

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde IV  
(Schwerpunkt: Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin)

**Wirkungen von Östradiol und Progesteron auf den  
hepatischen Phosphatidylcholin-Metabolismus der  
neonatalen Ratte**

—

**Untersuchungen mit stabiler Isotopenmarkierung und  
Tandem-Massenspektrometrie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Raith, Marco

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. W. Bernhard

2. Berichterstatterin: Professor Dr. O. Garaschuk

Tag der Disputation: 05.06.2019



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	a)
Übersicht der Abbildungen.....	b)
Übersicht der Tabellen.....	c)
Abkürzungen.....	d)
Abkürzungen allgemein.....	e)
Chemische und physikalische Größen.....	f)

## a) Inhaltsverzeichnis

<b>1. Physiologisch-chemischer Hintergrund.....</b>	<b>1</b>
1.1 Phospholipide und ihre Metabolite.....	1
1.1.1 Physiologie der Phospholipide.....	1
1.1.2 Biochemie der Phospholipide.....	4
1.1.3 Gruppen der Phospholipide.....	4
1.1.4 Glycerophospholipide.....	5
1.1.5 Synthese von PC.....	8
1.1.6 CDP-Cholin-Pathway (Kennedy-Pathway).....	9
1.1.7 PEMT-Pathway.....	11
1.1.8 Lands-Zyklus.....	12
1.1.9 Organotypische Zusammensetzung der PC-Spezies.....	12
1.1.10 Cholin und seine Metaboliten hinsichtlich anderer Funktionen.....	13
1.2 Cholinmangel beim Frühgeborenen.....	15
1.2.1 Cholin und sein Bezug zu den konditionell essentiellen Fettsäuren Arachidonsäure und Docosahexaensäure.....	16
<b>2. Methoden und Materialien.....</b>	<b>18</b>
2.1 Versuchsplanung.....	18
2.2 Versuchsaufbau.....	19
2.3 Organisation des Tierversuchs.....	19
2.4 Hormonelle Behandlung, Markierung und Organentnahme.....	19
2.4.1 Hormonelle Behandlung der Versuchstiere.....	19
2.4.2 Markierung mit D <sub>9</sub> -Cholin.....	21
2.4.3 Präziser Ablauf des Finalversuchs.....	22
2.5 Aufarbeitung von Leber und Blutplasma.....	23

2.5.1	Lipidextraktion aus Lebergewebe nach Folch.....	23
2.5.2	Plasmaextraktion nach Bligh & Dyer.....	24
2.6	Analytik der Phospholipide und wasserlöslichen Metabolite.....	25
2.6.1.	Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie.....	25
2.6.1.1	MS/MS-Analyse der wasserlöslichen Metabolite.....	28
2.6.1.2	MS/MS-Analyse der Phospholipide der Unterphase.....	30
2.6.1.3	Berechnung der D <sub>3</sub> -Markierung von S-Adenosyl-Methionin (D <sub>3</sub> -SAM), der deuterierten wasserlöslichen Derivate sowie der Transfer von D <sub>3</sub> -Methylgruppen auf Homocystein.....	34
2.7	Lösungsmittel und Chemikalien.....	34
2.8	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	35
2.8.1.1	Komponenten des Massenspektrometers.....	35
2.8.1.2	Weitere Gerätschaften.....	36
2.8.2	Verbrauchsmaterialien.....	37
2.9	Statistische Auswertung der Daten.....	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1	Wachstum neonataler Ratten und Hormoneffekte .....	39
3.2.1	Cholinversorgung der Ratte.....	41
3.2.2	Konzentrationen und Poolgrößen von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten in Leber und Blutplasma.....	41
3.2.3	Hormoneffekte auf die Leber- und Plasmahomöostase von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten.....	42
3.3.	Phospholipide in Leber und Plasma .....	47
3.3.1	Hormonwirkungen auf die Poolgrößen und Konzentrationen der Leber- und Plasma-Phospholipide.....	50
3.3.2	Hormonwirkungen auf die molekulare Zusammensetzung des Phosphatidylcholins und Phosphatidylethanolamins.....	53
3.4	Hormoneffekte auf den Cholin- und PC-Metabolismus.....	56
3.4.1	Kinetik von D <sub>9</sub> -Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten.....	56
3.4.2	Kinetik der D <sub>9</sub> -Cholin-Markierung in Leber und Plasma.....	59
3.5	Kinetik des via Kennedy- (D <sub>9</sub> -PC) und PEMT-Pathway (D <sub>3</sub> -PC) synthetisierten PC.....	61
3.5.1	Wirkungen auf D <sub>9</sub> -Cholin und seine wasserlöslichen Metabolite sowie D <sub>9</sub> - und D <sub>3</sub> -PC in Leber und Plasma.....	63
3.5.2	Konzentration und Anreicherung deuterierter Phosphatidylcholine.....	65
3.5.3	Die Anreicherung von D <sub>3</sub> im S-Adenosyl-Methionin.....	66
3.5.4	Hormoneffekte auf PC-Subgruppen via Kennedy- und PEMT-Pathway.....	66
3.6	Berechnung des neusynthetisierten PC via Kennedy- und PEMT-Pathway.....	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
4.1	Wachstum neonataler Ratten und Hormoneffekte.....	77
4.2	PC-Poolgrößen und -Zusammensetzung.....	77
4.3	Untersuchung des PC-Metabolismus mit stabiler Isotopenmarkierung..	80
4.4	Phosphatidylethanolamin in der Leber.....	85
4.5	PEMT-Pathway.....	86

4.6	Cholin und wasserlösliche Cholinmetabolite im Plasma.....	88
4.7	Cholin und wasserlösliche Cholinmetabolite der Leber.....	89
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>7.</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>105</b>

## **b) Übersicht der Abbildungen**

- 1 Plasmaspiegel von Östradiol und Progesteron während der Schwangerschaft
- 2 Die Glycerophospholipidklassen und das Sphingophospholipid Sphingomyelin
- 3 Palmitoyl-Linoleoyl-PC (PC16:0/18:2)
- 4 Dipalmitoyl-PC (DPPC, PC16:0/16:0)
- 5 Palmitoyl-Arachidonoyl-PC (PC16:0/20:4)
- 6 Schematische Darstellung des CDP-Cholin-Pathways
- 7 Charakteristische PC-Spezies des Kennedy-Pathways (PC16:0/18:2) (A) und des PEMT-Pathways (PC16:0/22:6) (B)
- 8 Schematische Darstellung des PEMT-Pathways
- 9 Anteile der PC-Subgruppen im Lebergewebe (A), Blutplasma (B) und Surfactant (C) 14 Tage alter Ratten
- 10 Synthese von D<sub>3</sub>-S-Adenosyl-Methionin
- 11 Plots der Analytik von wasserlöslichen Präkursoren
- 12 Plots der Analytik von Phospholipiden
- 13 Verlauf des Körpergewichts d7-d14
- 14 Poolgrößen von Cholin und seinen Metaboliten Phosphorylcholin, Betain, Dimethylglycin im Lebergewebe
- 15 Poolgrößen von Cholin (A) und seinen Metaboliten Betain (B) und Dimethylglycin (C) im Blutplasma
- 16 Zusammensetzung des PC im Lebergewebe
- 17 Zusammensetzung des PE im Lebergewebe
- 18 PC-Konzentration und Poolgrößen im Lebergewebe
- 19 PE-Konzentration und Poolgrößen im Lebergewebe
- 20 PC-Konzentration und Poolgröße im Plasma
- 21 PC-Zusammensetzung von Leber (A) und Plasma (B)
- 22 Kinetik von D<sub>9</sub>-Cholin und seinen Metaboliten in Leber und Plasma gesunder 14d alter Ratten
- 23 Kinetik von D<sub>9</sub>-Cholin-PC (A, C) und D<sub>3</sub>-Cholin-PC (B, D) in Leber (A, B) und Blutplasma (C, D)
- 24 Relative Anreicherung von D<sub>9</sub>-Cholin-PC (A, C) und D<sub>3</sub>-Cholin-PC (B, D) in Leber (A, B) und Blutplasma (C, D) der Ratte
- 25 Anteil der Hauptkomponenten am endogenen, D<sub>9</sub>- sowie D<sub>3</sub>-PC nach 1,5 Stunden in Leber (A) und 6 Stunden in Plasma (B)

### c) Übersicht der Tabellen

- 1 Die wichtigsten Fettsäuren in Glycerophospholipiden
- 2 Molekulare Spezifität des CDP-Cholin-/Kennedy- sowie PEMT-Pathways mit deren wichtigsten Syntheseprodukten
- 3 A: Injektionslösungen mit jeweiliger Konzentration, Dosierung und Lösungsmittel. B: Behandlung der Versuchsgruppen
- 4 Übersicht der Behandlungsgruppen
- 5 Native und deuterierte wasserlösliche Metabolite sowie ihre Fragmente, die in der massenspektrometrischen Analytik erfasst wurden
- 6 Geräteparameter des Massenspektrometers für die Analyse wasserlöslicher Metabolite
- 7 Pipettierschema zur Probenverarbeitung für die Massenspektrometrie
- 8 Monoisotopische Masse/Ladung (m/z) nativer und deuterierter PC-Spezies sowie ihrer diagnostischen Fragmente, welche in der massenspektrometrischen Analytik erfasst werden
- 9 Native PE-Spezies, die in der massenspektrometrischen Analytik erfasst werden.
- 10 Geräteparameter des Massenspektrometers für die Analyse der Phospholipidklassen PC und PE
- 11 Lösungsmittel und Chemikalien
- 12 Auflistung der im Rahmen der Massenspektrometrie benutzten Geräte
- 13 Auflistung der übrigen benutzten Geräte
- 14 Verbrauchsmaterialien
- 15 Behandlungseffekte auf Körper- und Lebergewichte
- 16 Konzentrationen (A) sowie Poolgröße je g KGW (B) von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten Phosphorylcholin, Betain und Dimethylglycin im Lebergewebe
- 17 Verhältnis von Betain zu Cholin (A) und von Dimethylglycin zu Betain (B) in Lebergewebe und Blutplasma, dargestellt als Quotient
- 18 Konzentration (A) sowie Poolgröße (B) je g KGW von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten Betain und Dimethylglycin im Blutplasma
- 19 Poolgrößen der Subgruppen des Leber- und Plasma-PC sowie Leber-PE
- 20 Poolgrößen von hepatischem PC und PE sowie deren Quotient
- 21 Verhältnis von hepatischem zu plasmatischem PC, bezogen auf Konzentration und Poolgrößen; dargestellt als Quotient
- 22 Poolgrößen der PC-Subgruppen in Leber (A) und Plasma (B)
- 23 Mengen und Anteile der D<sub>9</sub>-Cholinmetabolite bezogen auf die Applikationsmenge
- 24 Anreicherung von D<sub>9</sub>-Cholin sowie D<sub>9</sub>-Betain nach 1,5 und 6h in Leber (A) und Plasma (B)
- 25 Poolgrößen von D<sub>9</sub>-Cholin, D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin, D<sub>9</sub>-PC sowie D<sub>9</sub>-Betain nach 1,5 Stunden in Leber (A) und Plasma (B).
- 26 Differenz der Poolgrößen von D<sub>9</sub>-PC- (A) sowie D<sub>3</sub>-PC-Spezies (B) zwischen 6 Stunden und 1,5 Stunden in Leber und Plasma
- 27 D<sub>3</sub>-Anreicherung des S-Adenosyl-Methionins in der Leber
- 28 Poolgrößen von D<sub>9</sub>- (A, B) + D<sub>3</sub>-C18:2-/C20:4-/C22:6-PC-Spezies (C, D) in Leber (A, C) und Plasma (B, D)

- 29 Poolgrößen von neusynthetisiertem PC via Kennedy-Pathway
- 30 Poolgrößenänderungen von via Kennedy-Pathway neusynthetisiertem PC in Leber und Plasma sowie ihre kinetischen Änderungen
- 31 Poolgrößen von neusynthetisiertem PC via PEMT-Pathway
- 32 Poolgrößenänderungen von via PEMT-Pathway neusynthetisiertem PC in Leber und Plasma sowie ihre kinetischen Änderungen

**d) Abkürzungen von Enzymen**

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständiger Name</b>
AdoHcyH (EC 3.3.1.1)	S-Adenosyl-Homocysteinhydrolase
BADH (EC 1.2.1.8)	Betain-Aldehyddehydrogenase
BHMT (EC 2.1.1.5)	Betain-Homocystein-Methyltransferase
CCT (EC 2.7.7.15)	CTP-Cholinphosphat-Cytidyltransferase
CEPT (EC 2.7.8.1)	Cholin/Ethanolamin-Phosphotransferase
CDH (EC 1.1.99.1)	Cholindehydrogenase
CK (EC 2.7.1.32)	Cholinkinase
LPCAT (EC 2.3.1.23)	Lysophosphatidylcholinacyltransferase
MAT (EC 2.5.1.6)	Methioninadenosyltransferase
PEMT (EC 2.1.1.17)	Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase

**e) Abkürzungen allgemein**

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständiger Name</b>
ABCA1	ATP Binding Cassette A1
AI	Adäquate Aufnahme (Intake) (eines Nährstoffes)
ApoA1	Apolipoprotein A1
ARA (C20:4)	Arachidonsäure
Aqua (bi)dest.	Aqua (bi)destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	Butylhydroxytoluol

BMI	Body Mass Index
$C_n$	Kette mit $n$ Kohlenstoff-(C-)Atomen
C1/2/3	1./2./3. Kohlenstoffatom
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CDP	Cytidindiphosphat
$CHCl_3$	Chloroform
CMP	Cytidinmonophosphat
CM2+1	Chloroform + Methanol im Verhältnis 2+1
CTP	Cytidintriphosphat
D	Deuterium
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHA (C22:6)	Docosahexaensäure
DMG	Dimethylglycin
DPPC	1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin
D <sub>9</sub> -Cholin	9-fach deuteriertes Cholin
E <sub>2</sub>	Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELBW	Extrem niedriges Geburtsgewicht
EPA (C20:5)	Eicosapentaensäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HDL	High Density Lipoprotein
H <sub>2</sub> O	Wasser
ISTD	Interner (Analysen-)Standard
IVC	Individually Ventilated Cage
KI	Konfidenzintervall

LA (C18:2)	Linolsäure
LC	Flüssigchromatographie
LLF	Lungenlavageflüssigkeit
MAM	Mitochondrien-assoziierte ER-Membran (MAM)
MIDA	Multiple Isotopomer-Verteilungsanalyse
MS	Massenspektrometer
m/z	Masse/Ladung
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NL	Neutrallipide
OA (18:1)	Ölsäure
PC	Phosphatidylcholin
PC20:0/20:0	1,2-Diarachidoylphosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipid
PMA	Postmenstruelles Alter
PS	Phosphatidylserin
PUFA	Polyunsaturierte Fettsäure
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SPH	Sphingomyelin
SSW	Schwangerschaftswoche
TIC	Total Ion Count
TFE	Trifluorethanol

TPN	Totale parenterale Ernährung
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WPD	Western Pattern Diet
ZNS	Zentrales Nervensystem

## f) Chemische und physikalische Größen

Größensymbol	Bedeutung der Einheit	Einheitenzeichen
	Differenz	[Δ] Delta
P	Druck	[kP] Kilopascal [psi] pound per square inch (Pfund pro Quadratzoll) [mmHg] Millimeter Quecksilbersäule [=Torr]
U	Elektrische Spannung	[V] Volt
g	Erdbeschleunigung	[m/s <sup>2</sup> ]
O	Fläche	[m <sup>2</sup> ] Quadratmeter
F	Kraft	[N] Newton
s	Länge	[nm] Nanometer [μm] Mikrometer [mm] Millimeter [m] Meter
m	Masse	[μg] Mikrogramm [mg] Milligramm [g] Gramm [kg] Kilogramm
P	Prozent	[%]
R	Radius	[m] Meter
n	Stoffmenge	[mol] Mol

		[mmol] Millimol [μmol] Mikromol [nmol] Nanomol
T	Temperatur	[°C] Grad Celcius
V	Volumen	[μL] Mikroliter [mL] Milliliter [L] Liter
t	Zeit	[s] Sekunde [h] Stunde [d] Tag
M	Molare Masse	[g/mol] Gramm/Mol

# 1. Physiologisch-chemischer Hintergrund

## 1.1: Phospholipide und ihre Metabolite

### 1.1.1: Physiologie der Phospholipide

Phospholipide (PL) sind amphiphile Moleküle und damit zur Trennung von Kompartimenten mit hydrophiler Phase (Extrazellularraum, Zytosol, Organellen-Lumen) sowie als Oberflächenstrukturen rein apolarer Partikel (z. B. Fettvakuolen, Lipoproteinkerne) geeignet. Sie sind essenzielle Membranbausteine und liegen in Geweben mit hohem Parenchymanteil in hoher, konstanter Konzentration vor. Darüber hinaus sind Phospholipide konstitutive Bestandteile vieler Sekrete, u.a. Gallenflüssigkeit, Lipoproteine und Surfactant der Lunge. [1, 2, 3] Homöostase und -austausch der Phospholipide und ihrer Bestandteile zwischen den Organen sind über gerichtete Transportprozesse der Lipoproteine miteinander verschaltet. Deren Hauptphospholipid ist das Phosphatidylcholin (PC) [4]. Die Leber sezerniert das cholinhaltige PC via Lipoproteine sehr geringer Dichte (Very Low Density Lipoproteins (VLDL, ~20% PC enthaltend) [5], während die Lunge PC sowie Cholesterin über den basolateral exprimierten ABCA1-Transporter der Typ II-Pneumozyten auf Apolipoprotein A1 (ApoA1) überträgt und damit PC als Bestandteil von Lipoproteinen hoher Dichte (high density lipoproteins, HDL) sezerniert. Diese Sekretion macht bis zu 85% der PC-Synthese der Lunge aus, die damit zur Versorgung der Leber beiträgt [6, 7]. Das PC der Lipoproteine – insbesondere der VLDL – ist vorwiegender Carrier für langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids [LC-PUFA]) zur Versorgung peripherer Organe; davon in erster Linie Arachidonsäure (C20:4, ARA) sowie Docosahexaensäure (C22:6, DHA) [8].

Die Leber ist das Zentralorgan des Cholin- und PC-Stoffwechsels. Sie hat einen extrem hohen PC- und damit Cholin-Turnover über den enterohepatischen Kreislauf des PC der Galle [9]. Exogener Cholinmangel ebenso wie ein gestörter enterohepatischer Kreislauf von Galle-PC resultieren dementsprechend primär in einem Cholin-/PC-Mangel der Leber. Zur

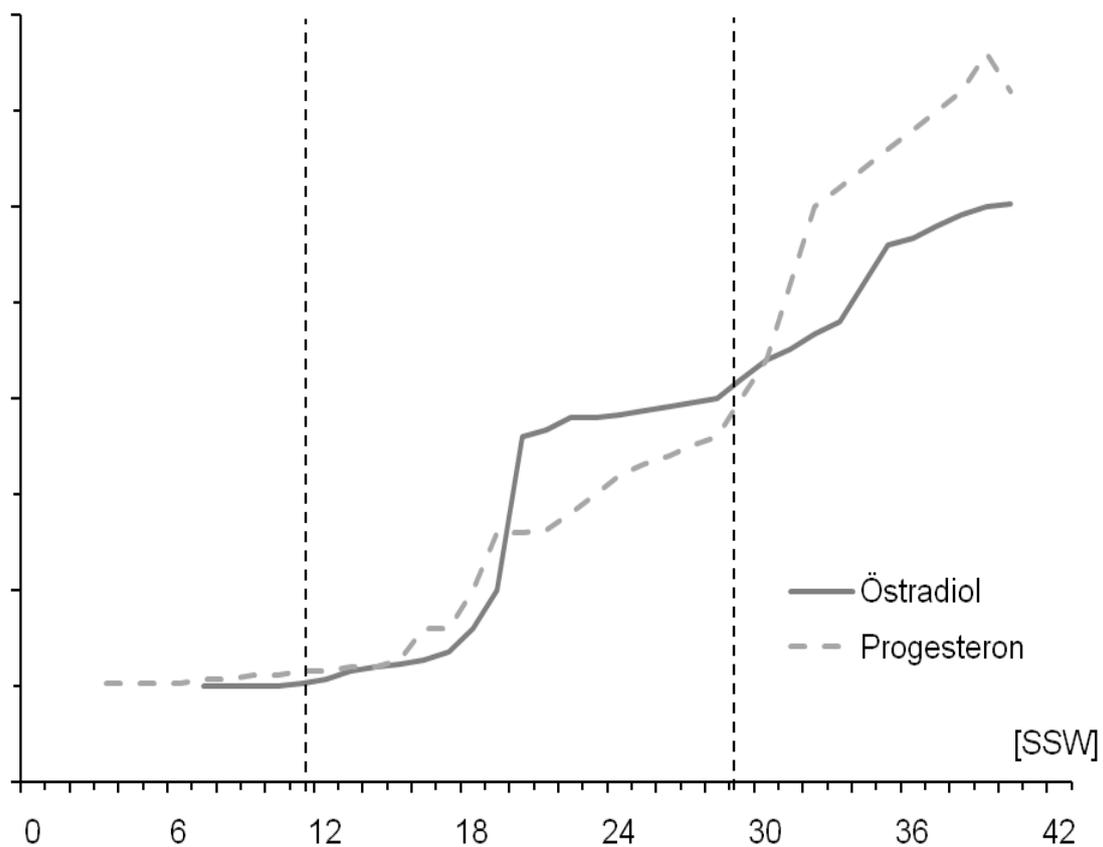
Aufrechterhaltung der Leberhomöostase wird Cholin via PC aus anderen Organen, u.a. der Lunge, rekrutiert [10]. Folgen eines Cholinmangels sind unter anderem:

- 1.) Hepatosteatose durch Triglycerid-Akkumulation, da die VLDL-Bildung Cholin für die PC-Synthese erfordert [10, 11],
- 2.) Desintegration der Plasmamembran mit Transaminasenanstieg, da Membranen bei Absinken ihres PC-Anteils „leaky“ werden (unter anderem bei totaler parenteraler Ernährung [TPN]) [12],
- 3.) analog möglicherweise die Cholestase beim Kind (im Rahmen von TPN) [13, 14]
- 4.) sowie (bei der Maus) das akute Leberversagen, weil hier der tägliche hepatische Cholin-/PC-Turnover dem hepatischen Gesamtpool entspricht, während der Anteil beim Menschen geringer ist [15].

Es ist anzunehmen, dass der Cholin-, PC- und Sphingomyelin(SPH)-Metabolismus für Wachstum und Entwicklung essenziell sind, da PC, SPH und andere Cholinmetabolite konstitutive Zellbausteine sind; ebenso wie Proteine und Nukleinsäuren. Für den hohen Cholinbedarf während des Wachstums spricht seine transplazentare Anreicherung im Fötus und eine hormonelle Kontrolle des PC-Stoffwechsels über die Hormone Östradiol und Progesteron [16, 17]. Die Blutplasmaspiegel von Östradiol und Progesteron steigen ab der Mitte der Schwangerschaft – insbesondere im dritten Trimenon – sowohl in der Gravida als auch im Fetus stark an (siehe Abb. 1) [18]. Frühgeborene, welche aufgrund der Durchtrennung der Nabelschnur kein maternales/plazentares Östradiol und Progesteron mehr erhalten, zeigen nahezu regelhaft strukturelle und funktionelle Defizite in der Organentwicklung; insbesondere des zentralen Nervensystems und der Lunge [47].

Zur Untersuchung des Einflusses von Östradiol und Progesteron auf Entwicklung und Phospholipidmetabolismus kommt in dieser Arbeit ein in vivo-Modell neugeborener Ratten zum Einsatz, da diese ebenfalls kein plazentares Östradiol und Progesteron zur Verfügung haben. Viele strukturelle und funktionelle Entwicklungsprozesse im 3. Trimenon des Menschen, wie z.B. jene der Lunge und des Gehirns, laufen bei der Ratte post natum ab [19, 20, 21]. Da

die Leber eine zentrale Rolle für die Versorgung anderer Organe mit Lipiden und Lipidbausteinen darstellt und insbesondere bei Frühgeborenen wegen ihrer hohen physiologischen Wachstumsrate relevant ist, wurde die neugeborene Ratte im Alter von 7 – 14 Tagen als Modell ausgewählt und die Effekte von Östradiol und Progesteron auf den Metabolismus von Cholin und PC der Leber sowie des Plasmas analysiert. Dies geschah unter Anwendung von stabiler Isotopenmarkierung. Damit ließ sich nicht nur die Homöostase erfassen, es sollten überdies auch die Kinetiken von Cholin und seinen Metaboliten bei 14 Tage alten Ratten bestimmt werden. Weiterhin sollte geklärt werden, welche Wirkungen Östradiol und Progesteron auf diese Prozesse haben, um eine mögliche Relevanz dieser Hormone für die Entwicklung Frühgeborener zu definieren.



**Abb. 1:** Plasmaspiegel von Östradiol und Progesteron während der Schwangerschaft (Quelle: Modifiziert nach [18]).

### **1.1.2: Biochemie der Phospholipide**

Die Zellmembranen der Vertebraten, also auch des Menschen, bestehen zu etwa 50% aus Phospholipiden, davon wiederum entfallen ~45% auf die Hauptklasse Phosphatidylcholin (PC). Darüber hinaus ist PC das Hauptphospholipid einiger Sekrete, in welchen es 80 - 95% der sezernierten PL ausmacht. Diese sind z. B. Surfactant, Galle, Lipoproteine, Magensekret; mit jeweils unterschiedlichen spezifischen Aufgaben: Erniedrigung der Oberflächenspannung, Triglyceridemulgierung, „Coating“ von Triglyceriden, um diese in wässrigen Systemen stabil zu halten und Erreichen der Mukushydrophobizität, um die Rückdiffusion von Protonen des Magenlumens zur Schleimhaut zu hemmen und die Aufrechterhaltung des pH-Gradienten zwischen Lumen und Epitheloberfläche zu erleichtern [1, 2, 3, 22].

Weitere Glycerophospholipide sind Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) sowie das Sphingophospholipid Sphingomyelin (SPH), welches via SPH-Synthase direkt vom PC abhängig ist und ca. 5% des Phospholipidanteils von Membranen ausmacht. Die übrigen rund 50% der Zellmembran entfallen auf Proteine sowie Cholesterin [23].

Jedes Organ besitzt eine in engen Grenzen definierte Gewebekonzentration von Phospholipiden sowie ihrer wasserlöslichen Metabolite (beispielsweise ca. 19,5µmol/g PC, 1,6µmol/g Sphingomyelin sowie 100 nmol/g Cholin, 550 nmol/g Betain und 1.400 nmol/g Phosphorylcholin im Lebergewebe einer adulten Ratte) [24].

### **1.1.3: Gruppen der Phospholipide**

Phospholipide werden in Glycerophospholipide und Sphingophospholipide unterteilt. Bei den Glycerophospholipiden ist Glycerin das Grundgerüst und Träger der Fettsäuren in der Position 1 und 2, in der Regel als Ester (1,2-Diacylglycerin, DAG). Die polare Kopfgruppe in Position 3 des DAG ist über einen Phosphatrest via Phosphodiesterbindung mit verschiedenen Kopfgruppen verknüpft, das heißt mit Cholin, Ethanolamin, Inositol, Serin, Glycerin oder einen Wasserstoffrest (siehe Abb. 2).

Diese Phospholipidklassen lassen sich entsprechend ihrer Fettsäuren in molekulare Spezies unterteilen, welche organotypisch verteilt sind. Dem stehen Sphingolipide gegenüber, die unterschiedliche polare Kopfgruppen besitzen können. Sphingomyelin ist das quantitativ wichtigste Sphingolipid. Sphingosin ist dabei mit einer Fettsäure via Säureamidbindung zu Ceramid verknüpft, das als Kopfgruppe bei den einen Kohlenhydrat-Rest (Glykosphingolipide) bzw. einen Phosphorylcholin-Rest (Sphingomyelin) enthält [25].

#### **1.1.4: Glycerophospholipide**

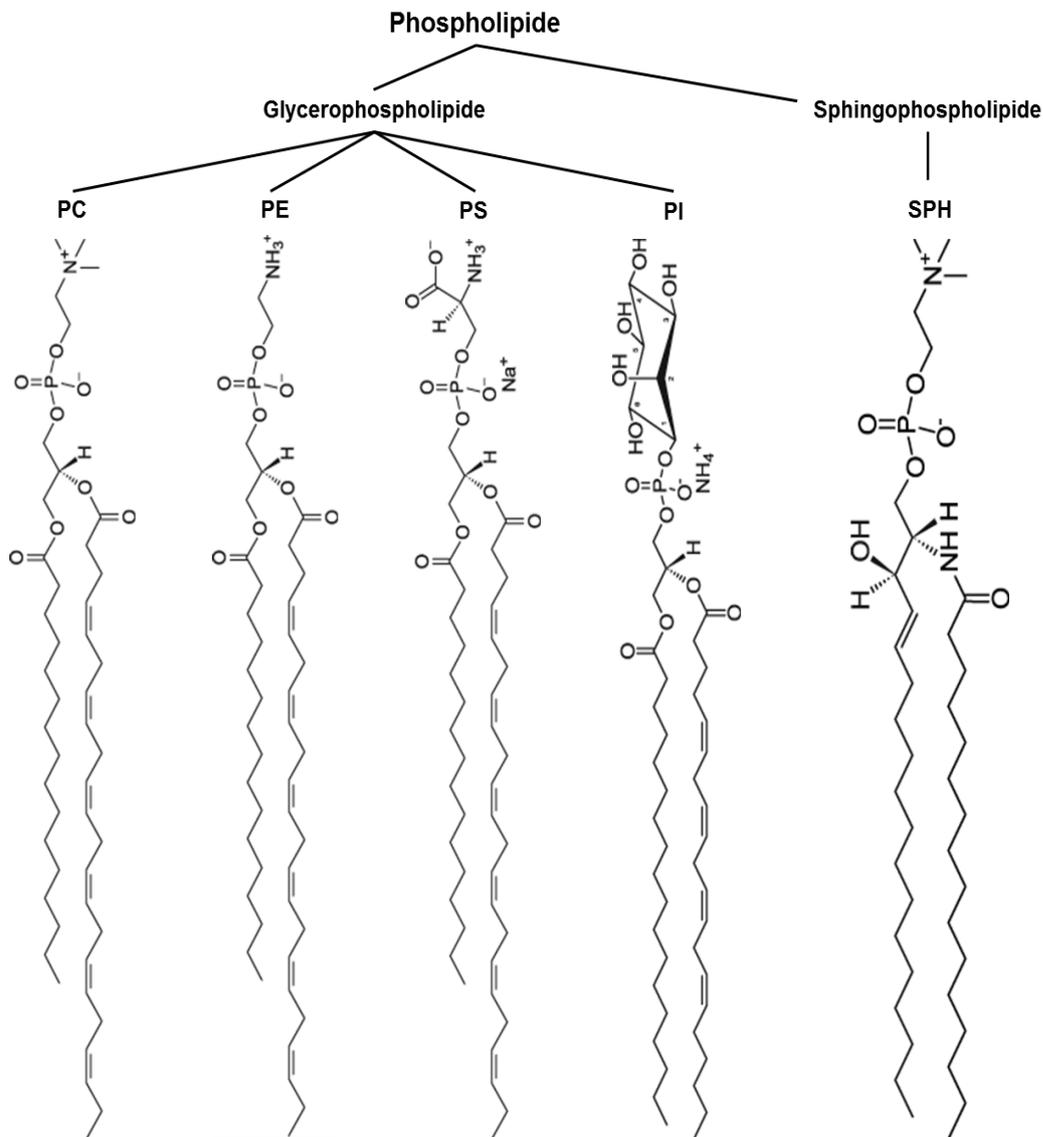
Glycerophospholipide besitzen zwei Fettsäurereste, welche über Esterbindungen mit Glycerin an den Positionen C1 und C2 (sn-1, sn-2) verbunden sind. In Position 1 kann auch ein Fettalkohol via Etherbindung geknüpft sein. Die Phosphatgruppe in Position 3 mit ihrem Rest (-H, -Cholin etc.; siehe oben) definiert die Phospholipidklasse. Diese Klassen sind im Wesentlichen Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylserin (PS), sowie Phosphatidylinositol (PI).

Die Fettsäuren besitzen in der Regel eine Länge von 14 bis 22 C-Atomen. In Position sn-2 (sn steht für stereospezifische Nummerierung; also an C2 des Glycerins gebunden) liegen meist ungesättigte Fettsäuren mit unterschiedlich vielen Doppelbindungen (1 bis 6) vor, die üblicherweise cis-konfiguriert sind. In Position sn-1 (C1) befindet sich meist eine gesättigte (Palmitinsäure [C16:0], Stearinsäure [C18:0]) oder eine einfach ungesättigte Fettsäure (Ölsäure [C18:1]).

Die Länge sowie Sättigung der Fettsäuren eines Phospholipids spielen insofern eine Rolle, als dass die Membranfluidität davon abhängig ist. Auch sind die Fettsäuren in Position sn-2 Freisetzungserzeugnis der Phospholipase A<sub>2</sub>, z.B. für die Synthese von Eicosanoiden (Prostaglandine, Leukotriene) und Docosanoiden (Resolvine zur Entzündungsterminierung) [26, 27].

Der Abkürzungsalgorithmus folgt einer einfachen Logik: Es ist maßgeblich, welche Fettsäure (siehe Tab. 1) sich jeweils in der sn-1-/C1- bzw. sn-2-/C2-Position und welche Kopfgruppe sich an der Phosphatgruppe in C3-Position

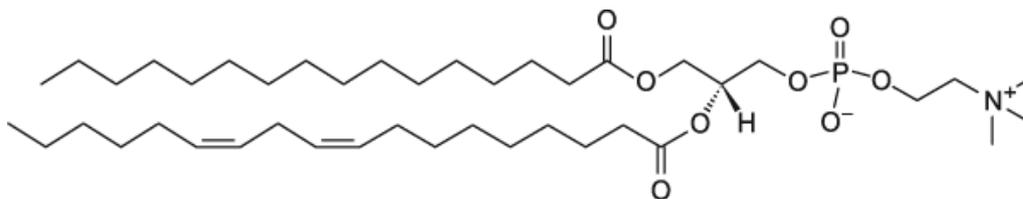
des Glycerophospholipides befindet. Ist beispielsweise ein Cholin mit der Phosphatgruppe des C3-Atomes verestert und befinden sich zwei Palmitinsäurereste in der sn-1- sowie sn-2-Position, spricht man von einem 1,2-Dipalmitoyl-PC (bzw. PC16:0/16:0).



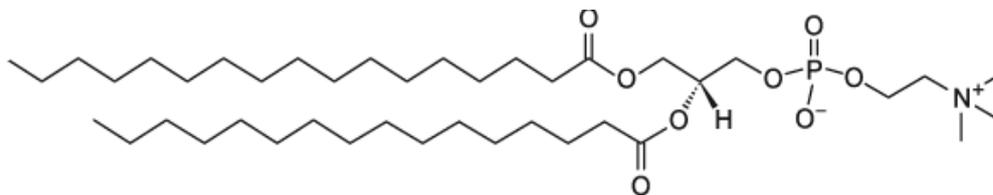
**Abb. 2:** Die Glycerophospholipidklassen Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) sowie Sphingophospholipid Sphingomyelin (SPH).

Trivialname	Summenformel	Doppelbindungen
Myristinsäure	C14:0	0
Palmitinsäure	C16:0	0
Palmitoleinsäure	C16:1	7-cis oder 9-cis
Stearinsäure	C18:0	0
Ölsäure	C18:1	9-cis
Vaccensäure	C18:1	11-cis
Linolsäure	C18:2	9-, 12-all-cis
Arachidonsäure („ARA“)	C20:4	5-,8-,11-,14-all-cis
Docosahexaensäure („DHA“)	C22:6	4-,7-,10-,13-,16-,19-all-cis

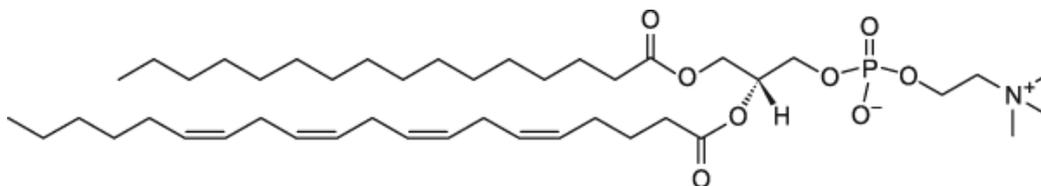
**Tab. 1:** Die wichtigsten Fettsäuren in Glycerophospholipiden.



**Abb. 3:** Palmitoyl-Linoleoyl-PC (PC16:0/18:2). Ein typisches Membranphospholipid.



**Abb. 4:** Dipalmitoyl-PC (DPPC, PC16:0/16:0). Ein wichtiges Phospholipid des Surfactants.



**Abb. 5:** Palmitoyl-Arachidonoyl-PC (PC16:0/20:4). Zusammen mit PC16:0/22:6 vorherrschender Bestandteil der Substantia grisea sowie Speicherform von ARA (C20:4) für die Eicosanoid-Synthese (Prostaglandine, Leukotriene).

### 1.1.5: Synthese von PC

Es existieren 3 Stoffwechselwege, welche für die Bereitstellung des charakteristischen PC-Profiles der Organe verantwortlich sind: Dies sind der CDP-Cholin-Pathway, der PEMT-Pathway sowie der Lands-Zyklus.

Für den CDP-Cholin-Pathway („Kennedy-Pathway“, nach dem Entdecker Eugene Kennedy, [28]) ist die direkte Verwendung von Cholin für die PC-Synthese aus einem Diglycerid charakteristisch.

Alle Gewebe synthetisieren PC über den CDP-Cholin-Pathway (Cytidindiphosphorylcholin-Stoffwechselweg) [29]. Dazu wird Cholin aus der oralen Aufnahme oder dem Recycling cholinhaltiger Lipide unter ATP-Verbrauch phosphoryliert und anschließend das Phosphorylcholin zu Cytidindiphosphorylcholin (CDP-Cholin) umgewandelt. Der Phosphorylcholin-Rest wird anschließend auf ein Diglycerid übertragen, wodurch PC entsteht (Abb. 6).

