ
LEMVKAATETNLPLFLPVHRSHIDYLLLTFFILFCHNIKAPYIASGNNLNIPFSTLIHKLGFFIRRRRL
DETPDGRKDVLYRALLHGHIVELLRQQQFLEIFLEGTRSRSGKTSCARAGLLSVVVDTLSTNVIPDILII
PVGISYDRIIEGHYNGEQLGKPKKNESSLWSVARGVIRMLRKNYGCVRVDFAQPFFSLKEYLESQSQKPVSA
LLSLEQALLPAILPSRPSDAADEGRDTSINESRNATDESLRRRLIANLAEHILFTASKSCAIMSTHIVAC
LLLYRHRQGIDLSTLVEDFFVMKEEVLARDFDLGFSGNSEDEVVMHAIQLLGNCVTITHTSRNDEFFITPS
TTVPSVFELNFYSNGVLHVFIIMEAIIACSLYAVLNKRGLGGPTSTPPNLI SQEQLVRKAASLCYLLSNEG
TISLPCQTFYQVCHETVGKFIQYGILTVAEHDDQEDISPSLAEQQWDKKLPEPLSWRSDEEDEDSDFGEE
QRDCYLKVSQSKEHQFIFTLQRLGPLEAYSSAAIFVHNFSGPVPEPEYLQKLHKYLI TRTERNVAVY
AESATYCLVKNVAVKMFKDIGVFKETKQKRVSVLELSSTFLPQCNRQKLLEYILSFVVVTRTRPLEQKLIS
EEDLAANDILDYKDDDDK
```

Rot = DDK-Tag

Blau = Abweichung zur aktuellen Referenzsequenz NP\_065969.3

Für Cholin kinase-alpha (CHKA) existieren durch alternatives Splicing zwei verschiedene mRNAs. Die Translation ergibt zwei CHKA-Proteine (CHKA1 und CHKA2), die sich durch das alternative Splicen eines Introns geringfügig in der Länge des gebildeten Proteins unterscheiden, aber denselben N- und C-Terminus haben. Cholin kinase- $\alpha$ 1 (NM\_001277.2) codiert die längere Isoform-a; (NP\_001268.2; 52 kDa), während Cholin kinase- $\alpha$ 2 (NM\_212469.1) die Isoform-b (NP\_997634.1;

50 kDa) codiert. Die für die Substratbindung und für die enzymatische Funktion von Cholin kinase wichtigen Aminosäuren [Malito et al., 2006, Hong et al., 2010] sind fett schwarz gedruckt. Abweichungen der cDNA in den Vektoren (blau markiert) betreffen nicht funktionell wichtige Aminosäuren. Nach heutigem Wissensstand gibt es keine Unterschiede in der enzymatischen Aktivität der beiden CHKA-Isoformen.

Referenzsequenz Cholinekinase-alpha Isoform-a: NP\_001268.2; 457aa  
 MKTKFCTGGEAEPSPLGLLLSCGSGSAAPAGVGGQQRDAASDLESKQLGGQQPPLALPPPPPLPLPLPLP  
 QPPPPQPPADEQPEPRTRRRAYLWCKEFLPGAWRGLREDEFHISVIRGGLSNMLFQC SLPDTTATLGDEP  
 RKVLLRLYGAILQMRSCKEGSEQAQKENEFGAEAMVLESVMFAILAERSLGP KLYGIFPQGRLEQFIP  
 SRRLDTEELSLPDISAEIAEKMATFHGMKMPFNKEPKWLFGTMEKYLKEVLR IKFTEESRIKKLHKLLSY  
 NLPLELENLRSLLESTPSVVF**FCHNDCQEGN**ILLLEGRENSEK**QKLMLIDFEYSSNYR**GFD**IGNHFCEW**  
 MYDYSYEKYPFFRANIRK**YPTKKQQLHF**ISSYLPAFQND FENLSTEEKSIIKEEMLLEVNRFALASHFLW  
 GLWSIVQAKISSIEFGYMDYAQARFDAYFHQKRKLGV

Cholin kinase- $\alpha$ 1+DDK-Tag: translatierte CHKA-cDNA von Vector RC219747 [AMSBio]; basierenbd auf NM\_001277; 491aa

MKTKFCTGGEAEPSPLGLLLSCGSGSAAPAGVGGQQRDAASDLESKQLGGQQPPLALPPPPPLPLPLPLP  
 QPPPPQPPADEQPEPRTRRRAYLWCKEFLPGAWRGLREDEFHISVIRGGLSNMLFQC SLPDTTATLGDEP  
 RKVLLRLYGAILQMRSCKEGSEQAQKENEFGAEAMVLESVMFAILAERSLGP KLYGIFPQGRLEQFIP  
 SRRLDTEELSLPDISAEIAEKMATFHGMKMPFNKEPKWLFGTMEKYLKEVLR IKFTEESRIKKLHKLLSY  
 NLPLELENLRSLLESTPSVVF**FCHNDCQEGN**ILLLEGRENSEK**QKLMLIDFEYSSNYR**GFD**IGNHFCEW**  
 MYDYSYEKYPFFRANIRK**YPTKKQQLHF**ISSYLPAFQND FENLSTEEKSIIKEEMLLEVNRFALASHFLW  
 GLWSIVQAKISSIEFGYMDYAQARFDAYFHQKRKLGV**TRTRPLEQKLI SEEDLAANDILDYKDDDDK**

Rot=DDK-Tag

Referenzsequenz Cholinekinase-alpha Isoform-b: NP\_997634.1; 439aa  
 MKTKFCTGGEAEPSPLGLLLSCGSGSAAPAGVGGQQRDAASDLESKQLGGQQPPLALPPPPPLPLPLPLP  
 QPPPPQPPADEQPEPRTRRRAYLWCKEFLPGAWRGLREDEFHISVIRGGLSNMLFQC SLPDTTATLGDEP  
 RKVLLRLYGAILQMGAEAMVLESVMFAILAERSLGP KLYGIFPQGRLEQFIPSRRLDTEELSLPDISAEI  
 AEKMATFHGMKMPFNKEPKWLFGTMEKYLKEVLR IKFTEESRIKKLHKLLSYNLPLELENLRSLLESTPS  
 PVVF**FCHNDCQEGN**ILLLEGRENSEK**QKLMLIDFEYSSNYR**GFD**IGNHFCEW**MYDYSYEKYPFFRANIRK  
**YPTKKQQLHF**ISSYLPAFQND FENLSTEEKSIIKEEMLLEVNRFALASHFLWGLWSIVQAKISSIEFGYM  
 DYAQARFDAYFHQKRKLGV

Cholin kinase- $\alpha$ 2+DDK-Tag: translatierte CHKA-cDNA von Vector RC207209 [AMSBio], basierenbd auf NM\_212469; 473aa

MKTKFCTGGEAEPSPLGLLLSCGSGSAAPAGVGGQQRDAASDLESKQLGGQQPPLALPPPPPLPLPLPLP  
 QPPPPQPPADEQPEPRTRRRAYLWCKEFLPGAWRGLREDEFHISVIRGGLSNMLFQC SLPDTTATLGDEP  
 RKVLLRLYGAILQ**V**GAEAMVLESVMFAILAERSLGP KLYGIFPQGRLEQFIPSRRLDTEEL**G**LPDISAEI  
 AEKMATFHGMKMPFNKEPKWLFGTMEKYLKEVLR IKFTEESRIKKLHKLLSYNLPLELENLRSLLESTPS  
 PVVF**FCHNDCQEGN**ILLLEGRENSEK**QKLMLIDFEYSSNYR**GFD**IGNHFCEW**MYDYSYEKYPFFRANIRK  
**YPTKKQQLHF**ISSYLPAFQND FENLSTEEKSIIKEEMLLEVNRFALASHFLW**Q**WSIVQAKISSIEFGYM  
 DYAQARFDAYFHQKRKLGV**TRTRPLEQKLI SEEDLAANDILDYKDDDDK**

Rot=DDK-Tag

Blau = Abweichung zur aktuellen Referenzsequenz NP\_997634.1

### 2.2.2.3 Antikörper

Anti-Calnexin aus dem Kaninchen Cell Signaling #2433

Anti-CHKA aus der Maus, Abcam #ab88053

Anti-CHKA MaxPab mouse polyclonal antibody B01, Abnova #H00001119-B01

Anti-CHKA aus der Maus, Sigma #SAB1405616

Anti-GPAM für WB aus der Maus, Abcam #68295

Anti-GPAM für IHC aus dem Kaninchen, Life Span Bioscience (LSBIO) #LS-B2734

Anti-GPCPD1 (EDI3) aus der Maus, hergestellt im Auftrag unserer Arbeitsgruppe durch AMSBio #clone 3B8G3

Anti-Mitofusin 2 aus der Maus, Abcam #ab56889

Anti-PCNA aus der Maus, Cell Signaling #2586

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Kultivieren, Einfrieren und Wiederbeleben von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien sind authentifiziert, Mykoplasmen-frei und ihre Morphologie wurde regelmäßig mikroskopisch überprüft. Alle Zelllinien wurden bei 37 ° und 5 % CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre steril kultiviert. Die fortlaufend nummerierte Subkultivierung erfolgte wie bei den jeweiligen Zelllinien angegeben, bis zur Subkultur 15.

Für Transfektionsexperimente mit Vektoren oder siRNA wurden Antibiotika-freie Medien verwendet. Die genaue Zellzahl für die jeweiligen Experimente wurde mit dem Zellzählgerät CASY TT<sup>®</sup> ermittelt.

Für die Lagerung von Zellen wurde eine nicht ganz konfluente Subkultur mit Hilfe von Trypsin geerntet, bei maximal 200 g abzentrifugiert und in Medium ohne Antibiotika resuspendiert, das aber zusätzlich mit 10 % FCS (insgesamt 20 %) und mit 10 % DMSO versetzt wurde. Es wurden jeweils 1 ml mit 1-2 Millionen Zellen in speziellen Cryo-Gefäßen langsam zunächst auf -80 °C gebracht und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Wiederbeleben wurden die Zellen schnell im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in 50 ml Medium gegeben. Nach Zentrifugieren bei 200 g für 5 min wurden die Zellen in 8-15 ml Medium suspendiert und kultiviert.

### 2.3.2 Zellwachstumsanalysen

Die Analyse des Zellwachstums erfolgte mittels Wachstumskurven. Dazu wurden 15000 MCF7-Zellen je  $\text{cm}^2$  in 24-Well-Format (30000 Zellen je Well) oder 8000 HeLa-Zellen je  $\text{cm}^2$  (15000 Zellen je Well) ausgesät und nach den gegebenen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h, 4 d und 5 d) gewaschen, mit 200  $\mu\text{l}$  Trypsin geerntet und in 800  $\mu\text{l}$  Medium aufgenommen. Die Gesamtzellzahl je Milliliter entspricht der Gesamtzellzahl je Well und wurde von drei technischen Replikaten je Zeitpunkt mit dem CASY®-Zellzählgerät ermittelt. Dabei wurden alle MCF7-Zellen, die größer als 12,4  $\mu\text{m}$  sind, als vitale Zellen gezählt. Der Zellschrott hat eine Größe kleiner 7  $\mu\text{m}$  und wurde von der Analyse ausgeschlossen. Alle Zellen einer Größe von 7-12,4  $\mu\text{m}$  wurden als tote MCF7-Zellen gezählt (7-11,5  $\mu\text{m}$  bei HeLa Zellen).

### 2.3.3 Vitalitätskontrolle der Zellen

Die Zellvitalitätskontrolle für alle durchgeführten Experimente erfolgte mit dem CASY TT®-Zellzählgerät. Das Messprinzip beruht auf einer Kombination von Partikelzählung und Widerstandsbestimmung. Der Widerstand intakter Zellen ist proportional zu ihrer Größe. Lebendzellzahlen werden vom CASY TT® mit Größenverteilung angegeben, tote Zellen über die Zellkerne detektiert. Dazu wurde das Gerät entsprechend für jede Zelllinie auf das Zellgrößenspektrum programmiert, wodurch auch eine Bestimmung der Zellvitalität möglich war. Die Zellvitalität geernteter Zellen betrug immer mindestens 85%. (für MCF7-Zellen: tote oder sterbende MCF7-Zellen = 7-12,4  $\mu\text{m}$ ; vitale MCF7-Zellen und Zelladukte = 12,4  $\mu\text{m}$  oder größer; mittlere MCF7-Zellgröße = 18  $\mu\text{m}$ ; für HEK293-Zellen: tote oder sterbende HEK293 = 7-10  $\mu\text{m}$ ; vitale HEK293 und Zelladukte = 10  $\mu\text{m}$  oder größer; für HeLa-Zellen: tote oder sterbende HeLa Zellen = 7-11,5  $\mu\text{m}$ ; vitale HeLa-Zellen und Zelladukte = 11,5  $\mu\text{m}$  oder größer).

Weitere Vitalitätsbestimmungen wurden mit dem Reagenz PrestoBlue® von Invitrogen durchgeführt. PrestoBlue® ist ein Farbstoff, der von lebenden Zellen aufgenommen und metabolisch aktiviert wird, wodurch sich die Absorptions- und Emissionswellenlängen verschieben. Die Veränderung der Emission bei 600 nm ist proportional zur Anzahl vitaler Zellen im Well. Zur Analyse des Einflusses der siRNA-Transfektionen auf die Zellvitalität wurden die Zellen von zwei Wells (6-Well-Format) 72 h nach der Transfektion gewaschen, mit jeweils 0,5 ml Trypsin geerntet und in 1,5 ml Medium suspendiert, so dass 4 ml Zellsuspension erhalten wurden. Die Gesamtzellzahl in Zellsuspensionen wurden bestimmt und 25000

MCF7-Zellen in 90 µl Medium in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h Kultivierung wurden 10 µl PrestoBlue® zugegeben. Die Platte wurde sofort lichtdicht verschlossen und nach einer Stunde die rote Fluoreszenz im Plattenlesegerät bestimmt. Dazu wurde mittels Licht einer Wellenlänge von 570 nm angeregt und bei 600 nm die Emission bestimmt. Jeder Messwert besteht aus acht technischen Replikaten.

### 2.3.4 Analyse von RNA

Zur Analyse von Genexpressionen mit *Real-Time*-PCR wurde zunächst auf unten beschriebene Weise die RNA aus den Kulturen isoliert und quantifiziert. Die mRNA wurde anschließend in DNA – so genannte cDNA – umgeschrieben und konnte in der *Real-Time*-PCR eingesetzt werden.

#### 2.3.4.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem *QiaShredder*- und dem *RNAeasy Mini-Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben. Zusätzlich wurde ein DNase-Verdau mit dem *RNase-free DNase Set* von Qiagen durchgeführt, um für die *Real-Time*-PCR vollständig DNA-freie mRNA zu erhalten. Die RNA wurde in 30 µl Wasser gelöst und die Konzentration mit Hilfe des Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) anhand der Absorption der Probe bei 160 nm bestimmt ( $OD_{260}$ ). Neben der Konzentration der RNA wurde auch auf Proteinkontamination kontrolliert. Eine  $OD_{260}/OD_{280} < 1,8$  deutet auf Verunreinigung mit Proteinen hin [LabFAQS Seite 9]. Bei einem Absorptionsverhältnis von  $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8 \leq 2,0$  ist die Nukleinsäurelösung rein und wurde für weitere Analysen verwendet.

#### 2.3.4.2 Reverse Transkription

Die cDNA wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Reagenziengemisches für die Reverse Transkription hergestellt (Applied Biosystems: *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*). Durch Einsatz zufälliger Primer, so genannte Random-Primer, amplifiziert die Reverse Transkriptase nahezu alle mRNA-Transkripte der Zelle. Jeder 10 µl Reaktionsansatz, bestehend aus 2 µl 10fachem RT-Puffer, 2 µl 10facher RT-Random-Primer-Lösung, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 0,8 µl 25fach konzentrierter dNTP-Lösung und 4,2 ml H<sub>2</sub>O, wurde mit 2 µg cDNA in 10 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte bei 37°C, wie in der Tabelle 2.3. angegeben.



Die dadurch entstandene cDNA wurde auf 200 µl mit Wasser verdünnt und in der *Real-Time-PCR* verwendet.

**Tab. 2.3: Bedingung für die cDNA-Synthese**

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
<b>Temperatur</b>	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
<b>Zeit</b>	10 min	120 min	5 min	∞

### 2.3.4.3 Semi-Quantitative *Real-Time-PCR*

Mit *Real-Time-PCR* werden Expressionsanalysen durch Quantifizierung einer bestimmten RNA im Verhältnis zu einer Referenz mRNA durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde in dieser Arbeit mit dem fluoreszierenden, in die DNA interkalierenden Farbstoff SYBR Green (*QuantiFast® SYBR Green PCR Kit* von Qiagen) verfolgt. Dabei nimmt die Fluoreszenz während des PCR-Reaktionsverlaufes proportional zur Menge an gebildeter DNA zu [Higuchi et al., 1993, Navarro et al., 2015]. Schmelzkurven-Analysen belegten die spezifische Amplifikation eines Genproduktes je Reaktion. Die *Real-Time-PCR* wurde mit dem *ABI 7500 PCR-System* von Applied Biosystems in *microAMP* optischen Platten im 96-Well-Format (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Primer wurden als Gemische aus *forward* und *reverse* Primer bei Qiagen bestellt. Die Reaktionsmischung enthielt folgende Komponenten: 5 µl cDNA (50 ng), 12,5 µl SYBR-Reaktionsmischung, 2,5 µl Primermischung und 5 µl H<sub>2</sub>O. Für die Amplifikation wurde zur Aktivierung der Polymerase zunächst auf 50 °C für 2 min und auf 95 °C für 15 min geheizt, gefolgt von der eigentlichen Kettenreaktion: 40 Zyklen von 94 °C für 15 sec zur Denaturierung doppelsträngiger Nukleinsäuren, 55 °C für 30 sec für das Anlagern der Primer und 72 °C für 35 sec für die Polymerasereaktion. Nach der Amplifikation wurde zur Aufnahme der Schmelzkurve langsam kontinuierlich auf 95 °C geheizt und auf 60 °C abgekühlt.

Für jede Probe wurden die *Real-Time-PCR* der untersuchten Gene und der Kontroll-mRNA (Actin, wenn nicht anders angegeben) in Triplikaten durchgeführt und die relative Expression aus den Mittelwerten der C<sub>T</sub>-Werte nach der unten stehenden Formel ermittelt. Messungen, bei denen die C<sub>T</sub>-Werte einer Probe um mehr als 0,3 Zyklen abweichen, wurden wiederholt.

Der C<sub>T</sub>-Wert gibt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz der Probe erstmals die Intensität eines für alle Analysen konstanten Schwellenwertes erreicht.

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgene}} - C_{T \text{ Kontrollgen}}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ behandelt}} - \Delta C_{T \text{ unbehandelt (FM)}}$$

$$\text{relative Expression} = 2^{(-\Delta \Delta C_T)}$$

### 2.3.5 Analyse von Proteinen

Zur Analyse des Gehaltes an speziellen Proteinen wurden durch Lyse der Zellmembran mit dem RIPA-Lysepuffer zunächst Proteingemische aus den Zellen isoliert. Für GPAM wurden zusätzlich aus den Zellen Mitochondrien isoliert und lysiert. Alle zur Identifikation und Quantifizierung der untersuchten Proteine (EDI3, GPAM und CHKA) verwendeten Antikörper wurden auf ihre Spezifität geprüft. Dazu wurden kommerziell erhältliche rekombinante Proteine und Lysate von Zellen verwendet, die das jeweilige Protein überexprimieren.

#### 2.3.5.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Gewinnung von Gesamtzell-Lysaten wurden 1-2 Millionen Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und dann auf Eis zügig in 200 µl eiskalten RIPA Puffer geschabt, der zuvor mit Protease und Phosphatase Inhibitoren versetzt war (10 µl Inhibitormix von Sigma je 1 ml RIPA). Die Lysate wurden kräftig gemischt (dreimal 30 sec Vortexer) und anschließend bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Tisch-Zentrifuge 5415R Eppendorf). Der Protein enthaltende Überstand wurde in neue, vorgekühlte Reagiergefäße überführt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

#### 2.3.5.2 Herstellung von Mitochondrienlysaten

Zur Herstellung von Mitochondrienlysaten wurden zunächst intakte Mitochondrien aus fünf Millionen Zellen mit dem *Mitochondria isolation Kit* von MiltenylBiotec nach Herstellerangaben isoliert und anschließend mit RIPA-Puffer lysiert. Das Isolierungsprinzip basiert auf Antikörpern gegen Mitochondrien-spezifische Proteine, die an magnetische Körnchen gekoppelt sind. Die Zellemembranen wurden mit Ultraschall (US) vollständig aufgebrochen und die Mitochondrien mittels der magnetischen Antikörper markiert. Für den Ultraschallaufschluss wurden die Zellen in einem Milliliter Lysepuffer aufgenommen [MiltemylBiotec, versetzt mit je 10 µl Protease und Phosphatase Inhibitoren von Sigma: PI1, PhI2 und PhI3] und mit einer Ultraschallsonde [SONS Plus, Bandelin] in zwei Schritten aufgebrochen: zweimal 20 sec mit 2 sec US-Pulsen und 0,2 sec Pause zwischen den Pulsen; Amplitude 90 %. Die Kopplung der Mitochondrien mit einem magnetischen Antikörper erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Probe in ein magnetisches Feld gebracht, das die Mitochondrien dank der Kopplung an die magnetischen Antikörper fixiert. Andere Zellbestandteile wurden ausgewaschen und die Mitochondrien schließlich durch Entfernen der Probe aus dem magnetischen Feld isoliert. Die intakten Mitochondrien wurden durch Zentrifugation pelletiert und in

RIPA-Puffer aufgenommen, wodurch sie lysiert wurden. Nach Zentrifugation wurde der Gesamtproteingehalt des Überstandes bestimmt und eine definierte Menge des Lysats, wie das oben beschriebene Gesamtzell-Lysat, mittels PAGE aufgetrennt. GPAM und Proteine, die speziell in Mitochondrien exprimiert sind, wurden anschließend mit Immunoblot detektiert. Die im Lysat verbliebenen magnetischen Körnchen bleiben bei der PAGE außerhalb des Gels zurück.

### 2.3.5.3 Protein-Quantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels PAGE und Immunodetektion. Hierzu wurde zunächst der Proteingehalt der Gesamtzell-Lysate mit Hilfe des BCA-Proteinassay-Reagenzienset von Thermo Scientific bestimmt. Die BCA-Methode beruht darauf, dass die Peptidbindungen in den Proteinen mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in der Reagenzienmischung zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert werden. Diese  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen farbigen Komplex, dessen Absorption bei 562 nm proportional zur Proteinmenge im Lysat ist. Zur Quantifizierung der Proteinmengen wurden Standardkurven mit Serumalbumin angefertigt.

Zur Bestimmung der Proteinmenge in den Lysaten wurden 2  $\mu\text{l}$  Lysat mit 798  $\mu\text{l}$  Wasser verdünnt und 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenzmischung (Reagenz A:Reagenz B = 50:1) zugegeben und invertiert. Die Proben wurden dann unter anhaltenden sanften Schütteln 30 min bei 60 °C inkubiert und nach weiteren 10 min Inkubation bei Raumtemperatur im JASCO-Spektrometer die Absorption bei 562 nm gemessen.

### 2.3.5.4 Sortierung von Proteingemischen mit SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine Variante der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE), die zur Trennung von Proteinen nach ihren Größen dient. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde zum Denaturieren der Proteine zugesetzt. SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass die Trennung nur aufgrund der Größe erfolgt. Zweck der SDS-PAGE ist es, die aus den Zell-Lysaten gewonnenen Proteine zu trennen. Das Polyacrylamidgel, das in der SDS-PAGE verwendet wird, entsteht durch Polymerisation von Acrylamid mit dem quervernetzenden NN'-Methylenbisacrylamids in Gegenwart des Radikal-Starters Ammoniumperoxydisulfat (APS) und des Radikal-Stabilisators (TEMED) Tetramethyldiamin

Dem eigentlichen Trenngel (8-10%ig) ist ein niedriger konzentriertes Sammelgel (4%ig) vorgelagert. Nach dem Polymerisieren des Gels wurden gleiche Proteinmengen der Proben, versetzt mit Ladepuffer, parallel mit den Proteinmarkern *Magic Mark* (Invitrogen) oder *Precision Plus Protein Standard Dual Color* (BioRad)

aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde bei 15-20 mA/Gel zwei bis drei Stunden durchgeführt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran für die Immunodetektion übertragen (Western Blot).

### 2.3.5.5 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteinbanden, die durch die Trennung der Proteine im Gel entstanden sind, auf eine PVDF-Membran übertragen, fixiert und anschließend mittels Immunodetektion sichtbar gemacht.

#### 2.3.5.5.1 Membrantransfer

Zum Übertragen der Proteine aus dem Gel der PAGE auf eine Membran wurde hier das sogenannte *SemiDry*-Verfahren in Apparaturen verschiedener Hersteller verwendet. Dazu wurden 16 Blotpapiere auf die dem Gel entsprechende Größe des Trenngels zurechtgeschnitten; ebenso je ein Stück PVDF-Membran. 12 Blotpapiere wurden für 10 min in Anoden-Puffer equilibriert, 4 Blotpapiere in Kathoden-Puffer. Das die getrennten Proteine enthaltende Gel wurde in Kathodenpuffer equilibriert. Die Membran wurde durch Tauchen in Methanol aktiviert und in Anodenpuffer für eine Minute equilibriert.

Die 12 Anoden-Papiere, leicht ausgedrückt, wurden auf der Anode platziert. Darauf wurden ohne Luftblasen die folgenden Komponenten aufgebaut: Die Membran, das Gel und schließlich die 4 Kathoden-Papiere. Das System wurde durch Aufsetzen der Kathode geschlossen und die Proteine bei einer Stromdichte von 3,5 mA/cm<sup>2</sup> für 30-60 min übertragen. Die Proteine wurden anschließend mit *PonceauS*-Lösung gefärbt und fixiert. Vor der Immunodetektion wurde die Membran mit TBS-T wieder entfärbt.

#### 2.3.5.5.2 Immunodetektion

Bei der Immunodetektion wird das zu detektierende Protein von einem spezifischen Antikörper gebunden. Zur Detektion verwendet man einen zweiten Antikörper, der gegen die konstante Region des ersten Antikörpers gerichtet ist. An den zweiten Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, hier eine Peroxidase, die HRP. Die HRP katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Chemolumineszenz-Reaktion des Luminols.

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die PVDF-Membran zu verhindern, wurde diese zunächst vollständig mit Proteinen aus der so genannten Blockierlösung (5%iger BSA-Lösung oder 5%iger Magermilchlösung) bei 4°C über Nacht mit dem gewünschten Antikörper inkubiert, verdünnt nach Tabelle 2.4 in der jeweiligen Blockierlösung. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit

TBS-T gewaschen und für 2 h mit dem Zweitantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen dreimal 10 min in TBS-T wurde das Protein spezifisch mit Luminol detektiert. Dazu wurden 1,5 ml ECL-Lösung 1 und 1,5 ml ECL-Lösung 2 (Perkin Elmer) miteinander vermischt, der Blot damit vollständig benetzt und direkt fotografiert mit Hilfe des BLOT-IMAGER Vilber Fusion Fx7 (Vilber Lourmat). Densitometrische Analysen der Protein-Bandenstärke erfolgen mit der Software ImageJ.

### 2.3.5.5.3 Redetektion von Immunoblots (Strippen)

Von einem bereits detektierten Blot kann der Antikörper durch Waschen in Stripping-Puffer (30 min) von den Proteinen abgelöst werden. Nach Waschen mit TBS-T und erneutem Beladen mit Proteinen in Blockierlösung für 30 min kann ein anderes Protein wie im Abschnitt 2.3.5.5.2 angegeben erneut detektiert werden.

**Tab. 2.4: Liste der Antikörper mit Angaben zur Verwendung**

Erstantikörper gegen	Verdünnung	Hersteller und Bestellnummer	Zweitantikörper	Verdünnung	Hersteller	Größe
GPCPD1 (Clone3B8G3)	1:1000 in 5%iger Magermilchlösung	AMSBIO #Kundenbestellung	anti-mouse IgG	1:3000	Cell Signaling #7076	76 kDa
Calnexin	1:1000	Cell Signaling #2433	anti rabbit	1:1000	Cell Signaling #7074	90 kDa
PCNA	1:1000	Cell Signaling #2586	anti-mouse IgG	1:1000	Cell Signaling #7076	36 kDa
GPAM	1:500 in 5%iger BSA Lösung	Abcam #ab68925	anti-mouse IgG	1:3000	Cell Signaling #7076	94 kDa
CHKA	1:500 in 5%iger Magermilchlösung	Sigma #SAB1405616	anti-mouse IgG	1:1000	Cell Signaling #7076	50/52 kDa
CHKA (CK1)	1:500 in 5%iger Magermilchlösung	Abcam #ab88053	anti-mouse IgG	1:1000	Cell Signaling #7076	50/52 kDa
CHKA (B01)	1:250 in 5%iger Magermilchlösung	Abnova #H00001119-B01	anti-mouse IgG	1:1000	Cell Signaling #7076	50/52 kDa
DDK-Tag	1:1000	Origene #TA50011	anti goat	1:1000	Origene	Vektor-spezifisch
Mitofusin2	1:1000 in 5%iger BSA Lösung	Abcam #ab56889	anti-mouse IgG	1:1000	Cell Signaling #7076	86 kDa

### 2.3.6 Reduktion der Genexpression mit siRNA

Zur transienten Verminderung der mRNA-Expression wurden kurze RNAs verwendet, die mit der Ziel-mRNA interferieren (siRNA). Die siRNA bindet an die Ziel-mRNA, so dass doppelsträngige RNA-Moleküle entstehen, die normalerweise in Eukaryoten nicht vorkommen. Durch zelluläre Abwehrmechanismen werden diese doppelsträngigen RNA-Moleküle vernichtet und so die Konzentration der Ziel-mRNA reduziert. Unspezifische Kontroll-siRNAs sind so aufgebaut, dass es kein bekanntes mRNA-Ziel in der Zelle gibt. Sie dienen der Identifizierung unspezifischer Effekte durch die Transkriptionsprozedur.

Experimente, bei denen siRNA verwendet wurde, wurden meist im 6-Well-Format durchgeführt. Dazu wurden 500 µl Serum reduziertes Medium (OptiMEM) je Well vorgelegt und 20 nmol siRNA der Invitrogen Stealth Select siRNA-Produktreihe oder 5 nmol siRNA der Ambion Select-Produktreihe darin gemischt. Dann wurden 5 µl Transfektionsreagenz Lipofectamine-RNAiMax zugemischt und gut auf dem Kulturboden verteilt. Nachdem die Transfektionsmischung für 30-45 Minuten bei Raumtemperatur zur Komplexbildung zwischen Transfektionslipiden und siRNA geruht hat, wurden 2,5 ml einer Zellsuspension mit 200000 MCF7-Zellen/ml oder 120000 HeLa-Zellen/ml in jedes Well zugegeben und geschwenkt. Für Analysen der Metaboliten der Zellen wurde der 20fache Ansatz gewählt: 10 ml OptiMEM + 60 µl siRNA + 100 µl Transfektionsreagenz Lipofectamine-RNAiMax in einer Kulturschale mit 15 cm Durchmesser. Nach 30 Minuten wurden 50 ml Zellsuspension (200000 MCF7-Zellen/ml) zugegeben.

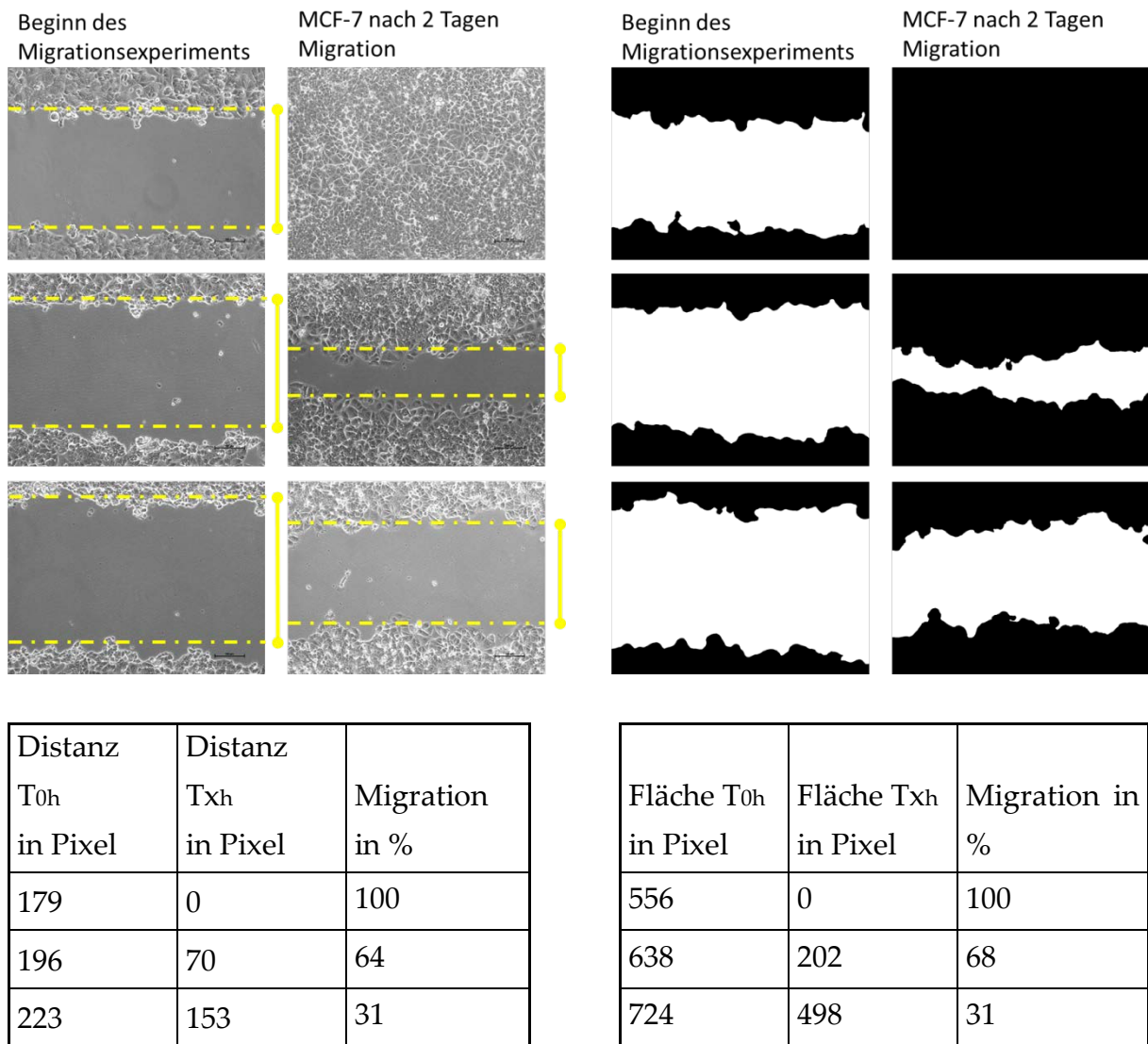
Die Zellen wurden zur Verminderung der Menge Ziel-mRNA für drei Tage bei 27°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Diese Verminderung der Ziel-mRNA wird im Folgenden als Knockdown bezeichnet. Die Knockdown-Effizienz zu jedem Experiment wurde parallel durch Isolierung der Gesamt-RNA eines zweiten identischen Knockdown-Ansatzes überprüft. Die isolierte mRNA wurde hierzu in cDNA umgeschrieben und anschließend die Expression der Ziel-mRNA und die der anderen zu untersuchenden Gene mit Real-Time-PCR überprüft. Die Knockdown-Effizienz ist für die jeweiligen Ergebnisse dieser Arbeit angegeben.

## 2.3.7 Migrationsversuche

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Migrationsversuche durchgeführt. Zum einen die Migration ausgehend von einer konfluenten Zellkultur, der Wundheilungsversuch, zum anderen die Migration durch eine Membran ausgehend von Zellen in Suspension, der Boyden-Kammer-Migrationsversuch.

### 2.3.7.1 Wundheilungsversuch

Die Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Beim MCF7-Zellmodell mit Knockdown waren das in der Regel 500000 Zellen/8,9 cm<sup>2</sup> (6-Well), bei HeLa mit Knockdown 300000 Zellen/8,9 cm<sup>2</sup> (6-Well) für drei Tage bei 37 °C. Dann wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein Raster in die Zellfläche gezogen und abgelöste Zellen durch Wechsel des Mediums entfernt. Direkt danach (Zeitpunkt 0h) und nach 24 h bzw. 28 h wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop (Nikon), unter Verwendung des 10fach-Objektivs, Bilder an drei bis vier definierten Stellen des eingebrachten Rasters aufgenommen. Bei der Quantifizierung der aufgenommenen Bilder wurde mit Hilfe der nicht kommerziellen Software ImageJ der Abstand der an die eingebrachte Lücke grenzenden Zellen gemessen und der prozentuale Verschluss der Lücke relativ zur Ausgangsgröße ermittelt. Dies diente als Maß für das Migrationspotenzial der behandelten Zellen in Relation zu unbehandelten Zellen. Alternativ wurde mit dem MiToBo Plugin 1.3 für die Software ImageJ die Fläche der verbliebenen Lücke relativ zur Ausgangsfläche berechnet und als Maß für die Migrationsfähigkeit relativ zu unbehandelten Zellen ausgewertet. Die beiden Methoden zur Ermittlung der Migration führen zu quantitativ gleichen Ergebnissen. Die Auswertung des Migrationsexperimentes mit dem MiToBo Plugin für ImageJ bietet den Vorteil der teilweisen Automatisierung. Ein Beispiel ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Das MiToBo Plugin ist von der Fakultät für Informatik der Universität Halle (Saale) entwickelt und kostenlos online erhältlich: <http://www2.informatik.uni-halle.de/agprbio/mitobo/index.php/Downloads>.



**Abb. 2.2: Beispiel für die Auswertung der Fotografien von Migrationsversuchen**

Die Auswertung der Migration erfolgte als prozentualer Anteil der Distanz oder als prozentualer Anteil der Fläche zum Zeitpunkt 0h: Migration =  $(1 - \text{Fläche } T_{xh} / \text{Fläche } T_{0h}) * 100$  oder Migration =  $(1 - \text{Distanz } T_{xh} / \text{Distanz } T_{0h}) * 100$ .

### 2.3.7.2 Boyden-Kammer-Migrationsversuch

Die Migrationsfähigkeit von Zellen, in denen zunächst experimentell die Expression von GPAM oder CHKA erhöht wurde (siehe Abschnitt 2.3.8.5 „Plasmid-Transfektion in Zellkultur“), untersuchten wir mit einem modifizierten Boyden-Kammer-Migrationsversuch.

Dazu wurden 200 µl Serum-freies Medium mit 20000 HEK293-Zellen in den oberen Teil einer Kammer gegeben, die nach unten durch einen Filter mit 8 µm breiten Poren abgeschlossen ist. Die Unterseite der Membran war mit 10 ng Fibronectin/cm<sup>2</sup> beschichtet. Die Kammer wurde in ein Reservoir gesetzt, das 475 µl Medium mit 20 % Serum enthielt.



Zur internen Kontrolle wurde zweimal dieselbe Anzahl von Zellen der gleichen Zellsuspension, direkt ohne Filterkammer, in das Reservoir mit 475 µl Medium (20 % Serum) gegeben. Nach 18 h Inkubation wurden die Zellen in den Kontrollcontainern gewaschen und mit 200 µl Trypsin geerntet. Die Zellen wurden mit dem CASY-TT Zellzählautomaten gezählt und der Mittelwert zur Errechnung des Migrationsindexes verwendet.

Nach 18 h Inkubation bei 37 °C wurden die in der Kammer auf dem Filter verbliebenen Zellen mit einem Wattestäbchen abgewischt. Die Zellen, die an der Unterseite des Filters hafteten und demnach durch die 8 µm Poren migriert sind, wurden fixiert und gefärbt. Für die Fixierung und Färbung wurde das *Differential Quick Staining Kit* verwendet. Der Filter wurde 10 min in Lösung A getaucht (Fixierung), dann 10 min in Lösung B und dreimal 30 sec in Lösung C. Anschließend wurden die Filter mit PBS-Lösung gewaschen. Mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops (Nikon) unter Verwendung der 20fachen Vergrößerung wurden jeweils 12 Bilder eines Filters aufgenommen und die migrierten Zellen gezählt. Die Quantifizierung der Migration erfolgte durch Berechnung des Quotienten aus migrierten Zellen und Kontrollzellen, die ohne Filter 18 h adhärten. Dieser Migrationsindex ist im Ergebnisteil als prozentuale Migration relativ zu unbehandelten Zellen angegeben.

### 2.3.8 Erhöhung der Genexpression

Die Übertragung von cDNA in eukaryotische Zellen nennt man Transfektion. Zur Übertragung der cDNA der *Gene GPAM* und *CHKA* in die Empfängerzellen dienten Vektoren. Die Vektoren zur transienten Überexpression wurden bei OriGene bestellt und entsprechen dem Kontrollvektor „pCMV6-Entry“, erweitert durch die humane cDNA Sequenz für GPAM und CHKA2 (siehe Abschnitt „Vektoren“). Um die gelieferten 10 µg Vektor-cDNA zu amplifizieren und zu isolieren, wurden zunächst kompetente *T7-E.Coli* Bakterien mit den Vektoren transformiert und die Vektor-tragenden Bakterien vermehrt. Anschließend wurde die Vektor-DNA aus den Bakterien isoliert und für die Transfektion von MCF7- und HEK293-Zellen eingesetzt.

#### 2.3.8.1 Vektor-Produktion

Um ausreichend Vektoren für die Transfektionsversuche zu haben, mussten diese zunächst in großer Menge produziert werden. Zur Vermehrung der verwendeten

Vektoren wurden *E.Coli T7*-Zellen eingesetzt. Die Isolierung aus den Bakterien erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher Reagenziensets von Qiagen.

### 2.3.8.2 Transformation von kompetenten Bakterien mit Hitzeschock

Das Einbringen von DNA in Bakterien wird als Transformation bezeichnet und diente hier dem Vermehren von Vektoren. Es existieren verschiedene Methoden für das Einbringen von DNA in Bakterien. In dieser Arbeit wurde der *E. coli* Stamm T7 verwendet und durch Hitzeschock transformiert. Dazu wurden 25 µl der Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit 0,1 µg Vector-DNA gemischt. Innerhalb von 30 min adhärirt DNA an der Zelloberfläche und wird durch Erwärmen (auf 42 °C für 45 sec) in die Bakterien aufgenommen. Nach zwei Minuten auf Eis wurden 900 µl LB-Medium zugefügt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zum Identifizieren transformierter Bakterien wurde die Kanamycinresistenz genutzt, die vorliegt, wenn das Bakterium den Vektor aufgenommen hat. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen 50 µl der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit 25 µg Kanamycin/ml ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Mit den entstandenen Kolonien transformierter Bakterien wurden Kulturen für die Vermehrung und Isolierung des Vektors angeimpft. Dazu wurde zunächst eine Kolonie in 4 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin gegeben und über Nacht bei 37 °C vermehrt. Von dieser Vorkultur wurden dann 200 µl verwendet, um 100 ml LB-Medium (25 µg/ml Kanamycin) zu infizieren. Die Zellen wuchsen bis zu einer optischen Dichte von 4 bei 37 °C in Erlenmeyerkolben mit Schikanen.

Eine Bakteriensuspension einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 1 enthält etwa  $0,8 \cdot 10^9$  Zellen/ml.

### 2.3.8.3 Vektor-Präparation

Die verwendeten Plasmid-DNAs wurden aus  $2-5 \cdot 10^9$  *E.Coli T7*-Zellen mit einem kommerziell erhältlichen Reagenzienset [QIAGEN Plasmid Maxi Kit] im großen Maßstab isoliert. Dazu wurden *E.Coli T7*-Bakterien mit dem Vektor *pCMV6 entry* (PS100001) von AMSBio sowie den Vektoren *pCMV6-GPAM* (RC219747), *pCMV6-CHKA1* (RC207209) und *pCMV6-CHKA2* (RC205509) transformiert. Die Plasmid-Isolierung erfolgte aus den Bakterien einer 250 ml Kultur mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Reagenzienset nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Bakterien abzentrifugiert, in Puffer P1 aufgenommen und einer alkalischen Lyse unterzogen (Puffer P2). Durch Zugabe eines sauren Kaliumacetat-Puffers (P3) wird die Lyse durch Neutralisation der Lösung gestoppt. Die kleinen Plasmide renaturieren schnell und bleiben in Lösung; Proteine, Membran und genomische DNA sinken ab. Die

Plasmid-DNA wird dann über eine äquilibrierte Anionenaustauschersäule gereinigt. Das Säulenmaterial bindet die negativ geladene DNA, während Proteine, RNA und Zuckerreste ausgewaschen werden (Puffer QC). Die Plasmid-DNA wird dann mit einem Hochsalzpuffer (QF) eluiert. Zur weiteren Reinigung wird diese mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol gefällt und zentrifugiert (30 min, 4 °C, 15000 g). Das DNA-Sediment wurde zur Entfernung der Salze mit 70%igen Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 min, 4 °C, 15000 g) und das Pellet an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 500 µl Wasser aufgenommen. Die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung wurde mit NanoDrop200 bestimmt und die Proben durch Einengen unter Vakuum oder durch Verdünnen mit Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/µl gebracht und bei -20 °C gelagert.

#### 2.3.8.4. Vektor-Qualitätsanalyse durch Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die Phosphodiesterbindungen in doppelsträngiger DNA spalten. Sie arbeiten sequenzspezifisch und eignen sich so für die kontrollierte Spaltung von DNA, beispielsweise für die Linearisierung von Vektoren bei Klonierungen oder für die Analyse von Plasmiden.

Die Restriktionsendonuklease NotI wurde mit 2 U/µg DNA in dem empfohlenen Cut Smart Puffer zur Linearisierung der Vektoren eingesetzt.

Die erhaltenen Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese auf die richtige Länge hin überprüft: *pCMV6-entry* = 4,9 kb; *CHKA-pCMV6* = 1,38 kb (RC219747) und 1,32 kb (RC207209); *GPAM-pCMV6* = 7,4 kb).

#### 2.3.8.5 Plasmid-Transfektion in Zellkultur

Die Plasmidtransfektion in MCF7- und HEK293-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz *X-treme gene HP DNA transfection*-Reagenz von Roche, das speziell für schwierig zu transfizierende Zellen wie MCF7 entwickelt wurde. Für die Überexpression von GPAM und CHKA wurden, 20 h vor der Zugabe der Transfektionsmischung, 42000 MCF7-Zellen/cm<sup>2</sup> (400000 je 6-Well; 8 Millionen je Platte mit 15 cm Durchmesser) oder 25000 HEK293-Zellen/cm<sup>2</sup> in einer Konzentration von 200000 Zellen/ml ausgesät. Nach Mediumwechsel zu genau 2 ml Antibiotika-freiem Medium (40 ml für eine Zellkultursschale mit 15 cm Durchmesser) wurden 10 % Transfektionsmischung zugegeben und nach 24 h durch einen Mediumwechsel wieder entfernt. Die Transfektionsmischung enthielt 1 µg DNA und 3,5 µl Transfektionsreagenz in 100 µl Serum-reduziertem Medium (OptiMEM). Die transfizierten Zellen wurden nach 48 h geerntet.

### 2.3.9 Bestimmung intrazellulärer Metaboliten

Zur Untersuchung der intrazellulären Metabolitenkonzentrationen wurden MCF7-Zellen analog zur Durchführung der Migrationsexperimente präpariert, allerdings mit der 20fachen Zellzahl pro Experiment. Zu einem Zeitpunkt, der denen der Migrationsexperimente entspricht, wurden die Zellen mit Trypsin in eiskaltem Medium geerntet und zweimal mit eiskalter Ringer-Lösung gewaschen. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm und 4 °C für 10 min wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde durch Verwirbelung aufgelockert und der Metabolismus der Zellen durch Zugabe von 4 ml Methanol (HPLC grad, Temperatur -70°C) während des Mischens gestoppt. Nach 1 h bei -20 bis -70 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (4000 rpm) und 4 °C für 30 min pelletiert und der Überstand in neue FALCON-Polypropylen-Probenröhrchen dekantiert. Das Methanol wurde anschließend bei 0 °C in ca. 3 h unter Stickstoffstrom verdampft und das verbliebene Wasser in einer Gefriertrocknungsanlage entfernt (ca. 3 h bei 0,001 mbar und -27 bis -72 °C). Die vollständig getrockneten Proben wurden bis zur NMR- oder LC-MS-Analyse bei -20°C gut verschlossen gelagert.

#### 2.3.9.1 NMR-Messungen

In Kooperation mit Dr. Lambert am Leibniz-Institut für analytische Wissenschaften in Dortmund (ISAS) erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerin-3-Phosphat (G3P), Glycerophosphocholin (GPC), Cholin (Cho) Phosphocholin (PCho), Glycerophosphoethanolamin (GPEA), Lactat (Lac), Alanin (Ala), Glucose (Gluc), Phosphatidylcholin (PtdCho) und der Triglyceride (TG).

Die Metaboliten der oben beschriebenen Versuche wurden in einem 1:2-Volumengemisch der deuterierten Lösemittel Methanol und Chloroform aufgenommen und es wurde sowohl <sup>1</sup>H- als auch <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie mit Hilfe eines 600 MHz-NMR-Spektrometers (Bruker) durchgeführt. Die Messung erfolgte unter vollständig relaxierten Bedingungen mit 512 Scans für die <sup>1</sup>H- und 23000 Scans für die <sup>31</sup>P-NMR-Spektren. Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Signale zu den Metaboliten erfolgte anhand von Literaturdaten und eigens zu diesem Zweck durchgeführter zweidimensionaler <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P-HMBC-NMR (siehe Anhang). Die Zuordnung der Metaboliten im Total-Cholin-Dreiliniensystem bei 3,2 ppm wurde zusätzlich durch Hinzufügen (Spiking) der erwarteten Metaboliten (GPC oder Cholin) zur Probe und unter Beobachtung der diesen Metaboliten zugeordneten Signale bestätigt. Die Quantifizierung der Signale wurde mit Hilfe des ERETIC-Verfahrens (Bruker) durchgeführt und basiert auf einer NMR-Messung an

einer Rohrzucker-Standardprobe bekannter Konzentration. Auf diese Weise lassen sich die Metabolitenkonzentrationen aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum sehr exakt bestimmen. Nach der Quantifizierung von Phosphocholin aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum wurde die quantitative Information auf das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum übertragen und anhand dessen weitere Metaboliten quantifiziert. Alle gemessenen Integrale von Metabolitensignalen wurden auf das Integral von Nukleosidtriphosphat referenziert, dessen Konzentration in allen NMR-Proben bei identischen Zellzahlen als konstant angenommen werden kann.

### 2.3.9.2 LC-MS/MS-Messungen

Die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen von 1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure (O-LPA = 18:1 LPA) und 1-Palmitoyl-Lysophosphatidsäure (P-LPA = 16:0-LPA) als repräsentative Vertreter aller löslichen Lysophosphatidsäuren erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) durch die zentrale Einheit Analytische Chemie im IfADo. Für die Quantifizierung nach der Methode des internen Standards (IS) wurde 1-(cis-9-Heptadecenoyl)-Lysophosphatidsäure-Ammoniumsalz (H-LPA = C17:1-LPA) verwendet.

Dazu wurden die oben beschriebenen Metabolitengemische in 200  $\mu\text{L}$  Methanol (100 %, LC-MS Qualität) resuspendiert, 5 min im Ultraschallbad behandelt und 5 min bei 2500 Upm (1200 g) zentrifugiert (Heraeus Labofuge 400R). Für die anschließende Messung wurde der Überstand durch ein 0,45  $\mu\text{m}$  Spritzenfilter gegeben.

Die massenspektrometrische Analyse der Lysophosphatidsäuren erfolgte mit dem LC-System UFLC XR Prominence (Shimadzu) und dem MS/MS-System Q-Trap 5500 (AB Sciex). Die Details zu den chromatographischen Bedingungen sind in der Tabelle 2.6 aufgeführt. Die Analyten werden nach Ionisierung mit Elektrospray (ESI) in das Massenspektrometer überführt. Im ersten Quadrupol wird nach Molekülonen eines bekannten Masse/Ladungsverhältnisses ( $m/z$  siehe Tabelle 2.7) selektiert, im Zweiten werden sie fragmentiert, so dass nach der Selektion die ausgewählten Produktionen im dritten Quadrupol mittels MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) im Negativ-Modus detektiert werden können.

Zur Quantifizierung der LPAs diente das größte für alle Phospholipide typische Fragment, das Glycerophosphat, mit dem Masse/Ladungsverhältnis 153. Als *Qualifier* wurde neben dem Phosphation  $m/z$  79 zur eindeutigen Identifizierung auch der ganz spezifische Fettsäurerest gemessen. Die Auswertung der Peakflächen erfolgte mit Hilfe der zum Gerät gehörenden *Analyst Software*. Die LPA-Konzentrationen wurden berechnet unter Verwendung von Kalibrierreihen aus einem Gemisch der

reinen O-LPA (18:1) und P-LPA (16:0) mit dem internen Standard (IS) H-LPA (17:1). Die Konzentration des IS, sowohl in der Kalibrierreihe als auch in den Proben, betrug 250 ng/ml (50 ng absolut je Probe). Für jeden Messtag wurde eine neue Kalibrierreihe im linearen Bereich von 25 – 400 ng/ml in reinem Methanol angesetzt.

**Tab. 2.5: Lysophosphatidsäure-Standards**

Substanz	CAS-Nummer	Summenformel	Molekülmasse g/mol	Exakte Molekülmasse <sup>#</sup> g/mol
1-Palmitoyl-Lysophosphatidsäure	17618-08-5	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub> PNa	432,464	432,225
1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure Natrium-Salz	325465-93-8	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>7</sub> PNa	458,502	458,241
1-(cis-9-Heptadecenoyl)-Lysophosphatidsäure Ammonium-Salz	1246298-35-0	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> NO <sub>7</sub> P	439,524	439,27

Die Standards wurden bei Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, USA über Otto Nordwald GmbH, Hamburg, bezogen.

<sup>#</sup>Die exakte Molekülmasse ergibt sich aus der Summe der Massen der einzelnen Isotope in der Verbindung. Wenn nicht anders angegeben, wird das Isotop mit der größten Häufigkeit verwendet.

**Tab. 2.6: Chromatographiebedingungen**

Säule	Nucleodur Hilic 125 x 3 mm, 3 µm (Macherey-Nagel)
Phase A	5 mM Ammoniumformiat + 0,1 % Ameisensäure in 50 % Wasser / 50 % Methanol
Phase B	Acetonitril (100 %)
isokratisch	60 % Phase A; 40 % Phase B
Flussrate	0,2 mL/min
Temperatur	40 °C
Injektionsvolumen	5 µL
Retentionszeit	4,14 min für O-LPA (18:1), 4,17 min für P-LPA (16:0), 4,16 min für H-LPA (17:1)

Tab. 2.7: Einstellungen am Massenspektrometer für die einzelnen LPAs

Analyt	m/z	Declustering potenzial (DP) V	Collision energy (CE) V
(O-LPA) 18:1	435,187 → 281,2	-135	-40
	435,187 → 152,9	-135	-28
	435,187 → 78,9	-135	-78
P-LPA (16:0)	409,212 → 255,2	-125	-38
	409,212 → 153,0	-125	-26
	409,212 → 78,9	-125	-112
(H-LPA (17:1) (IS)	421,270 → 267,0	-130	-39
	421,270 → 153,0	-130	-27
	421,270 → 78,9	-130	-90

Messbedingungen am Massenspektrometer für alle Analyten:

*Curtain gas* (CUR): 30 psi, Ionisierungsspannung: -4000 V, Temperatur: 550 °C

### 2.3.10 Statistische Datenbewertung

Zu allen Experimenten gehören mindestens drei unabhängige biologische Proben. Die Messwerte für die Migration oder Expression sind, wenn nicht anders angegeben, immer relativ zu unbehandelten Zellen berechnet. Die Signifikanz der Effekte wurde, sofern nicht anders ausgewiesen, immer mit dem zweiseitigen Student`s-t-Test ermittelt, wobei die Messwerte der Zellen mit Kontrollbehandlungen die jeweilige Referenzmatrix ist. Alle p-Werte zur Ermittlung der Signifikanz der Einflüsse auf die Migration sind auf multiples Testen adjustiert. Veränderungen in Metabolitenkonzentrationen wurden mit dem einseitigen und dem zweiseitigen Student`s-t-Test getestet. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  ist als statistisch signifikant anzusehen. Die Signifikanzen in einseitigen Tests sind mit „●“ gekennzeichnet, die Signifikanzen in zweiseitigen Tests mit „\*“. Alle numerischen Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.





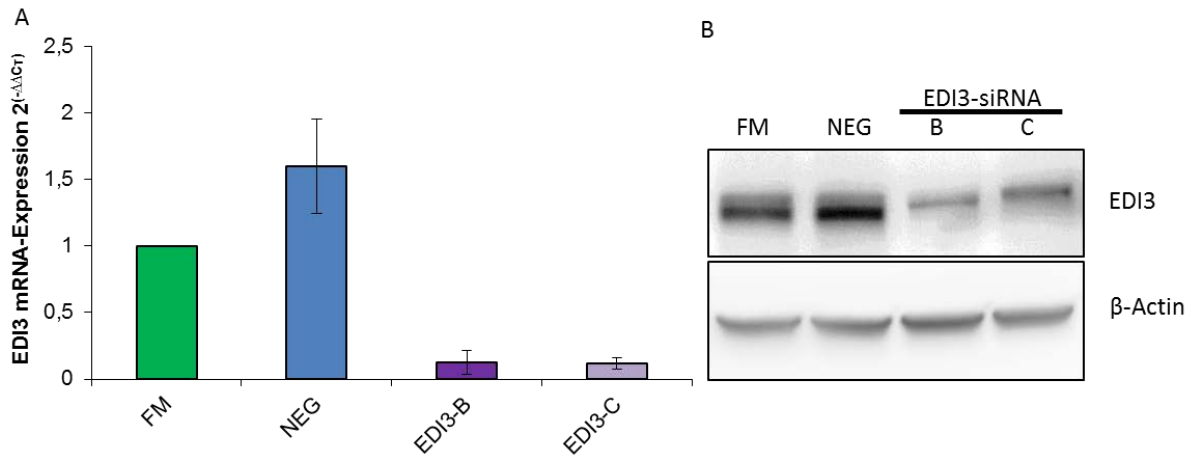
### 3. Ergebnisse

Um zu erkennen, auf welchem Weg die Migration von Tumorzellen durch EDI3 beeinflusst ist, wurden die beiden Enzyme Cholinase und Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase-1, die die EDI3-Produkte G3P und Cholin verstoffwechseln, moduliert und der Effekt auf das Tumorzell-Modellsystem MCF-7 untersucht. Diese Arbeit vergleicht damit erstmals die Rolle von EDI3, CHKA und GPAM für die Migration unter Berücksichtigung ihrer intrazellulären Metaboliten.

#### 3.1 Die Reduzierung der Genexpression mittels Knockdown

Für die Charakterisierung der Rollen von GPAM, EDI3 und CHKA auf die Migration und auf die intrazellulären Metaboliten sollten diese zuverlässig intrazellulär moduliert werden. Dafür wurde die vielfach verwendete und gut charakterisierte Tumorzelllinie MCF7 genutzt. Zunächst wurde mittels transienter Transfektion von *small interfering* RNA (siRNA) die Expression der Zielgene GPAM, EDI3 und CHKA vermindert, ein sogenannter Knockdown (Kd). Wie bereits in Stewart et al. 2012 publiziert, führt eine Reduktion der EDI3-Expression zu verminderter zellulärer Migration in MCF7-Zellen. Dies sollte zunächst unter Verwendung einer weiteren siRNA unabhängig bestätigt werden. Nachfolgend wird mit den Abbildungen 3.1-3.3 die Etablierung des EDI3-Knockdowns sowie die Validierung des Einflusses auf die Migration in zwei verschiedenen Zelllinien gezeigt.

Zur Verminderung der EDI3-Expression in MCF7-Zellen wurden diese mit zwei verschiedenen siRNAs spezifisch für EDI3 transfiziert, welches eine Reduktion der EDI3-mRNA zur Folge hat. Die mRNA-Konzentration wurde mit semiquantitativer Real-Time-PCR bestimmt. Die Quantifizierung der mRNA-Konzentration relativ zu unbehandelten Zellen (FM) in Abbildung 3.1A zeigt eine Reduktion der EDI3-mRNA um 88%. Der Knockdown führt darüber hinaus nicht nur zur Reduktion der mRNA, sondern verringert auch die EDI3-Proteinkonzentration. Dies wird exemplarisch im MCF7-Gesamtzell-Lysat mit Western Blot gezeigt (Abbildung 3.1).



**Abb. 3.1: Verminderung der EDI3-Konzentration in MCF7-Zellen durch siRNA**

A) Die Real-Time-Messung der relativen EDI3-mRNA-Konzentration, berechnet nach  $\Delta\Delta CT$ -Methode relativ zu unbehandelten Zellen (FM), zeigt bei Transfektion mit zwei verschiedenen siRNA, spezifisch für EDI3-mRNA (Stealth Select Invitrogen: EDI3-B und EDI3-C), eine Reduktion der EDI3-mRNA-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) um 88 %. Das Transfektionsreagenz Lipofectamine®-RNAiMAX (lipo) hingegen verändert die EDI3-Expression nicht. Unspezifische Kontroll-siRNA (NEG) führt zur Erhöhung der EDI3-mRNA in MCF7-Zellen um 20-100 %. Der Graph zeigt die Mittelwerte von  $\geq 5$  biologischen Replikaten mit Standardabweichung.

B) Die Reduktion der EDI3-Expression durch EDI3 siRNA wurde zusätzlich exemplarisch auf Proteinniveau im Vergleich zur EDI3-Konzentration in unbehandelten Zellen (FM) mit Western Blot (Antikörper: AMSBio GPCPD1 Clone3B8G3) bestätigt.

Im MCF7-Zellmodell konnte für EDI3 ein robuster Knockdown mit zwei siRNAs etabliert werden, der zu einer Verminderung der EDI3-Genexpression von mindestens 80 %, im Mittel sogar 88 % führt. Unter Verwendung dieser experimentellen Modifizierung von intrazellulärem EDI3 wurde anschließend die Migration von MCF7-Zellen untersucht.

### 3.2 Die Bedeutung von EDI3 für die Zellmigration

Der Einfluss auf die Migration wurde für alle in dieser Arbeit durchgeführten Knockdown-Versuche auf gleiche Weise durchgeführt. Die Zellsuspension wurde direkt in die Transfektionsmischung gegeben und nach 72 h-Kultivierung war eine konfluente Zellschicht erreicht. Zu diesem Zeitpunkt (72 h) wurde mit einer Pipettenspitze eine Lücke von ca. 500  $\mu\text{m}$  Breite in die vollständig geschlossene Zellschicht gezogen. Daraufhin wurde die Migration der Zellen in den entstandenen Freiraum mikroskopisch beobachtet. Dazu wurde der zellfreie Bereich mit angrenzenden Zellen an vier verschiedenen Stellen markiert und bei 10facher

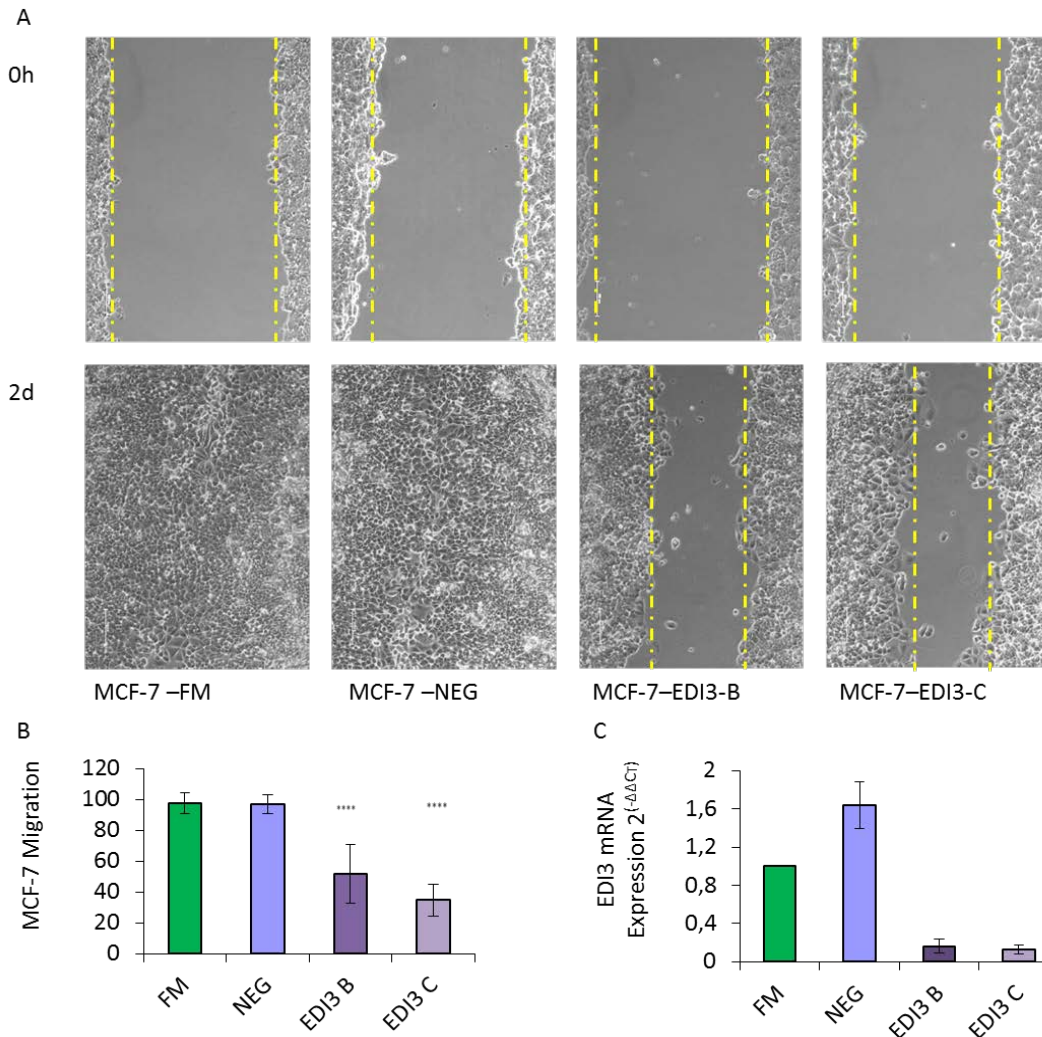
Vergrößerung fotografiert. Sobald die unbehandelten Kontrollzellen die Lücke wieder geschlossen hatten, wurden dieselben Stellen erneut unter 10facher Vergrößerung fotografiert. Das dauert bei MCF7-Zellen 48 h bei HeLa-Zellen nur 24 h. Eine Beeinträchtigung der Migration kann anhand der Größe der verbliebenen Lücke bei behandelten Zellen ermittelt werden. Dies erfolgte durch Messung des Abstandes zwischen den an die Lücke angrenzenden Zellen im Bildbearbeitungsprogramm ImageJ als Quantifizierung der prozentualen Migrationsdistanz oder durch Ermittlung der verbliebenen freien Fläche mit Hilfe des MiToBo Plugins für die Software ImageJ.

In bereits publizierten Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte für EDI3 bei Knockdown mit einer siRNA eine Verlangsamung der Migration von MCF7-Zellen gezeigt werden, während eine stabile Überexpression in MCF7-Zellen das Migrationspotenzial erhöht [Stewart et al., 2012]. Die Ergebnisse wurden in dieser Arbeit unter Verwendung einer weiteren siRNA unabhängig bestätigt. MCF7-Zellen repräsentieren den Brustkrebs Subtyp Luminal A, der sich meist gut mit Chemotherapie behandeln lässt und nicht schnell wächst [Holliday et al., 2011]. Die Ergebnisse wurden in der Gebärmutterhalskrebszell-Linie HeLa bestätigt. Dafür wurde die siRNA-B verwendet und eine weitere siRNA ausgewählt, die keinen Einfluss auf die Morphologie von HeLa-Zellen zeigt (siRNA-E). HeLa-Zellen haben ein stärkeres Migrationspotenzial als MCF7-Zellen und proliferieren schneller. Auch im HeLa-Zellmodell kann durch Verringerung der EDI3-Expression die Migration vermindert werden.

### **Einfluss von EDI3 auf die Migration in MCF7-Zellen**

Zur Untersuchung der Bedeutung von EDI3 für die Zellmigration wurden MCF7-Zellen mit zwei verschiedenen siRNA-Oligos spezifisch für EDI3-mRNA transfiziert. Die Verringerung der EDI3-mRNA wurde für jedes Experiment mit Real-Time-PCR bestätigt und betrug im Mittel 84 % für EDI3-siRNA-B und 88 % für EDI3-siRNA-C (Abbildung 3.2C). Das Migrationsexperiment ist so durchgeführt worden, wie es auf Seite 56 beschrieben ist. Nach zwei Tagen (2d) war die zellfreie Fläche durch die unbehandelten MCF7-Zellen (FM) vollständig besiedelt. Ebenso hatten die Zellen, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, die Lücke vollständig geschlossen, während bei EDI3-Knockdown noch immer eine Lücke in der Zellschicht zu beobachten war und als Unterschied in der Migrationsgeschwindigkeit quantifiziert wurde. Durch den EDI3-Knockdown wandern die Zellen signifikant langsamer. Der Knockdown mit EDI3-siRNA ergab für Oligo-B eine Reduktion der Migration um 58,4 %, denn im Mittel sind  $41,6 \pm 25$  % der Lücke

nach zwei Tagen noch nicht geschlossen. Oligo-C reduziert die Migration um  $65,3 \pm 10,6$  %. Unten stehend ist repräsentativ ein Foto jeder Versuchsbedingung zu Beginn (0h) und bei Beendigung des Migrationsexperimentes (2d) aufgeführt.



**Abb. 3.2: Verlangsamung der Migration durch EDI3-Knockdown in MCF7-Zellen**

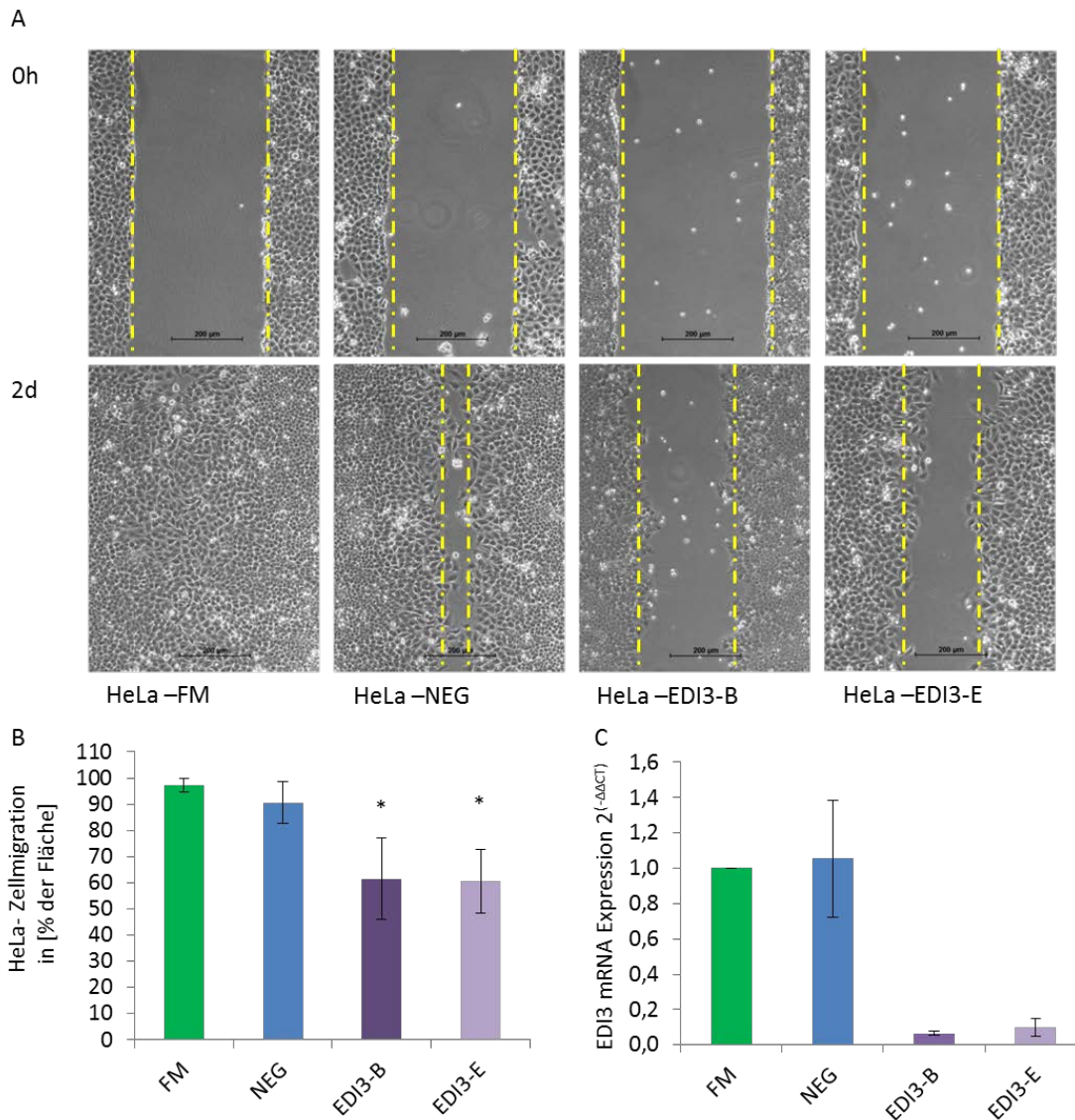
A) Repräsentative Bilder eines Migrationsexperimentes in MCF7-Zellen, transfiziert für 72 h mit zwei verschiedenen spezifischen siRNA-Oligos für EDI3 im Vergleich zu den Kontrollen: Medium alleine (FM) und Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NEG). Bilder zeigen Migration der Zellen über eine Distanz von ca. 500  $\mu\text{m}$  (Zeitpunkt 0 h) innerhalb von zwei Tagen (Zeitpunkt 2 d).

B) Quantifizierung von je 3 Bildern pro Zeitpunkt und Bedingung (prozentuale Migrationsdistanz im Vergleich zur Strecke zum Zeitpunkt 0 h) zeigt eine signifikante Reduktion der Zellmigration um 58 % für EDI3-siRNA-B und um 65 % für EDI3-siRNA-C. Zur Ermittlung der Signifikanz gegenüber der NEG-Kontrolle wurde ein zweiseitiger Student-t-Test verwendet (\*\*\*\* p-Wert < 0,00005).

C) Relative EDI3-mRNA-Konzentration zu Beginn des Migrations-experimentes (0 h), gemessen mit Real-Time-PCR und berechnet nach  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode relativ zu unbehandelten Zellen (FM), zeigt eine Reduktion der EDI3-mRNA-Konzentration bei Transfektion mit siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) um 84 % und 88 %. Alle Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung von fünf biologischen Replikaten.

## **Einfluss von EDI3 auf die Migration in HeLa-Zellen**

Um den bereits bekannten Effekt von EDI3 auf die Migration zu validieren, wurden HeLa-Zellen mit zwei verschiedenen siRNA-Oligos transfiziert, die spezifisch für die EDI3- mRNA sind. Das Migrationsexperiment wurde 72 h nach der Transfektion auf bereits beschriebene Weise durchgeführt. Da HeLa-Zellen schneller migrieren als MCF7-Zellen, wurde der Einfluss der Transfektion im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) oder Zellen, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert wurden (NEG), bereits nach 24 h analysiert. Abbildung 3.3A zeigt exemplarisch je eins von vier Bildern für jede Versuchsbedingung zu Beginn des Migrationsexperimentes (0h) und am Ende des Migrationsexperimentes (1d). In Abbildung 3.3B ist der mittlere Einfluss der drei durchgeführten Migrationsexperimente graphisch dargestellt. Die Migration ist durch den EDI3-Knockdown um 40 % verlangsamt. Die mittlere Knockdown-Effizienz bei diesen Migrationsexperimenten in HeLa-Zellen betrug mehr als 90 % (Abbildung 3.3C). Die Verminderung der EDI3-Expression reduziert demnach die Migrationsgeschwindigkeit in MCF7- und HeLa-Zellen.



**Abb. 3.3: Verlangsamung der Migration durch EDI3-Knockdown in HeLa-Zellen**

A) Repräsentative Bilder eines Migrationsexperimentes in MCF7-Zellen, transfiziert für 72 h mit zwei verschiedenen spezifischen siRNA-Oligos (Stealth Select Invitrogen B-C) für EDI3 im Vergleich zu den Kontrollen: Medium allein (FM) und Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NEG). Bilder zeigen Migration der Zellen über eine Distanz von ca. 500  $\mu\text{m}$  (Zeitpunkt 0h) in zwei Tagen (Zeitpunkt 2d). Messbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

B) Die Quantifizierung von je 4 Bildern pro Zeitpunkt und Bedingung, als prozentuale Migration im Vergleich zur freien Fläche zum Zeitpunkt 0h, zeigt eine signifikante Reduktion der Zellmigration um 40 %. Zur Ermittlung der Signifikanz gegenüber allen Kontrollen (FM + NEG) wurde der Student-t-Test verwendet (\* p-Wert < 0,05; \*\* p-Wert < 0,005).

C) Relative EDI3-mRNA-Konzentration mit STABW der obigen drei biologischen Replikate zu Beginn des Migrationsexperimentes (0h), gemessen mit Real-Time-PCR und berechnet nach  $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ zu unbehandelten Zellen (FM), zeigt eine Reduktion der EDI3-mRNA-Konzentration bei Transfektion mit siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) um  $\geq 90\%$ . Die Graphen B und C zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

### 3.3 Die Bedeutung von GPAM für die Migration

Nachdem nun der Effekt von EDI3 auf die Zellmigration gezeigt wurde, sollte untersucht werden, ob auch GPAM einen vergleichbaren Effekt auf die zelluläre Migration hat.

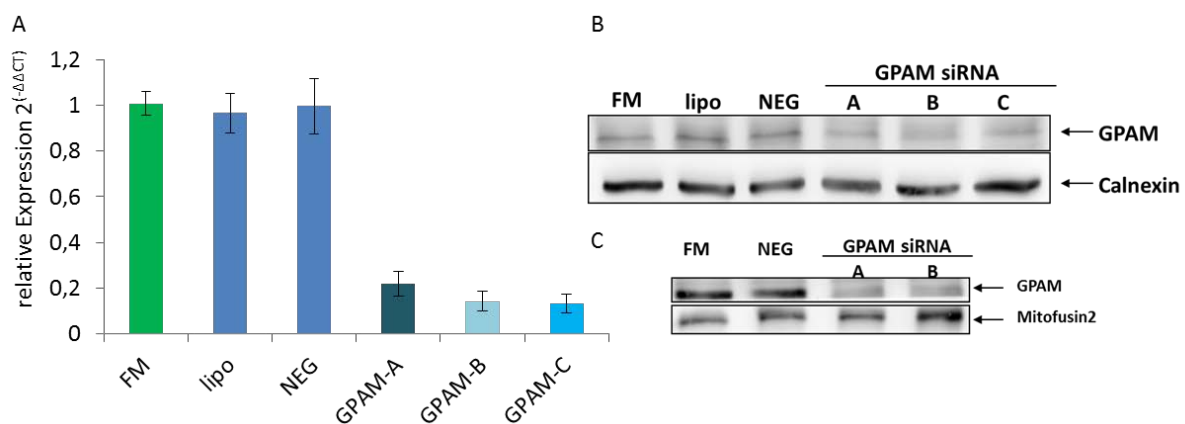
Dazu wurde zunächst die Verminderung der GPAM-Expression in MCF7-Zellen (Abbildung 3.4) erfolgreich mit drei verschiedenen siRNA-Spezies etabliert. Es wurde eine Reduktion der GPAM-mRNA in allen Experimenten von ca. 80 % ohne Beeinträchtigung der Zellmorphologie oder der Zellvitalität (Abbildung 3.5) erreicht. Die Verminderung der GPAM-Expression wird nicht durch erhöhte Transkription der anderen GPAT-Familienmitglieder ausgeglichen (Abbildung 3.6).

Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass auch GPAM auf die Zellmigration in MCF7- und HeLa-Brustkrebszellen sowie auf HEK293-Zellen Einfluss hat. In Abbildung 3.7 ist der Einfluss auf die MCF7-Zellen mit dazugehöriger Analyse der mRNA-Expression mittels Real-Time-PCR dargestellt. GPAM-Knockdown mit siRNA Oligo-A, -B und -C vermindert die MCF7-Migration um 30-50 %. Das konnte mit drei weiteren unabhängigen siRNAs validiert werden (siRNA-D, -E und -F), die die Migration um 22-38 % verlangsamen (Abbildung 3.8). Die Ergebnisse konnten in einer zweiten Krebszell-Linie, den HeLa-Zellen validiert werden (Abbildung 3.9). Weiterhin wurde der Effekt der verstärkten GPAM-Expression, einer sogenannten Überexpression, im HEK293-Zellmodell untersucht. Es konnte verdeutlicht werden, dass die Verminderung der GPAM-Expression zu verlangsamer Migration führt, während die Erhöhung der Expression die Zellmigration beschleunigt (Abbildung 3.10).

#### 3.3.1 Überprüfen der GPAM-Knockdown-Effizienz in MCF7-Zellen

Für die Reduktion der GPAM-Expression in MCF7-Zellen wurden diese mit drei verschiedenen siRNA-Oligos spezifisch für GPAM transfiziert und 72 h danach die RNA gesammelt. Es wurden auch Gesamtzelllysate-Stichproben untersucht. Zur Kontrolle wurden Zellen 72 h auf derselben Kulturschale kultiviert, wobei FM eine Kontrolle ohne jegliche Behandlung ist. Die Bezeichnung „lipo“ gibt eine Kontrollbehandlung mit Lipofectamine-RNAiMax™ an, aber ohne siRNA an. Bei „NEG“ handelt es sich um Zellen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurden. Abbildung 3.4A zeigt, dass die Behandlung mit siRNA gegen GPAM, im Gegensatz zu den Kontrollbehandlungen, die GPAM-mRNA-Konzentration reduziert (um 78 % für Oligo-A und um 86 % für Oligo-B und -C).

Die Reduktion des GPAM-Proteinanteils am Gesamtzellprotein konnte nur unbefriedigend gezeigt werden (Abbildung 3.4B). Da GPAM ein mitochondriales Protein ist, wurden zusätzlich die Mitochondrien mit einem kommerziell erhältlichen Isolierungssystem von MiltenylBiotec isoliert und lysiert (siehe Kapitel Material und Methoden, Abschnitt: Herstellung von Mitochondrienlysaten). Nach Auftrennung der Proteine mit 8%iger PAGE konnte der Knockdown mittels GPAM-Antikörper (ab68295) besonders deutlich gezeigt werden, da das GPAM-Protein im Mitochondrienlysate im Vergleich zum Gesamtzell-Lysate angereichert ist. Mitofusin2 zeigt als mitochondriales Marker an, dass gleich viel Proteingemisch in der PAGE verwendet wurde (siehe Abbildung 3.4C).



**Abb. 3.4: Verminderung die GPAM-Expression in MCF7-Zellen**

A) Relative GPAM mRNA-Konzentration in MCF7-transfiziert, mit je 20 nM siRNA spezifisch für GPAM (Stealth Select Invitrogen A-C), mit STABW gemessen mit Real-Time-PCR und berechnet nach  $\Delta\Delta CT$ -Methode relativ zu unbehandelten Zellen (FM), zeigt eine Reduktion der GPAM mRNA-Konzentration bei Transfektion mit siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) um 78 % für die siRNA GPAM-A und 86 % für die siRNAs GPAM-B und GPAM-C. Das Transfektionsreagenz Lipofectmin<sup>®</sup>RNAiMAX (lipo) und die unspezifische Kontroll-siRNA (NEG) bewirken keine Veränderung der GPAM-mRNA-Konzentration.

(B) Die Reduktion der GPAM-Expression im Knockdown mit Oligo-B und Oligo-C wurde zusätzlich exemplarisch auf Proteinniveau mit Western Blot (WB) in Gesamtzell-Lysat von MCF7-Zellen bestätigt.

C) WB von MCF7-Mitochondrienlysate zeigt mitochondriale Reduktion von GPAM in GPAM-siRNA transfizierten Zellen. Mitofusin 2-Detektion zeigt exemplarisch den Gehalt mitochondrialer Proteine in der Lysat-Probe (sogenannte Ladekontrolle).

Die Untersuchung der mRNA und der Proteinkonzentration mittels Western Blot zeigt, dass die Behandlung der MCF7-Zellen mit GPAM-siRNA die GPAM-Konzentration in den Zellen verringert.

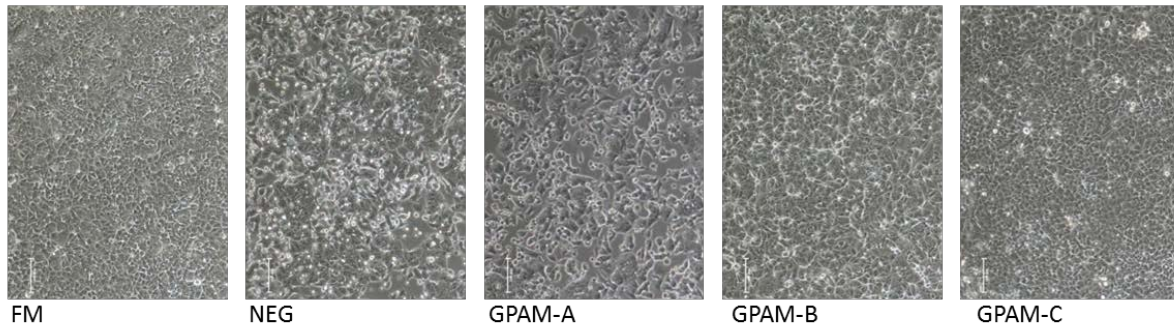


Da GPAM nicht die einzige Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) ist, wurde die Expression der anderen bekannten GPATs bei GPAM-Kd überprüft (Abbildung 3.6). Auch mögliche Einflüsse des Knockdown auf die Zellmorphologie und Vitalität der MCF7-Zellen wurden untersucht (Abbildung 3.5).

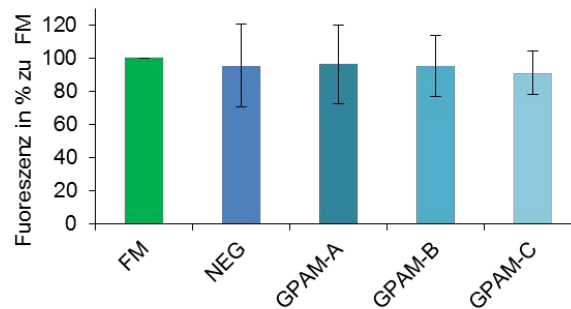
### 3.3.2 Morphologie und Vitalität bei GPAM-Knockdown

Bei der Untersuchung der Migration ist es wichtig, dass die Zellen hohe Vitalität aufweisen. Daher wurde der Einfluss der Transfektion auf die Zellmorphologie und auf die Zellvitalität überprüft. Die jeweils gleiche Anzahl an MCF7-Zellen wurde mit drei verschiedenen siRNAs spezifisch gegen die GPAM-mRNA (GPAM A-C) oder mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h danach wurde das Medium gewechselt und die Morphologie der Zellen mikroskopisch bei 10facher Vergrößerung beobachtet. Abbildung 3.5 A zeigt exemplarisch die Zellmorphologie, die der typischen MCF7-Morphologie für alle Transfektionen entspricht. Jedoch weist eine verringerte Zelldichte bei Behandlung mit siRNA-Oligo-A bereits auf eine Beeinträchtigung der Zellvitalität hin. Tote Zellen sind beim Mediumwechsel entfernt worden. Bei den abgerundeten Zellen in der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellkultur könnte es sich um sterbende Zellen handeln. Um das genauer zu untersuchen, wurde die Zellvitalität durch Aufnahme des Farbstoffes PrestoBlue® bestimmt. Für Abbildung 3.5B wurden die Zellen, wie oben beschrieben, transfiziert und anschließend für den PrestoBlue®-Vitalitätstest (Details, siehe Kapitel Material und Methoden, Abschnitt: Vitalitätskontrolle der Zellen) geerntet und neu ausgesät. Die Behandlung mit unspezifischer Kontroll-siRNA oder siRNA spezifisch für GPAM beeinflusst nicht die Vitalität der Zellen, wie in Abbildung 3.5B graphisch dargestellt wird.

A



B



**Abb. 3.5: GPAM-Knockdown in MCF7-Zellen hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität**

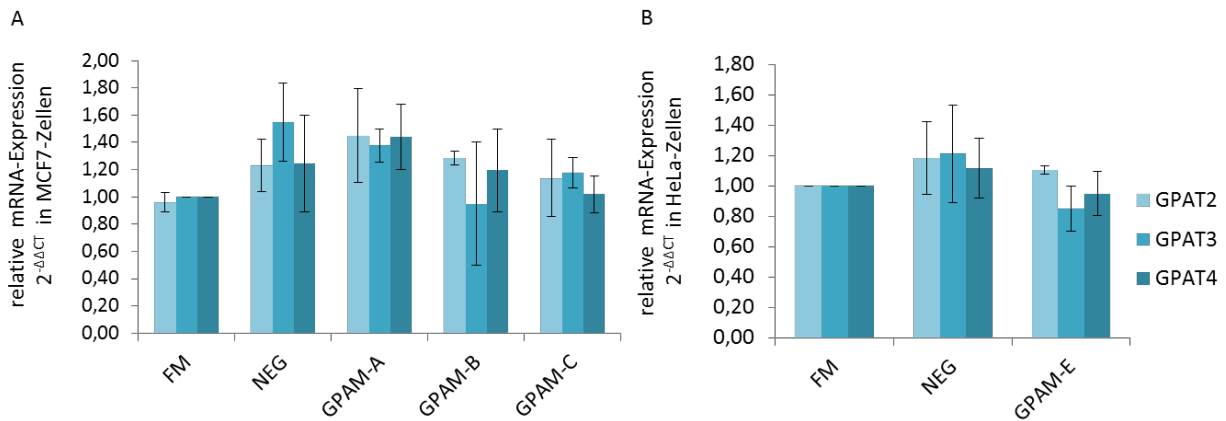
A) Phasenkontrastabbildungen von MCF7-Kontrollen (FM und NEG), 72 h transfiziert mit drei siRNAs spezifisch für GPAM (GPAM-A bis GPAM-C), zeigten keine morphologischen Veränderungen der MCF7-Zellen. Der Messbalken entspricht 100  $\mu$ m  
 B) PrestoBlue®-Zellvitalitäts-Versuch zeigt keine signifikante Beeinflussung der MCF7-Zellvitalität durch die Transfektion (drei biologische Replikate mit Standardabweichung).

### 3.3.3 Die G3P-Acyltransferase-Familie bei GPAM-Knockdown

Neben GPAM sind noch drei weitere Acyltransferasen bekannt, die G3P metabolisieren (siehe Einleitung, Abschnitt „Glycerin-3-Phosphat Acyltransferasen“). Bei experimenteller Herunterregulation der GPAM-Expression könnte eine biologische Überexpression einer anderen G3P-Acyltransferase den Effekt auf die Zellen ausgleichen.

Um zu prüfen, ob eine andere GPAT aufgrund der Reduktion von GPAM in der Zelle nach oben reguliert wird, wurden MCF7-Zellen mit drei verschiedenen siRNA-Oligos und HeLa-Zellen mit einer siRNA, spezifisch für GPAM, transfiziert und die Expression der anderen GPATs (GPAT 2-4) mit Real-Time-PCR anhand der nach 72 h isolierten RNA gemessen.

Abbildung 3.6A veranschaulicht, dass in MCF7-Zellen keine der GPATs signifikant verändert sind; auch in HeLa-Zellen (Abbildung 3.6 B) führt der GPAM-Knockdown nicht zur Veränderung der Expression einer anderen Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase.



**Abb. 3.6: Expressionsniveau anderer GPATs unverändert bei GPAM-Knockdown**

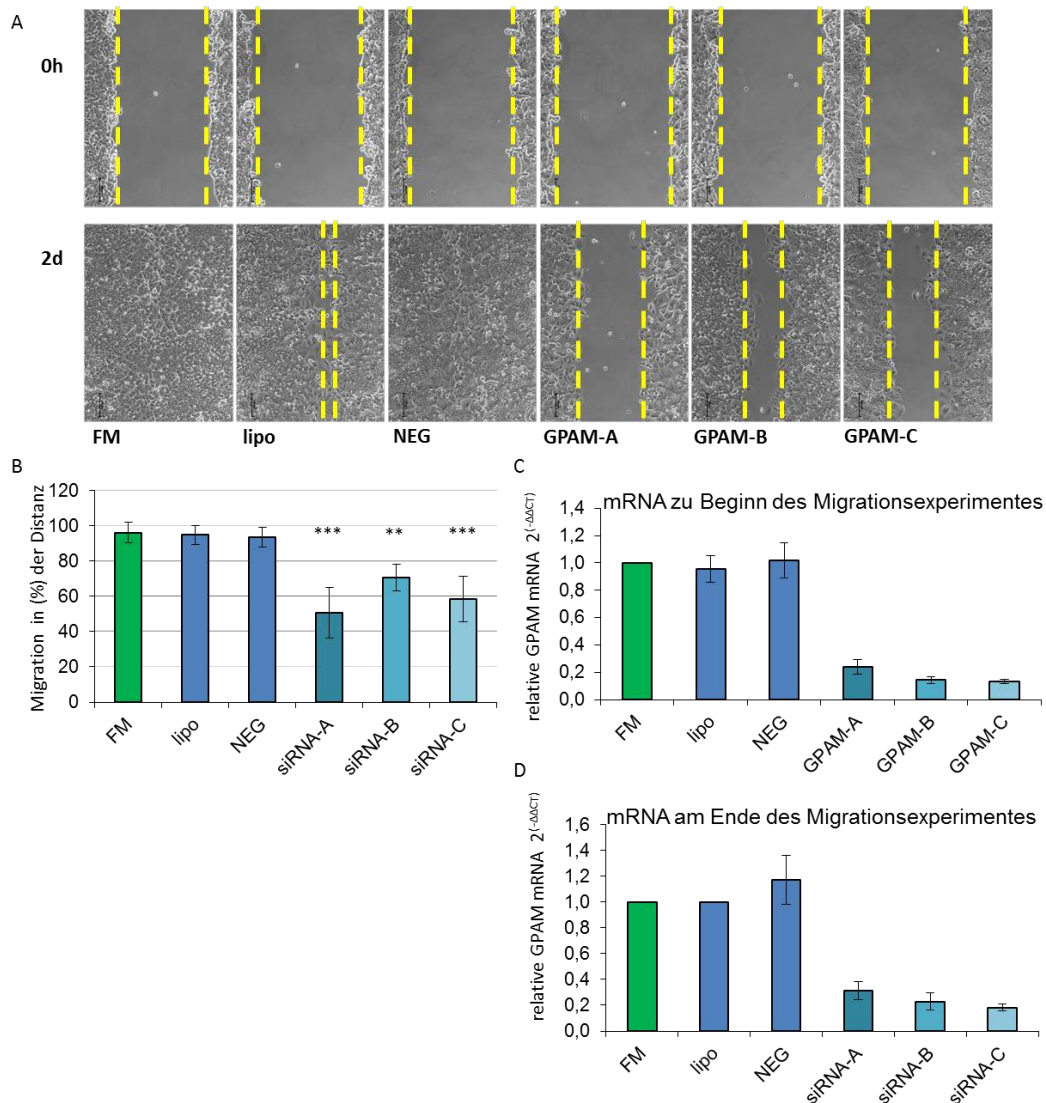
Real-Time-PCR-Analyse von mindestens drei biologischen Replikaten von GPAM-Knockdown in MCF7-Zellen, mit drei spezifischen siRNAs und einer spezifischen siRNA in HeLa-Zellen, verändert nicht die Expression von GPAT2, GPAT3 oder GPAT4.

Da der Knockdown von GPAM in MCF7-Zellen effizient und spezifisch ist, können alle drei getesteten siRNAs zur Modulation der GPAM-Expression eingesetzt werden. Auch für Migrationsexperimente eignen sich die drei siRNAs, wie in Abschnitt „3.3.2 Morphologie und Vitalität bei GPAM-Knockdown“ dargestellt wurde.

### 3.3.4 GPAM-Knockdown hat Einfluss auf Zellmigration

Zur Untersuchung der Bedeutung von GPAM für die Zellmigration wurden MCF7-Zellen mit drei verschiedenen siRNA-Oligos, spezifisch für GPAM, von Invitrogen Stealth Select mRNA transfiziert. Nach 72 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut für 24h kultiviert. Das Migrationsexperiment wurde danach, wie auf Seite 56 beschrieben, vier Tage nach der Transfektion durchgeführt. Die Verringerung der EDI3-mRNA zu Beginn des Experimentes (0h) wurde für jedes Migrationsexperiment mit Real-Time-PCR bestätigt und betrug im Mittel 80 %. Auch bei Beendigung des Experimentes (2d), sechs Tage nach der Transfektion, betrug die Reduktion der GPAM-mRNA noch immer 70-80 %, dies wurde stichprobenartig ermittelt. Abbildung 3.7 zeigt exemplarisch Bilder der verbliebenen Lücke. Die Auswertung der Distanz zwischen den Zellflächen, Migration in Prozent zu unbehandelten Zellen, zeigt eine signifikante Verringerung der Migration um 30-50 % für die verschiedenen siRNA-Oligos. Da die verschiedenen siRNA-Oligos (Invitrogen Stealth Select: GPAM-A, -B, -C) trotz gleich effizienter Reduktion der GPAM-mRNA die Migration unterschiedlich stark reduzieren, wurde der Effekt auf die Migration mit drei weiteren siRNAs (Ambion Silencer Select: GPAM-D, -E, -F) in MCF7-Zellen validiert. Diese siRNAs konnten für einen effizienten Knockdown von 80-90 % in geringerer Konzentration eingesetzt werden und zeigten ebenfalls eine signifikante Reduktion der Migration von MCF7-Zellen um 22-38 % (siehe Abbildung 3.8).

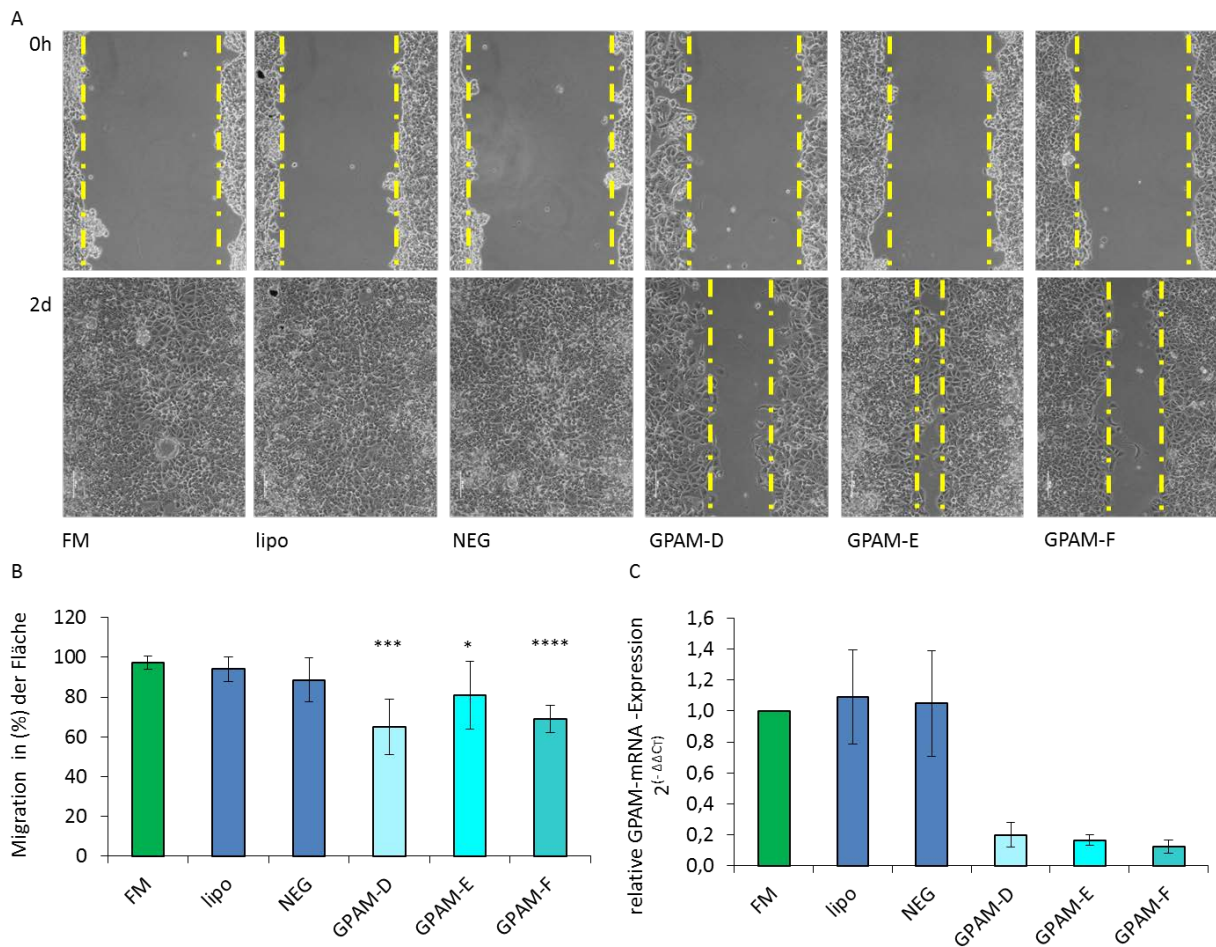
Zur Validierung der Ergebnisse in einer zweiten Zelllinie wurden HeLa-Zellen mit drei verschiedenen siRNAs spezifisch für GPAM transfiziert und 72 h später eine Lücke in den konfluenten Zellrasen gezogen. Nach 24 h ist diese Lücke wieder vollständig von unbehandelten Zellen besiedelt. Die nach 24 h nur zur Hälfte geschlossene Lücke bei GPAM-Knockdown in HeLa-Zellen weist eine Beeinträchtigung der Migration um 50 % auf. Die Auswertung der Knockdown-Effizienz in den Migrationsexperimenten mittels Real-Time-PCR zeigt eine Verringerung der GPAM-mRNA Expression um 86-90 % (Abbildung 3.9)



**Abb. 3.7: Verringerung der Migration bei GPAM-Knockdown A-C in MCF7-Zellen**

A) Repräsentative Bilder eines Migrationsexperimentes (scratch assay) in MCF7-Zellen, transfiziert für 72 h mit drei verschiedenen spezifischen siRNA-Oligos für GPAM von Invitrogen (A-C), im Vergleich zu den Kontrollen: Medium allein (FM), Medium mit Lipofectamine-RNAiMAX®-Transfektionsreagenz (lipo) und Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NEG). Bilder zeigen Migration der Zellen über eine Distanz von ca. 500  $\mu\text{m}$  (Zeitpunkt 0 h) in zwei Tagen (Zeitpunkt 2d). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . B) Quantifizierung der absoluten Migrationsdistanz als prozentuale Migration im Vergleich zu Zellen ohne Behandlung (FM). Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten zeigen signifikante Reduktion der Zellmigration um 30-50 %. Zur Ermittlung der Signifikanz gegenüber NEG wurde der zweiseitige Student-t-Test verwendet (\*\*\*) p-Wert < 0,0005; \*\* p-Wert < 0,005). C) Die Kd-Effizienz zu Beginn des Migrationsexperimentes (0h) ermittelt über die relative GPAM-mRNA-Expression, gemessen mit Real-Time-PCR und berechnet nach  $\Delta\Delta C_T$  Methode relativ zu unbehandelten Zellen (FM). Sie zeigt eine Reduktion der GPAM-mRNA-Konzentration bei Transfektion mit siRNA (A-C) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) um 80 %. D) Die Kd-Effizienz am Ende des Wundheilungsexperimentes wurde stichprobenartig mit Real-Time-PCR überprüft und betrug 70-80 %. B-D) Alle Graphen zeigen die Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten mit Standardabweichungen.

Zwei von drei weiteren siRNAs verlangsamten signifikant die MCF7-Zellmigration um 22-38%. Die unten stehende Abbildung illustriert exemplarisch die Ermittlung der verbliebenen Fläche als Index für die Migration.

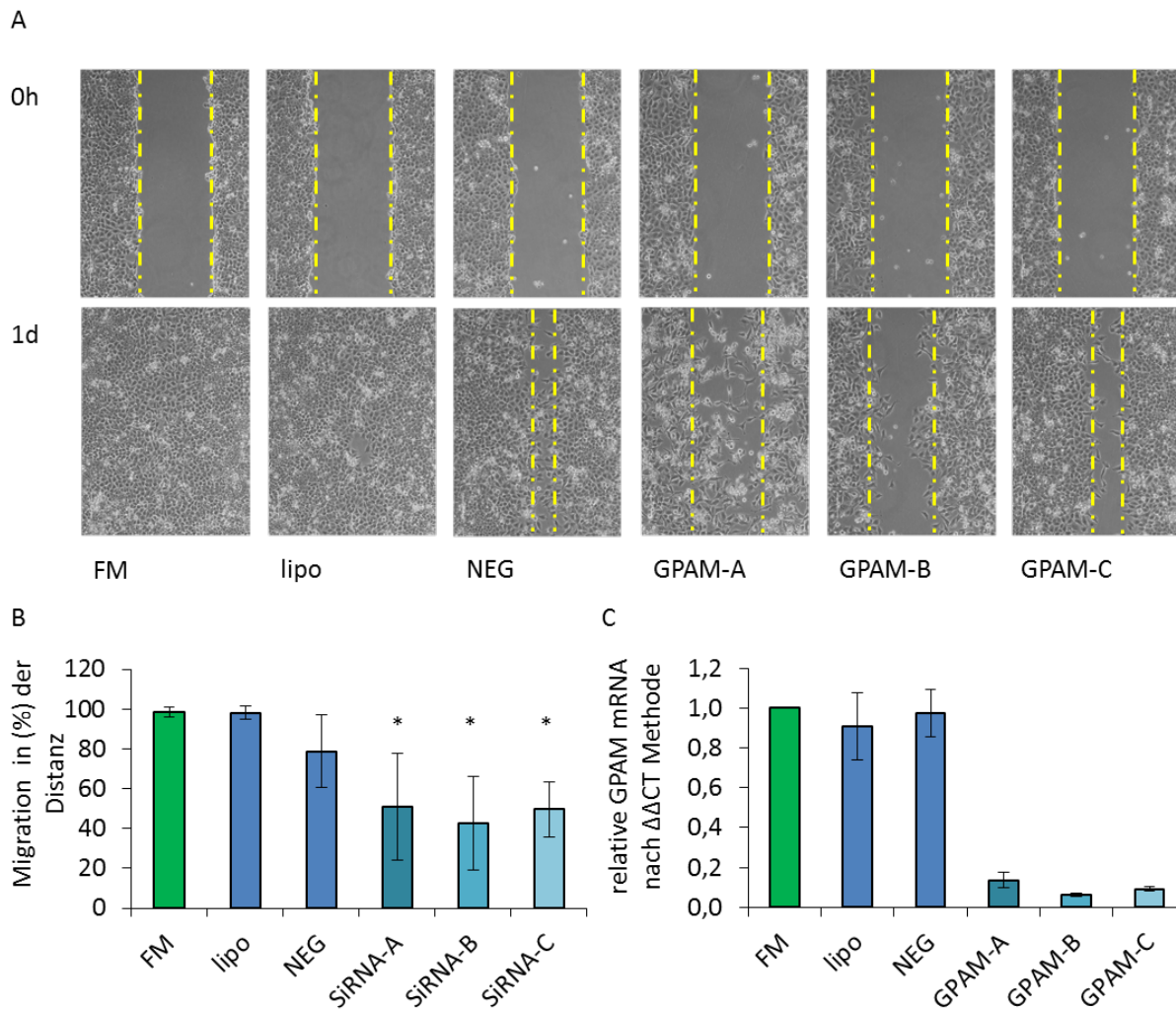


**Abb. 3.8: Verringerung der Migration bei GPAM-Knockdown D-F in MCF7-Zellen**

A) Repräsentative Bilder eines Migrationsexperiments (scratch assay) in MCF7-Zellen, transfiziert für 72 h mit je 5 nM von drei verschiedenen spezifischen siRNA-Oligos für GPAM von Invitrogen Ambion Select (D-F), im Vergleich zu den Kontrollen: Medium allein (FM), Medium mit Lipofectamine-RNAiMAX®-Transfektionsreagenz (lipo) und Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NEG). Bilder zeigen die Migration der Zellen über eine Distanz von ca. 500 µm (Zeitpunkt 0h) in zwei Tagen (Zeitpunkt 2d). Der Messbalken entspricht 100 µm.

B) Quantifizierung der verbliebenen Fläche (2d/0h), als prozentuale Migration, zeigt eine Reduktion der Zellmigration um 22-38 %. Der Graph zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf biologischen Replikaten. Zur Ermittlung der Signifikanz der Effekte der siRNAs gegenüber allen Kontrollen wurde der zweiseitige Student-t-Test verwendet (\* p < 0,05; \*\*\* p < 0,0005; \*\*\*\* p < 0,00005).

C) Relative GPAM-mRNA-Konzentration mit STABW der obigen fünf biologischen Replikate zu Beginn des Migrationsexperimentes (0h), gemessen mit Real-Time-PCR und berechnet nach  $\Delta\Delta CT$ -Methode relativ zu unbehandelten Zellen (FM), zeigt eine Reduktion der GPAM-mRNA-Konzentration bei Transfektion mit siRNA (D-F) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) um  $\geq 80$  %.



**Abb. 3.9: Verringerung der Migration bei GPAM-Knockdown in HeLa-Zellen**

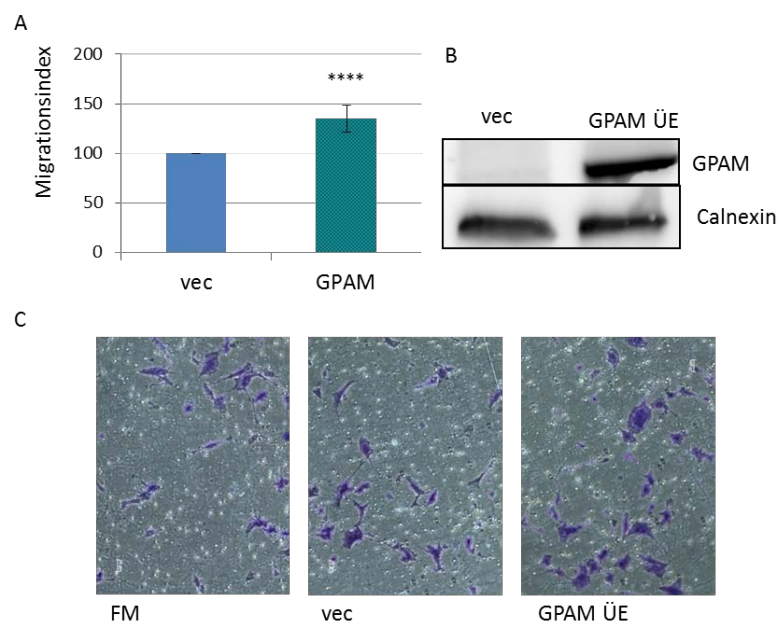
A) Repräsentative Bilder eines Migrationsexperiments, HeLa-Zellen transfiziert für 72 h mit drei verschiedenen spezifischen siRNA-Oligos für GPAM von Invitrogen Stealth Select (A-C) im Vergleich zu den Kontrollen: Medium allein (FM), Medium mit Lipofectamine-RNAiMAX®-Transfektionsreagenz (lipo) und Transfektion mit zwei verschiedenen unspezifischen Kontroll-siRNA zusammengefasst (NEG). Bilder veranschaulichen die Migration der Zellen über eine Distanz von ca. 500  $\mu\text{m}$  (Zeitpunkt 0h) in zwei Tagen (Zeitpunkt 1d). Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

B) Quantifizierung der verbliebenen Distanz nach 24 h als prozentuale Migration. Mittelwerte von drei biologischen Replikaten dokumentieren eine signifikante Reduktion der Zellmigration um 50 % ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) durch spezifische siRNA-Oligos für GPAM und um 21 % für NEG. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde der einseitige t-Test verwendet bei gleicher Varianz (F-Test  $p > 0,05$ ). Die  $p$ -Werte sind auf multiples Testen adjustiert.

C) Relative GPAM-mRNA-Konzentration mit STABW der obigen drei biologischen Replikate zu Beginn des Migrationsexperimentes (0 h), gemessen mit Real-Time-PCR und berechnet nach  $\Delta\Delta CT$  Methode, relativ zu unbehandelten Zellen (FM), zeigt eine Reduktion der GPAM-mRNA-Konzentration bei Transfektion mit siRNA (A-C) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) um 86-90 %.

### 3.3.5 Einfluss von GPAM-Überexpression auf die Migration

Nachdem eine Verminderung der Migration durch Knockdown von GPAM gezeigt werden konnte, sollte eine höhere GPAM-Expression zu stärkerer Migration führen. Da die Transfektionseffizienz in MCF7-Zellen für eine Analyse des Einflusses auf die Migration nicht ausreicht, wurde die sehr gut zu transfizierende Zelllinie HEK293 verwendet, um die Expression von GPAM experimentell zu erhöhen. HEK293 lösen sich leicht in konfluenter Kultur von der Kulturoberfläche, so dass sie sich nicht für das bisher verwendete Migrationsexperiment eignen. Ein alternativer Versuchsaufbau zur Untersuchung der Migration stellt die Migration durch eine poröse Membran dar – ein sogenanntes *Transwell*-Experiment. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Überexpression von GPAM im HEK293-Zellmodell und die Migration im *Transwell*-Experiment gezeigt (Abbildung 3.10). Die Überexpression von GPAM in HEK293-Zellen erhöht das Migrationspotenzial der Zellen um ca. 35%.



**Abb. 3.10: Überexpression von GPAM in HEK293-Zellen verstärkt die Zellmigration**

A) Migrationsindex, in Prozent zu Kontrollvektor pCMV6-entry (vec), zeigt den Mittelwert der migrierten Zellen von 12 randomisierten Bildern einer Membran, normalisiert zur Zellzahl in einer Kontrollkultivierung ohne Filtermembran:  $35 \pm 13,5$  % mehr Zellen wandern durch die Membran, wenn sie zuvor mit GPAM transfiziert wurden. Die Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen t-Test gegenüber vec ermittelt ( $p < 0,00005$ ).

B) Western Blot der GPAM-Überexpression (GPAM ÜE), nach 48 h in HEK293-Zellen.

C) Repräsentative Abbildungen von HEK293-Zellen, 10 h migriert durch 8  $\mu\text{m}$  Poren in Filtermembran, die mit  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Fibronectin beschichtet wurde, zeigen mehr Migration von pCMV6-GPAM transfizierten Zellen (GPAM ÜE) als von den Zellen, die mit Kontrollvektor pCMV6-entry (vec) transfiziert wurden.



Da neben der Reduktion von GPAM mittels Knockdown auch dessen Erhöhung einen Einfluss auf die Migration hat, liegt ein funktioneller Zusammenhang zwischen GPAM und der Migration nahe.

GPAMs Hauptfunktion in der Zelle ist die Triglyceridsynthese, wobei GPAM die erste Reaktion katalysiert, welche die Veresterung von Glycerin-3-Phosphat (G3P) zu Lysophosphatidsäure (LPA) und die Geschwindigkeit des gesamten Synthesewegs bestimmt. Diese enzymatische Funktion wurde durch Messung von LPA in Zellextrakten mittels LC-MS/MS nachgewiesen (siehe nachfolgender Abschnitt).

### 3.4 Metabolische Funktion des GPAM-Knockdowns

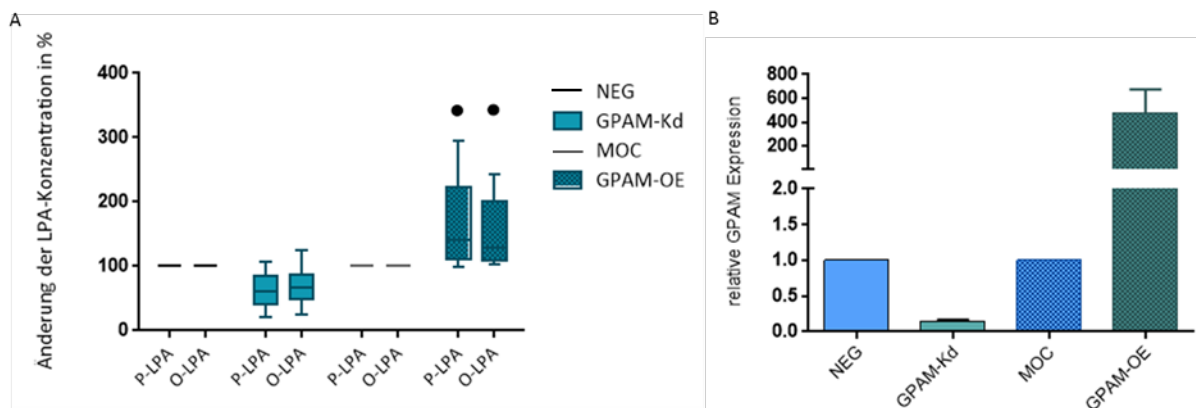
GPAM überträgt eine Fettsäurekette auf Glycerin-3-Phosphat (G3P; 1,2,3-Propanetriol, 1-Dihydrogen-Phosphat) und bildet so Lysophosphatidsäure (LPA). Dies stellt die erste Reaktion zur Biosynthese von Triglyceriden dar. Um zu prüfen, ob der GPAM-Knockdown (Kd) in den MCF7-Zellen, der auf mRNA und Proteinebene gezeigt werden konnte, ebenfalls enzymatisch funktionell ist, wurden die intrazellulären Konzentrationen des enzymatischen Reaktionsproduktes LPA und des Substrates G3P in Zellextrakten bestimmt.

#### 3.4.1 Veränderung der LPA-Konzentrationen bei GPAM-Modulation

Das GPAM-Reaktionsprodukt LPA konnte mittels *High performance liquid chromatography - mass spectrometry* (HPLC-MS) quantifiziert werden. Damit ist eine Unterscheidung der gebundenen Fettsäureketten möglich. Jede einzelne LPA-Spezies erfordert die Verwendung einer Standardsubstanz für quantitative Messungen. Da für GPAM eine Substratpräferenz für Palmitinsäure  $C_{16}H_{32}O_2$  (16:0) gegenüber Ölsäure  $C_{18}H_{34}O_2$  (18:1) gezeigt werden konnte [Vancura et al., 1994, Hammond et al., Xu et al., 2006], wurden diese exemplarisch zur Untersuchung der LPA-Konzentration verwendet.

Die Abbildung 3.11B ist die mittlere relative GPAM-Expression bei GPAM-Knockdown (GPAM-Kd) und GPAM-Überexpression (GPAM-OE) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbehandlung mit Standardabweichung angegeben. Die mittlere Knockdown-Effizienz ( $n = 6$ ) betrug  $85 \pm 2$  %. Dies führte zu einer Reduktion von P-LPA um 37 % ( $p$ -Wert = 0,0622) und von O-LPA um 31,5 % ( $p$ -Wert = 0,194). Die GPAM-Expression auf mRNA-Ebene war durch die Transfektion mit pCMV6-GPAM ( $n = 5$ ) auf  $304 \pm 144$  % erhöht. Dadurch erhöhte sich die P-LPA-Konzentration

signifikant um 61 % und die O-LPA-Konzentration um 49 %. Die p-Werte für P-LPA und O-LPA lagen für beide bei 0,0491.