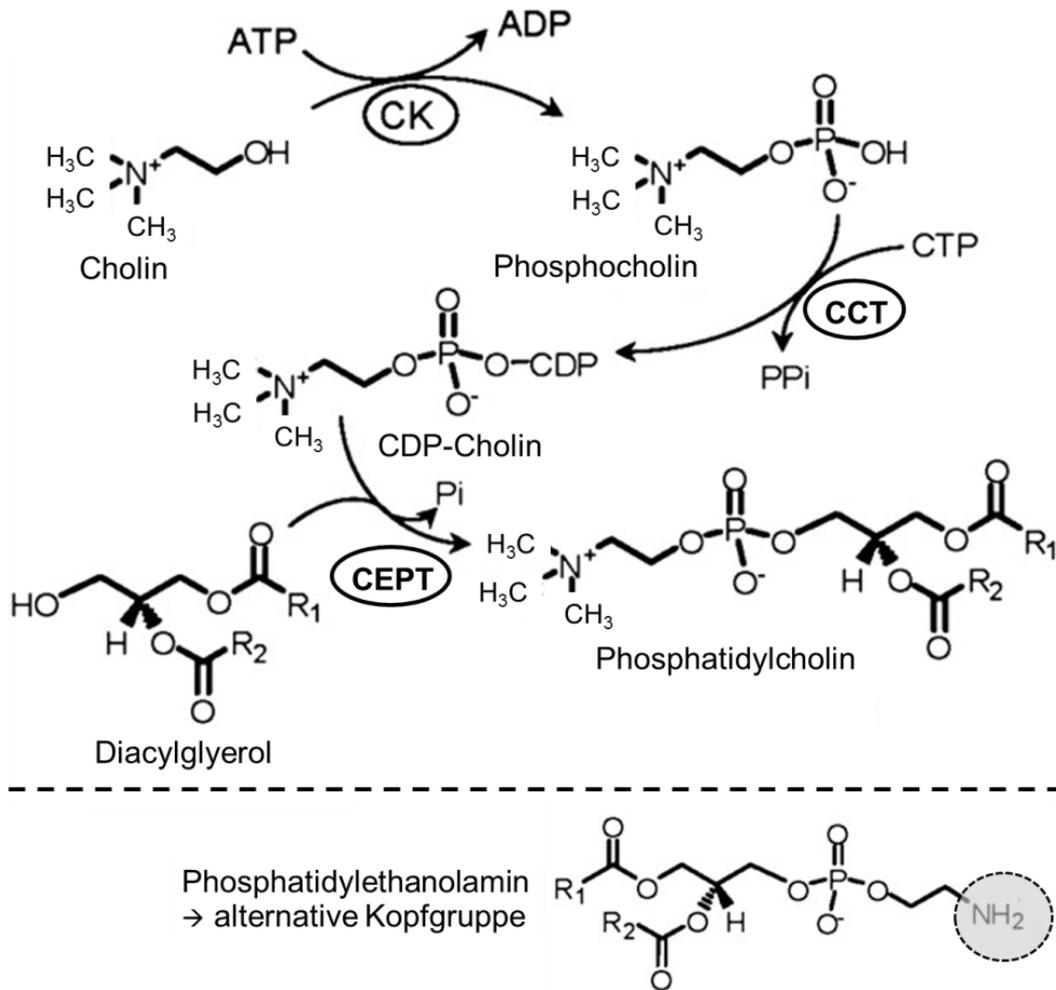
Ausschließlich in der Leber erfolgt zusätzlich eine PC-Synthese über den Phosphatidylethanolamin-(PE-)-N-Methyltransferase-Stoffwechselweg (PEMT-Pathway). Dieser verwendet nicht Cholin direkt, sondern aus Cholin bzw. Betain stammende Methylgruppen, mit welchen PE in drei Schritten zu PC methyliert wird. Der PEMT-Pathway hat die Funktion, vorwiegend LC-PUFA (Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids)-haltige PC-Spezies (LC-PUFA-PC) mit Arachidonsäure (ARA, C20:4) oder Docosahexaensäure (DHA, C22:6) aus PE zu bilden (ARA-PC, DHA-PC). Die Bedeutung des PEMT-Pathways liegt in der Versorgung extrahepatischer Organe mit ARA und DHA, welche in Gehirn und Lunge in hoher Konzentration vorkommen [30, 31]. Das PC der Lipoproteine ist dabei der hauptsächliche Carrier von ARA und DHA im Plasma [32]. Nur durch den PEMT-Pathway erfolgt eine (limitierte) Cholinsynthese, die z.B. in Hungerphasen Cholin bereitstellt, den Cholinbedarf des Organismus allerdings quantitativ nicht deckt. Deshalb ist Cholin ein essentieller Nährstoff [53].

Beide Synthesewege sind essentiell für die VLDL-Bildung, während für die Bildung von Galle-PC und PC der Lunge nur der Kennedy-Pathway hinreichend ist [33].

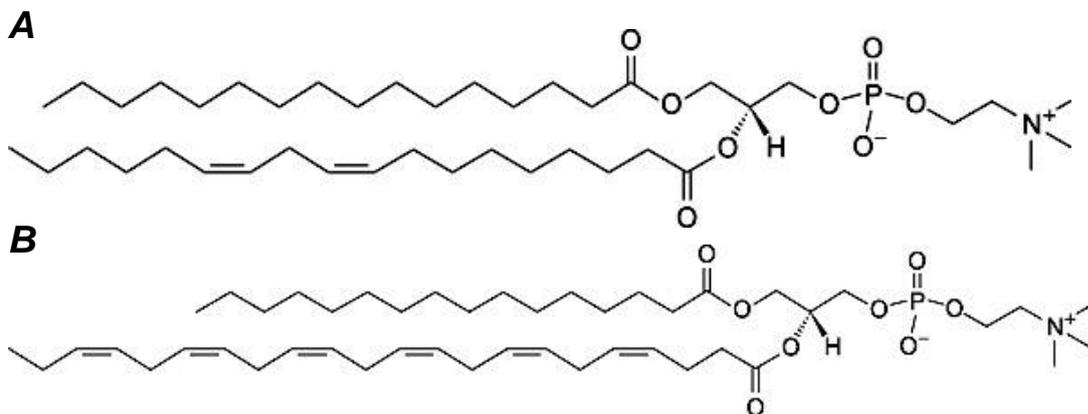
Der Lands-Zyklus hat die Aufgabe, Fettsäurereste in der Position sn-2 des PC sekundär auszutauschen, woraus ein organspezifisches molekulares PC-Verteilungsmuster resultiert [34].

### **1.1.6: CDP-Cholin-Pathway**

Der CDP-Cholin-Pathway wurde 1956 erstmals von Eugene Kennedy beschrieben [28]. Ein Teil dieses Stoffwechselweges ist als sogenannter Kennedy-Pathway bekannt, bei welchem Phosphatidylcholin (PC) gebildet wird; der andere Teil ist der CDP-Ethanolamin-Pathway, über welchen analog Phosphatidylethanolamin synthetisiert wird. Zunächst wird Cholin mittels der Cholin kinase (CK; Enzyme Commission Number [EC]: 2.7.1.32) unter ATP-Verbrauch phosphoryliert, wodurch Phosphorylcholin (= Cholinphosphat) entsteht. Anschließend erfolgt die Aktivierung über die CTP-Cholinphosphat-Cytidyltransferase (CCT; EC:2.7.7.15) mittels Cytidintriphosphat (CTP) zu Cytidyldiphosphorylcholin (CDP-Cholin). Schließlich wird ein Phosphorylcholin-Rest aus CDP-Cholin an DAG angehängt, was durch die Cholin/Ethanolamin-Phosphotransferase (CEPT; EC:2.7.8.2) katalysiert wird [16]. Das komplette Cholin wird bei diesem Syntheseweg eingebaut, sodass bei Markierung mit [ $D_9$ -Methyl]Cholin Intermediärprodukte und PC-Spezies entstehen, die eine um 9 Da höhere Molmasse haben als die unmarkierten Analoga. Das Ausmaß der Bildung von  $D_9$ -PC Spezies bei dieser Technik hängt ab von der Syntheserate und von der Anreicherung des  $D_9$ -Cholins in den Synthesestufen, also Cholin, Phosphorylcholin und CDP-Cholin.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des CDP-Cholin-Pathways. Abkürzungen: CK = Cholin kinase; CCT = CTP-Cholinphosphat-Cytidyltransferase; CEPT = Cholin/Ethanolamin-Phosphotransferase. (Quelle: Modifiziert nach [35])

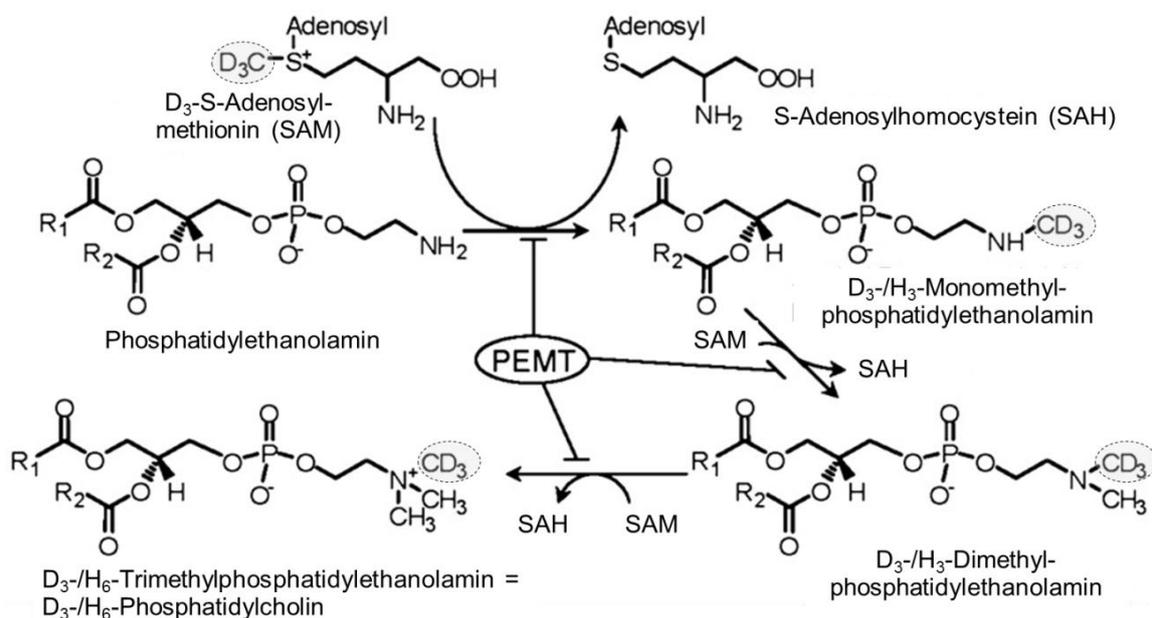


**Abb. 7:** Charakteristische PC-Spezies des Kennedy-Pathways (PC16:0/18:2) (**A**; siehe 1.1.6) und des PEMT-Pathways (PC16:0/22:6) (**B**; siehe 1.1.7).

### 1.1.7: PEMT-Pathway

Das Enzym Phosphatidylcholin-N-Methyltransferase (PEMT; EC: 2.11.17) katalysiert in drei sequenziellen Methylierungsschritten der Aminogruppe des Ethanolaminrestes die Umwandlung von Phosphatidylethanolamin (PE) zu Phosphatidylcholin (PC). Das neu synthetisierte PC besitzt dementsprechend die Fettsäurezusammensetzung des ausgehenden PE, welches viel ARA und DHA enthält. Die Bereitstellung von S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Methylgruppendorner und PE als Substrat sowie S-Adenosyl-Homocystein (SAH) als demethyliertes SAM regulieren die Aktivität der PEMT. Östrogen erhöht laut Literatur die Transkription des PEMT-Gens [33].

Der PEMT-Pathway bestimmt die limitierte Eigensynthese von Cholin (siehe oben) und bestimmt den Export der LC-PUFA (ARA, DHA) aus der Leber in andere Organe (Gehirn, Lunge und Weitere) [8, 36, 37, 38]. Für die in der Leber exprimierte PEMT existieren Isoenzyme: Die dominierende PEMT1 im endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie die PEMT2 in der Mitochondrien-assoziierten ER-Membran (MAM) [39].



**Abb. 8:** Schematische Darstellung des PEMT-Pathways. Einbeziehung von [D<sub>9</sub>-Methyl]cholinchlorid als D<sub>3</sub>C-Donor für die Synthese von deuteriertem SAM (siehe 2.4.2). Abkürzungen: D=Deuterium; PEMT= Phosphatidylethanolamin-Methyltransferase. (Quelle: Modifiziert nach [35]).

Beide Synthesewege des PC finden in der Leber statt, sind essentiell für die VLDL-Bildung und erzeugen komplementäre individuelle PC-Spezies (Tab. 2).

<b>CDP-Cholin-/Kennedy-Pathway</b>	<b>PEMT-Pathway</b>
Palmitoyl-Oleoyl-PC (PC16:0/18:1)	Palmitoyl-Docosahexaenoyl-PC (PC16:0/22:6)
Palmitoyl-Linoleoyl-PC (PC16:0/18:2)	Stearoyl-Arachidonoyl-PC (PC18:0/20:4)
Stearoyl-Oleoyl-PC (PC18:0/18:1)	Stearoyl-Docosahexaenoyl-PC (PC18:0/22:6)
Stearoyl-Linoleoyl-PC (PC18:0/18:2)	

**Tab. 2:** Molekulare Spezifität des CDP-Cholin-/Kennedy- sowie PEMT-Pathways mit deren wichtigsten Syntheseprodukten [40].

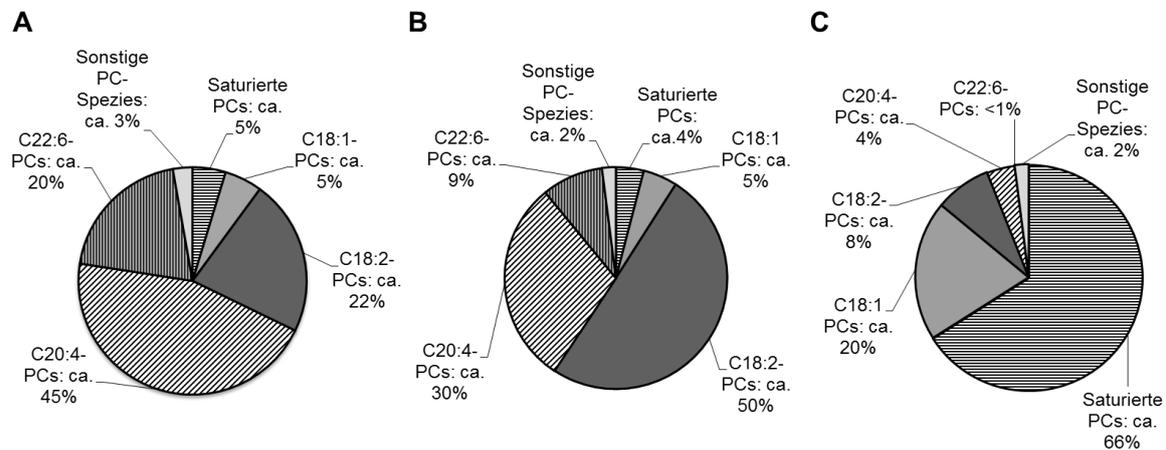
### 1.1.8: Lands-Zyklus

Mittels einer De- und Reacylierungsreaktion an der sn-2-Position seines Glycerolrestes wird über die Hälfte des neu synthetisierten PCs sekundär modifiziert [34]. Die Enzyme Phospholipase A2 (EC: 3.1.1.4) sowie Lysophosphatidylcholinacyltransferase (LPCAT; EC: 2.3.1.23) katalysieren diese Reaktionen [41, 42]. Durch diesen Austausch der Fettsäurereste entstehen für jeweilige Organe typische molekulare PC-Verteilungsmuster, welche z.B. in Lunge und Leber sehr unterschiedlich sind. In der Lunge entsteht über den Lands-Zyklus 50% des für den Surfactant charakteristischen PC16:0/16:0 aus PC16:0/18:1 und PC16:0/18:2 [43]. Bei der Markierung mit D<sub>9</sub>-Cholin werden molekulare Veränderungen des PC durch den Lands-Zyklus nicht erfasst.

### 1.1.9: Organotypische Zusammensetzung der PC-Spezies

Surfactant enthält insbesondere die disaturierten PC16:0/16:0 und PC16:0/14:0, PC14:0/16:0 und das monounsaturierte PC16:0/16:1, aber nur geringe Anteile hochungesättigter PC-Spezies [44]. Dem entgegen sind Leber und Plasma reich an C20:4-, C22:6- und C18:2-haltigen PCs und enthalten wiederum nur

wenig PC16:0/16:0 (Abb. 9A-C). Insbesondere das PC des fetalen Plasmas ist reich an PC16:0/20:4 und PC16:0/22:6, enthält aber verglichen mit Erwachsenen weniger PC16:0/18:2 und PC18:0/18:2 (siehe hierzu auch Abb. 21A+B).



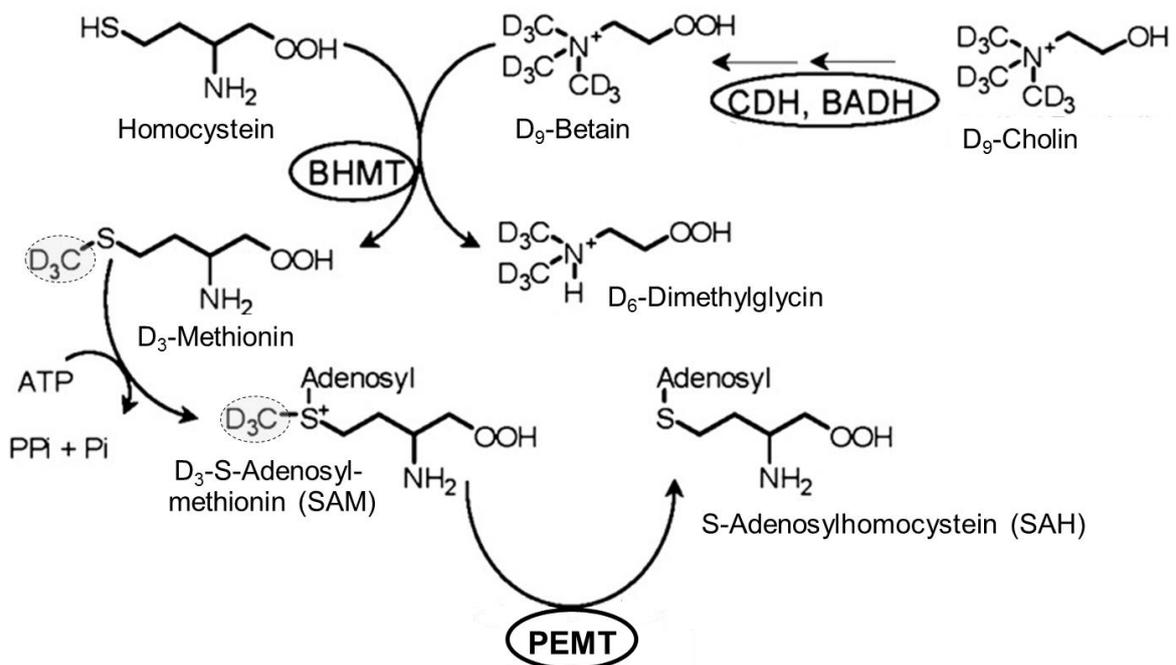
**Abb. 9:** Anteile der PC-Subgruppen im Lebergewebe (A), Blutplasma (B) und Surfactant (C) 14 Tage alter Ratten.

### 1.1.10: Cholin und seine Metaboliten hinsichtlich anderer Funktionen

Cholin hat weitere Funktionen im Organismus. Es ist wichtiger Donor von 1-Kohlenstoffeinheiten (C1-), unter anderem Methylgruppen. Dazu wird Cholin zunächst an der OH-Gruppe über die Cholin-Dehydrogenase (CDH, EC:1.1.99.1) sowie die Betain-Aldehyddehydrogenase (BADH, EC:1.2.1.8), zu Betain (Trimethylglycin) oxidiert. Die Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT, EC: 2.1.1.5) katalysiert anschließend die Übertragung einer Methylgruppe des Betains auf Homocystein, wodurch Methionin und Dimethylglycin (DMG) entstehen (siehe hierzu Abb. 10). Cholin ist also Quelle für die Bildung von Betain und damit C1-Donor für die Umwandlung von Homocystein zu Methionin [45]. Methionin ist nicht allein Starteraminosäure der Proteinbiosynthese und Bestandteil fertig prozessierter Proteine, sondern dient überwiegend (80%) der Bildung von S-Adenosyl-Methionin (SAM), dem Methylgruppendonor für die PEMT-Reaktion (siehe oben) sowie der Synthese von Creatin [46]. SAM ist darüber hinaus für den Adrenalin- und Histaminabbau

sowie für viele andere Methylierungen essentiell, insbesondere für die epigenetische Regulation via DNA- und Histon-Methylierung [35, 47]. Betain ist überdies ein ubiquitäres und für die Konzentrationsfähigkeit der Nierentubuli wichtiges Osmolyt sowie auch für die Mitochondrienfunktion essentiell [48]. Obwohl diese Funktionen von direkt aufgenommenem Betain ausgeübt werden, ist Cholin die endogene Betain-Quelle [49].

Darüber hinaus sind weitere Metabolite des Cholins für C1-Übertragungen wichtig. Dimethylglycin kann weiter zu Monomethyl-Glycin (Sarkosin; Dimethylglycin-Oxidase, EC: 1.5.3.10) und Glycin (Sarcosin-Dehydrogenase, EC: 1.5.8.3) mit (Tetrahydro-)Folsäure als C1-Akzeptoren abgebaut werden. Damit ist Folsäure C1-Akzeptor und Transportmolekül, während die C1-Einheiten aus Cholin stammen und die C1-Übertragungen inklusive der DNA-/Nucleotid-Biosynthese gewährleisten [50, 51, 52].



**Abb. 10:** Synthese von D<sub>3</sub>-S-Adenosyl-Methionin. Abkürzungen: D = Deuterium; CDH = Cholindehydrogenase; BADH = Betain-Aldehyddehydrogenase; BHMT = Betain-Homocystein-Methyltransferase; ATP = Adenosintriphosphat; (P)Pi = (Pyro-)Phosphat; PEMT = Phosphatidylethanolamin-Methyltransferase. (Quelle: Modifiziert nach [35]).

## 1.2: Cholinmangel beim Frühgeborenen

Cholin ist seit 1998 als essentieller Nährstoff definiert [53]. Während PC und SPH wichtig für Zellmembranen und diverse Sekrete sind (siehe hierzu 1.1.1), spielt Acetylcholin (ACh) unter anderem als Neurotransmitter eine Rolle. In diesem Zusammenhang stimuliert Cholin möglicherweise die Neurogenese, Ausbildung von Synapsen sowie die Organisation des Gehirns während der Entwicklung [54, 55, 56]. Die Bedeutung einer ausreichenden Versorgung mit Cholin für die prä- und postnatale Entwicklung wurde mehrfach in Tiermodellen gezeigt [57, 58, 59]. Maternale Cholinversorgung und -plasmakonzentration während der Schwangerschaft haben eine direkte Auswirkung auf die kognitive Leistung der Nachkommen [60, 61]. Cholin wird auch beim Menschen aktiv durch die Plazenta transportiert, was – verglichen mit maternalem Plasma – zu einer dreifach erhöhten Konzentration im fetalen Plasma führt [62, 63]. Dementsprechend bestehen während Schwangerschaft und Stillzeit auch für die Mutter ein erhöhter Bedarf an Cholin [64]. Freies Cholin und insbesondere Cholinester sind in ausreichender Konzentration in der Muttermilch vorhanden, um die Versorgung des reifen Neugeborenen zu gewährleisten, wenngleich diese in der Milch von Müttern Frühgeborener wahrscheinlich nicht bedarfsdeckend sind [65; 66]. Die US-amerikanische National Academy of Sciences hat Empfehlungen hinsichtlich der adäquaten Aufnahme (adequate intake; AI) von Cholin ausgesprochen. Während Männern 550 mg/d empfohlen wurden, sind es für Frauen – bei leichterem Körpergewicht – 425 mg/d, für Schwangere 450 mg/d sowie für Stillende 550 mg/d. Der gewichtsbezogene AI beträgt 17-18 mg/kg/d für Säuglinge und 7-8 mg/kg/d für Erwachsene. Aufgrund der 3-4-fach höheren Wachstumsraten ist der Bedarf insbesondere beim Frühgeborenen wahrscheinlich viel höher; ebenso wie bei der Proteinzufuhr. [57, 67, 68, 69] Feten mit einem Gestationsalter (GA) von 24 – 34 Wochen wachsen erheblich schneller als reifgeborene Säuglinge, sodass die Frühgeburt in diese kritische Phase des progredienten Wachstums fällt [70, 71, 72]. Die Cholinzufuhr Frühgeborener liegt im Allgemeinen jedoch erheblich unter dem geschätzten AI von mindestens 25 – 32 mg/kg/d, insbesondere in den ersten beiden postnatalen Wochen sowie in Phasen parenteraler Ernährung [73, 57].

Obwohl der geschätzte Bedarf umso höher, je kleiner das Frühgeborene ist, sind Frühgeborene mit extrem niedrigem Geburtsgewicht (ELBW; <1.000 g) besonders schlecht mit Cholin versorgt; vor allem dann, wenn beispielsweise durch Infekte, Ileus oder andere Komplikationen keine adäquate enterale Ernährung möglich ist [57].

### **1.2.1: Cholin und sein Bezug zu den konditionell essentiellen Fettsäuren Arachidonsäure und Docosahexaensäure**

Die essenziellen Fettsäuren Arachidonsäure (C20:4) und Docosahexaensäure (C22:6) sind konstitutionelle Bestandteile der Membranphospholipide, mit in engen Rahmen definierten Konzentrationen, und für die normale fetale Entwicklung unabdingbar [74, 75].

Nervengewebe besitzt eine besonders hohe Menge C22:6. Die Akkumulation beginnt bereits in utero und reicht bis in die ersten beiden Lebensjahre, in welchen es zu ZNS-Wachstum und -Differenzierung kommt. C22:6 aus der Muttermilch wird direkt in das Gehirn von Säuglingen inkorporiert; gestillte besitzen im Vergleich zu parenteral ernährten Säuglingen einen höheren C22:6-Anteil sowohl in ihren Erythrozyten als auch im Cortex des Gehirns. [76] Effekte der Regulierung und Akkumulation von C20:4 sind noch nicht vollständig geklärt. Im Gehirn kommt es in der Spätschwangerschaft sowie ersten Lebensjahr zur schnellen Zunahme von C20:4. Ein vermindertes Wachstum bei erniedrigtem C20:4 [77] sowie eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum werden diskutiert [78].

Zwar sind Stoffwechselwege zur endogenen Synthese vorhanden (C20:4-Synthese aus Linolsäure [C18:2n-6] und C22:6-Synthese aus alpha-Linolensäure [C18:3n-3]), jedoch synthetisieren diese nicht bedarfsdeckend, insbesondere nicht für den hohen Bedarf des Feten/Frühgeborenen [79, 80]. Während der Schwangerschaft wird der Fetus daher plazentar nicht nur mit großen Mengen von Cholin, sondern auch von C20:4 und C22:6 versorgt. Ab ca. 34 Wochen Gestationsalter steigt C22:6 im fetalen Plasma gegenüber der Gravida progredient an [81, 82, 83].

Epidemiologische Daten zeigen, dass Säuglinge, welche nicht ausschließlich mit Muttermilch gestillt werden, ein höheres Risiko für Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis haben [84]. Die Inzidenz dieser Leiden wie beispielsweise Asthma bronchiale, Heuschnupfen, das atopische Ekzem (Neurodermitis), Lebensmittelunverträglichkeiten und anderer allergischer Syndrome sind häufig mit einer erhöhten Zufuhr von Linolsäure (LA) bei gleichzeitig niedriger Aufnahme von Eicosapentaensäure (EPA) und C22:6 assoziiert; der sogenannten Western Pattern Diet (WPD, zucker- und fettreiche Diät) [85]. Mehrere Ernährungsinterventionsstudien legen nahe, dass die Ergänzung mütterlicher Nahrung mit Fischöl (während der späten Schwangerschaft und/oder der Laktationsperiode) sowie die Zufuhr von C20:4- und C22:6-angereicherter Säuglingsnahrung die immunologische Funktion so verändern, dass diese vorteilhaft für die orale Toleranzentwicklung, also der Toleranz der Darmmukosa gegenüber Nahrungsantigenen, im ersten Lebensjahr ist [86, 87, 88]. Sekundär kann ein Mangel zu Hepatosteatose, Nierentoxizität sowie Anomalien der Lunge führen [89].

Ebenso wie beim Cholin ist der Bedarf an C20:4 und C22:6 bei Frühgeborenen mit einem PMA von 24 – 34 Wochen aufgrund des raschen Wachstums besonders hoch, was insbesondere dann zum Tragen kommt, wenn eine intensivmedizinische Versorgung notwendig ist [70, 71, 72].

Zusammenfassend gilt, dass Cholin und die konditionell essenziellen Fettsäuren C20:4 und C22:6 metabolisch zusammengehören im Kontext des PC betrachtet werden müssen. Sie spielen eine kritische Rolle für die Entwicklung des Organismus, da sie in ihren Gewebekonzentrationen in engen Grenzen konstant gehalten werden. Die Stoffwechselwege zur Synthese von Cholin, C20:4 und C22:6 produzieren nicht bedarfsdeckend.

## 2. Methoden und Materialien

### 2.1: Versuchsplanung

Das in dieser Arbeit angewandte Tiermodell wurde zuvor für Untersuchungen des postnatalen Lipidmetabolismus der Lunge und der Leber eingesetzt [90, 91, 92]. Es wurden Ratten im Alter von 7 Tagen (d7) sechs Behandlungsmodalitäten zugeordnet und bis zum Alter von 14 Tagen (d14) täglich einmalig parenteral (intraperitoneal [i.p.] bzw. subkutan [s.c.]) behandelt. Anschließend gingen sie in den Terminalversuch mit Organentnahmen nach Töten durch Entbluten ein:

- Kontrolle ("Kontr.")
- Östradiol ("Estr.")
- Progesteron ("Prog.")
- Progesteron + Östradiol. („Prog. + Estr.“)
- Tamoxifen ("Tam.")
- Tamoxifen + Östradiol ("Tam. + Estr.").

10 Minuten vor Entbluten und Organentnahme wurden die Versuchstiere mit Ketamin/Xylazin i.p. in Narkose versetzt. Nach Prüfung der Areflexie erfolgte die Fixierung der Ratten auf einer Styroporplatte sowie die Abpräparation des Fells auf der Bauchseite. Die Trachea wurde freigelegt und eine Kanüle endotracheal eingebracht. Anschließend wurde das Abdomen eröffnet, die Thoraxhöhle via Diaphragma eröffnet und Diaphragma sowie ventrale Thoraxwand reseziert. Das Töten durch Entbluten erfolgte durch Blutentnahme aus dem rechten Herzventrikel. Anschließend wurden Lunge und Leber mit eisgekühlter isotonomischer Kochsalzlösung via Truncus pulmonalis bei 10-15 cm Wassersäule entblutet. Eine Lungenspülung zur Surfactantgewinnung wurde durchgeführt und Lunge, Leber, Großhirn, Kleinhirn und weitere Organe entnommen. In diese Arbeit gingen Blutplasma und Lebergewebe in die Analytik ein (Details siehe 2.4.3).

## **2.2: Versuchsaufbau**

Rattenwürfe wurden vom ersten Lebenstag an gemeinsam mit ihrem Muttertier bei Raumtemperatur in Individually Ventilated Cage (IVC)-Käfigen (Scanbur ScanTainer® Ventilated Cabinet) unter spezifisch pathogenfreien (SPF-)Bedingungen gehalten. Die Muttertiere verfügten über autoklaviertes Leitungswasser sowie bestrahltes Nagetierfutter (ssniff® M/Z V1124-703). Die Jungtiere wurden während der Versuchsdauer gesäugt.

## **2.3: Organisation des Tierversuchs**

Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt („Unterversorgung mit Cholin und Östrogenen bei Reif- und Frühgeborenen“; Versuchs-Nr. K 4/09; befristet bis 15.10.2012; verlängert bis zum 15.07.2014). Es wurden männliche und weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) in der Tierhaltung des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung Tübingen ab einem Alter von 8 Wochen jeweils über 4 Tage mehrmals verpaart. Die Wurfgröße wurde, unter Umständen durch Austausch neugeborener Tiere während der ersten 3 Tage nach Geburt, auf 12 Tiere eingestellt.

## **2.4: Hormonelle Behandlung, Markierung und Organentnahme**

### **2.4.1: Hormonelle Behandlung der Versuchstiere**

Die Auswahl der Tiere für die Gruppenzugehörigkeit erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Die hormonelle Behandlung fand täglich morgens um 10:00 Uhr statt. Zur Identifikation der Tiere wurden definierte Areale an den Ohren der Versuchstiere exzidiert (kein, rechtes, linkes oder rechtes & linkes Ohr). Die Behandlungslösungen wurden jeweils mit einer Einmalkanüle (27G) subkutan in den zervikalen bzw. kaudalen Rückenbereich des Tieres injiziert.

Die Hormone bzw. Hormonantagonisten wurden als Festsubstanzen mit einer Analysenwaage in ein steriles Reagenzglas eingewogen, mit sterilem Lösungsmittel versetzt und 10 Minuten im Ultraschallbad zur Lösung und

Homogenisierung behandelt. Die Injektionslösungen, Konzentrationen und Dosierungen sowie ihre Injektionsvolumina sind in der Tabelle 3A+B aufgeführt.

<b>A: Substanzen</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Dosierung</b>	<b>Lösungsmittel</b>	
	<b>mg/mL</b>	<b>mg/g</b>		
<b>Kontrolllösung</b>	-	-	0,9%ige NaCl-Lösung mit 2% Ethanol	
<b>Östradiol</b>	10	0,1	0,9%ige NaCl-Lösung mit 2% Ethanol	
<b>Progesteron</b>	20	0,1	Maisöl	
<b>Tamoxifen</b>	100	1	0,9%ige NaCl-Lösung mit 2% Ethanol	

<b>B: Gruppen</b>	<b>Substanz</b>	<b>Injektionsvolumen</b>	<b>Substanz</b>	<b>Injektionsvolumen</b>
	<b>s.c. Rücken, kranial</b>	<b>µL/g</b>	<b>s.c. Rücken, kaudal</b>	<b>µL/g</b>
<b>Kontrolle</b>	Kontrolllösung	10	Kontrolllösung	10
<b>Östradiol</b>	Östradiol	10	Kontrolllösung	10
<b>Progesteron</b>	Progesteron	5	Kontrolllösung	10
<b>Progesteron + Östradiol</b>	Progesteron	5	Östradiol	10
<b>Tamoxifen</b>	Tamoxifen	10	Kontrolllösung	10
<b>Tamoxifen + Östradiol</b>	Tamoxifen	10	Östradiol	10

**Tab. 3:** **A:** Injektionslösungen mit jeweiliger Konzentration, Dosierung und Lösungsmittel. **B:** Behandlung der Versuchsgruppen.

### 2.4.2: Markierung mit D<sub>9</sub>-Cholin

Zur Untersuchung des Stoffwechsels, insbesondere der Kinetik von Cholin, Phosphatidylcholin und weiteren Cholinmetaboliten, wurde den Versuchstieren 1,5 Std., 6 Std. oder 24 Std. vor dem Töten durch Entbluten [D<sub>9</sub>-Methyl]cholinchlorid (D<sub>9</sub>-Cholin) i.p. injiziert. Vorteil dieser Methode ist die Messbarkeit neusynthetisierter (deuterierter) Komponenten mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ohne Radioaktivitätsbelastung und damit ihre Anwendbarkeit auch am Patienten [49]. Die intraperitoneale Injektion entspricht

dabei im Wesentlichen der Aufnahme per os, da das Peritoneum über die Pfortader drainiert wird.

Der Ersatz des Wasserstoffs (H) der Methylgruppen des Cholins durch schweren Wasserstoff (Deuterium, D) resultiert in einem Massenanstieg von +9 Dalton (Gramm pro Mol) für D<sub>9</sub>-Cholin und alle D<sub>9</sub>-Cholin-markierten Moleküle, sodass D<sub>9</sub>-Cholin und die daraus neugebildeten Komponenten via Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) von den nativen Analoga differenziert werden können [35, 93]. Die D<sub>9</sub>-Cholinchlorid-Lösung zur i.p.-Injektion wurde frisch in 0,9%iger NaCl-Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/mL (375 mosmol/L) angesetzt. Die Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert (50 mg/kg, 336µmol/kg; 10µL/g Körpergewicht). Der Bauch wurde zur optimalen intraperitonealen Verteilung anschließend vorsichtig massiert. Zur Identifikation wurden die Tiere für das zeitgerechte Versuchsende mittels eines wasserfesten Filzstiftes markiert. Der zeitliche Abstand der Injektionen wurde so gewählt, dass die Organentnahmen im Abstand von 20 Minuten stattfinden konnten. Die Anzahl der Versuchstiere in den Behandlungs- und Markierungsgruppen ist in Tabelle 4 aufgeführt.

	<b>D<sub>9</sub>-Cholin-Markierung</b>	<b>Versuchstiere</b>
	<b>Dauer (h)</b>	<b>Anzahl (n)</b>
Kontr.	1,5; 6; 24	16; 13; 6
Östr.	1,5; 6	6; 6
Prog.	1,5; 6	6; 6
Prog.+ Östr.	1,5; 6	6; 6
Tam.	1,5; 6	9; 6
Tam. + Östr.	1,5; 6	11; 13

**Tab. 4:** Übersicht der Behandlungsgruppen. Dargestellt ist die Markierungsdauer mit D<sub>9</sub>-Cholinchlorid in den Behandlungsgruppen und die jeweilige Anzahl der Tiere. Abkürzungen: Kontr. = Kontrolle; Östr. = Östradiol; Prog. = Progesteron; Tam. = Tamoxifen.