**Abb. 3.11: Änderung der LPA-Konzentrationen und GPAM-mRNA-Expression bei Knockdown und Überexpression in MCF7-Zellen**

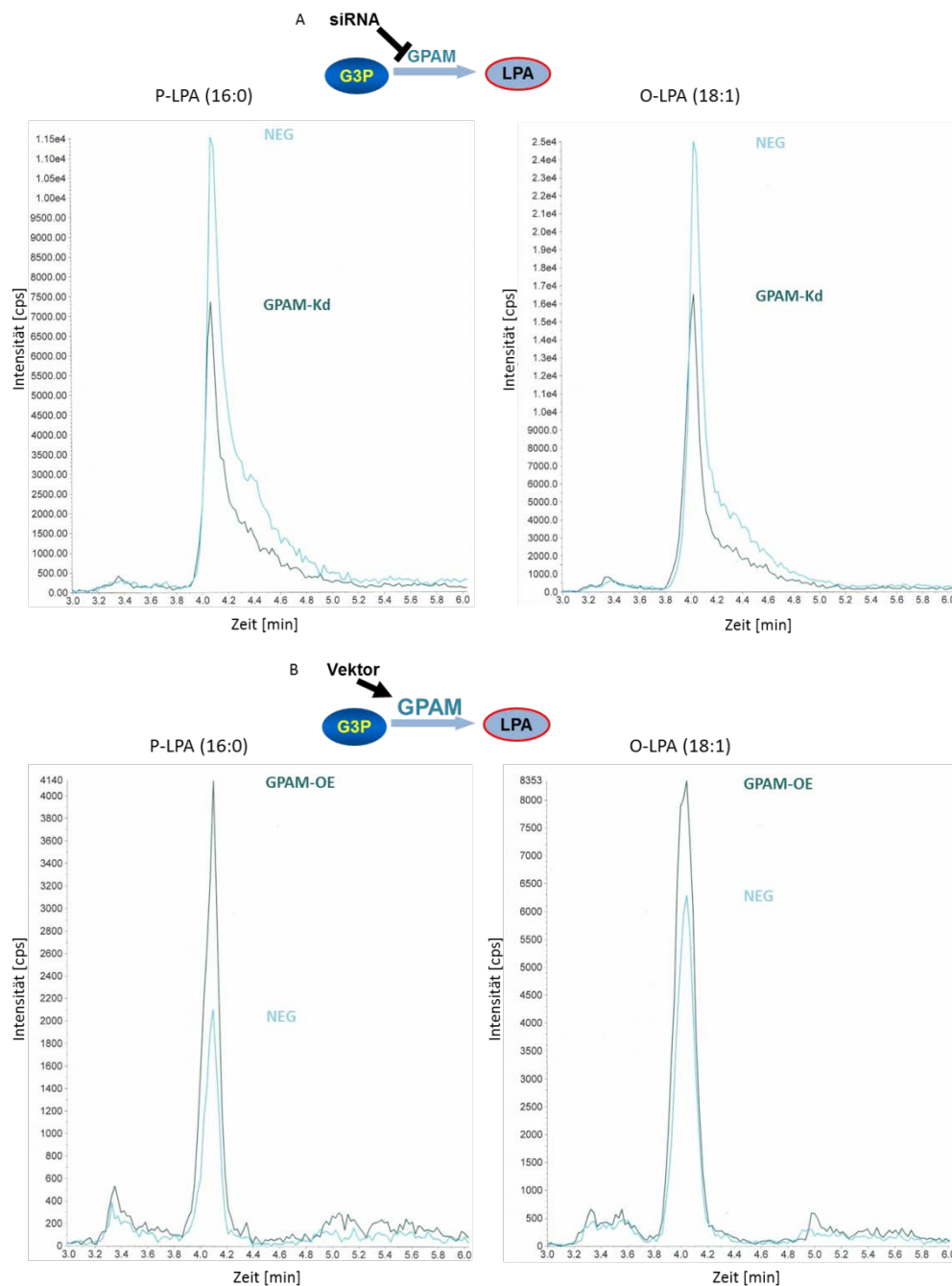
Quantitative Bestimmung der LPA-Konzentrationen mittels HPLC-MS/MS in Methanol-Extrakten aus MCF7-Zellen, behandelt mit GPAM-Knockdown (GPAM-Kd) unter Verwendung der siRNA Oligo-B (Invitrogen Stealth Select) und dessen Kontrollbehandlung NEG (Invitrogen Stealth Select scr-siRNA Oligo-low#2) sowie MCF7-Zellen mit transienter GPAM-Überexpression durch den Vektor pCMV6-GPAM (AMSBio) und dessen Kontrollbehandlung MOC (AMSBIO; pCMV6-entry).

A) Graphische Darstellung der mittleren Änderung der Konzentrationen von P-LPA und O-LPA gegenüber der jeweiligen Kontrollbehandlung in Prozent mit Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mit den einseitigen Student-t-Test für verbundene Stichproben ermittelt: ● p-Wert  $\leq 0,05$ .

B) Relative GPAM-Expression bei GPAM-Kd (n=6) und bei GPAM-OE (n=5) mit Standardabweichung.

Es konnte hiermit gezeigt werden, dass die Modifizierung der GPAM-Expression den erwarteten Einfluss auf dessen enzymatisches Produkt hat: ein Anstieg von GPAM erhöht auch die Konzentration an LPA intrazellulär. Die Verringerung von GPAM reduziert die LPA-Konzentration.

Repräsentativ sind die O-LPA- und P-LPA-Chromatogramme einer Messung von einem der biologischen Replikate in Abbildung 3.12 gezeigt.



**Abb. 3.12: LPA-Chromatogramme bei GPAM-Modulation**

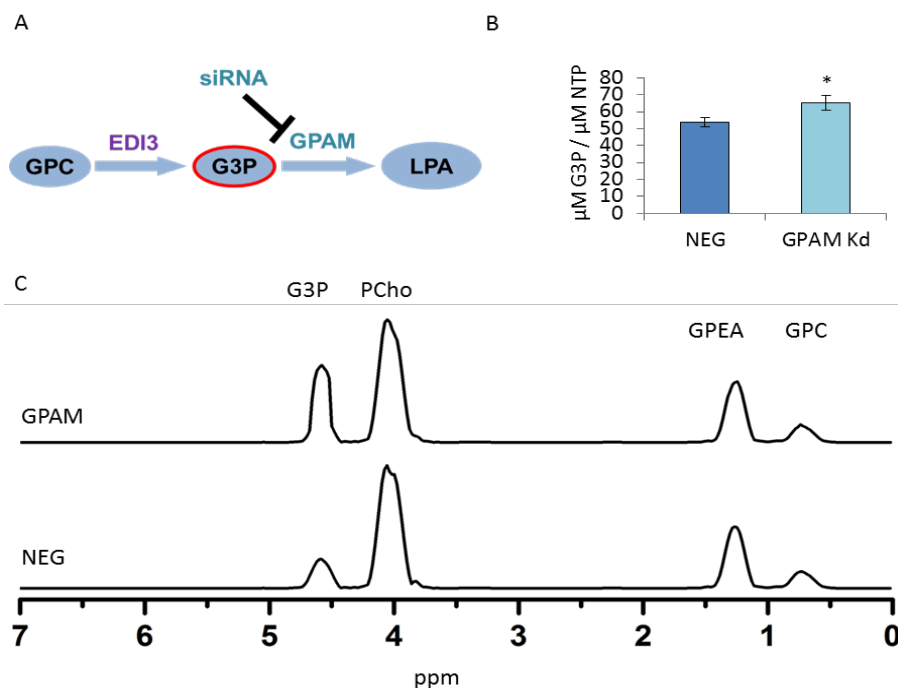
Die Reduktion der GPAM-Expression vermindert das Reaktionsprodukt LPA; bei Anstieg der GPAM-Expression erhöht sich die intrazelluläre LPA-Konzentration.

A) Repräsentative Chromatogramme der LC-MS/MS-Messungen von Palmitoylsäure-LPA (P-LPA) und Oleoylsäure-LPA (O-LPA) in Methanol-Extrakten aus acht Millionen MCF7-Zellen, gelöst mit 50 ng internen Standard in 200 µl Methanol. NEG = MCF7-Zellen behandelt mit unspezifischer Kontroll-siRNA (Invitrogen Stealth Select scr-low#2); GPAM-Kd = MCF7-Zellen, mit siRNA spezifisch für die GPAM-mRNA, zeigen im Vergleich zu NEG eine Reduktion der intrazellulären LPA-Konzentration bei GPAM-Knockdown (hier für P-LPA: NEG 60 ng/ml, GPAM-Kd 35 ng/ml; für O-LPA: NEG 325 ng/ml, GPAM-Kd 217 ng/ml).

B) Repräsentative Spektren für P-LPA und O-LPA in den Methanol-Extrakten aus 8,4 Millionen MCF7-Zellen, die mit dem Kontrollvektor pCMV6 (AMS Bio) behandelt wurden (NEG) im Vergleich zu MCF7-Zellen, die mit pCMV6-GPAM-Vektor behandelt wurden, weisen einen Anstieg der intrazellulären LPA-Konzentration bei GPAM Überexpression (GPAM OE) auf (hier für P-LPA: NEG 56 ng/ml, GPAM-Kd 83 ng/ml; für O-LPA: NEG 652 ng/ml, GPAM-Kd 752 ng/ml).

### 3.4.2 Veränderung der G3P-Konzentration bei GPAM-Knockdown

Um zu prüfen, ob sich bei Modifizierung der GPAM Expression auch die intrazelluläre Konzentration des enzymatischen Substrates Glycerin-3-Phosphat (G3P) ändert, wurden die Metaboliten aus MCF7-Zellen extrahiert. Die getrockneten Extrakte wurden dann zur Bestimmung von G3P mit  $^1\text{H-NMR}$  in deuteriertem Wasser ( $\text{D}_2\text{O}$ ) aufgenommen. Unten stehend ist der Bereich von -1 ppm bis 7 ppm eines  $^{31}\text{P}$ -Spektrums dargestellt. G3P wurde durch zweidimensionale  $^1\text{H-}^{31}\text{P-NMR}$  eindeutig identifiziert und ist im unten stehenden Spektrum neben den Signalen von Phosphocholin (PCho), Glycerophosphocholin (GPC) und Glycerophosphoethanolamin (GPEA), die eine ähnliche chemische Verschiebung haben, annotiert. Die mittlere Substrat-Konzentration ist bei GPAM-Knockdown signifikant um  $24,6 \pm 6 \%$  erhöht (p-Wert = 0,0115). Eine Übersicht über alle biologischen Replikate ist im Anhang (Tabelle A4) zu finden.



**Abb. 3.13: G3P-Konzentration bei GPAM-Knockdown**

Spektren aus quantitativer  $^{31}\text{P-NMR}$  von Methanolextrakten belegen: bei Verringerung der GPAM-Expression erhöht sich die Konzentration an Substrat (G3P).

A) Schema der Behandlung der MCF7-Zellen: GPAM-Kd verringert die GPAM-Enzymaktivität intrazellulär. B) Mittlere Glycerin-3-Phosphat (G3P)-Konzentrationen der drei biologischen Replikate in  $\mu\text{Mol/l}$ , normalisiert auf die  $\mu\text{molare}$  Konzentration an NTPs in der Probe mit Standardabweichungen. Der GPAM-Knockdown zeigt einen Anstieg der Substratkonzentration von  $47 \mu\text{M/NTP} \mu\text{M G3P}$  auf  $58 \mu\text{M/NTP} \mu\text{M G3P}$  um  $24,6 \pm 6 \%$  (Signifikanz mit zweiseitigem t-Test für verbundene Stichproben: \* p-Wert < 0,05). C)  $^{31}\text{P}$ -Spektrum für MCF7-Zellen, behandelt mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NEG) oder siRNA spezifisch für GPAM-mRNA (GPAM-Kd). Phosphocholin (PCho), Glycerophosphocholin (GPC) und Glycerophosphoethanolamin (GPEA)

### 3.5 Die Bedeutung von Cholinkinase für die Migration

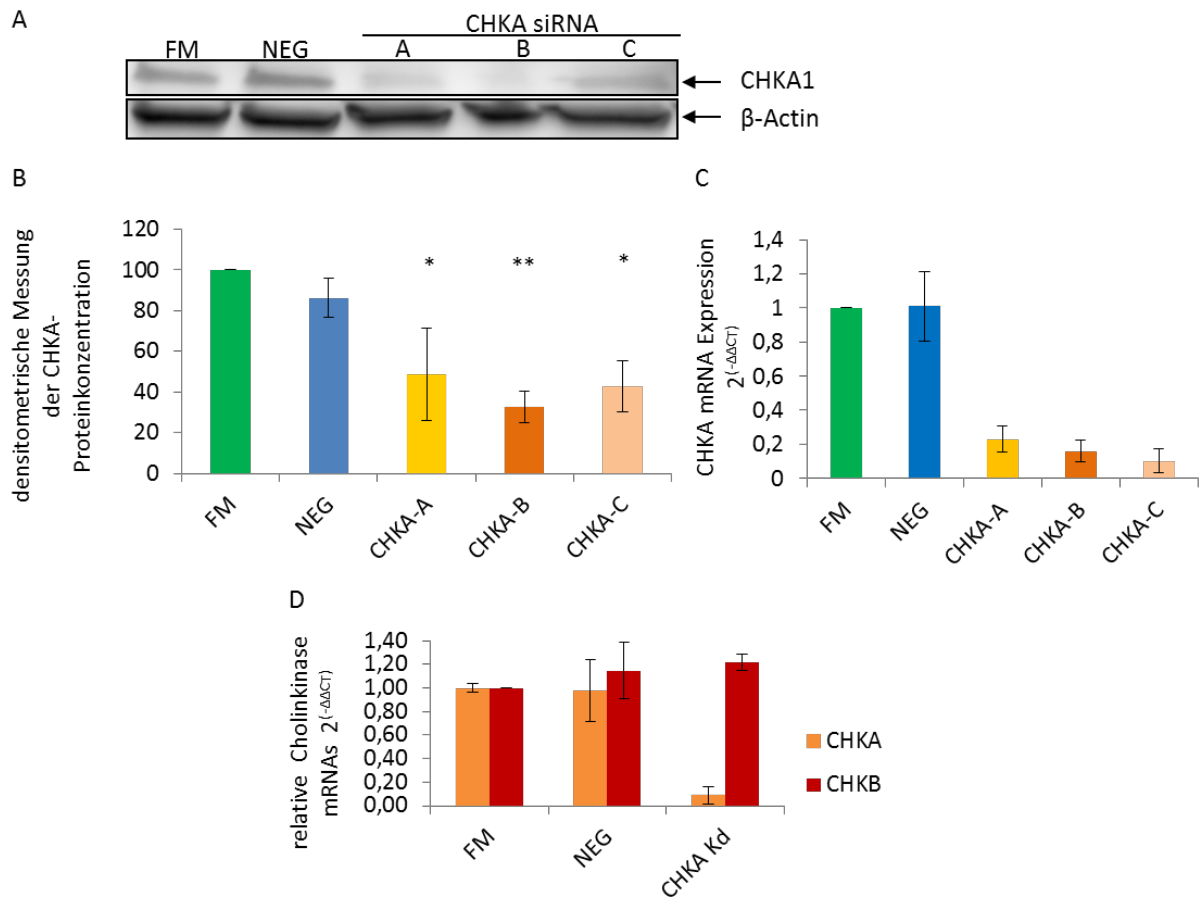
Nachdem nun die Bedeutung von EDI3 und GPAM für die Migration aufgezeigt wurde, sollte untersucht werden, ob Cholinkinase ebenfalls einen Einfluss auf die Migration hat und eine Rolle in dem von EDI3 induzierten migratorischen Phänotyp ausübt. Auf den folgenden Seiten ist die Modifizierung der CHKA-Expression und deren Einfluss auf die Migration beschrieben.

Zunächst wurde für CHKA ein Knockdown etabliert, der die Cholinkinase- $\alpha$ 1- und - $\alpha$ 2-Expression vermindert (Abbildung 3.14), die Expression von Cholinkinase- $\beta$  aber nicht beeinflusst (Abbildung 3.14 D). Der Knockdown mit drei verschiedenen siRNAs konnte auf mRNA und Proteinniveau gezeigt werden (Abbildung 3.14 A-C). Für die Untersuchung der Migration war die Auswahl weiterer siRNAs notwendig (siehe im Abschnitt „3.5.2 Zellmorphologie und Vitalität bei CHKA-Knockdown“ Abbildung 3.15). Die Migration unter Cholinkinase-Knockdown mit drei ausgewählten siRNAs wurde in MCF7-Zellen untersucht (Abbildung 3.16). Als ein Maß für die Reduktion der Cholinkinaseaktivität bei CHKA-Knockdown wurden mittels quantitativer NMR-Spektroskopie die Konzentrationen von Phosphocholin und Cholin ermittelt (Abbildung 3.17).

Der Einfluss der Überexpression von CHKA auf die zelluläre Migration wurde im HEK293-Zellmodell mit dem *Transwell*-Migrationsexperiment ermittelt (Abbildung 3.18).

#### 3.5.1 Überprüfen der CHKA-Knockdown-Effizienz in MCF7-Zellen

Für das Cholinkinase-alpha-Gen *CHKA* existieren zwei alternative mRNAs, welche die Proteine ChoK $\alpha$ 1 (52 kDa) und ChoK $\alpha$ 2 (50 kDa) codieren. Bei Knockdown von CHKA werden immer beide Isoformen reduziert, da alle verwendeten siRNA-Oligos zu beiden Transkripten homolog sind (siehe Anhang). In MCF7-Zellen wurde die Cholinkinase-alpha-mRNA-Expression mit Hilfe von drei verschiedenen siRNA-Oligos reduziert. Die mRNA von CHKA ist im Mittel um 78 % mit Oligo-A, um 84 % mit Oligo-B und um 90 % mit Oligo-C reduziert. Auch das CHKA-Protein wird durch alle drei siRNA-Oligos vermindert, im Mittel um 60 %. Dies wurde durch Immunodetektion mit drei verschiedenen Antikörpern gegen CHKA verdeutlicht. In Abbildung 3.14A ist exemplarisch der Immunoblot von CHKA unter Verwendung des Abcam #ab88053 Antikörpers gezeigt.



**Abb. 3.14: Transfektion mit siRNA, spezifisch für CHKA, vermindert die CHKA-Expression in MCF7-Zellen**

A) Die Reduktion der CHKA Expression wurde auf Proteinniveau bestätigt; exemplarisch CHKA mit Abcam ab88053 Antikörper in MCF7-Gesamtzell-Lysat detektiert.

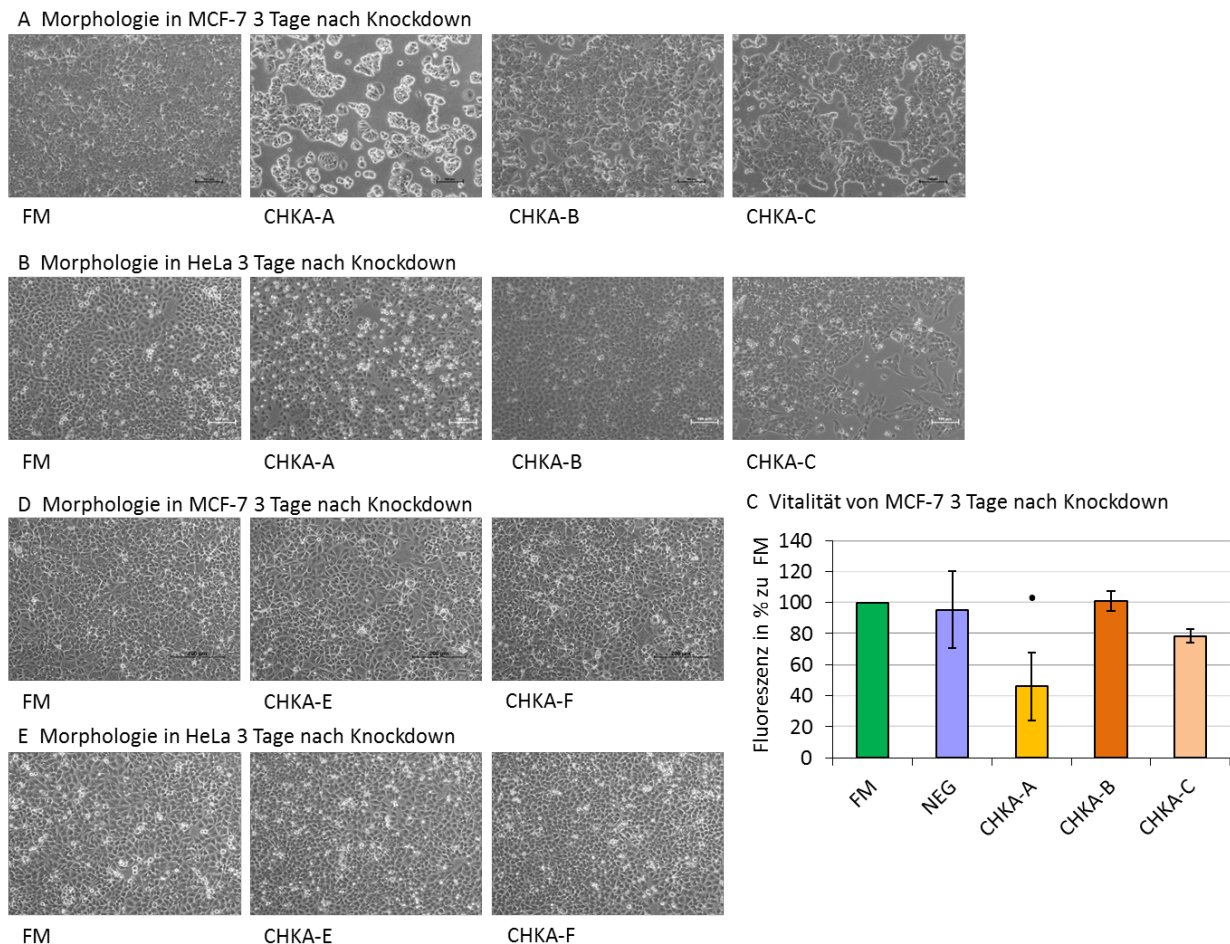
B) Mittelwert von fünf densitometrischen Messungen der CHKA-Western Blot-Bandenstärke mit Standardabweichung zeigt eine Reduktion der Konzentration des Cholinaseproteins um 80 % für Oligo-B, um 60 % für Oligo-C und um 50 % für Oligo-A.

C) Relative CHKA-mRNA-Konzentration in MCF7-Zellen, transfiziert mit je 20 nM siRNA spezifisch für CHKA (Invitrogen Stealth Select A-C), gemessen mit Real-Time-PCR und berechnet nach  $\Delta\Delta CT$ -Methode relativ zu unbehandelten Zellen (FM), zeigt eine Reduktion der CHKA-mRNA-Konzentration bei Transfektion mit siRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) um 78 % für die siRNA CHKA-A, 84 % für die siRNA CHKA-B und 90 % für die siRNA CHKA-C. Behandlung mit unspezifischer Kontroll-siRNA bewirkt keine gravierende Veränderung der CHKA-mRNA-Konzentration. Der Graph zeigt die Mittelwerte von minimal sechs biologischen Replikaten mit Standardabweichung.

D) Relative Cholinase-mRNA-Konzentrationen in MCF7-Zellen, transfiziert mit je 20 nM siRNA spezifisch für Cholinase-alpha (CHKA-Kd) (Invitrogen Stealth Select Oligo-B), gemessen mit Real-Time-PCR und berechnet nach  $\Delta\Delta CT$ -Methode relativ zu unbehandelten Zellen (FM). Der effektive CHKA-Knockdown (gelbe Balken) erhöht die Expression von Cholinase-beta (CHKB) nicht signifikant (rote Balken).

### 3.5.2 Zellmorphologie und Vitalität bei CHKA-Knockdown

Die siRNAs zeigen zum Teil eine Auswirkung auf die Morphologie von MCF7-Zellen (siRNA-B, Vergleich Abbildung 3.15A). Zudem beeinträchtigt eine der siRNAs die Zellvitalität von MCF7-Zellen (Abbildung 3.15C) und HeLa-Zellen (lichtmikroskopische Aufnahmen in Abb. 3.15B).



**Abb. 3.15: Einflüsse der verschiedenen CHKA siRNA-Oligos auf die Zellvitalität**

A-B) Repräsentative Abbildungen der (A) MCF7-Zellmorphologie und (B) HeLa-Zellmorphologie: unbehandelt (FM) und 72 h nach Transfektion mit 20 nM siRNA spezifisch gegen CHKA1/2-mRNA (Invitrogen Stealth Select A-C); Messbalken entspricht 100  $\mu$ m.

C) Quantifizierung der Zellvitalität mit PrestoBlue®-Zellfarbstoff von drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung zeigt deutlich die verschlechterte Zellvitalität durch siRNA-A (HSS140690) gegenüber der Behandlung mit Kontroll siRNA (NEG). Der P-Wert im einseitigen t-Test beträgt 0,03.

D-E) Repräsentative Abbildungen der (D) MCF7-Zellmorphologie und (E) HeLa-Zellmorphologie: unbehandelt (FM) und 72 h nach Transfektion mit 5 nM siRNA spezifisch gegen CHKA1/2-mRNA (Ambion Select siRNA E-F). Die Vergrößerung ist identisch für MCF7- und HeLa-Zellen. Der Messbalken entspricht 200  $\mu$ m.

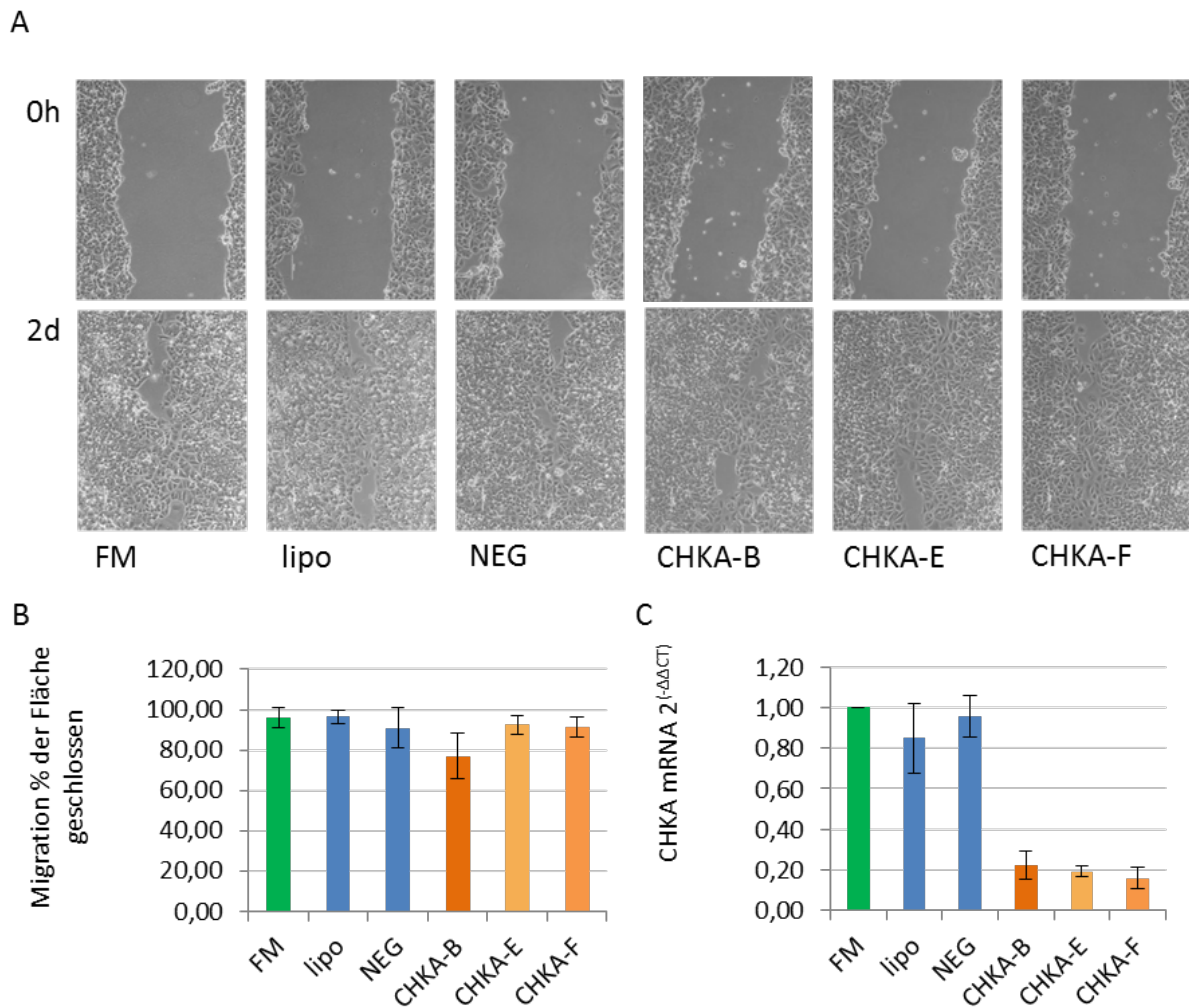
Die angestrebte Untersuchung der Migration in MCF-7 war mit siRNA-Oligo-A aufgrund reduzierter Zelldichte nach der Transfektion nicht möglich. Eine verminderte Proliferation durch die CHKA-siRNA-A (CHKAHSS140690) wurde bereits von Yalcin *et al.* an HeLa-Zellen beschrieben und daher nicht für die folgenden Migrationsexperimente verwendet. Die mit dem PrestoBlue® ermittelte Beeinträchtigung der Zellvitalität mit CHKA-siRNA-Oligo -A und -C entspricht den lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen. Beim Knockdown von CHKA mit siRNAs der Firma Ambion (Oligo-E und -F), die in geringeren Konzentrationen als die Stealth Select siRNAs verwendet werden konnten, war lichtmikroskopisch keine Beeinträchtigung der Zellvitalität oder Morphologie von MCF7- und HeLa-Zellen festzustellen.

### **3.5.3 CHKA-Knockdown hat keinen Einfluss auf die Zellmigration**

MCF7-Zellen wurden mit drei verschiedenen CHKA-spezifischen siRNAs transfiziert. Der Migrationsversuch wurde 72 h danach durchgeführt. Die CHKA-siRNA-B führte zu einer geringfügigen aber nicht signifikanten Verminderung der Migration. Nach zwei Tagen waren die mit Oligo-E und -F transfizierten Zellen genauso weit gewandert wie untransfizierte Zellen (FM) oder Zellen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurden (NEG). Auch das Transfektionsreagenz allein (lipo) hat keinen Einfluss auf die Migration von MCF7-Zellen.

Der Knockdown bei den gezeigten Migrationsexperimenten betrug im Mittel zu Beginn des Experimentes 78-84 % für die einzelnen Oligos (Abbildung 3.16). Am Ende des Experimentes (2d) wurde die Knockdown-Effizienz stichprobenartig überprüft und war sehr gut (um 90 %, Daten nicht gezeigt).





**Abb. 3.16: CHKA-Knockdown hat keinen Einfluss auf die Migration von MCF7-Zellen**

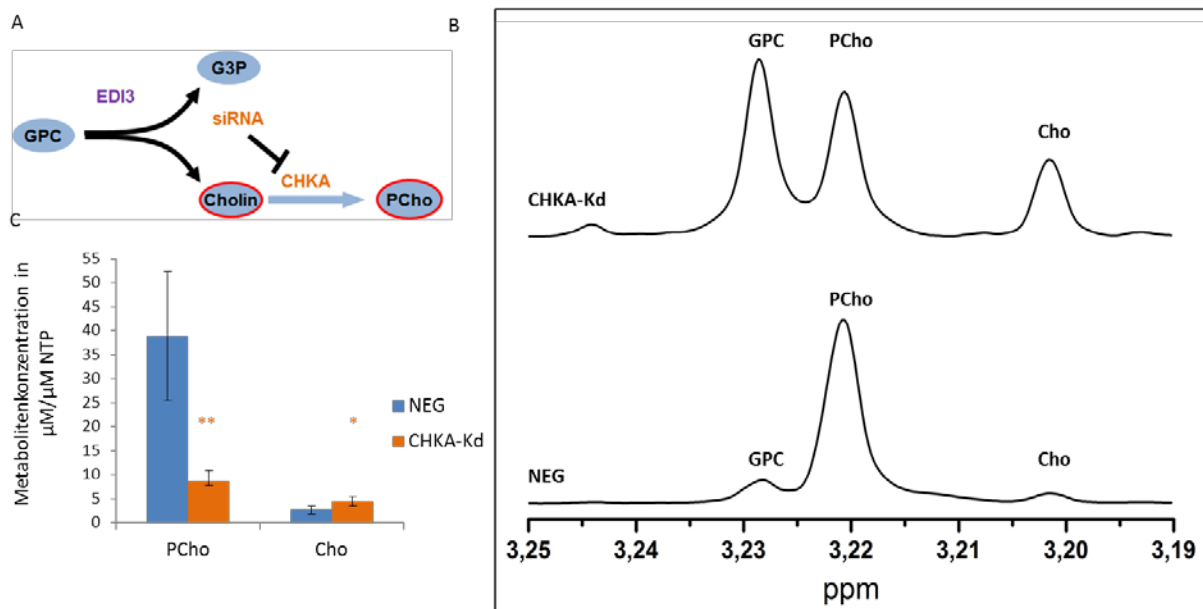
A) Repräsentative Bilder eines Migrationsexperimentes, MCF7-Zellen transfiziert für 72 h mit drei verschiedenen spezifischen siRNA-Oligos für CHKA von Invitrogen Stealth Select (CHKA-B; 20 nM) und Invitrogen Ambion Select (CHKA-E und -F; 5 nM), im Vergleich zu den Kontrollen: Medium allein (FM), Medium mit Lipofectamine-RNAiMAX®-Transfektionsreagenz (lipo) und Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA von Invitrogen Ambion Select (NEG; 5 nM). Die Bilder veranschaulichen die Migration der Zellen über die freie Fläche im Zellrasen innerhalb von 48 h (Zeitpunkt 0h-2d). Der Messbalken entspricht 100 µm.

B) Quantifizierung der verbliebenen Fläche nach 24 h, als prozentuale Migration der Fläche zu Beginn des Experimentes (0h). Die Mittelwerte von sechs biologischen Replikaten zeigen keine signifikante Reduktion der Zellmigration durch CHKA-spezifische siRNA-Oligos.

C) Relative CHKA-mRNA-Konzentration mit Standardabweichung der obigen sechs biologischen Replikate zu Beginn des Migrationsexperimentes (0h), gemessen mit Real-Time-PCR und berechnet nach  $\Delta\Delta C_T$  Methode relativ zu unbehandelten Zellen (FM), zeigt eine Reduktion der CHKA-mRNA-Konzentration bei Transfektion mit siRNA (Oligo-B, -E und -F) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (FM) um 78-84 % 72 h nach dem Knockdown.

### 3.5.4 Metabolische Funktion des CHKA-Knockdowns

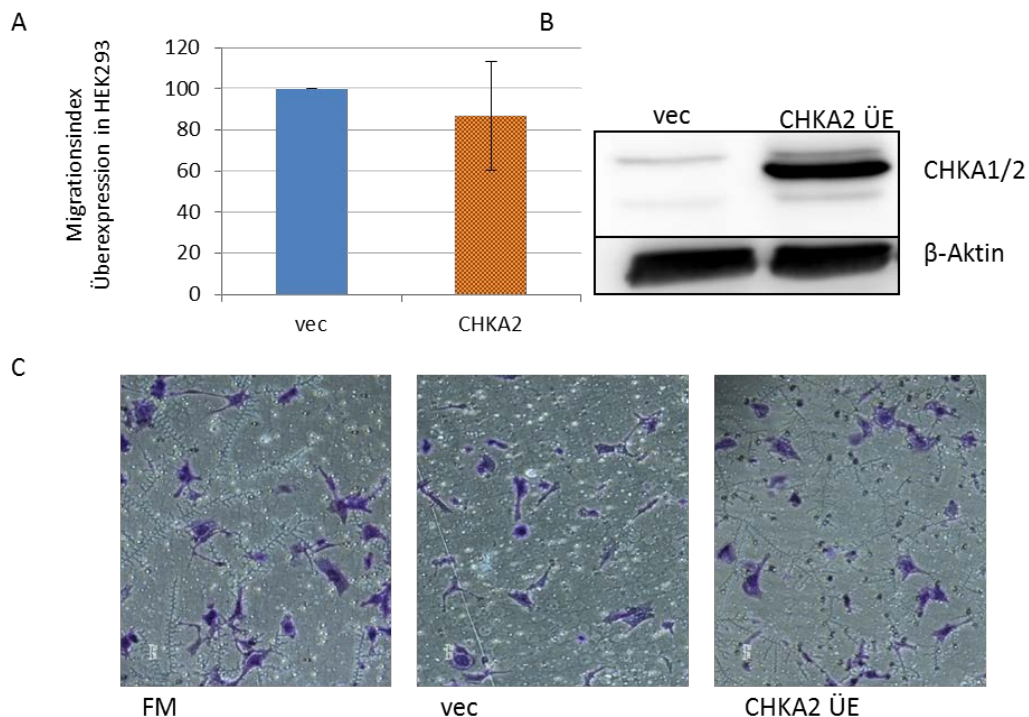
Um zu prüfen, ob der Knockdown von CHKA in MCF7-Zellen nicht funktionell ist, wurden zusätzlich zur Überprüfung der Knockdown-Effizienz auf mRNA und Proteinniveau (Vergleich Abbildung 3.14) die Metaboliten der Cholinkinaseaktivität bei CHKA-Knockdown bestimmt. Die enzymatische Funktion von Cholinkinase ist die Phosphorylierung von Cholin zu Phosphocholin (PCho). Bei Cholinkinase-Knockdown sollte das enzymatische Produkt PCho intrazellulär abnehmen und die Konzentration an Substrat (Cholin) zunehmen. Abbildung 3.17 zeigt deutlich, dass durch CHKA-Knockdown die Konzentration an intrazellulärem PCho um  $76,7 \pm 3,5 \%$  reduziert wird, während die Konzentration des Substrates Cholin um  $70 \pm 22,6 \%$  deutlich ansteigt.



**Abb. 3.17: Quantitative NMR-Spektroskopie von Methanol-Extrakten aus MCF7-Zellen**  
 A) Schema der Behandlung der MCF7-Zellen: CHKA-Kd verringert die CHKA-Enzymaktivität intrazellulär.  
 B)  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von MCF7-Zellextrakten, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NEG; Invitrogen Stealth Select scr low#2) oder mit spezifischer siRNA gegen CHKA (CHKA-Kd; Invitrogen Oligo-B) behandelt wurden. Metaboliten: Glycerophosphocholin (GPC), Phosphocholin (PCho), Cholin (Cho).  
 C) Cho- und PCho-Konzentrationen aus drei biologischen Replikaten in  $\mu\text{Mol/l}$ , normalisiert auf die  $\mu\text{molare}$  Konzentration an NTPs in der Probe mit Standardabweichungen. Der CHKA-Knockdown zeigt eine Reduktion der PCho-Produktkonzentration um  $76,7 \pm 3,5\%$ , von  $38,9 \mu\text{M/NTPs } \mu\text{M}$  auf  $8,7 \mu\text{M/NTPs } \mu\text{M}$ . Die Cholin-Substratkonzentration (Cho) erhöht sich bei CHKA-Knockdown im Vergleich zu MCF7-Zellen mit Kontrollbehandlung (NEG) auf  $170 \pm 22,6\%$ , von durchschnittlich  $2,75 \mu\text{M/NTPs } \mu\text{M}$  auf  $4,5 \mu\text{M/NTPs } \mu\text{M}$ . Die Signifikanz wurde mit zweiseitigem Student-t-Test ermittelt: \* p-Wert < 0,05.

### 3.5.5 CHKA-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Zellmigration

Ein Knockdown von CHKA hat keinen Einfluss auf die Migration von MCF7-Zellen. Shah *et al.* konnte 2010 zeigen, dass MCF7-Zellen, die stabil mit CHKA1 transfiziert wurden, mehr Phosphocholin enthalten und aggressiver sind. Eine transiente Überexpression von CHKA Isoform B (CHKA2) in HEK293-Zellen zeigt in unseren Experimenten keinen Einfluss der Cholin kinase- $\alpha$  auf die Migration. Dazu wurden HEK293-Zellen mit dem pCMV6-CHKA-Vektor transfiziert und nach 48 h geerntet und zur Untersuchung der Migration auf einem Transwell-Filter ausgesät. Nach weiteren 18 h bei 37 °C wurden die Zellen fixiert, gefärbt und für jede Versuchsbedingung 12 Felder je Filter ausgezählt. Der Graph in Abbildung 3.18 A zeigt das Mittel aus drei biologischen Replikaten als Migrationsindex relativ zu den Zellen, die mit dem pCMV6 entry-Kontrollvektor transfiziert waren.



**Abb. 3.18: Überexpression von CHKA2 in HEK293-Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellmigration**

A) Migrationsindex, in Prozent zum Kontrollvektor pCMV6-entry (vec), zeigt den Mittelwert der migrierten Zellen von 12 randomisiert aufgenommenen Bildern eines Filters, normalisiert zur Zellzahl in einer Kontrollkultivierung ohne Filter.

B) Überexpression von CHKA2 in HEK239-Zellen detektiert mit Western Blot in Gesamtzell-Lysat (SAB1405616).

C) Repräsentative Abbildungen von HEK293-Zellen, 18 h migriert durch 8  $\mu$ m Poren in der Filtermembran, die mit 10  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Fibronectin beschichtet wurde. Es sind mehr pCMV6-entry-CHKA2 transfizierte Zellen (CHKA2 ÜE) durch den Filter migriert als Zellen, die mit dem Kontrollvektor pCMV6-entry (vec) transfiziert wurden.

### **3.6 Vergleich der Bedeutung von EDI3, GPAM und CHKA für die Migration**

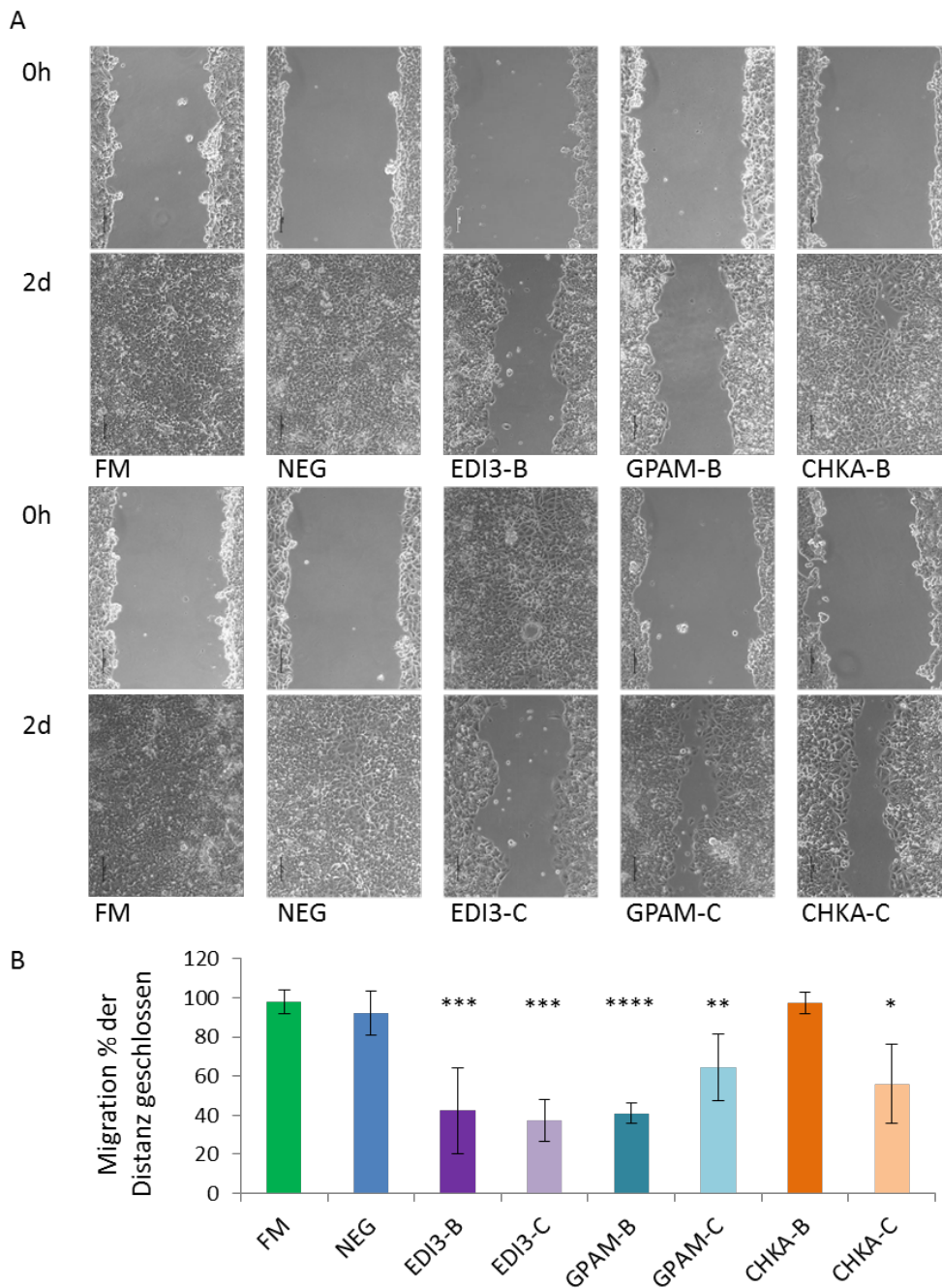
Durch die bisher durchgeführten Experimente ist deutlich aufgezeigt worden, dass die Cholinase keinen Einfluss auf die Migration aufweist. Unter der Annahme, dass die enzymatischen Produkte von EDI3 für den beobachteten Einfluss auf die Migration verantwortlich sind, spielt vermutlich GPAM für die Ausprägung des Phänotyps eine entscheidende Rolle, da GPAM G3P weiter zu LPA verstoffwechselt. Ob die enzymatische Funktion von GPAM notwendig und hinreichend für die Migration ist, sollte durch direkten Vergleich von EDI3- und GPAM-Knockdown näher betrachtet werden.

Hierzu erfolgten Migrationsexperimente mit dem bereits etablierten Migrationsversuch. Durch das Beobachten einer in die konfluente Kultur eingebrachten Lücke für MCF7- und HeLa-Zellen, wurde die Migration mit je zwei siRNAs je Gen, bei absolut identischen Versuchsbedingungen, für EDI3, GPAM und CHKA untersucht.

In Abbildung 3.15 war zu sehen, dass CHKA-Oligo-C die Morphologie der MCF7-Zellen verändert. Um gleiche siRNA-Konzentrationen für die vergleichenden Migrationsversuche einsetzen zu können, wurde diese siRNA dennoch verwendet. So konnten jeweils siRNA Oligo-B und Oligo-C für alle drei Gene mit einer Endkonzentration von 20 nM eingesetzt werden.

#### **3.6.1 Migration von MCF7-Zellen bei EDI3- und GPAM-Knockdown**

Die Abbildung 3.19 zeigt repräsentative Bilder und die Auswertung des Einflusses auf die Migration von MCF7-Zellen bei Knockdown von EDI3, GPAM und CHKA mit je zwei Oligos derselben Firma, bei gleichen Konzentrationen. Jeweils ein Oligo pro Gen und die entsprechenden Kontrollen befanden sich zum direkten Vergleich der Migration auf einer Kulturplatte. 72 h nach Knockdown wurde der Migrationsversuch wie bereits beschrieben durchgeführt und das Experiment abgeschlossen, sobald die Kontrolle ohne Behandlung (FM) die Lücke vollständig geschlossen hatte (nach 48 h). Dieser direkte Vergleich belegt, dass GPAM-Kd und EDI3-Kd die Migration ähnlich stark verlangsamen.



**Abb. 3.19: Vergleichende Migrationsanalysen in MCF7-Zellen**

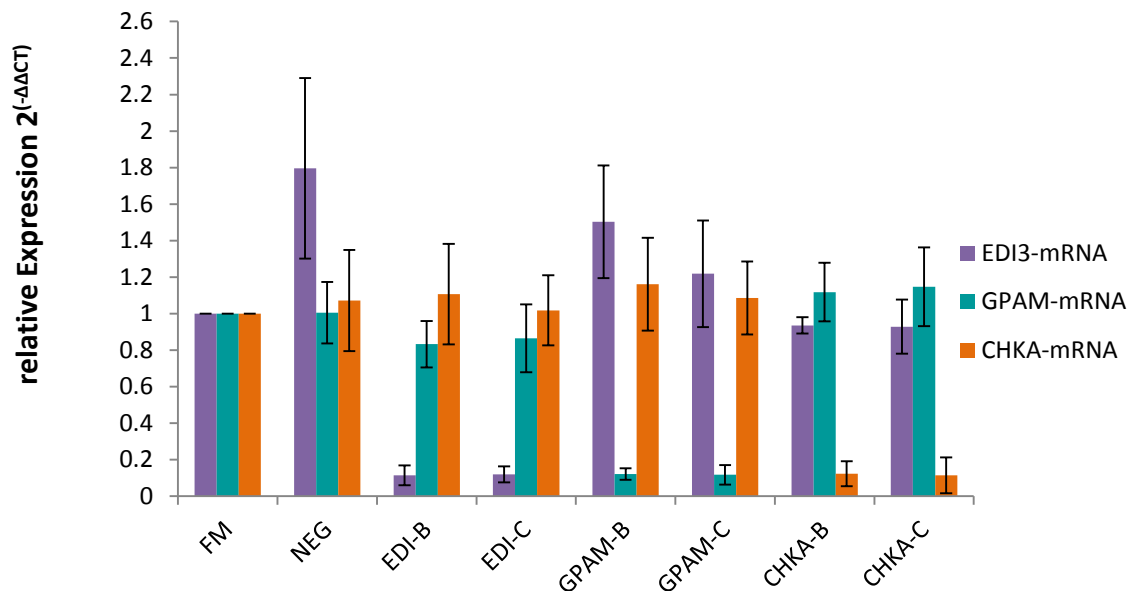
EDI3- und GPAM-Knockdown vermindern signifikant die Migration von MCF7-Zellen.

A) Repräsentativ gezeigt ist je ein Bild eines Migrationsexperimentes, bestehend aus je drei Bildern pro Bedingung: ohne Behandlung (FM), transfiziert mit 20 nM unspezifischer siRNA scr low-#1 von Invitrogen Stealth Select (NEG) und transfiziert mit je zwei spezifischen siRNAs für die Gene EDI3 und CHKA (EDI3-B, EDI3-C, GPAM-B, GPAM-C, CHKA-B und CHKA-C). Der Messbalken entspricht 100 µm.

B) Auswertung der Mittelwerte von 5 biologischen Replikaten mit Standardabweichung zeigt eine Reduktion der MCF7-Migration um  $58 \pm 22$  % für EDI3-B siRNA, um  $62,7 \pm 11$  % für EDI3-C siRNA, um  $59,3 \pm 5$  % für GPAM-B siRNA und um  $36 \pm 17$  % für GPAM-C siRNA. CHKA-B siRNA hat keinen Einfluss auf die Migration, während CHKA-C siRNA zu einer Verminderung der Migration um  $44 \pm 20$  % führt. Die Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt und auf multiples Testen adjustiert (p-Wert < 0,05 \*; p-Wert < 0,005 \*\*; p-Wert < 0,0005 \*\*\*; p-Wert < 0,00005 \*\*\*\*).

Wie in Abbildung 3.19 ersichtlich, wurde die Migration durch die Kontroll-siRNA scr low#2 nicht signifikant beeinflusst. Der Knockdown mit EDI3-siRNA ergab für Oligo-B eine Reduktion der Migration um  $58 \pm 22$  %. Oligo-C reduziert die Migration um  $62,7 \pm 11$  %. Gemittelt über beide verwendeten siRNAs verlangsamt der EDI3-Knockdown die Migration um  $60 \pm 16,5$  %. Die GPAM Oligos vermindern die Migration um  $59 \pm 5$  % für Oligo-B und um  $36 \pm 17$  % für Oligo-C. Gemittelt über beide verwendeten siRNAs reduziert der GPAM-Knockdown die Migration um  $47,5 \pm 17$  %, diese Reduktion ist somit nicht ganz so deutlich wie die bei dem EDI3-Knockdown.

Der CHKA Oligo-B beeinflusst die Migration von MCF7-Zellen nicht, während mit dem Oligo-C eine Reduktion um  $44 \pm 20$  % zu beobachten ist. Gemittelt über die zwei verwendeten siRNAs, reduziert der CHKA-Knockdown die Migration um  $27 \pm 31$  % nicht signifikant.



**Abb. 3.20: Real-Time-PCR zeigt die Knockdown-Effizienz im Migrationsexperiment**

Je zwei siRNAs (siRNA-B und siRNA-C) zeigen eine effektive Verminderung der Ziel-mRNA um 88%.

Die Knockdown-Effizienz wurde für die fünf biologischen Replikate des Migrationsversuches mit siRNA-B und siRNA-C anhand Real-Time-PCR überprüft (Abbildung 3.20) und betrug ca. 88 % für alle Behandlungen. Die EDI3-mRNA-Konzentration wird durch die unspezifische siRNA (NEG) erhöht. Die Behandlungen mit EDI3-siRNA verändern zum Teil die Expression der anderen untersuchten Gene. Demnach war die GPAM-mRNA bei EDI3-siRNA im Mittel um

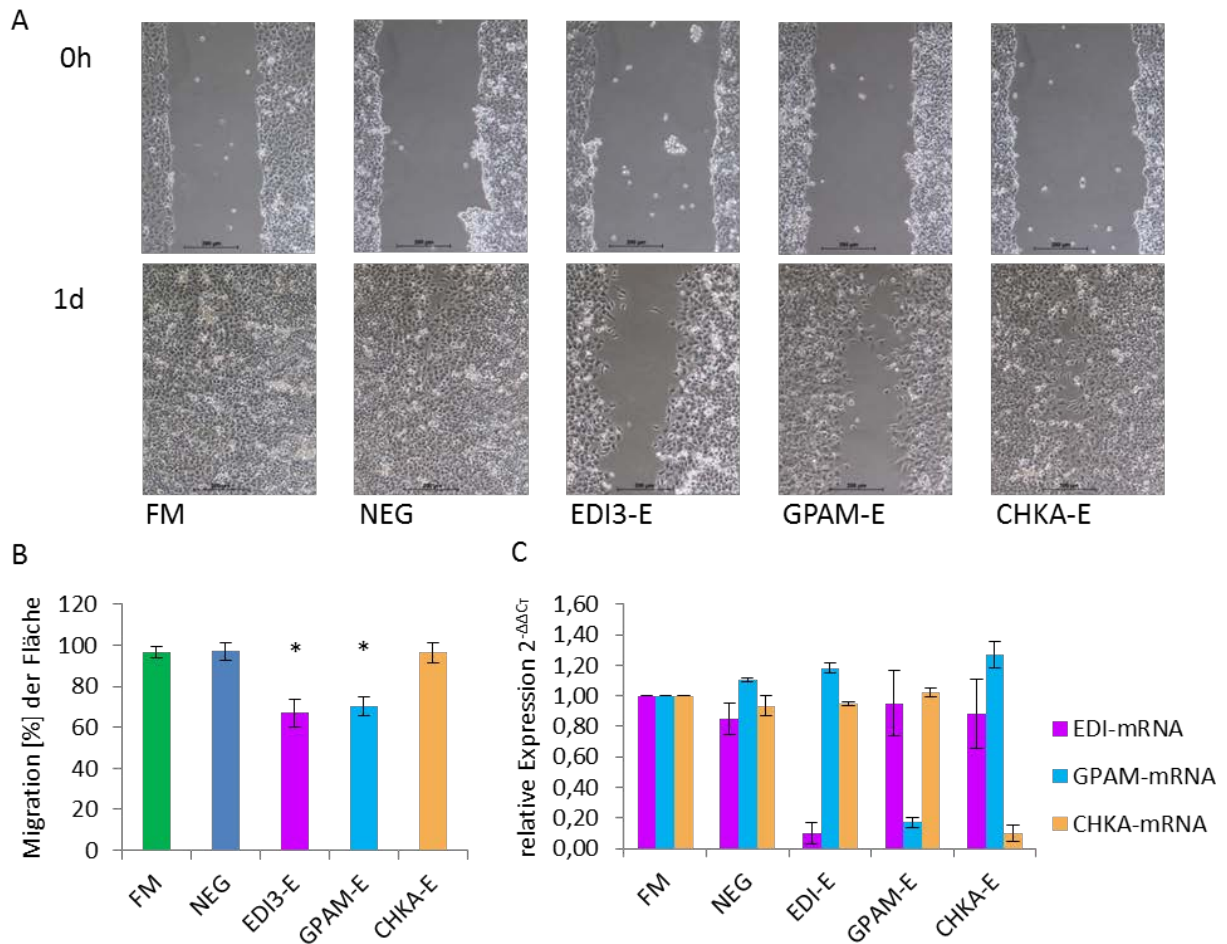
15 % verringert. Die Standardabweichung betrug 15 %. Die Nebenwirkung der EDI3-siRNA auf die GPAM Expression war nicht signifikant. Die CHKA-mRNA war bei EDI3-siRNA im Mittel nur geringfügig um 3,6 % vermindert, mit einer Standardabweichung von 3 %. Die Behandlung der Zellen mit CHKA-C-siRNA verminderte bei drei von fünf Experimenten die EDI3-mRNA-Konzentration um durchschnittlich 45 %. Bei diesen drei Versuchen handelte es sich um jene Wiederholungen, die den stärksten Effekt von CHKA-C-siRNA auf die Migration im MCF7-Zellmodell zeigen. Betrachtet man jedoch die EDI3-mRNA-Expression mit Standardabweichung aller fünf biologischen Replikate, so vermindert der CHKA-Knockdown die EDI3-mRNA nicht signifikant ( $15 \% \pm 18 \%$ ).

### 3.6.2 Migration von HeLa-Zellen bei EDI3- und GPAM-Knockdown

Nachdem gezeigt werden konnte, dass GPAM und EDI3, nicht aber CHKA, einen Effekt auf die Zellmigration haben, sollte dies an einer zweiten Zelllinie bestätigt werden. Durch Verwendung von HeLa-Zellen konnte das Migrationsexperiment *scratch assay* beibehalten werden.

Der EDI3-Knockdown mit siRNA-E vermindert die Migration von HeLa-Zellen um  $33 \pm 7 \%$ . Der GPAM-Knockdown senkt das Migrationspotenzial um  $30 \pm 5 \%$ . Der Cholinkinase-Knockdown mit siRNA-E hat keinen Einfluss auf die Migration ( $3,5 \pm 5 \%$ ). Die Verwendung der CHKA-siRNA-E in HeLa-Zellen hat die EDI3-Expression nicht signifikant beeinflusst. Die GPAM-Expression wird bei Verwendung von CHKA-siRNA-E in HeLa-Zellen um 25 % erhöht (Abbildung 3.21). Diese Veränderung erreicht jedoch keine statistische Signifikanz (zweiseitiger t-Test auf multiples Testen mit  $n=3$  adjustiert p-Wert = 0,093).

Somit weisen die Knockdowns in HeLa-Zellen dieselben Ergebnisse auf, wie die in den MCF7-Zellen. Der EDI3- und GPAM-Knockdown verlangsamten die Migration, während der CHKA-Knockdown keinen Einfluss darauf hat.



**Abb. 3.21: Vergleichende Migrationsanalysen in HeLa-Zellen**

Die EDI3- und GPAM-Knockdowns vermindern signifikant die Migration von HeLa-Zellen, nicht aber der CHKA-Knockdown.

A) Repräsentativ je ein Bild eines Migrationsexperimentes, bestehend aus je vier Bildern je Bedingung: Ohne Behandlung (FM), transfiziert mit 5 nM unspezifischer siRNA von Invitrogen Ambion Select (NEG) und transfiziert mit je 5 nM einer spezifischen siRNA für die Gene EDI3, GPAM und CHKA (EDI3-E, GPAM-E, CHKA-E).

B) Auswertung der Mittelwerte von mindestens drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung. EDI3 und GPAM vermindern die Migration von HeLa-Zellen um ca. 30 %. Die Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt und auf multiples Testen adjustiert (\*p-Wert < 0,05).