### 2.4.3: Präziser Ablauf des Finalversuchs

Die Narkose wurde durch i.p.-Injektion einer frisch angesetzten Lösung aus Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (4 mg/kg) 10 min+ vor dem Finalversuch hervorgerufen (Injektionsvolumen: 10µL/g Körpergewicht) und durch Areflexie

(Schwanzkneifreflex, Zwischenzehenreflex) überprüft. Die Ratten wurden auf einer Styroporplatte fixiert, das Fell von der Symphysis pubica bis zum Angulus jugularis aufgeschnitten und zu den Seiten hin abpräpariert. Die Trachea der Versuchstiere wurde ventral freipräpariert, mit einem Zwirnfaden umschlungen, eine abgestumpfte Kanüle (Größe: 19G) endotracheal eingebracht und diese mittels des Zwirnfadens fixiert. Danach wurde das Abdomen über einen Schnitt entlang der Linea alba und rechts und links unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Der Processus xiphoideus wurde angehoben und das daraufhin gut zugängliche Diaphragma per Inzision perforiert. Das Diaphragma wurde entlang des Rippenbogens reseziert, das Perikard eröffnet und die vordere Thoraxwand abpräpariert. Mittels einer Kanüle (Größe: 19G) wurde der rechte Ventrikel des Herzens punktiert und 0,9 - 1,2 mL Blut in eine 2 mL-Spritze aspiriert, was zum Entbluten und damit dem Tode des Versuchstieres führte. Das Blut wurde in ein 1,7 mL fassendes EDTA-Blutentnahmeröhrchen überführt, das in einem Eis-Wasser-Gemisch aufbewahrt und zeitnah zentrifugiert (1.000xg; 10 min; Raumtemperatur) wurde. Unmittelbar anschließend wurden Lunge und Leber via den rechten Ventrikel mittels eines Infusionssystems mit eisgekühlter 0,9%iger NaCl-Lösung perfundiert (Perfusionsdruck: 10-15 cm Wassersäule), um die Stoffwechselreaktionen zu stoppen. Dazu wurde eine gekürzte, den Truncus pulmonalis ausfüllende, 100µL-Pipettenspitze benutzt. Der Erfolg des Entblutens von Lunge und Leber wurde am Farbumschlag von rot nach weiß bzw. rotbraun nach graubraun verifiziert. Anschließend wurde die Lunge über den Trachealkatheter mit eisgekühlter 0,9%iger NaCl-Lösung bis auf ein Endvolumen von 12 mL lavagiert, welche in ein 15 mL fassendes Cellstar®-Röhrchen überführt wurden. Die Lavage erfolgte in ~1 mL Portionen, wobei die Lunge komplett inflatiert wurde, ohne Rupturen zu verursachen. Daraufhin erfolgte die Entnahme der Organe Lunge, Leber, Herz, Milz und Darm sowie – nach Eröffnen der Schädelkalotte – Klein- und Großhirn.

Die Lavageflüssigkeit wurde anschließend zentrifugiert (200xg; 10 min; Raumtemperatur), um Alveolarmakrophagen zu sedimentieren ohne die „large aggregates“ des Surfactant abzuzentrifugieren [94]. Die Gewebe wurden jeweils

in ein Cryo.S®-Röhrchen überführt, ebenso wie die zentrifugierte Lavageflüssigkeit, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

## **2.5.: Aufarbeitung von Leber und Blutplasma**

Lipidextraktionen wurden mittels Chloroform und Methanol unter Schaffung eines ternären Gemisches durchgeführt, in welchem alle niedermolekularen Komponenten einer Analysematrix löslich sind. Bei diesen Verfahren (Folch et al. [54]; Bligh & Dyer [55]) bewirkt der anschließend herbeigeführte relative Überschuss an Wasser und Chloroform die Trennung in eine Chloroform-Phase, welche die Lipide enthält, sowie eine Wasser/Methanol-Phase, in welcher sich die polaren niedermolekularen Metaboliten befinden. Die meisten Proteine werden dabei präzipitiert und finden sich als Schicht zwischen den Phasen (Plasmaextraktion nach Bligh & Dyer) oder auf dem Filter des Filtrationsschritts bei Gewebeextraktionen nach Folch et al.

### **2.5.1: Lipidextraktion des Lebergewebes nach Folch**

Bei der Methode nach Folch et al. [95] wird ein ternäres Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis 10:5:1 geschaffen. Die Phasentrennung wird anschließend durch Zugabe von 20 Vol.% 0,04%iger wasserlöslicher CaCl<sub>2</sub>-Lösung herbeigeführt. Die Oberphase enthält Cholin, Betain, Dimethylglycin, Phosphorylcholin, CDP-Cholin, hydrophile Abbauprodukte von Phospholipiden und weitere polare Komponenten. In der Chloroformphase befinden sich die Lipide. Von sämtlichen Versuchstieren wurde die Leber in toto verarbeitet; die Organgewichte betragen etwa 0,9 – 1,2 g. Zunächst wurde die Leber in 5 mL Methanol mittels des Ultraturrax®-Gewebezerkleinerers in einem 50-mL-Probenröhrchen homogenisiert. Dies wurde nach Zugabe von 10 mL Chloroform wiederholt. Das Homogenat wurde über einen Faltenfilter in ein weiteres 35 mL-Reagenzglas überführt, um präzipitierte Proteine zu entfernen. Für die verlustfreie Überführung wurden Homogenisieraufsatz, Extraktionsgefäß und Filter 3-4x mit einem Chloroform:Methanol-Gemisch 2+1 (CM 2+1) gespült, wobei im Reagenzglas ein Volumen von 25 mL erreicht wurde. Anschließend wurden 5 mL einer

0,04%igen CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugeführt und das Gemisch kräftig geschüttelt. Das milchig-weiße 2-Phasen-System wurde anschließend zentrifugiert (2.800xg; 20min; 4°C) und Ober- sowie Unterphase getrennt weiterverarbeitet. Das Volumen der Oberphase wurde quantifiziert, dokumentiert und es wurden zweimal je 4 mL für die Analytik bei -80°C asserviert. Die Unterphase wurde durch Zugabe von CM 2+1 auf ein Endvolumen von 20 mL gebracht und ebenfalls asserviert. Die weiteren Arbeitsschritte werden im Abschnitt 2.6 erläutert.

### **2.5.2: Plasmaextraktion nach Bligh & Dyer**

Dieses Verfahren [96] folgt demselben Prinzip der Bildung eines ternären Gemisches aus Chloroform, Methanol und Wasser. Es benötigt weniger Gesamtvolumen und ist für Flüssigkeiten mit geringeren Stoffkonzentrationen geeigneter als die Methode nach Folch et al. 50µL Blutplasma wurden mit 50µL D<sub>4</sub>-Cholin-Lösung (interner Standard für wasserlösliche Metabolite, 30µM in Wasser), 25µL Phospholipid-Gemisch (Interner Standard aus 500 mmol/L 1,2-Di-Arachidoyl-Phosphatidylcholin [PC20:0/20:0] und xyz mmol/L 1,2-dimyristoyl-PC [PE14:0/14:0]) und 5µL Butylhydroxytoluol [BHT]-Lösung (2.500 mg/L) als Antioxidans versehen. Anschließend wurden 700µL Wasser, 800µL Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) sowie 2.400µL Methanol zugegeben (C:M:H<sub>2</sub>O = 1+3+1, v/v), gründlich auf dem Rüttler durchmischt und das Gemisch eine Stunde im Kühlschrank (<6°C; dunkel) inkubiert. Anschließend wurden 1.600µL Wasser sowie 2.400µL CHCl<sub>3</sub> zugegeben, das Gemisch nach Verschluss mit dem Schraubdeckel geschüttelt und 20 Minuten bei 3.000xg und 4°C zentrifugiert. 4 mL der 4,8 mL Oberphase wurden in ein Glasröhrchen mit Schraubverschluss transferiert und der Rest verworfen. Danach wurde die Unterphase mit einer Glas-Pasteurpipette und Pellesball in ein Glasröhrchen mit Schraubverschluss überführt und mit CM 2+1 auf 4 mL aufgefüllt. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die weiteren Arbeitsschritte werden in Abschnitt 2.6 erläutert.

Die Berechnung der Größe des Plasma-Pools erfolgte gewichtsadaptiert. Pro kg KGW wurde von 80 mL Blutvolumen ausgegangen. Bei einem Hämatokrit von 0,4 entspricht dies 56 mL/kg. [97].

## **2.6.: Analytik der Phospholipide und wasserlöslichen Metabolite**

### **2.6.1: Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie**

Mittels der Massenspektrometrie können geladene Moleküle anhand ihrer Masse quantifiziert werden. Dies ist für Phosphatidylcholin (PC) und andere Phospholipide sowie für Cholin und seine Derivate anwendbar: Sie werden in einem positiven Spannungsfeld einfach protoniert und besitzen dann eine definierte positive Masse/Ladung ( $m/z$ ), welche um 1 Dalton (Da) höher ist als die des Ausgangsmoleküls. Andere Substanzen können unter negativer Spannung zu Anionen umgewandelt werden, die unter  $H^+$ -Abgabe ein negatives, um 1 Da geringeres  $m/z$  als die Originalmasse besitzen. Kohlenstoffhaltige Moleküle enthalten das Isotop  $^{13}C$  (Häufigkeit ca. 1,1%), was bedeutet, dass das mittlere Molekulargewicht eines Stoffes sich aus Molekülen mit unterschiedlich vielen  $^{13}C$ -Atomen zusammensetzt, so dass es mehrere monoisotope Massen einer Verbindung gibt,  $M+0$ ,  $M+1$ ,  $M+2$  usw. Bei der Massenspektrometrie wird die monoisotope Masse/Ladung ( $m/z$ ) des Moleküls  $M+0$  quantifiziert und das Signal um die prozentuale Häufigkeit der zusätzlichen natürlichen  $m/z$ -Werte ( $M+1$  bis  $M+4$ ) korrigiert.

Die Tandem-Massenspektrometrie nutzt darüber hinaus die gezielte Fragmentierung von Molekülen mit einem definierten  $m/z$  in charakteristische („diagnostische“) Fragmente, um die Quantifizierung eindeutig zu machen. So hat zum Beispiel 1,2-Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/16:0, „DPPC“) ein monoisotopes  $m/z$  von +734. Sein diagnostisches Fragment im positiven Ionisationsmodus ist, wie bei jedem anderen Phospholipid, das Cholin als polare Kopfgruppe hat (molekulare Spezies von PC, Lyso-PC, Sphingomyelin, siehe oben), Phosphorylcholin mit  $m/z = +184$ . Durch diese Fragmentierung wird nur eine Substanz mit  $m/z = +734$  erfasst, welche Phosphorylcholin als Kopfgruppe besitzt, also PC16:0/16:0. Damit ist die Analytik sehr spezifisch, da

andere Komponenten mit einer  $m/z = +734$  nicht detektiert werden. Einschränkend ist zu sagen, dass PC mit derselben Masse, wie z.B. Stearoyl-Myristoyl-PC (PC18:0/14:0), welches dieselbe Summenformel hat, miterfasst werden. Diese Substanz kommt jedoch praktisch nicht vor, was durch Fragmentierung im negativen Ionisationsmodus und Quantifizierung der Fettsäurefragmente (Stearat-, Palmitat- und Myristat-Anion) gezeigt ist.

Die zu analysierenden verdünnten Probenlösungen wurden in Probengefäßen in einem Autosampler (Thermo Finnigan Surveyor Autosampler Plus) bei 4°C vorgehalten. Nach Entnahme von 25µL Probenlösung wurde das Aliquot über eine automatische Probenschleife in den Strom der mobilen Phase (Laufmittel) injiziert. Die mobile Phase wurde mithilfe einer Präzisionspumpe (Thermo Finnigan Surveyor MS Pump Plus) über eine Trennsäule („HILIC Plus 3,5µm 2,1 x 100 mm“ für wässrige Metabolite bzw. „Polaris 3 Si-A 100 x 2,0 mm“ für PC, jeweils von Agilent Technologies für PC) zum Massenspektrometer (Thermo Scientific TSQ Quantum Discovery MAX) gepumpt. Die Analyte der Proben, insbesondere PC, Lyso-PC und SPH, die Cholin enthalten, wurden durch die Trennsäule getrennt, was deren Sensitivität erhöhte, und erreichten dann zeitlich versetzt die Ionenquelle (Probeneingang zur Ionisierung der Komponenten) des Massenspektrometers. Diese Trennung separierte insbesondere PC und SPH voneinander, da diese zum Teil überschneidende Massen haben sowie von anderen Lipiden, die mit der Ionisierung von PC interferieren (z.B. PC16:0/16:1 und C18:0-SPH).

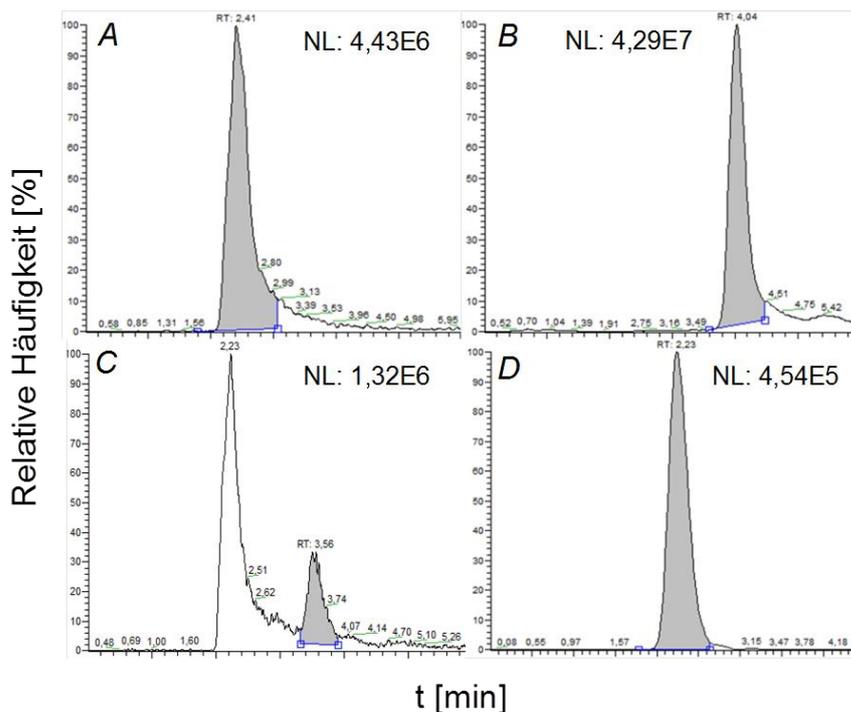
Das Lösungsmittel wird bei der Massenspektrometrie am Eingang zur Ionenquelle (Thermo Scientific H-ESI® Probe) durch Erhitzung auf 175°C verdampft und die Analyte durch Anlegung einer Ionisationsspannung (+3.500V) ionisiert. Die entstandenen Ionen werden durch die Transferkapillare in das Vakuum des Massenspektrometers gesogen und durch ein rotierendes elektrisches Gleichstromfeld beschleunigt. Die Ionen fliegen entlang der Längsachse dreier hintereinandergeschalteter Quadrupole. Diese besitzen jeweils vier parallel liegende Stabelektroden. Deren Schnittpunkte bilden mit der Flugbahnebene ein senkrecht zur Zylinderachse liegendes Quadrat. Durch alternierenden Wechsel der Gleichspannung werden die Teilchen invers

proportional zum m/z-Wert abgelenkt und treffen schließlich auf einen Detektor mit integriertem Messverstärker, welcher den Ionenstrom misst. Aufgrund der Selektion der Analyte im Spannungswchselfeld zwischen den Quadrupolen können zu einem Zeitpunkt lediglich Moleküle mit einem bestimmten m/z-Verhältnis das elektrische Feld durchlaufen. Durch das „Scannen“ des Massenbereichs von  $m/z = 50 - 1.050$  können alle Komponenten erfasst werden (Single MS). Die zu analysierenden Moleküle werden im zweiten Quadrupol (Q2) fragmentiert. „Diagnostisches“ Fragment für PC ist Phosphorylcholin ( $m/z = +184$ ; siehe oben); für PE Phosphorylethanolamin ( $m/z = +141$ ). Für die Auflistung charakteristischer nativer und deuterierter Analyte, ihres m/z sowie ihrer Fragmente siehe Tabellen 5 (wasserlösliche Präkursoren), 8 (PC) sowie 9 (PE). Durch die Abspaltung eines definierten Fragments wird die Spezifität der Analysenmethode erhöht. Die m/z-spezifischen Total Ion Counts (TICs) werden erfasst und im Programm XCalibur 2.0.6 des Steuerungscomputers als Datenfile gespeichert.

Diese Rohdaten wurden in ein selbst programmiertes, hauseigenes Excel-Makro eingelesen und ausgewertet. Das Makro wurde von mir gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bernhard konzipiert und programmiert und kam bereits in verschiedenen Untersuchungen zum Einsatz [48, 49, 50, 52]. Bei der Analytik von PC, PE und SPH erfolgte eine Korrektur der massenspektrometrischen Rohdaten entsprechend der Länge ihrer Kohlenstoff [C]-Kette: Je kürzer die C-Kette eines Analyten, desto niedriger ist die Ionisierungsrate und damit sein Signal („relativer Response“). Darüber hinaus erfolgte die Korrektur der monoisotopen  $^{13}\text{C}$ -freien, detektierten Masse (M+0) um M+1, M+2 sowie M+3 entsprechend ihres von der Anzahl der Kohlenstoffatome abhängigen natürlichen Anteils. Die relative Isotopenhäufigkeit von  $^{13}\text{C}$  beträgt rund 1,1%; somit ist diese umso relevanter, je höher die Anzahl der C-Atome im Molekül ist: Bei einem PC mit 40 C-Atomen (z.B. PC18:0/22:6), macht der M+1-~44%, M+2- ~2,3% und M+3-Peak ~0,2% relativ zum monoisotopischen Signal aus. [98, 99, 100]

### 2.6.1.1: MS/MS-Analyse der wasserlöslichen Metabolite

Von 4 mL Oberphase des Lebergewebeextraktes wurde 1 mL entnommen und 100µL D<sub>4</sub>-Cholin-Standard (1,875µM) hinzugegeben und durchmischt. Davon wurden 100µL entnommen und mit 1 mL eines polaren Lösungsmittelgemisches (90% Azetonitril, 10% Wasser) endverdünnt. Die Analyte wurden über eine auf 40°C erwärmte Säule mithilfe eines Lösungsmittelgradienten getrennt. Die mobilen Phasen waren (A) 90% Azetonitril, 10% Wasser, 0,1% Ameisensäure und (B) 99,9% Wasser, 0,1% Ameisensäure. Die Elutionsbedingungen waren: 0→6 min: 600µL/min, 100% A; 6→7 min: 800µL/min, 20% A; 7→7,5 min: 800µL/min, 20% A; 7,5→8,0 min: 800µL/min, 100% A; 8,0→8,9 min: 800µL/min, 100% A; Tab. 6 zeigt die Analyseparameter der nativen und deuterierten wasserlöslichen Metaboliten.



**Abb. 11:** Plots der Analytik von wasserlöslichen Präkursoren. Cholin und D<sub>4</sub>-Cholin (A) werden nach 2,4 Minuten, Betain (B) nach 4,0 Minuten, Dimethylglycin (C) nach 3,6 Minuten und Phosphorylcholin (D) nach 2,2 Minuten eluiert.

	Masse/Ladung	Fragment
	m/z	m/z
Dimethylglycin	+104,05	+58,10
Cholin	+104,10	+60,10
D <sub>4</sub> -Cholin	+108,09	+60,10; +61,10
D <sub>6</sub> -Dimethylglycin	+110,05	+64,10
D <sub>9</sub> -Cholin	+113,09	+69,10
Betain	+118,03	+58,10
D <sub>9</sub> -Betain	+127,12	+68,25
Phosphorylcholin	+183,98	+86,00
D <sub>9</sub> -Phosphorylcholin	+192,98	+95,00

**Tab. 5:** Native und deuterierte wasserlösliche Metabolite sowie ihre Fragmente, die in der massenspektrometrischen Analytik erfasst wurden.

Spray Voltage	3.500 mV	Ionisationsspannung
Vaporizer Temperature	250°C	Temperatur des Verdampfers
Sheath Gas Pressure	50 Torr	Druck des Vernebelungsgases
Ion Sweep Gas Pressure	0.0 Torr	Druck des Gases zum Durchlauf der Ionen
Aux Gas Pressure	0 Torr	Druck des Hilfsgases
Capillary Temperature	325°C	Temperatur der Transferkapillare
Tube Lens Offset	89	Versatz der Tubuslinse
Skimmer Offset	0	Versatz des Ionenfängers
Collision Pressure	1,0 Torr	Kollisionsdruck
Collision Energy	-10 eV	Kollisionsenergie

**Tab. 6:** Geräteparameter des Massenspektrometers für die Analyse wasserlöslicher Metabolite.

Aus den Konzentrationen von Cholin, Phosphorylcholin und Betain sowie ihrer entsprechenden D<sub>9</sub>-Anreicherung errechnen sich die Konzentrationen ihrer deuterierten Derivate in der Leber. Darüber hinaus kann aus der Dimethylglycin-Konzentration sowie seiner D<sub>6</sub>-Anreicherung der Transfer von D<sub>3</sub>-Methylgruppen auf Homocystein berechnet werden. Für die Analytik der wasserlöslichen Metabolite wurden Kalibrierungskurven für sämtliche Analyte

erstellt, da die Intensitäten ihrer Messsignale unterschiedliche Steigungen haben. Im oberen Messbereich steigt die Kurve nicht mehr linear zur Signalintensität; diese Abflachung ist überdies individuell für jeden Analyten.

### **2.6.1.2: MS/MS-Analyse der Phospholipide der Unterphase**

Lebergewebe enthält  $\sim 25 \mu\text{mol/g}$  Phospholipide (PL) und ca.  $20 \mu\text{mol/g}$  PC [24], die in 20 mL Chloroformphase aus der Extraktion von ca. 1 g resultieren, entsprechend einer PC-Konzentration von 1 mmol/L. Zur Quantifizierung musste noch interner Standard für die PC-, SPH-, Lyso-PC und PE-Detektion zugegeben werden. Bei einer PC-Konzentration im Plasma von ca. 2 mmol/L enthalten 4 mL Chloroformphase ca. 25 mmol/L PC. Die Extraktlösungen wurden auf eine Endkonzentration von  $\sim 5 \mu\text{mol/L}$  verdünnt. Dazu wurden zu 100  $\mu\text{L}$  Chloroformphase des Leberextrakts (entsprechend  $\sim 125 \text{ nmol PC}$ ) 25  $\mu\text{L}$  eines internen Analysenstandards in Trifluorethanol hinzupipettiert, entsprechend 12,5 nmol Diarachinoyl-Phosphatidylcholin (PC20:0/20:0) und 5 nmol Dimyristoyl-Phosphatidylethanolamin (PE14:0/14:00). Anschließend wurden die Proben mit 4 mL Chloroform:Methanol (60+40; „CM60+40“) verdünnt ( $\sim 1:41$ ). Davon wurden 200  $\mu\text{L}$  mit 1.000  $\mu\text{L}$  CM60+40 und von der Lipid-Unterphase des Plasmaextraktes direkt 200  $\mu\text{L}$  entnommen und mit ebenfalls 1.000  $\mu\text{L}$  CM60+40 verdünnt ( $\sim 1:6$ ), wodurch eine Endkonzentration von  $\sim 5 \mu\text{mol/L}$  PC erreicht wurde (siehe auch Tab. 7). Die Phospholipidklassen (Phosphatidylcholin [PC], Lyso-Phosphatidylcholin [Lyso-PC], Phosphatidyl-ethanolamin [PE], Sphingomyelin [SPH]) wurden mit einer auf 40°C erwärmten Säule getrennt. Die mobile Phase zur Trennung des PC/SPH war 60% Chloroform, 38% Methanol, 2% 300 mM Ammoniumacetat; mit Flussraten ansteigend von 400→600 mL/min (0 – 0,05 min), 600→600 mL/min (0,05 – 1,30 min), 600→400 mL/min (1,30 – 1,40 min) und 400→400 mL/min (1,40 – 7,00 min); siehe auch Abb. 16.

	Endogenes PC	PC via PEMT		PC via CDP-Cholin-/Kennedy-Pathway
	Masse nativ	Masse D <sub>3</sub> -Spezies	Masse D <sub>6</sub> -Spezies	Masse D <sub>9</sub> -Spezies
	m/z	m/z	m/z	m/z
Lyso-PC 14:0	+468,31	+471,31	+474,31	+477,31
Lyso-PC 16:0	+496,34	+499,34	+502,34	+505,34
Lyso-PC 18:2	+520,34	+523,34	+526,34	+529,34
Lyso-PC 18:1	+522,36	+525,36	+528,36	+531,36
Lyso-PC 18:0	+524,37	+527,37	+530,37	+533,37
16:0-SPH	+703,57	+706,57	+709,57	+712,57
PC16:0/14:0	+706,54	+709,54	+712,54	+715,54
PC16:0/16:1	+732,55	+735,55	+738,55	+741,55
PC16:0/16:0	+734,57	+737,57	+740,57	+743,57
PC16:0/18:3	+756,55	+759,55	+762,55	+765,55
PC16:0/18:2	+758,57	+761,57	+764,57	+767,57
PC16:0/18:1	+760,59	+763,59	+766,59	+769,59
PC16:0/18:0	+762,60	+765,60	+768,60	+771,60
PC16:0/20:4	+782,57	+785,57	+788,57	+791,57
PC18:1/18:2	+784,59	+787,59	+790,59	+793,59
PC18:0/18:2	+786,60	+789,60	+792,60	+795,60
PC18:0/18:1	+788,62	+791,62	+794,62	+797,62
PC18:0/18:0	+790,63	+793,63	+796,63	+799,63
PC16:0/22:6	+806,57	+809,57	+812,57	+815,57
PC18:1/20:4	+808,59	+811,59	+814,59	+817,59
PC18:0/20:4	+810,60	+813,60	+816,60	+819,60
PC18:0/22:6	+834,60	+837,60	+840,60	+843,60
PC18:0/22:5	+836,62	+839,62	+842,62	+845,62
PC18:0/22:4	+838,63	+841,63	+844,63	+847,63
PC20:0/20:0	+846,69	-	-	-
Diagn. Fragm.	+184,05	+187,05	+190,05	+193,05

**Tab. 8:** Monoisotopische Masse/Ladung (m/z) nativer und deuterierter (D<sub>3</sub>-, D<sub>6</sub>- und D<sub>9</sub>-)PC-Spezies sowie ihrer diagnostischen Fragmente, welche in der massenspektrometrischen Analytik erfasst werden.

Procedere	Leber	Plasma
Volumen	20 mL (= ~1 μmol/mL PC)	4 mL (= ~25 mmol/L PC)
Unterphase		
Zwischenverdünnung	100 μL Unterphase + 25 μL int. Std.-Lsg. + 4 mL CM60+40 = ~25 μmol/L PC	
Endverdünnung	200 μL Zwischenverd. + 1.000 μL CM60+40	200 μL Unterphase + 1.000 μL CM60+40
Endkonzentration Messlösung	= ~5 μmol/L PC	= ~5 μmol/L PC

**Tab. 7:** Pipettierschema zur Probenverarbeitung für die Massenspektrometrie.

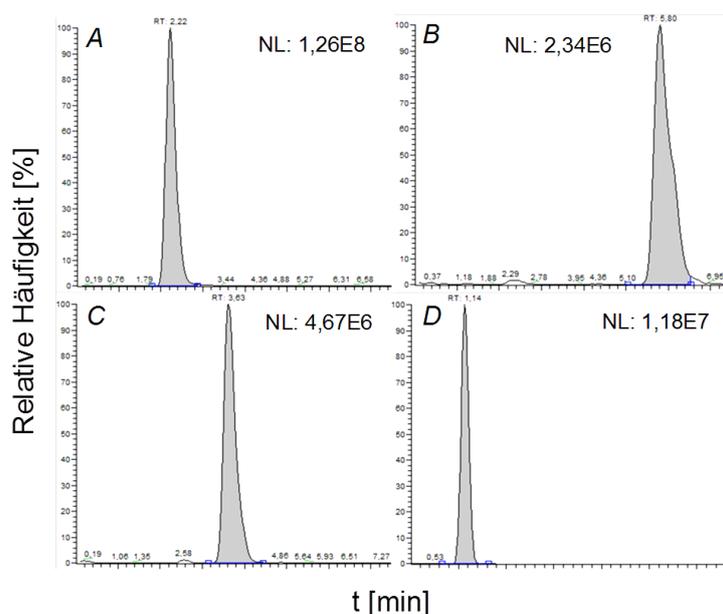
Analyt	Masse/Ladung nativ	Neutralverlust-Fragment
	m/z	m/z
Lyso-PE14:0	+426,26	+285,25
Lyso-PE16:0	+454,29	+313,28
Lyso-PE18:0	+482,32	+341,31
Lyso-PE20:4	+502,29	+361,28
Lyso-PE22:6	+526,29	+385,28
PE14:0/14:0	+636,46	+495,45
PE16:0/14:0	+664,49	+523,48
PE16:0/16:1	+690,51	+549,50
PE16:0/16:0	+692,52	+551,51
PE16:0/18:3	+714,51	+573,50
PE16:0/18:2	+716,52	+575,51
PE16:0/18:1	+718,54	+577,53
PE16:0/18:0	+720,55	+579,54
PE14:0/22:6	+736,49	+595,48
PE16:0/20:5	+738,51	+597,50
PE16:0/20:4	+740,52	+599,51
PE18:1/18:2	+742,54	+601,53
PE18:0/18:2	+744,55	+603,54
PE18:0/18:1	+746,57	+605,56
PE18:0/18:0	+748,59	+607,58
PE16:0/22:6	+764,52	+623,51
PE18:1/20:4	+766,54	+625,53
PE18:0/20:5	+766,54	+625,53
PE18:0/20:4	+768,55	+627,54
PE18:0/20:3	+770,57	+629,56
PE20:4/20:5	+786,51	+645,50
PE18:0/22:6	+792,55	+651,54
PE18:0/22:5	+794,57	+653,56
PE18:0/22:4	+796,59	+655,58

**Tab. 9:** Native PE-Spezies, die in der masenspektrometrischen Analytik erfasst werden.

Spray Voltage	3.500 mV	Ionisationsspannung
Vaporizer Temperature	175°C	Temperatur des Verdampfers
Sheath Gas Pressure	50 Torr	Druck des Vernebelungsgases
Ion Sweep Gas Pressure	0.0 Torr	Druck des Gases zum Durchlauf der Ionen
Aux Gas Pressure	0 Torr	Druck des Hilfsgases
Capillary Temperature	275°C	Temperatur der Transferkapillare

Tube Lens Offset	89	Versatz der Tubuslinse
Skimmer Offset	0	Versatz des Ionenfängers
Collision Pressure	1,0 Torr	Kollisionsdruck
Collision Energy	-10 eV	Kollisionsenergie

**Tab. 10:** Geräteparameter des Massenspektrometers für die Analyse der Phospholipidklassen PC und PE.



**Abb. 12:** Plots der Analytik von Phospholipiden. PC-Spezies (A) werden zwischen 2,08 - 2,66 Minuten, Lyso-PC-Spezies (B) zwischen 5,12 - 6,27, SPH (C) zwischen 3,1 - 3,63 Minuten und PE-Spezies (D) zwischen 0,87 - 1,41 Minuten eluiert.

### 2.6.1.3: Berechnung der D<sub>3</sub>-Markierung von S-Adenosyl-Methionin (D<sub>3</sub>-SAM), der deuterierten wasserlöslichen Derivate sowie der Transfer von D<sub>3</sub>-Methylgruppen auf Homocystein

S-Adenosyl-Methionin (SAM) ist alleiniger Methylgruppendonor für die hepatische Synthese von PC über den Methylierungsweg (PEMT) (siehe 1.1.6). Seine D<sub>3</sub>-Methyl-Anreicherung aus D<sub>9</sub>-Cholin via D<sub>9</sub>-Betain und die BHMT (siehe auch 1.1.10) lässt sich aus der D<sub>6</sub>- und D<sub>3</sub>-Markierung des PC errechnen. Die Formel lautet:  $D_6 / \sum D_3 + D_6$  [35, 101].

## 2.7: Lösungsmittel und Chemikalien

Für die Extraktionen und Analysen wurden für die Massenspektrometrie geeignete, hochreine Chemikalien („MS Grade“ oder „Ultra LC-MS Grade“) der nachfolgenden Hersteller verwendet.

Chemikalie	Hersteller; Firmensitz
Acetonitril ROTISOLV® Ultra LC-MS (HN40.2)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure 98 - 100% für LC-MS, LiChropur® (5.33002)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Ammoniumacetat für LC-MS, LiChropur® (5.33002)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Aqua bidest. (destilliertes Wasser)	Fresenius SE & Co. KGaA; Bad Homburg, Deutschland
Butylhydroxytoluol	Merck Schuchardt OHG; Hohenbrunn, Deutschland
Chloroform, BAKER ANALYZED™ ACS Reagent Grade (JT-9180-01)	JT Baker Chemicals; Phillipsburg, New Jersey, USA
Cholin-Chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> -Dihydrat	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
D <sub>9</sub> -Cholin-Chlorid (als interner Analysenstandard im Rahmen der Massenspektrometrie)	CDN Isotopes, Quebec, Canada
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, 250 mL	Fresenius SE & Co. KGaA; Bad Homburg, Deutschland
Selectavet Ketamin Hydrochlorid 10%, 10 mL	Selectavet Dr. Fischer GmbH; Weyarn-Holzolling, Deutschland
LiChrosolv®, Wasser für die Chromatographie, LC-MS (1.15333.2500)	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Methanol ROTISOLV® Ultra LC-MS (HN41.2)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
PC20:0/20:0 (als interner Analysenstandard im Rahmen der Massenspektrometrie)	Avanti Polar Lipids; Alabaster, Alabama, USA
Phospholipide zur Erstellung von substanzspezifischen Eichkurven, z.B. PC18:0/22:6	Avanti Polar Lipids; Alabaster, Alabama, USA
Argon 4.8 für Spektrometrie (Reingas)	Linde AG; München, Deutschland

Stickstoff 5.3 (Reingas)	Linde AG; München, Deutschland
Xylazin Hydrochlorid, 25 mL (Handelsname: Sedixylan®)	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte; Garbsen, Deutschland

**Tabelle 11:** Lösungsmittel und Chemikalien.

## 2.8: Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 2.8.1.1: Komponenten des Massenspektrometers

Gerätschaft	Firma; Sitz
Autosampler für die Massenspektrometrie: Thermo Finnigan SURVEYOR Autosampler Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ionenquelle: Interface H-ESI® (Heated Electrospray Ionization) Probe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kompressor für den Stickstoffmembrangenerator: SF 2 FF	Atlas Copco AB, Stockholm, Schweden
Massenspektrometer: Thermo Scientific Discovery MAX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pumpe für die Massenspektrometrie: Thermo Finnigan SURVEYOR MS Pump Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stickstoffmembrangenerator: NGM 11-LC/MS	cmc Instruments GmbH, Eschborn, Deutschland
Trennsäule für hydrophile Komponenten: HILIC Plus Säule, 3,5µm, 2,1 x 100 mm	Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA
Trennsäule für Phospholipide: POLARIS 3 Si-A 100 Säule, 3,5µm, 100 x 2,0 mm	Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA
Vakuumpumpe für das Massenspektrometer: E2M30	Edwards, Burgess Hill, England, U.K.

**Tabelle 12:** Auflistung der im Rahmen der Massenspektrometrie benutzten Geräte.

### 2.8.1.2: Weitere Gerätschaften

Gerätschaft	Firma; Sitz
Eppendorf Research Pipetten (100, 250, 500; 1000µL)	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Flaschenaufsatz-Dispenser Dispensette® S Organic Flüssigstickstoffbehältnis	Brand GmbH; Wertheim, Deutschland KGW Isotherm; Karlsruhe, Deutschland
Gefrierschrank Sanyo -80°C	Stiehl Kälte-und Klimatechnik; Tübingen, Deutschland
Gefrierschrank -32°C	Liebherr; Bulle, Schweiz
Glasflaschen Duran 500 mL	Duran Group GmbH; Mainz, Deutschland
Glastrichter 55 mm, Soda	Scherf Präzision Europa GmbH; Meningen, Deutschland
Glaspipette 10 mL Eterna	Brand GmbH; Wertheim, Deutschland
Handdispensierpipette HandyStep	Brand GmbH; Wertheim, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr; Bulle, Schweiz
Messzylinder Duran 50, 100, 250, 500, 1000 mL	Duran Group GmbH; Mainz, Deutschland
Mikroliterspritze Hamilton 25, 100 sowie 500µL	Hamilton Company; Reno, Nevada, USA
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen, Deutschland
ScanTainer® Ventilated Cabinet	Scanbur A/S; Karlslunde, Dänemark
Ultraschallbad SONOREX SUPER®	Bandelin Electronic; Berlin, Deutschland
ULTRATURRAX® T25basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen, Deutschland
Vortex REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG; Schwabach, Deutschland
Waage Sartorius AC121S	Sartorius AG; Göttingen, Deutschland
Zentrifuge MULTIFUGE 1 S-R	Heraeus Holding GmbH; Hanau, Deutschland
Zentrifuge ROTIXA 50 RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge ROTANTA/RPC	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

**Tab. 13:** Auflistung der übrigen benutzten Geräte.

## 2.8.2: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller; Firmensitz	Verwendungszweck
Cellstar-Röhrchen, PP-Test-Tubes, 15 mL, steril	Greiner BioOne GmbH; Frickenhausen, Deutschland	Aufbewahrung der Lungenlavageflüssigkeit
Cryo.S-Röhrchen, PP, mit Schraubverschluss, 2 mL, steril	Greiner BioOne GmbH; Frickenhausen, Deutschland	Aufbewahrung der Rattenorgane bei -80°C
Black Cap-Röhrchen, ca. 12 mL Fassungsvermögen	Einzelanfertigung	Lipidextraktion
EDTA-Röhrchen S-Monovette, 1,7 + 2,7 mL	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland	Antikoagulation des Rattenblutes
Eppendorf-Hütchen	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	Aufbewahrung von Rattenblutplasma
Kanülen BD Microlance 18, 20, 21, 24, 25, 27 G	BD Bioscience; Franklin Lakes, New Jersey, USA	Injektion und Lavagieren im Zuge des Tierversuchs
Multipettenspitzen Ritips, 1,25 mL, 5 mL, 12,5 mL sowie 50 mL	Ritter GmbH; Schwabmünchen, Deutschland	Pipettierhilfe
Faltenfilter Whatman, ø90 mm	Whatman GmbH; Dassel, Deutschland	Lipidextraktion
Falcon-Röhrchen, Blue Max, 50 mL Polypropylen Conical Tube	BD Bioscience; Franklin Lakes, New Jersey, USA	Lipidextraktion
MS Vials, Verex 9 mm, 2 mL zzgl. Verex Cap 9 mm mit PTFE-Septum	Phenomenex; Aschaffenburg, Deutschland	Massenspektrometrie
Pasteurpipetten, 150 mm	Wilhelm Ulbrich GdB; Bamberg, Deutschland	Lipidextraktion
Pipettenspitzen 10-100 µL, 50-1000µL	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland	Volumentransfer
Red Cap-Röhrchen, ca. 35 mL Fassungsvermögen	Einzelanfertigung	Lipidextraktion
Spritze Injekt, 2 mL, 5 mL sowie 10 mL	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland	Injektionen im Zuge des Tierversuchs
Wasserfilter Biopak Endfilter	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	Ultrafilter zur Erzeugung von Wasser für die MS-Analytik

**Tabelle 14:** Verbrauchsmaterialien.

## 2.9: Statistische Auswertung der Daten

Für die statistische Auswertung der im vorgenannten Excel-Makro verarbeiteten massenspektrometrischen Daten wurde das Computerprogramm JMP® (SAS Institute; Cary, NC, USA) in seiner 13. Version genutzt. Dabei erfolgte zunächst die Prüfung der Daten auf eine Normalverteilung. Die Varianzhomogenität wurde mithilfe des „One-way ANOVA“-Tests geprüft. Sofern diese jeweils gegeben waren, kam anschließend der einfache t-Test zum Vergleich zweier Gruppen zum Einsatz. Der Tukey-Kramer-HSD-Test wurde zum Vergleich mehrerer Gruppen genutzt und die Ergebnisse mithilfe der Bonferroni-Korrelation korrigiert. Ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  entsprechend 5% Irrtumswahrscheinlichkeit wurde als signifikant erachtet. Nachfolgende Signifikanzqualitäten und Grade wurden unterschieden:  $p < 0,05$  entsprechend „schwach signifikant“: \*, Vergleich mit Kontrolle; †, Vergleich mit Östradiol; ‡, Vergleich mit Progesteron;  $p < 0,01$ , entsprechend „signifikant“ (\*\*, ††, ‡‡) sowie  $p < 0,001$ , entsprechend „hoch signifikant“ (\*\*\*, †††, ‡‡‡).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1: Wachstum neonataler Ratten und Hormoneffekte

Von Tag 7-14 (d7-d14) nahm das Körpergewicht (KGW) der Kontrolltiere von  $15,5 \pm 1,7$  g auf  $29,4 \pm 3,0$  g ( $+95 \pm 13\%$ ) zu. Die absolute Gewichtszunahme war linear ( $2,17 \pm 0,14$  g/d) und die relative nahm bis zum d4 nach Versuchsbeginn ab. Das Lebergewicht an d14 betrug  $988 \pm 83$  mg, d.h.  $3,21 \pm 0,26\%$  des KGW.

A	Gewicht d7	Gewicht d14	Wachstum d7-14
	g	g	g
Kontr.	$15,5 \pm 1,7$	$29,4 \pm 3,0$	$15,2 \pm 1,0$
Östr.	$15,8 \pm 2,6$	$32,5 \pm 3,0^{**}$	$18,5 \pm 2,6^{**}$
Prog.	$15,4 \pm 2,2$	$30,1 \pm 3,1$	$14,8 \pm 2,7$
Prog. + Östr.	$15,4 \pm 2,3$	$30,3 \pm 3,7$	$15,4 \pm 2,0$
Tam.	$15,9 \pm 2,1$	$27,1 \pm 3,4^{**,\dagger\dagger}$	$11,4 \pm 1,2^{**,\dagger\dagger}$
Tam. + Östr.	$15,9 \pm 2,2$	$27,7 \pm 1,8^{**,\dagger\dagger}$	$11,6 \pm 2,1^{**,\dagger\dagger}$

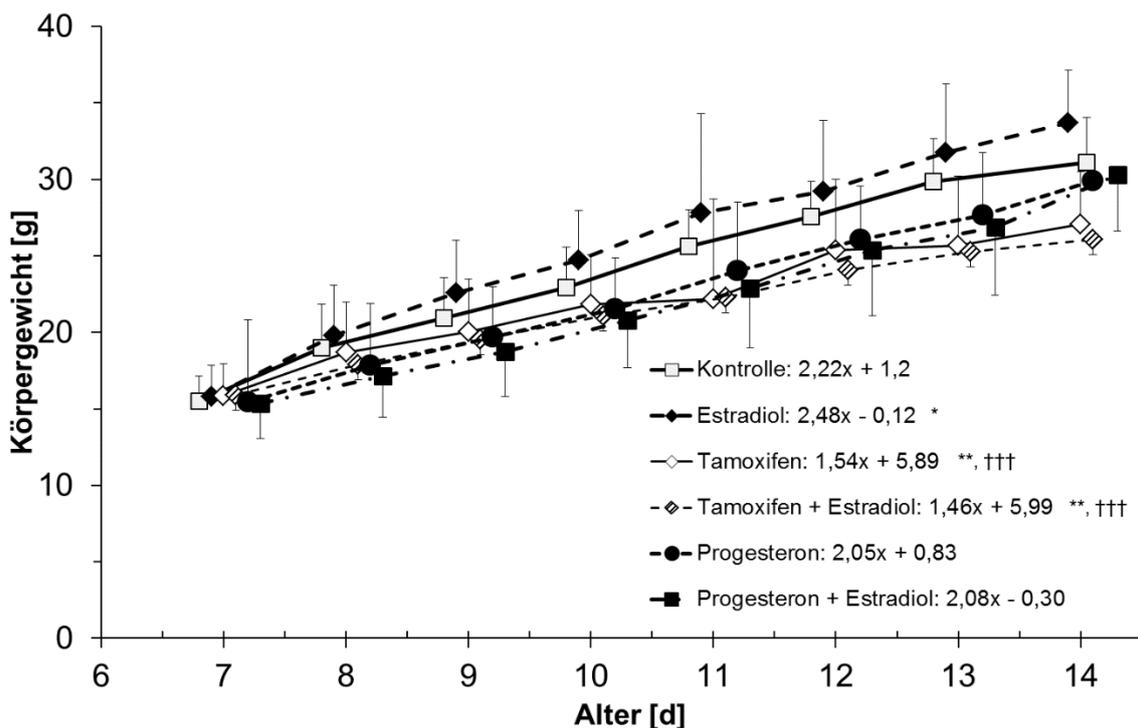
  

B	Wachstum d7-d14	Lebergewicht d14	Lebergewicht
	%	mg	% KGW
Kontr.	$95 \pm 13$	$988 \pm 83$	$3,21 \pm 0,26$
Östr.	$105 \pm 27^*$	$1.070 \pm 86^{**}$	$3,08 \pm 0,07^*$
Prog.	$95 \pm 22$	$965 \pm 93$	$3,34 \pm 0,42$
Prog. + Östr.	$94 \pm 23$	$962 \pm 136$	$3,32 \pm 0,26$
Tam.	$64 \pm 14^{**,\dagger\dagger}$	$915 \pm 64^{**,\dagger\dagger}$	$3,25 \pm 0,13^{\dagger\dagger}$
Tam. + Östr.	$72 \pm 14^{*,\dagger\dagger}$	$924 \pm 41^{**,\dagger\dagger}$	$3,42 \pm 0,29^{*,\dagger\dagger}$

**Tab. 15: Behandlungseffekte auf Körper- und Lebergewichte.** Ratten wurden für 7 Tage (d7 – d14 post partum) täglich einmalig mit Kontrolllösung (n=13), 10 mg/kg Östradiol s.c. (n=6), 100 mg/kg Tamoxifen s.c. (n=7), 100 mg/kg Tamoxifen + 10 mg/kg Östradiol s.c. (n=20), 100 mg/kg Progesteron s.c. (n=25) oder 100 mg/kg Progesteron + 10 mg/kg Östradiol s.c. (n=25) behandelt. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: KGW = Körpergewicht; g = Gramm; mg = Milligramm; d = Tag. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01 vs. Kontrolle; ††, p<0,01; †††, p<0,001 vs. Östradiol.

Östradiol erhöhte die Körpergewichtszunahme von  $15,8 \pm 2,6$  g auf  $32,5 \pm 3,0$  g ( $+105 \pm 27\%$ , p<0,05), wohingegen Tamoxifen diese reduzierte ( $+64 \pm 14\%$  Zunahme; p<0,01). Das Lebergewicht betrug nach Östradiolbehandlung

1.070±86 mg; sein Anteil am Körpergewicht war vermindert auf 3,08±0,07% (p<0,05). Tamoxifen reduzierte hingegen die Wachstumsrate, sodass KGW und Lebergewicht 27,1±3,4 g bzw. 915±64 mg betragen. Der Leberanteil am KGW wurde durch Tamoxifen zwar nicht beeinflusst, ist jedoch im Vergleich zur Östradiolbehandlung höher (3,25%; p<0,01). Östradiol kompensierte diese Wirkungen von Tamoxifen nicht. Progesteron beeinflusste weder Wachstumsrate und Endgewicht noch das Lebergewicht und hob die Einzelwirkung von Östradiol auf Wachstum und Lebergewicht auf. (Tab. 15A+B) Die tägliche absolute Gewichtszunahme war in allen Gruppen linear; allerdings mit einer höheren Steigung durch Östradiol und einer niedrigeren durch Tamoxifen (Abb. 13). Das relative Wachstum nahm hingegen ab und erreichte nach 4 Tagen in allen Gruppen – außer denen mit Tamoxifen-Behandlung – ein Plateau; bei den Tamoxifen-Gruppen nahm die Wachstumsrate weiter bis d14 ab.



**Abb. 13: Verlauf des Körpergewichts d7-d14.** Details zu den Gruppen siehe Legende von Tabelle 15. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: d = Tag; KGW = Körpergewicht. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01 vs. Kontrolle; ††, p<0,01; †††, p<0,001 vs. Östradiol.

### 3.2.1: Cholinversorgung der Ratte

Der plasmatische Cholinpool an d7 liegt bei 32 nmol, während er an d14 bei 58 nmol liegt.

Im Alter von 7d konsumiert eine Ratte rund 4,1 g Muttermilch; im Alter von 14d sind dies etwa 10,9 g [102]. Das Gesamtcholin der aus dem Magen isolierten Rattenmilch setzte sich zusammen aus Phosphorylcholin (47,8±3,7Mol%), Glycerophosphorylcholin (40,1±4,3Mol%), PC (4,4±0,3Mol%), Lyso-PC(0,4±0,1 Mol%), SPH (2,6±0,1Mol%) sowie freiem Cholin (4,7±0,6Mol%) und war kongruent zu bereits publizierten Daten [103, 104].

Alter	Körper- gewicht	Milch- volumen	Gesamt- cholin	Cholinzufuhr gesamt		
				µmol	mmol/kg KGW	mg/kg KGW
d7	15,5	4,1	6,5	26,7	1,72	179
d14	29,4	10,9	6,0	65,4	2,22	231

Zur Markierung wurden 0,335mmol/kg (50mg/kg) (D<sub>9</sub>-)Cholin in den Organismus eingebracht, d. h. 15% der regulären Cholinzufuhr.

### 3.2.2: Konzentrationen und Poolgrößen von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten in Leber und Blutplasma

Das Lebergewebe einer 14d alten Kontrollratte enthielt 252±12 nmol Cholin, 75±8 nmol Phosphorylcholin, 2.023±104 nmol Betain sowie 92±3 nmol Dimethylglycin; entsprechend 250±11 nmol/g Cholin, 74±8 nmol/g Phosphorylcholin, 1.998±102 nmol/g Betain sowie 91±3 nmol/g Dimethylglycin.

Im Plasmapool befanden sich 61±8 nmol Cholin, 180±11 nmol Betain sowie 49±8 nmol Dimethylglycin; die Konzentrationen waren dementsprechend 35±6µmol/L Cholin, 98±5µmol/L Betain sowie 21±5µmol/L Dimethylglycin. Sie betragen damit für Cholin 24±3,7%, für Betain 8,9±0,6% sowie für Dimethylglycin 23,0±1,7% der Menge in der Leber. Somit sind die Poolgrößen im Parenchym 4,2±0,2-fach (Cholin), 11,2±0,9-fach (Betain) sowie 4,3±0,3-fach (Dimethylglycin) höher als im Plasma. Phosphorylcholin als intrazellulärer

Cholinmetabolit, welcher nach Aufnahme in die Zelle durch die Cholinkinasereaktion entsteht (siehe Abb. 7) und für die im Zytoplasma sowie am endoplasmatischen Retikulum ablaufende PC-Synthese dient [105], lag im Plasma unter der Nachweisgrenze.

Die Betain/Cholin- sowie Dimethylglycin/Betain-Ratio wurden als Indikatoren des Cholin-Katabolismus zu Betain und Dimethylglycin, der Methionin-Synthese via Betain:Homocystein-Methyltransferase (BHMT) [106] sowie der Bereitstellung aktivierter Methylgruppen (S-Adenosyl-Methionin [SAM]) [33] berechnet (siehe auch Tab. 17A+B). Die Betain/Cholin-Ratio war  $>3$  und im Lebergewebe etwa doppelt so hoch wie im Plasma. Die Dimethylglycin/Betain-Ratio hingegen war deutlich kleiner als 0,2 und im Lebergewebe etwa 1,5-fach niedriger als im Plasma. Dimethylglycin entsteht in der Leber durch die BHMT-Reaktion; und renal ausgeschieden oder zu Sarkosin weitermetabolisiert (C1-Transfer auf THF), womit die niedrige Ratio erklärbar ist.

### **3.2.3: Hormoneffekte auf die Leber- und Plasmahomöostase von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten**

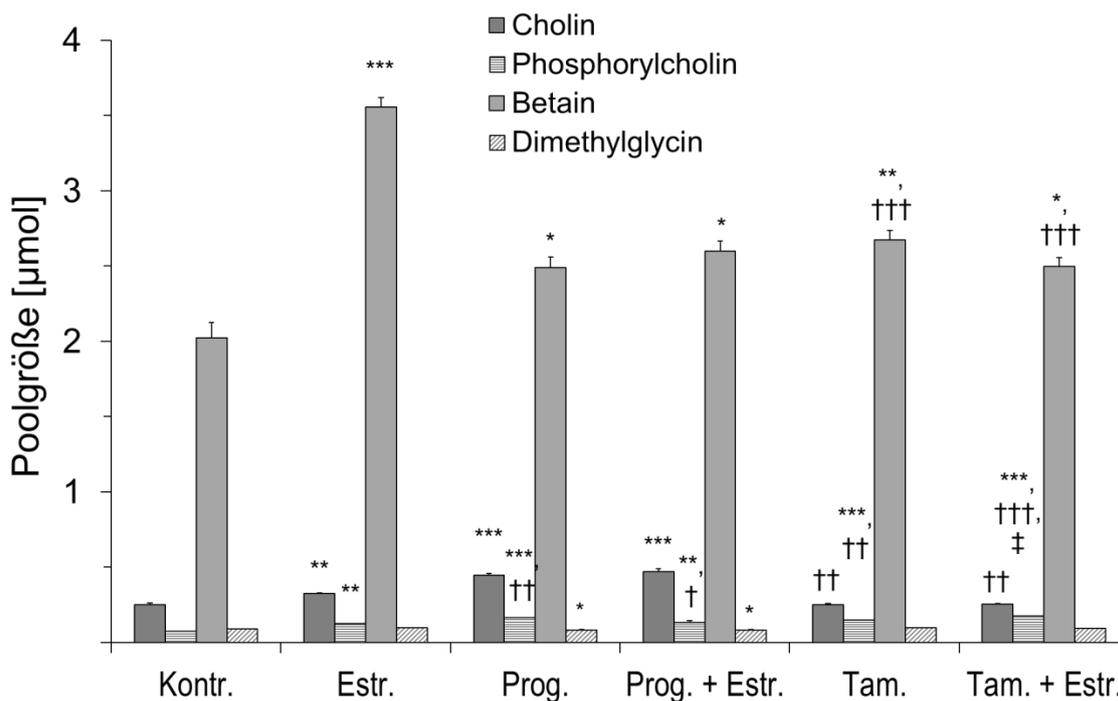
#### Leber:

Östradiol erhöhte die hepatischen Poolgrößen von Cholin ( $+29\pm 3\%$ ,  $p < 0,01$ ), Phosphorylcholin ( $+68\pm 4\%$ ,  $p < 0,01$ ) und Betain ( $+76\pm 3\%$ ,  $p < 0,001$ ) im Lebergewebe. Es erhöhte jedoch nicht das Dimethylglycin. Progesteron hingegen verdoppelte die Konzentration von Cholin und Phosphorylcholin (jeweils  $p < 0,001$ ); sowohl mit als auch ohne Kombination mit Östradiol, wobei die Kombination mit Östradiol den Effekt auf die Phosphorylcholin-Konzentration etwas abschwächt. Progesteron vermindert Dimethylglycin, das Demethylierungsprodukt von Betain, sowohl in Monotherapie als auch bei Kombination mit Östradiol ( $p < 0,05$ ).

Tamoxifen erhöhte lediglich die Phosphorylcholin- und Betain-Pools ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,01$ ). Östradiol hob den Effekt von Tamoxifen nicht auf. (Abb. 14)

Bezogen auf die Konzentrationen je Gramm Lebergewebe zeigen sich die gleichen Effekte (Daten werden nicht gezeigt).

Die Betain/Cholin-Ratio wurde in der Leber durch Östradiol erhöht ( $p < 0,001$ ) und die Dimethylglycin/Betain-Ratio erniedrigt ( $p < 0,01$ ), was durch den größeren Pool an Betain bei konstanter Rate der Demethylierung erklärt wurde. Progesteron erhöhte beide Quotienten ebenfalls. Tamoxifen hatte einen gegenteiligen Effekt und hob die Wirkung des Östradiols auf. (Tab. 17A+B)



**Abb. 14: Poolgrößen von Cholin und seinen Metaboliten Phosphorylcholin, Betain, Dimethylglycin im Lebergewebe.** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=39; Östradiol n=10; Tamoxifen n=27; Tamoxifen+Östradiol n=23; Progesteron n=13; Progesteron+Östradiol n=13. Das Lebergewebe wurde mit Chloroform:Methanol:0,04% CaCl<sub>2</sub> nach Folch et al. [95] extrahiert, wie im Methodenteil beschrieben (2.5.1). Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: g = Gramm; PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle; †,  $p < 0,05$ ; ††,  $p < 0,01$ ; †††,  $p < 0,001$  vs. Östradiol. ‡,  $p < 0,05$  vs. Progesteron

A	Cholin	Phosphoryl- cholin	Betain	Dimethyl- glycin
	nmol/g Leber	nmol/g Leber	nmol/g Leber	nmol/g Leber
Kontr.	239,6 ± 9,7	59,5 ± 7,1	1.637,4 ± 84,9	76,7 ± 2,4
Östr.	286,6 ± 4,8**	98,2 ± 5,6**	2.656,1 ± 48,7***	71,9 ± 2,4
Prog.	432,6 ± 12,6***	134,0 ± 9,0***	1.967,0 ± 55,5**	65,1 ± 1,3
Prog. + Östr.	457,0 ± 17,1***	102,4 ± 5,3**	2.207,8 ± 51,3**	68,0 ± 1,9
Tam.	251,6 ± 4,6†	103,8 ± 2,0**	2.256,6 ± 53,8**	86,7 ± 0,7*†
Tam. + Östr.	256,4 ± 4,2†	113,5 ± 1,8**	2.071,1 ± 49,7**	81,7 ± 0,6†

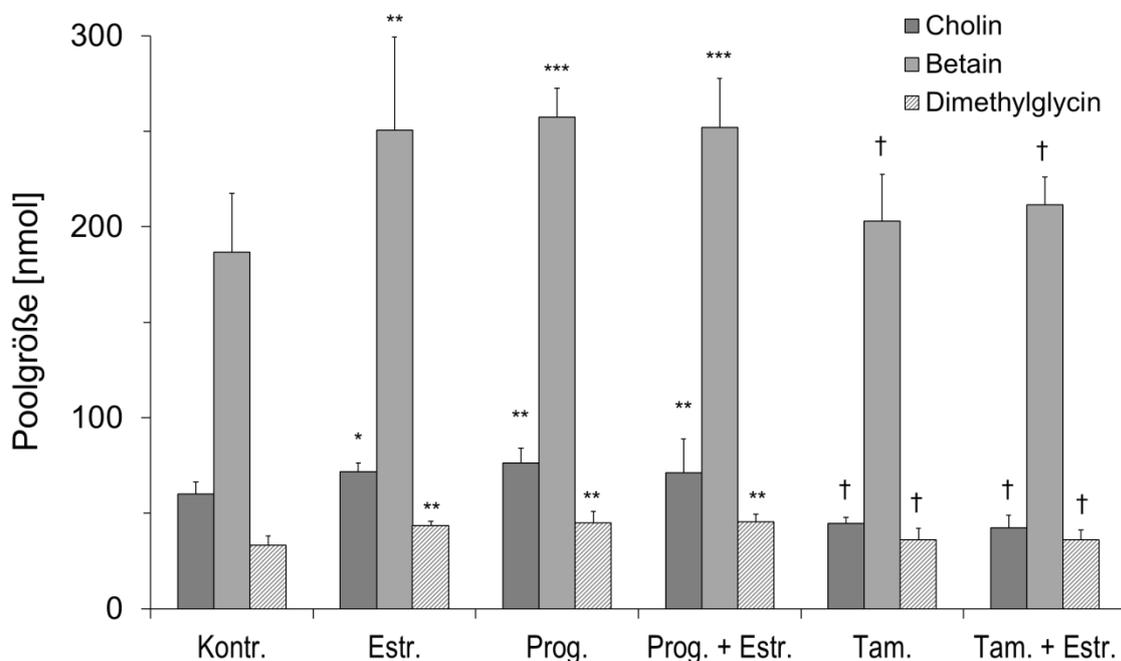
B	Cholin	Phosphoryl- cholin	Betain	Dimethyl- glycin
	nmol/g KGW	nmol/g KGW	nmol/g KGW	nmol/g KGW
Kontr.	8,2 ± 0,3	2,0 ± 0,2	55,7 ± 2,9	2,6 ± 0,2
Östr.	8,8 ± 0,1	3,0 ± 0,3**	81,1 ± 1,2**	2,2 ± 0,3
Prog.	14,4 ± 0,4***	4,5 ± 0,2***	65,3 ± 1,6*	2,2 ± 0,2
Prog. + Östr.	15,1 ± 0,6***	3,4 ± 0,3**	72,9 ± 1,9**	2,2 ± 0,3
Tam.	9,3 ± 0,4*	3,8 ± 0,5***,†	83,3 ± 1,9**	3,2 ± 0,4*,††
Tam. + Östr.	9,3 ± 0,2*	4,1 ± 0,4***,††	74,8 ± 1,9**,†	2,9 ± 0,3*,†

**Tab. 16: Konzentrationen (A) sowie Poolgröße je g KGW (B) von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten Phosphorylcholin, Betain und Dimethylglycin im Lebergewebe.** Details zu den Gruppen siehe Legende zu Tab. 15. Kontrolle n=39; Östradiol n=10; Tamoxifen n=27; Tamoxifen+Östradiol n=23; Progesteron n=13; Progesteron+Östradiol n=22. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: g = Gramm; PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05; ††, p<0,01 vs. Östradiol.

A	Betain/Cholin	
	Leber	Plasma
Kontr.	6,83 ± 0,88	3,1 ± 0,36
Östr.	9,27 ± 0,85***	3,49 ± 0,68*
Prog.	4,55 ± 0,39*	3,37 ± 0,53*
Prog. + Östr.	4,83 ± 0,33*	3,54 ± 0,67*
Tam.	8,97 ± 0,50***,††	4,55 ± 0,90***,††
Tam. + Östr.	8,08 ± 1,17*,†	4,98 ± 1,22***,††

B	DMG/Betain	
	Leber	Plasma
Kontr.	0,047 ± 0,003	0,179 ± 0,014
Östr.	0,027 ± 0,006**	0,174 ± 0,013
Prog.	0,033 ± 0,003**	0,175 ± 0,014
Prog. + Östr.	0,031 ± 0,004**	0,181 ± 0,012
Tam.	0,038 ± 0,003*†	0,179 ± 0,012
Tam. + Östr.	0,039 ± 0,001*†	0,171 ± 0,014

**Tab. 17: Verhältnis von Betain zu Cholin (A) und von Dimethylglycin zu Betain (B) in Lebergewebe und Blutplasma, dargestellt als Quotient.** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: DMG = Dimethylglycin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05, ††, p<0,01 vs. Östradiol.



**Abb. 15: Poolgrößen von Cholin (A) und seinen Metaboliten Betain (B) und Dimethylglycin (C) im Blutplasma.** Details zu den Gruppen siehe Legende zu Tab. 15. Kontrolle n=34; Östradiol n=9; Tamoxifen n=26; Tamoxifen+Östradiol n=23; Progesteron n=13; Progesteron+Östradiol n=13. Das Blutplasma wurde mit Chloroform:Methanol:H<sub>2</sub>O nach Bligh & Dyer [96] extrahiert, wie im Methodenteil beschrieben (2.5.2). Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: L = Liter. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05 vs. Östradiol.

#### Plasma:

Die Effekte auf das Plasma unterscheiden sich teilweise von denen auf das Leberparenchym. Östradiol erhöhte ebenfalls die Poolgrößen sowohl von

Cholin als auch von Betain; ferner erhöhte es Dimethylglycin. Progesteron, allein und in Kombination mit Östradiol, vergrößerte die Pools aller drei Komponenten am deutlichsten (Cholin +27±4% (p<0,01), Betain +38±2% (p<0,001), Dimethylglycin +36±3% p<0,01)). Tamoxifen hingegen erniedrigte die Cholin- sowie Betain-Poolgröße und erhöhte Dimethylglycin geringgradig gegenüber Östradiol. Dies wurde nicht durch Östradiol aufgehoben. (Abb. 15) Im Plasma wurde die Betain/Cholin-Ratio durch Östradiol aufgrund des deutlich erhöhten Betains ebenfalls erhöht. Tamoxifen, auch in Kombination mit Östradiol, hatte die stärkste Erhöhung des Quotienten zur Folge. Im Plasma wurde die DMG/Betain-Ratio allerdings nicht durch die Hormoninterventionen beeinflusst. (Tab. 18A+B) Bezogen auf die Konzentrationen je Milliliter Plasma zeigen sich die gleichen Effekte.

A	Cholin	Betain	Dimethylglycin
	nmol/mL	nmol/mL	nmol/mL
Kontr.	34,5 ± 0,9	98,1 ± 5,7	18,4 ± 1,6
Östr.	40,0 ± 0,6*	136,4 ± 6,8**	26,8 ± 2,7**
Prog.	55,5 ± 0,9**	143,0 ± 8,6**	26,0 ± 2,0**
Prog. + Östr.	48,5 ± 2,1**	174,3 ± 4,1***	26,4 ± 1,7**
Tam.	27,0 ± 0,9	103,4 ± 3,8††	19,9 ± 0,8††
Tam. + Östr.	29,7 ± 0,6	114,8 ± 3,0*†	18,8 ± 1,6††

B	Cholin	Betain	Dimethylglycin
	nmol/g KGW	nmol/g KGW	nmol/g KGW
Kontr.	1,9 ± 0,3	5,3 ± 0,2	0,6 ± 0,2
Östr.	2,2 ± 0,2	7,5 ± 0,3**	0,8 ± 0,3**
Prog.	3,0 ± 0,4***	7,8 ± 0,2**	0,9 ± 0,2***
Prog. + Östr.	2,6 ± 0,5**	9,4 ± 0,3***	0,9 ± 0,3***
Tam.	1,5 ± 0,3**††	5,6 ± 0,5††	0,7 ± 0,2*†
Tam. + Östr.	1,6 ± 0,2*††	6,2 ± 0,4*†	0,7 ± 0,1*†

**Tab. 18: Konzentration (A) sowie Poolgröße (B) je g KGW von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten Betain und Dimethylglycin im Blutplasma.** Details zu den Gruppen siehe Legende zu Tab. 15. Kontrolle n=39; Östradiol n=10; Tamoxifen n=27; Tamoxifen+Östradiol n=23; Progesteron n=13; Progesteron+Östradiol n=22. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: g = Gramm; PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05, ††, p<0,01 vs. Östradiol.

### 3.3: Phospholipide in Leber und Plasma

#### Poolgrößen:

Die drei Hauptphospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Sphingomyelin (SPH) wurden adressiert, von denen insbesondere PC anschließend auch hinsichtlich seines Metabolismus mittels D<sub>9</sub>-Cholin-Markierung untersucht wurde (siehe 2.4.2).

Die Konzentration von PC in der Leber bei 14d alten Kontrollratten betrug  $18,8 \pm 2,7 \mu\text{mol/g}$  und jene im Plasma  $1,9 \pm 0,2 \mu\text{mol/L}$ . Der Gesamtpool an Leber-PC betrug  $18,6 \pm 2,3 \mu\text{mol/Gesamtorgan}$  bzw.  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{mol/g KGW}$ ; der errechnete Plasma-PC-Pool betrug  $3,0 \pm 0,4 \mu\text{mol}$ .

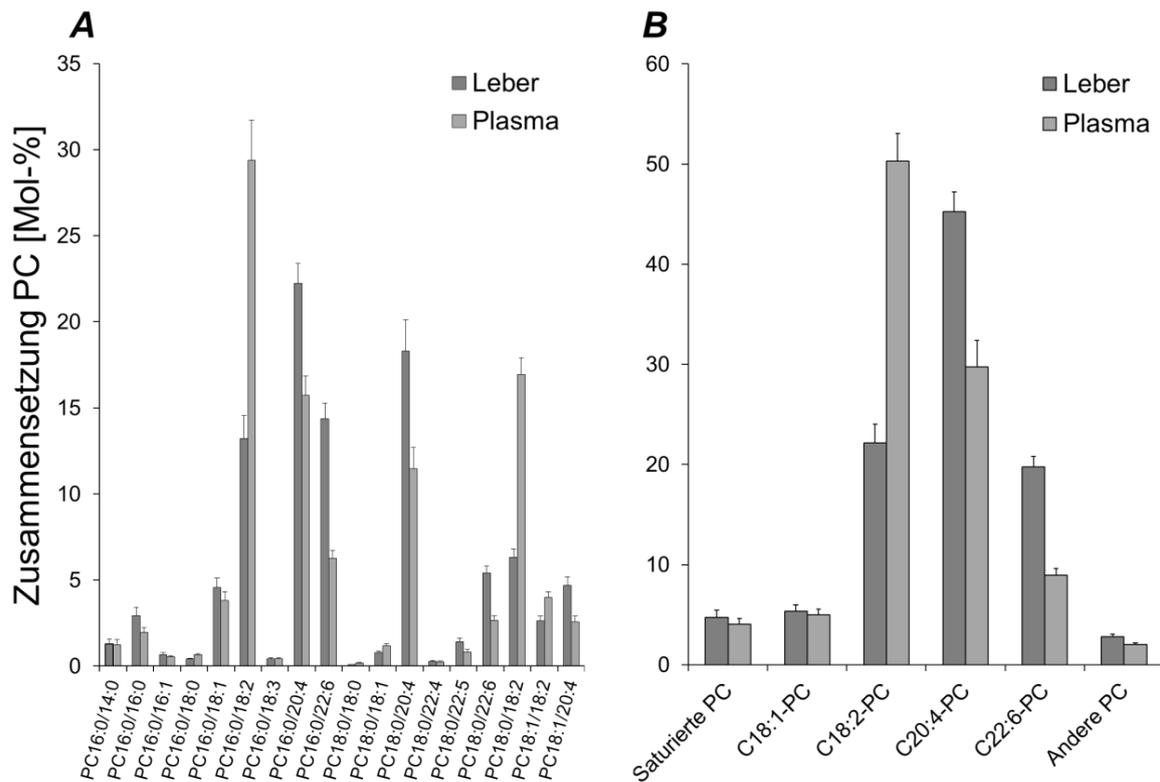
Die Konzentrationen und Pools von Sphingomyelin (SPH) und Phosphatidylethanolamin (PE) in der Leber waren  $0,255 \pm 0,029 \mu\text{mol/g}$  bzw.  $0,258 \pm 0,030 \mu\text{mol}$  und  $7,22 \pm 0,86 \mu\text{mol/g}$  bzw.  $7,13 \pm 0,83 \mu\text{mol}$  je Gesamtorgan. Im Plasma betrug SPH  $0,045 \pm 0,005 \mu\text{mol/L}$ .

#### Molekulare Zusammensetzung:

Die organotypischen und altersabhängigen molekularen Zusammensetzungen von PC und PE – entsprechend den Organfunktionen (siehe Einleitung) – sind in Abb. 16A+B für Leber- und Plasma-PC sowie in Abb. 17A+B für Leber-PE 14d alter Ratten dargestellt. In der sn-1-Position lag meist ein Palmitinsäure-(C16:0) oder Stearinsäurerest (C18:0) vor; in der sn-2-Position Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2), Arachidonsäure (C20:4) und Docosahexaensäure (C22:6) (Abb. 16A und 21A). Die Vereinfachung nach dem Gehalt an einem C18:1-, C18:2-, C20:4- oder C22:6-Rest ergab eine überschaubarere Einteilung in Subgruppen (Abb. 16B und 17B). Sie zeigt, dass in der Leber C20:4-PC > C22:6-PC = C18:2-PC dominieren. Das gilt ähnlich für das Plasma, allerdings mit C18:2-PC > C20:4-PC > C22:6-PC. Bei PE zeigt die Zusammensetzung einen höheren Anteil an C20:4 und C22:6, mit C20:4-PE > C22:6-PE >> C18:2-PE in der Leber und C20:4-PE > C22:6-PE = C18:2-PE im Plasma.

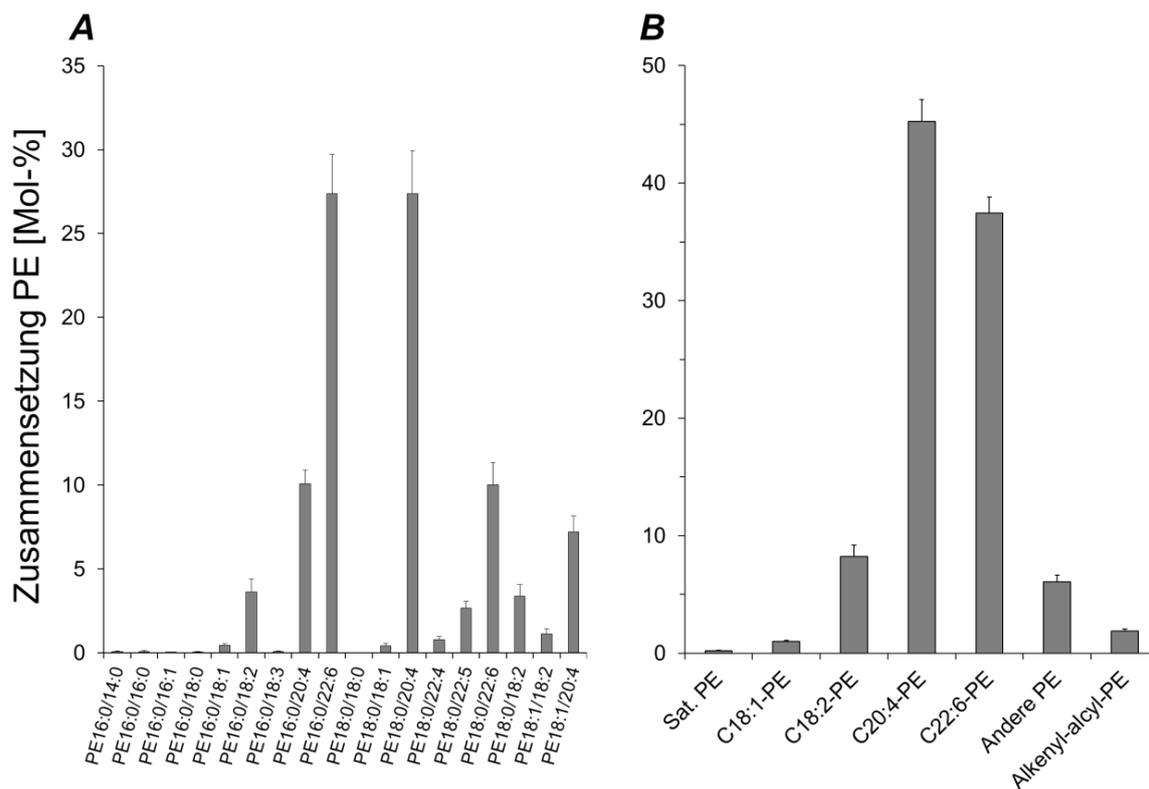
Daraus ergeben sich die in Tab. 19 dargestellten Poolgrößen für die einzelnen PC- und PE-Subgruppen und die molaren Konzentrationen von C18:1, C18:2, C20:4 und C22:6 in Leber und Plasma. Für C20:4- und C22:6-PC ergibt sich,

dass sich  $10\pm 2\%$  bzw.  $7\pm 1\%$  des gesamten hepatischen Pools im Plasma befanden. Bei C18:1 und C18:2 waren es  $13\pm 1\%$  und  $27\pm 2\%$ .



**Abb. 16: Zusammensetzung des PC<sup>1</sup> im Lebergewebe.** **A** zeigt die molekularen Spezies von PC in Leber und Plasma. **B** zeigt die Zusammensetzung der Subgruppen. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung 14d alter Kontrollratten. n=33 (Leber), n=34 (Plasma). Details zur Kontrollgruppe siehe Legende von Tab. 15. Symbole und Abkürzungen: % = Mol-Prozent; PC = Phosphatidylcholin.

<sup>1</sup> **Abkürzungsalgorithmus PC:** Siehe 1.1.2 (S. 4) sowie 1.1.4 (S. 5).



**Abb. 17: Zusammensetzung des PE im Lebergewebe.** **A** zeigt die molekularen Spezies von PE. **B** zeigt die Zusammensetzung der Subgruppen. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung 14d alter Kontrollratten. n=33 (Leber), n=34 (Plasma). Details zur Kontrollgruppe siehe Legende von Tab. 15. Symbole und Abkürzungen: % = Mol-Prozent; PE = Phosphatidylethanolamin.

	Saturierte Spezies	C18:1-Spezies	C18:2-Spezies	C20:4-Spezies	C22:6-Spezies	Anderer Spezies
	nmol	nmol	nmol	nmol	nmol	nmol
Leber PC	873 ± 139	994 ± 115	4.114 ± 349	8.399 ± 371	3.670 ± 191	518 ± 52
Plasma PC	121 ± 17	149 ± 18	1.503 ± 83	889 ± 79	267 ± 21	60 ± 5
Leber PE	16 ± 3	71 ± 7	588 ± 64	3.228 ± 128	2.670 ± 97	434 ± 39

**Tab. 19: Poolgrößen der Subgruppen des Leber- und Plasma-PC sowie Leber-PE.** Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung 14d alter Kontrollratten. n=33 (Leber), n=34 (Plasma). Details zur Kontrollgruppe siehe Legende von Tab. 15. Symbole und Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; PE = Phosphatidylethanolamin.