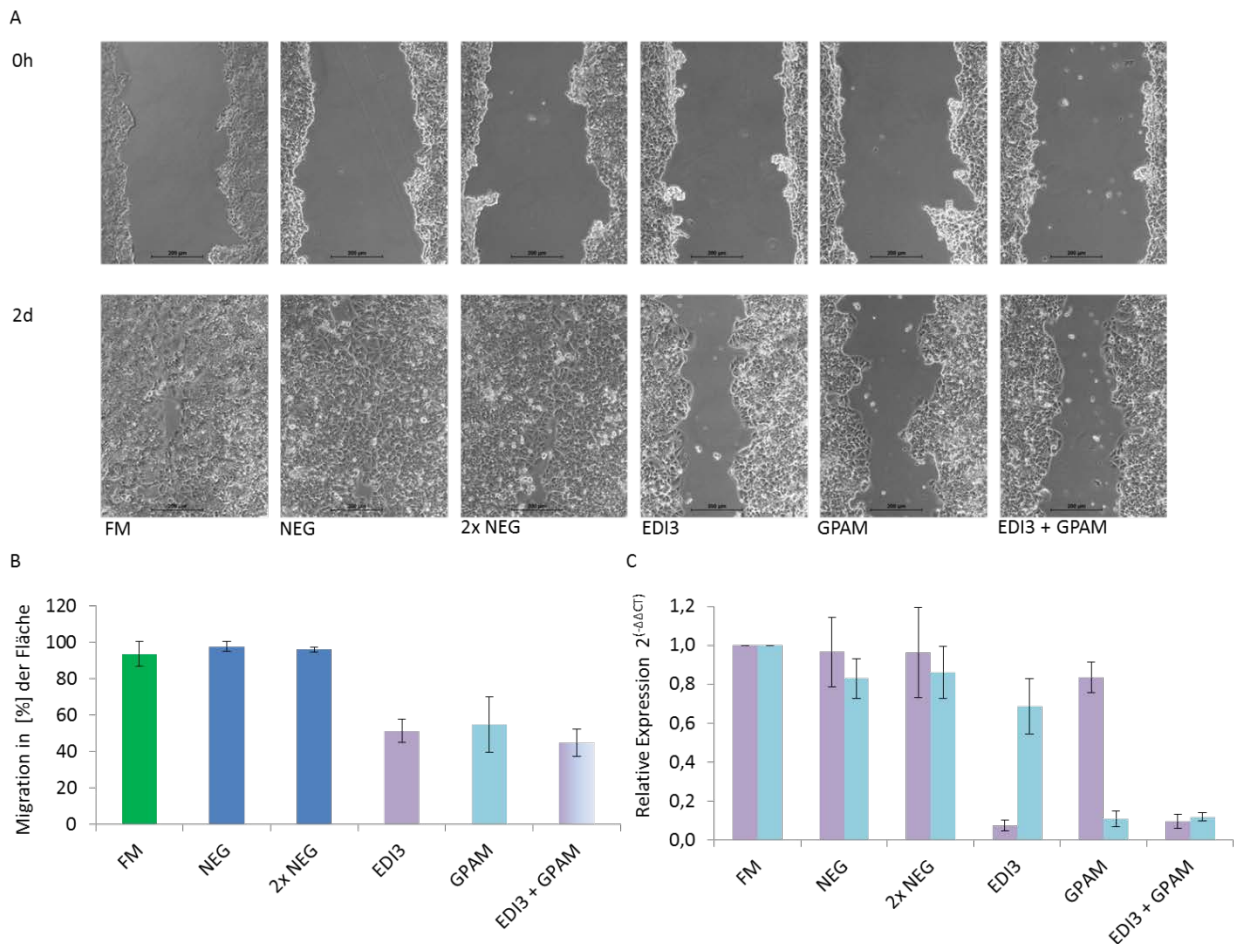
C) Die Expression der Zielgene EDI3, GPAM und CHKA wurde für alle Behandlungen zu Beginn des Migrationsexperimentes überprüft. Die Knockdown-Effizienz betrug 90 % für EDI3 und CHKA und 83 % für GPAM.



### 3.6.3 GPAM- und EDI3-Kd haben keinen additiven Effekt auf die Migration

Sowohl für EDI3 als auch für GPAM konnte ein Effekt auf die Migration verdeutlicht werden. Das EDI3-Produkt ist das Substrat für GPAM. Wenn der migratorische Phänotyp metabolisch bedingt ist, greifen beide Enzyme in dasselbe Signal ein. Bei einer simultanen Modulation beider Enzyme wäre keine Verstärkung des Effektes auf die Migration zu erwarten. Sollte es sich um unabhängige Einflüsse auf die Migration handeln, würde sich bei simultaner Reduktion beider Enzyme der Effekt auf die Migration verstärken. Im folgenden Experiment wurden sowohl EDI3 als auch GPAM in MCF7-Zellen gleichzeitig reguliert.

Die Verlangsamung der Migration um  $55 \pm 15 \%$  bei simultanen Knockdown von EDI3 und GPAM ist nicht signifikant abweichend gegenüber den Knockdowns der einzelnen Enzyme ( $49 \pm 6 \%$ ). Der Knockdown für EDI3 und GPAM, bei Verwendung beider siRNAs, ist mit ca. 90 % in gleicher Weise effizient wie die Reduktion der Expression beim einfachen Knockdown. Wie der Abbildung 3.22C zu entnehmen ist, hat bei diesen Versuchen bereits die alleinige Verwendung der EDI3-siRNA die mittlere GPAM-Expression um 31,4 % reduziert.



**Abb. 3.22: Simultaner Knockdown von EDI3 und GPAM verstärkt den Effekt auf die Migration nicht**

A) Repräsentative Bilder eines Migrationsexperimentes in unbehandelten MCF7-Zellen (FM), behandelt mit 20 nM siRNA scr-low#2 von Invitrogen Stealth Select (NEG) beziehungsweise einzeln behandelt mit 20 nM der spezifischen siRNAs gegen EDI3 und GPAM; oder behandelt mit beiden siRNAs ( $\Sigma$  40 nM) Stealth Select siRNA EDI3-B und GPAM-B.

B) Quantifizierung der Migration mit ImageJ MiToBo von je drei Bildern, pro Zeitpunkt und Bedingung bei Knockdown von EDI3 und/oder GPAM in MCF7-Zellen, weist den gleichen Effekt auf die Migration bei EDI3-Knockdown ( $49\% \pm 6\%$ ) auf wie bei EDI3 + GPAM-Knockdown ( $55\% \pm 15\%$ ) in MCF7-Zellen. Der Graph illustriert die Mittelwerte des Migrationsindexes als prozentualen Anteil der Fläche, welche geschlossen wurde von mindestens drei biologisch unabhängigen Replikaten mit Standardabweichung.

C) Die Expression der Zielgene EDI3 und GPAM wurde zu Beginn des Migrationsexperimentes überprüft. Die EDI3-Knockdown-Effizienz betrug  $92,4\%$  für EDI3-siRNA und  $90,3\%$  für EDI3/GPAM-siRNA-Gemisch. Die GPAM-Knockdown-Effizienz betrug  $89\%$  für GPAM-siRNA und  $88\%$  für EDI3/GPAM-siRNA-Gemisch.

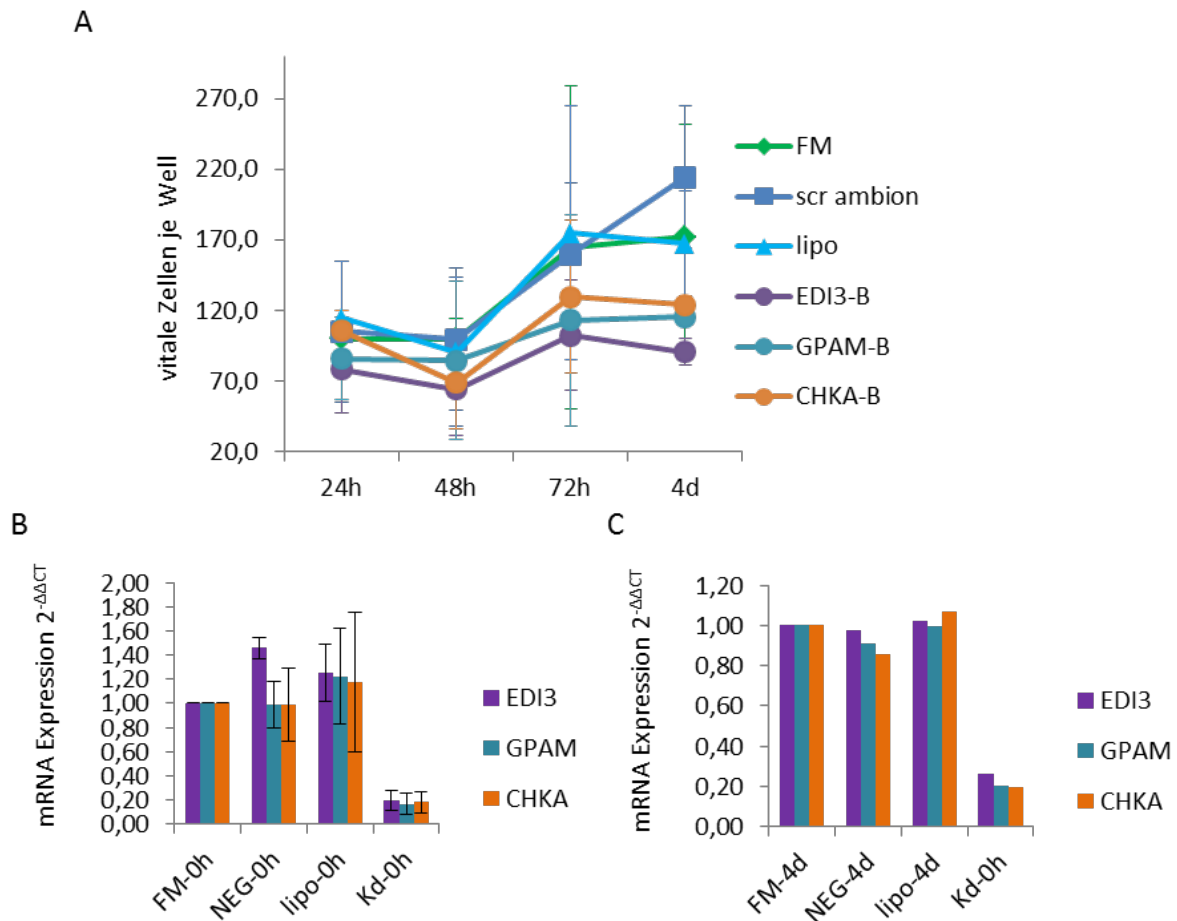
### **3.7 Die Proliferation ist im Migrationsexperiment nicht beeinflusst.**

Alle Migrationsexperimente in MCF7- und HeLa-Zellen wurden in konfluenter Monokultur durchgeführt. Unter diesen Bedingungen findet durch Kontaktinhibierung kaum Proliferation der Zellen statt. Auf die Verwendung eines Proliferationsinhibitors wurde daher verzichtet. Um eine mögliche Verfälschung der Migrationsergebnisse durch Beeinflussung der Proliferation im Knockdown-Experiment zu registrieren, wurden Wachstumskurven für je eine siRNA der untersuchten Gene in den beiden Zelllinien erstellt.

Bei Untersuchung der Proliferation von MCF7-Zellen fällt für EDI3-, GPAM- und CHKA-Knockdown eine ähnliche Beeinträchtigung der Proliferation auf (siRNA-Set B). Ein besonders starker Abfall der Wachstumskurve ist nach 48 h, also bei Beendigung des Migrationsversuchs, zu verzeichnen. Dieser ist jedoch aufgrund der großen Streuung der Werte nicht signifikant. Erst nach vier Tagen im Proliferationsversuch (7 Tage nach Transfektion) wird der Einfluss auf das Wachstum von MCF7-Zellen bei EDI3-, GPAM- und CHKA-Knockdown signifikant (Abbildung 3.23).

In HeLa-Zellen konnte von anderen Arbeitsgruppen ein Einfluss von CHKA auf die Proliferation mittels Knockdown [Ramirez de Molina et al., 2004, Yalcin et al., 2010, Mori et al., Granata et al., 2014] und unter Verwendung eines Cholinkinase-Inhibitors, wie NM58B, gezeigt werden [Chua et al., 2009, Yalcin et al., 2010, Clem et al., 2011].

Der Zeitrahmen für die Messung der Migration in HeLa-Zellen beträgt nur 24 h. Ein Einfluss von Proliferation auf die Migrationsergebnisse konnte zusätzlich durch die Wachstumskurven ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 3.24 ersichtlich, ist die Proliferation von MCF7-Zellen zum Zeitpunkt des Migrationsexperimentes nicht beeinflusst (24h). Die Beeinträchtigung zu späteren Zeitpunkten durch alle verwendeten siRNAs für GPAM und EDI3 ist nicht signifikant. Nur zum Zeitpunkt 4 d (7 Tage nach der Transfektion) zeigt sich ein signifikanter Einfluss des CHKA-Knockdowns auf die Proliferation.

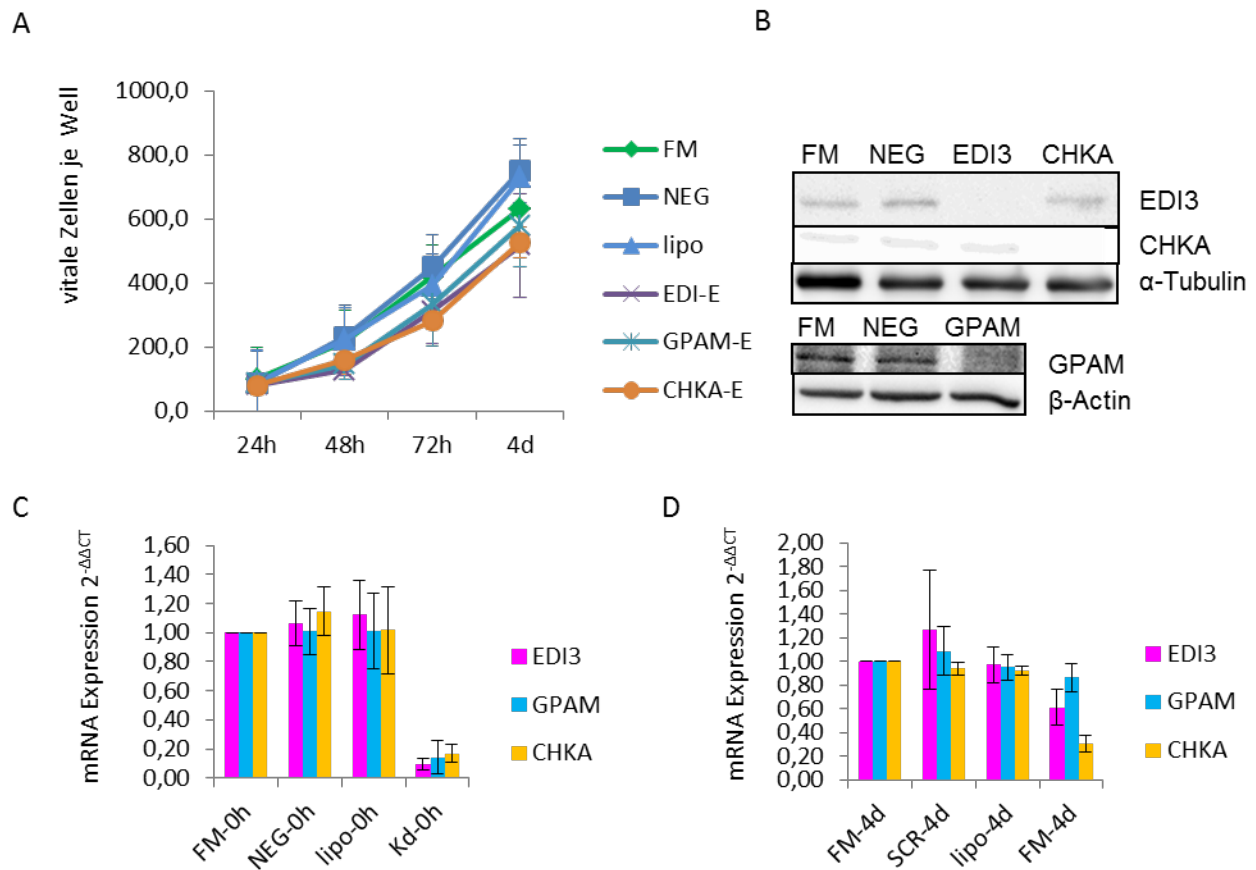


**Abb. 3.23: Wachstumskurven für EDI3-, GPAM- und CHKA-Knockdown in MCF7-Zellen zeigen Einfluss auf die Proliferation**

A) MCF7-Zellen wurden mit je einer spezifischen siRNA für EDI3, GPAM und CHKA transfiziert, 72 h inkubiert, drei technische Replikate von je 20000 Zellen in 24-Well-Platte neu ausgesät. Zählung der Zellen nach 24, 48, 72 Stunden und 4 Tagen ergab für drei biologische Replikate einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation nach 4 Tagen (7 Tage nach Transfektion).

B) Die mittlere Knockdown-Effizienz zu Beginn des Experimentes betrug 80 % für EDI3, 83 % für GPAM und 82 % für CHKA.

C) Exemplarische Ermittlung der Knockdown-Effizienz am Ende des Experimentes (72 h + 4 d) zeigt Knockdown für EDI3 von 74 %, für GPAM und CHKA von 80 % (n=1).



**Abb. 3.24: Wachstumskurven für EDI3-, GPAM- und CHKA-Knockdown in HeLa-Zellen zeigen keinen Einfluss auf die Proliferation**

A) MCF7-Zellen wurden mit je einer spezifischen siRNA für EDI3, GPAM und CHKA transfiziert, 72h inkubiert und drei technische Replikate von je 15000 Zellen in neue 24-Well-Platte ausgesät. Zählung der Zellen nach 24h, 48h, 72h und 4 Tagen ergab für drei biologische Replikate keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation bis zu nach 7 Tagen nach der Transfektion.

B) Der Knockdown zu Beginn des Experimentes konnte auf Proteinniveau exemplarisch bestätigt werden.

C) Die Knockdown-Effizienz zu Beginn des Experimentes betrug 90 % für EDI3, 86 % für GPAM und 83 % für CHKA.

D) Die Knockdown-Effizienz am Ende des Proliferationsexperimentes (72h + 4d) wurde stichprobenartig ermittelt und betrug 40 % für EDI3, 70 % für CHKA und nur 14 % für GPAM.

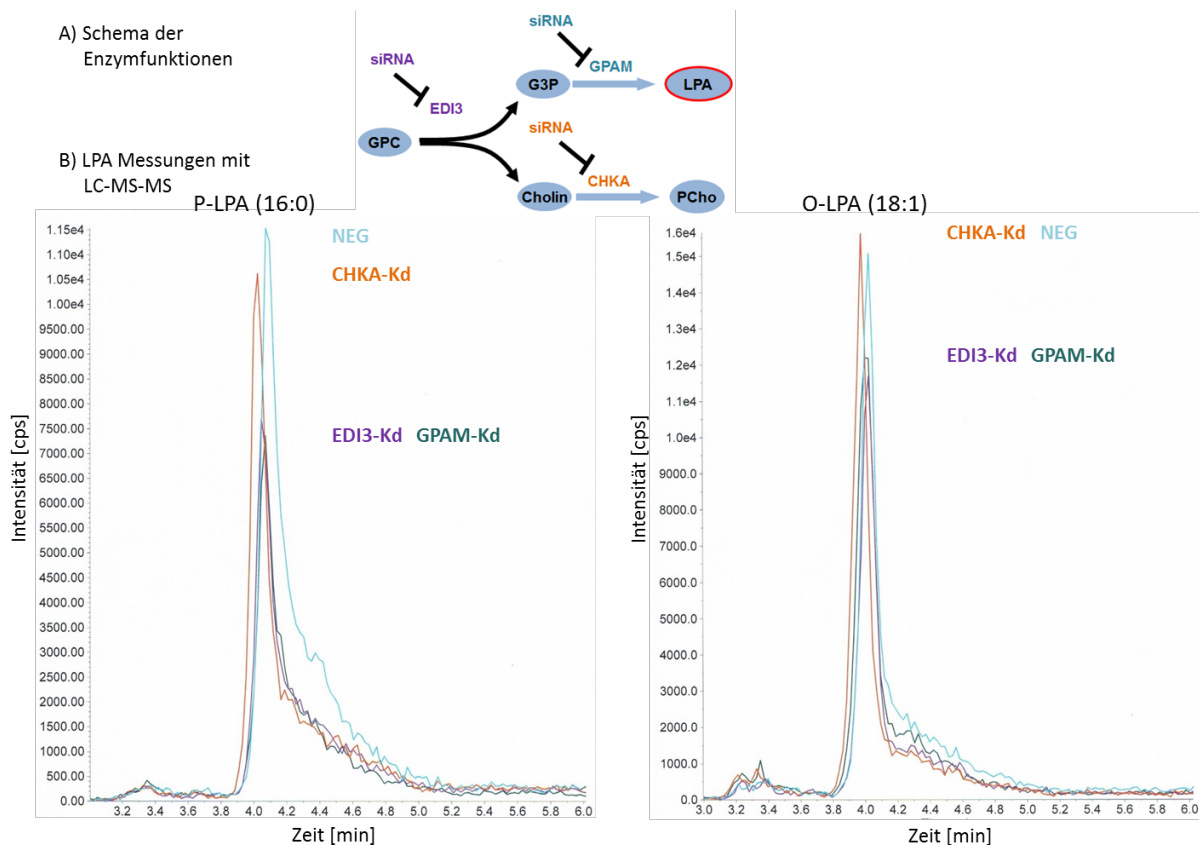
### 3.8 Metabolische Veränderungen neben den erwarteten Enzymaktivitäten

Um die metabolischen Veränderungen in einem breiteren Rahmen detektieren und verstehen zu können, wurden für alle drei untersuchten Gene Knockdowns in MCF7-Zellen durchgeführt und Methanolextrakte der intrazellulären Metaboliten hergestellt. Diese Extrakte wurden auf die Metaboliten Palmitoyl-LPA (P-LPA; 16:0) und Oleoyl-LPA (O-LPA; 18:1) mittels LC-MS/MS untersucht. Nur EDI3 und GPAM verändern die intrazelluläre LPA-Konzentration. Abbildung 3.25 illustriert die Veränderungen der P-LPA- und O-LPA-Konzentrationen anhand exemplarischer Chromatogramme. Die Änderungen der LPA-Konzentrationen sind zudem graphisch in Abbildung 3.26 dargestellt.

Im GPAM-Knockdown war P-LPA um 37 % reduziert (p-Wert = 0,0622). O-LPA war im Mittel um 31 % verringert. Im EDI3-Knockdown war die P-LPA-Konzentration um 16 % (p-Wert = 0,087) und O-LPA um 10 % (p-Wert = 0,0635) verringert.

Der CHKA-Knockdown ergab im Mittel keinen klaren Trend zu einer Veränderung der LPA-Konzentrationen.

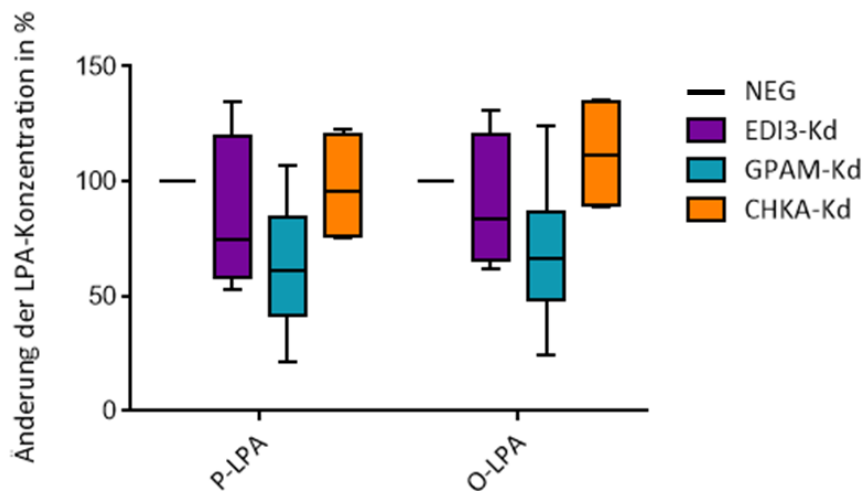
In Tabelle A3 im Anhang sind alle Messwerte der einzelnen biologischen Replikate in aMol/Zelle und die ermittelten p-Werte tabellarisch dokumentiert.



**Abb. 3.25: LC-MS/MS Messung der intrazellulären LPA-Konzentrationen in MCF7-Zellextrakten**

A) Graphische Übersicht der enzymatischen Funktionen von EDI3, GPAM und CHKA: Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase (GPCPD1, EDI3) spaltet Glycerophosphocholin (GPC) in Glycerin-3-Phosphat (G3P) und Cholin (Cho). Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase-1 (GPAM) verestert G3P zu Lysophosphatidsäure (LPA). Cholin-kinase- $\alpha$  (CHKA) phosphoryliert Cholin zu Phosphocholin (PCho).

B) Repräsentative Spektren für die LC-MS/MS-Messungen von Palmitoyl-LPA (P-LPA) und Oleoyl-LPA (O-LPA) in den Methanol-Extrakten von MCF7-Zellen, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA (Stealth Select scr low#2) behandelt wurden (NEG), im Vergleich zu MCF7-Zellen, die mit siRNA spezifisch für die GPAM-mRNA (GPAM-Kd), EDI3-mRNA (EDI3-KD) oder CHKA-siRNA (CHKA-Kd) behandelt wurden, zeigen eine Reduktion der intrazellulären LPA-Konzentration bei GPAM- und EDI3-Knockdown. Dargestellt sind die Spektren von Extrakten aus je 8 Millionen MCF7-Zellen in 200  $\mu$ l Methanol gelöst. Die Integration der Peakflächen der abgebildeten Spektren ergab für P-LPA: NEG 60 ng/ml, CHKA-Kd 57 ng/ml, EDI3-Kd 44 ng/ml und GPAM-Kd 35 ng/ml; und für O-LPA: NEG 325 ng/ml, CHKA-Kd 328 ng/ml, EDI3-Kd 234 ng/ml und GPAM-Kd 217 ng/ml.



**Abb. 3.26: Änderung der mittleren LPA-Konzentrationen**

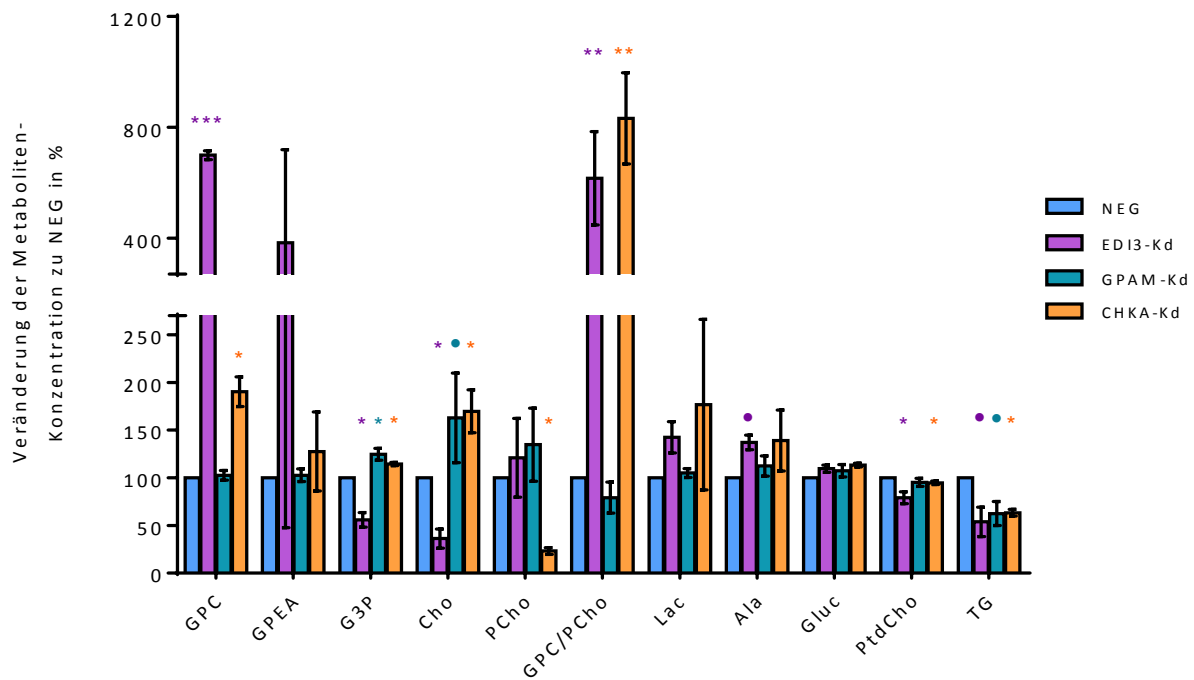
Die P-LPA- und O-LPA-Konzentrationen wurden quantifiziert mit LC-MS/MS und normalisiert auf die für die Extraktion verwendete Zellzahl. Der Scatterplot zeigt die mittleren sowie die maximalen prozentualen Veränderungen der Metaboliten-Konzentrationen bei Knockdown von EDI3, GPAM oder CHKA in MCF7-Zellen (je 20 nM Invitrogen Stealth Select siRNA Oligo-B) gegenüber der Kontroll-Transfektion mit 20 nM unspezifischer siRNA (Invitrogen Stealth Select scr low#2; NEG)

Auf dieselbe Weise hergestellte Extrakte wurden zudem auf weitere Metaboliten des Cholinstoffwechsels sowie auf generelle Indikatoren für veränderten Energie-Stoffwechsel, wie Lactat, mit quantitativer NMR-Spektroskopie untersucht. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte mittels zweidimensionaler  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -NMR.

Die Messungen aller quantifizierten Metaboliten wurden in einem deuteriertem Lösemittelgemisch  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  2:1 an drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Messwerte in den graphischen Darstellungen für die unpolaren Metaboliten Triglyceride (TG) und Phosphatidylcholin (PtdCho) wurden den in  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  2:1 gemessenen  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Spektren entnommen. Drei weitere biologische Replikate wurden in deuteriertem Wasser ( $\text{D}_2\text{O}$ ) gemessen und daraus die Metaboliten Glycerophosphocholin (GPC), Glycerophosphoethanolamin (GPEA), Cholin (Cho), Phosphocholin (PCho) und Glycerin-3-Phosphat (G3P) sowie Lactat, alpha-D-Glucose (Gluc), Alanin (Ala) und die Trinukleotide (NTP) als biologischer interner Standard daraus quantifiziert.

Abbildung 3.27 stellt die mittleren Veränderungen gegenüber der Kontrolle (NEG) in Prozent mit Standardabweichungen graphisch dar. Eine tabellarische Übersicht aller bestimmten Metaboliten in  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  2:1 und  $\text{D}_2\text{O}$  von allen einzelnen Messwerten der verschiedenen Metaboliten ist im Anhang zu finden (Tabelle A4).





**Abb. 3.27: Veränderung der intrazellulären Metaboliten**

Die Metabolitenkonzentrationen wurden quantifiziert mit  $^1\text{H-NMR}$  (und/oder  $^{31}\text{P-NMR}$ ) und normalisiert auf die Konzentration der NTPs in der Probe. Der Graph zeigt die mittlere prozentuale Veränderung der Metabolitenkonzentrationen bei Knockdown von EDI3, GPAM oder CHKA in MCF7-Zellen (je 20 nM Invitrogen Stealth Select siRNA Oligo-B) gegenüber der Kontroll-Transfektion mit 20 nM unspezifischer siRNA (Invitrogen Stealth Select scr low#2; NEG).

Metaboliten gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ :

Glycerophosphocholin (GPC), Glycerophosphoethanolamin (GPEA), Glycerin-3-Phosphat (G3P), Cholin (Cho), Phosphocholin (PCho), Lactat (LAC), alpha-D-Glucose (Gluc) und die Aminosäure Alanin (ALA)

Metaboliten gemessen in  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  2:1:

Phosphatidylcholin (PtdCho) und Triglyceride (TG)

Die Signifikanz gegenüber der NEG-Kontrolle wurde mit einem einseitigen oder einem zweiseitigen t-Test für gepaarte Stichproben ermittelt. Signifikante Veränderungen einseitig getesteter Metaboliten sind mit „●“ gekennzeichnet:  $p\text{-Wert} \leq 0,05$ .

Veränderungen, die auch im zweiseitigen t-Test als signifikant erkannt wurden, sind mit „\*“ gekennzeichnet:  $p\text{-Wert} \leq 0,05 = *$ ;  $p\text{-Wert} \leq 0,005 = **$ ;  $p\text{-Wert} \leq 0,0005 = ***$ .

Die Farbe der Signifikanzmarkierungen zeigt zusätzlich zur Position der Markierung an, welcher Knockdown den jeweiligen Metaboliten signifikant verändert hat: Lila = EDI3-Knockdown, Türkis = GPAM-Knockdown und Orange = CHKA-Knockdown.

Für die intrazelluläre Konzentration der Glucose konnten keine Veränderungen in den Knockdown-Experimenten festgestellt werden. Auch bei GPEA, Alanin und Lactat gab es keine signifikanten Veränderungen. Alle drei Metaboliten sind jedoch bei EDI3- und CHKA-Kd tendenziell erhöht.

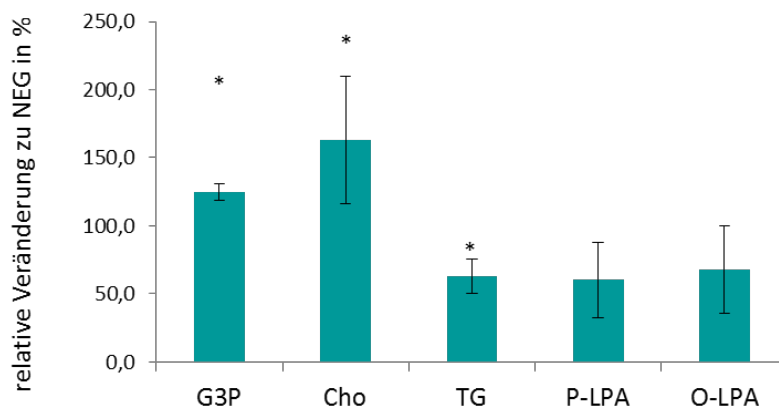
Die Triglyceride sind in allen Knockdown-Experimenten verringert. Bei PtdCho führen der EDI3- und der CHKA-Kd zu einer geringfügigen, aber signifikanten Verminderung.

Im Folgenden sind die Veränderungen in Metaboliten-Konzentrationen für die einzelnen Knockdown-Experimente aufgeführt und alle Veränderungen der GPC- und Cholin-Metaboliten graphisch dargestellt.

### 3.8.1 Metabolische Veränderung bei GPAM-Knockdown

GPAM katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Triglycerid-Synthese. Wie die Auswertung der quantitativen NMR-Spektren verdeutlicht, ist bei GPAM-Knockdown die Konzentration an Triglyceriden (TG) signifikant um  $37,5 \pm 12,5 \%$  verringert. Beim GPAM-Knockdown erhöht sich signifikant die intrazelluläre Konzentration an Substrat G3P ( $n=3$ ) um  $25 \pm 6 \%$ , während die Konzentration an Produkt (LPA) um  $31,5-37 \%$  ( $n=6$ ) abnimmt. Die GPAM-Überexpression führt zu einer Erhöhung der LPA-Konzentration ( $83 \%$  für P-LPA und  $65 \%$  für O-LPA) was in Abbildung 3.11 illustriert ist.

Cholin ist durch GPAM-Kd signifikant erhöht. Alle weiteren gemessenen Metaboliten sind durch GPAM-Knockdown nicht signifikant verändert worden. Die unten stehende Abbildung fasst alle beim GPAM-Kd beobachteten Veränderungen zusammen.

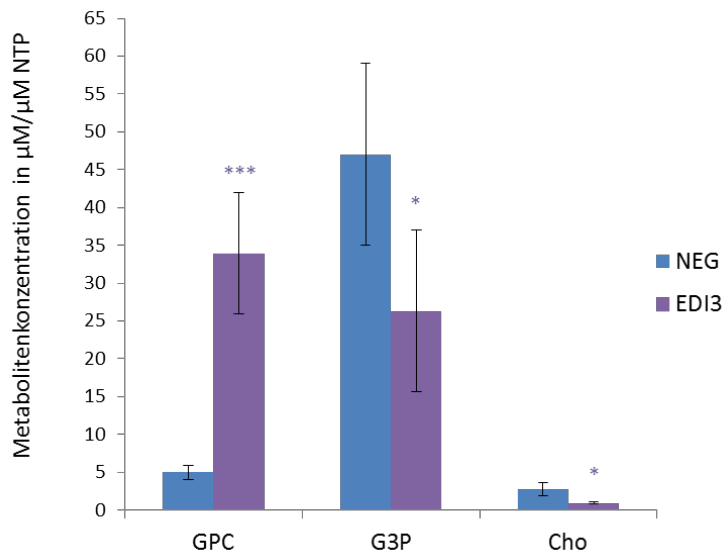


**Abb. 3.28: Veränderung der Metaboliten bei GPAM-Knockdown in MCF7-Zellen**

Der Graph zeigt Cholin (Cho)-, Glycerin-3-Phosphat- (G3P) und Triglycerid (TG)-Konzentrationen als Mittelwert der Veränderung gegenüber der Kontrolle NEG von drei biologischen Replikaten sowie die mittlere Veränderungen von Palmitoyl-LPA (P-LPA) und Oleyl-LPA (O-LPA) von sechs biologischen Replikaten. Der GPAM-Knockdown zeigt eine Erhöhung der Konzentrationen des GPAM-Reaktionsproduktes G3P um  $24,6 \%$ . Die Cholin-Konzentration ist um  $63 \%$  erhöht. Die TG-Konzentration ist auf  $62,5 \%$  verringert, die LPA-Konzentrationen auf  $60,45 \%$  für P-LPA und auf  $67,6 \%$  für O-LPA.

### 3.8.2 Metabolische Veränderung bei EDI3-Knockdown

Das Substrat für EDI3 und Glycerophosphocholin (GPC) ist auf die siebenfache Konzentration erhöht. Die direkten enzymatischen Produkte G3P und Cholin sind intrazellulär signifikant reduziert, damit ist die funktionelle Reduktion der EDI3-Enzymaktivität bestätigt.



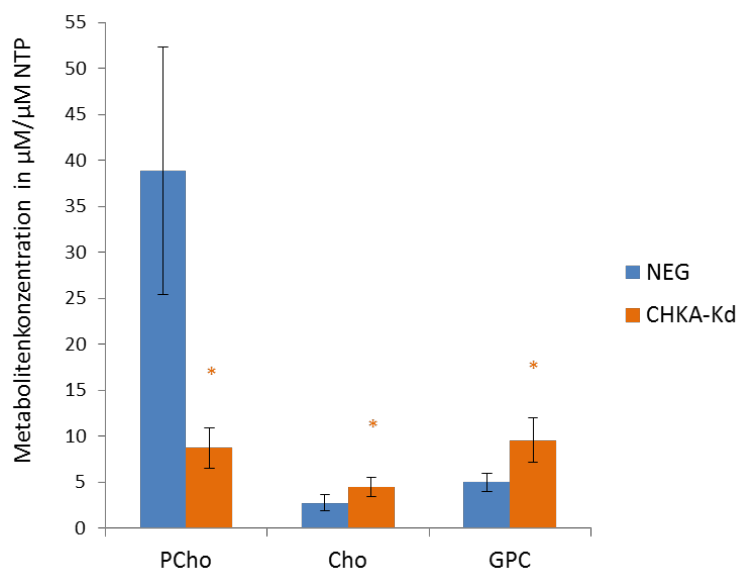
**Abb. 3.29: Veränderung der Cholinmetaboliten bei EDI3-Knockdown in MCF7-Zellen**

Glycerophosphocholin (GPC)-, Cholin (Cho)- und Glycerin-3-Phosphat (G3P)-Konzentrationen aus drei biologischen Replikaten in  $\mu\text{Mol/l}$ , normalisiert auf die  $\mu\text{molare}$  Konzentration an NTPs in der Probe, mit Standardabweichungen. Der EDI3-Knockdown zeigt eine Reduktion der Konzentrationen der EDI3-Reaktionsprodukte Cholin und Glycerin-3-Phosphat. G3P verringert sich von  $26,6 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$  auf  $10,15 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$ , um  $44 \pm 7,6\%$ . Die Cholin-Konzentration verringert sich um  $63,7 \pm 10\%$  von durchschnittlich  $2,7 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$  auf  $0,9 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$ . Die GPC-Konzentration erhöht sich von  $4,95 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$  auf  $34,6 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$  um  $700 \pm 16\%$ .

Darüber hinaus werden auch die sekundären und tertiären Metaboliten LPA und PtdCho vermindert. Bei EDI3-Knockdown in MCF7-Zellen sind Konzentrationen von Oleoyl-LPA um  $23,4\%$  und von Palmitoyl-LPA um  $16\%$  reduziert. Auch die Konzentration der Triglyceride ist signifikant gesunken.

### 3.8.3 Metabolische Veränderung bei CHKA-Knockdown

Die unten stehende Abbildung fasst alle Veränderungen der Metaboliten für den Cholin-kinase-alpha-Knockdown graphisch zusammen. Die Reduktion der enzymatischen Funktion von Cholin-kinase bei CHKA-Knockdown führt in MCF7-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Cholin- und GPC-Konzentrationen um  $70 \pm 22,6 \%$  und  $90,4 \pm 15,6 \%$ . Cholin-kinase-beta (CHKB) ist nicht moduliert und kann Cholin phosphorylieren. Cholin reichert sich ohne CHKA dennoch in den Zellen an. Die Konzentration des enzymatischen Produkts Phosphocholin ist um  $76,7 \pm 3,5 \%$  verringert. Demnach ist der funktionelle Knockdown der Cholin-kinaseaktivität bestätigt.



**Abb. 3.30: Veränderung der Cholinmetaboliten bei CHKA-Knockdown in MCF7-Zellen**

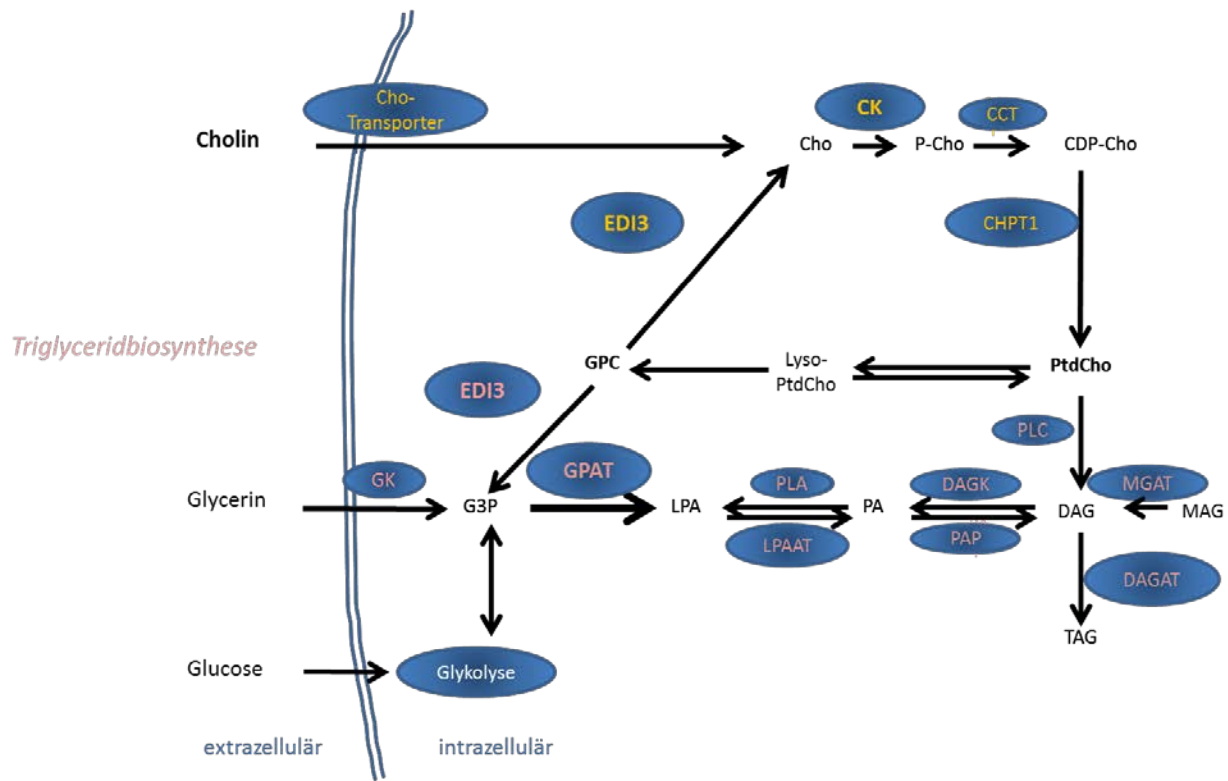
Im Graph aufgeführt sind die Phosphocholin (PCho)-, Cholin (Cho)- und Glycerophosphocholin (GPC)-Konzentrationen mit Standardabweichungen aus drei biologischen Replikaten in  $\mu\text{Mol/l}$ , normalisiert auf die  $\mu\text{molare}$  Konzentration an NTPs in der Probe. Der CHKA-Knockdown zeigt eine Reduktion des PCho-Produkts von  $38,9 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$  auf  $8,7 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$  um  $77 \pm 3,5\%$ .

Die Cholin-Substratkonzentration (Cho) erhöht sich bei CHKA-Knockdown im Vergleich zu MCF7-Zellen mit Kontrollbehandlung (NEG) um  $70 \pm 22,6 \%$ , von durchschnittlich  $2,75 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$  auf  $4,5 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$ . Die Glycerophosphocholin-Konzentration ist von  $4,95 \pm 1,03 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$  auf  $9,55 \pm 2,5 \mu\text{M}/\mu\text{M NTP}$  um  $90 \%$  erhöht.

Neben dem GPAM-Knockdown erhöht auch der CHKA-Knockdown die Konzentration an G3P aber mit  $14,5 \%$  mehr G3P nicht so stark wie der GPAM- oder der EDI3-Kd. Die Konzentration der Triglyceride ist signifikant verringert. Die Lactat- und Glucose-Konzentrationen sind durch den CHKA-Knockdown nicht beeinflusst.

Zur besseren Übersicht sind die Metaboliten und deren verstoffwechselnde Enzyme in Abbildung 3.31 schematisch dargestellt.

*Phospholipidbiosynthese*



**Abb. 3.31: Übersicht Cholinmetabolismus**

Cholin wird über Cholintransporter aus dem extrazellulären Medium aufgenommen und durch die Cholinkinasen (CK) zu Phosphocholin (PCho) phosphoryliert, welches als Substrat zur Synthese von Phosphatidylcholin (PtdCho) der Membran dient. PtdCho kann durch Phospholipase-C zu DAG abgebaut werden. DAG dient als Ausgangsstoff für die Triglyceridsynthese. Glycerophosphocholin, das durch Abbau von Phosphatidylcholin intrazellulär gebildet wird, wird durch EDI3 zu G3P und Cholin gespalten. G3P dient wiederum dem Aufbau von Triglyceriden, kann aber auch in die Glykolyse eingespeist werden.

Enzyme: Phosphorylcholin-Citidyltransferase E.C.2.7.7.15 (CCT), Cholinkinase CHKA und CHKB E.C. 2.7.1.32 + E.C. 2.7.1.82 (CK), Diacylglycerin-Cholinphosphotransferase E.C. 2.7.8.2 (CHPT1), Diacylglycerin-Acyltransferase E.C. 2.3.1.20 (DAGAT), DAG-Kinase E.C. 2.7.1.107 (DAGK), Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase GDE1 homolog GDE5 E.C.3.1.4.2 (EDI3), Glycerinkinase E.C. 2.7.1.30 (GK), G3P-Acyltransferase E.C. 2.3.1.15 (GPAT), LPA-Acyltransferase E.C. 2.3.1.51 LPAAT auch AGPATS genannt sowie PLAAT1/2 und LPCAT1 (LPAAT), Lysophospholipid-Acyltransferasen LPLAT E.C.2.3.1.23 (LPCAT), Lysophospholipasen E.C. 3.1.1.5 (LYPLA), Monoacylglycerin-Acyltransferase E.C. 2.3.1.22 (MGAT), PA-Phosphatase E.C. 3.1.3.4 (PAP), Phospholipase-A E.C. 3.1.1.4 (PLA), Phospholipase-C E.C. 3.1.4.3 (PLC), Phospholipase-D E.C. 3.1.4.4 (PLD),

Metaboliten: CDP-Cholin (CDP-Cho), Cholin (Cho), Diacylglycerin (DAG), Glycerin-3-Phosphat (G3P), Glycerophosphocholin (GPC), Lysophosphatidsäure (LPA), Lysophosphatidylcholin (Lyso-PtdCho), Monoacylglycerin (MAG), Phosphatidsäure (PA), Phosphocholin (PCho), Phosphatidylcholin (PtdCho), Triacylglycerin (TAG).



## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe unter Leitung von Frau Dr. Marchan verdeutlichten in den vergangenen Jahren die Bedeutung von EDI3 für die Tumorentstehung. Anknüpfend an diese Ergebnisse stellte sich jedoch die Frage, auf welche Art und Weise EDI3 in der Lage ist die zelluläre Migration, einen für die Metastasierung entscheidenden Prozess, zu steuern. In dieser Arbeit wurde geprüft, welche bei der enzymatischen Aktivität von EDI3 entstehenden Metaboliten eine Bedeutung für die Migration haben.

Die Erhöhung der Cholinmetaboliten ist bereits in der Literatur in Assoziation mit der Tumorgenese beschrieben worden [Glunde et al., 2004, Moestue et al., 2010, Glunde et al., 2011a, Bertilsson et al., 2012]. Ein Grund für die Erhöhung könnte die verstärkte CHKA-Expression in Tumorzellen sein, die zu mehr Phosphocholin (PCho) in der Zelle führt [Ramirez de Molina et al., 2002b]. Aber auch die Expression der Glycerophosphocholin-Diesterasen EDI3 und GDE2 spielt eine wesentliche Rolle, denn diese spalten GPC zu Cholin und Glycerin-3-Phosphat (G3P) [Stewart et al., 2012, Grinde et al., 2014]. Das CHKA-Produkt PCho könnte der Grund für die Proliferations-unterstützende Wirkung der CHKA sein, denn PCho dient als Ausgangsstoff für die Membranlipide [Fernandez-Murray et al., 2013], ein für die Proliferation notwendiger Baustoff [Trousil et al., 2014]. Neben der Funktion als Membranbestandteil kann PtdCho jedoch auch als Ausgangsstoff für die Synthese von Lipid-Signalmolekülen, wie Phosphatidsäure (PA) [Cazzolli et al., 2006, Gadiya et al., 2014] oder Diacylglycerin (DAG) [Turban et al., 2011, Macrae et al., 2013] dienen, die Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Überleben, Proliferation und Migration nehmen können. Da sowohl EDI3 als auch CHKA mit der Tumorgenese assoziiert sind, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Konzentrationsverschiebungen der Cholin-Metaboliten, die durch beide Enzyme hervorgerufen werden können, ursächlich für Veränderungen der Migration sind, welche bei Modulation von EDI3 beobachtet wurden [Stewart et al., 2012]. Neben dem Cholinniveau und der Konzentration der *downstream*-Metaboliten sollte EDI3 auch Einfluss auf die Glycerin-3-Phosphat (G3P)-Konzentration haben. G3P wird von Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferasen, wie GPAM, zur Triglycerid-Synthese verwendet, wobei zunächst die Lipidintermediate LPA, PA und DAG [Coleman, 2004] entstehen. Diese dienen wiederum als Signalmoleküle. Bisher wurde in der Literatur vor allem ein Einfluss von CHKA auf die Proliferation beschrieben, die durch EDI3 nicht unmittelbar beeinflusst ist. Die Untersuchung der Migration zeigte zunächst, dass

CHKA keinen Einfluss auf die Migration nimmt. Eine Überprüfung der intrazellulären Metaboliten bestätigte den Einfluss von CHKA auf die PCho-Konzentration [Glunde et al., 2005] und die von anderen Arbeitsgruppen beobachtete Reduktion der Proliferation [Yalcin et al., 2010].

Die Rolle von GPAM für die Triglycerid-Synthese ist vor allem in der Leber gut untersucht. Jedoch wurde bisher der Einfluss von GPAM auf LPA als Signalmolekül und eine mögliche Modulation der Migration nicht erforscht. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass GPAM, ebenso wie EDI3, in der Lage ist, die Migration von Tumorzellen zu verändern. Dies korreliert mit der Konzentration an LPA in der Zelle. Ob LPA jedoch ursächlich für die Veränderung der Migration ist, soll in Zukunft noch untersucht werden.

Diese Arbeit hat die intrazellulären Metaboliten-Konzentrationen *in vitro* mit dem Migrationsverhalten von Krebszellen in Zusammenhang gebracht. Die vorliegenden bisher unbekanntenen Ergebnisse leisten einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle der Metabolisierung von Glycerophosphocholin für die Tumorgenese.

### **4.1 Die Enzyme EDI3 und GPAM unterstützen die Migration**

Im Zuge der malignen Transformation erwerben die Zellen verschiedene Fähigkeiten, die ihnen das Überleben sichern. Darüber hinaus kommt es während der fortschreitenden Krebserkrankung zu Metastasen, wobei einzelne Zellen vom Tumor abwandern und an neuer Stelle zu einem weiteren Tumor heranwachsen können. Die Migration, eine für diesen Prozess grundlegende Eigenschaft, wurde in dieser Arbeit vor allem an der Brustkrebszelllinie MCF7 exemplarisch untersucht. Für EDI3 lagen bereits Daten vor, die eine klare Assoziation zwischen verringerter Expression und weniger Migration der Zellen belegen [Stewart et al., 2012, Lesjak et al., 2014]. Jedoch wurde bisher kein Mechanismus gefunden, der erklärt auf welche Weise EDI3 dazu in der Lage ist. Um die Bedeutung der durch EDI3 gebildeten Metaboliten Glycerin-3-Phosphat und Cholin für die Migration zu verstehen, wurden diejenigen Enzyme experimentell reprimiert, die die Produkte von EDI3 als Substrate verwenden. Cholinkinase verwendet Cholin und die G3P-Acyltransferasen benutzen G3P. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von EDI3 auf die Migration validiert und durch Untersuchungen von Cholinkinase- $\alpha$  (CHKA) und der Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase GPAM ergänzt. Dazu wurde spezifisch die Expression der Gene EDI3, GPAM und CHKA vermindert und der Effekt auf die Migration im klassischen „scratch assay“-Migrationsversuch gezeigt. Die Ergebnisse zeigen



eindeutig, dass die verminderte Expression von EDI3 als auch GPAM, nicht aber die von CHKA, die Migration der Zellen verlangsamt. Experimente mit simultanem Knockdown von EDI3 und GPAM zeigten keinen additiven Effekt auf die verlangsamte Migration. Dies deutet darauf hin, dass EDI3 und GPAM Komponenten des gleichen Mechanismus sind, der Einfluss auf die zelluläre Migration hat.

Grundsätzlich sind „off target“-Effekte bei siRNA-Experimenten trotz Verwendung von Kontroll-siRNAs nicht auszuschließen. Durch Verwendung von insgesamt sechs verschiedenen siRNAs ist jedoch davon auszugehen, dass es sich hier nicht um eine zufällige Nebenwirkung der Transfektion handelt, sondern um einen spezifischen Einfluss auf die Migration. Auch die Überexpression von GPAM beeinflusst die Migration. Eine Beeinträchtigung der Zellvitalität wirkt sich auf die Migration der Zellen aus. In dieser Arbeit wurde die Zellvitalität exemplarisch durch den PrestoBlue®-Vitalitätstest geprüft und für jedes Experiment lichtmikroskopisch betrachtet. Vitalitätsunterschiede, die mit PrestoBlue® detektiert wurden, sind bereits optisch eindeutig zu erkennen. Die Zellvitalität ist durch die Transfektion mit GPAM- und EDI3-siRNAs nicht stärker beeinträchtigt als bei Transfektion mit Kontroll-siRNA.

Die Migration wird klassischer Weise durch den MAP-Kinase- (ERK1/2; p42/p44) Signalweg reguliert. Phosphorylierungen an Thr202/Tyr204 und Thr185/Tyr187 der ERK-Kinasen werden als Marker für die Aktivierung des Signalweges untersucht. Durch Knockdown von GPAM konnten jedoch keine eindeutigen Veränderungen in der AKT (Ser473)- oder ERK (Thr202/Tyr204)-Phosphorylierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch für EDI3 konnte in früheren Arbeiten keine Veränderung in MAPK- und AKT-Signalwegen gefunden werden. Somit konnte zunächst keiner der bekannten Signalwege den Migrationsveränderungen durch EDI3 oder GPAM zugeordnet werden. ERK- und AKT-Signalwege werden durch verschiedene Stimuli aktiviert, wie beispielsweise durch externe Signale von Wachstumsfaktoren, die als Liganden für Rezeptortyrosinkinasen dienen, mittels Liganden für Integrinrezeptoren und durch Cytokine. Auch die Aktivierung von G-Proteingekoppelten Rezeptoren moduliert AKT- und ERK-Signale. Die Signalwegaktivierung durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF) wurde jedoch hier nicht untersucht. Es wäre möglich, dass die Beeinträchtigung der ERK-Aktivierung oder AKT-Aktivierung nur unter Stimulation von Migrationssignalen auf Proteinebene sichtbar wird. Auch eine ganz andere Signalkette zur Regulation der Migration wäre denkbar.

Für die Fortbewegung der Zelle (Migration) ist zunächst eine Polarisierung durch räumlich asymmetrische Aufteilung zellulärer Signalproteine notwendig. Zu den Signalproteinen, die besondere Bedeutung bei der Regulation der Migration haben, zählen PTEN/PIP3K, RhoA, Rac1 und Cdc42. Die Kraft für die Fortbewegung wird vom Aktin-Cytoskelett aufgebracht. Für die Streckung der Zelle in eine Richtung sind die Aktin-Polymerisation und Aktin-Verzweigung sowie deren Kappung verantwortlich. Diese Prozesse sind wiederum durch viele verschiedene Effektoren reguliert. Auch die Adhäsion der Zelle in Migrationsrichtung und das Lösen der „*Focal Adhesion Points*“ sind entscheidende Prozesse, in denen Integrine eine wichtige Rolle spielen [Welf et al., 2011]. Die Regulation der Expression der Integrine ist eine Möglichkeit, die Adhäsion und damit auch die Migration zu steuern. Doch die *Focal Adhesion Points* (die Anheftungspunkte der Zelle) sind vielschichtig reguliert. Durch EDI3-Knockdown in Kombination mit Replattierungs-Experimenten wurde ein Einfluss von EDI3 auf die Adhäsion von MCF7-Zellen gefunden [Lesjak et al., 2014]. Auf mRNA-Ebene reguliert ist dabei der Fibronectin-Rezeptor, bestehend aus den Untereinheiten Integrin- $\alpha$ 5 und Integrin- $\beta$ 1. Dies ist zumindest für eine von zwei verwendeten siRNAs gegen EDI3 in verschiedenen Zellmodellen gezeigt worden. Der Einfluss von EDI3 auf die Zelladhäsion ist nicht durch RhoA oder Rac1 reguliert [Lesjak, 2014-Dissertation]. Die Proteinkinase C war bei EDI3-Knockdown auf mRNA- und Protein-Ebene reduziert [Stewart et al., 2012]. Diese Reduktion in PKC konnte funktionell den bei EDI3-Knockdown beobachteten Veränderungen in der Adhäsion und dem *Spreading in vitro* zugeordnet werden. Eine Auswahl an Integrinrezeptor-Untereinheiten wurde auf mRNA-Expressionsniveau untersucht und ergab keinen Einfluss der einzelnen GPAM-siRNAs auf die Integrin-Expression. Weder PKC noch Adhäsion oder *Spreading* sind durch GPAM beeinflusst (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

Da die Migrationsversuche ohne Verwendung eines Proliferationsinhibitors durchgeführt wurden, könnte argumentiert werden, dass die Migrationsergebnisse durch reduzierte Proliferation überlagert sein könnten. Die Generationszeit von HeLa-Zellen wird beim DSMZ (Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) mit 48 h angegeben. Damit ist der Migrationsversuch deutlich schneller abgeschlossen als eine Generationszeit. Es werden jedoch auch kürzere Generationszeiten von ca. 22 h berichtet. Die Generationszeit für unbehandelte HeLa-Zellen im Wachstumsversuch dieser Arbeit lag bei 27,7 h und entspricht damit etwa der Dauer des Versuches (24 h). Die Verdopplungszeit für unbehandelte MCF7-Zellen betrug 30,5 h und ist damit kürzer

als der Beobachtungszeitraum im MCF7-Migrationsversuch (48 h). Ein Einfluss der Proliferation auf das Ergebnis der Migration ist jedoch als gering einzustufen, da der Migrationsversuch bei konfluenter Kultur durchgeführt wird und bei den verwendeten Zell-Linien die Proliferation durch Zell-Zell-Kontakte inhibiert ist (Kontaktinhibierung). Tatsächlich zeigen alle mit siRNA transfizierten Zellen flachere Wachstumskurven und damit langsamere Proliferation. Das gilt aber sowohl für die CHKA-siRNA als auch für die Transfektion mit EDI3- oder GPAM-siRNA. Eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle wurde jedoch für CHKA nicht ermittelt.