### 3.3.1: Hormonwirkungen auf die Poolgrößen und Konzentrationen der Leber- und Plasma-Phospholipide

Da bei der alleinigen Angabe von Plasma- und Gewebekonzentrationen das Körper- sowie Organgewicht unberücksichtigt bleiben, wurden die Poolgrößen (also der Gehalt je Gesamtplasma bzw. Gesamtorgan) ebenfalls angegeben.

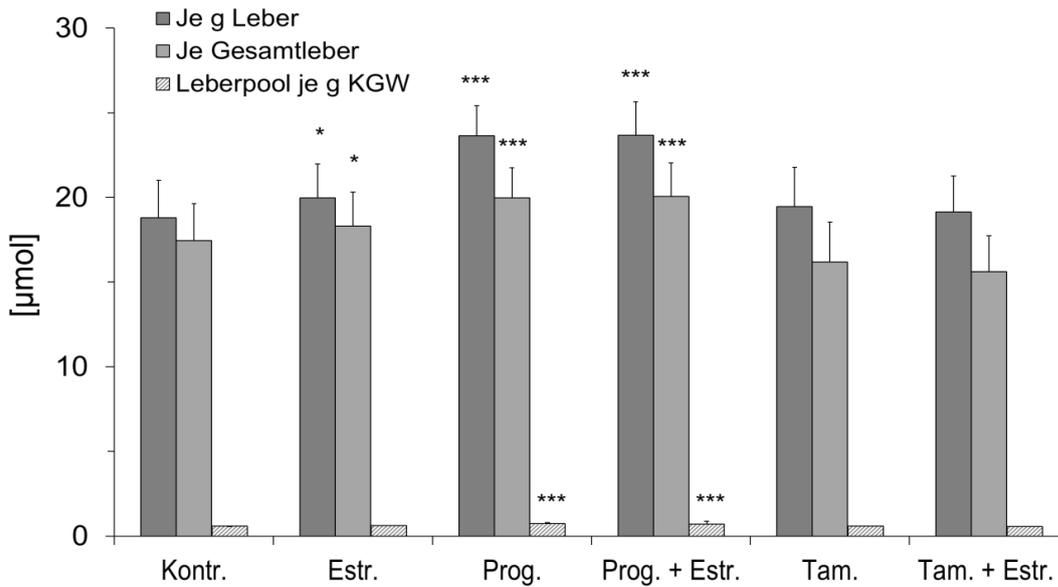
Der Quotient aus Leber- sowie Plasmakonzentration ( $[\mu\text{mol/g}]/[\mu\text{mol/mL}]$ ) erlaubt eine Aussage über die Sekretionsleistung der Leber. Steigt dieser an, ist entweder die Sekretion ins Plasma vermindert oder die hepatische Poolgröße bei konstanter Sekretion vergrößert.

Östradiol erhöhte die PC-Konzentration und Poolgrößen in der Leber um  $6\pm 1$  bzw.  $15\pm 1\%$  ( $p < 0,05$ ). Progesteron hingegen, allein und in Kombination mit Östradiol, erhöhte die Konzentration ( $+26\pm 3\%$ ) und Poolgröße ( $+15\pm 2\%$ /Leber;  $+26\pm 3\%$ /g KGW) des PC erheblich mehr. Tamoxifen hatte keine Wirkung. (Abb. 18).

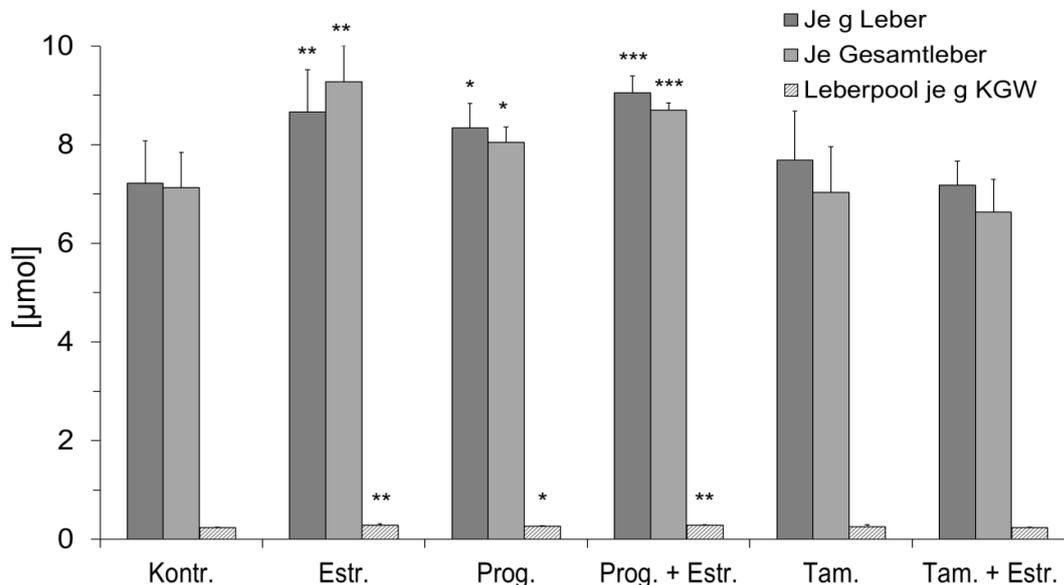
PE wurde durch Östradiol ( $+30\pm 4\%$ /Leber;  $+21\pm 2\%$ /g KGW), Progesteron ( $+13\pm 3\%$ /Leber;  $+13\pm 2\%$ /g KGW) sowie ihrer Kombination ( $+22\pm 4\%$ /Leber;  $+21\pm 3\%$ /g KGW) erhöht. Die Behandlung mit Tamoxifen führte zu keiner Änderung. (Abb. 19)

Wie in der Leber erhöhte Östradiol die PC-Konzentration ( $+7,4\pm 1,2\%$ ;  $p < 0,05$ ) und -Poolgröße ( $+19\pm 3,1\%$ ;  $p < 0,05$ ) im Plasma. Auch hier war der Effekt von Progesteron, allein und in Kombination mit Östradiol, analog zur Leber und stärker bezüglich PC-Konzentration ( $+41\pm 6\%$ ;  $p < 0,01$ ) und. Poolgröße ( $+31\pm 5\%$ ;  $p < 0,01$ ). Durch Tamoxifen wurden PC-Konzentration ( $-19\pm 1,5\%$ ;  $p < 0,01$ ) und -Poolgröße ( $-24\pm 2,6\%$ ;  $p < 0,01$ ) erniedrigt (Abb. 18). Östradiol hob den Tamoxifen-Effekt auf. (Abb. 20)

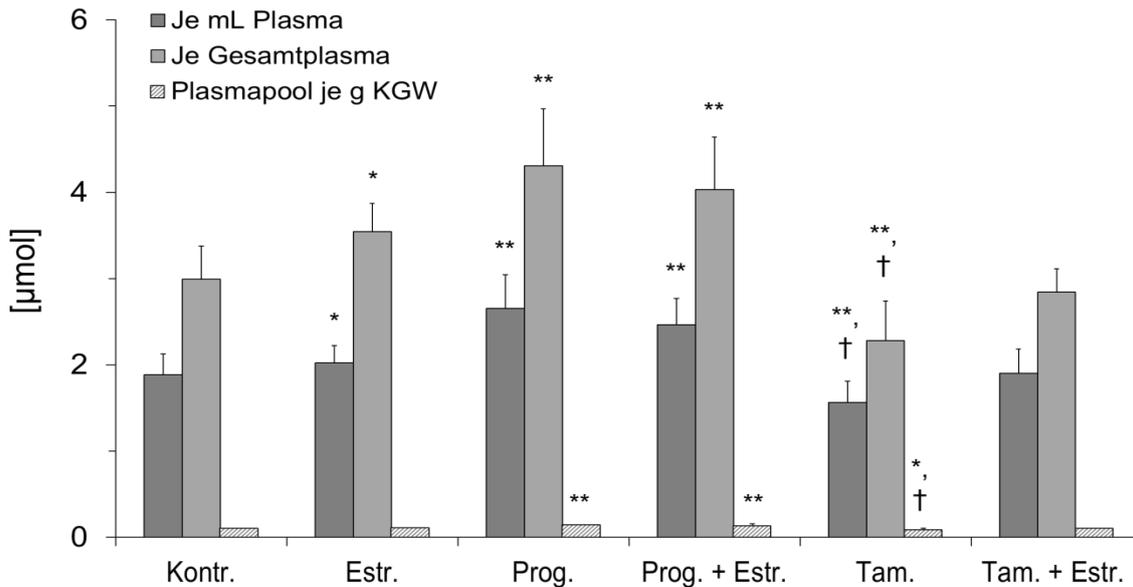
Die Quotienten der Konzentrationen und Poolgrößen zwischen Leber- und Plasma sind in Tab. 21 dargestellt. Östradiol änderte diese Ratio nicht, während Progesteron dieses erhöhte ( $p < 0,05$ ). Tamoxifen erhöhte die Ratio ( $p < 0,01$ ), aufgrund der niedrigeren Plasma-PC-Konzentration bzw. dem kleineren PC-Pool im Plasma geschuldet ist. Östradiol hob hier den Effekt von Tamoxifen auf.



**Abb. 18: PC-Konzentration und Poolgrößen im Lebergewebe.** Gezeigt wird die Konzentration pro Gramm, pro Gesamtleber sowie der Leberpool je Gramm Körpergewicht. Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=34; Östradiol n=10; Tamoxifen n=23; Tamoxifen+Östradiol n=24; Progesteron n=20; Progesteron+Östradiol n=21. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: g = Gramm; KGW = Körpergewicht; PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*\*, p<0,001.



**Abb. 19: PE-Konzentration und Poolgrößen im Lebergewebe.** **A** zeigt die Konzentration pro Gramm, **B** pro Gesamtleber und **C** je Gramm Körpergewicht. Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=34; Östradiol n=10; Tamoxifen n=23; Tamoxifen+Östradiol n=24; Progesteron n=20; Progesteron+Östradiol n=21. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: g = Gramm; KGW = Körpergewicht; PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle.



**Abb. 20: PC-Konzentration und Poolgröße im Plasma.** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=35; Östradiol n=12; Tamoxifen n=23; Tamoxifen+Östradiol n=25; Progesteron n=24; Progesteron+Östradiol n=23. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: mL = Milliliter; PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01 vs. Kontrolle; †, p<0,05 vs. Östradiol.

	Poolgröße PC	Poolgröße PE	Gesamt-PC/ Gesamt-PE
	µmol/Leber	µmol/Leber	Ratio
Kontr.	18,57 ± 2,27	7,13 ± 0,71	2,60 ± 0,03
Östr.	21,37 ± 2,55***	9,27 ± 0,74***	2,31 ± 0,03*
Prog.	22,81 ± 1,58***	8,05 ± 0,92**	2,83 ± 0,02*
Prog. + Östr.	22,78 ± 2,67***	8,70 ± 0,66**	2,61 ± 0,04
Tam.	17,80 ± 1,29††	7,03 ± 0,32†††	2,53 ± 0,05†
Tam. + Östr.	17,68 ± 1,22††	6,64 ± 0,14†††	2,66 ± 0,09†

**Tab. 20: Poolgrößen von hepatischem PC und PE sowie deren Quotient.** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=35; Östradiol n=12; Tamoxifen n=23; Tamoxifen+Östradiol n=25; Progesteron n=24; Progesteron+Östradiol n=23. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: mL = Milliliter; PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05; ††, p<0,01; †††, p<0,001 vs. Östradiol.

Leber/Plasma	Konzentration ([ $\mu\text{mol/g}$ ]/[ $\mu\text{mol/mL}$ ])	Poolgröße	Poolgröße je g KGW
	Ratio	Ratio	Ratio
Kontr.	10,0 $\pm$ 1,5	6,2 $\pm$ 0,5	6,2 $\pm$ 0,5
Östr.	9,9 $\pm$ 1,3	6,0 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 0,4
Prog.	8,9 $\pm$ 0,6*	5,3 $\pm$ 0,6*	5,3 $\pm$ 0,6*
Prog. + Östr.	9,6 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 0,3
Tam.	12,5 $\pm$ 1,8**,††	7,8 $\pm$ 0,8**,††	7,8 $\pm$ 0,8**,††
Tam. + Östr.	10,0 $\pm$ 1,6	6,2 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 0,6

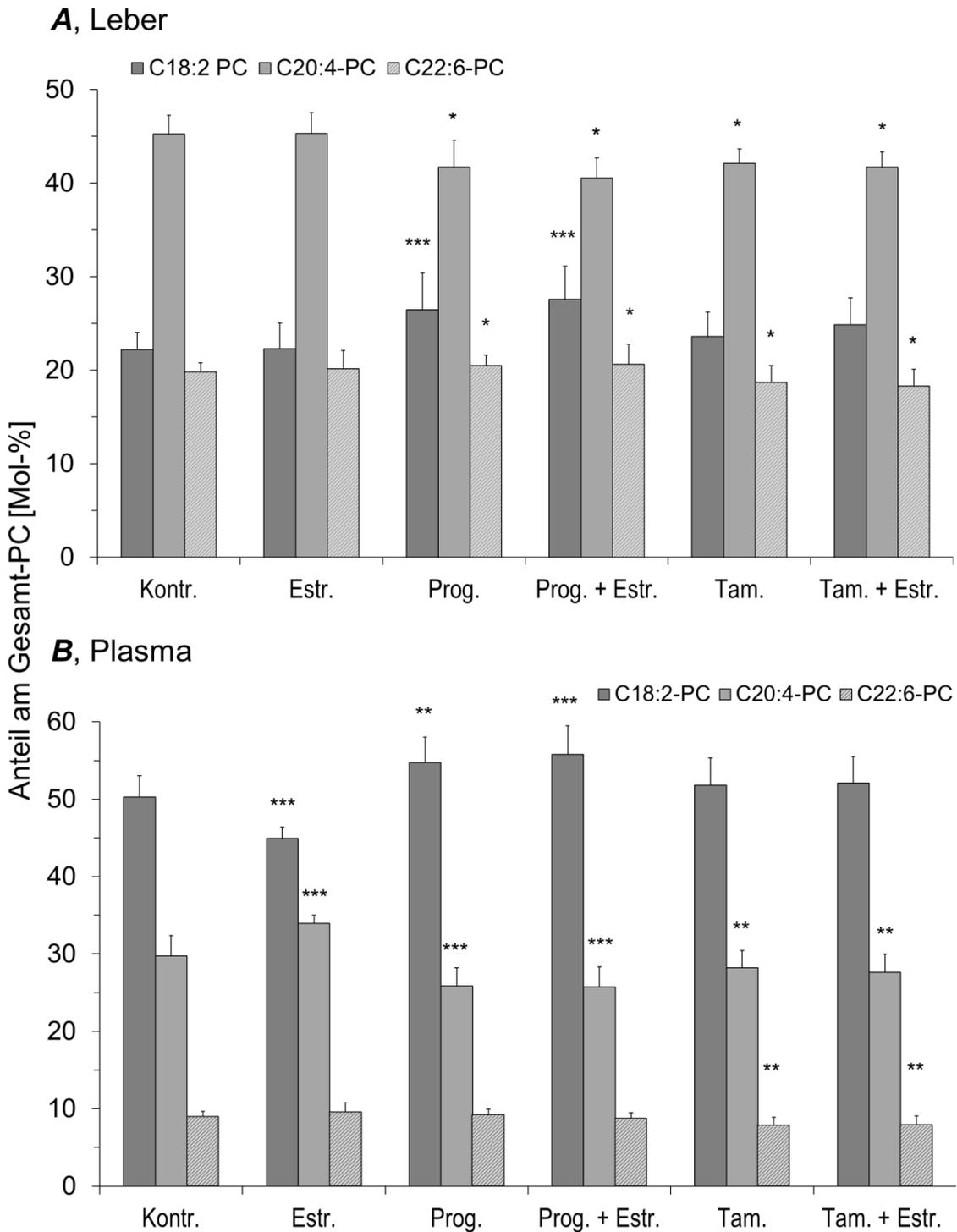
**Tab. 21: Verhältnis von hepatischem zu plasmatischem PC, bezogen auf Konzentration und Poolgrößen; dargestellt als Quotient.** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=35; Östradiol n=12; Tamoxifen n=23; Tamoxifen+Östradiol n=25; Progesteron n=24; Progesteron+Östradiol n=23. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: mL = Milliliter; PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01 vs. Kontrolle; ††, p<0,01 vs. Östradiol.

### 3.3.2: Hormonwirkungen auf die molekulare Zusammensetzung des Phosphatidylcholins und Phosphatidylethanolamins

Die Darstellung konzentriert sich auf die Hauptkomponenten C18:2-PC, C20:4-PC und C22:6-PC, da saturiertes PC in Leber und Plasma nur 4,7 $\pm$ 0,7% bzw. 4,0 $\pm$ 0,5% des PCs ausmachte und, ebenso wie C18:1-PC (5,4 $\pm$ 0,6% bzw. 5,0 $\pm$ 0,6%; jeweils p>0,05), zwischen allen Gruppen unverändert war.

Östradiol hatte keinen Einfluss auf die jeweiligen Anteile der Subgruppen in der Leber, wohingegen Progesteron, auch in Kombination mit Östradiol, C18:2-PC erhöhte (p<0,001) und C20:4-PC sowie C22:6-PC verminderte (jeweils p<0,05). Tamoxifen verminderte LC-PUFA-PC (C22:6-PC; C20:4-PC) (p<0,05), was auch bei gemeinsamer Behandlung mit Östradiol der Fall war. (Abb. 21A)

Im Plasma hingegen erhöhte Östradiol C20:4-PC zu Lasten von C18:2-PC (jeweils p<0,001), während C22:6-PC unverändert blieb. Progesteron hingegen erhöhte – analog zur Leber – C18:2 (p<0,001) und verminderte C20:4 sowie C22:6 (p<0,05 bzw. p<0,01). Tamoxifen verminderte, ebenfalls wie in der Leber, C20:4-PC sowie C22:6-PC (p<0,01) (Abb. 21B).



**Abb. 21: PC-Zusammensetzung von Leber (A) und Plasma (B).** Die Daten zeigen den Anteil von C18:2-PC, C20:4-PC sowie C22:6-PC am PC von Leber und Plasma. Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=34; Östradiol n=10; Tamoxifen n=23; Tamoxifen+Östradiol n=24; Progesteron n=20; Progesteron+Östradiol n=21. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle.

Daraus ergeben sich die in Tabelle 22 dargestellten Poolgrößen und Konzentrationen von C18:2-PC, C20:4-PC und C22:6-PC in Leber und Plasma, sodass Östradiol in erster Linie zu einer Vergrößerung der C20:4- und C22:6-Pools in der PC-Fraktion führt, während Progesteron insbesondere C18:2-PC erhöht. Die Behandlung mit Tamoxifen, auch in Kombination mit Östradiol, bedingt hingegen eine Verkleinerung hepatischer und plasmatischer LC-PUFA-Pools, siehe hierzu auch Abschnitt 3.3.1. Dementsprechend bedingt die Behandlung mit Östradiol eine generelle Zunahme von C20:4-PC und C22:6-PC, während es durch Einfluss von Progesteron in erster Linie zum Anstieg von C18:2-PC und -PE kommt. Tamoxifen hingegen beeinträchtigt insbesondere die Synthese von PUFA-haltigen Phospholipiden.

A: Leber	C18:2-PC	C20:4-PC	C22:6-PC
	µmol	µmol	µmol
Kontr.	4,11 ± 0,24	8,40 ± 0,35	3,67 ± 0,12
Östr.	4,76 ± 0,17*	9,68 ± 0,36***	4,30 ± 0,15**
Prog.	6,03 ± 0,36***	9,51 ± 0,25***	4,67 ± 0,12***
Prog. + Östr.	6,28 ± 0,30***	9,24 ± 0,36***	4,70 ± 0,16***
Tam.	4,20 ± 0,13†	7,49 ± 0,22**	3,32 ± 0,11*
Tam. + Östr.	4,39 ± 0,24	7,37 ± 0,32**	3,23 ± 0,10*

B: Plasma	C18:2-PC	C20:4-PC	C22:6-PC
	µmol	µmol	µmol
Kontr.	1,50 ± 0,11	0,89 ± 0,05	0,27 ± 0,03
Östr.	1,59 ± 0,10	1,20 ± 0,07***	0,34 ± 0,03*
Prog.	2,36 ± 0,12**	1,11 ± 0,09***	0,39 ± 0,06**
Prog. + Östr.	2,25 ± 0,15**	1,04 ± 0,06**	0,35 ± 0,04*
Tam.	1,18 ± 0,12*	0,64 ± 0,05**	0,18 ± 0,02**
Tam. + Östr.	1,48 ± 0,14	0,79 ± 0,07*	0,22 ± 0,03**

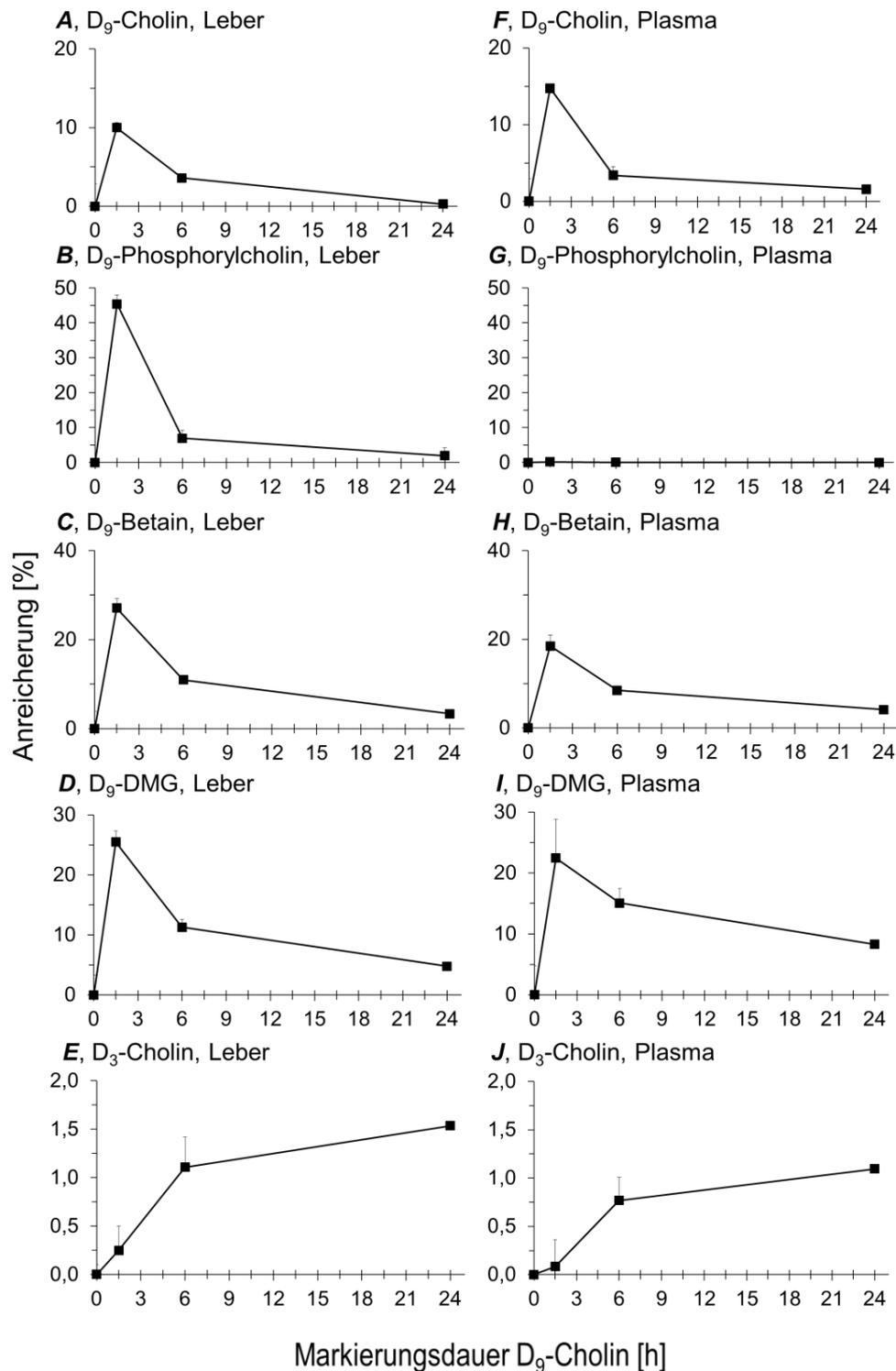
**Tab. 22: Poolgrößen der PC-Subgruppen in Leber (A) und Plasma (B).** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=35; Östradiol n=12; Tamoxifen n=23; Tamoxifen+Östradiol n=25; Progesteron n=24; Progesteron+Östradiol n=23. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05 vs. Östradiol.

### 3.4: Hormoneffekte auf den Cholin- und PC-Metabolismus

#### 3.4.1: Kinetik von D<sub>9</sub>-Cholin und seinen deuterierten wasserlöslichen Metaboliten in Leber und Plasma

Die Kinetik von D<sub>9</sub>-Cholin und seinen deuterierten Metaboliten ist als Anreicherung des Deuteriums in der jeweiligen Substanz ausgedrückt (D<sub>9</sub>-Cholin/Gesamt-Cholin\*100%). Abb. 22 beschreibt diese Kinetiken in Leber und Blutplasma. Die Reihenfolge wurde entsprechend der Sequenz des Stoffwechsels festgelegt (A-E sowie F-J).

D<sub>9</sub>-Cholin wurde in Leber und Plasma (Abb. 22A+F) schnell metabolisiert. Es war nach 24 Stunden nicht mehr in der Leber vorhanden und im Plasma an der Nachweisgrenze. In der Leber wurde es sehr schnell zu D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin metabolisiert, sodass dessen D<sub>9</sub>-Anreicherung 6 Stunden nach Markierung maximal war. Im Plasma war es indessen an der Nachweisgrenze, da Phosphorylcholin ein intrazellulärer Metabolit ist (Abb. 22B+G). Auch der *Turnover* von Phosphorylcholin war schnell, da seine D<sub>9</sub>-Anreicherung von 6 bis 24 Stunden um 80% sank. Die Kinetiken von Produkten des D<sub>9</sub>-Cholin-Katabolismus, D<sub>9</sub>-Betain (Abb. 22C+H) und D<sub>6</sub>-Dimethylglycin (Abb. 22D+I), sind ähnlich jener von D<sub>9</sub>-Cholin. Die D<sub>9</sub>-Anreicherung von Betain war höher als die von Cholin, was in Kombination mit den höheren Betainkonzentrationen bedeutet, dass ein erheblicher Teil des (D<sub>9</sub>-)Cholins zu (D<sub>9</sub>-)Betain katabolisiert wurde. Die D<sub>3</sub>-Anreicherung von Cholin (endogenes Cholin aus der PC-Synthese via PE-Methylierung mit anschließender PC-Spaltung, siehe 1.1.7) hingegen stieg sowohl im Lebergewebe als auch im Blutplasma kontinuierlich über 24h - als Resultat der sekundären Freisetzung von D<sub>3</sub>-Cholin aus dem Katabolismus von D<sub>3</sub>-PC aus dem PEMT-Pathway - an (Abb. 22E+J).



**Abb. 22: Kinetik von D<sub>9</sub>-Cholin und seinen Metaboliten in Leber und Plasma gesunder 14d alter Ratten.** 14d alten Kontrollratten wurde 1,5 Stunden (n=15), 6 Stunden (n=13) bzw. 24 Stunden (n=6) vor Töten durch Entbluten 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert und die Deuterium-Anreicherung von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten bestimmt. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: D = Deuterium; DMG = Dimethylglycin.

### 3.4.2: Kinetik der D<sub>9</sub>-Cholin-Markierung in Leber und Plasma

Aus den Kinetiken in Abb. 22 ergeben sich die in Tab. 23 dargestellten Poolgrößen Deuterium-markierter wasserlöslicher Metabolite je Zeitpunkt, womit der D<sub>9</sub>-Cholin/D<sub>9</sub>-Betain-Turnover, aufgezeigt wird.

Zur Einordnung in den Gesamtkontext sowie zur Illustration, welcher Anteil des injizierten D<sub>9</sub>-Cholins sich zum jeweiligen Markierungszeitpunkt im entsprechenden Metabolitenpool befindet, wurden auch D<sub>9</sub>- sowie D<sub>3</sub>-PC-Spezies implementiert.

In der Leber (Tab. 23A) fand sich nach 1,5 Stunden der größte Anteil der applizierten Menge (100%=9,89 µmol) von D<sub>9</sub>-Cholin (21,4±3,1%), während im Plasma (Tab. 23B) lediglich 1,21±0,10% zu finden waren. Im Plasma war das Maximum nach 6 Stunden erreicht (1,78±0,21%). Dieser Wert fiel jeweils kontinuierlich, sodass nach 24 Stunden das Minimum erreicht wurde; 7,34±0,92% in der Leber, 0,84±0,01% im Plasma.

Analog dazu sank auch der hepatische Pool von D<sub>9</sub>-Cholin, seinen wasserlöslichen Metaboliten und D<sub>9</sub>-PC von 2,13±0,31µmol (1,5h) über 1,52±0,23µmol (6h) auf 0,73±0,09µmol (24h). Im Plasma stieg der gesamte D<sub>9</sub>-Pool von 121±10 nmol nach 1,5 Stunden auf 178±21 nmol nach 6 Stunden und fiel schließlich auf 84±1 nmol nach 24 Stunden.

Nach 1,5 Stunden machte D<sub>9</sub>-Betain in der Leber 7,5±1,3% und im Plasma 0,39±0,01% des injizierten D<sub>9</sub>-Cholins aus, womit in summa bereits 7,9±1,3% zu D<sub>9</sub>-Betain katabolisiert wurden. Nach 6 Stunden lag dieser Anteil bei 3,3±0,8% in der Leber sowie 0,17±0,01% im Plasma, womit der D<sub>9</sub>-Betain-Anteil in Summe bei 3,5±0,8% lag. Nach 24 Stunden ist der Anteil des D<sub>9</sub>-Betain hepatisch weiter auf 0,30±0,05% und plasmatisch auf 0,04±0,01% gesunken, womit nur noch 0,34±0,05% des injizierten D<sub>9</sub>-Cholins auf D<sub>9</sub>-Betain entfielen.

Während die Pools von D<sub>9</sub>-Cholin, D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin und D<sub>9</sub>-Betain (sowie D<sub>6</sub>-Dimethylglycin) über die Zeit kleiner wurden, nahmen die Poolgrößen von D<sub>3</sub>-PC und D<sub>3</sub>-Cholin zu (siehe hierzu Abb. 22E+J sowie 23C+D).

	1,5 Stunden	6 Stunden	24 Stunden
<b>A: Leber</b>	%	%	%
D <sub>9</sub> -PC	11,31 ± 1,38	7,60 ± 0,93	3,02 ± 0,37
D <sub>3</sub> -PC	1,81 ± 0,22	4,21 ± 0,51	3,99 ± 0,49
D <sub>9</sub> -Cholin	0,38 ± 0,11	0,09 ± 0,03	0,01 ± 0,00
D <sub>3</sub> -Cholin	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
D <sub>9</sub> -Phosphorylcholin	0,42 ± 0,07	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00
D <sub>9</sub> -Betain	7,48 ± 1,32	3,28 ± 0,79	0,30 ± 0,05
<b>Gesamt D<sub>9</sub> (% des appl. D<sub>9</sub>-Cholins)</b>	<b>21,4 ± 3,1</b>	<b>15,2 ± 2,3</b>	<b>7,3 ± 0,9</b>
<b>nmol D<sub>9</sub> absolut</b>	<b>2.137 ± 310</b>	<b>1.518 ± 226</b>	<b>732 ± 92</b>
<b>B: Plasma</b>	%	%	%
D <sub>9</sub> -PC	0,693 ± 0,089	1,293 ± 0,167	0,428 ± 0,006
D <sub>3</sub> -PC	0,043 ± 0,006	0,288 ± 0,037	0,364 ± 0,005
D <sub>9</sub> -Cholin	0,084 ± 0,002	0,027 ± 0,003	0,003 ± 0,000
D <sub>3</sub> -Cholin	0,001 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,004 ± 0,000
D <sub>9</sub> -Phosphorylcholin	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
D <sub>9</sub> -Betain	0,389 ± 0,002	0,171 ± 0,006	0,043 ± 0,001
<b>Gesamt D<sub>9</sub> (% des appl. D<sub>9</sub>-Cholins)</b>	<b>1,21 ± 0,10</b>	<b>1,78 ± 0,21</b>	<b>0,84 ± 0,01</b>
<b>nmol D<sub>9</sub> absolut</b>	<b>121 ± 9,9</b>	<b>178 ± 21</b>	<b>84 ± 1</b>
<b>C: % von Leber im Plasma</b>	%	%	%
D <sub>9</sub> -PC	6,13 ± 1,38	17,02 ± 2,20	14,19 ± 0,20
D <sub>3</sub> -PC	2,38 ± 0,33	6,83 ± 0,88	9,12 ± 0,13
D <sub>9</sub> -Cholin	22,21 ± 0,53	30,02 ± 3,35	28,57 ± 1,10
D <sub>3</sub> -Cholin	14,29 ± 1,79	22,39 ± 1,00	13,86 ± 0,37
D <sub>9</sub> -Phosphorylcholin	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
D <sub>9</sub> -Betain	5,19 ± 0,03	5,23 ± 0,18	14,33 ± 0,43
<b>% von Leber im Plasma gesamt</b>	<b>5,7 ± 0,5</b>	<b>11,7 ± 1,4</b>	<b>11,5 ± 0,2</b>

**Tab. 23: Anteile der D<sub>9</sub>-Cholinmetabolite bezogen auf die Applikationsmenge.** 14d alten Kontrollratten wurde 50mg/kg D<sub>9</sub>-Cholinchlorid (9,98 µmol/Tier) intraperitoneal injiziert und relative Mengen von D<sub>9</sub>-Cholin und seinen Metaboliten in Leber (A) und Plasma (B) bestimmt. (C) repräsentiert den Anteil der D<sub>9</sub>-Cholinmetabolite im Plasma bezogen auf die Leber. Anzahlen: n=18 (1,5h); n=15 (6h); n=12 (6h). Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: g = Gramm; mL = Milliliter; D = Deuterium.

Die D<sub>9</sub>-Anreicherung von Cholin in der Leber war nach 1,5h bereits deutlich erniedrigt (als Ausdruck des beschleunigten Verbrauchs, Tab. 24A), allerdings nicht zur Bildung von Betain, dessen D<sub>9</sub>-Anreicherung kompensatorisch nicht

erhöht war. Im Plasma hingegen kam es initial (nach 1,5h) durch Behandlung mit Östradiol sowie Progesteron nur zu einer geringeren Änderung, wohingegen die Anreicherung nach 6h höher war.

Die D<sub>9</sub>-Anreicherung von Cholin und Betain in der Leber war durch Tamoxifen erhöht. Dies gilt auch für das Plasma (als Ausdruck des verlangsamten *Turnovers* aufgrund erniedrigter PC-Synthese, siehe Diskussion). (Tab. 24A+B) Tamoxifen führte – unabhängig von einer gemeinsamen Behandlung mit Östradiol – zu einer starken Erhöhung der D<sub>9</sub>-Anreicherung. Dies galt ebenso für D<sub>9</sub>-Betain (Tab 24B).

A: Leber	D <sub>9</sub> -Cholin		D <sub>9</sub> -Betain	
	1,5h	6h	1,5h	6h
	%	%	%	%
Kontr.	13,6 ± 2,2	3,47 ± 0,53	32,2 ± 4,2	14,7 ± 2,1
Estr.	5,9 ± 0,2**	3,49 ± 0,56	23,4 ± 0,4**	12,4 ± 0,9
Prog.	9,2 ± 1,0*	3,53 ± 1,40	26,3 ± 1,6	12,9 ± 0,8
Prog. + Estr.	7,2 ± 0,9**	3,57 ± 0,09	26,4 ± 5,1	12,2 ± 0,7
Tam.	14,3 ± 2,5***.†††	3,48 ± 0,63	35,3 ± 2,2††	10,3 ± 1,8
Tam. + Estr.	13,9 ± 3,2***.†††	3,29 ± 0,66	40,9 ± 3,5†††	11,1 ± 0,6

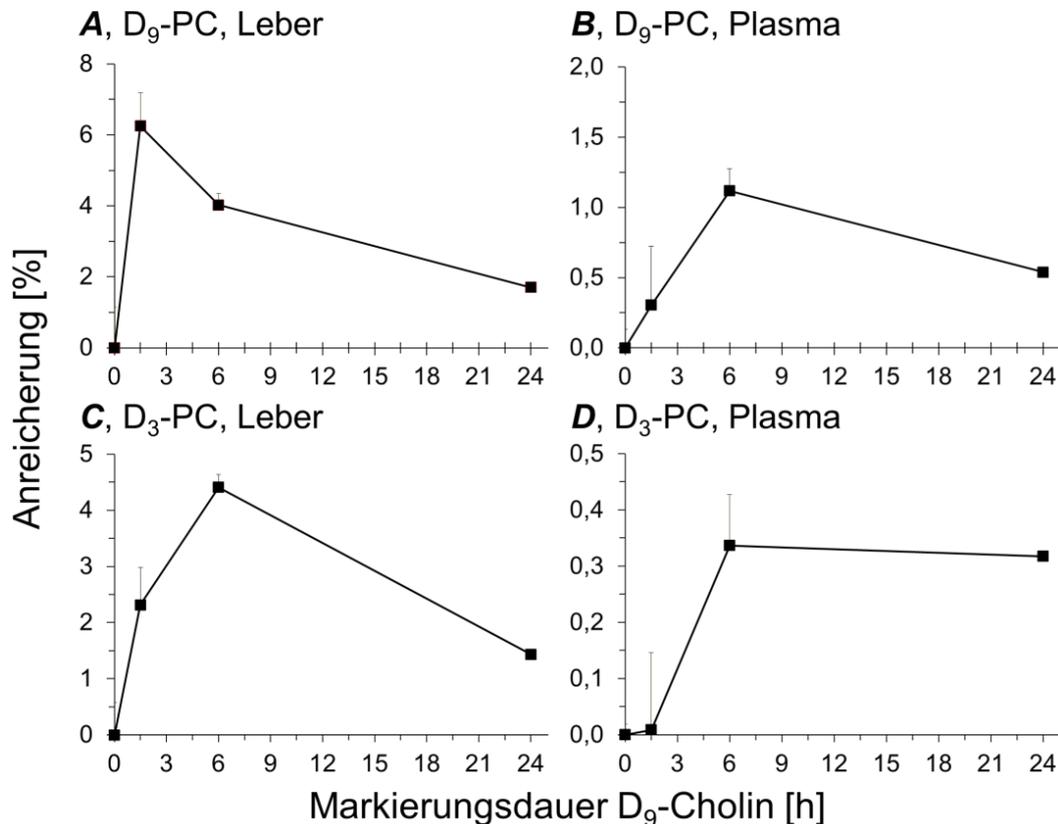
B: Plasma	D <sub>9</sub> -Cholin		D <sub>9</sub> -Betain	
	1,5h	6h	1,5h	6h
	%	%	%	%
Kontr.	12,8 ± 3,0	4,65 ± 0,51	18,5 ± 1,1	8,5 ± 2,5
Estr.	12,7 ± 2,1	5,76 ± 0,71*	17,1 ± 1,3	9,2 ± 1,2
Prog.	10,9 ± 1,1	6,61 ± 2,77**	21,6 ± 2,4*	9,5 ± 0,5
Prog. + Estr.	14,0 ± 1,5	10,71 ± 0,27***	20,8 ± 0,9*	10,2 ± 0,6
Tam.	30,7 ± 5,9***.†††	2,07 ± 1,03**.*†††	29,1 ± 2,2***.†††	8,8 ± 3,0
Tam. + Estr.	39,1 ± 5,7***.†††	1,44 ± 0,27***.†††	28,7 ± 3,6***.†††	9,5 ± 3,0

**Tab. 24: Anreicherung von D<sub>9</sub>-Cholin sowie D<sub>9</sub>-Betain nach 1,5 und 6h in Leber (A) und Plasma (B).** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=18 (1,5h), 15 (6h); Östradiol n=4, 6; Tamoxifen n=13, 8; Tamoxifen+Östradiol n=10, 10; Progesteron n=7, 6; Progesteron+Östradiol n=13, 9. 1,5 Stunden bzw. 6 Stunden vor Töten durch Entbluten wurden 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: D = Deuterium; h = Stunden. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05, ††, p<0,01 vs. Östradiol.

### **3.5: Kinetik des via Kennedy- ( $D_9$ -PC) und PEMT-Pathway ( $D_3$ -PC) synthetisierten PC.**

Vor Bestimmung der Behandlungseffekte soll die reguläre Kinetik von neu-synthetisiertem PC in Leber und Plasma beschrieben werden. Die den Kennedy-Pathway repräsentierende  $D_9$ -Cholin-Markierung von PC hatte mit  $6,3 \pm 1\%$   $D_9$ -Anreicherung in unserem Versuchsaufbau nach 1,5 Stunden ihren Maximalwert und sank anschließend – innerhalb von 4,5 Stunden – ähnlich wie  $D_9$ -Cholin sowie  $D_9$ -Phosphorylcholin (siehe Abb. 22A+B sowie F+G) auf  $4,0 \pm 1,0\%$  ab (Abb. 23A). Die Kinetik von  $D_9$ -PC im Plasma – als Resultante der hepatischen Sekretion – war jedoch verzögert. Die Anreicherung stieg von  $2,3 \pm 0,7\%$  nach 1,5 Stunden auf  $4,5 \pm 1,0\%$  nach 6 Stunden (Abb. 23C). Demzufolge liegt der maximale gemessene Einbau von  $D_9$ -Cholin in PC der Leber ( $t_{\max-D_9}$ ) bei 1,5 Stunden nach Gabe von  $D_9$ -Cholin, während die Sekretion verzögert erfolgt, weshalb die  $t_{\max-D_9}$  im Plasma bei 6 Stunden lag.

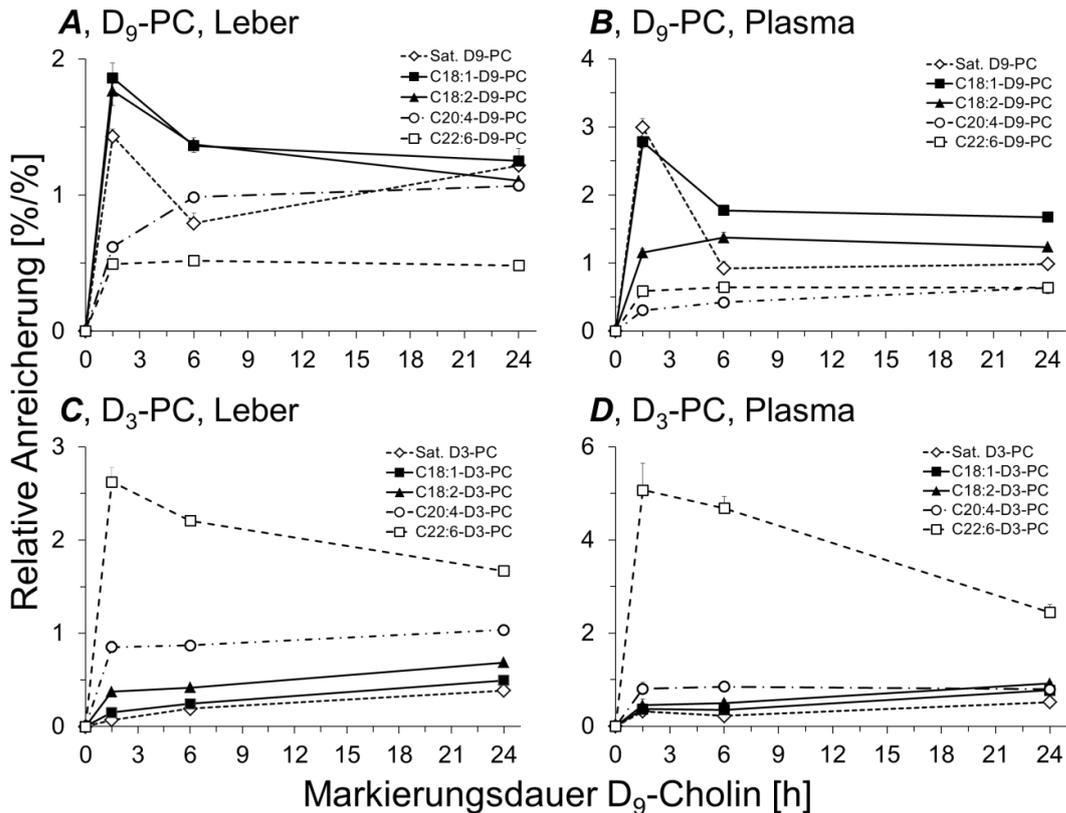
Die Synthese von  $D_3$ -PC in der Leber und seine Freisetzung ins Plasma (Abb. 23B+D) waren jedoch verzögert, mit maximaler Anreicherung nach 6 Stunden. Diese Kinetik entspricht der des  $D_3$ -Cholins (siehe Abb. 22E+J). Die  $D_3$ -Anreicherung von PC (sowie auch von Cholin) ist erheblich niedriger als deren  $D_9$ -Anreicherung. Außerdem ist die Anreicherung in der Leber höher als im Plasma.



**Abb. 23: Kinetik von D<sub>9</sub>-Cholin-PC (A, C) und D<sub>3</sub>-Cholin-PC (B, D) in Leber (A, B) und Blutplasma (C, D).** 14d alten Kontrollratten wurde 1,5 (n=18, 12), 6 (n=15, 12) bzw. 24 Stunden (n=6, 5) vor der Organentnahme 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid i.p. injiziert und die Deuterium-Anreicherung von PC bestimmt. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: h = Stunden; D = Deuterium; PC = Phosphatidylcholin.

Der Anteil des plasmatischen am gesamten D<sub>3</sub>-PC nimmt im Verlauf zu: Während dieser nach 1,5h bei  $2,4 \pm 0,3\%$  liegt, sind es nach 6h  $6,4 \pm 0,8\%$  und nach 24h  $8,4 \pm 1,1\%$ .

Die relative Anreicherung von D<sub>9</sub>-Cholin in allen Subgruppen von Leber- und Plasma-PC hat nach 1,5 Stunden ebenfalls ihren Höhepunkt erreicht und fällt anschließend ab. C18:1-D<sub>9</sub>- und C18:2-D<sub>9</sub>-PC-Spezies besitzen hier die größte relative Anreicherung, da diese beiden Subgruppen vorwiegend über den CDP-Cholin-/Kennedy-Pathway synthetisiert werden (Abb. 24A+B). In Leber und Plasma besitzt wiederum C22:6-D<sub>3</sub>-PC die größte relative Anreicherung, was zeigt, dass C22:6-PC-Spezies überwiegend via PEMT-Pathway synthetisiert werden (Abb. 24C+D).



**Abb. 24: Relative Anreicherung von D<sub>9</sub>-Cholin-PC (A, C) und D<sub>3</sub>-Cholin-PC (B, D) in Leber (A, B) und Blutplasma (C, D) der Ratte.** 14d alten Kontrollratten wurde 1,5 Stunden (n=18, 12), 6 Stunden (n=15, 12) bzw. 24 Stunden (n=6, 5) vor Töten durch Entbluten 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid i.p. injiziert und die Deuterium-Anreicherung von PC bestimmt. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: h = Stunden; D = Deuterium; PC = Phosphatidylcholin.

### 3.5.1: Wirkungen auf D<sub>9</sub>-Cholin, seine wasserlöslichen Metabolite sowie D<sub>9</sub>- und D<sub>3</sub>-PC in Leber und Plasma

Aufgrund der Kinetiken deuterierter Metabolite über 24 Stunden bei gesunden Kontrollen wurden 1,5 Stunden sowie 6 Stunden als Zeitpunkte zur Erfassung pharmakologischer Effekte definiert. Nach Aufnahme in die Zellen wird Cholin zu Phosphorylcholin metabolisiert, welches dann nach Aktivierung bei der de novo-Synthese von PC auf Diacylglycerol übertragen wird. Somit sind die Poolgrößen von D<sub>9</sub>-Cholin die Resultante aus Aufnahme und Phosphorylierung (siehe auch 1.1.2) [105].

Östradiol verringert seine hepatische Poolgröße von D<sub>9</sub>-Cholin nach 1,5 Stunden (p<0,001). Progesteron hingegen führt bei gleichbleibendem D<sub>9</sub>-

Cholin-Pool zu einer Erhöhung des D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin-Pools in der Leber; sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit Östradiol (jeweils p<0,001). Darüber hinaus wird die Menge D<sub>6</sub>-Dimethylglycin in der Leber verringert (p<0,05 bzw. p<0,01). Tamoxifen führt jeweils in etwa zu einer Verdoppelung des hepatischen D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin-, D<sub>9</sub>-Betain- sowie D<sub>6</sub>-Dimethylglycin-Pools (p<0,001). Dies gilt auch in Kombination mit Östradiol.

Im Plasma bewirkt Progesteron tendenziell eine Vergrößerung des D<sub>9</sub>-Cholin-Pools (p<0,05). Tamoxifen, sowohl allein als auch gemeinsam mit Östradiol, erhöht sowohl die Poolgrößen von D<sub>9</sub>-Cholin (+122±9%; p<0,001), D<sub>9</sub>-Betain (+107±11%, p<0,001) als auch D<sub>6</sub>-Dimethylglycin (+43±5%, p<0,01).

In Tab. 25 sind die jeweiligen hepatischen (Tab. 25A) sowie plasmatischen (Tab. 25B) Poolgrößen von D<sub>9</sub>-Cholin, D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin, sowie D<sub>9</sub>-Betain zum Markierungszeitpunkt 1,5 Stunden dargestellt.

<b>A: 1,5h Leber</b>	<b>D<sub>9</sub>-Cholin</b>	<b>D<sub>9</sub>-Ph<sup>3</sup>Cholin</b>	<b>D<sub>9</sub>-Betain</b>
	<b>nmol</b>	<b>nmol</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	37,7 ± 10,7	41,7 ± 7,3	747 ± 132
Östr.	14,9 ± 1,0 <sup>***</sup>	30,9 ± 4,2 <sup>*</sup>	731 ± 17
Prog.	43,8 ± 9,7 <sup>*</sup>	54,8 ± 13,5 <sup>*</sup>	709 ± 65
Prog.+Östr.	36,3 ± 8,2	63,0 ± 15,9 <sup>**</sup>	610 ± 174
Tam.	35,1 ± 10,8 <sup>††</sup>	94,6 ± 21,2 <sup>***,†††</sup>	1.238 ± 99 <sup>***,†††</sup>
Tam.+Östr.	31,6 ± 12,4 <sup>††</sup>	127,3 ± 9,1 <sup>***,†††</sup>	1.332 ± 134 <sup>***,†††</sup>

<b>B: 1,5h Plasma</b>	<b>D<sub>9</sub>-Cholin</b>	<b>D<sub>9</sub>-Ph<sup>3</sup>Cholin</b>	<b>D<sub>9</sub>-Betain</b>
	<b>nmol</b>	<b>nmol</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	8,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	38,8 ± 1,2
Östr.	8,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0	49,3 ± 4,4
Prog.	9,8 ± 0,1	0,0 ± 0,0	50,1 ± 1,8
Prog.+Östr.	10,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	46,7 ± 4,3
Tam.	18,6 ± 0,5 <sup>***,†††</sup>	0,0 ± 0,0	80,1 ± 5,9 <sup>***,†††</sup>
Tam.+Östr.	23,3 ± 0,2 <sup>***,†††</sup>	0,0 ± 0,0	75,1 ± 8,7 <sup>***,†††</sup>

**Tab. 25: Poolgrößen von D<sub>9</sub>-Cholin, D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin sowie D<sub>9</sub>-Betain nach 1,5 Stunden in Leber (A) und Plasma (B).** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=18; Östradiol n=4; Tamoxifen n=13; Tamoxifen+Östradiol n=10; Progesteron n=7; Progesteron+Östradiol n=13. 1,5 Stunden vor Töten durch Entbluten wurden 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: P<sup>3</sup>Cholin=Phosphorylcholin; D = Deuterium; g = Gramm; h = Stunden. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; ††, p<0,01; †††, p<0,001 vs. Östradiol.

### 3.5.2: Konzentration und Anreicherung deuterierter Phosphatidylcholine

Der D<sub>9</sub>-PC-Pool im Lebergewebe betrug im Mittel 1.130 nmol bei 1,5 Stunden und 760 nmol bei 6 Stunden. Die Abnahme (durch Sekretion und/oder Katabolismus) war unter Einfluss von Östradiol stärker, während sie durch Progesteron abgeschwächt wurde. Durch Tamoxifen kam es zur stärksten Abnahme in der Leber. Die Erhöhungen im Plasma in diesem Zeitraum betrugen im Mittel ca. 15% der Erniedrigungen in der Leber. Keine Behandlung veränderte den Plasma-Pool, außer Tamoxifen, allein und in Kombination mit Östradiol, das zu einer Erniedrigung von 60-76 nmol auf 15-17 nmol führte (Tab. 26A).

<b>A: D<sub>9</sub>-PC, Δ6h-1,5h</b>	<b>Leber</b>	<b>Plasma</b>
	<b>nmol</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	-371,0 ± 9,2	+59,8 ± 4,6
Östr.	-493,8 ± 10,6*	+70,6 ± 7,7
Prog.	-308,5 ± 16,5*	+76,4 ± 4,9
Prog. + Östr.	-401,9 ± 10,0	+70,7 ± 4,7
Tam.	-735,5 ± 16,9 <sup>***,††</sup>	+14,5 ± 0,7 <sup>***,†††</sup>
Tam. + Östr.	-872,9 ± 19,7 <sup>***,††</sup>	+17,1 ± 1,8 <sup>***,†††</sup>

<b>B: D<sub>3</sub>-PC, Δ6h-1,5h</b>	<b>Leber</b>	<b>Plasma</b>
	<b>nmol</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	-239,0 ± 5,3	+24,4 ± 1,9
Östr.	-186,9 ± 4,8	+22,0 ± 2,2
Prog.	-257,5 ± 12,0	+31,5 ± 2,1
Prog. + Östr.	-219,3 ± 9,7	+29,6 ± 2,3
Tam.	-118,0 ± 5,2 <sup>**††</sup>	+13,2 ± 0,8*
Tam. + Östr.	-119,5 ± 3,4 <sup>**††</sup>	+15,4 ± 1,1*

**Tab. 26: Differenz der Poolgrößen von D<sub>9</sub>-PC- (A) sowie D<sub>3</sub>-PC-Spezies (B) zwischen 6 Stunden und 1,5 Stunden in Leber und Plasma.** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=18 (1,5h), 15 (6h); Östradiol n=4, 6; Tamoxifen n=13, 8; Tamoxifen+Östradiol n=10, 10; Progesteron n=7, 6; Progesteron+Östradiol n=13, 9. 1,5 Stunden bzw. 6 Stunden vor Töten durch Entbluten wurden 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: D = Deuterium; g = Gramm; h = Stunden. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05, ††, p<0,01 vs. Östradiol.

Östradiol und Progesteron hatten in diesem Zeitraum keinen Effekt auf die Abnahme von D<sub>3</sub>-PC in der Leber oder die Zunahme im Plasma. D<sub>3</sub>-PC-Abnahme von 1,5-6 Std in der Leber und der korrespondierende Anstieg im Plasma wurden durch Tamoxifen, allein oder in Kombination mit Östradiol, abgeschwächt. (Tab. 26B).

### 3.5.3: Die Anreicherung von D<sub>3</sub> im S-Adenosyl-Methionin

Die D<sub>3</sub>-Anreicherung von S-Adenosyl-Methionin (errechnet aus dem  $D_6\text{-PC}/\Sigma D_3+D_6\text{-PC}$ -Quotienten; siehe auch 2.6.1.3) in der Leber änderte sich durch Hormoneinfluss nicht statistisch relevant (Tab. 27).

D <sub>9</sub> -Cholin-Markierung	1,5h	6h	24h
	%	%	%
Kontr.	7,3 ± 0,7	6,1 ± 1,2	3,3 ± 0,5
Östr.	5,6 ± 1,4	5,1 ± 0,3	
Prog.	8,4 ± 1,6	6,2 ± 1,4	
Prog. + Östr.	6,5 ± 1,0	5,3 ± 0,9	
Tam.	7,2 ± 1,1	7,0 ± 0,6	
Tam. + Östr.	9,5 ± 2,9	6,4 ± 0,7	

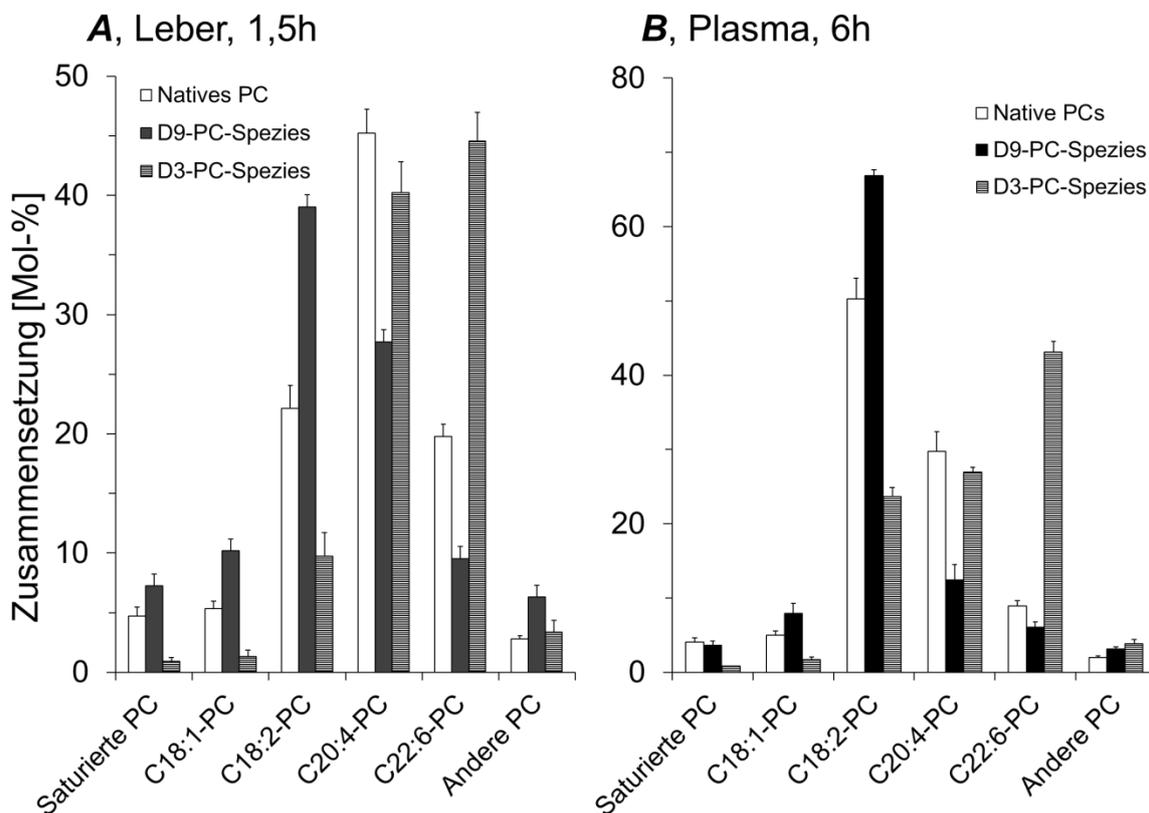
**Tab. 27: D<sub>3</sub>-Anreicherung des S-Adenosyl-Methionins in der Leber.** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=12 (1,5h), 12 (6h), 7 (24h); Östradiol n=4, 6; Tamoxifen n=8, 6; Tamoxifen+Östradiol n=6, 8; Progesteron n=7, 6; Progesteron+Östradiol n=7, 6. 1,5 Stunden, 6 Stunden bzw. 24 Stunden vor Töten durch Entbluten wurden 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: h = Stunden; D = Deuterium. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01 vs. Kontrolle; †, p<0,05; ††, p<0,01 vs. Östradiol.

### 3.5.4: Hormoneffekte auf PC-Subgruppen via Kennedy- und PEMT-Pathway

Allgemeine Fettsäurespezifität der PC-Synthesewege:

Die Synthesewege sind durch die Markierung mit D<sub>9</sub>-Cholin charakterisiert, indem D<sub>9</sub>-PC via Kennedy-Pathway entsteht, während via PE-Methylierung (PEMT-Pathway) D<sub>3</sub>-PC entsteht. Für die Kontrollen ist die molekulare Spezifität dieser Pathways in Abb. 25 für die Lebersynthese (A) und die ins Plasma sezernierten PC-Komponenten (B) dargestellt. Das unmarkierte PC

charakterisiert dabei das sich letztlich einstellende molekulare Äquilibrium aus beiden Synthesewegen und der Ab- und Umbauprozesse über die Zeit. Es wurde die maximale Deuterium-Anreicherung in Leber und Plasma dargestellt, was bei D<sub>9</sub>-PC in der Leber 1,5h und im Plasma 6h sowie bei D<sub>3</sub>-PC sowohl in der Leber als auch im Plasma 6h ist, da die hepatische PC-Sekretion und die Synthese via PEMT-Pathway verzögert ablaufen (siehe hierzu auch Abb. 23). Via Kennedy-Pathway wurde vorwiegend D<sub>9</sub>-C18:2-, D<sub>9</sub>-C20:4-PC, aber wenig D<sub>9</sub>-C22:6- und gesättigtes D<sub>9</sub>-PC synthetisiert. Beim PEMT-Pathway hingegen dominierte D<sub>3</sub>-C22:6-PC als Hauptkomponente (siehe auch Tab 2). Dies gilt für die Leber wie auch für das Plasma; wobei im Plasma der Anteil an D<sub>9</sub>-C18:2-PC prinzipiell höher ist als in der Leber.



**Abb. 25: Anteil der Hauptkomponenten am endogenen, D<sub>9</sub>- sowie D<sub>3</sub>-PC nach 1,5 Stunden in Leber (A) und 6 Stunden in Plasma (B).** 14d alten Kontrollratten (n=12) wurde 6 Stunden vor Töten durch Entbluten 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: D = Deuterium.

### Effekte der Behandlung auf die Fettsäurespezifität der PC-Synthese:

Sowohl in der Leber als auch im Plasma führte die Behandlung mit Östradiol zu einer Erhöhung des Anteils von D<sub>9</sub>-C22:6-PC-Spezies (+28±4%, p<0,01 bzw. +34±5%, p<0,001, vs. Kontrolle). Tamoxifen hingegen reduzierte diesen Anteil (-22±4%, p<0,01 bzw. -18±2%, p<0,01), was auch in Kombination mit Östradiol der Fall war.

Tabelle 28 illustriert die Poolgrößen von D<sub>9</sub>- bzw. D<sub>3</sub>-Analoge von C18:2-, -C20:4- und -C22:6-PC in Leber (A, C) und Plasma (B, D). Die Veränderungen der D<sub>9</sub>-Derivate sind weitestgehend kongruent zu denen der nativen PC-Subgruppen: Während Östradiol in erster Linie zu einem vergrößerten Pool von D<sub>9</sub>-LC-PUFA führte (p<0,01 bzw. p<0,001), wurden D<sub>9</sub>-C18:2-PC-Pools sowohl in der Leber (p<0,001) als auch im Plasma (p<0,05) durch Progesteron erhöht. (Tab. 28A+B). Dabei drücken diese Werte allerdings nicht die Menge an neusynthetisierten PC-Subgruppen aus, weil diese um die D<sub>9</sub>-Anreicherung insbesondere des Phosphorylcholins und die D<sub>3</sub>-Anreicherung des S-Adenosyl-Methionins korrigiert werden muss (siehe 3.6 sowie Diskussion).

Die Menge der D<sub>3</sub>-Derivate von C18:2-PC, C20:4-PC und C22:6-PC (p<0,001) war in der Leber durch Tamoxifen-Behandlung erniedrigt (-11±2% [p<0,05], -22±4% [p<0,01] sowie -26±4 [p<0,001]). Die kombinierte Behandlung mit Östradiol konnte dies nicht kompensieren.

Im Plasma waren die Hormoneffekte übereinstimmend; lediglich die gemeinsame Gabe von Östradiol konnte der Verringerung des Pools von D<sub>3</sub>-C18:2-PC entgegenwirken (-4±1%, p>0,05). (Tab. 28C+D)

<b>A: Leber, 1,5h</b>	<b>D<sub>9</sub>-C18:2-PC</b>	<b>D<sub>9</sub>-C20:4-PC</b>	<b>D<sub>9</sub>-C22:6-PC</b>
	<b>nmol</b>	<b>nmol</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	441 ± 13	313 ± 12	106 ± 6
Östr.	455 ± 11	387 ± 11**	152 ± 9***
Prog.	666 ± 15***	415 ± 12**	154 ± 10***
Prog. + Östr.	779 ± 13***	442 ± 14**	168 ± 11***
Tam.	370 ± 10**,††	229 ± 9**,†††	65 ± 4***,†††
Tam. + Östr.	377 ± 11**,††	240 ± 11**,†††	68 ± 5***,†††
<b>B: Plasma, 6h</b>	<b>D<sub>9</sub>-C18:2-PC</b>	<b>D<sub>9</sub>-C20:4-PC</b>	<b>D<sub>9</sub>-C22:6-PC</b>
	Kontr.	86,3 ± 1,3	16,0 ± 1,5
Östr.	87,4 ± 2,9	20,0 ± 1,6**	11,1 ± 2,0**
Prog.	98,5 ± 3,1*	20,8 ± 2,3**	10,0 ± 1,4*
Prog. + Östr.	88,5 ± 6,9	17,5 ± 2,5	8,7 ± 1,4
Tam.	63,9 ± 3,1**,††	9,2 ± 1,3***,†††	4,6 ± 1,0***,†††
Tam. + Östr.	80,5 ± 2,5	11,9 ± 2,2***,†††	5,5 ± 0,7**,†††
<b>C: Leber, 6h</b>	<b>D<sub>3</sub>-C18:2-PC</b>	<b>D<sub>3</sub>-C20:4-PC</b>	<b>D<sub>3</sub>-C22:6-PC</b>
	Kontr.	40,8 ± 1,2	169,3 ± 10,4
Östr.	31,2 ± 0,3**	145,1 ± 6,6*	181,1 ± 2,3
Prog.	43,9 ± 1,6	153,5 ± 4,5	192,1 ± 17,1
Prog. + Östr.	34,2 ± 0,1*	168,7 ± 18,7	200,8 ± 15,5
Tam.	36,3 ± 0,4*	132,5 ± 13,1**	139,3 ± 10,2***,†††
Tam. + Östr.	34,5 ± 0,3*	119,0 ± 6,6**,†	128,5 ± 6,7***,†††
<b>D: Plasma, 6h</b>	<b>D<sub>3</sub>-C18:2-PC</b>	<b>D<sub>3</sub>-C20:4-PC</b>	<b>D<sub>3</sub>-C22:6-PC</b>
	Kontr.	6,8 ± 0,5	7,7 ± 0,2
Östr.	6,2 ± 0,8	6,9 ± 0,4*	11,6 ± 1,0
Prog.	7,5 ± 0,2*	7,3 ± 0,3	13,9 ± 1,4
Prog. + Östr.	7,3 ± 1,0	6,8 ± 0,6	12,0 ± 0,3
Tam.	5,0 ± 0,8**,†	4,4 ± 0,5***	7,3 ± 0,6***,†††
Tam. + Östr.	6,5 ± 0,9	5,4 ± 0,4**,††	9,2 ± 0,5***,†††

**Tab. 28: Poolgrößen von D<sub>9</sub>- (A, B) + D<sub>3</sub>-C18:2-/C20:4-/C22:6-PC-Spezies (C, D) in Leber (A, C) und Plasma (B, D).** Darstellung entsprechend der maximalen Deuteriumanreicherung im jeweiligen Kompartiment, d. h. 1,5h für Leber-D<sub>9</sub>-PC und 6h für Plasma-D<sub>9</sub>-PC und D<sub>3</sub>-PC in Leber und Plasma. Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=12; Östradiol n=6; Tamoxifen n=6; Tamoxifen+Östradiol n=8; Progesteron n=6; Progesteron+Östradiol n=6. 1,5 Stunden bzw. 6 Stunden vor Töten durch Entbluten wurden 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; D = Deuterium. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05; ††, p<0,01; †††, p<0,001 vs. Östradiol.

### 3.6 Berechnung des neusynthetisierten PC via Kennedy- und PEMT-Pathway

	D <sub>9</sub> -PC	D <sub>9</sub> -Ph'cholin	PC-Neusynthese
<b>A: Leber 1,5h</b>	<b>nmol</b>	<b>% Anreich.</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	1.129 ± 138	38,2 ± 3,1	2.955 ± 53
Estr.	1.259 ± 150	28,8 ± 2,7	4.372 ± 43 <sup>***</sup>
Prog.	1.139 ± 138	25,9 ± 3,1	4.398 ± 36 <sup>***</sup>
Prog. + Estr.	1.174 ± 138	32,6 ± 2,9	3.601 ± 45 <sup>***</sup>
Tam.	1.224 ± 88	47,5 ± 5,8	2.577 ± 42 <sup>**,†††</sup>
Tam. + Estr.	1.356 ± 93	47,6 ± 4,4	2.849 ± 44 <sup>†††</sup>
<b>B: Plasma 1,5h</b>	<b>nmol</b>	<b>% Anreich.</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	69 ± 9	38,2 ± 3,1	181 ± 3
Estr.	64 ± 6	28,8 ± 2,7	222 ± 2 <sup>**</sup>
Prog.	96 ± 15	47,5 ± 5,8	371 ± 4 <sup>***</sup>
Prog. + Estr.	93 ± 14	47,6 ± 4,4	285 ± 5 <sup>***</sup>
Tam.	64 ± 13	25,9 ± 3,1	135 ± 6 <sup>**,†††</sup>
Tam. + Estr.	76 ± 7	32,6 ± 2,9	160 ± 3 <sup>†††</sup>
<b>C: Leber 6h</b>	<b>nmol</b>	<b>% Anreich.</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	758 ± 93	38,2 ± 3,1	1.984 ± 36
Estr.	765 ± 91	28,8 ± 2,7	2.656 ± 26 <sup>***</sup>
Prog.	830 ± 57	47,5 ± 5,8	3.205 ± 15 <sup>***</sup>
Prog. + Estr.	772 ± 90	47,6 ± 4,4	2.368 ± 29 <sup>***</sup>
Tam.	491 ± 35	25,9 ± 3,1	1.034 ± 17 <sup>**,†††</sup>
Tam. + Estr.	484 ± 33	32,6 ± 2,9	1.017 ± 16 <sup>**,†††</sup>
<b>D: Plasma 6h</b>	<b>nmol</b>	<b>% Anreich.</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	129 ± 17	38,2 ± 3,1	338 ± 7
Estr.	135 ± 12	28,8 ± 2,7	469 ± 4 <sup>***</sup>
Prog.	173 ± 26	47,5 ± 5,8	668 ± 7 <sup>***</sup>
Prog. + Estr.	164 ± 25	47,6 ± 4,4	503 ± 8 <sup>***</sup>
Tam.	79 ± 16	25,9 ± 3,1	166 ± 8 <sup>**,†††</sup>
Tam. + Estr.	93 ± 9	32,6 ± 2,9	195 ± 4 <sup>**,†††</sup>

**Tab. 29: Poolgrößen von neusynthetisiertem PC via Kennedy-Pathway.**

Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=12; Östradiol n=6; Tamoxifen n=6; Tamoxifen+Östradiol n=8; Progesteron n=6; Progesteron+Östradiol n=6. 1,5 Stunden bzw. 6 Stunden vor Töten durch Entbluten wurden 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; D = Deuterium. Signifikanzniveaus: \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †††, p<0,001 vs. Östradiol.

Die Wirkungen von Östradiol, Progesteron und Tamoxifen auf die hepatische PC-Synthese lassen sich aus den Plasma- und Gewebekonzentrationen der Präkursoren und Syntheseprodukte sowie ihrer D<sub>9</sub>- bzw. D<sub>3</sub>-Markierung herleiten. In einem Annäherungsverfahren wurde anhand der Daten die Synthese berechnet.

#### CDP-Cholin-/Kennedy-Pathway:

Hier wurde die Menge von D<sub>9</sub>-PC im jeweiligen Kompartiment durch die Präkursorenanreicherung mit D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin nach 1,5 Stunden Markierungszeit dividiert. D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin stellt somit den Surrogatparameter dar, da dieses den zellulären Präkursorenpool für die D<sub>9</sub>-PC-Synthese via Kennedy-Pathway repräsentiert. [35]

Korrigiert man dementsprechend die Poolgrößen an neusynthetisiertem (D<sub>9</sub>-markiertem) PC durch die D<sub>9</sub>-Anreicherung der Präkursoren, akzentuieren sich die Hormoneffekte.

Die Menge an neusynthetisiertem PC via Kennedy-Pathway bei Kontrollen betrug nach 1,5h  $2.955 \pm 53$  und nach 6h  $1.984 \pm 36$  nmol pro Gesamtleber. Östradiol führte im Lebergewebe nach 1,5 Stunden zu vermehrter PC-Synthese ( $+48 \pm 4\%$ ), ebenso wie Progesteron ( $+49 \pm 2\%$ ), während Tamoxifen diese beeinträchtigte ( $-13 \pm 3\%$ ), auch in Kombination mit Östradiol ( $-4 \pm 1\%$ ) (Tab. 29A). Im Plasma präsentierte sich 1,5 Stunden nach Markierung ein vergleichbares Bild (Tab. 29B).

Östradiol verstärkte die Abnahme des D<sub>9</sub>-PC-Pools der Leber von 1,5 bis 6h nach Markierung von  $917 \pm 187$  auf  $1.715 \pm 113$  nmol ( $76 \pm 6\%$  vs. Kontrolle,  $p < 0,001$ ). Im Gegenzug kam es zu einem stärkeren Anstieg des D<sub>9</sub>-PC-Pools im Plasma von  $247 \pm 6$  statt  $157 \pm 22$  nmol ( $57 \pm 4\%$  vs. Kontrolle,  $p < 0,001$ ). Progesteron verstärkte ebenfalls die hepatische D<sub>9</sub>-PC-Abnahme ( $23 \pm 3\%$ ,  $p < 0,001$ ), wirkte aber nicht additiv mit Östradiol ( $27 \pm 3\%$ ,  $p < 0,01$ ). Durch Einfluss von Tamoxifen, sowohl in Monotherapie als auch gemeinsam mit Östradiol, kam es ebenfalls zu einer starken Abnahme des D<sub>9</sub>-PC-Pools ( $60 \pm 6\%$  des Pools,  $p < 0,001$ ), was der größten relativen Abnahme zwischen 1,5 und 6h entsprach ( $-13,4 \pm 0,4\%$ ).

$\Delta t_{6h-1,5h}$	Leber	Abnahme	Plasma	Änderung Plasma/Leber
	nmol	%/h	nmol	%
Kontr.	-971 ± 187	7,3 ± 0,7	+157 ± 22	16,2 ± 1,2
Estr.	-1.715 ± 113 <sup>***</sup>	8,7 ± 0,8	+247 ± 6 <sup>***</sup>	14,4 ± 0,3 <sup>*</sup>
Prog.	-1.193 ± 53 <sup>***</sup>	6,0 ± 1,3	+297 ± 26 <sup>***</sup>	24,9 ± 2,2 <sup>***</sup>
Prog. + Estr.	-1.233 ± 132 <sup>***</sup>	7,6 ± 0,7	+218 ± 37 <sup>**</sup>	17,7 ± 3,0
Tam.	-1.549 ± 69 <sup>***,†</sup>	13,4 ± 1,3	+32 ± 5 <sup>***,†††</sup>	2,1 ± 0,3 <sup>***,†††</sup>
Tam. + Estr.	-1.834 ± 70 <sup>***,†</sup>	14,3 ± 1,4	+36 ± 3 <sup>***,†††</sup>	2,0 ± 0,2 <sup>***,†††</sup>

**Tab. 30: Poolgrößenänderungen von via Kennedy-Pathway neusynthetisiertem PC in Leber und Plasma sowie ihre kinetischen Änderungen.** Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. Kontrolle n=12; Östradiol n=6; Tamoxifen n=6; Tamoxifen+Östradiol n=8; Progesteron n=6; Progesteron+Östradiol n=6. 1,5 Stunden bzw. 6 Stunden vor Töten durch Entbluten wurden 50 mg/kg [Methyl-D<sub>3</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; D = Deuterium. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; †, p<0,05; †††, p<0,001 vs. Östradiol.