Es kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Beeinträchtigung der Proliferation nicht als Verlangsamung der Migration zu beobachten ist. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die GPAM-Expression eine Auswirkung auf einen für die Metastasierung wichtigen Phänotyp hat.

## 4.2 Cholinkinase hat keinen Einfluss auf die Migration

Durch CHKA-Inhibierung wird die Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen, nicht aber von normalen epithelialen Zellen reduziert [Ramirez de Molina et al., 2004, Glunde et al., 2005, Chua et al., 2009, Yalcin et al., 2010, Clem et al., 2011, Miyake et al., 2012, Mori et al., 2013]. Auch eine geringfügige Verstärkung der invasiven Eigenschaften durch CHKA-Überexpression in MCF7-Zellen, die in der Regel schwach invasiv sind, konnte erstmals angedeutet werden [Shah et al., 2010], sowie eine leichte Verstärkung der Migration in Eierstockkrebszellen [Granata et al., 2014]. In den Experimenten dieser Arbeit war die Migration von MCF7-Zellen oder HeLa-Zellen durch die CHKA nicht beeinflusst, wie Experimente mit verschiedenen siRNAs spezifisch gegen CHKA verdeutlichen.

Durch Nachweis des Knockdowns auf mRNA- und Protein-Ebene sowie durch intrazelluläre Messung einer Abnahme des Cholinkinase-Reaktionsproduktes PCho um  $77 \pm 3$  % mit Oligo-B ist bestätigt, dass der Cholinkinase-Knockdown die gesamte Cholinkinase-Aktivität der Zelle um ca. 75 % reduziert. Die enzymatische Reaktion von CHKA kann offensichtlich nicht durch CHKB ausgeglichen werden. Des Weiteren bleibt anzumerken, dass nur Cholinkinase- $\alpha$  (CHKA1 und CHKA2; 50/52 kDa), nicht aber Cholinkinase- $\beta$  (CHKB; 45 kDa) mit der Invasivität von Tumorzellen sowie der Proliferation *in vitro* assoziiert ist.

Die CHKA-siRNAs zeigen teilweise einen starken Einfluss auf Zellvitalität und Morphologie, welcher eine Untersuchung der Migration mit diesem Oligo nicht

möglich macht. Eine verminderte Vitalität von Zellen hat einen Einfluss auf das Migrationsverhalten, wie bei der Verwendung des CHKA-siRNA-Oligo-C deutlich wird. Der Oligo-C beeinträchtigt ebenfalls die Vitalität der Zellen und führt zusätzlich zu morphologischen Veränderungen, die mit kleinen Lücken im Zellrasen einhergehen. Dies führt zu einem signifikanten, aber dennoch unspezifischen Einfluss auf die Migration. Zudem wurde die EDI3-Expression in manchen, aber nicht allen Versuchen durch den Oligo-C um bis zu 30 % reduziert. Dies erklärt ebenfalls den Effekt auf die Migration in diesen Experimenten. Da die Reduktion von EDI3 jedoch nur gelegentlich auftrat, wirkt sich der CHKA-Knockdown nicht signifikant auf die EDI3-Expression aus. Die Ergebnisse des siRNA-Oligos-C sind als Artefakte bei der Ermittlung der Migration durch Beeinträchtigung der Vitalität und Zelldichte anzusehen. Sie ließen sich durch Verwendung von drei weiteren, weniger toxischen siRNAs gegen CHKA nicht bestätigen. Alle anderen verwendeten siRNAs gegen CHKA haben keinen Einfluss auf die Migration von MCF-Zellen (Oligo-B, -E und -F) oder HeLa-Zellen (Oligo-E). Bei Verwendung von siRNA-Oligo-E gegen CHKA im HeLa-Zellmodell, jedoch nicht in MCF7-Zellen, erhöht sich die GPAM-Expression um 27 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen im selben Experiment. Demnach könnte zumindest im HeLa-Zellmodell ein leichter Effekt des CHKA-Knockdown auf die Zellmigration durch erhöhte GPAM-Expression überdeckt sein. Auch eine Überexpression im MCF7-Zellmodell konnte das Migrationspotenzial der Zellen nicht entscheidend verstärken (Daten nicht gezeigt). Dies könnte jedoch auch auf eine unzureichende Transfektionseffizienz in den schwer zu transfizierenden MCF7-Zellen zurückzuführen sein. Im gut zu transfizierenden Zellmodell HEK hat die Überexpression von *CHKA2* ebenfalls keinen Einfluss auf die Migration durch die Membranporen im Transwell-Migrationsversuch.

Während bei Knockdown und bei Anwendung von Cholinkinase-Inhibitoren immer CHKA1 und CHKA2 inhibiert werden, kann bei Überexpression nur eine der beiden fast identischen Cholinkinase- $\alpha$ -Isoformen überexprimiert werden. In dieser Arbeit wurde CHKA2 überexprimiert. Zur vollständigen Untersuchung der CHKA-Überexpression sollten die Experimente mit CHKA1 wiederholt werden, weil unterschiedliche Einflüsse der Isoformen denkbar sind. Die Expression von CHKA1 und CHKA2 scheinen für jeden Zelltyp spezifisch zu sein. Eine Unterscheidung der CHKA-mRNAs ist aufgrund der hohen Identität der Sequenzen nicht möglich. Ein Antikörper, der simultan CHKA1- und CHKA2-Proteine mit gleicher Sensitivität detektiert, ist leider kommerziell nicht erhältlich. Somit steht eine differenzierte Untersuchung der Cholinkinase-Isoformen noch aus.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einfluss auf die Migration durch EDI3 auf verschiedene Zell-Linien in unserer Arbeitsgruppe eindeutig belegt wurde [Stewart et al., 2012, Lesjak, 2014] und hier unter Verwendung von zwei siRNAs für EDI3 in MCF7-Zellen und HeLa-Zellen unabhängig bestätigt werden konnte. Auch GPAM beeinflusst die Migration in vergleichbarem Ausmaß wie EDI3. Dieser Einfluss wurde noch durch Überexpression von GPAM in HEK-Zellen bestätigt.

### 4.3 Einfluss von CHKA auf die Proliferation

Die Zunahme von PCho und die Abnahme von GPC sind im Zusammenhang mit aggressiven Tumorzellen beschrieben worden [Ramirez de Molina et al., 2002b]. *In vitro*-Versuche zeigen vor allem eine Verstärkung der Proliferation – nicht der Migration – durch CHKA Überexpression, während siRNA die Proliferation und Zellvitalität herabsetzt [Glunde et al., 2005, Granata et al., 2014]. In dieser Arbeit wurden die Proliferation und mögliche apoptotische Effekte durch CHKA-Inhibierung [Yalcin et al., 2010] nicht untersucht. Ziel war es, den Mechanismus aufzudecken, der EDI3 in die Lage versetzt die Migration von Zellen zu beeinflussen. Die Proliferation wurde lediglich zur Einschätzung der beobachteten Einflüsse auf die Migration durch GPAM-, EDI3- oder CHKA-Knockdown betrachtet.

Bei der Regulation von Proliferation und Überleben von Zellen spielt die AKT-Kinase eine zentrale Rolle, deren Aktivierung durch Phosphorylierung an Ser473 mit spezifischen Antikörpern untersucht werden kann. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass chemische Inhibierung oder Knockdown von CHKA dazu führt, dass ERK- und AKT-Signale in HeLa-Zellen [Yalcin et al., 2010, Clem et al., 2011], MDAMB468-Zellen und MDAMB231-Zellen [Chua et al., 2009] attenuiert werden. Cholinase kann also über AKT- und ERK-Signalwege Zellüberleben und Proliferation verstärken. Ein Effekt auf die Proliferation von MCF7- und HeLa-Zellen konnte in dieser Arbeit durch den Knockdown von CHKA bestätigt werden, jedoch wurden keine Veränderungen in der basalen Aktivierung von AKT gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Knockdown-Effizienz des transienten Knockdowns am Ende des Wachstumsexperimentes wurde stichprobenartig überprüft und betrug 70 %. Dies zeigt, dass CHKA über den gesamten experimentellen Zeitraum reprimiert war. Wie in Abbildung 3.23 und 3.24 ersichtlich, war die Proliferation von HeLa-Zellen und MCF7-Zellen zum Zeitpunkt des Migrationsexperimentes nicht signifikant beeinflusst. Erst sieben Tage nach der Transfektion wird ein Einfluss des CHKA-

Knockdowns auf die Proliferation deutlich, während bei CHKA-Knockdown-Versuchen anderer Forschungsgruppen der Effekt in verschiedenen Zelllinien bereits nach fünf Tagen sichtbar war [Glunde et al., 2005, Granata et al., 2014]. Trotz vieler Berichte über erhöhte Phosphocholin-Konzentrationen in transformierten Zellen besteht weiterhin die Notwendigkeit für detaillierte Untersuchungen von Cholin kinase. Dies wird auch durch eine aktuelle Veröffentlichung deutlich, die aufzeigt, dass die Proliferation-unterstützende Wirkung von CHKA unabhängig von deren enzymatischer Funktion ist [Falcon et al., 2013]. Interessante Weise ist auch die PCho-Konzentration in aggressiven Tumoren *in vivo* nicht immer höher als in weniger aggressiven Tumoren [Moestue et al., 2010, Cao et al., 2012g].

#### 4.4 Metabolische Veränderungen

Veränderungen im Cholinmetabolismus sind vielfach in der Literatur in Assoziation mit der Tumorgenese beschrieben worden [Glunde et al., 2004, Moestue et al., 2010, Glunde et al., 2011e, Bertilsson et al., 2012]. Des Weiteren haben Tumore, die unabhängig von Hormonen wachsen können (HR<sup>-</sup>) im Vergleich zu Tumoren, die Hormonrezeptoren exprimieren (HR<sup>+</sup>), ein kleineres GPC/PCho-Verhältnis. Es bestehen demnach niedrigere Glycerophosphocholin (GPC)-Konzentrationen und/oder höhere Phosphocholin (PCho)-Konzentrationen intrazellulär [Cao et al., 2012d]. Trägerinnen von HR<sup>+</sup>-Tumoren haben allgemein die bessere Prognose. Mit nicht-invasiven Verfahren wie *Magnetic resonance spectroscopic imaging* (MRSI) lässt sich meist nur der Gesamtgehalt aller Cholinmetaboliten zuverlässig bestimmen und dieser ist in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe deutlich erhöht [Glunde et al., 2011e]. Die Detektion von Cholinmetaboliten mit Magnet-Resonanz-Bildgebung (MRS) findet bereits Anwendung zur Überprüfung des Therapieerfolges. Auch *Cao M. et al* konnte 2012 zeigen, dass Patientinnen, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten, verringerte Cholinmetaboliten-Konzentrationen in den Tumoren zeigten. Wie auch *in vitro* gezeigt werden konnte, geht der Übergang von nicht-malignen MCF12A-Zellen zu malignen, aber schwach metastasierenden MCF7-Zelllinie und weiter zu stark metastasierenden MDAMB231-Zellen mit einer Verschiebung des GPC/PCho-Verhältnisses zu mehr PCho einher [Eliyahu et al., 2007]. Neben der vielfach beschriebenen Erhöhung der CHKA-Expression in Tumorzellen, die zu mehr PCho in der Zelle führt [Ramirez de Molina et al., 2002b], spielt auch die Expression der Glycerophosphocholin-Diesterasen EDI3 und GDE2 eine wesentliche Rolle, denn diese spalten GPC zu Cholin und Glycerin-3-Phosphat (G3P) und

verringern die GPC-Konzentration [Stewart et al., 2012, Grinde et al., 2014]. Die hier untersuchten metabolischen Veränderungen spiegeln Veränderungen durch Knockdown von EDI3, GPAM oder CHKA in den Zellen wider. Damit wurde der Einfluss der jeweils ersten Enzyme der Triglycerid- und Phosphatidylcholin-Synthese sowie die Verbindungsstelle beider Synthesen, die Metabolisierung von GPC durch EDI3 untersucht. Alle drei Enzyme nehmen signifikanten Einfluss auf die Triglycerid-Synthese. Sowohl EDI3 als auch CHKA beeinflussen die intrazelluläre Phosphatidylcholin-Konzentration. Die Veränderungen der metabolischen Endprodukte sowie aller bestimmten Zwischenstufen werden in den nächsten Kapiteln im Einzelnen diskutiert. Dazu wurden die Metaboliten zu den folgenden Gruppen zusammengefasst: [GPC, Cholin und Phosphocholin]; [G3P]; [LPA] und [PtdCho und TG].

Allgemein lässt sich zunächst zu den metabolischen Untersuchungen anmerken, dass die Zusammensetzung an Nährstoffen im Medium einen Einfluss auf die intrazellulären Metaboliten haben könnte, da viele Metaboliten aktiv in die Zelle aufgenommen werden. Cholin war im Medium mit 23  $\mu\text{Mol/l}$  in vergleichbar hohen Konzentrationen enthalten wie im Blutplasma (im Mittel 10  $\mu\text{Mol/l}$  Cholin mit einem intraindividuellen Bereich von 7-20  $\mu\text{Mol/l}$ ) [Zeisel et al., 1991, Gossell-Williams et al., 2005, Sidhu et al., 2013]. Die Metaboliten GPC, Phosphocholin, Phospho-Ethanolamin oder Ethanolamin sind im Kulturmedium nicht enthalten, stehen aber im Organismus zur Verfügung. Dies hat Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration von Phosphocholin wie an Xenograft-Experimenten in Mäusen gezeigt werden konnte, wobei die Tumore in der Maus zum Teil andere metabolische Eigenschaften aufweisen als die Zell-Linie *in vitro*, aus der der Tumor generiert wurde [Wijnen et al., 2014]. Um das Tumormilieu in die Untersuchungen einzubeziehen, können mit modernen NMR-Spektrometern und HR-MAS-Technik Metaboliten auch direkt im isolierten Tumorgewebe quantifiziert werden [van Asten et al., 2015]. Für detailliertere Einblicke in den Metabolismus wären *Tracing*-Experimente mit  $^{13}\text{C}$ -gelabelten GPC nötig sowie Untersuchungen der Metaboliten in der Zelle und im Medium.

#### 4.4.1 Veränderungen in den GPC-, Cholin- und PCho-Konzentrationen

Cholin ist ein essentieller Nährstoff [Zeisel et al., 1991], welcher von der Zelle über Cholintransporter aufgenommen oder selbst gebildet werden kann. Für die intrazelluläre Produktion wird es durch EDI3 oder GDE2 aus GPC abgespalten. Die CholinKonzentration ist mit  $<0,4$  fMol/Zelle vergleichsweise gering. Das Substrat GPC für EDI3 liegt ebenfalls nur in sehr geringem Maße vor ( $0,6-0,9$  fMol/Zelle). Der Peak von PCho hingegen dominiert das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bei 3,2 ppm für die direkt vergleichbaren Cholinmetaboliten und hat eine deutlich höhere Konzentration um 5 fMol/Zelle. Dies ist typisch für Krebszellen [Glunde et al., 2004].

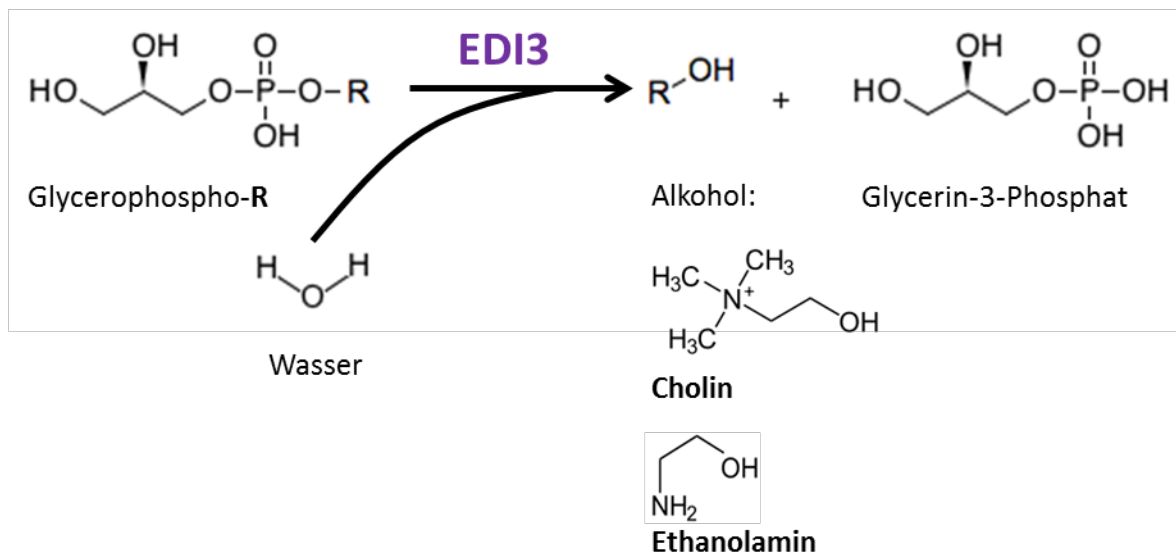
##### 4.4.1.1 EDI3-Knockdown

Im EDI3-Knockdown erhöht sich die intrazelluläre GPC-Konzentration auf die siebenfache Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen. Demgegenüber verringert sich die Produkt-Konzentration, denn die Cholin-Konzentration der Zelle ist deutlich um 64 % herabgesetzt. Dies bestätigt eindrücklich die funktionelle Reduktion der EDI3-Enzymaktivität und bestätigt GPC als Substrat und Cholin als Produkt von EDI3. Die Konzentration des sekundären Metaboliten PCho ist jedoch nicht signifikant beeinflusst, welches in einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe, die in Kooperation mit Hector Keun vom Imperial College in London durchgeführt wurde, zu beobachten war [Stewart et al., 2012]. Allerdings unterscheiden sich die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, die alle in Methanol gelösten Metaboliten untersuchen, grundlegend von früheren Arbeiten, bei denen das Methanol zum Stoppen des Metabolismus verwendet wurde und vor der Zweiphasenextraktion der Zellen mitsamt den darin gelösten Metaboliten verworfen wurde.

Die signifikante Erhöhung der GPC-Konzentration für EDI3-Knockdown war zu erwarten, da Glycerophosphocholin das bekannte Substrat für EDI3 ist [Okazaki et al., 2010, Ohshima et al., 2015]. GPC wurde als Hauptsubstrat für EDI3 bestätigt. Eine biologische Relevanz der enzymatischen Aktivität kann aufgrund der sehr deutlichen Veränderung der GPC-Konzentration postuliert werden. Für eine andere Glycerophosphocholindiesterase GDE2 (GDPD5) konnte *in vivo* eine Assoziation zwischen der Expression und der GPC-Konzentration in Brustkrebs mit negativen Hormonrezeptorstatus (HR<sup>-</sup>), im Vergleich zu HR<sup>+</sup>-Brustkrebs, gezeigt werden [Cao et al., 2012f]. Neben der signifikanten Veränderung von GPC ist auch ein Trend zu erhöhten Glycerophosphoethanolamin-Konzentrationen in MCF7-Zellen mit EDI3-



Knockdown beobachtet worden. Folglich scheint neben GPC in geringerem Umfang auch GPEA als Substrat für EDI3 zu dienen (siehe auch Abbildung 4.1).



**Abb. 4.1: Enzymatische Funktion von EDI3, eine Diesterase für GPC und GPEA**

Die NMR-Analysen ergaben, dass EDI3 neben Glycerophosphocholin auch Glycerophosphoethanolamin zu Glycerin-3-Phosphat und den entsprechenden freien Alkoholen Cholin und Ethanolamin umsetzen kann.

#### 4.4.1.2 CHKA-Knockdown

Entsprechend der in Hudson *et al.* (2013) beschriebenen enzymatischen Funktion erhöht sich bei CHKA-Knockdown die Cholin Substratkonzentration um  $70 \pm 23 \%$ , während  $77 \pm 3 \%$  weniger PCho gebildet wird. Diese Reduktion des Phosphocholins bestätigt vergleichbare Experimente anderer Arbeitsgruppen: In stark invasiven Krebszell-Linien kann die PCho-Konzentration durch CHKA-Knockdown um bis zu 50 % reduziert werden, in untransformierten Zellen ist jedoch keine signifikante Veränderung zu beobachten [Glunde *et al.*, 2005, Granata *et al.*, 2014]. Diese beobachteten *in vitro*-Effekte entsprechen *in vivo*-relevanten Veränderungen. Beispielsweise wurde in Endometrium-Karzinomen 79 % mehr PCho gefunden als im gesunden Endometriumgewebe [Trousil *et al.*, 2014]. Erhöhte PCho-Level weisen auf maligne Transformation hin. Neben Cholin ist auch Ethanolamin als Substrat für die Cholinase bekannt [Aoyama *et al.*, 2002, Gibellini *et al.*, 2008, Gallego-Ortega *et al.*, 2009] und wird zu Phosphoethanolamin (PEA) phosphoryliert. Die PEA-Konzentration lag bei den hier untersuchten Extrakten aus MCF7-Zellen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze mit NMR-Spektroskopie. Eine Reduktion von PEA konnte somit nicht detektiert werden. Eine Reduktion der CHKA-Enzymaktivität

erklärt nicht direkt die beobachtete Erhöhung der GPC-Konzentration. Eine andere Arbeitsgruppe fand jedoch bei CHKA-Knockdown ebenfalls erhöhte GPC-Konzentrationen [Granata et al., 2014, Granata et al., 2015], während Glunde et al. 2005 keine Veränderungen in GPC oder Cholin bei CHKA-Knockdown fanden. Andererseits ist die GPC-Konzentration bei CHKA-Überexpression verringert [Shah et al., 2010].

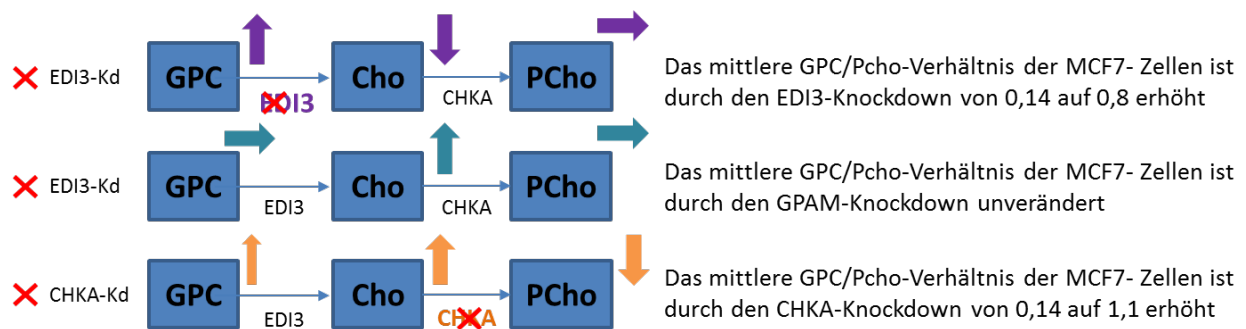
Eventuell wird also die Produktion und/oder der Abbau von GPC intrazellulär durch die Konzentration von freiem Cholin reguliert. Eine Co-Regulation von EDI3 und CHKA wäre ebenfalls eine Möglichkeit, die die Ergebnisse erklären würde. Eine Co-Expression zwischen der Glycerophosphocholin-Diesterase GDE2 und CHKA konnte in Brustkrebs [Cao et al., 2012d] gezeigt werden. Im Endometriumkarzinom sind Enzyme des *Kennedy-Pathways* wie CHKA, Enzyme des *Landes-Cycle* wie Lysophospholipid-Acyltransferasen (LYLPAs), EDI3 und Cholin-Transporter stärker als im normalen Endometriumgewebe exprimiert [Trousil et al., 2014]. Darüber hinaus führt die Reduktion von EDI3 durch Knockdown allein nicht zu Veränderungen der CHKA-Expression, welches durch Analyse der EDI3-Expression in CHKA-Knockdown-Experimenten mit drei verschiedenen siRNAs, spezifisch für die CHKA-mRNA überprüft wurde (Daten nicht gezeigt).

### 4.4.1.3 GPAM-Knockdown

Der GPAM-Knockdown hat keinen Einfluss auf die Cholinmetaboliten GPC, PCho oder PtdCho. Interessanter Weise ist jedoch die Cholin-Konzentration signifikant um  $63 \pm 7,4$  % erhöht. Der Grund dafür ist nicht vollkommen klar aber es kann vermutet werden, dass die mangelnde Umsetzung von G3P zu DAG, und weiter zu Phosphatidylcholin (PtdCho) zu einem partiellen Mangel an PtdCho führt, welches die Aufnahme von Cholin (einem Ausgangsstoff für die PtdCho-Synthese) verstärkt.

#### 4.4.1.4 Das GPC/PCho Verhältnis

Im Zusammenhang mit Krebs wird oft das Verhältnis der Metaboliten Glycerophosphocholin und Phosphocholin betrachtet. Tumore haben mit zunehmender Aggressivität ein kleineres GPC/PCho-Verhältnis [Glunde et al., 2011b, Trousil et al., 2014]. Der Knockdown von CHKA führt in der Tat zu einem verminderten GPC/PCho-Verhältnis. Ebenso Während der Knockdown von EDI3 und von CHKA zu einem verminderten GPC/PCho-Verhältnis führt, hat nur EDI3 - nicht aber CHKA - einen Einfluss auf die zelluläre Migration. Der Knockdown von GPAM hat keinen Einfluss auf die GPC- und PCho-Konzentrationen oder auf das GPC/PCho-Verhältnis. Das GPC/PCho-Verhältnis ist nicht ursächlich für die hier untersuchte Migration.



#### Abb. 4.2: Veränderung der Cholinmetaboliten bei EDI3- und CHKA-Knockdown

EDI3- und CHKA-Knockdown erhöhen das GPC/PCho-Verhältnis, da bei Verlust der Enzymaktivität von EDI3 GPC signifikant stark erhöht ist, während die Verminderung der CHKA-Enzymmenge zu einer signifikanten Reduktion der PCho-Konzentration führt. Metaboliten: Glycerophosphocholin (GPC), Cholin (Cho), Phosphocholin (PCho). Die Pfeilrichtung gibt die Art der Veränderung an: Spitze nach oben = Erhöhung, Spitze nach unten = Verringerung der Konzentration durch den angegebenen Knockdown im Vergleich zu MCF7-Zellen mit Kontrollbehandlung.

Die Pfeilstärke entspricht der Stärke des signifikanten Effektes in den drei biologischen Replikaten.

#### 4.4.2 Veränderungen in der G3P-Konzentration

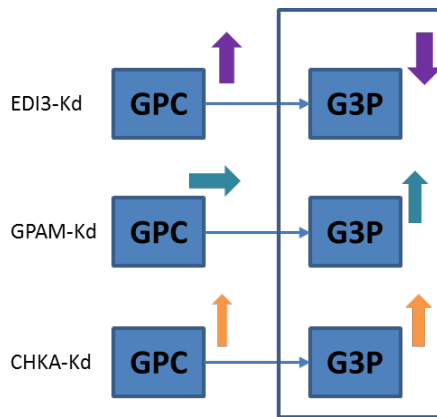
Glycerin-3-Phosphat wird der Zelle durch die G3P-Dehydrogenase zur Verfügung gestellt, die Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), ein Intermediat der Glykolyse, zu G3P reduziert. G3P kann durch Oxidation zu DHAP wiederum in die Glykolyse eingespeist werden. Bei Glucosemangel wird G3P aus Metaboliten der Glyceroneogenese wie Pyruvat, Alanin oder Glutamin hergestellt oder durch Phosphorylierung von Glycerin durch die Glycerinkinase gebildet. Des Weiteren kann G3P auch durch Glycerophosphocholin-Phosphodiesterasen (GPCPDs) wie EDI3 aus Glycerophosphocholin (GPC) oder Glycerophosphoethanolamin (GPEA) hergestellt werden. Glycerin-3-Phosphat dient als Gerüst für die Synthese von LPA, PA und DAG. DAG ist ein Zwischenprodukt der Triglycerid- und Phospholipid-Synthese. Eine weitere Bedeutung kommt dem G3P in der Regeneration des  $\text{NAD}^+$  von NADH aus dem Citratzyklus zu. Das oxidierte *Nicotinamide adenine dinucleotide* ( $\text{NAD}^+$ ) ist ein essentielles Coenzym in biochemischen Synthesen. Die Menge an  $\text{NAD}^+$  im Cytosol ist begrenzt. Durch zwei Shuttleprozesse ist aber gesichert, dass die im NADH gespeicherten Elektronen an die Atmungskette im Mitochondrium übertragen werden und NADH zu  $\text{NAD}^+$  regeneriert wird. Eines dieser Shuttle ist das Glycerin-3-Phosphat-Shuttlesystem.

Um zu untersuchen, ob die Enzyme EDI3 und GPAM, und eventuell auch die CHKA, den G3P-Pool der Zelle entscheidend beeinflussen können, wurde die intrazelluläre G3P-Konzentration mit NMR-Spektroskopie quantifiziert.

Die Reduktion der GPAM-Enzymmenge durch Knockdown erhöht die intrazelluläre G3P-Konzentration um  $24,6 \pm 6\%$ . Daraus lässt sich ableiten, dass ein Teil des G3P der Zelle zur LPA-Synthese verwendet wird. Der Verlust der EDI3-Expression führt hingegen zur Verringerung der G3P-Konzentration um  $44 \pm 8\%$ . Diese massive Beeinflussung der G3P-Konzentration verdeutlicht, dass die Spaltung von GPC einen Großteil des in der Zelle verwendeten G3Ps zur Verfügung stellt und unterstreicht die zelluläre Bedeutung von EDI3. Beide Enzyme, EDI3 und GPAM, haben Einfluss auf die Migration. Wenn der Mechanismus für die Veränderung der Migration für beide Enzyme identisch ist, dann spielt die G3P-Konzentration darin keine Rolle.

Die Reduktion der Expression von Cholin kinase- $\alpha$  erhöht überraschend die intrazelluläre G3P-Konzentration. Damit erhöhen sowohl der GPAM-Knockdown als auch der CHKA-Knockdown in ähnlichem Umfang signifikant die intrazelluläre Konzentration an G3P, jedoch nur GPAM beeinflusst die Migration, nicht aber die CHKA. Die Menge an GPAM-mRNA in Zellen mit CHKA-Knockdown bleibt unverändert. Die GPAM-Enzymmenge scheint für die Synthese von LPA limitierend

zu sein, denn die Konzentration an LPA ist in Zellen mit CHKA-Knockdown nicht erhöht (gemessen mit LC-MS/MS siehe Abschnitt 4.3.3). Es wäre auch möglich, dass intrazellulär verschiedene G3P-Speicher bereit stehen und das durch CHKA-Kd entstandene G3P zum Beispiel in den hier nicht näher untersuchten Citratzyklus eingespeist wird.



**Abb. 4.3: Veränderungen der G3P-Konzentrationen**

Graphische Darstellung der Veränderungen, der mit NMR-Spektroskopie quantifizierten intrazellulären G3P-Konzentration bei Reduktion der Expression von EDI3, GPAM oder CHKA mittels Knockdown in MCF7-Zellen. Der Knockdown von EDI3 verringert die G3P-Konzentration intrazellulär, während der GPAM-Knockdown und der CHKA-Knockdown die G3P-Konzentration erhöhen. Die Pfeilstärke entspricht der Stärke des signifikanten Effektes in den drei biologischen Replikaten. Abkürzungen: Cholininkinase-alpha (CHKA), Glycerin-3-Phosphat (G3P), Glycerophosphocholin (GPC), Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase (EDI3), Glycerin-3-Phosphatacyltransferase1 (GPAM), Knockdown (Kd).

#### 4.4.3 Einfluss der LPA-Konzentration auf die Migration

Das Signalmolekül LPA und dessen Rezeptoren konnten bereits mit veränderter Migration [Yanagida et al., 2013, Yang et al., 2013a, Llona-Minguez et al., 2015] und Tumorwachstum [Brindley, 2004, Liu et al., 2009] in Verbindung gebracht werden. LPA ist ein Ligand der G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptoren [Mills et al., 2003, Coleman et al., 2004] und kann so verschiedene zelluläre Prozesse wie Migration, Überleben und Proliferation steuern. LPA ist in hohen Konzentrationen in der Flüssigkeit der freien Bauchhöhle, bei Aszites im Falle von Eierstockkrebskrankungen zu finden [Liu et al., 2009]. Das Bauchwasser von Patientinnen mit Eierstockkrebs enthält 10-fach höhere Konzentrationen an LPA als jenes gesunder Frauen [Leblanc et al., 2014]. Dies ist auf erhöhte Expression der LPA herstellenden Lysophospholipase D, bekannt als ATX, und reduzierter Expression der

LPA abbauenden Phosphatasen (LPPs) zurückzuführen [Willier et al., 2013]. Die erhöhte Expression von ATX oder der LPA-Rezeptoren ist ausreichend um Brusttumore in Mäusen zu induzieren [Panupinthu et al., 2010].

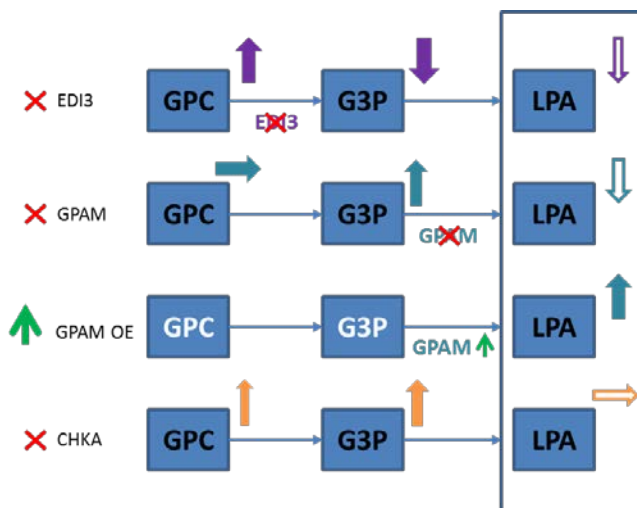
GPAM verestert eine (bevorzugt ungesättigte) Fettsäurekette von AcylCoA auf das Glycerin-3-Phosphatgerüst an der sn-1-Position, so dass LPA entsteht. EDI3 spaltet Glycerophosphocholin in G3P und Cholin. Verringerte G3P-Konzentrationen begrenzen die Substratmenge für GPAM und dies könnte ebenfalls zu verringerten LPA-Konzentrationen in der Zelle führen. Ob beide Enzyme GPAM und EDI3 die LPA-Konzentration in MCF7-Zellen verändern, wurde mit LC-MS/MS untersucht. Dafür wurde die Expression beider Enzyme mittels Knockdown reduziert, oder aber die GPAM-Expression mittels Transfektion erhöht.

Die LPA-Konzentration wurde durch exemplarische Messung der einfach-ungesättigten Oleoyl-Lysophosphatidsäure (O-LPA, 18:1) und der gesättigten Palmitoyl-Lysophosphatidsäure (P-LPA, 16:0) mittels Massenspektroskopie in Zellextrakten bestimmt und ergab eine Reduktion für O-LPA um 31,5 % und für P-LPA um 37 % in den Proben mit GPAM-Knockdown, die nur für P-LPA deutlich war. Eine signifikante Erhöhung der Konzentration wurde für beide LPA-Spezies in den Proben mit GPAM-Überexpression festgestellt (siehe Abbildung 3.11). Hierbei ist die Veränderung in P-LPA (die gesättigte Fettsäure 16:0 ist verestert) immer etwas deutlicher als die Veränderung in der O-LPA-Konzentration. Von GPAM ist bekannt, dass es gesättigtes Fettsäure-CoA gegenüber ungesättigtem bevorzugt [Vancura et al., 1994, Hammond et al., 2002, Xu et al., 2006]. Der beobachtete Trend stimmt somit mit den Literaturdaten überein. Allerdings ist der Gehalt an ungesättigter O-LPA mit ca. 21 aMol je Zelle höher als der von P-LPA mit nur ca. 2,9 aMol. Der Gehalt an P-LPA war bei GPAM-Kd um durchschnittlich 0,6 aMol je Zelle reduziert, der Gehalt an O-LPA um 4,5 aMol. Der Gesamtgehalt an LPA und PA in einer Zelle beträgt etwa 650 aMol (gemessen mit NMR, Daten nicht gezeigt). Die beiden gemessenen LPA-Spezies lassen auf eine Gesamtveränderung im LPA-Gehalt um ca. 260 aMol und damit auf einen überraschend hohen Beitrag von GPAM zur Gesamtaktivität der Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferasen schließen. GPAM ist vor allem in der Leber und in Adipozyten exprimiert und trägt dort 30-50 % zur GPAT-Enzymaktivität bei. Auch in anderen Geweben ist GPAM zu finden; der Beitrag zur Gesamtaktivität wurde jedoch bisher mit etwa 10 % [Cao et al., 2012a] unterschätzt. Im Vergleich zu Veränderung der LPA-Konzentration war die Anreicherung von G3P durch GPAM-Kd mit etwa 2,65 fMol je Zelle etwa 10mal so groß wie die Reduktion von LPA. Dies verdeutlicht, dass LPA ein schnell verstoffwechselter

Metabolit ist, der sich – vermutlich aufgrund seiner Funktion als Signalmolekül - nicht in der Zelle anreichert.

Zudem scheint die Expression von GPAM nicht redundant zu sein, da die *in vitro* Reduktion von GPAM nicht zu erhöhter Expression einer anderen Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase führt.

Der EDI3-Knockdown ergab einen Trend zu verringerten LPA-Konzentrationen. Die Konzentration an Oleoyl-LPA ist um 23,4 % und die Palmitoyl-LPA-Konzentration um 16 % reduziert. Damit ist die Änderung des sekundären Metabolits LPA nicht derart gravierend wie die Veränderung des direkten Metabolits G3P, welcher um 44 % reduziert ist. G3P wird jedoch nicht nur zur LPA-Synthese verwendet, sondern kann auch in die Glykolyse eingespeist werden.



**Abb. 4.4: Veränderungen in LPA könnten ursächlich für die Inhibierung der Migration bei EDI3- und GPAM-Knockdown sein**

EDI3- und GPAM-Knockdown verringern die LPA-Konzentration, während die Verringerung der CHKA-Expression keinen Einfluss auf die intrazelluläre LPA-Konzentration in MCF7-Zellen hat.

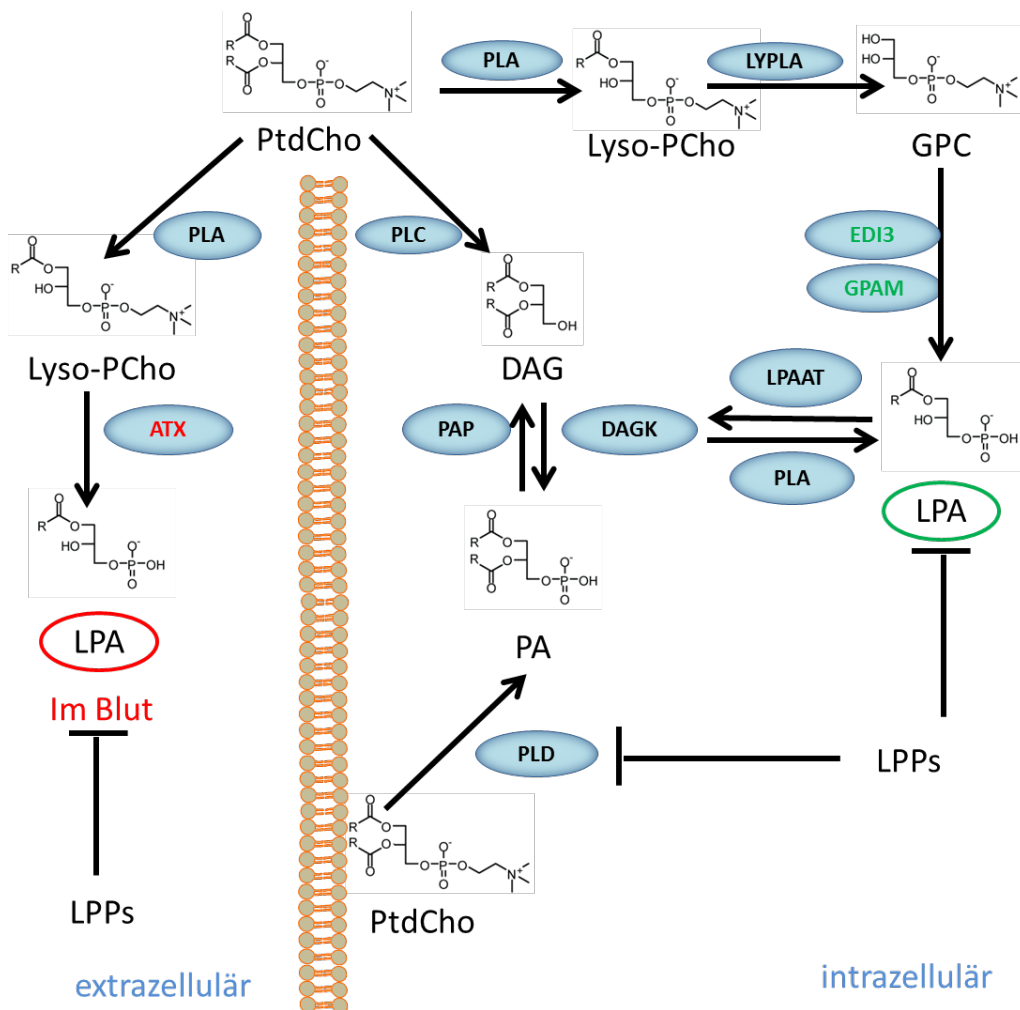
Quantifizierte Metaboliten sind schwarz gedruckt, nicht bestimmte Metaboliten sind weiß gedruckt. Metaboliten: Glycerophosphocholin (GPC), Glycerin-3-Phosphat (G3P), Lysophosphatidsäure (LPA).

Die Pfeilrichtung gibt die Art der Veränderung an: Pfeilspitze zeigt nach oben = Erhöhung, Pfeilspitze zeigt nach unten = Verringerung der Konzentration im Vergleich zu MCF7-Zellen mit Kontrollbehandlung (NEG für Knockdown-Experimente, MOC für GPAM-Überexpression (OE)). Die Pfeilfarbe gibt an, welches Enzym experimentell reguliert wurde: Lila = EDI3, Türkis = GPAM, Orange = CHKA. Die Pfeilstärke entspricht der Stärke des Effektes. Gefüllte Pfeile indizieren signifikante Veränderungen, Konturpfeile indizieren Veränderungen, die nicht signifikant waren.

Der CHKA-Knockdown verändert die Konzentration an P-LPA oder O-LPA nicht. Es kann also vermutet werden, dass die Veränderungen der Migration auf die

Reduktion der LPA-Konzentration bei EDI3 und GPAM-Knockdown zurückzuführen ist.

Es ist noch nicht geklärt, ob das intrazellulär gebildete LPA die Membran-ständigen LPA-Rezeptoren aktivieren kann, da deren Ligandenbindedomäne sich an der extrazellulären Seite der Zellmembran befindet. Die LPA und PA dephosphorylierenden Lysophosphatid-Phosphatasen existieren auch an intrazellulären Membranen und haben als „Endophosphatasen“ zum Beispiel Einfluss auf die Aktivierung der Protein Kinase C und der Phospholipase D [Samadi et al., 2011].



**Abb. 4.5: Intrazelluläres LPA, anders gebildet als extrazelluläres LPA**

Metaboliten: Phosphatidylcholin (PtdCho), Diacylglycerin (DAG), Phosphatidsäure (PA), Lysophosphatidylcholin (Lyso-PtdCho), Lysophosphatidsäure (LPA),  
Enzyme: Lysophospholipase (ATX), DAG-Kinase (DAGK), Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase1 (GPAM), Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase (EDI3), LPA-Acyltransferase (LPAAT), Lipid-Phosphat-Phosphatase (LPP), Lysophospholipasen wie LYPLA1, LYPLA2, LYPLA3 oder PLB1 (LYPLA), Phosphatidsäure-Phosphatase PAP1 auch LIPIN1 (PAP), Phospholipase-A1, -A2 und PLB1 (PLA), Phospholipase-C (LPC), Phospholipase-D (PLD).



Die bisher durchgeführten Ergebnisse deuten darauf hin, dass LPA ursächlich für die beobachteten Veränderungen der Migration bei Modulation von GPAM und EDI3 sein könnte. Dieser mögliche Mechanismus sollte weiter untersucht werden. Es gibt verschiedene LPA-Rezeptoren, deren Beteiligung an der Regulation der Migration gezeigt werden konnte. Zum Beispiel induziert der LPA-Rezeptor 1 die Migration in Prostata-Krebszellen durch p42- und p38 $\alpha$ -Aktivierung [Hao et al., 2007]. Auch der LPA-Rezeptor 2 unterstützt die Migration durch Aktivierung von G-Proteinen und der p38-Signalkaskade [Yang et al., 2013a]. Der LPA-Rezeptor 3 der Maus ist notwendig für die *in vitro*-Chemotaxis, während LPA-Rezeptor 4 eher einen inhibierenden Effekt auf die zelluläre Migration hat [Lee et al., 2008].

Zur Untersuchung der Bedeutung der LPA-Rezeptoren werden zukünftig stabile Zell-Linien generiert, die entweder EDI3 oder GPAM stark und enzymatisch funktionell exprimieren sollen. Die Migration wird dann bei Inhibition und Knockdown der LPA-Rezeptoren auf der Zelloberfläche untersucht.

Für intrazelluläres LPA ist PPAR $\gamma$  als Rezeptor in der Kernmembran bekannt [McIntyre et al., 2003] und eine Aktivierung des Rezeptors in GPAM-überexprimierenden CHO-Zellen konnte gezeigt werden [Stapleton et al., 2011]. Da PPAR $\gamma$  die Speicherung von Fetten reguliert [Yessoufou et al., 2010], scheint LPA als Zwischenprodukt der Triglyceridsynthese ein logischer natürlicher Ligand für PPAR $\gamma$  zu sein. Der „*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*“ (PPAR $\gamma$ ) ist vielfach bei der Entstehung von Darmkrebs [Jeong et al., 2014], Blasenkrebs [Yang et al., 2013c] und Leberkrebs [Shen et al., 2012, Pang et al., 2013] sowie bei der Migration von Blut-, Muskel- und Endothelzellen beschrieben [Gustin et al., 2008, Ham et al., 2014, Lin et al., 2014, Liu et al., 2015]. Demnach inhibiert beispielsweise die Überexpression von PPAR $\gamma$  und die Verwendung des Agonisten GW1929 die Invasion von *hepatic cellular carcinoma* HCC-Zellen [Pang et al., 2013]. In der Vergangenheit wurde die differentielle Expression von PPAR-Rezeptoren während der Wundheilung untersucht [Tan et al., 2004, Michalik et al., 2006].

PPAR $\gamma$  bildet bei Aktivierung durch Bindung eines Liganden, wie LPA, Heterodimere mit einem der „retinoid X receptor“ RXR-Rezeptoren aus und wird anschließend in den Kern aufgenommen. Dort bindet er die DNA von Genen, die ein „peroxisome proliferator response element“ (eine PPRE-Sequenz) haben [Juge-Aubry et al., 1997, Berger et al., 2002]. Je nach Gen wird dadurch die Transkription initialisiert oder reprimiert. Durch die Vielzahl möglicher Heterodimere und Koaktivatoren reguliert PPAR $\gamma$  verschiedene Gene und damit unter anderem

metabolische Prozesse mit klinischer Relevanz wie Insulin-Resistenz [Juge-Aubry et al., 1997, Picard et al., 2002].

Synthetische PPAR $\gamma$ -Agonisten aus der Gruppe der Thiazolidindione werden zur Behandlung von Diabetes Mellitus Typ 2 eingesetzt und zeigten auch Wirkung bei der Behandlung von Krebs [Weng et al., 2006, Hatton et al., 2008, Belfiore et al., 2009, Yuan et al., 2012, Joshi et al., 2014]. Ein Abgleich von differentiell exprimierten Genen eines Gene Arrays von MCF7-Zellen, in denen die EDI3-Expression experimentell durch Knockdown vermindert wurde, zeigt keine Übereinstimmung mit publizierten Gene-Array-Daten, bei denen PPAR $\gamma$  experimentell irreversibel inhibiert wurde [Yuan et al., 2012]. Somit wurden keine Hinweise darauf gefunden, dass EDI3 PPAR $\gamma$ -Zielgene beeinflusst. Für GPAM liegen leider keine ähnlichen Daten vor, da unter GPAM-Modulation noch kein Gene-Array durchgeführt wurde.

Demnach bleibt es bisher eine unbestätigte Theorie, dass GPAM und EDI3 über Veränderung der LPA-Konzentration die Migration von Zellen verändern können. Es wäre jedoch auch denkbar, dass andere PPAR-Rezeptoren wie beispielsweise PPAR $\alpha$ , der wie GPAM stark in der Leber exprimiert ist [Yessoufou et al., 2010], eine Rolle für die LPA vermittelte Regulation spielen.

LPA und die daraus gebildete Phosphatidsäure (PA) sind als sogenannte „second messenger“ bekannt. Die erhöhten LPA-Konzentrationen der Zelle bei GPAM- oder EDI3-Knockdown könnten die PA-Konzentrationen erhöhen, da die eine Fettsäurekette tragende Lysophosphatidsäure durch die Familie der LPA-Acyltransferasen (AGPATs; E.C.2.3.1.51) zur zwei Fettsäureketten tragenden Phosphatidsäure (PA) verestert wird. PA ist in der Lage als Membrananker für Signalproteine zu dienen. So wird zum Beispiel die Kinase Raf1 durch PA zur Plasmamembran rekrutiert und damit Einfluss auf die MAP-Kinase-Kaskade genommen [Andresen et al., 2002]. PA ist auch fähig, mTOR-Komplexe zu stabilisieren und dadurch Überlebenssignale der Zelle zu verstärken [Foster, 2009, Toschi et al., 2009]. Eine Veränderung der MAP-Kinase-Kaskade anhand von ERK-Phosphorylierung lag beim gewählten experimentellen Aufbau für die Migration von MCF7-Zellen nicht vor (Daten nicht gezeigt). Somit scheint eine Beeinflussung der Migration über ERK durch PA unwahrscheinlich. Der mTOR-Signalweg wurde in der hier vorgestellten Arbeit nicht untersucht. Es bleibt offen, ob für die beobachteten Veränderungen in der Proliferation PA verantwortlich ist.

#### 4.4.4 Veränderungen in der PtdCho- und Triglycerid-Konzentration

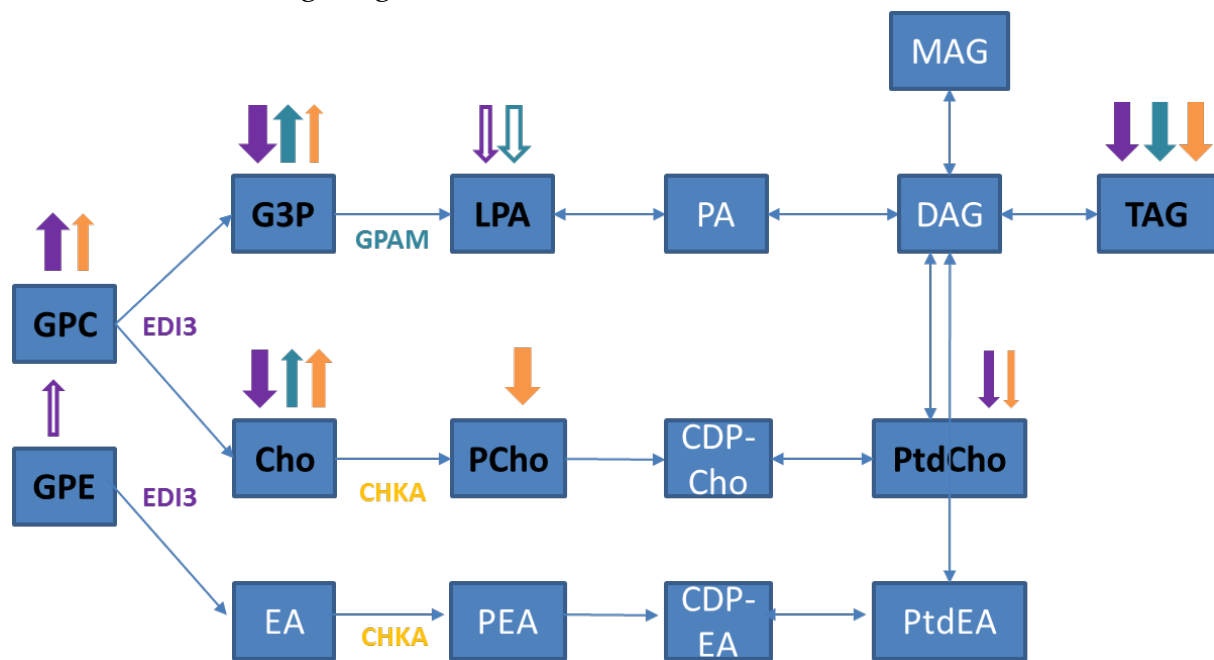
Wegen der eingeschränkten Löslichkeit von Lipiden in Wasser wurden Extrakte zur Quantifizierung des Phosphatidylcholins (PtdCho) oder der Triglyceride (TG) in einem Gemisch aus zwei Teilen deuteriertem Chloroform und einem Teil deuteriertem Methanol aufgenommen. Da die Zellmembranen zu diesem Zeitpunkt bereits durch Zentrifugation entfernt wurden, kann kein PtdCho aus der Membran herausgelöst werden. Gemessen wird demnach PtdCho, das zum Zeitpunkt der Extraktion in Methanol löslich war. Triglyceride werden in den Zellen in sogenannten *lipid droplets* gespeichert, die neben TG auch Cholesterin enthalten und durch eine einschichtige Phospholipidschicht mit daran assoziierten Proteinen vom Cytosol abgegrenzt sind.

Wie durch die NMR-Spektroskopie belegt wurde, ist bei GPAM-Knockdown die Konzentration an TG signifikant um  $63 \pm 13\%$  reduziert. Die PtdCho-Konzentrationen sind tendenziell verringert, jedoch nicht signifikant verändert. Dies zeigt, dass LPA, welches durch GPAM innerhalb des dreitägigen Knockdown-Experimentes gebildet wurde, ausschließlich für die Triglyceridsynthese verwendet wurde und nicht für die Phospholipidsynthese. Da es sich bei MCF7 nicht um Zellen handelt, in denen Fette gespeichert werden, sind Veränderungen in der Triglyceridsynthese schon nach kurzer Zeit messbar. Es ist überraschend, dass die Triglycerid-Konzentrationen auch bei EDI3- und CHKA-Knockdown signifikant reduziert sind.

Änderungen in PtdCho, als Hauptbestandteil der Membran, sollten geringfügig sein, sind jedoch bei EDI3- und CHKA-Knockdown nach drei Tagen bereits signifikant messbar. Es ist also davon auszugehen, dass GPAM keinen Beitrag zu PtdCho-Produktion leistet. Das widerspricht bisher veröffentlichten Ergebnissen zu GPAM-Metaboliten in Brustkrebs [Brockmüller et al., 2012], die abhängig von der GPAM-Expression eine signifikante Erhöhung von TG und den Phospholipiden Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin in Methanol/Chloroform-Extrakten von Tumorgewebe mittels Massenspektrometrie zeigen. Durch eine Reduktion von Cholin als Ausgangsprodukt für CDP-Cholin könnte bei EDI3-Knockdown die Synthese von PtdCho beeinträchtigt sein. Vom energiereichen CDP-Cholin wird die chemische Gruppe Cholin auf Diacylglycerin übertragen. Durch Reduktion der G3P-Konzentration könnte EDI3 – wie auch GPAM – die DAG-Konzentration herabsetzen und so einen weiteren essentiellen Metabolit für die PtdCho-Synthese limitieren. Sollte die Veränderung von LPA jedoch zu Veränderungen des verfügbaren Diacylglycerins für die PtdCho-Synthese führen, so

kann dieses durch Abbau von TG produziert werden. Aus der Beobachtung, dass der GPAM-Knockdown die PtdCho-Konzentrationen nicht signifikant beeinflusst, ist zu schließen, dass LPA und G3P nicht entscheidend für die PtdCho-Synthese sind. Veränderungen der PtdCho-Konzentration sind demnach eher auf Änderungen der Metaboliten Cholin und Phosphocholin zurückzuführen.

Der CHKA-Knockdown setzt die Phosphorylierung von Cholin zu Phosphocholin auf 25 % herab. Eine geringfügige, aber signifikante, Reduktion der PtdCho-Konzentration bei CHKA-Kd um 5 % belegt, dass weniger CDP-Cholin und damit auch weniger PtdCho synthetisiert werden kann. Diese Beobachtung konnte bisher noch nie so deutlich gezeigt werden [Granata et al., 2014].



**Abb. 4.6: Reduktion von Triglyceriden und Phosphatidylcholin.**

Graphische Zusammenfassung der gemessenen Metaboliten und der nicht bestimmten Intermediate des Kennedy Pathway.

Blaues Kästchen = Metabolit; quantifizierte Metaboliten in schwarz: Cholin (Cho), Glycerin-3-Phosphat (G3P), Glycerophosphocholin (GPC), Glycerophosphoethanolamin (GPEA), Lysohosphatidsäure (LPA), Phosphatidylcholin (PtdCho), Phosphocholin (PCho), Triglyceride (TG); nicht bestimmte Metaboliten in weiß: CDP-Ethanolamin (CDP-EA), Diacylglycerin (DAG), Ethanolamin (EA), Monoacylglycerin (MAG), Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylethanolamin (PtdEA), Phosphoethanolamin (PEA).

Die Pfeilrichtung gibt die Art der Veränderung an: Pfeilspitze zeigt nach oben = Erhöhung, Pfeilspitze zeigt nach unten = Verringerung der Konzentration im Vergleich zu MCF7-Zellen mit Kontrollbehandlung

Die Pfeilfarbe gibt an, bei welchem Knockdown die Veränderung zu beobachten ist: Lila = EDI3-Kd, Türkis = GPAM-Kd, Orange = CHKA-Kd. Die Pfeilstärke entspricht der Stärke des Effektes. Gefüllte Pfeile indizieren signifikante Veränderungen, Konturpfeile indizieren Veränderungen, die nicht statistisch signifikant waren.