Die Zunahme von D<sub>3</sub>-PC des Plasmas war durch Östradiol, Progesteron und ihrer Kombination deutlich erhöht (p<0,01–p<0,001), betrug aber weniger als 25%. Dabei unterschied sich die Zunahme durch Östradiol nicht von der Kontrolle, war aber durch Progesteron allein und in Kombination mit Östradiol deutlich höher. Am niedrigsten war der Anteil unter Einfluss von Tamoxifen (Tab. 30).

A: Leber 1,5h	D <sub>3</sub> -PC	D <sub>3</sub> -SAM	PC-Neusynthese
	nmol	% Anreich.	nmol
Kontr.	182 ± 21	7,3 ± 0,7	2.479 ± 154
Estr.	181 ± 22	5,6 ± 1,4	3.215 ± 122 <sup>**</sup>
Prog.	207 ± 14	8,4 ± 1,6	2.454 ± 121
Prog. + Estr.	173 ± 20	6,7 ± 1,1	2.569 ± 137
Tam.	203 ± 15	7,2 ± 1,1	2.815 ± 106 <sup>*,†</sup>
Tam. + Estr.	213 ± 15	9,5 ± 2,9	2.246 ± 139 <sup>††</sup>
B: Plasma 1,5h	nmol	% Anreich.	nmol
Kontr.	4,3 ± 0,6	7,3 ± 0,7	58 ± 4
Estr.	3,6 ± 0,3	5,6 ± 1,4	65 ± 2
Prog.	4,4 ± 0,7	8,4 ± 1,6	53 ± 6
Prog. + Estr.	3,6 ± 0,5	6,7 ± 1,1	54 ± 4
Tam.	3,5 ± 0,7	7,2 ± 1,1	48 ± 5
Tam. + Estr.	4,5 ± 0,4	9,5 ± 2,9	47 ± 4

<b>C: Leber 6h</b>	<b>nmol</b>	<b>% Anreich.</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	420 ± 51	6,1 ± 1,2	6.906 ± 313
Estr.	368 ± 44	5,1 ± 0,3	7.284 ± 222*
Prog.	464 ± 32	6,2 ± 1,4	7.506 ± 199*
Prog. + Estr.	392 ± 46	5,3 ± 0,9	7.374 ± 245*
Tam.	321 ± 23	7,0 ± 0,6	4.584 ± 163***,†††
Tam. + Estr.	332 ± 23	6,4 ± 0,7	5.181 ± 147**,†††
<b>D: Plasma 6h</b>	<b>nmol</b>	<b>% Anreich.</b>	<b>nmol</b>
Kontr.	29 ± 17	6,1 ± 1,2	472 ± 23
Estr.	26 ± 12	5,1 ± 0,3	507 ± 12*
Prog.	36 ± 26	6,2 ± 1,4	581 ± 27**
Prog. + Estr.	33 ± 25	5,3 ± 0,9	624 ± 27**
Tam.	17 ± 16	7,0 ± 0,6	238 ± 23***,†††
Tam. + Estr.	20 ± 9	6,4 ± 0,7	310 ± 12**,†††

**Tab. 31: Poolgrößen von neusynthetisiertem PC via PEMT-Pathway.** Kontrolle n=12; Östradiol n=6; Tamoxifen n=6; Tamoxifen+Östradiol n=8; Progesteron n=6; Progesteron+Östradiol n=6. 1,5 Stunden bzw. 6 Stunden vor Töten durch Entbluten wurden 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Dosierungen siehe Legende zu Tab. 15. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; D = Deuterium. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; ††, p<0,01; †††, p<0,001 vs. Östradiol.

#### Gesamtsynthese via PEMT-Pathway:

Zur Berechnung des Gesamtpools von neusynthetisiertem PC via PEMT-Pathway wurde die Menge des D<sub>3</sub>-PC in Leber und Plasma durch die D<sub>3</sub>C-Anreicherung des S-Adenosyl-Methionins zum Synthesezeitpunkt (D<sub>3</sub>-SAM/Gesamt-SAM in %; Tab. 27) dividiert, was die Realsynthese von PC über diesen Stoffwechselweg repräsentiert [35].

Die Ergebnisse zeigen, dass die Menge an neusynthetisiertem PC via PEMT bei Kontrollen nach 1,5h 2.479±154 und nach 6h 6.906±313 nmol pro Gesamtleber betrug (Tab. 31A+C). Die Gesamtsynthese lag in derselben Größenordnung wie die Synthese *de novo*. Östradiol führte nach 1,5h zu einer Vermehrung um 29±4% (p<0,01), während nach 6h Östradiol, Progesteron und ihre Kombination zu einer Erhöhung um 5,4±0,3, 8,6±0,3 bzw. 6,8±0,4% führten. Tamoxifen verringerte die via PEMT gebildete PC-Menge nach 6 Stunden in Leber und Plasma um 29±2% bzw. 42±4% (jeweils p<0,001) (Tab. 31C+D).

$\Delta t_{6h-1,5h}$	Leber	Zunahme	Plasma	Änderung Plasma/Leber
	nmol	%/h	nmol	%
Kontr.	+4.427 ± 483	14,3 ± 1,2	+414 ± 9	9,5 ± 0,2
Estr.	+4.069 ± 271	12,4 ± 0,8	+442 ± 2	10,9 ± 0,1*
Prog.	+5.052 ± 240*	15,0 ± 0,8	+528 ± 19**	10,4 ± 0,4
Prog. + Estr.	+4.805 ± 334	14,5 ± 0,9	+571 ± 10***	12,2 ± 0,2**
Tam.	+1.769 ± 173***,†††	8,6 ± 0,7	+190 ± 12***,†††	7,6 ± 0,2*,††
Tam. + Estr.	+2.935 ± 204**,††	12,6 ± 0,9	+262 ± 5***,†††	7,5 ± 0,1*,††

**Tab. 32: Poolgrößenänderungen von via PEMT-Pathway neusynthetisiertem PC in Leber und Plasma sowie ihre kinetischen Änderungen.** Kontrolle n=12; Östradiol n=6; Tamoxifen n=6; Tamoxifen+Östradiol n=8; Progesteron n=6; Progesteron+Östradiol n=6. Dosierungen siehe Legende von Tab. 15. 1,5 Stunden bzw. 6 Stunden vor Töten durch Entbluten wurden 50 mg/kg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid (5 mg/mL) i.p. injiziert. Daten sind Mittelwerte und Standardabweichung. Symbole und Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; D = Deuterium. Signifikanzniveaus: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 vs. Kontrolle; ††, p<0,01; †††, p<0,001 vs. Östradiol.

## 4. Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie wurde eine in Tierversuchen und bei Patienten etablierte Markierung mit D<sub>9</sub>-Cholin in Form seines Chloridsalzes angewandt, um den Metabolismus von Cholin, Cholinmetaboliten und Phosphatidylcholin (PC)-Spezies in Leber und Plasma zu untersuchen. Dies ist klinisch relevant, da Cholin, Arachidonsäure (ARA, C:20:4) und Docosahexaensäure (DHA, C22:6) in Form von Phospholipiden – insbesondere PC – konstitutive Membranbestandteile aller Organe sind. Die Organkonzentrationen sind dabei in engen Grenzen definiert [73] und eine Abweichung ist mit Organgesundheit und normaler Entwicklung nicht vereinbar [12]. Der PC-Metabolismus umfasst sowohl die ubiquitäre Synthese von PC *de novo* als auch via Phosphatidylethanolamin (PE)-Methylierung in der Leber, die Sekretion von PC ins Plasma sowie die molekulare Spezifität der Synthesewege hinsichtlich unterschiedlicher Fettsäurereste [35]. Durch die Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) war es möglich, die Konzentrationen und Poolgrößen der biochemisch, organotypisch und funktionell unterschiedlichen PCs sowie ihre Synthese und Kinetiken hochsensitiv und spezifisch zu erfassen. [7, 90, 91, 92, 107]

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effekte von Östradiol und Progesteron sowie Tamoxifen auf Phospholipidhomöostase und -metabolismus von Leber und Plasma. Zusätzlich wurden übliche biometrische Parameter wie die Gewichtsentwicklung erfasst. Es wurden 7 Tage alte Ratten verwendet und diese für weitere 7 Tage behandelt, weil sich Ratten dieses Alters in einem Entwicklungsstadium befinden, welches in vielen Aspekten dem des 3. Trimenons der menschlichen Fetalentwicklung entspricht. Die molekulare Zusammensetzung von Phospholipiden, ihren Derivaten sowie die Synthese- und Sekretionskinetiken von Leber- und Plasma-PC von Mensch und kleinen Labornagern sind dabei grundsätzlich identisch. Die 14 Tage alte Ratte zeigt dabei allerdings im Vergleich zur 8 Wochen alten Maus und insbesondere zum erwachsenen Menschen einen noch höheren Turnover. [35] Viele strukturelle und funktionelle Entwicklungsprozesse des 3. Trimenons des Menschen laufen

bei Ratte und Maus erst post natum ab, beispielsweise die Entwicklung von Gehirn und Lunge [108, 109]. Da Feten über die Nabelschnur bzw. Plazenta mit maternalem Östradiol und Progesteron versorgt werden, versiegt diese Quelle nach der Geburt. Die grundsätzliche Bedeutung von Östradiol und Progesteron für den Phospholipidmetabolismus während dieser Prozesse lässt sich daher am neonatalen Rattenmodell untersuchen. Bei Frühgeburt geschieht dies ebenso, allerdings zu einem unphysiologisch frühen Zeitpunkt. Frühgeborene präsentieren sich nahezu regelhaft mit einer defizitären Entwicklung von Gehirn und Lunge; ein Bezug zwischen Östrogen-/Progesteronversorgung sowie der Lungenentwicklung ist nachweisbar [110, 111].

Dementsprechend wurden die Wirkungen von Östradiol und Progesteron auf den Phospholipidstatus und PC-Metabolismus der Leber sowie des Plasmas untersucht. Die Leber ist Zentralorgan für die periphere und zentralnervöse Versorgung mit Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten sowie PC der daran gebundenen (konditionell) essentiellen Fettsäuren Arachidonsäure (C20:4) und Docosahexaensäure (C22:6). Cholin ist ein primär essentieller Nährstoff [48, 53]. C20:4 und C22:6 sind während des schnellen Parenchymwachstums essentiell, da ihre endogene Synthese aus Linolsäure bzw.  $\alpha$ -Linolensäure unterhalb des Bedarfs liegt [79, 80]. Zur Untersuchung des systemischen PC-Status und -Metabolismus gehört auch die Bestimmung der für die Leber charakteristischen Parameter im Plasma, da Letzteres Carrier zur Versorgung des zentralen Nervensystems (ZNS) und der anderen peripheren Gewebe ist. Damit sind diese Untersuchungen insbesondere für das schnell wachsende Frühgeborene klinisch relevant.

Die Dosierungen wurden so gewählt, dass der Plasmaspiegel der Hormone in etwa jenem der Schwangerschaft entspricht, eine komplette Blockade der Östrogen-Wirkungen durch Tamoxifen erfolgt und dabei jedoch keine direkten toxischen Effekte auftreten. Eine Zytotoxizität hinsichtlich der Membranhomöostase durch Tamoxifen wurde dadurch ausgeschlossen, dass eine verminderte PC/PE-Ratio, welche charakteristisch für eine gestörte Membranintegrität ist [12], nicht festgestellt wurde. Ebenso war zwar das

Gesamt- und Leberwachstum proportional erniedrigt, aber es kam nicht zu einer erhöhten Letalität (Tierüberleben über 7 Tage = 100%).

#### **4.1: Wachstum neonataler Ratten und Hormoneffekte**

Die Behandlung mit Östradiol, Progesteron bzw. Tamoxifen begann am 7. postnatalen Tag, da zu diesem Zeitpunkt keine endogene Östradiol- und Progesteronwirkung mehr besteht. Im Vergleich zum Menschen befinden sich Ratten dennoch in der „quasi-fetalen“ Situation, mit noch geschlossenen Augen und erst beginnender Alveolarisierung der Lunge. Dies entspricht dem letzten Trimenon der menschlichen Schwangerschaft und damit der progredienten Phase des menschlichen Fetalwachstums [112, 113]. Zwischen Tag 7 (d7) und Tag (d14) verdoppeln Ratten in etwa ihr Gewicht (siehe Ergebnisse), entsprechend dem fetalen Wachstum des Menschen zu 24, 30 und 37 Wochen Gestationsalter (~600g – ~1.320g – ~2.860g) [73, 114].

Die Behandlung mit Östradiol über 7 Tage (7d) erhöhte das Körper- und Lebergewicht, Letzteres aber in geringerem Ausmaß. Da Östrogene über eine Hemmung der Lipolyse zu einem erhöhten Körperfettanteil führen [115], könnte dies die diskrepante Zunahme erklären. Der Body Mass Index (BMI) und Fettgehalt der Versuchstiere wurden jedoch nicht bestimmt. Während der Anteil des Lebergewichts am Gesamtkörpergewicht durch Östradiol abnimmt, bleibt dieser bei Behandlung mit Tamoxifen auf Niveau der Kontrollgruppe. Dies trifft auch auf die gemeinsame Behandlung mit Tamoxifen und Östradiol zu, was den Eigeneffekt des Tamoxifens unterstreicht. Östradiol hat die Effekte von Tamoxifen in aller Regel nicht kompensiert. Tamoxifen ist ein kompetitiver Antagonist des Östrogenrezeptors [116]. Die Tamoxifen-Dosis wurde so gewählt, um seine Eigeneffekte herauszukristallisieren.

#### **4.2: PC-Poolgrößen und -Zusammensetzung**

##### Konzentrationen und Poolgrößen:

Die Konzentrationen von PC in Leber und Plasma betragen bei Kontrollen  $18,8 \pm 2,3 \mu\text{mol/g}$  bzw.  $1,9 \pm 0,2 \mu\text{mol/mL}$ . Die Poolgrößen, berechnet aus dem

Gewicht der Leber und dem Volumen des Plasmas [97], betragen  $18,6 \pm 2,6$  bzw.  $3,0 \pm 0,4$   $\mu\text{mol}$ . Im Interstitium beträgt die Lipoproteinkonzentration ca. 18 - 25% des Plasmas, sein Volumen ist allerdings 3–4-fach höher als das des Plasmas [117, 118]. Das bedeutet, dass im Interstitium nahezu genausoviel PC vorhanden ist wie im Plasma. Somit befinden sich im Extrazellularraum ca. 30–33% der PC-Menge im Vergleich zur Leber.

Östradiol erhöhte die Konzentrationen und die Poolgrößen von PC in Leber und Plasma gleichermaßen, während Progesteron zu einer erhöhten Ratio  $\text{PC}_{\text{Plasma}}/\text{PC}_{\text{Leber}}$  führte und damit das PC des Extrazellularraumes stärker erhöhte als das der Leber. Die Daten legen damit nahe, dass Progesteron den Export von Gesamt-PC aus der Leber ins Plasma stärker erhöht als Östrogen. Die Untersuchungen schließen allerdings nicht die möglichen Effekte dieser Hormone auf die Aufnahme bzw. Sekretion von PC durch andere Organe in das Plasma ein, was nur durch deren Untersuchung geklärt werden kann (s.u.).

#### Hormonelle Wirkungen auf die Subgruppen des PC:

Hinsichtlich des Metabolismus bzw. zunächst der Homöostase der für Gehirn und andere Organe entwicklungsphysiologisch wichtigsten PC-Komponenten [30, 73] – namentlich C20:4-, C22:6- und C18:2-PC – ergibt sich Folgendes für die Wirkungen von Östradiol und Progesteron, wobei ein additiver Effekt nicht sich statistisch nicht nachweisen ließ: Östradiol, Progesteron und ihre Kombination erhöhten die Poolgrößen von C20:4-PC in der Leber um  $+15,2 \pm 0,6\%$ ,  $+13,2 \pm 0,3\%$  bzw.  $+10,0 \pm 0,3\%$  ( $p < 0,001$ ; Tab. 22A). Die Erhöhung im Plasma betrug  $+34,8 \pm 2,0\%$ ,  $+24,7 \pm 3,0\%$  bzw.  $+16,9 \pm 1,0\%$  ( $p < 0,01$ ; Tab. 22B). Damit hat Östradiol einen stärkeren Effekt auf die C20:4-PC-Erhöhung als Progesteron allein oder in Kombination. Hinsichtlich C22:6-PC ergibt sich, dass in der Leber die Poolgrößen durch Östradiol, Progesteron oder deren Kombination um  $+17,2 \pm 0,6\%$ ,  $+27,2 \pm 0,7\%$  bzw.  $+28,0 \pm 1,0\%$  ( $p < 0,001$ ; Tab 22A) erhöht wurden, und im Plasma um  $+25,9 \pm 2,3\%$ ,  $+44,4 \pm 3,8\%$  bzw.  $+29,6 \pm 3,3\%$ . Damit hat Progesteron einen deutlicheren Effekt auf C22:6-PC. Hinsichtlich C18:2-PC ergibt sich für die Leber  $+15,8 \pm 0,6\%$ ,  $+46,7 \pm 2,8\%$  bzw.  $+52,8 \pm 2,5\%$  und für das Plasma kein Effekt durch Östradiol ( $6,0 \pm 0,4\%$ ), jedoch  $57,4 \pm 2,9\%$  sowie  $50,0 \pm 3,3\%$  durch Progesteron allein oder in Kombination.

Daraus ergibt sich, dass beide Hormone die Poolgröße bzw. Konzentration im Plasma (und Interstitium) stärker erhöhen als im Lebergewebe. Des Weiteren wirkt Östradiol vorwiegend erhöhend auf C20:4-PC, während Progesteron präferentiell C22:6-PC und insbesondere C18:2-PC erhöht.

Während der Gravidität verändert sich das PC-Profil im Plasma kontinuierlich, wobei C20:4 sukzessive zu Lasten von C18:2-PC erhöht ist. Die ändert sich erst zu Gunsten von C22:6-PC, wenn der Progesteron-Spiegel im 3. Trimenon stärker ansteigt als der Östrogenspiegel [18]. Der Anstieg von C22:6-PC in der Spätschwangerschaft wurde bereits sowohl am trächtigen Meerschweinchen als auch an der Schwangeren gezeigt. [119, 120, 121]

Nicht übereinstimmend mit den Hormonwirkungen bei der Ratte gegenüber dem Fetus sind die Effekte auf C18:2-PC, wo beim menschlichen Fetus kontinuierlich niedrige und zum Ende der Schwangerschaft weiter absinkende Werte im Plasma-PC zu finden sind [59]. Damit sind die Änderungen im C20:4- und C22:6-PC-Status des menschlichen Feten über die Gestation teilweise, aber nicht vollständig, durch die Wirkungen von Progesteron und Östradiol erklärbar.

Hinsichtlich des verwendeten Tiermodells ist allerdings zu erwähnen, dass die wahrscheinlich ernährungsbedingten Veränderungen zu Ungunsten von C20:4- und C22:6-PC beim Frühgeborenen wesentlich stärker ausgeprägt sind als die Hormoneffekte auf physiologisch ernährte 7-14d alten Ratten [59]. Zusätzlich waren die Ratten bedarfsdeckend via Rattenmilch ernährt. Das betrifft auch das Cholin, für das bei Frühgeborenen eher eine Mangelversorgung vorliegt [57]. Die postnatalen Veränderungen der PC-, C20:4- und C22:6-Homöostase, die ernährungsbedingt sind, haben ein wesentlich größeres Ausmaß als die Effekte auf Zusammensetzung und Poolgröße bei diesen Versuchen. Das bedeutet, dass die Hormoneffekte auf die Homöostase von Cholin, C20:4, C22:6 und PC gegenüber der Versorgung mit diesen für die Entwicklung essentiellen Nährstoffen wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung sind. Das impliziert für Frühgeborene eine gegenüber dem Hormonstatus (Östrogen/Progesteron) vorrangige Bedeutung der optimierten Ernährung mit diesen Substanzen. Das wird nicht nur an dem postnatalen Absinken von C20:4

und C22:6 im Plasma-PC, u. a. wegen C18:2-Übersorgung, deutlich [73], sondern auch an dem Effekt der Supplementierung von Cholin auf dessen Plasmaspiegel [122].

### **4.3: Untersuchung des PC-Metabolismus mit stabiler Isotopenmarkierung**

Ein wesentliches Untersuchungskonzept war, die Effekte auf Konzentrationen und Poolgrößen durch Adressierung der Synthese und Sekretion von PC zu untermauern. Dazu wurde D<sub>9</sub>-Cholinchlorid verwendet. Dies hat drei Gründe: (I) Beim CDP-Cholin-/Kennedy-Pathway kommt es zur direkten Verwendung von D<sub>9</sub>-Cholin für die PC-Synthese, wodurch massenspektrometrisch eindeutig identifizierbare Intermediärprodukte und PC-Spezies entstehen, welche ein um 9 Dalton (Da) höheres Molekulargewicht besitzen. (II) Es kann bestimmt werden, welche Menge und in welcher Geschwindigkeit D<sub>9</sub>-Cholin oxidativ zu D<sub>9</sub>-Betain, welches eine tragende Rolle als Osmolyt sowie als Methylgruppendonor spielt, abgebaut wird. (III) Da eine deuterierte Methylgruppe (D<sub>3</sub>C-) des D<sub>9</sub>-Betains zur Methylierung von Homocystein verwendet wird, entsteht letztlich D<sub>3</sub>-S-Adenosyl-Methionin (D<sub>3</sub>-SAM). Da dieses zur PC-Synthese über den PEMT-Pathway benutzt wird, sind D<sub>3</sub>- und D<sub>6</sub>-PC repräsentativ für diesen Stoffwechselweg [35].

#### Kinetiken des D<sub>9</sub>- sowie D<sub>3</sub>-PC:

Die Kinetiken der Deuterium-Anreicherung im PC der Leber zeigen, dass die direkte PC-Synthese (D<sub>9</sub>-PC) schnell geschieht, mit der größten relativen Anreicherung ( $t_{max}$ )=1,5h. Das Absinken um 33% bis t=6h zeigt, dass dieses PC einen hohen *Turnover* hat, wesentlich bedingt durch die PC-Sekretion via Galle und VLDL. Die Halbwertszeit liegt laut Abb. 23A bei rund 7h, also deutlich unter der adulten Maus [15, 35]. Nach 24h befinden sich allerdings noch 33% des 1,5h-Wertes in der Leber; und zwar als Resultante der Rezyklisierung von D<sub>9</sub>-Cholin aus dem D<sub>9</sub>-PC der Galle via enterohepatischem Kreislauf sowie der Wiederaufnahme von D<sub>9</sub>-PC aus peripheren Organen – wie der Lunge – über Lipoproteine hoher Dichte (high density lipoproteins, HDL) [5,6,7,10].

Die Sekretion von D<sub>9</sub>-PC ins Plasma geschieht verzögert ( $t_{\max}=6\text{h}$ ). Geht man von 6 Stunden als Maximum aus, ist die Plasma-Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) < 15h (Abb. 23B), da die Anreicherung im Plasma die Summe aus In- und Efflux ist. Das entspricht im Wesentlichen dem Wert der adulten Maus und ist um ein Vielfaches schneller als beim erwachsenen Menschen mit einer  $t_{1/2}$  von 6d [35, 107].

Dem steht die Kinetik von D<sub>3</sub>-PC in Leber und Plasma entgegen, die wesentlich verzögert ist; mit  $t_{\max}$  der Leber = 6h (ähnlich der Maus). Allerdings sinkt das D<sub>3</sub>-Enrichment des Plasma-PCs – wiederum als Resultante von Sekretion und Wiederaufnahme – nicht wie beim adulten Menschen und der Maus ab [35]. Dies ist auf zweierlei Art zu erklären: (I) Die Bereitstellung von D<sub>3</sub>-SAM aus D<sub>9</sub>-Cholin und die darauffolgende PC Synthese via PEMT-Pathway geschieht zwar verzögert, aber nachhaltiger, weil das markierte Substrat persistiert. (II) Die Plasma- $t_{1/2}$  von LC-PUFA-PC, welches primär via PEMT-Pathway entsteht, ist länger als die der anderen, kürzerkettigen PC-Spezies, welche über Neusynthese entstehen (unveröffentlichte Ergebnisse am Frühgeborenen [122,123] und Abb. 24).

Die molekulare Spezifität der beiden Stoffwechselwege unterscheidet sich zwischen Mensch und Ratte nicht: In der Leber werden via Kennedy-Pathway vorwiegend C18:1- und C18:2-PCs gebildet werden, während via PEMT-Pathway selektiv C22:6- und – mit Einschränkung – C20:4-PC synthetisiert werden. Dies wird ebenfalls im Plasma-PC deutlich (siehe Abb 28).

#### Hormonwirkungen auf die (berechnete) PC-Synthese:

Will man die Wirkung der Hormone und des Tamoxifens auf die PC-Synthese der Leber quantifizieren, muss die Deuteriumanreicherung der Präkursoren (Abb. 22) mit der Konzentration des deuterierten PCs (Tab. 25) verrechnet werden. Daraus ergaben sich folgende Daten für das Lebergewebe (Tab. 29): In der Leber bewirkten Östradiol, Progesteron sowie ihre Kombination eine Vermehrung des D<sub>9</sub>-PC; und von 1,5-6h eine Abnahme von  $1.715\pm 113$ ,  $1.193\pm 53$  bzw.  $1.233\pm 123$  nmol statt  $971\pm 187$  nmol (jeweils  $p < 0,001$ ). Im Plasma hingegen beträgt die Zunahme nur  $247\pm 8$ ,  $297\pm 26$  bzw.  $218\pm 37$  nmol gegenüber  $157\pm 22$  nmol ( $p < 0,001$ ). Das bedeutet, dass sich nur ein geringer

Anteil im Plasma wiederfindet. Die hepatische Abnahme setzt sich aus dem intrahepatischen PC-*Turnover*, der Sekretion ins Plasma sowie der Sekretion in die Gallenflüssigkeit zusammen. Letztere wurde nicht quantifiziert, macht aber einen wesentlichen Aspekt der hepatischen PC-Sekretion aus [9].

Der intrahepatische Abbau lässt sich anhand des Auftretens charakteristischer PC-Abbauprodukte nachweisen. Die markierten Metabolite – D<sub>9</sub>-Cholin und D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin – unterliegen jedoch einem so schnellen *Turnover*, dass sie zum quantitativen Nachweis nicht geeignet sind. Der Nachweis von D<sub>3</sub>-Cholin hingegen, welches nur aus dem Katabolismus von D<sub>3</sub>-PC, das wiederum ausschließlich via PEMT-Pathway entstanden sein kann, sowie sein Anstieg von 1,5 bis 6h nach Markierung, beweisen, dass der intrahepatische PC-Katabolismus charakteristisch für die neonatale Ratte ist. Quantitativ beträgt der Katabolismus – berechnet aus den Poolgrößen von D<sub>3</sub>-PC und D<sub>3</sub>-Cholin – allerdings nur 1–2% in 4,5h.

Die Zunahme im Plasma ist determiniert durch die hepatische Sekretion und Nettoaufnahme durch periphere Gewebe. Die nur geringe Zunahme im Plasma bedeutet daher – abzüglich der biliären Sekretion von PC – dass PC von peripheren Geweben sehr schnell aufgenommen wird. Dementsprechend muss die PC-Zunahme an insbesondere neonatologisch relevanten Organen wie Gehirn und Lunge weiter untersucht werden.

Durch Einfluss von Östradiol ist das neu synthetisierte D<sub>9</sub>-PC in der Leber von 2.955±53 auf 4.372±43 nmol (+47,9±0,9%, p<0,001) angestiegen; im Plasma kam es zum Anstieg von 181±3 auf 222±2 nmol und nach 6h von 338±7 auf 469±4 nmol (+ ca. 23,0±0,1%). Ein erheblicher Teil des neu synthetisierten PCs wird ins Plasma sezerniert (+ ca. 57,0±1,4%).

Dem steht eine Erhöhung sowohl der endogenen PC-Konzentration als auch des -Pools gegenüber (+6,3±1,2% bzw. +15,1±0,8%, p<0,05). Dies zeigt den stimulierenden Effekt von Östradiol sowohl auf die Synthese als insbesondere auch auf die Sekretion von PC.

Der Anstieg im Plasma ist quantitativ erheblich geringer als die Abnahme von neu synthetisiertem PC in der Leber: Zwischen 1,5 und 6h befinden sich lediglich 14,4±0,5% des hepatisch sezernierten PC im Plasma, was die

Bedeutung der vermehrten PC-Sekretion sowie den überaus schnellen Plasma-Turnover zur Versorgung peripherer Organe unterstreicht.

Durch Progesteron in Monotherapie wie auch in Kombination mit Östradiol werden der endogener PC-Konzentration und -Pool der Leber am deutlichsten erhöht (+25,8±0,6% bzw. +22,8±0,7%, p<0,001). Dasselbe gilt für die Menge an PC-Neusynthese via Kennedy-Pathway (+47,9±1,5%, p<0,001), während sich hinsichtlich des PEMT-Pathways keine Änderung ergibt (p>0,05).

Auch im Plasma kommt es zu einer deutlichen Zunahme der PC-Konzentration sowie des -Pools (+40,6±0,3% bzw. +44,0±0,6%, p<0,001). Die Zunahme von Plasma-D<sub>9</sub>-PC gegenüber der Abnahme in der Leber zwischen 1,5 und 6h beträgt bei Progesteronbehandlung 24,9±1,5% statt 16,2±2,3% bei Kontrollen, was auf eine weiter erhöhte Sekretion durch dieses Hormon hinweist. Prinzipiell nicht ausschließbar ist allerdings ein erniedrigter Plasma-Turnover durch Progesteron, wenngleich das unwahrscheinlich ist. Dies muss anhand der PC-Aufnahme in andere Organe (Lunge, Gehirn) geklärt werden.

Durch den Einfluss von Tamoxifen ist der endogene hepatische PC-Pool verringert (-4,1±1,0%, p>0,05). Das ist bei der Menge an D<sub>9</sub>-PC ebenso, sowohl in der Leber (-12,8±2,3%, p<0,01) als auch im Plasma (-23,7±1,2%, p<0,001). D<sub>3</sub>-PC ist nach 1,5h erhöht (+13,6±4,2%;p<0,05), nach 6h erniedrigt (29,3±2,2%; p<0,001). Das kann bedeuten, das Tamoxifen zu einem erhöhten intrahepatischen PC-Katabolismus führt, zumal die Sekretion ins Plasma erniedrigt zu sein scheint. Dazu passen die Ergebnisse der D<sub>9</sub>-Markierung: Die Cholinase (CK)-Reaktion ist verantwortlich für die Umwandlung von (D<sub>9</sub>-) Cholin in (D<sub>9</sub>-)Phosphorylcholin. Die erhöhte D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin-Menge sowie -Anreicherung und Erniedrigung von Gesamt- und D<sub>9</sub>-PC implizieren, dass Tamoxifen in der gewählten Dosis die *de novo*-PC-Synthese der Leber beeinträchtigt, während die PC-Synthese via PEMT-Pathway nicht primär erniedrigt ist, die Syntheseprodukte jedoch via PC-Katabolismus schnell recycled werden.

#### Metabolismus der Subgruppen von PC in Leber und Plasma:

Endogene und D<sub>9</sub>-C22:6-PC-Spezies sind im Leber-PC durch Östradiol-Einfluss erhöht. Da C22:6-PC wird aber primär via PEMT Pathway gebildet, und in

diesen Experimenten zeigte sich keine deutliche Erhöhung des PEMT-Pathways durch Östradiol. Dasselbe gilt für Arachidonsäure. Östradiol wirkt also offenbar primär auf die Fettsäure-Homöostase und führt darüber hinaus zum erhöhten Einbau dieser langkettigen polyunsaturierten Fettsäuren (LC-PUFA) in PC, welche für die ZNS-Entwicklung wichtig sind, unabhängig von den beteiligten PC-Synthesewegen. Ab der 34. Schwangerschaftswoche kommt es beim Menschen zum isolierten Anstieg von Docosahexaensäure im Plasma-PC, und es ist denkbar dass die Progesteron- und Östradiol-Anstiege [124, 125] im dritten Trimenon primär via LC-PUFA-Homöostase wirken.

Die durch Östradiol sowie auch Progesteron größeren PC-Pools bringen einen erhöhte Cholinbedarf mit sich, der bei den Versuchstieren wahrscheinlich gegeben war. Dies ist allerdings ein relevanter Unterschied zum Frühgeborenen: Während ersteren aufgrund der Muttermilch-Ernährung ausreichend Cholin zur Verfügung stand, liegt beim Frühgeborenen wahrscheinlich ein Cholinmangel durch Diskonnektion von der Plazenta und ungenügender Cholinversorgung via Muttermilch bzw. Formula-Nahrung vor [70, 71, 72].

Die Zusammensetzung des hepatischen PCs ändert sich durch Einfluss von Progesteron: Während C18:2-PCs, welche hauptsächlich über den CDP-Cholin-Pathway synthetisiert werden, in Leber und Plasma einen höheren Anteil ausmachen, kommt es zu einem geringeren Anteil von C20:4-PCs (siehe Abb. 21). Dieser Effekt des Progesterons kann zwar auch während der menschlichen Schwangerschaft beobachtet werden; C18:2-PC steigt beim Menschen jedoch während der Schwangerschaft nicht an [32], was nur bei einer verstärkten Aktivität des Kennedy-Pathways zu erwarten wäre. Es ist somit anzunehmen, dass C18:2, welches vorherrschende Fettsäure der Muttermilch-Triglyceride ist [126, 127], aus der Nahrung via Leber in die Phospholipide eingebaut wird und der Fettsäuremetabolismus primär durch Progesteron beeinflusst wird.

Die Kinetik der D<sub>9</sub>-haltigen C20:4-PC-Spezies in Leber und Plasma unterscheidet sich sowohl unter Östrogen- als auch unter Progesteroneinfluss nicht von der Kontrolle. Dies schließt eine erhöhte (C20:4-PC-)Sekretion der Leber allerdings nicht aus, da gleichzeitig die Aufnahme in periphere Organe

verändert sein kann. Um dies zu verifizieren, ist es allerdings nötig, den (D<sub>9</sub>-)C<sub>20:4</sub>-PC-Gehalt anderer parenchymatöser Organe wie Gehirn und Lunge zu analysieren.

Interessanterweise werden C<sub>18:2</sub>-haltige PC-Spezies auch via PE-Methylierung synthetisiert, da sie rund 10 Mol% des D<sub>3</sub>-PC ausmachen. Die Erhöhung von D<sub>3</sub>-C<sub>18:2</sub>-PC durch Progesteron impliziert, dass dieses Hormon keine Änderung der Balance zwischen Kennedy- und PEMT-Pathway induziert, sondern eine vorgeschaltete Änderung der Fettsäurebalance hervorruft (siehe 4.4).

Tamoxifen hingegen verhindert offenbar die PC-Sekretion der Leber: Die D<sub>9</sub>-Anreicherung des Leber-PC unterscheidet sich nicht gegenüber der Kontrolle, wohingegen diese im Plasma deutlich niedriger ist. Darüber hinaus ist der intrahepatische PC-Metabolismus insbesondere von C<sub>20:4</sub>- und C<sub>22:6</sub>-PC durch Tamoxifen beeinträchtigt. Die hepatische Kumulation von D<sub>9</sub>-PCs erklärt sich aus einer verminderten Sekretion, somit ist die Erniedrigung im Plasma nicht das Ergebnis vermehrter peripherer Aufnahme, sondern einer generellen Erniedrigung der peripheren Organversorgung aus der Leber. Die verminderte Verwendung von D<sub>9</sub>-Cholin und D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin für die PC-Synthese – resultierend in eine Verminderung des D<sub>9</sub>-PC-Pools in der Leber – ist konsistent mit einem erhöhten Abbau von Cholin zu Betain. Dazu passt der erhebliche Anstieg des nativen und D<sub>9</sub>-markierten Betains in der Leber durch Tamoxifen als Resultat des erniedrigten Cholinverbrauchs.

#### **4.4: Phosphatidylethanolamin in der Leber**

Eine Verminderung von PE durch erhöhte Aktivität des PEMT-Pathways im Rahmen der Hormonbehandlungen konnte nicht festgestellt werden. Durch Behandlung mit Östradiol sowie mit Progesteron kam es zwar zur Erhöhung von C<sub>22:6</sub>-PC in der Leber; im Gegenzug jedoch zu keiner verminderten Menge an C<sub>22:6</sub>-PE. Die Effekte auf die C<sub>22:6</sub>-PC Synthese waren jedoch nur gering und es ist anzunehmen, dass der *Turnover* von PE ebenso sehr hoch ist wie der des PC.

Darüber hinaus war beim D<sub>3</sub>-PC der C18:2-Gehalt erhöht, sodass Progesteron offenbar die generelle PE-Verfügbarkeit für die PC-Synthese via PEMT-Pathway verändert. Hier bietet die zelluläre Kompartimentierung und unterschiedliche Zusammensetzung von Membranphospholipiden subzellulärer Membranen eine Erklärung dafür, dass der Verbrauch von C22:6- und C18:2-PE in diesen Membranen nicht zu einer nachweisbaren Änderung im Gesamtextrakt führt.

Durch Einfluss von Tamoxifen kam es hingegen zu einer verminderten Menge von PE, in erster Linie von C22:6-PE-Spezies, was unterstreicht, dass Tamoxifen den Fettsäuremetabolismus generell beeinträchtigt.

#### **4.5: PEMT-Pathway**

Betain ist Methylgruppendonator für die Synthese von Methionin aus Homocystein via BHMT. Es stellt damit SAM für weitere Methylierungen bereit, insbesondere dem PEMT-Pathway, der Kreatinsynthese sowie DNA-/Histon-Methylierungen [128, 129]. Es darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass Betain zudem als Osmolyt benötigt wird; hauptsächlich für die Konzentrationsfähigkeit der Nieren.

Das D<sub>3</sub>-Enrichment von S-Adenosyl-Methionin (SAM) ändert sich innerhalb der Behandlungsgruppen nicht. Außerdem bleibt das D<sub>3</sub>-Enrichment des Gesamt-PCs zwischen den Behandlungsgruppen konstant. Das bedeutet, dass unter den hier gewählten Bedingungen die Aktivität des PEMT-Pathways und die Präkursorbereitstellung für diesen Stoffwechselweg in der neonatalen Rattenleber nicht von Östradiol und Progesteron abhängig sind. Ob dies der Tatsache geschuldet ist, dass die Cholinversorgung der Ratten – im Gegensatz zum Frühgeborenen [59] – physiologisch hoch war oder die PEMT-Aktivität der wachsenden Leber nicht hormonabhängig ist, lässt sich in dieser Arbeit nicht beantworten.