## 4.5 GPAM und EDI3 als mögliche therapeutische Ziele

Für EDI3 konnte eine klare Assoziation zwischen hoher EDI3-Expression und dem Auftreten von Metastasen bei Eierstockkrebspatienten nachgewiesen werden. Darüber hinaus kann vermutet werden, dass eine Inhibierung der EDI3-Aktivität die Spaltung von GPC minimiert und somit weniger Cholin als Substrat für die Cholin kinase zur Verfügung steht. Unter den gewählten Kulturbedingungen ist Cholin im Medium enthalten, dennoch ist bei EDI3-Knockdown Cholin signifikant reduziert. Die Cholintransporter der Zelle reichen offenbar nicht aus, um den Verlust der Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase-Aktivität ausgleichen zu können. Selbst bei Überexpression von Cholin kinase - einem häufigen Muster in verschiedenen Krebsarten wie Brustkrebs, Eierstockkrebs und Hirntumoren -, würde auf diese Weise das GPC/PCho Verhältnis zugunsten von GPC verschoben werden. Da eine erhöhte PCho-Konzentration und eine hohe Expression von CHKA mit verstärktem Tumorwachstum in Verbindung stehen, könnten EDI3-Inhibitoren durch die Limitierung von Cholin die üblichen Chemotherapien ergänzen. Für Phosphodiesterasen existieren bereits Inhibitoren die *in vitro* schon eingesetzt werden konnten. Es sei hier auch erwähnt, dass bereits verschiedene gut wirksame CHKA-Inhibitoren für *in vitro*-Experimente und Mausversuche verwendet wurden. Für mindestens einen Inhibitor TCD-717 (TCD-Pharma) ist die klinische Testphase 1 abgeschlossen [<https://clinicaltrials.gov: NCT01215864>]. *In vitro* gelang es unserer Arbeitsgruppe bereits EDI3 effektiv zu inhibieren Stewart et al. (2012). EDI3-Inhibitoren sollten ebenfalls auf ihre Eignung als Anti-Tumor-Medikament getestet werden. Neben der Bedeutung des Cholinmetabolismus und des GPC/PCho-Verhältnisses zeigen die Ergebnisse mit EDI3, dass ein weiterer metabolischer Weg in der Lage ist die Migration und Adhäsion zu beeinflussen [Stewart et al., 2012, Lesjak et al., 2014], beides essentielle Fähigkeiten von Krebszellen bei der Metastasierung. Die Migration in der vorliegenden Studie korreliert nicht mit Veränderung der Cholinmetaboliten PCho oder GPC, sondern mit der von GPAM katalysierten Veresterung von G3P zu LPA. GPAM könnte demnach ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Krebsentstehung zukommen. Erste Analysen zeigen, dass eine hohe GPAM-Expression mit schlechterer Prognose für Patientinnen mit Eierstockkrebs assoziiert ist. Zukünftig soll hier zunächst die Bedeutung von GPAM für intra- und extrazelluläre LPA-Konzentrationen ermittelt werden. Der Einfluss von GPAM auf die Migration wird zudem zukünftig *in vitro* an Eierstock-Krebszellen untersucht.



## 5. Zusammenfassung

Das Verhindern und die Behandlung von Metastasen stellen eine große Herausforderung der Krebstherapie dar, denn für die meisten Krebspatienten ist die Ausbildung von Metastasen todesursächlich. In früheren Studien konnte bei Patienten mit Endometriumkarzinom eine Assoziation zwischen hoher EDI3-Expression und einer geringeren tumorfreien Überlebensdauer beschrieben werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde EDI3 als eine Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase charakterisiert; sie katalysiert die Hydrolyse von Glycerophosphocholin (GPC) zu Glycerin-3-Phosphat (G3P) und Cholin (Cho). Durch Cholin kinasen wird Cho zu Phosphocholin (PCho) phosphoryliert. Sowohl die Expression von CHKA als auch die Konzentration von PCho ist in vielen Krebszelltypen erhöht. Das GPC/PCho-Verhältnis verringert sich bei Krebserkrankungen. Die enzymatische Reaktion von EDI3 könnte ebenfalls zu der beobachteten Verringerung des GPC/PCho-Verhältnisses beitragen und ist *in vitro* bereits nachgewiesen worden. Mit der hier vorliegenden Arbeit wurde diese enzymatische Funktion in Zellkultur bestätigt. Sie belegt darüber hinaus, dass EDI3 neben GPC auch Glycerophosphoethanolamin als Substrat verwenden kann. Weiterhin wurde in vorausgegangenen Arbeiten EDI3 eine entscheidende Rolle in der Migration zugeschrieben, ein für die Metastasierung bedeutender Prozess. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Cholinmetaboliten GPC, Cho und Phosphocholin jedoch nicht die Ursache für die bei der Modulation von EDI3 beobachteten Änderungen der Migration sind, weil der Knockdown von Cholin kinase- $\alpha$  (CHKA) zu einer ähnlichen metabolischen Verschiebung der Cholinmetaboliten führt wie der EDI3-Knockdown. CHKA aber hat keinen Einfluss auf die Migration von in dieser Arbeit untersuchten humanen Tumorzellen. Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen der Migration bei Inhibition von EDI3, CHKA und GPAM validieren EDI3 als wichtigen Faktor in der Metastasierung und zeigen erstmals *in vitro* Ergebnisse zur Modulation von GPAM in einem zellulären Krebskontext.

Insgesamt gewährt diese Arbeit einen grundlegenden Einblick in die tumorbiologische Funktion des in diesem Zusammenhang noch uncharakterisierten Enzyms GPAM. Sie ist die erste umfassendere Studie über die metabolische Bedeutung von EDI3 und GPAM in humanen Mammakarzinom-Zellen. Die Beobachtung, dass neben EDI3 auch GPAM bei der Zellmigration mitwirkt, bildet den Grundstein zum genaueren Verständnis dafür, auf welche Weise EDI3 zur

Metastasierung von Tumorzellen beitragen kann. Das enzymatische Produkt G3P von EDI3, und nicht das Cholin mit seinen sekundären Metaboliten, ist für die Migration-stimulierende Wirkung von EDI3 verantwortlich. G3P wird durch die Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase GPAM zu Lysophosphatidsäure (LPA) verestert. LPA ist nicht nur Ausgangsstoff für die Triglycerid-Synthese, sondern auch als Ligand für Signalweg-gekoppelte Rezeptoren bekannt. Der GPAM- und der EDI3-Knockdown führen zu geringeren LPA-Konzentrationen in der Zelle. Die Resultate bestärken LPA als intrazellulären Regulator der Migration. Eine weitere Analyse der Wirkungsweise des GPAM-Produktes LPA könnte behilflich sein, neue Behandlungsmethoden gegen Metastasen zu entwickeln.



## **Glycerol-3-Phosphate-Acyltransferase-1 (GPAM) is a key factor in tumour cell migration**

A major challenge in cancer therapy remains the prevention and/or treatment of metastasis, which is usually the main cause of death in cancer patients. Previous studies in our group reported an association between high expression of Endometrial Differential Cancer-3 (EDI3) expression in the primary tumour of ovarian and endometrial cancer patients and decreased survival. In addition, work in our group showed that EDI3 is a glycerophosphodiesterase which catalyses the hydrolysis of glycerophosphocholine (GPC) to glycerol-3-phosphate (G3P) and choline (Cho). Choline is phosphorylated by choline kinase (CHKA) to phosphocholine (PCho), and both enzyme and product are elevated in many cancer cell types. The GPC/PCho ratio has also been reported to decrease in different types of cancer. Via its enzymatic reactivity, EDI3 was also shown to contribute to the observed decrease in GPC/PCho ratio in different types of cancer cells. EDI3's enzymatic function and its role in influencing the GPC/PCho ratio were confirmed in the present work. In addition, EDI3 was also shown to hydrolyze another glycerophosphodiester, glycerophosphoethanolamine. Previous work also described an important role for EDI3 in cell migration, a process important for metastasis. However, the present study indicated that EDI3's role in migration appears to not be via its contribution to choline metabolic pathways, as knockdown of choline kinase- $\alpha$  (CHKA) did not inhibit migration, despite similar metabolic alterations as observed after EDI3 knock down. Comparative knockdown of EDI3, CHKA and GPAM confirmed EDI3's importance in migration and showed for the first time the contribution of a GPAT enzyme to a process linked to cancer.

Overall, this work provides further insight into the tumorigenesis process by describing a new role for GPAM. This is the first comprehensive study of the metabolic importance of both EDI3 and GPAM in human breast cancer cells. The results showing that GPAM, in addition to EDI3, participates in cell migration provides additional insight as to how EDI3 contributes to metastasis, and suggests that G3P and not choline and its secondary metabolites is responsible for EDI3's role in migration. G3P is esterified by glycerol-3-phosphate acyltransferase GPAM to lysophosphatidic acid (LPA). LPA is not only a key precursor for triglyceride synthesis, but also a ligand for G-protein-coupled receptors. The GPAM- and EDI3 knockdown resulted in lower concentrations of LPA in the cell, implying that LPA also functions as an intracellular regulator of migration. Further understanding of the mechanism underlying intracellular LPA's role in migration could help in the development of new treatments against metastasis.



## 6. Verzeichnisse

### 6.1 Verzeichnis der allgemeinen Abkürzungen

<b>dest</b>	destilliert
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DP</b>	<i>Declustering potential</i>
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i> , (Darmbakterium)
<b>ECM</b>	<i>extra cellular matrix</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylendiamin-tetra-acetic acid</i> , (Ethylendiamintetra- Essigsäure)
<b>EMT</b>	Epitheliale Mesenchymale Transition
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FCS</b>	<i>Fetal Calf Serum</i> (fetales Kälberserum)
<b>G3P</b>	Glycerin-3-Phosphat
<b>H-LPA</b>	1-(cis-9-Heptadecenoyl)-Lysophosphatidsäure
<b>HLPC</b>	<i>high performance liquid chromatography mass spectrometry</i>
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>
<b>HRMAS</b>	<i>high resolution magic-angle spinning</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
<b>Kd</b>	Knockdown
<b>Konz.</b>	konzentriert
<b>LC-MS/MS</b>	<i>liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry</i> auch Tandem-Massenspektometrie genannt
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>MRSI</b>	<i>Magnetic resonance spectroscopic imaging</i>
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>n</b>	Anzahl der Messwerte
<b>NMR</b>	<i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i>

<b>NTP</b>	Nukleosidtriphosphat
<b>OE</b>	Überexpression
<b>O-LPA</b>	1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatpuffer
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , (Polymerasekettenreaktion)
<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>R</b>	Rest; Fettsäurekette
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>STABW</b>	Standardabweichung
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TAG</b>	Triglycerid, Triacylglycerol
<b>Taq</b>	<i>Taq (Thermus aquaticus)</i> Polymerase
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-Puffer
<b>TOCSY</b>	<i>Total correlation spectroscopy</i>

## 6.2 Bezeichnungen der Enzyme

ATX	Autotaxin, <i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2</i> , ENPP2, (E.C. 3.1.4.39)
CCT	Cholinphosphat-Cytidylyltransferase (E.C. 2.7.7.15);
CHKA	Cholinkinase-alpha (E.C. 2.7.1.32 + E.C. 2.7.1.82)
CHKB	Cholinkinasa-beta (E.C. 2.7.1.32 + E.C. 2.7.1.82)
CHPT1	Diacylglycerin-Cholinphosphotransferase (E.C. 2.7.8.2)
CK	Cholinkinase CHKA und CHKB (E.C. 2.7.1.32 + E.C. 2.7.1.82)
CPT	Carnitin-Palmityltransferase (E.C. 2.3.1.21)
DAGK	Diacylglycerin-Kinase (E.C. 2.7.1.107)
EACT	CTP-Phosphoethanolamin-Cytidylyl-Transferase (E.C. 2.7.7.14)
EDI3	GDE5, GPCPD1, Glycerophosphocholin-Phosphodiesterase, GDE1 homolog (E.C.3.1.4.2)
EAK	Ethanolamin-Kinase (E.C. 2.7.1.82)
EAPT	Diacylglycerin-Ethanolamin-Phosphotransferase (E.C. 2.7.8.21 )
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.12 )
GPAM	G3P-Acyltransferase-1, mitochondrial (E.C. 2.3.1.15)
GPAT	G3P-Acyltransferase (GPAT1-4) (E.C. 2.3.1.15)
GPEA	Glycerophosphoethanolamin
LPAAT	LPA-Acyltransferase, = 1-acyl-sn-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (AGPATS, PLAAT1/2, LPCAT1) (E.C. 2.3.1.51)
LPCAT	Lysophospholipid-Acyltransferasen, = Lysophosphatidylcholin-Acyltransferasen (E.C. 2.3.1.23)
LPPs	Lysophosphatid-Phosphatasen (zum Beispiel die humane PAP2A = LPP1 und PAP2AB = LPP3)
LYPLA	Lysophospholipasen (LYPLA1, LYPLA2, LYPLA3, PLB1) (E.C. 3.1.1.5)
MGAT	Monoacylglycerol-Acyltransferase (E.C. 2.3.1.22)
PAP	PA-Phosphatase, Phosphatidsäure-Phosphatase (PAP1 = LIPIN1) (E.C. 3.1.3.4)
PLA	Phospholipase A (EC:3.1.1.4)
PLB1	Phospholipase B1 (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.5)
PLC	Phospholipase C (E.C. 3.1.4.3)
PLD	Phospholipase D (E.C. 3.1.4.4)

### 6.3 Liste der Stoffwechselmetaboliten

<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ATP</b>	Adenosintri-phosphat
<b>CDP-Cho</b>	Cytidin-5'-Diphosphocholin
<b>CDP-EA</b>	Cytidin-5'-Diphosphoethanolamin
<b>Cho</b>	Cholin
<b>CMP</b>	Cytidinmonophosphat
<b>CTP</b>	Cytidintri-phosphat
<b>DAG</b>	1,2-Diacyl-sn-Glycerin = Diacylglycerin
<b>EA</b>	Ethanolamin
<b>G3P</b>	Glycerin-3-Phosphat
<b>GPC</b>	Glycerophosphocholin
<b>KK</b>	Ketonkörper
<b>LPA</b>	Lysophosphatidsäure
<b>Lyso-PtdCho</b>	Lysophosphatidylcholin
<b>Lyso-PX</b>	Lysophospholipide
<b>MAG</b>	Monoacylglycerin
<b>PA</b>	Phosphatidsäure
<b>PCho</b>	Phosphocholin
<b>PEA</b>	Phosphoethanolamin
<b>PtdCho</b>	Phosphatidylcholin
<b>PtdEA</b>	Phosphatidylethanolamin
<b>PX</b>	Phospholipide mit X = Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol
<b>TG</b>	Triglycerid, auch Triacylglycerin genannt
<b>Lyso-PX</b>	Lysophospholipide
<b>PA</b>	Phosphatidsäure
<b>PX</b>	Phospholipide mit X= Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol

## 6.4 Verzeichnis verwendeter Einheiten

<b>a</b>	Atto, 10 <sup>-18</sup>
<b>aa</b>	Aminosäuren
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>cps</b>	Counts per second (dt. Zähler Schritte oder Zählimpulse pro Sekunde) eine Einheit zur Zählrate in der Spektroskopie
<b>Da</b>	Dalton oder (unified atomic mass unit) ist die Standardeinheit für die Masse im Atomaren Maßstab. Ein Dalton entspricht in etwa der Masse eines Wasserstoffatoms ( $1.66 \times 10^{-24}$ g) und ist gleich der atomaren Masseneinheit <b>u</b> . Da ist äquivalent zu 1g/mol
<b>f</b>	Femto, 10 <sup>-15</sup>
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton (1 Da = 1 g/mol)
<b>Mol</b>	SI-Basiseinheit der Stoffmenge. Ein Mol enthält etwa $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen.
<b>nM</b>	Nano Mol
<b>psi</b>	Pound-force per square inch, oder pound per square inch („Pfund pro Quadratzoll“), ist eine in der Massenspektrometrie gebräuchliche Maßeinheit des Drucks. 1psi = 6895 Pa
<b>rpm</b>	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute (Upm)
<b>U</b>	unit, Einheit der enzymatischen Aktivität, entspricht dem Umsatz von 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$
<b>xg</b>	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung, entspricht x Vielfachen der Erdbeschleunigung

## 6.5 Beschreibung der Kurzbezeichnungen von Firmen

<b>Ambion™</b>	registrierte Waren- oder Dienstleistungsmarke von Thermo Scientific
<b>Applied Biosystems™</b>	registrierte Waren- oder Dienstleistungsmarke von Thermo Scientific.
<b>GIBCO™</b>	registrierte Waren- oder Dienstleistungsmarke von Thermo Scientific. Gibco produziert Materialien und Lösungen für die Zellkultur.
<b>Invitrogen™</b>	registrierte Waren- oder Dienstleistungsmarke von Thermo Scientific. Invitrogen ist die Hauptmarke von Life für molekularbiologische Anwendungen
<b>J. T. Baker</b>	J. T. Baker GmbH, Deventer, Holland
<b>Merck</b>	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Millipore</b>	Millipore GmbH, Schwalbach
<b>MJ Research</b>	MJ Research, Waltham/USA
<b>NEB</b>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M.
<b>Pierce™</b>	registrierte Waren- oder Dienstleistungsmarke von Thermo Scientific
<b>Qiagen</b>	Qiagen GmbH, Hilden
<b>Riedel</b>	Riedel de Haën GmbH, Seelze
<b>Roche</b>	Roche GmbH, Mannheim
<b>Roth</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<b>Sarstedt</b>	Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht
<b>Schleicher &amp; Schüll</b>	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
<b>Sigma</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
<b>Thermo Scientific</b>	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts USA



## 6.6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 a/b: Todesstatistiken 2012 des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden.....	1
Abb. 1.2: Mechanismus der Metastasierung.....	2
Abb. 1.3: GPAT-Reaktion .....	4
Abb. 1.4: Lokalisation und Funktion der GPATs in der Zelle.....	5
Abb. 1.5: Kennedy Pathway I - Einbau der Kopfgruppe in Glycerophospholipide .....	10
Abb. 1.6: Kennedy Pathway II – Einbau von DAG in Phosphatidyl-Cholin .....	12
Abb. 1.7: Der Cholinmetabolismus .....	13
Abb. 1.8: Synthese und Lokalisation der Phospholipide und verantwortliche Proteine zur Bildung der Signalmoleküle LPA, PA und DAG.....	15
Abb. 1.9: Produktion von PA aus Phospholipiden.....	16
Abb. 1.10: Intrazelluläre Signalfunktionen von DAG, PA und LPA.....	17
Abb. 2.1: Darstellung des pCMV6 entry Vector von ORIGENE-AMSBio #PS100001 .....	33
Abb. 2.2: Beispiel für die Auswertung der Fotografien von Migrationsversuchen.....	46
Abb. 3.1: Verminderung der EDI3-Konzentration in MCF7-Zellen durch siRNA .....	56
Abb. 3.2: Verlangsamung der Migration durch EDI3-Knockdown in MCF7-Zellen.....	58
Abb. 3.3: Verlangsamung der Migration durch EDI3-Knockdown in HeLa-Zellen.....	60
Abb. 3.4: Verminderung die GPAM-Expression in MCF7-Zellen.....	62
Abb. 3.5: GPAM-Knockdown in MCF7-Zellen hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität .....	64
Abb. 3.6: Expressionsniveau anderer GPATs unverändert bei GPAM-Knockdown .....	65
Abb. 3.7: Verringerung der Migration bei GPAM-Knockdown A-C in MCF7-Zellen .....	67
Abb. 3.8: Verringerung der Migration bei GPAM-Knockdown D-F in MCF7-Zellen.....	68
Abb. 3.9: Verringerung der Migration bei GPAM-Knockdown in HeLa-Zellen.....	69
Abb. 3.10: Überexpression von GPAM in HEK293-Zellen verstärkt die Zellmigration .....	70
Abb. 3.11: Änderung der LPA-Konzentrationen und GPAM-mRNA-Expression bei Knockdown und Überexpression in MCF7-Zellen.....	72
Abb. 3.12: LPA-Chromatogramme bei GPAM-Modulation.....	73
Abb. 3.13: G3P-Konzentration bei GPAM-Knockdown.....	74
Abb. 3.14: Transfektion mit siRNA, spezifisch für CHKA, vermindert die CHKA- Expression in MCF7-Zellen.....	76
Abb. 3.15: Einflüsse der verschiedenen CHKA siRNA-Oligos auf die Zellvitalität .....	77

Abb. 3.16: CHKA-Knockdown hat keinen Einfluss auf die Migration von MCF7-Zellen.....	79
Abb. 3.17: Quantitative NMR-Spektroskopie von Methanol-Extrakten aus MCF7-Zellen .....	80
Abb. 3.18: Überexpression von CHKA2 in HEK293-Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellmigration .....	81
Abb. 3.19: Vergleichende Migrationsanalysen in MCF7-Zellen .....	83
Abb. 3.20: Real-Time-PCR zeigt die Knockdown-Effizienz im Migrationsexperiment .....	84
Abb. 3.21: Vergleichende Migrationsanalysen in HeLa-Zellen .....	86
Abb. 3.22: Simultaner Knockdown von EDI3 und GPAM verstärkt den Effekt auf die Migration nicht .....	88
Abb. 3.23: Wachstumskurven für EDI3-, GPAM- und CHKA-Knockdown in MCF7-Zellen zeigen Einfluss auf die Proliferation.....	90
Abb. 3.24: Wachstumskurven für EDI3-, GPAM- und CHKA-Knockdown in HeLa-Zellen zeigen keinen Einfluss auf die Proliferation.....	91
Abb. 3.25: LC-MS/MS Messung der intrazellulären LPA-Konzentrationen in MCF7- Zellextrakten .....	93
Abb. 3.26: Änderung der mittleren LPA-Konzentrationen .....	94
Abb. 3.27: Veränderung der intrazellulären Metaboliten.....	95
Abb. 3.28: Veränderung der Metaboliten bei GPAM-Knockdown in MCF7-Zellen .....	96
Abb. 3.29: Veränderung der Cholinmetaboliten bei EDI3-Knockdown in MCF7-Zellen .....	97
Abb. 3.30: Veränderung der Cholinmetaboliten bei CHKA-Knockdown in MCF7-Zellen.....	98
Abb. 3.31: Übersicht Cholinmetabolismus.....	99
Abb. 4.1: Enzymatische Funktion von EDI3, eine Diesterase für GPC und GPEA.....	111
Abb. 4.2: Veränderung der Cholinmetaboliten bei EDI3- und CHKA-Knockdown .....	113
Abb. 4.3: Veränderungen der G3P-Konzentrationen .....	115
Abb. 4.4: Veränderungen in LPA könnten ursächlich für die Inhibierung der Migration bei EDI3- und GPAM-Knockdown sein .....	117
Abb. 4.5: Intrazelluläres LPA, anders gebildet als extrazelluläres LPA .....	118
Abb. 4.6: Reduktion von Triglyceriden und Phosphatidylcholin.....	122
Abb. A1.1: cDNA-Basenabfolge von CHKA1 .....	159
Abb. A1.2: cDNA-Basenabfolge von CHKA2 .....	160
Abb. A1.3: cDNA-Basenabfolge von GPAM-Transkript 1 .....	162
Abb. A1.4: cDNA-Basenabfolge von GPAM-Transkript 2 .....	164

Abb. A1.5: cDNA-Basenabfolge von EDI3 (GPCPD1) .....	166
Abb. A2.1: Massen-Chromatogramm des internen Standards in einer Standardreihe.....	167
Abb. A2.2: Massen-Chromatogramm von P-LPA in einer Standardreihe .....	168
Abb. A2.3: Massen-Chromatogramm von O-LPA in einer Standardreihe .....	169
Abb. A2.4: Massen-Chromatogramm von P-LPA .....	170
Abb. A2.5: Massen-Chromatogramm von O-LPA.....	171
Abb. A6.1: Zweidimensionales <sup>1</sup> H- <sup>31</sup> P-Spektrum eines MCF7-Zellextraktes: NEG.....	178
Abb. A6.2: Zweidimensionales <sup>1</sup> H- <sup>31</sup> P-Spektrum eines MCF7-Zellextraktes: EDI3-Kd.....	179
Abb. A6.3: Zweidimensionales <sup>1</sup> H- <sup>31</sup> P-Spektrum eines MCF7-Zellextraktes: GPAM-Kd.....	179
Abb. A6.4: Zweidimensionales <sup>1</sup> H- <sup>31</sup> P-Spektrum eines MCF7-Zellextraktes: CHKA-Kd.....	180

## 6.7 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: verwendete siRNA von Invitrogen aus der Serie „Stealth Select RNAi“ .....	31
Tab. 2.2: verwendete siRNA von Ambion aus der Serie „Silencer® Select siRNA“ .....	32
Tab. 2.3: Bedingung für die cDNA Synthese .....	39
Tab. 2.4: Liste der Antikörper mit Angaben zur Verwendung.....	43
Tab. 2.5: Lysophosphatidsäure-Standards.....	52
Tab. 2.6: Chromatographiebedingungen .....	52
Tab. 2.7: Einstellungen am Massenspektrometer für die einzelnen LPAs .....	53
Tab. A1.1: Basenabfolge und Bestellnummer der CHKA-siRNAs.....	160
Tab. A1.2: Basenabfolge und Bestellnummer der GPAM-siRNAs.....	164
Tab. A1.3: Basenabfolge und Bestellnummer der EDI3-siRNAs.....	166
Tab. A3: LPA-Konzentrationen aller biologischen Replikate, gemessen mit LC-MS/MS.....	172
Tab. A4: Metabolische Veränderungen bei Knockdown von GPAM, EDI3 und CHKA.....	174
Tab. A5.1: Mediumkomponenten im verwendeten DMEM-Medium.....	177
Tab. A5.2: Zusammensetzung der zum Medium zugesetzten Aminosäurelösung .....	177
Tab. A7: Chemische Struktur, Konstitutionsformel und chemische Verschiebungen der Metaboliten.....	181

## 6.8 Glossar

<b>Adherens Junctions</b>	Auch als Gürteldesmosomen oder Zonula adhaerens bezeichnet; Gruppe von Zellkontakten, bei denen die Aktin-Filamente zweier Zellen verbunden werden.
<b>Aszites</b>	Aszites, auch Bauchwassersucht genannt, ist eine pathologische (krankhafte) Flüssigkeitsansammlung in der freien Bauchhöhle. Bei gesunden Menschen ist nur eine sehr geringe Menge Flüssigkeit in der freien Bauchhöhle. Vor allem bei Krebserkrankungen im Unterleib sammelt sich oft Flüssigkeit in der freien Bauchhöhle an.
<b>Alignment</b>	Ausrichten; Bestimmung der Abweichung
<b>Amplifikation</b>	Vermehrung eines DNA-Abschnitts
<b>Angiogenese</b>	Komplexer Vorgang der Aussprossung bestehender Gefäße.
<b>Annealing</b>	Anlagerung von Oligonukleotidprimern an eine DNA-Matrize.
<b>Blotten</b>	Übertragung von Proteinen, DNA oder RNA aus einem Agarose- oder Acrylamidgel auf eine Membran und Immobilisierung für selektive Detektionen.
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> , DNA, die durch reverse Transkription von mRNA gewonnen wird.
<b>Citratzyklus</b>	Auch als Krebs-Zyklus bezeichnet; ein Kreislauf biochemischer Reaktionen, der eine wichtige Rolle spielt im Stoffwechsel (Metabolismus) zum Zweck der Energiegewinnung und der Bereitstellung von Zwischenprodukten für Biosynthesen.
<b>Collision energy</b>	Fachbegriff in der Massenspektrometrie: Kollisionsenergie; zur Fragmentierung der Ionen verwendete Spannung.

<b><i>Declustering potential</i></b>	Fachbegriff in der Massenspektrometrie: Auflösungspotenzial von Ionenclustern. Der DP-Parameter steuert die Spannung am Orifice (Düse), die das Auflösungsvermögen der Ionen zwischen dem Orifice und der QJet® -Ionenführung bestimmt.
<b>Denaturierung</b>	Veränderung der Konformation von Proteinen unter Funktionsverlust oder Aufschmelzen von Nukleinsäuren durch Erhitzen bzw. mit Chemikalien.
<b>Elution</b>	Ablösen von Molekülen, die an eine Matrix gebunden sind.
<b>Endometriumkarzinom</b>	Gebärmutterkörperkrebs, auch Uterus- oder Korpuskarzinom, eine Krebserkrankung der Gebärmutter Schleimhaut.
<b>Enzyme</b>	Proteine, die die chemischen Reaktionen im Metabolismus beschleunigen (katalysieren) können.
<b>Exon</b>	Abschnitt eines Gens, der transkribiert wird und sowohl im Primärtranskript als auch in der reifen mRNA vorhanden ist.
<b>Exprimieren</b>	Synthese eines Genprodukts
<b>Gen</b>	Definierte Sequenz aus Nukleotiden, die eine RNA kodiert.
<b>genomische DNA</b>	chromosomale DNA, Begriff in Kontrast zu cDNA verwendet.
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i> ist eine zweidimensionale NMR-Technik, die Korrelationen zwischen Atomen über 2-4 Bindungen hinweg detektiert und hier zur eindeutigen Identifizierung von Metaboliten verwendet wurde.
<b>HR<sup>+</sup> / HR<sup>-</sup></b>	Östrogen und Progesteron können das Wachstum von Brustkrebszellen beeinflussen. Ob ein Tumor hormonabhängig wächst, hängt von dem Anteil der exprimierenden Zellen und der Menge der entsprechenden Hormonrezeptoren (HR) ab. Hormonempfindliche Tumore werden als HR <sup>+</sup> bezeichnet, Hormon-unabhängig wachsende Tumore als HR <sup>-</sup> .

<b>HRMAS</b>	<i>high resolution magic-angle spinning</i> ist eine Technik für die NMR-Analyse von Feststoffen, bei der die zu untersuchende Probe in einen Winkel von $54,74^\circ$ in Rotation versetzt wird; das bewirkt eine Verringerung der Linienbreite im Spektrum.
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i> ist eine zweidimensionale NMR-Technik, die vor allem für Proteine und andere organische Moleküle Anwendung findet.
<b>Intron</b>	Teil eines Gens, der transkribiert, aber nicht translatiert wird.
<b>Karzinom</b>	Ein Karzinom ist ein aus epithelialen Zellen entstandener Tumor.
<b>Kernspinresonanz</b>	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , ein kernphysikalischer Effekt.
<b>Kinase</b>	Enzym, das die Übertragung einer Phosphorylgruppe von einem Nucleosidtriphosphat auf die OH-Gruppe eines Serin-, Thymin- oder Threonin-Restes des Proteins katalysiert.
<b>Klon</b>	Ansammlung genetisch identischer Zellen, die von einem Vorgänger abstammen.
<b>Klonieren</b>	Herstellen exakter Kopien eines DNA-Abschnittes
<b>Knockdown</b>	Ein Knockdown ist die gezielte Reduktion der Genexpression eines Zielgens mittels siRNA.
<b>kompetente Bakterien</b>	Zellen, die besonders gut DNA bei Transformationen aufnehmen.
<b>Krebs</b>	Neubildung in Form eines spontanen, autonomen und irreversiblen Überschusswachstums von körpereigenem Gewebe.
<b>LC-MS/MS</b>	Tandemmassenspektrometrie, auch Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie genannt, ist ein modernes Analyseverfahren zur schnellen Quantifizierung von Molekülen. Sie ist an ein chromatographisches Trennsystem gekoppelt ( <i>liquid chromatography</i> , LC).

<b>Lyse</b>	Zerstörung der Zellmembran; führt zum Austreten des Zytoplasmas und zum Tod der Zelle.
<b><i>Magnetic resonance spectroscopic imaging (MRSI)</i></b>	MRSI kombiniert Magnetresonanz-Spektroskopie mit bildgebenden Methoden zur nicht-invasiven Bestimmung von Metaboliten im Tumor des Patienten innerhalb definierter Areale.
<b>Massenspektrometrie</b>	Spektrale Methode zur Quantifizierung von Molekülen bestimmter Masse bzw. eines bestimmten Masse/Ladungsverhältnisses.
<b>Metabolismus</b>	Stoffwechsel; bezeichnet die Gesamtheit von Aufnahme, Transport, chemischer Umwandlung und Ausscheidung von Substanzen einer Zelle oder eines ganzen Organismus. Alle beteiligten Substanzen werden als Metaboliten bezeichnet.
<b>Metabolit</b>	In molekularbiologischem Sinne ein Intermediat, ein Zwischenprodukt, in einem biochemischen Stoffwechselweg.
<b>neoadjuvant / adjuvant</b>	Die neoadjuvante Therapie in der Onkologie bezeichnet eine Chemo- oder auch Strahlentherapie, die zur Reduktion der Tumormasse vor einem geplanten operativen Eingriff durchgeführt wird. Eine Chemo-/Strahlentherapie, die nach einem operativen Eingriff zur Entfernung des Tumors durchgeführt wird, bezeichnet man als adjuvante Therapie.
<b>NMR</b>	In dieser Arbeit immer <i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i> , die Kernspinresonanzspektroskopie, unter quantitativen Bedingungen am ISAS durch Dr. Lambert durchgeführt.
<b>NMR-Spektroskopie</b>	Kernspinresonanzspektroskopie, ein Verfahren zur Identifikation und Quantifizierung organischer Moleküle in Substanzgemischen mittels Kernspinresonanz.

<b>Nukleosidtriphosphate</b>	Bausteine der Nukleinsäuren DNA und RNA sowie energiereiche Verbindungen im Energiehaushalte der Zelle (ATP, CTP; GTP und UTP). Jedes Nukleotid enthält einen Ring aus Kohlenstoff und Stickstoff-Atomen (die Purin-Basen Adenin und Guanin bzw. die Pyrimidin-Basen Thymin und Cytosin oder Uracil), einen Zucker mit 5 Kohlenstoffatomen in Ringform (Pentose, in der RNA Ribose und der DNA Desoxyribose) und drei Phosphatgruppen.
<i>off target</i>	In der Mikrobiologie die unerwünschte, unbeabsichtigte Nebenwirkung einer Behandlung (hier siRNA-Behandlung). Demgegenüber steht der <i>on target</i> -Effekt der gezielten Beeinflussung eines Zellsystems, der möglichst groß sein sollte, hier der Knockdown der Ziel-mRNA.
<b>Onkogenese</b>	Krebsentwicklung, Tumorgenese
<b>Plasmid</b>	spezieller Vektor
<b>Polymerase</b>	Enzym, das die Anknüpfung eine Nukleotidrestes an ein Polynukleotid katalysiert. Dies erfolgt durch nukleophilen Angriff der 3'-OH-Gruppe des Polynukleotids auf das $\alpha$ -Phosphat des Nukleosidtriphosphates. Die Polymerase benötigt eine Matrize, mit der die zu verknüpfenden Nukleotide Basenpaarungen eingehen können.
<b>Produkt</b>	Ein Produkt ist die bei einer biochemischen Reaktion entstehende Substanz. Es können ein oder mehrere Produkte entstehen.
<b>Promotor</b>	DNA-Sequenz, an die der Transkriptions-Initiations-Komplex bindet.
<b>Protease</b>	Enzym, das den Abbau von Peptiden und Proteinen katalysiert.
<b>Qualifier</b>	Fachbegriff in der NMR: Ion, dessen Masse/Ladungs-Verhältnis der Identifikation des Analyten dient.



<b>Quantifier</b>	Fachbegriff in der Massenspektrometrie: Ion, dessen Masse/Ladungs-Verhältnis der Quantifizierung des Analyten dient.
<b>Real-Time-PCR</b>	die <i>Real-Time-quantitative-PCR</i> ist eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA-Molekülen; hier verwendet zur relativen Quantifizierung bestimmter mRNAs nach deren Transkription in cDNA.
<b>Restriktionsenzym</b>	Enzym, das die doppelsträngige DNA an bestimmten Erkennungssequenzen schneidet.
<b>scratch assay</b>	Ein <i>scratch assay</i> ist ein Migrationsexperiment <i>in vitro</i> , bei dem eine Lücke in eine zuvor angelegte konfluente Kultur eukaryotischer Zellen eingebracht und die Migration der Zellen in diese Lücke hinein beobachtet wird.
<b>Selektion</b>	Identifizierung von Bakterienkolonien, die ein Insert enthalten oder gezielte Kultivierung derjenigen eukaryotischen Zellen, die mit einem Resistenz verleihenden Vektor transfiziert wurden.
<b>Sequenz</b>	Abfolge von Nukleotiden eines DNA- oder RNA-Moleküls
<b>Sequenz-Alignment</b>	Sequenz-Alignment: aneinander Ausrichten von Sequenzen, so dass größtmögliche Übereinstimmung erzielt wird.
<b>siRNA</b>	( <i>small interfering RNA</i> )Zzur Verminderung der mRNA-Expression werden kurze RNAs transduziert, die mit der Ziel-mRNA interferieren.
<b>Substrat</b>	In der Biochemie der Ausgangsstoff für die Biosynthese eines Metaboliten.
<b>TOCSY</b>	<i>Total correlation spectroscopy</i> ist eine zweidimensionale NMR-Technik, bei der Kopplungen zwischen Protonen beobachtet werden. Für diese Arbeit wurden die Mediumkomponenten Cholin und Laktat mit TOCSY-NMR vermessen.

<b>Transfektion</b>	Einführen fremder DNA-Moleküle in eine eukaryotische Zelle.
<b>Transformation</b>	Veränderung der genetischen Information einer Zelle durch Einschleusen fremder DNA.
<b>Transkription</b>	Umschreiben der genetischen Information von DNA in RNA durch RNA-Polymerase.
<b>Transkriptionsfaktor</b>	Ein Transkriptionsfaktor erkennt und bindet spezifische, kurze DNA-Sequenzen im Promotor-Bereich eines Gens und führt zur Aktivierung oder Repression der Transkription.
<b>Translation</b>	Übersetzen der genetischen Information der mRNA in die entsprechende Aminosäuresequenz des Peptids/Proteins.
<b>t-Test</b>	Zweistichproben-Students-t-Test; prüft anhand der Mittelwerte zweier unabhängiger oder abhängiger Stichproben, wie sich die Mittelwerte zueinander verhalten. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Daten der Stichproben normalverteilt sind.
<b>Tumor</b>	Gewebewucherung
<b>Tumorgenese</b>	Entwicklung von Krebs (Karzinomen, Sarkomen und Leukämie).
<b>Tumorsuppressorgen</b>	Gen, das ein Protein kodiert, dessen Abwesenheit oder Funktionsverlust zu Krebs führen kann.
<b>Überexpression</b>	Als Überexpression bezeichnet man die experimentell verstärkte Expression eines Gens, das entweder in dem Organismus selbst vorkommt oder aus einem anderen Organismus stammt.
<b>Unit</b>	Menge eines Restriktionsenzym, die in der Lage ist, 1 µg Substrat innerhalb von 60 min komplett zu schneiden.
<b>Vektor</b>	Zirkuläres DNA-Molekül (Plasmid, Virus etc.), das einen Abschnitt fremder DNA in sich aufnehmen und in eine andere Zelle transferieren kann.

<b>Well</b>	Vertiefung (Kavität) in einer Kulturschale für eukaryotische Zellen, die mehrere solcher Vertiefungen zur gleichzeitigen Kultivierung und Behandlung enthält.
<b>Wissenschaft</b>	„Austausch unserer Ungewissheit gegen Ungewissheit von neuer Art.“ (George Byron)
<b>Xenograft</b>	Bei einer Xenotransplantation (griechisch ξένος, xénos: Fremder) handelt es sich um die Übertragung von lebens- und funktionstüchtigen Zellen oder Zellverbänden zwischen verschiedenen Spezies.
<b>Zytoskelett</b>	System von Proteinfilamenten, das die Zellmorphologie erhält und als Transportweg dient.

## 6.9 Literaturverzeichnis

- Aboagye, E. O. & Bhujwala, Z. M. 1999. Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 59, 80-4.
- Adamczyk, M., Brashear, R. J. & Mattingly, P. G. 2006. Choline concentration in normal blood donor and cardiac troponin-positive plasma samples. *Clin Chem*, 52, 2123-4.
- Andresen, B. T., Rizzo, M. A., Shome, K. & Romero, G. 2002. The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett*, 531, 65-8.
- Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R. & Arai, H. 2002. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem*, 277, 48737-44.
- Aoyama, C., Ohtani, A. & Ishidate, K. 2002. Expression and characterization of the active molecular forms of choline/ethanolamine kinase-alpha and -beta in mouse tissues, including carbon tetrachloride-induced liver. *Biochem J*, 363, 777-84.
- Beigneux, A. P., Vergnes, L., Qiao, X., Quatela, S., Davis, R., Watkins, S. M., Coleman, R. A., Walzem, R. L., Philips, M., Reue, K. & Young, S. G. 2006. Agpat6--a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium. *J Lipid Res*, 47, 734-44.
- Belfiore, A., Genua, M. & Malaguarnera, R. 2009. PPAR-gamma agonists and their effects on IGF-I receptor signaling: Implications for cancer. *PPAR Res*, 2009, 830501.
- Berger, J. & Moller, D. E. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53, 409-35.
- Bertilsson, H., Tessem, M. B., Flatberg, A., Viset, T., Gribbestad, I., Angelsen, A. & Halgunset, J. 2012. Changes in gene transcription underlying the aberrant citrate and choline metabolism in human prostate cancer samples. *Clin Cancer Res*, 18, 3261-9.
- Brindley, D. N. 2004. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem*, 92, 900-12.
- Brockmüller, S. F., Bucher, E., Müller, B. M., Budczies, J., Hilvo, M., Griffin, J. L., Oresic, M., Kallioniemi, O., Iljin, K., Loibl, S., Darb-Esfahani, S., Sinn, B. V., Klauschen, F., Prinzler, J., Bangemann, N., Ismaeel, F., Fiehn, O., Dietel, M. & Denkert, C. 2012. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer-link to patient survival, hormone receptor status, and metabolic profiling. *J Proteome Res*, 11, 850-60.
- Cao, G., Konrad, R. J., Li, S. D. & Hammond, C. 2012a. Glycerolipid acyltransferases in triglyceride metabolism and energy homeostasis-potential as drug targets. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 12, 197-206.

- Cao, J., Li, J. L., Li, D., Tobin, J. F. & Gimeno, R. E. 2006. Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19695-700.
- Cao, M. D., Dopkens, M., Krishnamachary, B., Vesuna, F., Gadiya, M. M., Lonning, P. E., Bhujwala, Z. M., Gribbestad, I. S. & Glunde, K. 2012d. Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5 (GDPD5) expression correlates with malignant choline phospholipid metabolite profiles in human breast cancer. *NMR Biomed*, 25, 1033-42.
- Cao, M. D., Giskeodegard, G. F., Bathen, T. F., Sitter, B., Bofin, A., Lonning, P. E., Lundgren, S. & Gribbestad, I. S. 2012f. Prognostic value of metabolic response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*, 12, 39.
- Cao, M. D., Sitter, B., Bathen, T. F., Bofin, A., Lonning, P. E., Lundgren, S. & Gribbestad, I. S. 2012g. Predicting long-term survival and treatment response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy by MR metabolic profiling. *NMR Biomed*, 25, 369-78.
- Cazzolli, R., Shemon, A. N., Fang, M. Q. & Hughes, W. E. 2006. Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life*, 58, 457-61.
- Chua, B. T., Gallego-Ortega, D., Ramirez de Molina, A., Ullrich, A., Lacal, J. C. & Downward, J. 2009. Regulation of Akt(ser473) phosphorylation by choline kinase in breast carcinoma cells. *Mol Cancer*, 8, 131.
- Clem, B. F., Clem, A. L., Yalcin, A., Goswami, U., Arumugam, S., Telang, S., Trent, J. O. & Chesney, J. 2011. A novel small molecule antagonist of choline kinase-alpha that simultaneously suppresses MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene*, 30, 3370-80.
- Coleman, R. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research*, 43, 134-176.
- Coleman, R. A. & Lee, D. P. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*, 43, 134-76.
- Collison, L. W. & Jolly, C. A. 2006. Phosphorylation regulates mitochondrial glycerol-3-phosphate-1 acyltransferase activity in T-lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1761, 129-39.
- Collison, L. W., Murphy, E. J. & Jolly, C. A. 2008. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 regulates murine T-lymphocyte proliferation and cytokine production. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295, C1543-9.
- Corda, D., Mosca, M. G., Ohshima, N., Grauso, L., Yanaka, N. & Mariggio, S. 2013. The emerging physiological roles of the glycerophosphodiesterase family. *Febs j*.
- Dircks, L. K., Ke, J. & Sul, H. S. 1999. A conserved seven amino acid stretch important for murine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. Significance of arginine 318 in catalysis. *J Biol Chem*, 274, 34728-34.
- Eliyahu, G., Kreizman, T. & Degani, H. 2007. Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: molecular and biochemical studies. *Int J Cancer*, 120, 1721-30.

- Ellis, J. M., Paul, D. S., Depetrillo, M. A., Singh, B. P., Malarkey, D. E. & Coleman, R. A. 2012. Mice deficient in glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 have a reduced susceptibility to liver cancer. *Toxicol Pathol*, 40, 513-21.
- Ericsson, J., Jackson, S. M., Kim, J. B., Spiegelman, B. M. & Edwards, P. A. 1997. Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem*, 272, 7298-305.
- Esseridou, A., Di Leo, G., Sconfienza, L. M., Caldiera, V., Raspagliesi, F., Grijuela, B., Hanozet, F., Podo, F. & Sardanelli, F. 2011. In vivo detection of choline in ovarian tumors using 3D magnetic resonance spectroscopy. *Invest Radiol*, 46, 377-82.
- Falcon, S. C., Hudson, C. S., Huang, Y., Mortimore, M., Golec, J. M., Charlton, P. A., Weber, P. & Sundaram, H. 2013. A non-catalytic role of choline kinase alpha is important in promoting cancer cell survival. *Oncogenesis*, 2, e38.
- Fernandez-Murray, J. P., Ngo, M. H. & McMaster, C. R. 2013. Choline transport activity regulates phosphatidylcholine synthesis through choline transporter Hnm1 stability. *J Biol Chem*, 288, 36106-15.
- Foster, D. A. 2009. Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1791, 949-55.
- Gadiya, M., Mori, N., Cao, M. D., Mironchik, Y., Kakkad, S., Gribbestad, I. S., Glunde, K., Krishnamachary, B. & Bhujwalla, Z. M. 2014. Phospholipase D1 and choline kinase-alpha are interactive targets in breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 15, 593-601.
- Gallego-Ortega, D., Gomez del Pulgar, T., Valdes-Mora, F., Cebrian, A. & Lacal, J. C. 2011. Involvement of human choline kinase alpha and beta in carcinogenesis: a different role in lipid metabolism and biological functions. *Adv Enzyme Regul*, 51, 183-94.
- Gallego-Ortega, D., Ramirez de Molina, A., Ramos, M. A., Valdes-Mora, F., Barderas, M. G., Sarmentero-Estrada, J. & Lacal, J. C. 2009. Differential role of human choline kinase alpha and beta enzymes in lipid metabolism: implications in cancer onset and treatment. *PLoS One*, 4, e7819.
- Geiger, T. R. & Peeper, D. S. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1796, 293-308.
- Gibellini, F., Hunter, W. N. & Smith, T. K. 2008. Biochemical characterization of the initial steps of the Kennedy pathway in *Trypanosoma brucei*: the ethanolamine and choline kinases. *Biochem J*, 415, 135-44.
- Gibellini, F. & Smith, T. K. 2010. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*, 62, 414-28.
- Jimeno, R. E. & Cao, J. 2008. Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. *J Lipid Res*, 49, 2079-88.
- Glunde, K. & Bhujwalla, Z. M. 2007. Choline kinase alpha in cancer prognosis and treatment. *Lancet Oncol*, 8, 855-7.
- Glunde, K. & Bhujwalla, Z. M. 2011a. Metabolic tumor imaging using magnetic resonance spectroscopy. *Semin Oncol*, 38, 26-41.

- Glunde, K., Bhujwala, Z. M. & Ronen, S. M. 2011b. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer*, 11, 835-48.
- Glunde, K., Jacobs, M. A. & Bhujwala, Z. M. 2006. Choline metabolism in cancer: implications for diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn*, 6, 821-9.
- Glunde, K., Jiang, L., Moestue, S. A. & Gribbestad, I. S. 2011e. MRS and MRSI guidance in molecular medicine: targeting and monitoring of choline and glucose metabolism in cancer. *NMR Biomed*, 24, 673-90.
- Glunde, K., Jie, C. & Bhujwala, Z. M. 2004. Molecular causes of the aberrant choline phospholipid metabolism in breast cancer. *Cancer Res*, 64, 4270-6.
- Glunde, K., Raman, V., Mori, N. & Bhujwala, Z. M. 2005. RNA interference-mediated choline kinase suppression in breast cancer cells induces differentiation and reduces proliferation. *Cancer Res*, 65, 11034-43.
- Gonzalez-Baro, M. R., Lewin, T. M. & Coleman, R. A. 2007. Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G1195-9.
- Gossell-Williams, M., Fletcher, H., McFarlane-Anderson, N., Jacob, A., Patel, J. & Zeisel, S. 2005. Dietary intake of choline and plasma choline concentrations in pregnant women in Jamaica. *West Indian Med J*, 54, 355-9.
- Granata, A., Nicoletti, R., Perego, P., Iorio, E., Krishnamachary, B., Benigni, F., Ricci, A., Podo, F., Bhujwala, Z. M., Canevari, S., Bagnoli, M. & Mezzanzanica, D. 2015. Global metabolic profile identifies choline kinase alpha as a key regulator of glutathione-dependent antioxidant cell defense in ovarian carcinoma. *Oncotarget*.
- Granata, A., Nicoletti, R., Tinaglia, V., De Cecco, L., Pisanu, M. E., Ricci, A., Podo, F., Canevari, S., Iorio, E., Bagnoli, M. & Mezzanzanica, D. 2014. Choline kinase-alpha by regulating cell aggressiveness and drug sensitivity is a potential druggable target for ovarian cancer. *Br J Cancer*, 110, 330-40.
- Grinde, M. T., Skrbo, N., Moestue, S. A., Rodland, E. A., Borgan, E., Kristian, A., Sitter, B., Bathen, T. F., Borresen-Dale, A. L., Maelandsmo, G. M., Engebraaten, O., Sorlie, T., Marangoni, E. & Gribbestad, I. S. 2014. Interplay of choline metabolites and genes in patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res*, 16, R5.
- Gulvady, A. A., Murphy, E. J., Ciolino, H. P., Cabrera, R. M. & Jolly, C. A. 2013. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 gene ablation results in altered thymocyte lipid content and reduces thymic T cell production in mice. *Lipids*, 48, 3-12.
- Gustin, C., Van Steenbrugge, M. & Raes, M. 2008. LPA modulates monocyte migration directly and via LPA-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295, C905-14.
- Ham, S. A., Yoo, T., Hwang, J. S., Kang, E. S., Lee, W. J., Paek, K. S., Park, C., Kim, J. H., Do, J. T., Lim, D. S. & Seo, H. G. 2014. Ligand-activated PPARdelta modulates the migration and invasion of melanoma cells by regulating Snail expression. *Am J Cancer Res*, 4, 674-82.

- Hammond, L. E., Gallagher, P. A., Wang, S., Hiller, S., Kluckman, K. D., Posey-Marcos, E. L., Maeda, N. & Coleman, R. A. 2002. Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition. *Mol Cell Biol*, 22, 8204-14.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Hancock, J. F. 2007. PA promoted to manager. *Nat Cell Biol*, 9, 615-7.
- Hao, F., Tan, M., Xu, X., Han, J., Miller, D. D., Tigyi, G. & Cui, M. Z. 2007. Lysophosphatidic acid induces prostate cancer PC3 cell migration via activation of LPA(1), p42 and p38alpha. *Biochim Biophys Acta*, 1771, 883-92.
- Hatton, J. L. & Yee, L. D. 2008. Clinical Use of PPARgamma Ligands in Cancer. *PPAR Res*, 2008, 159415.
- Heath, R. J. & Rock, C. O. 1998. A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol*, 180, 1425-30.
- Hernando, E., Sarmentero-Estrada, J., Koppie, T., Belda-Iniesta, C., Ramirez de Molina, V., Cejas, P., Ozu, C., Le, C., Sanchez, J. J., Gonzalez-Baron, M., Koutcher, J., Cordon-Cardo, C., Bochner, B. H., Lacal, J. C. & Ramirez de Molina, A. 2009. A critical role for choline kinase-alpha in the aggressiveness of bladder carcinomas. *Oncogene*, 28, 2425-35.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11, 1026-30.
- Holliday, D. L. & Speirs, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 13, 215.
- Hong, B. S., Allali-Hassani, A., Tempel, W., Finerty, P. J., Jr., Mackenzie, F., Dimov, S., Vedadi, M. & Park, H. W. 2010. Crystal structures of human choline kinase isoforms in complex with hemicholinium-3: single amino acid near the active site influences inhibitor sensitivity. *J Biol Chem*, 285, 16330-40.
- Horchani, H., de Saint-Jean, M., Barelli, H. & Antonny, B. 2014. Interaction of the spo20 membrane-sensor motif with phosphatidic Acid and other anionic lipids, and influence of the membrane environment. *PLoS One*, 9, e113484.
- Iorio, E., Ricci, A., Bagnoli, M., Pisanu, M. E., Castellano, G., Di Vito, M., Venturini, E., Glunde, K., Bhujwala, Z. M., Mezzanzanica, D., Canevari, S. & Podo, F. 2010. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 70, 2126-35.
- Iorio, E., Ricci, A., Pisanu, M. E., Bagnoli, M., Podo, F. & Canevari, S. 2013. Choline metabolic profiling by magnetic resonance spectroscopy. *Methods Mol Biol*, 1049, 255-70.
- Janardhan, S., Srivani, P. & Sastry, G. N. 2006. Choline kinase: an important target for cancer. *Curr Med Chem*, 13, 1169-86.
- Jeong, E., Koo, J. E., Yeon, S. H., Kwak, M. K., Hwang, D. H. & Lee, J. Y. 2014. PPARdelta deficiency disrupts hypoxia-mediated tumorigenic potential of colon cancer cells. *Mol Carcinog*, 53, 926-37.



- Joshi, H., Pal, T. & Ramaa, C. S. 2014. A new dawn for the use of thiazolidinediones in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 23, 501-10.
- Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A. G., Wahli, W., Meier, C. A. & Desvergne, B. 1997. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*, 272, 25252-9.
- Kooijman, E. E., Chupin, V., de Kruijff, B. & Burger, K. N. 2003. Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic*, 4, 162-74.
- Lacal, J. C. 2001. Choline kinase: a novel target for antitumor drugs. *IDrugs*, 4, 419-26.
- Leblanc, R. & Peyruchaud, O. 2014. New insights into the autotaxin/LPA axis in cancer development and metastasis. *Exp Cell Res*.
- Lee, Z., Cheng, C. T., Zhang, H., Subler, M. A., Wu, J., Mukherjee, A., Windle, J. J., Chen, C. K. & Fang, X. 2008. Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell*, 19, 5435-45.
- Lesjak, M. S. 2014. *Funktionale Charakterisierung der Glycerophosphodiesterase EDI3 sowie Untersuchung ihrer Metastasen-fördernden Eigenschaften in humanen Tumorzelllinien*. Dr. rer. nat. Dissertation.
- Lesjak, M. S. & Marchan, R., Stewart, J. D., Rempel, E., Rahnenfuhrer, J. & Hengstler, J. G. 2014. EDI3 links choline metabolism to integrin expression, cell adhesion and spreading. *Cell Adh Migr*, 8.
- Li, Z., Wu, G., van der Veen, J. N., Hermansson, M. & Vance, D. E. 2014. Phosphatidylcholine metabolism and choline kinase in human osteoblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1841, 859-67.
- Lin, L. C., Hsu, S. L., Wu, C. L. & Hsueh, C. M. 2014. TGFbeta can stimulate the p(38)/beta-catenin/PPARgamma signaling pathway to promote the EMT, invasion and migration of non-small cell lung cancer (H460 cells). *Clin Exp Metastasis*, 31, 881-95.
- Liu, S., Murph, M., Panupinthu, N. & Mills, G. B. 2009. ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer. *Cell Cycle*, 8, 3695-701.
- Liu, W., Li, J., Liu, M., Zhang, H. & Wang, N. 2015. PPAR-gamma Promotes Endothelial Cell Migration By Inducing the Expression of Sema3g. *J Cell Biochem*, 116, 514-23.
- Llona-Minguez, S., Ghassemian, A. & Helleday, T. 2015. Lysophosphatidic acid receptor (LPA) modulators: The current pharmacological toolbox. *Prog Lipid Res*, 58, 51-75.
- Macara, I. G. 1989. Elevated phosphocholine concentration in ras-transformed NIH 3T3 cells arises from increased choline kinase activity, not from phosphatidylcholine breakdown. *Mol Cell Biol*, 9, 325-8.
- Mackinnon, W. B., Barry, P. A., Malycha, P. L., Gillett, D. J., Russell, P., Lean, C. L., Doran, S. T., Barraclough, B. H., Bilous, M. & Mountford, C. E. 1997. Fine-needle biopsy specimens of benign breast lesions distinguished from invasive cancer ex vivo with proton MR spectroscopy. *Radiology*, 204, 661-6.

- Macrae, K., Stretton, C., Lipina, C., Blachnio-Zabielska, A., Baranowski, M., Gorski, J., Marley, A. & Hundal, H. S. 2013. Defining the role of DAG, mitochondrial function, and lipid deposition in palmitate-induced proinflammatory signaling and its counter-modulation by palmitoleate. *J Lipid Res*, 54, 2366-78.
- Malito, E., Sekulic, N., Too, W. C., Konrad, M. & Lavie, A. 2006. Elucidation of human choline kinase crystal structures in complex with the products ADP or phosphocholine. *J Mol Biol*, 364, 136-51.
- Martinez-Outschoorn, U., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. 2014. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol*, 41, 195-216.
- McIntyre, T. M., Pontsler, A. V., Silva, A. R., St Hilaire, A., Xu, Y., Hinshaw, J. C., Zimmerman, G. A., Hama, K., Aoki, J., Arai, H. & Prestwich, G. D. 2003. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 131-6.
- Michalik, L. & Wahli, W. 2006. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest*, 116, 598-606.
- Michel, V., Yuan, Z., Ramsbir, S. & Bakovic, M. 2006. Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231, 490-504.
- Mills, G. B. & Moolenaar, W. H. 2003. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, 582-91.
- Miyake, T. & Parsons, S. J. 2012. Functional interactions between Choline kinase alpha, epidermal growth factor receptor and c-Src in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*, 31, 1431-41.
- Moestue, S. A., Borgan, E., Huuse, E. M., Lindholm, E. M., Sitter, B., Borresen-Dale, A. L., Engebraaten, O., Maelandsmo, G. M. & Gribbestad, I. S. 2010. Distinct choline metabolic profiles are associated with differences in gene expression for basal-like and luminal-like breast cancer xenograft models. *BMC Cancer*, 10, 433.
- Moestue, S. A., Giskeodegard, G. F., Cao, M. D., Bathen, T. F. & Gribbestad, I. S. 2012. Glycerophosphocholine (GPC) is a poorly understood biomarker in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E2506; author reply E2507.
- Mori, N., Gadiya, M., Wildes, F., Krishnamachary, B., Glunde, K. & Bhujwala, Z. M. 2013. Characterization of choline kinase in human endothelial cells. *NMR Biomed*, 26, 1501-7.
- Muoio, D. M., Seefeld, K., Witters, L. A. & Coleman, R. A. 1999. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J*, 338 ( Pt 3), 783-91.
- Nagle, C. A., Vergnes, L., Dejong, H., Wang, S., Lewin, T. M., Reue, K. & Coleman, R. A. 2008. Identification of a novel sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform, GPAT4, as the enzyme deficient in *Agpat6*<sup>-/-</sup> mice. *J Lipid Res*, 49, 823-31.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castano, M. J. & Solera, J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*, 439c, 231-250.

- Ohshima, N., Kudo, T., Yamashita, Y., Mariggio, S., Araki, M., Honda, A., Nagano, T., Isaji, C., Kato, N., Corda, D., Izumi, T. & Yanaka, N. 2015. New members of the mammalian glycerophosphodiester phosphodiesterase family: GDE4 and GDE7 produce lysophosphatidic acid by lysophospholipase D activity. *J Biol Chem*, 290, 4260-71.
- Okazaki, Y., Ohshima, N., Yoshizawa, I., Kamei, Y., Mariggio, S., Okamoto, K., Maeda, M., Nogusa, Y., Fujioka, Y., Izumi, T., Ogawa, Y., Shiro, Y., Wada, M., Kato, N., Corda, D. & Yanaka, N. 2010. A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase, GDE5, controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. *J Biol Chem*, 285, 27652-63.
- Pang, X., Wei, Y., Zhang, Y., Zhang, M., Lu, Y. & Shen, P. 2013. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits hepatocellular carcinoma cell invasion by upregulating plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Sci*, 104, 672-80.
- Panupinthu, N., Lee, H. Y. & Mills, G. B. 2010. Lysophosphatidic acid production and action: critical new players in breast cancer initiation and progression. *Br J Cancer*, 102, 941-6.
- Patton-Vogt, J. L. & Henry, S. A. 1998. GIT1, a gene encoding a novel transporter for glycerophosphoinositol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 149, 1707-15.
- Pellon-Maison, M., Montanaro, M. A., Lacunza, E., Garcia-Fabiani, M. B., Soler-Gerino, M. C., Cattaneo, E. R., Quiroga, I. Y., Abba, M. C., Coleman, R. A. & Gonzalez-Baro, M. R. 2014. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 behaves as a cancer testis gene and promotes growth and tumorigenicity of the breast cancer MDA-MB-231 cell line. *PLoS One*, 9, e100896.
- Picard, F. & Auwerx, J. 2002. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr*, 22, 167-97.
- Ramirez de Molina, A., Banez-Coronel, M., Gutierrez, R., Rodriguez-Gonzalez, A., Olmeda, D., Megias, D. & Lacal, J. C. 2004. Choline kinase activation is a critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression. *Cancer Res*, 64, 6732-9.
- Ramirez de Molina, A., de la Cueva, A., Machado-Pinilla, R., Rodriguez-Fanjul, V., Gomez del Pulgar, T., Cebrian, A., Perona, R. & Lacal, J. C. 2012. Acid ceramidase as a chemotherapeutic target to overcome resistance to the antitumoral effect of choline kinase alpha inhibition. *Curr Cancer Drug Targets*, 12, 617-24.
- Ramirez de Molina, A., Gallego-Ortega, D., Sarmentero-Estrada, J., Lagares, D., Gomez Del Pulgar, T., Bandres, E., Garcia-Foncillas, J. & Lacal, J. C. 2008. Choline kinase as a link connecting phospholipid metabolism and cell cycle regulation: implications in cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 1753-63.
- Ramirez de Molina, A., Gallego-Ortega, D., Sarmentero, J., Banez-Coronel, M., Martin-Cantalejo, Y. & Lacal, J. C. 2005. Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. *Cancer Res*, 65, 5647-53.

- Ramirez de Molina, A., Penalva, V., Lucas, L. & Lacal, J. C. 2002a. Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene*, 21, 937-46.
- Ramirez de Molina, A., Rodriguez-Gonzalez, A., Gutierrez, R., Martinez-Pineiro, L., Sanchez, J., Bonilla, F., Rosell, R. & Lacal, J. 2002b. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 580-3.
- Ramirez de Molina, A., Sarmentero-Estrada, J., Belda-Iniesta, C., Taron, M., Ramirez de Molina, V., Cejas, P., Skrzypski, M., Gallego-Ortega, D., de Castro, J., Casado, E., Garcia-Cabezas, M. A., Sanchez, J. J., Nistal, M., Rosell, R., Gonzalez-Baron, M. & Lacal, J. C. 2007. Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol*, 8, 889-97.
- Samadi, N., Bekele, R., Capatos, D., Venkatraman, G., Sariahmetoglu, M. & Brindley, D. N. 2011. Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemo-resistance. *Biochimie*, 93, 61-70.
- Shah, T., Wildes, F., Penet, M. F., Winnard, P. T., Jr., Glunde, K., Artemov, D., Ackerstaff, E., Gimi, B., Kakkad, S., Raman, V. & Bhujwalla, Z. M. 2010. Choline kinase overexpression increases invasiveness and drug resistance of human breast cancer cells. *NMR Biomed*, 23, 633-42.
- Shaw, R. J. 2006. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 598-608.
- Shen, B., Chu, E. S., Zhao, G., Man, K., Wu, C. W., Cheng, J. T., Li, G., Nie, Y., Lo, C. M., Teoh, N., Farrell, G. C., Sung, J. J. & Yu, J. 2012. PPARgamma inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. *Br J Cancer*, 106, 1486-94.
- Shindou, H. & Shimizu, T. 2009. Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J Biol Chem*, 284, 1-5.
- Sidhu, N., Davies, S., Nadarajah, A., Rivera, J., Whittington, R., Mercier, R. J., Virag, L., Wang, S. & Flood, P. 2013. Oral choline supplementation for postoperative pain. *Br J Anaesth*, 111, 249-55.
- Soupene, E., Fyrst, H. & Kuypers, F. A. 2008. Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 88-93.
- Spadaro, F., Ramoni, C., Mezzanzanica, D., Miotti, S., Alberti, P., Cecchetti, S., Iorio, E., Dolo, V., Canevari, S. & Podo, F. 2008. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activation in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 68, 6541-9.
- Stapleton, C. M., Mashek, D. G., Wang, S., Nagle, C. A., Cline, G. W., Thuillier, P., Leesnitzer, L. M., Li, L. O., Stimmel, J. B., Shulman, G. I. & Coleman, R. A. 2011. Lysophosphatidic acid activates peroxisome proliferator activated receptor-gamma in CHO cells that over-express glycerol 3-phosphate acyltransferase-1. *PLoS One*, 6, e18932.

- Stewart, J. D. & Marchan, R., Lesjak, M. S., Lambert, J., Hergenroeder, R., Ellis, J. K., Lau, C. H., Keun, H. C., Schmitz, G., Schiller, J., Eibisch, M., Hedberg, C., Waldmann, H., Lausch, E., Tanner, B., Sehouli, J., Sagemueller, J., Staude, H., Steiner, E. & Hengstler, J. G. 2012. Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 drives tumor cell migration and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 8155-60.
- Tan, N. S., Michalik, L., Desvergne, B. & Wahli, W. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta as a target for wound healing drugs. *Expert Opin Ther Targets*, 8, 39-48.
- Toschi, A., Lee, E., Xu, L., Garcia, A., Gadir, N. & Foster, D. A. 2009. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol*, 29, 1411-20.
- Trousil, S., Lee, P., Pinato, D. J., Ellis, J., Dina, R., Aboagye, E. O., Keun, H. C. & Sharma, R. 2014. Alterations of choline phospholipid metabolism in endometrial cancer are caused by choline kinase alpha overexpression and a hyperactivated deacylation pathway. *Cancer Res*.
- Turban, S. & Hajdich, E. 2011. Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett*, 585, 269-74.
- Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J. & Arai, H. 2002. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*, 158, 227-33.
- van Asten, J. J., Vettukattil, R., Buckle, T., Rottenberg, S., van Leeuwen, F., Bathen, T. F. & Heerschap, A. 2015. Increased levels of choline metabolites are an early marker of docetaxel treatment response in BRCA1-mutated mouse mammary tumors: an assessment by ex vivo proton magnetic resonance spectroscopy *J Transl Med*, 13, 114.
- Vancura, A. & Haldar, D. 1994. Purification and characterization of glycerophosphate acyltransferase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 269, 27209-15.
- Wang, X., Devaiah, S. P., Zhang, W. & Welti, R. 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 45, 250-78.
- Welf, E. S. & Haugh, J. M. 2011. Signaling pathways that control cell migration: models and analysis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 3, 231-40.
- Weng, J. R., Chen, C. Y., Pinzone, J. J., Ringel, M. D. & Chen, C. S. 2006. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. *Endocr Relat Cancer*, 13, 401-13.
- Wijnen, J. P., Jiang, L., Greenwood, T. R., Cheng, M., Dopkens, M., Cao, M. D., Bhujwalla, Z. M., Krishnamachary, B., Klomp, D. W. & Glunde, K. 2014. Silencing of the glycerophosphocholine phosphodiesterase GDPD5 alters the phospholipid metabolite profile in a breast cancer model in vivo as monitored by <sup>31</sup>P MRS. *NMR Biomed*, 27, 692-9.
- Willier, S., Butt, E. & Grunewald, T. G. 2013. Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: a focussed review and analysis of LPA

- receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biol Cell*, 105, 317-33.
- Xu, H., Wilcox, D., Nguyen, P., Voorbach, M., Suhar, T., Morgan, S. J., An, W. F., Ge, L., Green, J., Wu, Z., Gimeno, R. E., Reilly, R., Jacobson, P. B., Collins, C. A., Landschulz, K. & Surowy, T. 2006. Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile. *Biochem Biophys Res Commun*, 349, 439-48.
- Xu, Y., Shen, Z., Wiper, D. W., Wu, M., Morton, R. E., Elson, P., Kennedy, A. W., Belinson, J., Markman, M. & Casey, G. 1998. Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *Jama*, 280, 719-23.
- Yalcin, A., Clem, B., Makoni, S., Clem, A., Nelson, K., Thornburg, J., Siow, D., Lane, A. N., Brock, S. E., Goswami, U., Eaton, J. W., Telang, S. & Chesney, J. 2010. Selective inhibition of choline kinase simultaneously attenuates MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene*, 29, 139-49.
- Yamashita, A., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Ito, M., Oka, S., Tanikawa, T., Waku, K. & Sugiura, T. 2014. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res*, 53, 18-81.
- Yanagida, K., Kurikawa, Y., Shimizu, T. & Ishii, S. 2013. Current progress in non-Edg family LPA receptor research. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 33-41.
- Yanaka, N., Nogusa, Y., Fujioka, Y., Yamashita, Y. & Kato, N. 2007. Involvement of membrane protein GDE2 in retinoic acid-induced neurite formation in Neuro2A cells. *FEBS Lett*, 581, 712-8.
- Yang, D., Yang, W., Zhang, Q., Hu, Y., Bao, L. & Damirin, A. 2013a. Migration of gastric cancer cells in response to lysophosphatidic acid is mediated by LPA receptor 2. *Oncol Lett*, 5, 1048-1052.
- Yang, D. R., Lin, S. J., Ding, X. F., Miyamoto, H., Messing, E., Li, L. Q., Wang, N. & Chang, C. 2013c. Higher expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma or its activation by agonist thiazolidinedione-rosiglitazone promotes bladder cancer cell migration and invasion. *Urology*, 81, 1109.e1-6.
- Yessoufou, A. & Wahli, W. 2010. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly*, 140, w13071.
- Yuan, H., Kopelovich, L., Yin, Y., Lu, J. & Glazer, R. I. 2012. Drug-targeted inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma enhances the chemopreventive effect of anti-estrogen therapy. *Oncotarget*, 3, 345-56.
- Zeisel, S. H., Da Costa, K. A., Franklin, P. D., Alexander, E. A., Lamont, J. T., Sheard, N. F. & Beiser, A. 1991. Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB J*, 5, 2093-8.
- Zhang, C., Wendel, A. A., Keogh, M. R., Harris, T. E., Chen, J. & Coleman, R. A. 2012. Glycerolipid signals alter mTOR complex 2 (mTORC2) to diminish insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 1667-72.

- Zhao, C., Du, G., Skowronek, K., Frohman, M. A. & Bar-Sagi, D. 2007. Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos. *Nat Cell Biol*, 9, 706-12.
- Zheng, B., Berrie, C. P., Corda, D. & Farquhar, M. G. 2003. GDE1/MIR16 is a glycerophosphoinositol phosphodiesterase regulated by stimulation of G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 1745-50.
- Zheng, Y., Rodrik, V., Toschi, A., Shi, M., Hui, L., Shen, Y. & Foster, D. A. 2006. Phospholipase D couples survival and migration signals in stress response of human cancer cells. *J Biol Chem*, 281, 15862-8.

## Anhang

### A1 siRNA-Nukleotidsequenzen

Im Folgenden sind die mRNA-Sequenzen und siRNA-Sequenzen aller für die Reduktion der Expression verwendeten siRNAs angegeben. Alle verwendeten siRNAs binden spezifisch an die jeweilige Ziel-mRNA und sind in der mRNA-Basenabfolge von CHKA-Isoform A und Isoform B sowie in den Basenabfolgen von GPAM (Transkript 1 und 2) und EDI3 (GPCPD5) farbig markiert.



>gi|47078275|ref|NM\_001277.2| Homo sapiens choline kinase alpha (CHKA), transcript variant 1, mRNA

GGCAGAGGAGCGAGTGCAGCGGCCAGCAGCACATCCCCGCTCCACAGTCGCCCGCAGTCGCCCGACCCGCC  
 GCCGCCCGCCCGCGCGCCCAACCGCCCGGCCCCCTGCCCGCCGGCCTGCCAGTGAGAGAGCGGCGAGG  
 GGGCGCCCGCCGGACTCTGAGCCTAGTCTCTCGCGCTGCGGCCGCCCGCGCCTCCTCGGCCCGCTGTC  
 GGGCATGAAAACCAAATTCTGCACCGGGGGCGAGGCGGAGCCCTCGCCGCTCGGGCTGCTGCTGAGCTGC  
 GGTAGCGGCAGCGCGGCCCGCGCCCGGCGTGGGGCAGCAGCGGACCGCCAGCGACCTCGAGTCCA  
 AGCAGCTGGGCGGCCAACAGCCGCGCTCGCGCTGCCCCCTCCGCCCGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCT  
 GCCCCAGCCCCCGCCGCGCAGCCGCCCGCAGACGAGCAGCCGGAGCCCCGGACCGGGCGCAGGGCCTAT  
 CTGTGGTGCAAGGAGTTCCTGCCCGGCGCCTGGCGGGGCTCCGCGAGGACGAGTTCACATCAGTGTCA  
 TCAGAGGCGGCCCTTAGCAACATGCTGTTCCAGTGTCTCCCTACCTGACACCACAGCCACCCTTGGTGATGA  
 GCCTCGGAAAGTGCTCCTGCGGCTGTATGGAGCGATTTTGCAGATGAGGTCTGTAAATAAAGAGGGATCC  
 GAACAAGCTCAGAAAGAAAATGAATTTCAAGGGGCTGAGGCCATGGTTCTGGAGAGCGTTATGTTTGCCA  
 TTCTCGCAGAGAGGTCACTTGGGCCAAAACCTATGGCATCTTTCCCAAGGCCGACTGGAGCAGTTCAT  
 CCCGAGCCGGCGATTAGATACTGAAGAATTAAGTTTTGCCAGATATTTCTGCAGAAATCGCCGAGAAAAATG  
 GCTACATTTTCATGGTATGAAAATGCCATTCAATAAGGAACCAAAATGGCTTTTTGGCA **CATGAAAAT**  
**ATCTAAAGGA**AGTGCTGAGAATTAATTTACTGAGGAATCCAGAATTA AAAAGCTCCACAAAATGCTCAG  
 TTACAATCTGCCCTTGGAACTGGAAAA **CCTGAGATCATTGCTTGAATCTACT**CCATCTCCAGTTGTATTT  
 TGTATAATGACTGTCAAGAAGGTAATATCTTGTGTGCTGGAAGGCCGAGAGAATTTGAAAAACA **GAAAC**  
**GTGCTCATTGATTTCGAAT**TACAGCAGTTACAATTACAGGGGATTCGACATTGGAAATCACTTCTGTGA  
 GTGGATGTATGATTATAGCTATGAAAAATACCCTTTTTTTCAGAGCAAACATCCGGAAGTATCCCAACAAG  
 AAACAACAGCTCCATTTTTATTTCCAGTTACTTGCCTGCATTCCAAAATGACTTTGAAAACCTCAGTACTG  
 AAGAAAAATCCATTATAAAAAGAAGAAATGTT **GCTTGAAGTTAATAGGTTT**GCCCTTGCATCTCATTTCCT  
 CTGGG **ACTGTGGTCCATTGTACAAGCCA**AGATTTTCATCTATTGAATTTGGGTACATGGACTACGCCCAA  
 GCAAGGTTTGATGCCTATTTCCACCAGAAGAGGAAGCTTGGGGTGTGACTGTGGGGAGGACTCCATCCAC  
 CTCATCACTGGACTGCATGGGGAGGCAGCAGAGCGGGGTCCCCTCTGTGCTTCGACTACTGCTCCTGTGG  
 CAGGAGGCTTTGGGTGGCTCACTACTGAACACATGTGTATGATACTAAAGACGGTATTA AAAATGGAGCGA  
 CGTTTTATTTTCATCTCTTGTTTACGATTTCACTAGGACTCAGAAAACGAGATCGGGAAGCAGAAATATAGTG  
 CAATAGTGCAACATCTCTGAATCCTTTTAATCTAGAGAAGGCATTTTCATATTTGGGGGCTAAGGTTTCCA  
 GTCAGATGAGGCAAACAGCAAGAGTAAGCAGTGTACTTGCAGGTACTTTGGTTAATGTTGATTTAAATTT  
 TTCATGAATGTGCTGGTGAACACTGTGACCAGGCTTTTTGTAGATGGCGATGTGTTATAGACGGTGCTCAC  
 TCCCAAGGGACAGCAAGTGAGCAGAGATGTACTGCAAAGTCGCCAGTCACTGCTGCAAGGTGGCCTCTGC  
 CTGGGGCCTCCAGAAGCTGCTCCTTTACCCTCTTGGTCCCATGGCTGAAGCTGGAGCAGCGGATTGCTCT  
 GGAGCAGCCAAGGCCGCGCAGCGTGTGGAGCAGAGCTCTCCCCTCCTGCTGGGCGTGTGTGACACTGATGA  
 GTTTCACTGTACTGCATGTGACTTCTCCCCTGCCCTTCCCTCCTGATGGAGTGTGCAGACAGCCATGCGTG  
 GCCACGGGGCAGTGTGAGGACCTCCCTGTCTCCCGGCTCCCCTCCAGGGGAGCCAGCTGCTTGACCTA  
 GCTCTTTGGGCCTCTCCTGCCCTCTGCTCTGCCTGGAGTGTGGATCCTGTGAGTAGGCTGGGCCTCCCC  
 TGGCAGGGTTCTCCAAGGGCCCCGGTTTTCCCGCCCTTACCTTTTCTGATGCCCTGACATCATCATTTCT  
 TGTGGGAGACAGCAGCCTGTATGTGGTGTGGGGCGTGGATCGAGTGTAGCTGTGAAAATCCATATATATGA  
 AATGTCCTGCGGATAACAGTCTTAGCTGACTTTTTTTTTACTCTGAACTCTTATTTGAATGTTTTTTGTG  
 CATATATTTCTGCTACCACAGAGATTGTACTATACAAAATAAAAAAATAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAA

### Abb. A1.1: cDNA-Basenabfolge von CHKA1

Das Cholinkinase- $\alpha$ -Transkript Nummer 1 (NM\_001277.2) wird zum Protein CHKA Protein Isoform a (NP\_001268.2) mit eine Molekülgröße von 457 aa (52g/mol) translatiert.

Verwendete siRNAs für den Knockdown sind farbig markiert:

rot = Oligo-A CHKAHSS14069; grün = Oligo-B CHKAHSS140691;

blau = Oligo-C CHKAHSS141030; orange = Oligo-D 4392420-s3007;

türkis= Oligo-E 4390824-s3008 und lila = Oligo-F 4392420-s3009

>gi|47078277|ref|NM\_212469.1| Homo sapiens choline kinase alpha (CHKA), transcript variant 2, mRNA  
 GGCAGAGGAGCGAGTGCAGCGGCCAGCAGCACATCCCCGCTCCACAGTCGCCCGCAGTCGCCCGCAGCCGCC  
 GCCGCCCGCCCGCGCGCCCAACCGCCGCGGCCCCCTGCCCGCCGGCCTGCCAGTGAGAGAGCGGCGAGG  
 GGGCGCCCGCCGGACTCTGAGCCTAGTCTCTCGCGCTGCGGCCGCCCGCGCCTCCTCGGCCGCTGTC  
 GGGCATGAAAACCAAATTCTGCACCGGGGGCGAGGCGGAGCCCTCGCCGCTCGGGCTGCTGCTGAGCTGC  
 GGTAGCGGCAGCGCGGCCCGCGCCCGGCGTGGGGCAGCAGCGGACCGCCAGCGACCTCGAGTCCA  
 AGCAGCTGGGCGGCCAACAGCCGCGCTCGCGCTGCCCCCTCCGCCCGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCT  
 GCCCCAGCCCCCGCCGCGCAGCCGCGCCGAGACGAGCAGCCGGAGCCCCGGACCGGGCGCAGGGCCTAT  
 CTGTGGTGCAAGGAGTTCCTGCCCGGCGCCTGGCGGGGCTCCGCGAGGACGAGTTCACATCAGTGTCA  
 TCAGAGGCGGCCCTTAGCAACATGCTGTTCCAGTGTCTCCCTACCTGACACCACAGCCACCCTTGGTGATGA  
 GCCTCGGAAAGTGTCTCTGCGGCTGTATGGAGCGATTTTGCAGATGGGGGCTGAGGCCATGGTCTGGAG  
 AGCGTTATGTTTGCATTCTCGCAGAGAGGTCACCTGGGCCAAAACCTCTATGGCATCTTTCCCAAGGCC  
 GACTGGAGCAGTTCATCCCGAGCCGGCGATTAGATACTGAAGAATTAAGTTTGCCAGATATTTCTGCAGA  
 AATCGCCGAGAAAATGGCTACATTTTCATGGTATGAAAATGCCATTCAATAAGGAACCAAAATGGCTTTTT  
 GGCA **CAATGGAAAAGTATCTAAA**GGAAAGTGTCTGAGAATTAATTTACTGAGGAATCCAGAATTAAGAAAGC  
 TCCACAAATTGCTCAGTTACAATCTGCCCTTGGAACTGGAAAA **CCTGAGATCATTGCTTGAATCTACT**CC  
 ATCTCCAGTTGTATTTTGTGATAATGACTGTCAAGAAGGTAATATCTTGTGCTGGAAGGCCGAGAGAAT  
 TCTGAAAAACAGAACTGATGCTCATTGATTTTCGAAATACAGCAGTTACAATTACAGGGGATTCGACATTG  
 GAAATCACTTCTGTGAGTGGATGTATGATTATAGCTATGAAAAATACCCCTTTTTTTCAGAGCAAACATCCG  
 GAAGTATCCCACCAAGAAACAACAGCTCCATTTTATTTCCAGTTACTTGCCATTCAAAATGACTTT  
 GAAAACCTCAGTACTGAAGAAAAATCCATTATAAAAAGAAGAAATGTT **GCTTGAAGTTAATAGGTTT**GCCC  
 TTGCATCTCATTTCCTCTGGG **GACTGTGGTCCATTGTACAAGCCAA**GATTTTCATCTATTGAATTTGGGTA  
 CATGGACTACGCCCAAGCAAGGTTTGGATGCCTATTTCCACCAGAAGAGGAAGCTTGGGGTGTGACTGTGG  
 GGAGGACTCCATCCACCTCATCACTGGACTGCATGGGGAGGCAGCAGAGCGGGGTCCCCTCTGTGCTTCG  
 ACTACTGCTCCTGTGGCAGGAGGCTTTGGGTGGCTCACTACTGAACACATGTGTATGATACTAAAGACGG  
 TATTAATAATGGAGCGACGTTTATTTTCATCTCTTGTGTTACGATTTCACTAGGACTCAGAAACGAGATCGGG  
 AAGCAGAAATATAGTGCAATAGTGCAACATCTCTGAATCCTTTTAATCTAGAGAAGGCATTTTCATATTTG  
 GGGGCTAAGGTTTCCAGTCAGATGAGGCAAACAGCAAGAGTAAGCAGTGTACTTGCAGGTAATTTGGTT  
 AATGTTGATTTAAATTTTTCATGAATGTGCTGGTGAACACTGTGACCAGGCTTTTGTAGATGGCGATGTGT  
 TATAGACGGTGTCACTCCCAAGGGACAGCAAGTGAGCAGAGATGTAAGTGCAGGATCGCCAGTCACTGCT  
 GCAAGGTGGCCTCTGCCTGGGGCCTCCAGAAGCTGCTCCTTTACCCTCTTGGTCCCATGGCTGAAGCTGG  
 AGCAGCGGATTGCTCTGGAGCAGCCAAGGCCCGCCAGCGTGTGGAGCAGAGCTCTCCCTCCTGCTGGGCG  
 TGTGTGACACTGATGAGTTTCACTGTACTGCATGTGACTTCTCCCTGCCCTTCTCCTGATGGAGTGTG  
 CAGACAGCCATGCGTGGCCACGGGGCAGTGTGAGGACCTCCCTGTCTCCCGGCTCCCCTCCAGGGGAG  
 CCAGCTGCTTGACCTAGCTCTTTGGGCCTCTCCTGCCCTCTGCTCTGCCTGGAGTGTGGATCCTGTGAG  
 TAGGCTGGCCCTCCCCTGGCAGGGTTCTCCAAGGGCCCCGTTTCCCGGCCCTTACCTTTCTGATGCC  
 CTGACATCATATTCTTGTGGGAGACAGCCTGTATGTGTTGGTGTGGGGCGTGGATCGAGTGTAGCTGTG  
 AAATCCATATATATGAAATGTCCTGCGGGATACAGTCTTAGCTGACTTTTTTTTTTACTCTGAACCTTATT  
 TGAATTGTTTTTGTGCATATATTTCTGCTACCACAGAGATTGTACTATACAAAATAAAAAATAAAAAACC  
 CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Abb. A1.2: cDNA-Basenabfolge von CHKA2**

Das Cholinkinase- $\alpha$ -Transkript Nummer 2 (NM\_212469.1) wird zum Protein CHKA Isoform b (NP\_997634.1) mit einer Molekülgröße von 439 aa (50g/mol) translatiert. Verwendete siRNAs für den Knockdown sind farbig markiert:  
 rot = Oligo-A CHKAHSS14069; grün = Oligo-B CHKAHSS140691;  
 blau = Oligo-C CHKAHSS141030; orange = Oligo-D 4392420-s3007;  
 türkis= Oligo-E 4390824-s3008 und lila = Oligo-F 4392420-s3009

**Tab. A1.1: Basenabfolge und Bestellnummer der CHKA-siRNAs**

CHKA	siRNA Sequenz	Bestellnummer	cDNA (U=T)
A	UG GCU UGU ACA AUG GAC CAC AGU C	CHKAHSS140690	<b>GACTGTGGTCCATTGTACAAGCCAA</b>
B	UC GAA AUC AAU GAG CAU CAG UUU C	CHKAHSS140691	<b>GAAACTGATGCTCATTGATTTCGAA</b>
C	GU AGA UUC AAG CAA UGA UGU CAG G	CHKAHSS141030	<b>CCTGACATCATTGCTTGAATCTACT</b>
D	GA AAA GUA UCU AAA GGA Att	4392420-s3007	<b>GGAAAAGTATCTAAAGGAAtt</b>
E	AA UGG AAA AGU AUC UAA Att	4390824-s3008	<b>CAATGGAAAAGTATCTAAAtt</b>
F	CU UGA AGU UAA UAG GUU Utt	4392420-s3009	<b>GCTTGAAGTTAATAGGTTtt</b>

>gi|350276139|ref|NM\_001244949.1| Homo sapiens glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial (GPAM), transcript variant 1, mRNA  
TGCGTCATCAGGGTGCGCCACTGCAGCTGGCATTGGCCGGGACTGGAAGTGCGGGCTTCTGCAGACCCG  
AAGCTGGAGCTGCTAGGGCAGCAGCGGCTCCCCTGTTGTATGGACATTCTGCACCCGAAACTGATAGCTG  
AGTCCTGAAGTTTTATGTTATGAAACAGAAGAAGCTTTCATCCCAGCACATGATTTGGGAATTACACTTTG  
TGACATGGATGAATCTGCACTGACCCTTGGTACAATAGATGTTTTCTTATCTGCCACATTCATCAGAATAC  
AGTGTGGTTCGATGTAAGCACACAAGTGAGGAATGGGGTGAGTGTGGCTTTAGACCCACCATCTTCAGAT  
CTGCAACTTTAAATGGAAAGAAAGCCTAATGAGTCCGAAAAGGCCATTTGTTGGAAGATGTTGTTACTC  
CTGCACTCCCCAGAGCTGGGACAAATTTTTCAACCCAGTATCCCGTCTTTGGGTTTGCAGGAATGTTATT  
TATATCAATGAACTCACACAAGACACCGCGGATGGCTTGCAAGACGCCTTTCTTACGTTCTTTTTATTC  
AAGAGCGAGATGTGCATAAGGGCATGTTTGCCACCAATGTGACTGAAAATGTGCTGAACAGCAGTAGAGT  
ACAAGAGGCAATTGCAGAAGTGGCTGCTGAATTAACCCCTGATGGTTCTGCCAGCAGCAATCAAAAGCC  
GTTAACAAAGTGAAGAAAGAAAGCTAAAAGGATTCTTCAAGAAATGGTTGCCACTGTCTCACCGGCAATGA  
TCAGACTGACTGGGTGGGTGCTGCTAAAAGTGTCAACAGCTTCTTTTGGAAACATTCAAATTCACAAAAG  
TCAACTTGAGATGGTTAAAGCTGCAACTGAGACGAATTTGCCGCTTCTGTTTTCTACCAGTTCATAGATCC  
CATATTGACTATCTGCTGCTCACTTTTATTCTTCTGCCATAACATCAAAGCACCATAACATTGCTTCAG  
GCAATAATCTCAACATCCCAATCTTCACTGATCCATAAGCTTGGGGGCTTCTTCATACGACGAAG  
GCTCGATGAAACACCAGATGGACGGAAAGATGTTCTCTATAGAGCTTTGCTCCATGGGCATATAGTTGAA  
TTACTTCGACAGCAGCAATTTCTGGAGATCTTCTGGAAGGCACACGTTCTAGGAGTGGAAAAACCTCTT  
GTGCTCGGGCAGGATTTTGTGTCAGTTGTGGTAGATCTGTCTACCAATGTCAATCCAGACATCTTGAT  
AATACCTGTTGGAATCTCCTATGATCGCATTATCGAAGTCTACTACAATGGTGAACAACACTGGCCAAACCT  
AAGAAGAATGAGAGCCTGTGGAGTGTAGCAAAGGTTTATTAGAATGTTACGAAAAAACTATGGTTGTG  
TCCGAGTGGATTTTGCACAGCCATTTTCTTAAAGGAATATTTAGAAAAGCCAAAAGTCAGAAAACCGGTGTC  
TGCTCTACTTTCCCTGGAGCAAGCGTTGTTACCAGCTATACTTCTTCAAGACCCAGTGATGCTGCTGAT  
GAAGGTAGAGACACGTCCATTAATGAGTCCAGAAATGCAACAGATGAATCCCTACGAAGGAGGTTGATTG  
CAAATCTGGCTGAGCATATTCTATTCACTGCTAGCAAGTCTGTGCCATTATGTCCACACACATTGTGGC  
TTGCCTGCTCCTCTACAGACACAGGCAGGGAATTGATCTCTCCACATTGGTGAAGACTTCTTTGTGATG  
AAAGAGGAAGTCTGGCTCGTGATTTTACCTGGGTTCTCAGGAAATTCAGAAGATGTAGTAATGCATG  
CCATACAGCTGCTGGGAAATTTGTGTCACAATCACCCACACTAGCAGGAACGATGAGTTTTTTATCACCC  
CAGCACAACTGTCCCATCAGTCTTCAACTCACTTCTACAGCAATGGGGTACTTCATGTCTTTATCATG  
GAGGCCATCATAGCTTGCAGCCTTATGCAAGTTCGAACAAGAGGGGACTGGGGGGTCCCCTAGCACCC  
CACCTAACCTGATCAGCCAGGAGCAGCTGGTGCAGGAAAGGCGGCCAGCCTGTGCTACCTTCTCTCCAATGA  
AGGCACCATCTCACTGCCTTGCAGACATTTTACCAAGTCTGCCATGAAAACAGTAGGAAAAGTTTATCCAG  
TATGGCATTCTTACAGTGGCAGAGCACGATGACCAGGAAGATATCAGTCTTAGTCTTGGCTGAGCAGCAGT  
GGGACAAGAAGCTTCCAGAACCTTTGTCTTGGAGAAGTGAAGAAAGATGAAGACAGTACTTTGGGGA  
GGAACAGCGAGATTGCTACCTGAAGGTGAGCCAATCCAAGGAGCACCAGCAGTTTATCACCTTCTTACAG  
AGACTCCTTGGGCTTTGCTGGAGGCCTACAGCTCTGCTGCCATCTTTGTTCAAACTTCACTGAGTCTCTG  
TTCCAGAACCTGAGTATCTGCAAAAGTTGCAAAATACCTAATAACCAGAACAGAAAAGAAATGTTGCAGT  
ATATGCTGAGAGTGCCACATATTGTCTTGTGAAGAATGCTGTGAAAATGTTTAAGGATATTGGGGTTTTC  
AAGGAGACCAACAAAAGAGAGTGTCTGTTTTAGAACTGAGCAGCACTTTTCTACCTCAATGCAACCGAC  
AAAAACTTCTAGAATATATTCTGAGTTTTTGTGGTGTGTAGGTAACGTGTGGCACTGCTGGCAAAATGAAG  
GTCATGAGATGAGTTCCTTGTAGGTACCAGCTTCTGGCTCAAGAGTTGAAGGTGCCATCGCAGGGTCAGG  
CCTGCCCTGTCCGAAGTGTCTCCTGGAAGACAAGTGCCCTTCTCCCTCCATGGATCTGTGATCTTCCCA  
GCTCTGCATCAACACAGCAGCCTGCAGATAACACTTGGGGGGACCTCAGCCTCTATTTCGCAACTCATAAT  
CCGTAGACTACAAGATGAAATCTCAATAAATTTATTTTTGAGTTTATTTAAAGATTGACATTTTAAAGTACAA  
CTTTTAAAGGACTAATTACTGTGATGGACACAGAAATGTAGCTGTGTTCTGGAAGTGAATCTTACATGGTA  
TACTTAGTGTCTGCTGGGTAATTTGTTGGTATATTATCTGGTTAGTGGTTAATGCTTCTTTAAAAATAAT  
TGAGTCATCCATCACTCTTTTTTCACTTTTATCTGTCAATAGTAGCTACATTTTAAATGGGAGCACCTTT  
TATCCCAAAGTGCTTTATAAATTGAGTGGACTGATATATATCACACCCAGGTATCACTGTGCTGTCTTTT  
GCTGTGAGATTTAGAAATGTTTTTAAAGAGCTATGTGAAAACAGACAATATTAGTTTGGGTCGGGAACTGA  
GATATTGTAATCAAATAGTTAACATCAGGAAGTTAATTTGGCTGGCAAAATCTAGGGAAAATTTGGCCAG  
AAAAGTGGTGTGAAAGGCTTTTGTCTCATATAAAACAAGTGCCATTGAGTTTCAAATGACCAGCAAAATATAT  
TTAGAACCCTTCTGTTTTATGTCTGTACCTCGTCCACCCCTCAGGTAATACCTGCCTCTCACAGGTACA  
GCTGTTTTCTTGGAAATCTCCAACCAATAGCAGTTTTCTTAACCTTGAATTAGCTTGAAGTGTGACTGT  
TAGAATACAGTCTCTGGCCACAGCTGATGAGGCTTTCTGTACTGCACACAGATATGTGTACTGCACCCC  
AGTCCAGGTGACTGGTACCACCTCGAGTTGTGCCGTGCACAACCTGTCCAGTATATGCATGTGTGGTCCCC  
TACTGACTGGTAATGGTTAGAGGCATTTATGGATTTTTAGCTTTGAGGAAAAACCATGACTTTTAAACAAA  
TTTTTATGGGTTATATGCCTAAACCCTTATGCCACATAGTGGTAAATAATTTATGAAAAATGGTCTGTTCA  
TAATTGGTAGGTGCCTTTTGTGAGCAGGGAGCATAAATTATTGGTTTATTATGGTAATTTATGGTGATTTTT  
TAAATATCATGTAATGTTAAACGTTTTTCTAACAGTTTACTGTTGCTTATCTCCAAGATATTATGGAATT  
AAGAATTTTTCCAGATGAGTGTACATAGATTCTTTGAATTTAGTATAAAAAGTACTGAGAATTAAGTTTG  
TACTTCCATAAGCTTGGATTTTAAACACTGATAGTATCTCATGAGTAATGTGTGTTTTGGGAGAGGGAGG  
GATGCTGATTGATATTTACATTGTATGAAATACCATGTTTGAACCTCATAGCAATAATGCTATGCTGTT

GTGATCCCTCTCAAGTTCTGCATTTAAAATATATTTTTTCTTTATAGGAATTGATGTATACCATGAAGTC  
 ATTGTCAGTTGTAGTAGCTCTGATGTTGAATGAGATATCATGTTTTAGCATTCCATTTTACTGACTAGGG  
 TAGAAGAACAACCTTTTCTGGCTACATTTGGAGGATACCCAGGGAGTCTTGGGTGTTCCCTTATCTGGGGAA  
 GCAAACATTTCACTAGTCTCTTTTTTTCATCCTTTAAATTGTAAATTAAGGATTACTCAAGCTCACCATT  
 ATTCAAGATTGGGACTCGCTTCCCAGTCGACACTCTGCCCTGCCTGTCATTGCTGCAAAGAGCTGCTGCT  
 TTGCCAACCTAAGCAAAGAAAATACGGCTTCTCTTGCAATTATTTTCCCTTTTGGTTGGTTTGTCTTAG  
 AAGTACGTTTCAAGATGCTTTGGGGAATGCAATGTATGATTTGCTAGCTCTCTCACCCTTAACTCACTGTG  
 AGGATAAATATGCATGCTTTTTGTAATTAAGTGGTCTTTGAAAATCTTTTTTAAGGGAGAAAAATCTCA  
 ACCAAAGTTATGCTCATCCAGACAAGCTGACCTTTGAGTTAATTTTCCAGACAACCTCATTCTTCAGTGCCT  
 CATGACTGAAAACAAAAAACAAAAAACGAAAGCATCTTACAAATGAAGCTTCCAGATAGCACCGTTTTG  
 CTAAGATAACATTCTCATTGTTTTTCCAACAGTGTGGCTTCCACATAAGGTTAAACAAACTAGGTGCTT  
 GTAAATAATTTATTACAGTTTACTCTATCGCATTTCTGTAACATGAAATGCATGCCCTTCTTCAGGGGAA  
 GACTGTGGTCAAGTTAAAAAACAATATTAACAACATGAAACTGCAGTCTGTTTTTAAAAATGA  
 GAATGTCCTAAGTGATTGAGAAGAGAGGAGGGAAGTTGTGCACTCTGAAAATGCATGAAAAACAAAGGCA  
 AAACTAGTGGGAAATGTGTAGAAGTGTAACTGAGATGGCTTCCGAGTCTTCCCTTCTGGAATCTGTTAAA  
 TTTTCAAAAGTCATGAGGGTAAATGGAGAAAATATTTCTGGGATTACAATGAATGTAAGCCCAAAATTTGTG  
 GAATTGCCAGTAACCTGGATGGGAAAAGCATTTCATAGCACTCCATGTAATATGAGTGTCTGTGAG  
 ATGTTTATCAGTGTTTTATAGAAATGGTGTGCTGGGAAACCAAGTTTGCACCTGGAACTTACAATGCA  
 CTTTAGCGCAGTAAGGGCTTGGCATCCGGTAGTGAACCTCTACTAATGTCTGTGGAGAACATTTTG  
 GACACCAGGACCTTTTCTCCTTTGGGATACTTATGAACCTCTACTAATGTCTGTGGAGAACATTTTG  
 GGAAACACTATGTTAGATAGTTCTTTAAGGAGACAAAACGGTAATGAACAGATAGCACTGGGGCAGAATA  
 TGCATGCATTTTGTAACTCCAGTGTGGCGTTGAATAGATGTGTATTTCTCCCTGCAGAAAATAAGCA  
 CAGAAAATTATAATGTAGGTGATCGGAGCTCTTTCTTTGATAGAGAGAACAGCCCCAATGATCCTGGCT  
 TTTTCACTGAACGTATCAGAATACATGGATGAATTGGGGTAAATAAGGTTTAAATTCAGATCTAGAAGAA  
 AGTATTGTACGTTTGAATGCAGATTTTATCCACAGATAGTTGTAGTGTTTAGACATGACAGGACCTATC  
 GTTGAGGTTTCTAAGACTTACTATGGGCTGTAAACCTGTTTTTAAAACTATTTTAGAAACCTGAGACTT  
 GCCGTCTGGCATTTTAGTTTAAATACAACTAATGATTGCATTTGAAAGAGATTCTTGACCTTATTTCTAA  
 ACGTCTAGAGCTCTGAAATGTCTTGTATGGAAGGTATTAACCTATTTGCCTGTTGTACAAAGAAATGTTAA  
 GACTCGTGAAGAATTACTATAAGGTACTGTGAAATAACTGCGATTTTGTGAGCAAAACATACTTGGAA  
 ATGCTGATTGATTTTTATGCTTGTAGTGTATTGCAAGAAACACAGAAAATGTAGTTTTGTTTTAATAAA  
 CCAAAAATTGAACATACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

**Abb. A1.3: cDNA-Basenabfolge von GPAM-Transkript 1**

Die mRNA des GPAM-Transkripts Nummer 1 (NM\_001244949.1) wird zum Protein (NP\_001231878.1) mit einer Molekülgröße von 828 aa (93,8 kDa) translatiert. Variante 1 und 2 codieren für dasselbe Protein.

Verwendete siRNAs für den Knockdown sind farbig markiert:

blau = Oligo-A HSS126649; rot = Oligo-B HSS126650; grün = Oligo-C HSS126651;  
 orange = Oligo-D S33575; türkis= Oligo-E S224483 und lila = Oligo-F S224484

>gi|350276138|ref|NM\_020918.5| Homo sapiens glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial (GPAM), transcript variant 2, mRNA  
 TGCATCATCAGGGTGCGCCACTGCAGCTGGCATTGGCCGGGACTGGAAGTGCGGGCTTCTGACGACGCCG  
 AAGCTGGAGCTGCTAGGCAGCGGCTCCCCTGTTGTATGGACATTCTGCACCCGAAACTGTAGCTGAGTC  
 CTGAAGTTTTATGTTATGAAACAGAAGAAGCTTTCATCCCAGCACATGATTTGGGAATTACACTTTGTGAC  
 ATGGATGAATCTGCACTGACCCTTGGTACAATAGATGTTTTCTTATCTGCCACATTCATCAGAATACAGTG  
 TTGGTGCATGTAAGCACACAAGTGAGGAATGGGGTGGTGTGGCTTTAGACCCACCATCTTCAGATCTGC  
 AACTTTAAATGGAAAGAAAGCCTAATGAGTCCGAAAAGGCCATTTGTTGGAAGATGTTGTTACTCCTGC  
 ACTCCCCAGAGCTGGGACAAATTTTTCAACCCAGTATCCCGTCTTTGGGTTTGGGAATGTTATTTATA  
 TCAATGAACTCACACAAGACACCGCGGATGGCTTGCAAGACGCCTTTCTTACGTTCTTTTTATTCAAGA  
 GCGAGATGTGCATAAGGGCATGTTTGGCCACCAATGTGACTGAAAATGTGCTGAACAGCAGTAGAGTACAA  
 GAGGCAATTGCAGAAGTGGCTGCTGAATTAACCCCTGATGGTTCTGCCAGCAGCAATCAAAAGCCGTTA  
 ACAAAGTGA AAAAGAAAGCTAAAAGGATTCTTCAAGAAATGGTTGCCACTGTCTCACCCGCAATGATCAG  
 ACTGACTGGGTGGGTGCTGCTAAAAGTGTCAACAGCTTCTTTTGGAAACATTCAAATTCACAAAGGTCAA  
 CTTGAGATGGTTAAAGCTGCAACTGAGACGAATTTGCCGCTTCTGTTTTCTACCAGTTCATAGATCCCAT  
 TTGACTATCTGCTGCTCACTTTTATTCTTCTGCCATAACATCAAAGCACCATAACATTGCTTCAGGCAA  
 TAATCTCAACATCCCAATCTTCAGTACCTTGATCCATAAGCTTGGGGGCTTCTTCATACGACGAAGGCTC  
 GATGAAACACCAGATGGACGGAAAGATGTTCTCTATAGAGCTTTGCTCCATGGGCATATAGTTGAATTAC  
 TCGACAGCAGCAATTTGGAGATCTTCTGGAAGGCACACGTTCTAGGAGTGGAAAAACCTCTTGTGC  
 TCGGGCAGGATTTTGTGTCAGTTGTGGTAGACTACTGTCTACCAATGTCTCCAGACATCTGATAATA  
 CCTGTTGGAATCTCCTATGATCGCATTATCGAAGTCACTACAATGGTGAACAACCTGGCACAACATAAGA  
 AGAATGAGAGCCTGTGGAGTGTAGCAAGAGGTGTTATTAGAAATGTTACGAAAAAACTATGGTTGTGTCG  
 AGTGGATTTTGCACAGCCATTTTCTTAAAGGAATATTTAGAAAAGCCAAAAGTCAGAAAACCGGTGTCTGCT  
 CTACTTTCCCTGGAGCAAGCGTTGTTACCAGCTATACTTCTTCAAGACCCAGTGATGCTGCTGATGAAG  
 GTAGAGACACGTCCATTAATGAGTCCAGAAATGCAACAGATGAATCCCTACGAAGGAGGTTGATTGCAAAA  
 TCTGGCTGAGCATATTCTATTCACTGCTAGCAAGTCTGTGCCATTATGTCCACACACATTGTGGCTTGC  
 CTGCTCCTCTACAGACACAGGCAGGGAATTGATCTCTCCACATTGGTTCGAAGACTTCTTTGTGATGAAAG  
 AGGAAGTCTGGCTCGTGATTTTGGCTGGGTTCTCAGGAAATTCAGAAGATGTAGTAATGCATGCCAT  
 ACAGCTGCTGGGAAATTTGTGTCACAATCACCCACACTAGCAGGAACGATGAGTTTTTTATCACCCCCAGC  
 ACAACTGTCCCATCAGTCTTCAACTCAACTTCTACAGCAATGGGGTACTTTCATGTCTTTATCATGGAGG  
 CCATCATAGCTTGCAGCCTTTATGCAAGTTCGAACAAGAGGGGACTGGGGGGTCCCCTAGCACCCACC  
 TAACCTGATCAGCCAGGAGCAGCTGGTGCAGGAGGCGGCCAGCCTGTGCTACCTTCTCTCCAATGAAGGC  
 ACCATCTCACTGCCTTGGCAGACATTTTACCAAGTCTGCCATGAAACA GTAGGAAAAGTTTATCCAGTATG  
 GCATTCTTACAGTGGCAGAGCACGATGACCAGGAAGATATCAGTCTTAGTCTTGGCTGAGCAGCAGTGGGA  
 CAAGAAGCTTCCAGAACCTTTGTCTTGGAGAAGTGTGTAAGAAGATGAAGACAGTACTTTGGGGAGGAA  
 CAGCGAGATTGCTACCTGAAGGTGAGCCAATCCAAGGAGCACCAGCAGTTTATCACCTTCTTACAGAGAC  
 TCCTTGGGCCTTTGCTGGAGGCCTACAGCTCTGCTGCCATCTTTGTTTCAACTTTCAGTGGTCTGTTC  
 AGAAGCTGAGTATCTGCAAAAAGTTGCACAAATACCTAATAACCAGAACAGAAAAGAAATGTTGCAGTATAT  
 GCTGAGAGTGCACATATTGTCTTGTGAAGAATGCTGTGAAAATGTTTAAAGGATATTGGGGTTTCAAGG  
 AGACCAACAAAAGAGAGTGTCTGTTTTAGAACTGAGCAGCACTTTTCTACCTCAATGCAACCGACAAAA  
 ACTTCTAGAATATATTCTGAGTTTTTGTGGTGTGTAGGTAACGTGTGGCACTGCTGGCAAAATGAAGGTCA  
 TGAGATGAGTTCTTGTAGGTACCAGCTTCTGGCTCAAGAGTTGAAGGTGCCATCGCAGGGTTCAGGCCTG  
 CCCTGTCCCGAAGTGTCTCCTGGAAGACAAGTGCCTTCTCCCTCCATGGATCTGTGATCTTCCAGCTC  
 TGCATCAACACAGCAGCCTGCAGATAACACTTGGGGGGACCTCAGCCTCTATTGCAACTCATAATCCGT  
 AGACTACAAGATGAAATCTCAATAAATTTATTTTTGAGTTTATTTAAAGATTGACATTTTAAGTACAACCTT  
 TAAGGACTAATTACTGTGATGGACACAGAAATGTAGCTGTGTTCTGGAAGTGAATCTTACATGGTATACT  
 TAGTGTGCTGGGTAATTTGTTGGTATATTATCTGGTTAGTGGTTAATGCTTCTTTAAAAATAATTGAG  
 TCATCCATTCAGTCTTTTTTCTGTTTATCTGTCAATAGTAGCTACATTTTTTAAATGGGAGCACCTTTTATC  
 CCAAAGTGCTTTATAAATTGAGTGGACTGATATATATCACACCCAGGTATCACTGTGCTGTCTTTGCTG  
 TCAGATTTAGAAATGTTTTTAAAGAGCTATGTGAAAACAGACAATATTAGTTTAGGTTCGGGAACTGAGATA  
 TTGTAATCAAATAGTTAACATCAGGAAGTTAATTTGGCTGGCAAAATCTAGGGAACTTGGCCAGAAAA  
 CTGGTGTGAAAGGCTTTTGTCTCATATAAAACAAGTGCATTGAGTTTCAAATGACCAGCAAAATATTTTAG  
 AACCTTCTCTGTTTTATGTCTGTACCTCGTCCACCCCTCAGGTAATACCTGCCTCTCACAGGTACAGCTG  
 TTTCTTGGAAATCTCCAACCAATAGCAGTTTTCTTAACCTTGATTAGCTTGGCTGACAGACTGTTAGA  
 ATACAGTTCTCTGGCCACAGCTGATGAGGCTTTCTGTAAGTGCACACAGATTGTGTACTGCACCCAGTC  
 CAGGTGACTGGTACCACACTCGAGTTGTGCCGTGCACAACCTGTCCAGTATATGCATGTGGTGGCCCTACT  
 GACTGGTAATGGTTAGAGGCATTTATGGATTTTTAGCTTTGAGGAAAAACCATGACTTTTTAACAAATTTT  
 TATGGGTTATATGCCTAAACCTTATGCCACATAGTGGTAAATAATATGAAAAATGGTCTGTTTATAAT  
 TGGTAGGTGCCTTTTGTGAGCAGGGAGCATAAATTATTGGTTTATTATGGTAATTATGGTGATTTTTTAAA  
 TATCATGTAATGTTAAACGTTTTTCTAACAGTTTACTGTTGCTTATCTCCAAGATATTATGGAATTAAGA  
 ATTTTTCCAGATGAGTGTACATAGATTCTTTGAATTTAGTATAAAAAGTACTGAGAATTAAGTTTGTACT  
 TCCATAAGCTTGGATTTTAAACACTGATAGTATCTCATGAGTAATGTGTGTTTTGGGAGAGGGAGGGATG  
 CTGATTGATATTTACATTGTATGAAATACCATGTTTGAACCTCATAGCAATAATGCTATGCTGTTGTGA

TCCCTCTCAAGTTCTGCATTTAAAATATATTTTTTCTTTATAGGAATTGATGTATACCATGAAGTCATTG  
 TCAGTTGTAGTAGCTCTGATGTTGAATGAGATATCATGTTTTAGCATTCCATTTTACTGACTAGGGTAGA  
 AGAACACTTTTTCTGGCTACATTTGGAGGATACCCAGGGAGTCTTGGGTGTTCCCTTATCTGGGGAAGCAA  
 ACATTTCACTAGTCTCTTTTTTTCATCCTTTAAATTGTAAATTAAGGATTACTCAAGCTCACCATTATTC  
 AAGATTGGGACTCGCTTCCCAGTCGACACTCTGCCCTGCCTGTCATTGCTGCAAAGAGCTGCTGCTTTGC  
 CAACCTAAGCAAAGAAAATACGGCTTCTCTTGCAATTATTTTCCCTTTTGGTTGGTTTTGTTTTCTAGAAGT  
 ACGTTCAGATGCTTTGGGGAATGCAATGTATGATTTGCTAGCTCTCTCACCCTTAACTCACTGTGAGGA  
 TAAATATGCATGCTTTTTGTAATTAAGTGGTCTTTGAAAATCTTTTTTAAGGGAGAAAAATCTCAACCA  
 AAGTTATGCTCATCCAGACAAGCTGACCTTTGAGTTAATTTTCAGCACAACCTCATTCTTCAGTGCCTCATG  
 ACTGAAAACAAAAAACAAAAAACGAAAGCATCTTCACAATGAAGCTTCCAGATAGCACCGTTTTGCTAA  
 AAGATACATTCTCATTGTTTTCCAACAGTGATGGCTTCCACATAAGGTTAAACAAACTAGGTGCTTGTA  
 ATAATTTATTACAGTTTACTCTATCGCATTTCTGTAACATGAAATGCATGCCCTTCTTCAGGGGAAGACT  
 GTGGTCAAGTTAAAAAAAAAAAAACAATATTAACAACATGAAACTGCAGTCTGTTTTTGAATGAGAAT  
 GTCCTAAGTGATTGAGAAGAGAGGAGGAAAGTTGTGCACTCTGAAAATGCATGAAAAACAAAGGCAAAAA  
 CTAGTGGGAAATGTGTAGAAGTGTAACTGAGATGGCTTCCGAGTCTTCTTCTGGAATCTGTTAAATTTTC  
 ACAAAGTCATGAGGGTAAATGGAGAAAATATTTCTGGGATTACAATGAATGTAAGCCCAAAATTTGGAAT  
 TGCCAGTAACCTGGATGGGAAAAGCATTTCATAGCACTCCATGTAATATGAGTGTCTGTGAGATGT  
 TCATCAGTGTTTTATAGAAATGGTGTGTGCTGGGAAACCAAGTTTGCACCTGGAACTTACAATGCACCTT  
 AGCGCAGTAAGGGCTTGGCATCCGGTAGTGAAAACTGTCTAACCAGCATTGCCCAAACTATTTTGACA  
 CCAGGACCTTTTTCTCCTTTGGGATACTTATGAACCTCTACTAATGTCTGTGGAGAACATTTGGGAA  
 ACATATGTTAGATAGTTCTTTAAGGAGACAAAACGGTAATGAACAGATAGCACTGGGGCAGAATATGCA  
 TGCATTTTGTAACTCCAGTGTGGCGTTGAATAGATGTGTATTTCTCCCCTGCAGAAAATAAGCACAGA  
 AAATTATAATGTAGGTGATCGGAGCTCTTTCTTTGATAGAGAGAACAGCCCCAATGATCCTGGCTTTTTT  
 CACTGAACGTATCAGAATACATGGATGAATTGGGGTAAATAAGGTTTAAATTCAGATCTAGAAGAAAAGTA  
 TTGTACGTTTGAATGCAGATTTTTATCCACAGATAGTTGTAGTGTTTAGACATGACAGGACCTATCGTTG  
 AGGTTTCTAAGACTTACTATGGGCTGTAAACCTGTTTTTAAACTATTTTAGAAACCTGAGACTTGCCG  
 TCTGGCATTTTAGTTTAAATACAAACTAATGATTGCATTTGAAAGAGATTCTTGACCTTATTTCTAAACGT  
 CTAGAGCTCTGAAATGTCTTGATGGAAGGTATTAACCTATTTGCCTGTTGTACAAAGAAATGTTAAGACT  
 CGTGAAGAAGAACTACTATAAGGTACTGTGAAATAACTGCGATTTTGTGAGCAAAACATACTTGAAATGC  
 TGATTGATTTTTATGCTTGTAGTGTATTGCAAGAAACACAGAAAATGTAGTTTTGTTTTAATAAACCAA  
 AAATTGAACATACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

**Abb. A1.4: cDNA-Basenabfolge von GPAM-Transkript 2**

Die mRNA des GPAM-Transkripts Nummer 2 (NM\_020918.5) wird zum Protein (NP\_065969.3) mit einer Molekülgröße von 828 aa (93,8 kDa) translatiert. Variante 1 und 2 codieren für dasselbe Protein.

Verwendete siRNAs für den Knockdown sind farbig markiert:

blau = Oligo-A HSS126649; rot = Oligo-B HSS126650; grün = Oligo-C HSS126651;  
 orange = Oligo-D S33575; türkis= Oligo-E S224483 und lila = Oligo-F S224484

**Tab. A1.2: Basenabfolge und Bestellnummer der GPAM-siRNAs**

GPAM	Bestellnummer	siRNA Sequenz	cDNA (U=T)
A	HSS126649	GGAGCAAGCGUUGUUACCAGCUAUA	GGAGCAAGCGTTGTTACCAGCTATA
B	HSS126650	GAGGCCAUCAUAGCUUGCAGCCUUU	GAGGCCATCATAGCTTGACGCCTTT
C	HSS126651	GAGGAACAGCGAGAUUGCUACCUA	GAGGAACAGCGAGATTGCTACCTGA
D	S33575	GGCAUAGUUGAAUUACUtt	GGCATATAGTTGAATTACTtt
E	S224483	GAGGUGUUUUAGAAUGUUtt	GAGGTGTTATTAGTTTGTtt
F	S224484	GUAGGAAAGUUUUAUCCAGUtt	GTAGGAAAGTTTATCCAGTtt

>gi|153218549|ref|NM\_019593.3| Homo sapiens glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog (S. cerevisiae) (GPCPD1), mRNA  
AGTTTGGTCTGGAGCAGCTGAAACCGGTTTTGAGCGTGGCTGCTTCTCGCCGCTCGACGCCGCGGCAGGCC  
GCCTGGGGGGAGCGCTGGCGAGGCACGGACGGCGGGCGCCCGGTACCTCTGCCCCGGTCCCTCGCTCTCG  
GGCGGGGCGGCGGCAGCGGACCTGCGGACTAGCGAACCCGGAGCAGCAGATCATAAAAATAAATCCATC  
AGAATGACACCTTCTCAGGTTGCGTTTGAATAAGAGGAACTCTTTTACCAGGAGAAGTTTTTGCATAT  
GTGGAAGCTGTGATGCTTTGGGAACTGGAATCCTCAAAATGCTGTGGCTCTTCTTCCAGAGAATGACAC  
AGGTGAAAGCATGCTATGGAAAGCAACCATTGTAAGTACTCAGTAGAGGAGTATCAGTTCAGTATCGCTACTTC  
AAAGGGTACTTTTTAGAACCAAAGACTATCGGTGGTCCATGTCAAGTGATAGTTCACAAGTGGGAGACTC  
ATCTACAACCACGATCAATAACCCCTTTAGAAA  
CGAAATTATTATTGACGATGGACAATTTGGAATCCA  
CAATGGTGTGAAACTCTGGATTCTGGATGGCTGACATGTGACTGAAATAAGATTACGTTTGCATTAT  
TCTGAAAAACCTCCTGTGTCAATAACCAAGAAAAAATTAATAAATCTAGATTTAGGGTGAAGCTGACAC  
TAGAAGGCCTGGAGGAAGATGACGATGATAGGGTATCTCCACTGTAAGTCCACAAAATGTCCAATAGCTT  
GGAGATATCCTTAATAAGCGACAATGAGTTCAGTGCAGGCATTACAGCCGGAGTGTGGTTATGGCTTG  
CAGCCTGATCGTTGGACAGAGTACAGCATAACAGACGATGGAACCAGATAAACCCTGGAACATACTTTGATT  
TTTTCGAAGAAGATCTCAGTGAGCACGTAGTTGAGGGTGTGCCCCTTCTGGACATGTGGGTACAGCTTG  
TCTCTTATCATCCACCATTGCTGAGAGTGGAAAGAGTGTGGAATTCTTACTCTTCCCATCATGAGCAGA  
AATTCGCGAAAACAATAGGCAAAGTGAGAGTTGACTATATAATTATTAAGCCATTACCAGGATACAGTT  
GTGACATGAAATCTTCATTTTCCAAGTATTGGAAGCCAAGAATACCATTGGATGTTGGCCATCGAGGTGC  
AGGAACTCTACAACAACCTGCCAGCTGGCTAAAGTTCAAGAAAATACTATTGCTTCTTTAAGAAAATGCT  
GCTAGTCATGGTGCAGCCTTTGTAGAATTTGACGTACACCTTTCAAAGGACTTTGTGCCCGTGGTATATC  
ATGATCTTACCTGTTGTTGACTATGAAAAAGAAAATTTGATGCTGATCCAGTTGAATTATTTGAAAATTC  
AGTAAAAGAATTAACATTTGACCAACTCCAGTTGTTAAAGCTCACTCATGTGACTGCACTGAAACTAAG  
GATCGGAAAGAATCTGTGGTTCAGGAGGAAAATTCCTTTTCAAGAAAATCAGCCATTTCTTCTTAAGA  
TGTTTTTAGAGTCTTTGCCAGAAGATGTAGGGTTAACATTGAAATAAAATGGATCTGCCAGCAAAGGGA  
TGGAATGTGGATGGTAACCTTATCAACATATTTTGCATGAATCTGTTTTTGGATATAATTTAAAAACT  
GTTTTAGAAAATTTGGAAGAGGAGAATAGTGTTTTCTTCAATTTGATGCAGATATTTGCACAATGGTTC  
GGCAAAGCAGAACAATATCCGATACTATTTTAACTCAAGGAAAATCTGAGATTTATCCTGAACTCAT  
GGACCTCAGATCTCGGACAACCCCCATTGCAATGAGCTTTGCACAGTTTGAATACTACTGGGATAAAT  
GTACATACTGAAGACTTGCTCAGAAACCCATCCTATATTCAAGAGGCAAAGCTAAGGGACTAGTCATAT  
TCTGCTGGGGTGTGATACCAATGATCCTGAAAACAGAAGGAAAATTTGAAGGAACTTGGAGTTAATGGTCT  
AATTTATGATAGGATATATGATTGGATGCCTGAACAACCAAATATATTCCAAGTGGAGCAATTGGAACGC  
CTGAAGCAGGAATTGCCAGAGCTTAAGAGCTGTTTGTGTCCCCTGTTAGCCGCTTTGTTCCCTCATCTT  
TGTGTGGGGAGTCTGATATCCATGTGGATGCCAACGGCATTGATAACGTGGAGAATGCTTAGTTTTTATT  
GCACAGAGGTCATTTTGGGGCGTGCACCGCTGTTCTGGGTATTCAATTTTTCATCACTGAGCATTGTTGA  
TCTATGCCTTTTGGGCTTCTCAGTTCAATGAAGCAATAATGAAGTATTTAACTCTTTCCTACAGTTCTT  
GCAAGTATGCTATTTAAATTAATTTGAGGATAAATTTGCCAGTCAGTCTCTTTATAGTGAGAAAATTTA  
TTGGTTAGTAATATAAATATTTTAACTAAATATATAAATCTATAATGTTAAACATATGTTTCAATTTAAAG  
CATAGCACTTTGAAATTAATATATAAATAGCTCATATTTACACTTACAGCTTTTCAATTTGATCAGGTCT  
GAAATCTTTAGCACTTAAGGAAAATGACTATGCATAATTATACCTGACCATGAAAAAATAAGTACCTCA  
AATGCATGCATTTGCACTGGTGAATCCAACCTGCACAAATCTTTGTGCCATCTTGTATATAGGTATTTTTT  
ACATGGGTTGACATGCACACAACACCATTTTCATTCAGTATGAACCTTGGAGGCTGCTGCCATTTTCCAC  
TTAACCAAACCAGCCTGAAGGTGAACCTCGAACTTGTTCATAAATCTTTCAAAGTTGTTTTACATCA  
ATGTTAAAATTTCAAATGCTGCAGGGTAATTTAATGTATAAATAATTAGTAAGAAAAAGTATGTATTGC  
ATACTTAGTAGAATAGATCACAACATACAAATTCAAATTCAGTGCATGCTTTAGGTGTTAAGCATGAGATT  
GTACATGTTTACTGTTAGGTCCTTGCATCTGTGGTGTAGGTGAGTATGAGAAGATGTCAAGGACTGGAC  
GTATTTTGTGCTTAAAAAAGGCTGTTTGTAGGCGTTTTAAATATGCTTATTTTGTGTGCTCTCA  
CTACCTATTACACTGTTGCTTTGTGGGTTTGTGTTTGTATGTGCGTGTGTTATACAGTAGTTAAATTT  
CATGCAGAAAAATAAATGTCTGAATTTTCATATTAGTATTCTTTATTGTATATCATGCATGTAATTTAT  
TTAGAAATGTAGGTCTTACTAAATGTATATGCATGTATTTAGATTATACTAGGATTTCTTGGATTAGAA  
GCAGATTGTGTTAACTGTAACCTAAAGAATGAATGTTAAATAAATGATACAGATTTATTTTCTTCATTA  
CAAAATGAAATTTCAAGAAGGTGTTACTTTTGTAGAATGGTTTTATAATATGACAAGAAAATTTAATATA  
GTGTCTACCCTAAAGGGATGGCTTATTTGCATCTACCTTTTACTGCATGTTTTTCAACAAGGCAGTTTAT  
CATATATTGACATATTTTGGTAGTAGCTGAGAACCTAAGACTTGAATTTATACATTGTGTAGTATTTTTT  
AAGCTAAGCAATGCAATTTTGGTCAGATCTTATTTGTGTGAAGATAGGCTCTGAAATCCTATGGTATTGC

GTTTGTAAACGTTGATATTAATGCAAAATAGTTTAGGAAATGGAGTCTTCTGCAAGGGTTCTGTATACTTT  
TCCCACATTGTATGAGATTTTCCAAAATTTTGGTGTGAATTGGGCACTTTTGGAAAACTCCTGAAAAAGA  
ATTAGTTTCCTTCATCTGCAGACCTTTGTCCAATACGGTTACCATTTCTTTATAGTAACTCGATTAGCCA  
TATATGTTTGTCTAGTCCTGCTCCTTTGCTCCTCTCCTATGCCTTCCCAGTGCTGGCTCCATTTTGAA  
GACTCAAGGACAGAGGGGAAGCAGATCATAAAGAGAAAAAGGAGACAGAAGAAAGGATGAAGGAAGGAGG  
TCATGGGGAGTGTGGCTTCTGAGCAGTTTAGTTGCTGGGGAGAGCAGACAGTCACTGCCTACAATACAGA  
CAGAACCTTCTGCTCACTTTCTGTCTATCTCTTCTGACCTTATGAACCAGTGTTAGTAGATGATTAA  
AACATGACAAGCAATGGCTCCTTATTTTACAGGACTAAGTCCGGGCTTCGTATCACTAGCTGTTGCCT  
TTTACACCCTGCTTCAGCCACCCTGTCCCTGTCAATTGGCCCTGGACTTCTCTCTGTGCCCGTGTGTCT  
CTGCCTGGGAGCCCTCTCCTCCCATAGTCACTTTCTCTCTGCCAAACTCATTTCTTCTTGTGCCCAAGAC  
CTCTCTCCTGAGCCCTTGTGGAACTTCCAGGAAGGATGAATCCGCTTTTGTGCTCCACGGCTCGTACCTT  
GATCAGGCTGTGCATCACAGTAATTCTGTTCTAGGTAGGCAGAGTTGATCTTTGTCTCATCTGCCAGGCT  
GCAGGCTCTTCAAGGGCAGGGACCTTGTCCATAGTCATTTTTATTTTACAGTGCTTGGAAATGGTGGAA  
AATGAATGTTGGAATTATTGGAGTAATATAATTTGTATCAAATGTCCTTTTGAATTAAGAGATTTAGTTA  
TGTTTACTAAGAATGTAACTTTGAATTGGTTTGCATTTTAAACAATTAGGATGGTTTATTGATGTGAATT  
TTGAAATGTAGAGGTATAATGTTAAATTATTTTATACTTTATGGAAATCAAGTGAAATGTTTGGAAAAAT  
GCCGCCATTATCCTCTGGTATTTTCTACTCTCTGGAATTATGTGCTGTAAATGATCGGCTGTAAATGTGA  
GGCACACCACCCACCCCTGTGTGGAAAGTGTGTGGCGCTTCTGCCACCCACCCACCTCTCTGCCGTTG  
CTCCTTGTGACACTTGTCTGTCTCCATCCAACTCCAAGCTTACAGCTACCTCAGTACTGCTTTGC  
TTGTCTGAAACACCTCCTTTGCCTTCTTCCAGTGTCCCGCTCAGGTGCAGCCTCCTCCCTAAAGCTCATC  
TCAGCTTTTGTATCTGAATGATGATGGAAACATGCAGACAGCCTCTCAGTCTTACTATTTAATGTTGTAGC  
TGGGAAAAAACCCAGAGAGGTTAACTGATATACTGGGTTGGGACTAGGATGTGGGTTTTGTGACTCTGAA  
TCCCATGTTCTCAAACCTACGCTGCCTTCCGAAGTCTGGCATTGTTAGCTCATGCTTCTTGTAGTCCAG  
CTTCTTATGTGCCTGTTATATTCTCCAGTAAGATTGTAAGCCCCCTTAAGGGCAGGGACGTCTTGCATCT  
CTAGCACTGCTATAGTGTCTATCCTTAGTTATGAACTAGATAAATAAATGGTGGTGGCAACAATCCTAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Abb. A1.5: cDNA-Basenabfolge von EDI3 (GPCPD1)**

Die mRNA der Glycerophosphocholin Phosphodiesterase GPCPD1 (EDI3; NM\_019593.3) wird zum Protein NP\_062539.1 mit einer Molekülgröße von 672 aa (76 kDa) translatiert.

Verwendete siRNAs für den Knockdown sind farbig markiert: rot = Oligo-A HSS125509; blau = Oligo-B HSS125510; grün = Oligo-C HSS183474; orange = Oligo-D 4392420-s32104; türkis= Oligo-E 4392420-s32105 und lila = Oligo-F 4392420-s32106

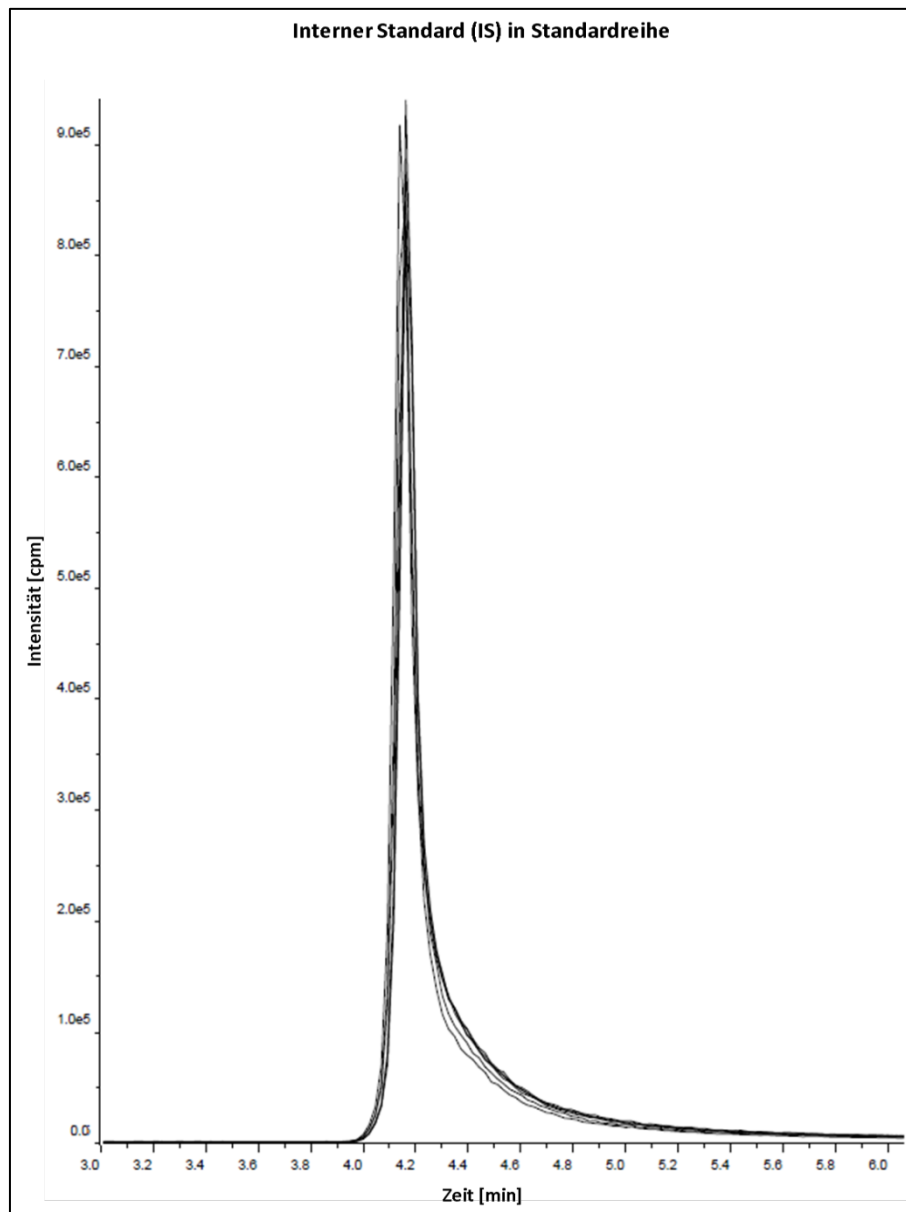
**Tab. A1.3: Basenabfolge und Bestellnummer der EDI3-siRNAs**

EDI3	Bestellnummer	siRNA Sequenz	cDNA (U=T)
A	HSS125509	G GCAAAGUGAGAGUUGACUAUUA	GGCAAAGTGAGAGTTGACTATATAA
B	HSS125510	GUCACUCAUGUGACUGACUGAAA	GCTCACTCATGTGACTGCACTGAAA
C	HSS183474	GACACCUUCUCAGGUUGCCUUUGAA	GACACCTTCTCAGGTTGCCCTTGAA
D	4392420-s32104	CGAAUUUAUUUUGACGAUtt	CGAAATTATTATTGACGAtt
E	4392420-s32105	GGAUGGUAACUUAUCAACAtt	GGATGGTAACTTATCAACAtt
F	4392420-s32106	GCGAAUUUAUUUUGACGct	GCGAAATTATTATTGACGct

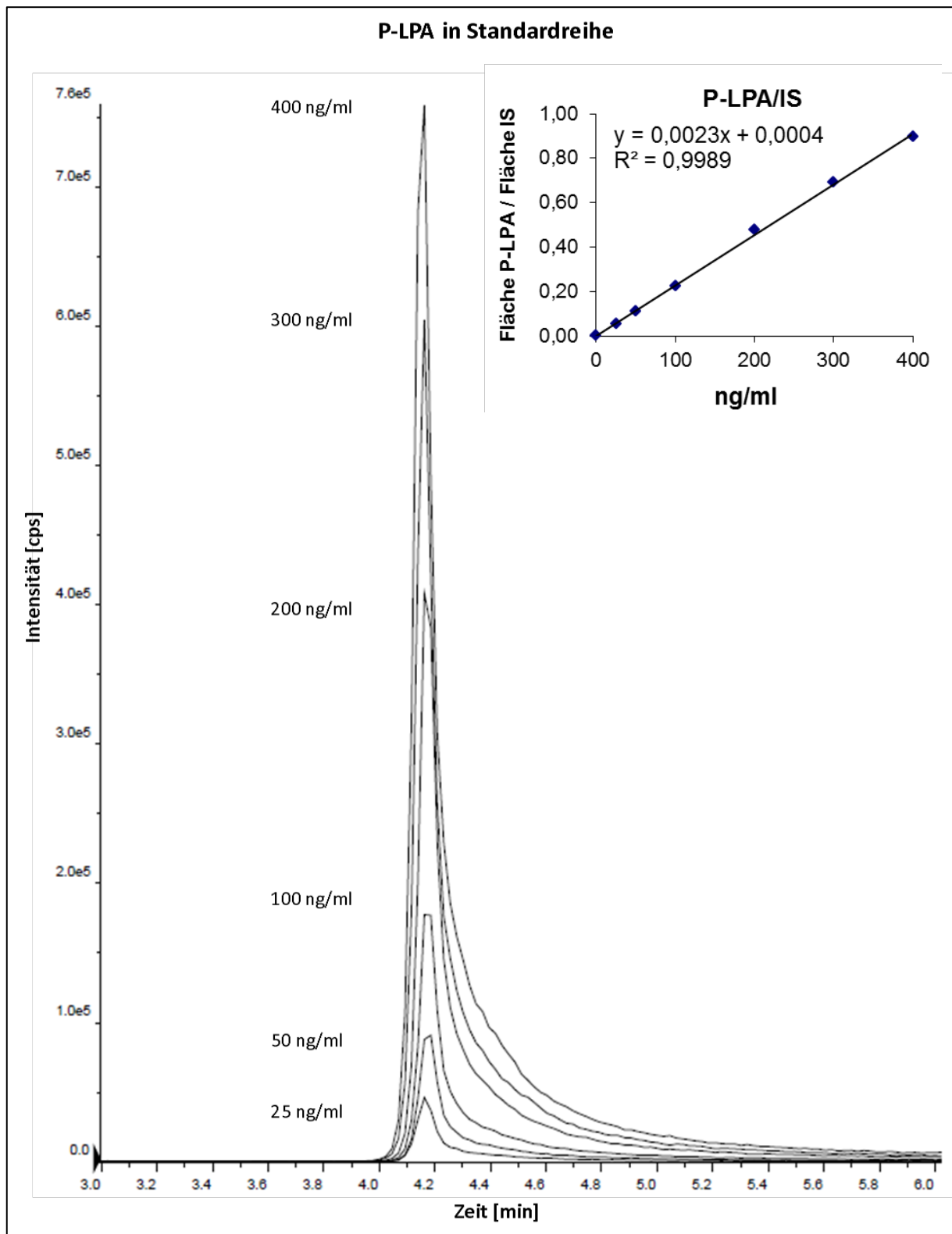


## A2 Standardreihen für die massenspektrometrischen Bestimmungen

Im Folgenden sind exemplarisch Standardreihen für die Bestimmung von 1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure (O-LPA) und 1-Palmitoyl-Lysophosphatidsäure (P-LPA) aufgeführt. Alle Proben und Standardreihen enthielten 250 ng/ml 1-(cis-9-Heptadecenoyl)-Lysophosphatidsäure (H-LPA) als internen Standard (IS).

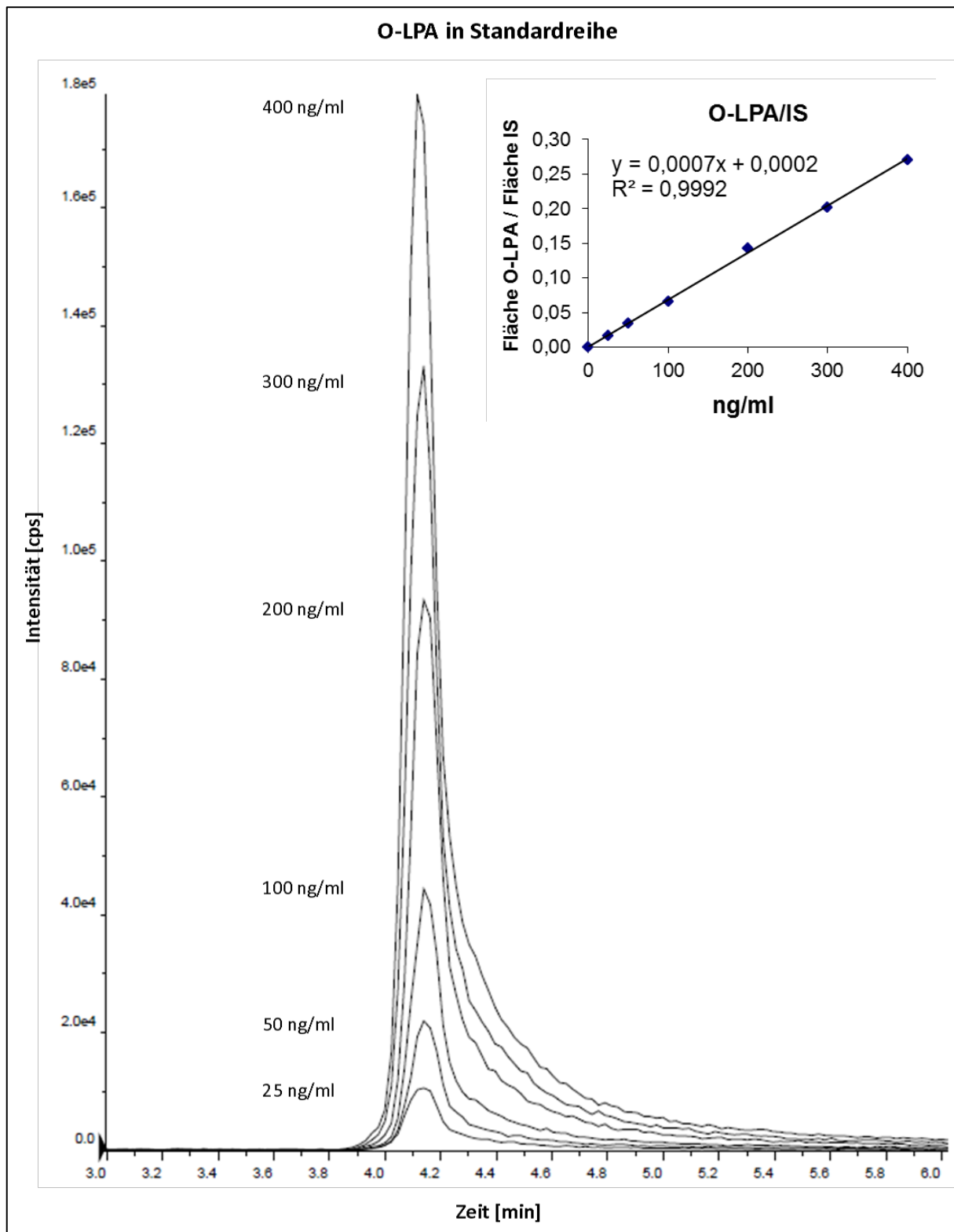


**Abb. A2.1: Massen-Chromatogramm des internen Standards in einer Standardreihe**  
Chromatogramm des H-LPA-Produktions mit dem Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  152; Peakfläche entspricht 250 ng/ml H-LPA, Überlagerung der Einzelpeaks von H-LPA mit einer Retentionszeit von 4 min 16 sec zeigt robuste Detektion des internen Standards.



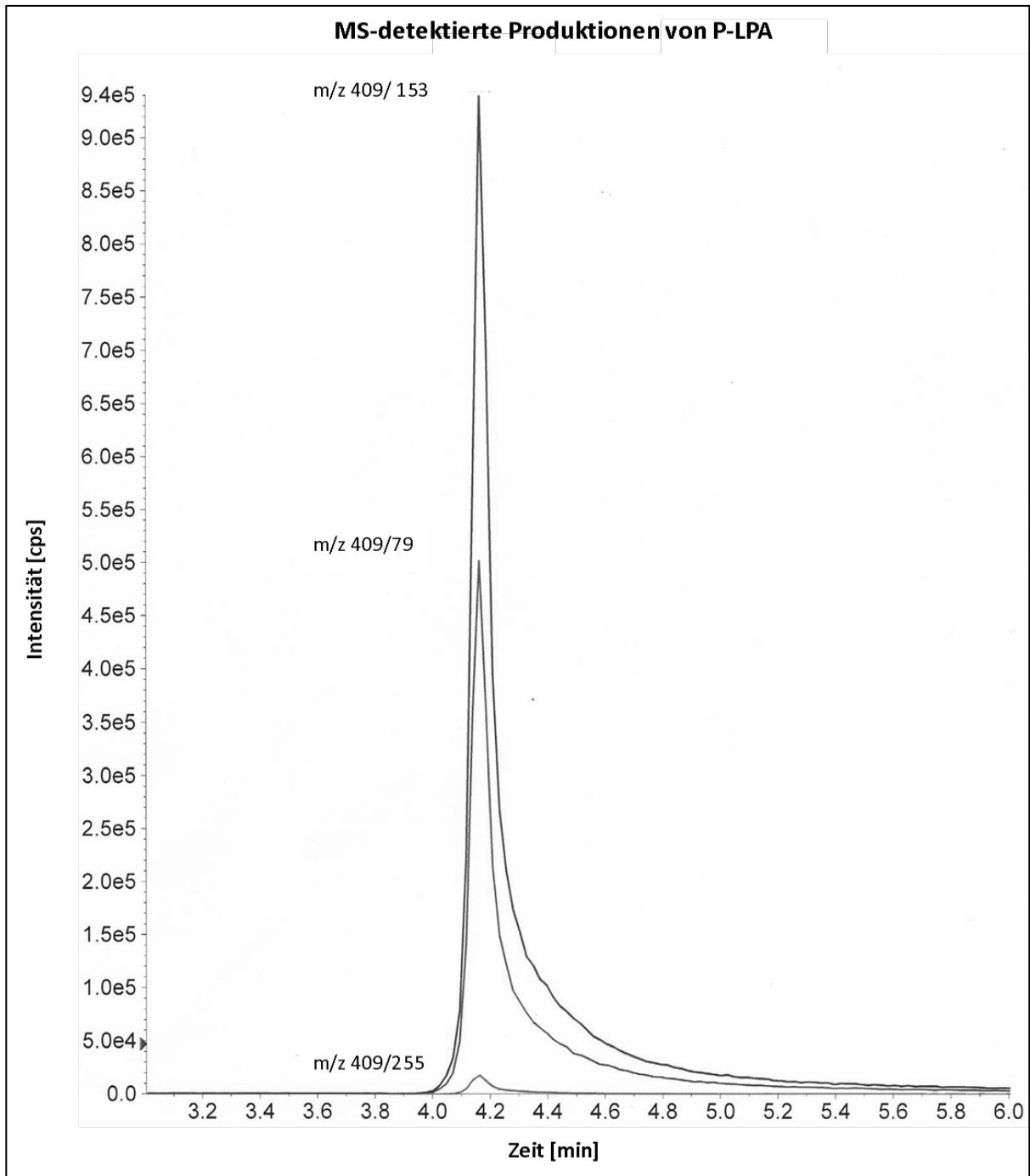
**Abb. A2.2: Massen-Chromatogramm von P-LPA in einer Standardreihe**

Überlagerung der Einzelpeaks des P-LPA-Produktions für die Quantifizierung in einer Standardreihe mit einer Retentionszeit von 4,17 sec und dem Massen/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  153 (Glycerophosphat). Die Kalibriergerade ist oben rechts angegeben.



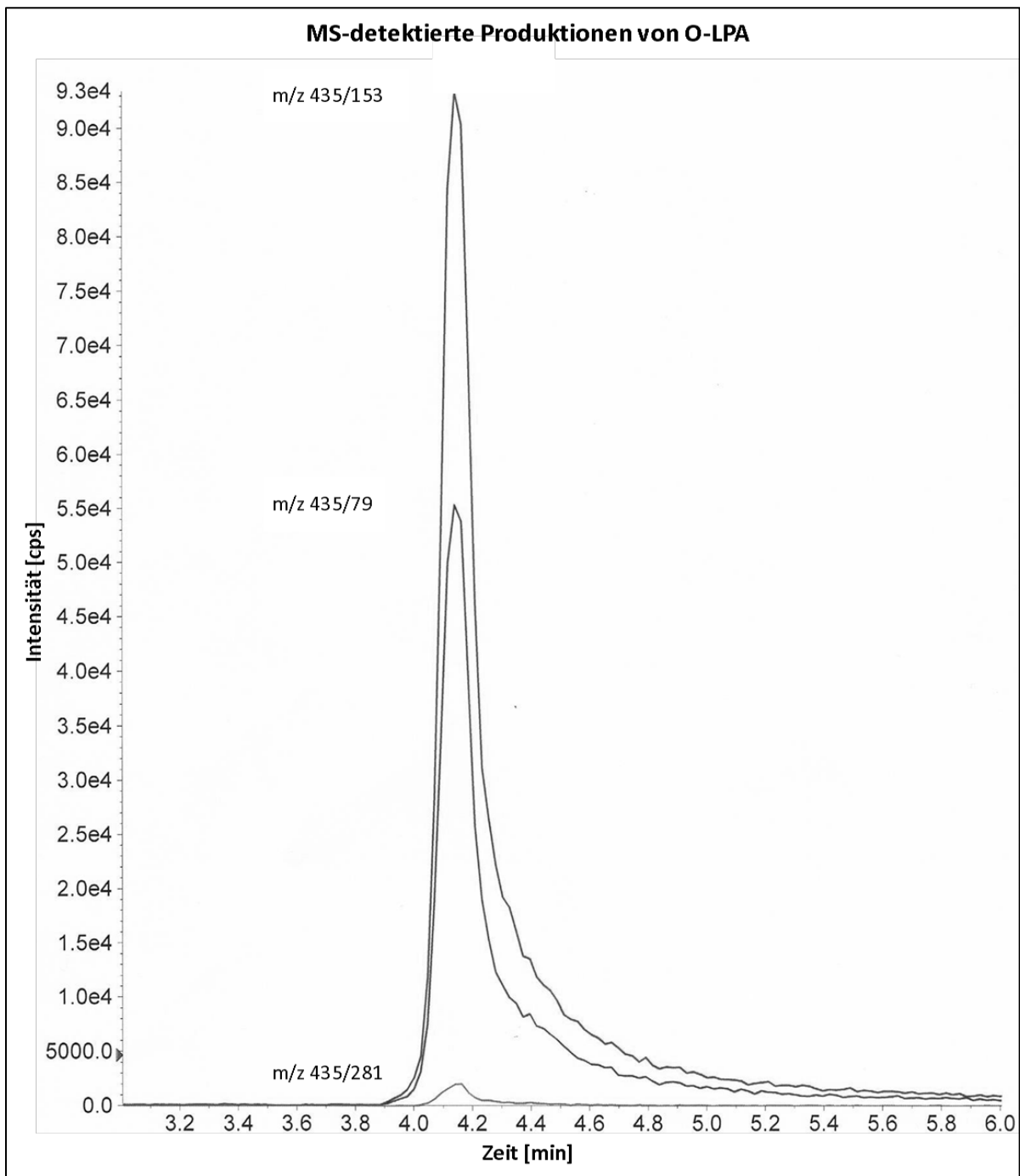
**Abb. A2.3: Massen-Chromatogramm von O-LPA in einer Standardreihe**

Überlagerung der Einzelpeaks des O-LPA-Produktions für die Quantifizierung in einer Standardreihe mit einer Retentionszeit von 4,14 sec und dem Massen/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  153 (Glycerophosphat). Die Kalibriergerade ist oben rechts angegeben.



**Abb. A2.4: Massen-Chromatogramm von P-LPA**

Überlagerung der Einzelpeaks der drei Produktionen von P-LPA mit einer Retentionszeit von 4,17 sec und den Massen/Ladungs-Verhältnissen: m/z 255 (Palmitinsäure), m/z 153(Glycerophosphat) und m/z 78,9 (Phosphation). Das Ion mit m/z 153 diente der Quantifizierung.



**Abb. A2.5: Massen-Chromatogramm von O-LPA**

Überlagerung der Einzelpeaks der drei Produktionen von O-LPA mit einer Retentionszeit von 4,14 sec und den Massen-Ladungsverhältnissen: m/z 281,2 (Ölsäure); m/z 153 (Glycerophosphat) und m/z 78,9 (Phosphation). Das Ion mit m/z 153 diente der Quantifizierung.

### A3 Intrazelluläre LPA-Konzentrationen

In der Tabelle A3 sind alle mit LC-MS/MS gemessenen LPA-Konzentrationen der einzelnen biologischen Replikate in aMol/Zelle aufgelistet. Jeder Messwert der einzelnen Experimente (Exp. 1-6) ist ein Mittelwert aller technischen Replikate der Extraktion. Die Massenspektrometrie wurde jeweils zweimal durchgeführt und die Messwerte wurden anschließend gemittelt. Fünf von sechs biologischen Replikaten für GPAM zeigen eine Reduktion der intrazellulären P-LPA und O-LPA-Konzentration (Tabelle. A3.1).

Drei von vier biologischen Replikaten für EDI3 zeigen eine deutliche Reduktion der intrazellulären P-LPA und O-LPA-Konzentration, ein Versuch eine Erhöhung.

Der CHKA-Knockdown zeigte für P-LPA in zwei aus vier Experimenten eine Erhöhung um bis zu 25 %. In den beiden anderen wurde eine Reduktion der LPA-Konzentration um bis zu 25 % beobachtet. Für O-LPA war eine Erhöhung bis zu 35 % und eine Verringerung um maximal 10 % zu beobachten. Der GPAM-Kd reduziert LPA um 31,5-37 %. Beim EDI3-Kd ist LPA um 16-23,4 % reduziert.

**Tab. A3: LPA-Konzentrationen aller biologischen Replikate, gemessen mit LC-MS/MS**

Alle Werte [aMol/Zelle] der sechs biologischen Replikate (Exp. 1-6) sind auf die für die Extraktion verwendete Zellzahl normalisiert. Die Signifikanz wurde mit dem Einstichproben t-Test für die Verhältnisse der Behandlung zur jeweiligen Kontrolle (NEG für Knockdown-Experimente; MOC für Überexpressionsexperimente) für gepaarte Proben mit der Software SASS ermittelt. Für GPAM- und EDI3-Knockdown wurde einseitig getestet, für CHKA-Knockdown zweiseitig. p-Werte  $\leq 0,1$  sind hellgrün unterlegt. p-Werte  $\leq 0,05$  sind dunkelgrün unterlegt.

Probe	Mittelwert der Änderung der P-LPA Konz. gegenüber Kontrolle in %	STABW in % der P-LPA Konzentrationsänderungen	p-Wert	Mittelwert P-LPA [aMol/Zelle]	STABW	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
NEG				2,90	1,13	4,85	1,65	2,55	3,34	2,96	2,03
EDI3-Kd	-15,86	35,05	T-Test 1seitig = 0,087	2,17	0,53			1,91	2,50	1,56	2,73
GPAM-Kd	-37,34	28,51	T-Test 1seitig = 0,0622	1,63	0,64	1,05	1,05	2,73	1,96	1,44	1,57
CHKA-Kd	-2,56	24,43	T-Test 2seitig = 0,318	2,63	0,82			1,91	3,80	2,32	2,49
pCMV6				2,90	1,87		0,88	5,97	2,40	2,38	2,84
GPAM-OE	61,04	77,44	T-Test = 1seitig = 0,0491	3,80	1,30		2,61	5,86	3,37	2,92	4,23
Probe	Mittelwert der Änderung der O-LPA Konz. gegenüber Kontrolle in %	STABW in % der O-LPA Konzentrationsänderungen	p-Wert	Mittelwert O-LPA [aMol/Zelle]	STABW	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
NEG				21,04	9,99	39,71	10,16	17,29	16,84	20,96	21,30
EDI3-Kd	-23,39	14,07	T-Test 1seitig = 0,0635	17,37	7,06			13,47	15,15	12,98	27,87
GPAM-Kd	-31,51	32,29	T-Test 1seitig = 0,194	12,73	5,13	9,76	6,97	21,44	10,76	11,74	15,74
CHKA-Kd	11,88	25,30	T-Test 2seitig = 0,6782	21,33	5,38			15,76	22,79	18,62	28,15
pCMV6				21,73	11,45		6,23	32,89	14,61	22,81	32,13
GPAM-OE	48,93	56,76	T-Test 1seitig = 0,0491	29,09	15,06		15,17	51,82	18,70	23,28	36,49

## A4 Metabolische Veränderungen gemessen mit NMR-Spektroskopie

In Tabelle A4 sind alle Veränderungen der Metabolitenkonzentrationen in Zellextrakten von MCF7-Zellen mit Knockdownbehandlung gemessen mit NMR-Spektroskopie im Vergleich zur Kontrollbehandlung aufgeführt. Es sind alle Messwerte der einzelnen drei biologischen Replikate (Exp. 1-3) aufgeführt, in  $\mu\text{Mol/l}$  normalisiert auf die Konzentration an NTPs in  $\mu\text{Mol/l}$ , sowie die Mittelwerte berechnet nach:

Mittelwert der  $\sum \text{Konz}_{\text{Metabolit Exp1}}/\text{Konz}_{\text{NTP Exp1}}; \text{Konz}_{\text{Metabolit Exp2}}/\text{Konz}_{\text{NTP Exp2}}; \text{Konz}_{\text{Metabolit Exp3}}/\text{Konz}_{\text{NTP Exp3}}$ .

Des Weiteren sind die mittleren prozentualen Veränderungen der Metaboliten im Vergleich zur NEG-Kontrolle angegeben und bei Signifikanz grün unterlegt. Dazu wurden zunächst die prozentualen Veränderungen der einzelnen biologischen Replikate berechnet, anschließend gemittelt und als Veränderung gegenüber 100 % angegeben:

$100 - \text{Mittelwert}_{\text{Kd}} (\text{Konz}_{\text{NEG Exp1}}/\text{Konz}_{\text{Kd Exp1}}; \text{Konz}_{\text{NEG Exp2}}/\text{Konz}_{\text{Kd Exp2}}; \text{Konz}_{\text{NEG Exp3}}/\text{Konz}_{\text{Kd Exp3}}) * 100$ .

Die Signifikanz der beobachteten Veränderungen wurde mit dem Student-t-Test für gepaarte Stichproben in der Software SAS/STAT, Version 9.4 in Zusammenarbeit mit der Statistikerin Dr. rer. nat. Silvia Selinski der Abteilungen Systemtoxikologie und Arbeitsmedizin am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund ermittelt.

**Tab. A4: Metabolische Veränderungen bei Knockdown von GPAM, EDI3 und CHKA**

**Legende:** Metabolit gemessen in CD3OD/CDCI3 1:2; Metabolit gemessen in D2O; NEG Kontrolle; EDI3-Kd; GPAM-Kd; CHKA-Kd;  
 Mittelwert aus drei biologischen Replikaten; signifikant P-Wert ≤ 0,05; signifikant P-Wert ≤ 0,005; signifikant P-Wert ≤ 0,0005

Konzentrationen der Metaboliten in µmol/l normalisiert auf NTP in µmol/l				
Metabolit	Knockdown des jeweiligen Enzyms			
	NEG	EDI3	GPAM	CHKA
GPC	5,76	40,58	5,68	11,06
GPC	5,30	36,13	5,35	10,87
GPC	3,91	25,11	4,20	6,73
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	4,99	<b>33,94</b>	<b>5,08</b>	<b>9,55</b>
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3 600% > NEG	GPAM = NEG	CHKA 90% > NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		<b>0,0001</b>	0,7629	<b>0,0032</b>
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		<b>0,0002</b>	<b>0,4741</b>	<b>0,0064</b>
GPEA	8,13	40,96	7,53	11,87
GPEA	10,74	22,26	10,29	11,94
GPEA	9,13	<b>14,26</b>	9,78	8,46
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	9,33	<b>25,82</b>	<b>9,20</b>	<b>10,76</b>
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3 283% > NEG	GPAM = NEG	CHKA 28% > NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		0,0593	0,6312	0,2057
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		<b>0,1187</b>	<b>0,7376</b>	<b>0,4113</b>
G3P	55,80	33,67	68,31	63,30
G3P	52,07	31,23	62,35	60,65
G3P	33,26	14,04	43,04	36,92
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	47,05	<b>26,31</b>	<b>57,90</b>	<b>53,62</b>
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3 44% < NEG	GPAM 24,6% > NEG	CHKA 14,5% > NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		<b>0,0169</b>	<b>0,0057</b>	<b>0,0058</b>
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		<b>0,0338</b>	<b>0,0115</b>	<b>0,0117</b>
Cho	3,17	0,92	4,35	4,96
Cho	3,33	1,06	4,47	5,23
Cho	1,74	0,74	3,70	3,33
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	2,75	<b>0,91</b>	<b>4,17</b>	<b>4,51</b>
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3 63,7% < NEG	GPAM 62,9% > NEG	CHKA 69,8% > NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		<b>0,0056</b>	<b>0,0467</b>	<b>0,0081</b>
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		<b>0,0112</b>	0,0934	<b>0,0162</b>
Pcho	48,29	46,83	53,25	9,74
Pcho	44,93	43,74	51,76	10,23
Pcho	<b>23,48</b>	35,11	40,87	6,15
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	38,90	<b>41,89</b>	<b>48,63</b>	<b>8,71</b>
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3= NEG	GPAM = NEG	CHKA 76,7% < NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		0,2539	0,8947	<b>0,0013</b>
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		<b>0,5077</b>	<b>0,2105</b>	<b>0,0026</b>
GPC/Pcho	0,12	0,87	0,11	1,13
GPC/Pcho	0,12	0,83	0,10	1,06
GPC/Pcho	0,17	0,72	0,10	1,09
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	0,13	0,80	0,10	1,10
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3 516% > NEG	GPAM = NEG	CHKA 732,5% > NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		<b>0,0046</b>	0,0933	<b>0,0016</b>
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		<b>0,0091</b>	<b>0,1866</b>	<b>0,0032</b>



Konzentrationen der Metaboliten in $\mu\text{mol/l}$ normalisiert auf NTP in $\mu\text{mol/l}$				
Metabolit	Knockdown des jeweiligen Enzyms			
	NEG	EDI3	GPAM	CHKA
LAC	30,22	47,60	30,95	71,15
LAC	30,41	44,13	31,12	67,16
LAC	28,70	31,49	19,35	20,96
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	29,77	41,07	27,14	53,09
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3 38% > NEG	GPAM = NEG	CHKA 77% > NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		0,0537	0,2466	0,1812
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		<b>0,1074</b>	<b>0,4932</b>	<b>0,3624</b>
ALA	48,62	70,06	51,39	74,72
ALA	45,96	63,45	49,12	74,13
ALA	65,65	75,53	79,57	65,19
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	53,41	69,68	60,03	71,35
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3 37,1% > NEG	GPAM = NEG	CHKA 39% > NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		<b>0,0286</b>	0,0699	0,0955
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		0,0572	<b>0,1398</b>	<b>0,1910</b>
alfa-D-Glucose	0,96	1,08	0,99	1,07
alfa-D-Glucose	0,81	0,87	0,91	0,94
alfa-D-Glucose	1,35	3,43	3,67	3,12
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	1,04	1,79	1,86	1,71
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3= NEG	GPAM = NEG	CHKA = NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		0,1565	0,1712	0,1315
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		<b>0,3129</b>	<b>0,3424</b>	<b>0,2629</b>
PhtdCho	43,30	33,30	39,10	41,40
PhtdCho	44,20	32,75	43,40	42,45
PhtdCho	45,40	39,00	44,10	42,10
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	44,30	35,02	42,20	41,98
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3 21% < NEG	GPAM 4,8% < NEG	CHKA 5,2% < NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		<b>0,0165</b>	0,0995	<b>0,0199</b>
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		<b>0,0331</b>	<b>0,1990</b>	<b>0,0398</b>
TG	9,07	6,50	4,44	5,74
TG	9,16	4,09	5,94	5,48
TG	8,41	3,80	6,21	5,63
Mittelwert aus drei biologischen Replikaten	8,88	4,80	5,53	5,62
Veränderung in % gegenüber NEG		EDI3 46,2% < NEG	GPAM 37,5% < NEG	CHKA 36,7% < NEG
einseitiger t-Test gepaart Kd/NEG		<b>0,0269</b>	<b>0,0288</b>	<b>0,0025</b>
zweiseitiger t-Test Verhältnis Kd/NEG		0,0537	0,0576	<b>0,0050</b>

## **A5 Medium bei Experimenten zur Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten**

Das für die Kultivierung verwendete Komplettmedium, sowie die Mischung im Knockdown-Versuch enthalten kein PCho, GPC, PEA oder Ethanolamin; wie mit  $^1\text{H},^1\text{H}$ -2D-TOCSY-NMR-Spektren durch Dr. Lambert am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften (ISAS) nachgewiesen. Die CholinKonzentration im DMEM-Medium beträgt, laut PanBiotec-Herstellerangaben 4 mg/l Cholinchlorid (28,7  $\mu\text{Mol/l}$ ) und ist damit etwa doppelt so hoch wie die bekannte Plasmakonzentration in gesunden Menschen von etwa 10-13  $\mu\text{Mol/l}$  [Adamczyk et al., 2006] und <http://www.nap.edu/catalog/6015.html> 2015}. Neben den genannten Substanzen sind noch Pyruvat, Glutamat, Glucose (alfa-D/beta-D), Valin, Leucin, Isoleucin, Alanin, Arginin und Lactat im DMEM-Medium enthalten. Die Lactat-Konzentration im Medium ist mit 555  $\mu\text{Mol/l}$  etwa 4,4mal so hoch wie die intrazelluläre Konzentration (durchschnittlich 124  $\mu\text{Mol/l}$  gemessen mit  $^1\text{H}$  NMR in  $\text{D}_2\text{O}$  gelösten Zellextrakten). Die Zusammensetzung des Mediums, ohne weitere Zusätze, ist unten tabellarisch aufgeführt. Dem Medium wurden noch 10 vol% FCS (Sera Plus), 1 vol% Natriumpyruvat (100 mM), 1 vol% NEAA (siehe Tabelle 2) und 0,1 vol% Insulin zugesetzt.

Tab. A5.1: Mediumkomponenten im verwendeten DMEM-Medium

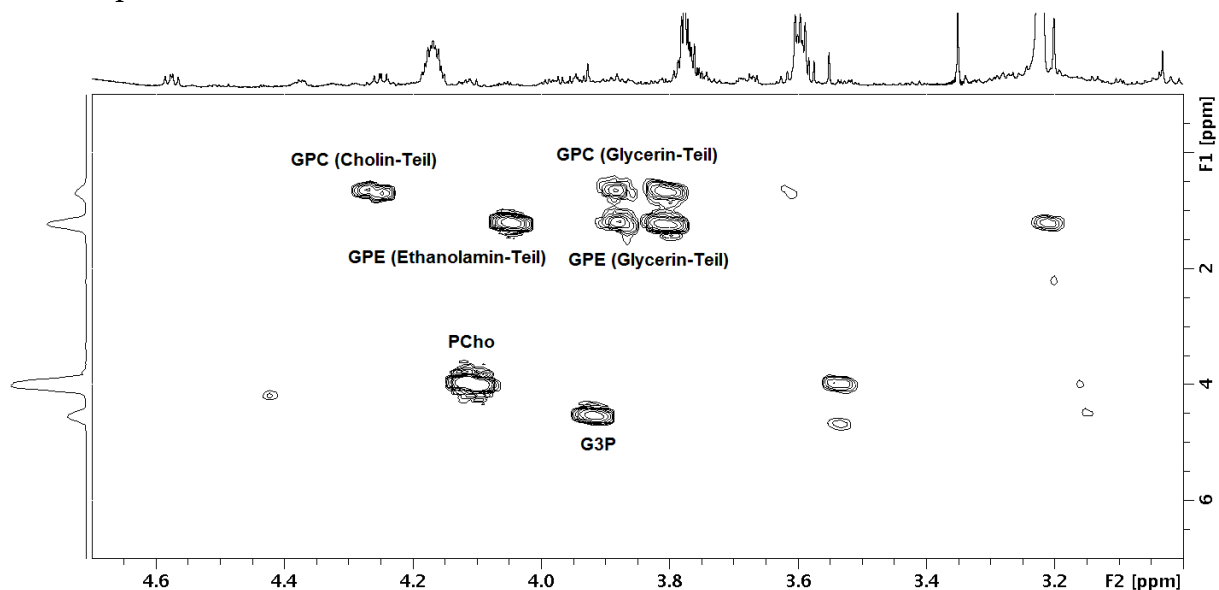
DMEM w: 4.5 g/l Glucose, stabiles Glutamin, SodiumPyruvat, 3,7g/L NaHCO <sub>3</sub>	
Salze, Puffer und andere Zusätze	Konzentration
Calcium chlorid-Anhydrat	200 mg/l
Eisen(III) Nitrat x 9H <sub>2</sub> O	0,1 mg/l
Magnesiumsulfat	97,66 mg/l
Kaliumchlorid	400 mg/l
Natriumchlorid	6400 mg/l
Natriumdihydrogenphosphat	108,69 mg/l
D(+)-Glucose Anhydrat	4500 mg/l
HEPES	0 mg/l
Natriumpyruvate	0 mg/l
Phenolrot	15 mg/l
Natriumhydrogencarbonat	3,7 g/l
Aminosäuren	Konzentration
L-Arginin x HCl	84 mg/l
L-Cystein x 2HCl	62,58 mg/l
L-Glutamin	870 mg/l
Glycin	30 mg/l
L-Histidin x HCl x H <sub>2</sub> O	42 mg/l
L-Isoleucin	104,8 mg/l
L-Leucin	104,8 mg/l
L-Lysin x HCl	146,2 mg/l
L-Methionin	30 mg/l
L-Phenylalanin	66 mg/l
L-Serin	42 mg/l
L-Threonin	95,2 mg/l
L-Tryptophan	16 mg/l
L-Tyrosin x 2Na	103,79 mg/l
D-Valin	93,6 mg/l
Vitamine	Konzentration
D-Calcium pantothenat	4 mg/l
Cholinechlorid	4 mg/l
Folsäure	4 mg/l
i-Inositol	7 mg/l
Nicotinamid	4 mg/l
Pyridoxin HCL	4 mg/l
Riboflavin	0,4 mg/l
Thiamin x HCl	4 mg/l

Tab. A5.2: Zusammensetzung der zum Medium zugesetzten Aminosäurelösung

Aminosäurelösung NEAA (Gibco) Katalognummer 11140		
Komponente	Konzentration (mg/l)	mM
Glycin	750	10
L-Alanin	890	10
L-Asparagin	1320	10
L-Asparaginsäure	1330	10
L-Glutaminsäure	1470	10
L-Prolin	1150	10
L-Serin	1050	10

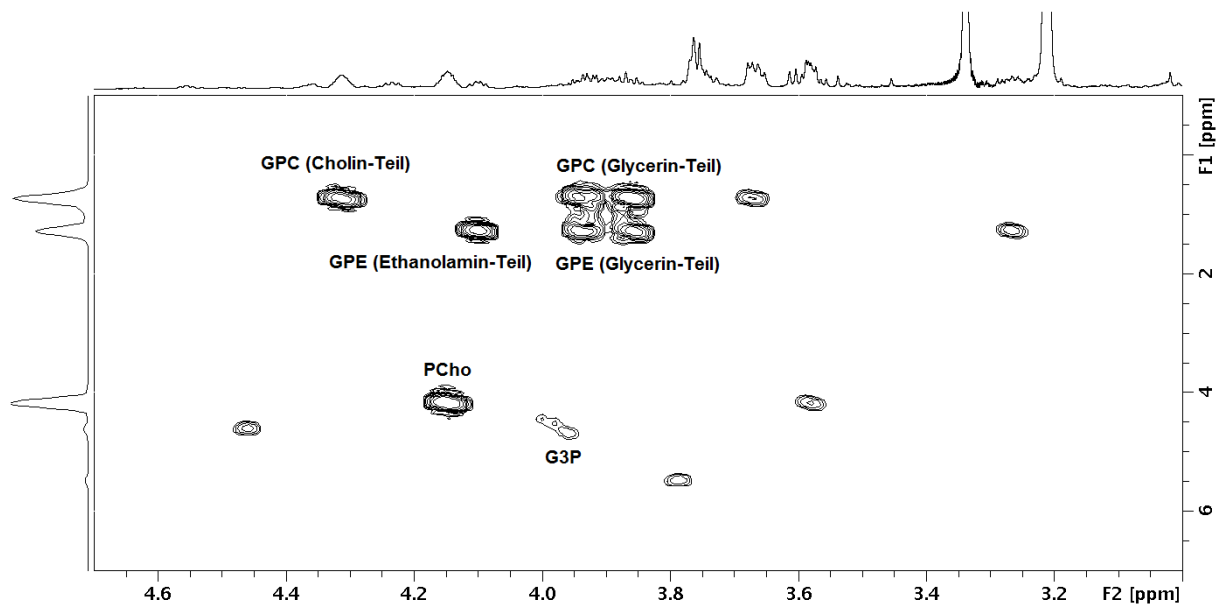
## A6 $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -2D-Spektren zur Identifizierung der Metaboliten

Die folgenden vier Abbildungen veranschaulichen anhand zweidimensionaler  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -HMBC-Spektren die eindeutige Identifizierung der Metabolitensignale. Abgebildet sind die Spektren für die Kontrollbehandlung (NEG) und für die Knockdown-Proben (EDI3-Kd, GPAM-Kd und CHKA-Kd). Der getrocknete Zellextrakt wurde in deuteriertem Wasser aufgenommen und mittels NMR-Spektroskopie (Bruker, 600 MHz-NMR-Spektrometer) vermessen. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum im Bereich der Cholinmetaboliten ist auf der x-Achse dargestellt. Die Höhenliniendarstellung beinhaltet die Signale aller Wasserstoff- und Phosphor-Strukturelemente, die in der Struktur des Metaboliten über drei Bindungen miteinander verbunden sind. Dabei gibt die Anzahl der parallelen Linien und der Querschnitt der eingefassten Ebene die Stärke der Signale wieder. Das Volumen der Peaks ist proportional zur Konzentration der Metaboliten multipliziert mit der Anzahl der Phosphor-Atome (hier: immer 1) in einer chemischen Kopplungsgruppe. Werden diese Signale auf die y-Achse projiziert, erhält man das eindimensionale  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum.

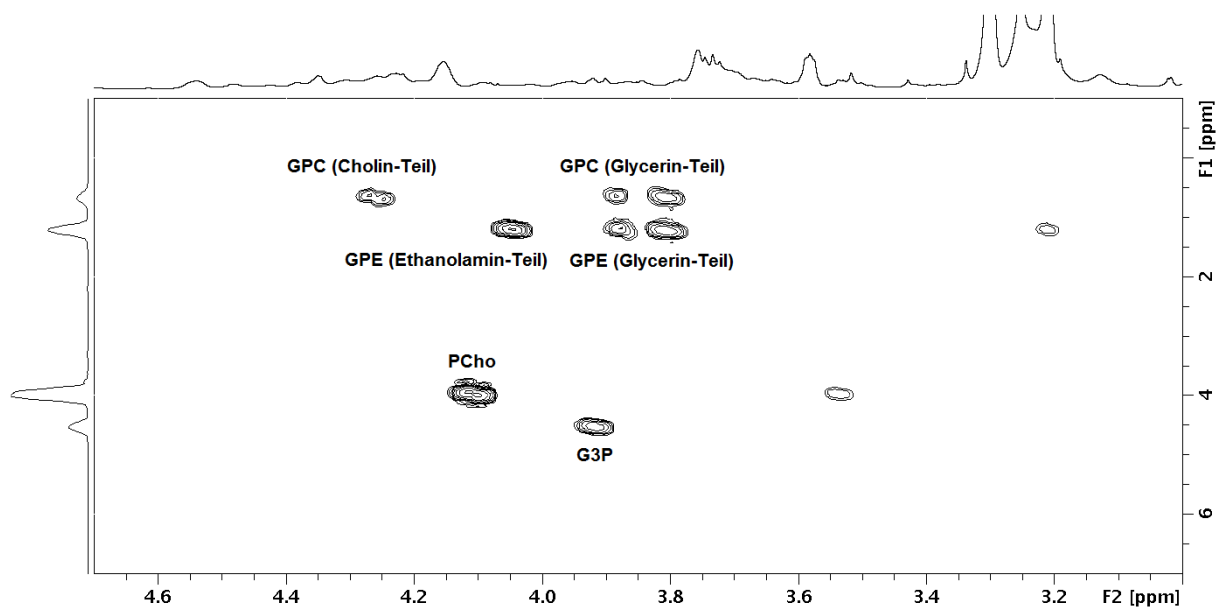


**Abb. A6.1: Zweidimensionales  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -Spektrum eines MCF7-Zellextraktes: NEG**

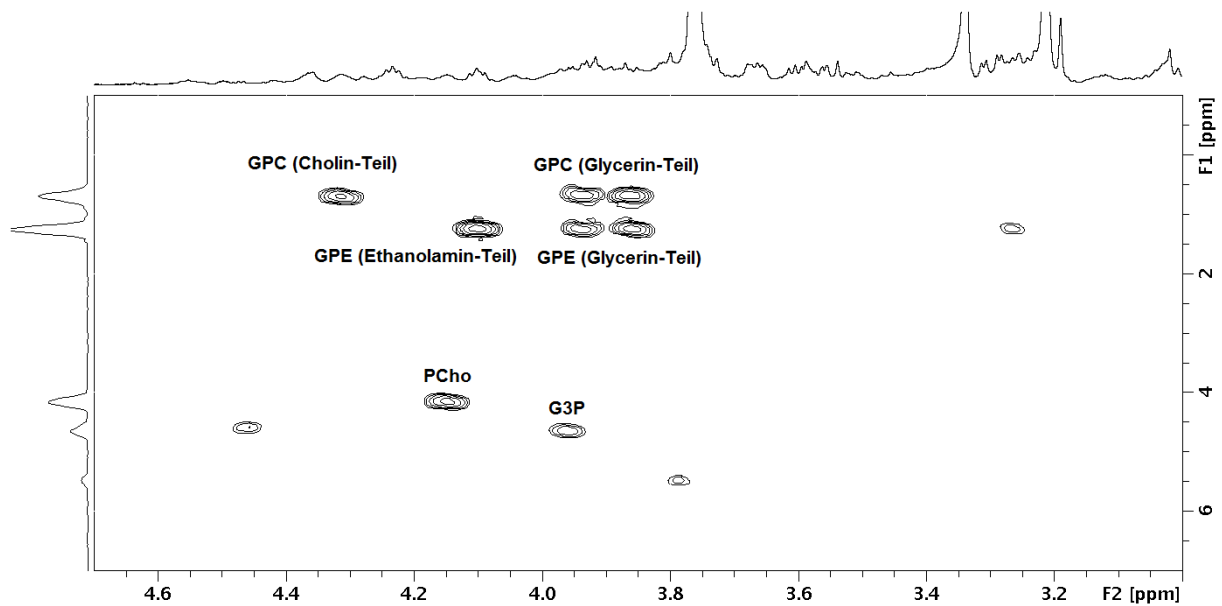
Die MCF7-Zellen wurden transfiziert mit 20 mM Kontroll-siRNA (scr low#2, Invitrogen) und die Metaboliten mit Methanol extrahiert. Die NMR-Messung erfolgte in deuteriertem Wasser.



**Abb. A6.2: Zweidimensionales  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -Spektrum eines MCF7-Zellextraktes: EDI3-Kd**  
 Die MCF7-Zellen wurden transfiziert mit 20 mM EDI3-siRNA (Oligo-B, Invitrogen) und die Metaboliten mit Methanol extrahiert. Die NMR-Messung erfolgte in deuteriertem Wasser.



**Abb. A6.3: Zweidimensionales  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -Spektrum eines MCF7-Zellextraktes: GPAM-Kd**  
 Die MCF7-Zellen wurden transfiziert mit 20 mM GPAM-siRNA (Oligo-B, Invitrogen) und die Metaboliten mit Methanol extrahiert. Die NMR-Messung erfolgte in deuteriertem Wasser.



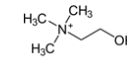
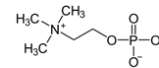
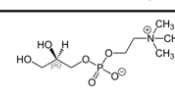

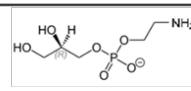

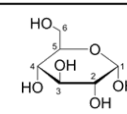


**Abb. A6.4: Zweidimensionales  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ -Spektrum eines MCF7-Zellextraktes: CHKA-Kd**  
 Die MCF7-Zellen wurden transfiziert mit 20 mM CHKA-siRNA (Oligo-B, Invitrogen) und die Metaboliten mit Methanol extrahiert. Die NMR-Messung erfolgte in deuteriertem Wasser.

## A7 Chemische Verschiebung der quantifizierten Metaboliten

Das Integral der Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum entspricht der Konzentration des jeweiligen Metaboliten multipliziert mit der Anzahl der signalgebenden Protonen. Die für die Quantifizierung verwendete Cholin-Kopfgruppe enthält neun Protonen. Die Integrale der Signale von GPC, PCho und Cho bei der x-Koordinate 3,2 ppm sind daher direkt vergleichbar. Die nachstehende Tabelle gibt die chemischen Verschiebungen der einzelnen gemessenen Metaboliten-Signale an. Bei der Quantifizierung wurden die berechneten Integrale auf die Anzahl der signalgebenden Protonen normiert.

**Tab. A7: Chemische Struktur, Konstitutionsformel und chemische Verschiebungen der Metaboliten**  
 Mit NMR-Spektroskopie analysierte Metaboliten in Zellextrakten:

Blau unterlegt: chemische Verschiebung in D<sub>2</sub>O als Lösemittel, orange unterlegt: chemische Verschiebung in CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub> in Verhältnis 1:2 als Lösemittel

Metabolit	Summenformel	<sup>31</sup> P –Verschiebung in ppm	<sup>1</sup> H-Verschiebung in ppm
Cholin 	OH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-	3,19
Phosphocholin 	PO <sub>4</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	4,12	3,21
GPC 	CH <sub>2</sub> OH-CHOH-CH <sub>2</sub> -PO <sub>4</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,63	3,22
Ethanolamin 	OH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	-	4,03
GPE 	(OH-CH) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -PO <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	1,29	4,10
Lactat 	CH <sub>3</sub> -CHOH-COOH	-	1,33
Glucose 	H an C1 der Pyranose	-	5,2 (alfa-D) 4,8 (beta-D)
Alanin 	CH <sub>3</sub> -CHNH <sub>2</sub> -COOH	-	1,46
G3P 	OH-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -OPO <sub>3</sub>	4,60	3,95
Triglyceride	-COO-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	-	1,29
PtdCho	-PO <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-0.6	4,25