Aus dem PEMT-Pathway stammendes D<sub>3</sub>-Cholin ist im Vergleich zu D<sub>9</sub>-Cholin, welches dem Kennedy-Pathway entspringt, sowohl hepatisch (um den Faktor 8-12) als auch plasmatisch (um den Faktor 20-30) niedriger. Eine erhöhte D<sub>3</sub>-PC-

Konzentration im Plasma, welche zumindest für eine verstärkte Sekretion von PEMT-PCs seitens der Leber sprechen würde, liegt ebenfalls nicht vor.

Jedoch korrigiert um die D<sub>9</sub>- bzw. D<sub>3</sub>-Anreicherung von Phosphorylcholin (38,2±4,3%) und S-Adenosyl-Methionin (Tab. 27) ergeben sich daraus Verhältnisse von D<sub>9</sub>:D<sub>3</sub> von ca. 1:1. Das bedeutet, dass die endogene Cholin-Synthese einen deutlichen Anteil an der Cholinversorgung ausmacht.

D<sub>3</sub>-Cholin entsteht zunächst ausschließlich aus D<sub>3</sub>-PC, welches primär dem PEMT-Pathway entspringt. Anschließend steht das D<sub>3</sub>-Cholin jedoch auch dem Kennedy-Pathway zur Verfügung. Das bedeutet, freies D<sub>3</sub>-Cholin – insbesondere zu späteren Analysezeitpunkten (>6h) – stammt auch aus D<sub>3</sub>-PC, welches via Kennedy-Pathway entstanden ist.

Es ist naheliegend, dass zwar der Hauptanteil der D<sub>3</sub>-Derivate der Leber entspringt, jedoch periphere Organe durchaus auch D<sub>3</sub>-PC/D<sub>3</sub>-Cholin freisetzen können, nachdem diese aufgenommenes D<sub>3</sub>-PC katabolisiert haben.

Dementsprechend ist es von Bedeutung, die Anreicherung D<sub>3</sub>-haltiger PCs in parenchymatösen Organen zu quantifizieren. Wenngleich die Daten dagegen sprechen, dass die Leber verstärkt PC sezerniert, werden PEMT-PCs möglicherweise selektiv und mit einem hohen Turnover (via VLDL) aus der Leber in die Peripherie transportiert. Ebenso ist es sinnvoll, in weiteren Versuchen die Expression des PEMT-Gens der Hepatozyten bei hormoneller Behandlung *in vivo* zu quantifizieren [130].

Dennoch ist es ungewöhnlich, dass die PC-Synthese via PEMT-Pathway etwa genauso hoch ist wie die Synthese *de novo* (siehe Tab. 29+31). Dies liegt möglicherweise an den Korrekturfaktoren für die Präkursorenanreicherung als Grundlage der Absolutsynthese. Die rechnerische Ableitung der D<sub>3</sub>-Anreicherung von SAM für den PEMT-Pathway geschieht aus Daten zum Zeitpunkt der Synthese, wodurch sich eine korrekte Bestimmung der Synthese via PEMT ergibt [35]. Die D<sub>9</sub>-Anreicherung von Phosphorylcholin zur Absolutsynthese geschah zum selben Zeitpunkt wie die Probennahme, obwohl das PC höchstwahrscheinlich vorher synthetisiert wurde. Entsprechend der schnellen Abnahme der D<sub>9</sub>-Anreicherung von Cholin sowie Phosphorylcholin ist anzunehmen, dass die D<sub>9</sub>-Anreicherung von Phosphorylcholin zum Zeitpunkt

der *de novo*-PC-Synthese höher war und damit die Syntheserate dementsprechend wesentlich höher lag als hier veranschlagt.

#### **4.6: Cholin und wasserlösliche Cholinmetabolite im Plasma**

Die Cholinkonzentration im Plasma einer 14 Tage alten Ratte entspricht mit  $34,5 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$  in etwa jener der Nabelschnur bzw. dem 1. postnatalen Tag des Menschen. Die Konzentration bei der erwachsenen Ratte beträgt ca.  $23 \mu\text{mol/L}$ , beim erwachsenen Menschen beträgt sie etwa  $9 \mu\text{mol/L}$  [59, 131].

Der plasmatische Cholinpool an d7 liegt bei 32 nmol, während er an d14 bei 58 nmol liegt.

Im Alter von 7d konsumierte die Ratte ca.  $27 \mu\text{mol}$  Cholin; an d14 ca.  $65 \mu\text{mol}$ . Mit Injektion der stabilen Isotopen wurden  $10 \mu\text{mol}$  ( $D_9$ -)Cholin in den Organismus eingebracht (siehe auch 3.2.1).

Da sich die Ratte in diesem Zeitraum im progredienten Wachstum befindet, ist der hohe Plasmacholinspiegel analog zur Fetalperiode des Menschen mit seinem hohen Cholinbedarf zu sehen, insbesondere für die Neurogenese, Ausbildung von Synapsen und Organisation des Gehirns und das allgemeine Parenchymwachstum, da Cholinkomponenten konstitutive Bestandteile aller Gewebe mit definierten Konzentrationen sind [54, 56]. Durch den diaplazentaren Transport von Cholin kommt es zu einer im Vergleich zum maternalen Plasma rund dreifach erhöhten Konzentration im Feten [62, 63], welche biologisch sinnvoll damit begründet ist, dass die Carrier für die Cholinaufnahme zur PC-Synthese eine niedrige Substrataffinität haben (hohe Michaelis-Konstante  $K_m$ ) und die Aufnahme deshalb proportional zur Plasmakonzentration geschieht [132, 133]. Die Membranbildung erfolgt dementsprechend auch proportional zur Plasmakonzentration.

Durch den oxidativen Abbau von Cholin entsteht Betain als Osmolyt und Methylgruppendedonor [35, 47, 48, 49]. Analog entsteht  $D_9$ -Betain nach  $D_9$ -Cholin-Gabe. Durch Östradiol steigt nicht nur Cholin, sondern plasmatisches ( $D_9$ -)Betain relativ zu ( $D_9$ -)Cholin überproportional an, was – analog zu den Daten der Leber – einen vermehrten oxidativen Abbau des Cholins indiziert (siehe oben).

Progesteron erhöht den Cholinpiegel im Plasma ebenso wie Östradiol ( $55,5 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$  vs.  $40,0 \pm 4,9$  vs.  $34,5 \pm 3,1$ ), was seine Rolle als Gestagen unterstreicht. Der Anstieg des Progesterons im maternalen – und dementsprechend auch im fetalen – Plasma während des dritten Trimenons korreliert mit dem starken Wachstum und damit dem hohen Bedarf an Cholin.

Tamoxifen erhöht das Cholin und Betain im Plasma nicht, führt aber zu einer höheren  $D_9$ -Cholin-Konzentration. Ursache könnte eine gestörte Cholinverwertung durch die Leber sein. Dies stimmt mit den Daten zur geringeren PC-Synthese und -Sekretion durch die Leber unter Tamoxifen-Einfluss überein.

#### **4.7: Wasserlösliche Metabolite des Cholins in der Leber**

Die Kinetiken von  $D_9$ -Cholin und  $D_9$ -Phosphorylcholin in der Leber (Abb. 22A+B) zeigen, dass Cholin sehr schnell in Phosphorylcholin umgewandelt wird, weil die  $D_9$ -Anreicherung des Letzteren bereits nach 1,5h höher ist als die des Cholins, obwohl seine Poolgröße höher ist als die des Cholins in der Leber. Dies zeigt auch der Abfall zwischen 1,5h und 6h um ca. 65%. Das bedeutet, dass die initiale Anreicherung zum Zeitpunkt der PC-Synthese *de novo* ( $D_9$ -PC) möglicherweise noch höher war als zum Analysezeitpunkt (siehe auch 4.4). Dennoch wurde die  $D_9$ -Anreicherung des Phosphorylcholins bei 1,5h als Rechengröße für die Nettosynthese benutzt, weil die Extrapolierung eine nicht experimentell gesicherte Spekulation darstellen würde. Es ist aber zu bedenken, dass dadurch die Syntheseraten und der hepatische PC-Turnover ggf. zu niedrig angesetzt sind, und nicht  $7,3 \pm 0,3\%/Std.$  beträgt (Tab. 30), sondern noch höher ist. Das bedeutet, dass der hepatische PC-Turnover mit ca. 10 Stunden noch wesentlich schneller abläuft, als es bei adulten Mäusen der Fall ist [12, 15, 35].

Der Beitrag anderer Organe am plasmatischen PC-Spiegel ist darüber hinaus nicht erfasst; beispielsweise jedoch spielt die Lunge eine wichtige Rolle, da nach 1,5 Stunden freies  $D_9$ -Cholin im Plasma nachweisbar war und damit unter anderem der pulmonalen PC-Synthese zur Verfügung stand. Ein erheblicher

Anteil der pulmonalen PC-Synthese unterliegt dem Export via ABCA1-Transporter sowie dem Transfer auf Apolipoprotein A1 [134]; diese Sekretion wird darüber hinaus von Steroidhormonen beeinflusst [92].

Entsprechend dem stimulierenden Effekt auf die PC-Synthese und -Sekretion vermehren Östradiol und Progesteron in unterschiedlichem Ausmaß die Konzentrationen und Poolgrößen von Cholin und seinen wasserlöslichen Metaboliten.

Östradiol erhöht insbesondere Betain, während Progesteron in erster Linie zu einer Erhöhung von Cholin führt (siehe Abb. 14 + Tab. 16). Östradiol bedingt im Vergleich zu Progesteron keinen Anstieg der Phosphorylcholinpools, was sowohl mit dem erhöhten Verbrauch durch die gesteigerte PC-Synthese als auch mit der verstärkten Umwandlung zu Betain erklärt werden kann. Dies gilt, obwohl im Plasma die Konzentrationen von freiem Cholin durch Östradiol und Progesteron gleichmäßig erhöht werden. Die Plasma-Erhöhung ist insofern relevant, als dass die Aufnahme von Cholin in die Zellen für die PC-Synthese und damit Membranbildung proportional zur Plasmakonzentration abläuft. Dies bedeutet einen generellen trophischen Effekt dieser Hormone auf die Parenchymentwicklung. [132, 135, 73]

Bemerkenswerterweise gelten diese Veränderungen bei freier Nahrungsaufnahme mit physiologischem Cholingehalt durch Rattenmilch, sodass der Cholinspiegel des Plasmas nicht allein über die Ernährung, sondern auch über Progesteron und Östradiol geregelt ist.

Der scheinbare Widerspruch von beschleunigter Abnahme der D<sub>9</sub>-Anreicherung in der Leber und ihrer Verlangsamung im Plasma durch Östradiol und Progesteron ist dadurch erklärbar, dass diese Hormone den PC- und Cholin-*Turnover* beschleunigen und somit recyceltes D<sub>9</sub>-Cholin vermehrt im Plasma persistiert.

Tamoxifen führt – bei unveränderter Cholin-Konzentration – zur vermehrten Anreicherung von D<sub>9</sub>-Cholin in der Leber (sowie insbesondere auch im Plasma). Dies kann durch eine Kumulation aufgrund eines langsameren Einbaus erklärt werden. Da sich das Verhältnis von Betain zu Cholin indessen nicht ändert, ist ein verringerter oxidativer Cholinabbau hierfür nicht ursächlich.

Interessanterweise kommt es durch Tamoxifen darüber hinaus zu einer deutlichen Erhöhung des Phosphorylcholingehaltes im Lebergewebe. Da die PC-Synthese gehemmt ist, kommt es zur Erhöhung von D<sub>9</sub>-Phosphorylcholin, dem Hauptspeicher von Cholin in der Zelle und Intermediärprodukt der PC-Synthese via Kennedy-Pathway [28]. Bei Nichtverwendung von Cholin kommt es hingegen nicht zu Akkumulation, sondern zum oxidativen Abbau zu Betain. Diese vermehrte Betainsynthese schlägt sich zwar in einer erhöhten zellulären Konzentration nieder, jedoch nicht für die Methylgruppendonation und SAM-Bildung für die PC-Synthese via PE-Methylierung.

In summa zeigen die Daten eine erniedrigte Menge von Gesamt-PC sowie via Kennedy- und PEMT-Pathway neusynthetisiertem PC in der Leber. Im Plasma sind Gesamt- sowie neusynthetisiertes PC ebenfalls erniedrigt, sodass aus der Tamoxifenbehandlung sowohl eine Synthese- als auch Sekretionsstörung des Leber-PC ins Plasma resultiert, obwohl die Dosis im eigentlichen Sinne nicht lebertoxisch ist (LD<sub>50</sub> = 4.100 mg/kg KGW [136]; applizierte Dosis = 1.000 mg/kg).

Da die Funktion der PC-Sekretion der Leber ins Plasma dem Triglycerid-Export via VLDL dient, müsste sich dieses in einer Triglyceridanreicherung der Leber (Hepatosteatose) äußern, wie bei mit Tamoxifen behandelten Patienten bestätigt wurde [137, 138].

## 5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass Wachstum und Phospholipidmetabolismus der neugeborene Ratte maßgeblich durch die Gabe von Östradiol und Progesteron beeinflusst werden: (I) Östradiol führt zu einem beschleunigten Gesamt- und Leberwachstum. (II) Östradiol und Progesteron stimulieren die hepatische PC-Synthese und -Sekretion ins Plasma. (III) Östrogen erhöht die Oxidation von Cholin zu Betain, dem wichtigsten Methylgruppendonor, während Progesteron insbesondere die Plasmakonzentration von Cholin erhöht. (IV) Die Deuterium-Markierung zeigte, dass die Synthese von arachidonsäure- (C20:4) sowie docosahexaensäurehaltigem (C22:6) PC prinzipiell sowohl via *de novo*-Synthese (Kennedy-Pathway) als auch über Phosphatidylethanolamin-Methylierung (PEMT-Pathway) erfolgt, wobei C20:4- und C22:6-Subgruppen bevorzugt über den PEMT-Pathway entstehen. (V) Östradiol und Progesteron erhöhen C20:4- sowie C22:6-PC-Spezies wahrscheinlich nicht primär über die Änderung der Synthesewege, sondern über die Fettsäurehomöostase. In diesem Kontext ist auch die Erhöhung von C18:2-PC-Spezies durch Progesteron erklärbar. (VI) Die Hormoneffekte auf die Fettsäure-Balance sind im Gegensatz zum Frühgeborenen eher diskret. Das bedeutet, dass die massiven Erniedrigungen von C20:4- und C22:6-PC sowie die Erhöhungen von C18:2-PC beim Frühgeborenen Ausdruck der Lipidfehlernährung und nicht eines Hormondefizits sind. (VII) Östradiol führt zur Erhöhung von Betain als Methylgruppendonor und Osmolyt, was eine verbesserte osmotische Kompetenz und epigenetische Regulation bedeuten könnte. Allerdings wird Betain beim Frühgeborenen durch Cholinsupplementierung ebenfalls signifikant erhöht. [139] (VIII) Tamoxifen hingegen bewirkte eine erhebliche Beeinträchtigung der PC-Synthese und -Sekretion durch die Leber.

Im Zuge dieser Arbeit wurde nicht bestätigt, dass Östradiol zu einer Hochregulierung des PEMT-Pathways von 14 Tage alten Ratten führt. Damit kann die Bedeutung von Östrogen für die Regulation des C20:4- und C22:6-Metabolismus in der wachsenden Leber über den PEMT-Pathway nicht belegt

werden. Ob Frühgeborene von einer Substitution dieser beiden Hormone bis zum Erreichen des errechneten Geburtstermines profitieren, bleibt ohne weiterführende Forschung unklar. Am Tiermodell, welches für diese Studie verwendet wurde, muss nun anhand anderer parenchymatöser Organe gezeigt werden, ob diese hinsichtlich ihrer Cholinversorgung und PC-Eigensynthese sowie Versorgung mit hepatischem PC einen Vorteil aus der hormonellen Intervention ziehen.

Unabhängig vom hormonellen Einfluss auf den PEMT-Pathway steht die klinische Relevanz einer Östrogen- und Progesteron-Substitution hinter der adäquaten alimentären Versorgung mit Cholin, C20:4 und C22:6 zurück, da ein mangelhaftes bzw. unbalanciertes Nährstoffangebot nicht durch Hormonsubstitution kompensiert werden kann.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- 1 Schmitz G, Müller G. (1991). Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res* 32:1539–70.
- 2 Mason TM. (1998). The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 35:461–87.
- 3 Cohen DE (1996). Hepatocellular transport and secretion of biliary phospholipids. *Semin Liver Dis* 16:191–200.
- 4 Vance DE. (2008). Role of phosphatidylcholine biosynthesis in the regulation of lipoprotein homeostasis. *Curr Opin Lipidol* 19:229-34.
- 5 Yao ZM, Vance DE. (1988). The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem.* . 263:2998-3004.
- 6 Zhou J, You Y, Ryan AJ, Mallampalli RK. (2004). Upregulation of surfactant synthesis triggers ABCA1-mediated basolateral phospholipid efflux. *J Lipid Res.* 45:1758-67.
- 7 Bernhard W, Gesche J, Raith M, Poets CF. (2016). Phosphatidylcholine kinetics in neonatal rat lungs and the effects of rhuKGF and betamethasone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 310:L955-63.
- 8 Scott BL, Bazan NG. (1989). Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:2903-7.
- 9 Kawamoto, T, Okano G, Akino T. (1980). Biosynthesis and turnover of individual molecular species of phosphatidylcholine in liver and bile. *Biochim Biophys Acta.* 619:20-34.
- 10 Li Z, Agellon LB, Vance DE. (2007). Choline redistribution during adaptation to choline deprivation. *J Biol Chem* 282:10283-10289.
- 11 Macfarlane DP, Zou X, Andrew R, Morton NM, Livingstone DE, Aucott RL, Nyirenda MJ, Iredale JP, Walker BR. (2011). Metabolic pathways promoting intrahepatic fatty acid accumulation in methionine and choline deficiency: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 300:E402-9.
- 12 Li Z, Agellon LB, Allen TM, Umeda M, Jewell L, Mason A, Vance DE. (2006). The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab.* 3:321-31.
- 13 Suchy FJ. (2004). Neonatal cholestasis. *Pediatrics in Review*, vol. 25, no. 11, pp. 388-96.
- 14 Sondheimer JM, Asturias E, Cadnapaphornchai M. (1998). Infection and cholestasis in neonates with intestinal resection and long-term parenteral

- 
- nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 27, no. 2, pp. 131-137.
- 15 Li Z, Agellon LB, Vance DE. (2005). Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure. *J Biol Chem*. 280:37798–802.
  - 16 Fischer LM, da Costa KA, Kwock L, Galanko J, Zeisel SH. (2010). Dietary choline requirements of women: effects of estrogen and genetic variation. *Am J Clin Nutr*. 92:1113-9.
  - 17 Luine VN. (1985). Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. *Exp Neurol*. 89:484-90.
  - 18 Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR. (1972). Plasma estrone, Estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 112:1095-100.
  - 19 Sengupta P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*.4:624-30.
  - 20 Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. (2012). Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig*. 25:49-51.
  - 21 Watson RE, Desesso JM, Hurtt ME, Cappon GD. Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 77:471-84.
  - 22 Cooper GM. „The Cell, A Molecular Approach (2nd Edition)“. Sunderland (MA). 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6.
  - 23 Alberts B, Johnson A, Lewis J. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. New York: Garland Science. Verfügbar über: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>.
  - 24 Koc H, Mar MH, Ranasinghe A, Swenberg JA, Zeisel SH. (2002). Quantitation of Choline and Its Metabolites in Tissues and Foods by Liquid Chromatography/ Electrospray Ionization-Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Anal. Chem*. 74:4734-40.
  - 25 Artikel „Phospholipide“. Römpp Online. Georg Thieme Verlag. <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-16-01940>.
  - 26 Van Dorpd, Beerthuis RK, Nugteren DH, Vonkeman H. (1964). Enzymatic conversion of all-cis-polyunsaturated fatty acids into prostaglandins. *Nature*. 203:839-41.
  - 27 Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. (2002). Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*. 196:1025-37.
  - 28 Kennedy EP, Weiss SB. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*. 222:193-214.

- 
- 29 Gibellini F, Smith TK. (2010). The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 62(6).
  - 30 Makrides M, Neumann MA, Byard RW, Simmer K, Gibson RA. (1994). Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* 60:189-194.
  - 31 Bernhard W, Haagsman HP, Tschernig T, Poets CF, Postle AD, van Eijk ME, von der Hardt H. (1997). Conductive airway surfactant: surface-tension function, biochemical composition, and possible alveolar origin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 17:41-50.
  - 32 Bernhard W, Maas C, Shunova A, Mathes M, Böckmann K, Bleeker C, Vek J, Poets CF, Schleicher E, Franz AR. (2017). Transport of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infant plasma is dominated by phosphatidylcholine. *Eur J Nutr*. 2017 Jun 20. doi:10.1007.
  - 33 Vance DE (2014). "Phospholipid methylation in mammals: from biochemistry to physiological function". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1838:1477-87. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.018.
  - 34 Lands WE, Inoue M, Sugiura Y, Okuyama H. (1982). Selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylcholine by rat liver microsomes. *J Biol Chem*. 257:14968-72.
  - 35 Pynn CJ, Henderson NG, Clark H, Koster G, Bernhard W, Postle AD. (2011). Specificity and rate of human and mouse liver and plasma phosphatidylcholine synthesis analyzed in vivo. *J Lipid Res*. 52:399-407.
  - 36 Scott BL, Bazan NG. (1989). Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc. Natl. Acad. USA* 86:2903-07.
  - 37 Ridgway ND, Vance DE. (1988). Specificity of rat hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase for molecular species of diacyl phosphatidylethanolamine. *J. Biol. Chem*. 263:16856-63.
  - 38 DeLong CJ, Shen YJ, Thomas MJ, Cui Z. (1999). Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:29683–8.
  - 39 Vance DE, Walkey CJ, Cui Z. (1997). Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from liver. *Biochim. Biophys. Acta*. 1348:142-50.
  - 40 DeLong CJ, Shen YJ, Thomas MJ, Cui Z. (1999). "Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway". *The Journal of Biological Chemistry*. 274:29683–8.
  - 41 Zhao Y, Chen YQ, Bonacci TM, Bredt DS, Li S, Bensch WR, Moller DE, Kowala M, Konrad RJ, Cao G. (2008). Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase. *J Biol Chem*. 283:8258-65.

- 
- 42 Kazachkov M, Chen Q, Wang L, Zou J. (2008). Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids*. 43:895-902.
  - 43 Burdge GC, Kelly FJ, Postle AD. (1993). Synthesis of phosphatidylcholine in guinea-pig fetal lung involves acyl remodelling and differential turnover of individual molecular species. *Biochim Biophys Acta*, 1993. 1166:251-7.
  - 44 Polin A, Abman SH, Rowitch D, Benitz WE, Fox WW. (2016). Section XII - The Lung. In: *Fetal and Neonatal Physiology*. Elsevier LTD, Oxford. 5th edition. ISBN-10: 0323352146.
  - 45 Innis SM, Davidson AG, Chen A, Dyer R, Melnyk S, James SJ. (2003). Increased plasma homocysteine and S-adenosylhomocysteine and decreased methionine is associated with altered phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 143:351-6.
  - 46 Stöckler S, Isbrandt D, Hanefeld F, Schmidt B, von Figura K. (1996). Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am J Hum Genet* 58:914–22.
  - 47 Yan J, Jiang X, West AA, Perry CA, Malysheva OV, Devapatla S, Pressman E, Vermeylen F, Stabler SP, Allen RH, Caudill MA. (2012). Maternal choline intake modulates maternal and fetal biomarkers of choline metabolism in humans. *Am J Clin Nutr* 95:1060–71
  - 48 Zeisel SH. (2006). Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr*. 26:229–50.
  - 49 Grothe J, Riethmüller J, Tschürtz SM, Raith M, Pynn CJ, Stoll D, Bernhard W. (2015). Plasma phosphatidylcholine alterations in cystic fibrosis patients: impaired metabolism and correlation with lung function and inflammation. *Cell Physiol Biochem*. 35:1437-53.
  - 50 Abeles RH, Frisell WR, Mackenzie CG. (1960). A dual isotope effect in the enzymatic oxidation of deuteromethyl sarcosine. *J Biol Chem*. 235:853–6.
  - 51 Mackenzie CG, Frisell WR. (1958). The metabolism of dimethylglycine by liver mitochondria. *J Biol Chem*. 232:417–27.
  - 52 Wittwer AJ, Wagner C. (1980). Identification of folate binding protein of mitochondria as dimethylglycine dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci US A*. 77:4484–8.
  - 53 Institute of Medicine, National Academy of Sciences USA. (1998). Dietary reference intakes for folate, thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline, vol 1. National Academy Press, Washington, DC.
  - 54 Oshida K, Shimizu T, Takase M, Tamura Y, Shimizu T, Yamashiro Y. (2003). Effects of dietary sphingomyelin on central nervous system myelination in developing rats. *Pediatr Res* 53:589–93.

- 
- 55 Lauder JM, Schambra UB. (1999). Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ Health Perspect* 107:65–9.
  - 56 Zeisel SH, Blusztajn JK. (1994). Choline and human nutrition. *Annu Rev Nutr* 4:269–96.
  - 57 Bernhard W, Full A, Arand J, Maas C, Poets CF, Franz AR. (2013). Choline supply of preterm infants: assessment of dietary intake and pathophysiological considerations. *Eur J Nutr* 52:1269–78.
  - 58 Fischer LM, da Costa KA, Galanko J, Sha W, Stephenson B, Vick J, Zeisel SH. (2010). Choline intake and genetic polymorphisms influence choline metabolite concentrations in human breast milk and plasma. *Am J Clin Nutr* 92:336–46.
  - 59 Bernhard W, Raith M, Kunze R, Koch V, Heni M, Maas C, Abele H, Poets CF, Franz AR. (2014). Choline concentrations are lower in postnatal plasma of preterm infants than in cord plasma. *Eur J Nutr.* 54:733-41.
  - 60 Zeisel SH. (2006). The fetal origins of memory: the role of dietary choline in optimal brain development. *J Pediatr* 149:S131-6
  - 61 Wu BT, Dyer RA, King DJ, Richardson KJ, Innis SM. (2012). Early second trimester maternal plasma choline and betaine are related to measures of early cognitive development in term infants. *PLoS One* (8).e43448.
  - 62 Molloy AM, Mills JL, Cox C, Daly SF, Conley M, Brody LC, Kirke PN, Scott JM, Ueland PM. (2005). Choline and homocysteine interrelations in umbilical cord and maternal plasma at delivery. *Am J Clin Nutr* 82:836-42.
  - 63 Ozarda Ilcol Y, Uncu G, Ulus IH. (2002). Free and phospholipidbound choline concentrations in serum during pregnancy, after delivery and in newborns. *Arch Physiol Biochem* 110:393–9.
  - 64 Veenema K, Solis C, Li R, Wang W, Maletz CV, Abratte CM, Caudill MA. (2008). Adequate Intake levels of choline are sufficient for preventing elevations in serum markers of liver dysfunction in Mexican American men but are not optimal for minimizing plasma total homocysteine increases after a methionine load. *Am J Clin Nutr.* 88:685-92.
  - 65 Holmes-McNary MQ, Cheng WL, Mar MH, Fussell S, Zeisel SH. (1996). Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas. *Am J Clin Nutr* 64:572–6
  - 66 Maas C, Franz AR, Shunova A, Mathes M, Bleeker C, Poets CF, Schleicher E, Bernhard W. (2017). Choline and polyunsaturated fatty acids in preterm infants' maternal milk. *Eur J Nutr.*56:1733-42.
  - 67 Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. (1998). Dietary reference intakes: thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B-6, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline, vol 1. National Academy Press, Washington, DC, pp 390–422.

- 
- 68 Zeisel SH. (2000). Choline: needed for normal development of memory. *J Am Coll Nutr* 19:528s–31s.
- 69 Caudill MA. (2010). Pre- and postnatal health: evidence of increased choline needs. *J Am Diet Assoc* 110:1198–1206.
- 70 Voigt M, Rochow N, Straube S, Briese V, Olbertz D, Jorch G. (2010). Birth weight percentile charts based on daily measurements for very preterm male and female infants at the age of 154–223 days. *J Perinat Med* 38:289–95.
- 71 Wikland KA, Luo ZC, Niklasson A, Karlberg J (2001) Swedish population-based longitudinal reference values from birth to 18 years of age for height, weight and head circumference. *Acta Paediatr* 91:739–54.
- 72 Stocker JT, Dehner LP, Husain AN. (2001). Means and standard deviations of weights and measurements of lifeborn infants by body weight. In: Stocker JT, Dehner LP (eds) *Stocker and Dehner's pediatric pathology*, 2nd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp 1302–04 (Appendix 28–29).
- 73 Bernhard W, Poets CF, Franz AR. (2018). Choline and choline-related nutrients in regular and preterm infant growth. *Eur J Nutr*. 2018 Oct 8. doi:10.1007/s00394-018-1834-7. [Epub ahead of print]
- 74 Institute of Medicine, National Academy of Sciences USA. (1998). Dietary reference intakes for folate, thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B12, panthothenic acid, biotin, and choline, Vol 1. National Academies Press, Washington, DC.
- 75 Crawford MA (2000) Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Am J Clin Nutr* 71:275S–84S.
- 76 Makrides M, Neumann MA, Byard RW (1994). Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* 60:189–94.
- 77 Carlson SE. (1996). Arachidonic acid status of human infants: influence of gestational age at birth and diets with very long chain n-3 and n-6 fatty acids. *J Nutr* 126:1092S–8.
- 78 Lapillonne A, Carlson SE. (2001). Polyunsaturated fatty acids and infant growth. *Lipids* 36:901–11.
- 79 Lapillonne A, Groh-Wargo S, Gonzalez CH. (2013). Lipid needs of preterm infants: updated recommendations. *J Pediatr* 162:S37–47.
- 80 Lapillonne A. (2014). Enteral and parenteral lipid requirements of preterm infants. *World Rev Nutr Diet* 110:82–98.
- 81 Calder PC, Dangour AD, Diekman C, Eilander A, Koletzko B, Meijer GW, Mozaffarian D, Niinikoski H, Osendarp SJ, Pietinen P, Schuit J, Uauy R.

- 
- (2010). Essential fats for future health. Proceedings of the 9th Unilever Nutrition Symposium, 26–27 May 2010. *Eur J Clin Nutr* 64:S1–13.
- 82 Martinez M. (1992). Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 120:S129–S138.
- 83 Bernhard W, Raith M, Koch V, Maas C, Abele H, Poets CF, Franz AR. (2015). Developmental changes in polyunsaturated fetal plasma phospholipids and feto-maternal plasma phospholipid ratios and their association with bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Nutr*. 55:2265-74.
- 84 Van Odijk J, Kull I, Borres MP, Brandtzaeg P, Edberg U, Hanson LA. (2003). Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966–2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy* 58:833–43.
- 85 Dunstan JA, Prescott SL. (2005). Does fish oil supplementation in pregnancy reduce the risk of allergic disease in infants? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5:215–21.
- 86 Garside P, Mowat AM. (2001). Oral tolerance. *Semin Immunol.* 13:177–85.
- 87 M'Rabet L, Vos AP, Boehm G, Garssen J. (2008). Breast-feeding and its role in early development of the immune system in infants: consequences for health later in life. *J. Nutr.* 138:1782S–90S.
- 88 Field CJ, Thomson CA, Van Aerde JE, Parrott A, Euler A, Lien E, Clandinin MT. (2000). Lower proportion of CD45R0+ cells and deficient interleukin-10 production by formula-fed infants, compared with humanfed, is corrected with supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31:291–99.
- 89 Aaes-Jorgensen E, Leppik EE, Hayes HW, Holman RT. (1958). Essential fatty acid deficiency. II. In adult rats. *J Nutr.* 66:245-59.
- 90 Raith M, Schaal K, Koslowski R, Fehrenbach H, Poets CF, Schleicher E, Bernhard W. (2012). Effects of recombinant human keratinocyte growth factor on surfactant, plasma, and liver phospholipid homeostasis in hyperoxic neonatal rats. *J Appl Physiol* 112:1317-28.
- 91 Bernhard W, Gesche J, Raith M, Poets CF. (2016). Phosphatidylcholine kinetics in neonatal rat lungs and the effects of rhuKGF and betamethasone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 310:L955-63.
- 92 Gesche J, Fehrenbach H, Koslowski R, Ohler FM, Pynn CJ, Griese M, Poets CF, Bernhard W. (2011). rhKGF stimulates lung surfactant production in neonatal rats in vivo. *Pediatr Pulmonol.* 46:882-95.
- 93 DeLong CJ, Shen YJ, Thomas MJ, Cui Z. (1999). Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDPcholine pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 29683-8.

- 
- 94 Bernhard W, Schmiedl A, Koster G, Orgeig S; Acevedo C, Poets CF, Postle AD. (2007). Developmental changes in rat surfactant lipidomics in the context of species variability. *Pediatr Pulmonol* 42:794–804.
- 95 Folch J, Lees M, Stanley GHS. (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-507.
- 96 Bligh EG, Dyer WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-17.
- 97 Johnson D, Roofe PG. (1965). Blood constituents of normal newborn rats and those exposed to low oxygen tension during gestation; weight of newborn and litter size also considered. *Anat Rec.* 153:303-9
- 98 Tans PP, de Jong AFM, Mook WG. (1979). "Natural atmospheric <sup>14</sup>C variation and the Suess effect. *Nature.* 280:826–8.
- 99 Boschker HT, Moerdijk-Poortvliet TC, van Breugel P, Houtekamer M, Middelburg JJ. (2008). A versatile method for stable carbon isotope analysis of carbohydrates by high-performance liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 22:3902-8.
- 100 Moerdijk-Poortvliet TC, Schierbeek H, Houtekamer M, van Engeland T, Derrien D, Stal LJ, Boschker HT. (2015). Comparison of gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry for carbon stable-isotope analysis of carbohydrates. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 29:1205-14.
- 101 Hellerstein MK. (2004). New stable isotope-mass spectrometric techniques for measuring fluxes through intact metabolic pathways in mammalian systems: introduction of moving pictures into functional genomics and biochemical phenotyping. *Metab Eng.* 6:85-100.
- 102 Bornschein RL, Fox DA, Michaelson IA. (1977). Estimation of daily exposure in neonatal rats receiving lead via dam's milk. *Toxicol Appl Pharmacol.*40:577-87.
- 103 Holmes-McNary MQ, Cheng WL, Mar MH, Fussell S, Zeisel SH. (1996). Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas. *Am J Clin Nutr.* 64:572-6
- 104 Rohlf EM, Garner SC, Mar MH, Zeisel SH. (1993). Glycerophosphocholine and phosphocholine are the major choline metabolites in rat milk. *J Nutr.* 123:1762-8
- 105 Vance DE, Vance JE. (2008). Chapter 8 Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition).* pp 213-44. Elsevier B.V. ISBN: 978-0-444-53219-0
- 106 Teng YW, Mehedint MG, Garrow TA, Zeisel SH. Deletion of betaine-homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon

- 
- metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas. *J Biol Chem.* 286:36258-67.
- 107 Bernhard W, Pynn CJ, Jaworski A, Rau GA, Hohlfeld JM, Freihorst J, Poets CF, Stoll D, Postle AD. Mass spectrometric analysis of surfactant metabolism in human volunteers using deuteriated choline. *Am J Respir Crit Care Med.* 170:54-8.
- 108 Bernhard W, Hoffmann S, Dombrowsky H, Rau GA, Kamlage A, Kappler M, Haitsma JJ, Freihorst J, von der Hardt H, Poets CF. (2001). Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant. Composition in relation to respiratory rate and lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:725–31.
- 109 Buechler KF, Rhoades RA. (1980). Fatty acid synthesis in the perfused rat lung. *Biochim Biophys Acta.* 619:186-95.
- 110 Polin A, Abman SH, Rowitch D, Benitz WE. (2016). Section IV - Intrauterine and Postnatal Growth. In: *Fetal and Neonatal Physiology.* Elsevier LTD, Oxford. 5th edition. ISBN-10: 0323352146.
- 111 Trotter A, Maier L, Grill HJ, Wudy SA, Pohlandt F. (1999). Beta-Östradiol and progesterone supplementation in extremely low-birth-weight infants. *Pediatr Res.* 45:489-93.
- 112 Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology.* 28:931-7.
- 113 Rice D, Barone S Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.* 108:511-33.
- 114 Stocker JT, Dehner LP, Husain AN. (2002). Means and standard deviations of weights and measurements of lifeborn infants by body weight (Appendix 28-29). 2nd ed. In: JT Stocker & LP Dehner, ed. *Stocker & Dehner's Pediatric Pathology*, Lippinkott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp 1302-4.
- 115 Pedersen SB, Kristensen K, Hermann PA, Katzenellenbogen JA, Richelsen B. (2004). Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Apr;89(4).1869-78.
- 116 Kuhl H. (2005). Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric.* 8:3-63.
- 117 Parini P, Johansson L, Bröijersén A, Angelin B, Rudling M. (2006). Lipoprotein profiles in plasma and interstitial fluid analyzed with an automated gel-filtration system. *Eur J Clin Invest.* 36:98-104.
- 118 Tortora GJ, Derrickson BH. (2016). Unit IV: Maintenance of the Human Body; 27. Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Homeostasis. In: *Principles of*

---

Anatomy and Physiology. Wiley. 15th edition, 2016. ISBN: 978-1-119-32064-7.

- 119 Burdge GC, Hunt AN, Postle AD. (1994). Mechanisms of hepatic phosphatidylcholine synthesis in adult rat: effects of pregnancy. *Biochem J.* 303:941-7.
- 120 Burdge GC, Postle AD. (1995). Phospholipid molecular species composition of developing fetal guinea pig brain. *Lipids.* 30:719-24.
- 121 Stark, KD, Beblo S, Murthy M, Buda-Abela M, Janisse J, Rockett H, Whitty JE, Martier SS, Sokol RJ, Hannigan JH. (2005). Comparison of bloodstream fatty acid composition from African-American women at gestation, delivery, and postpartum. *J. Lipid Res.* 46:516–25.
- 122 Nahrungsergänzung Mit Cholin- Und Docosahexaensäure Bei Sehr Unreifen Frühgeborenen (Metabolic Effects of Choline and Docosahexaenoic Acid Supplementation in Preterm Infants). (2015). <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02509728?term=choline&cntry=DE&rank=1>
- 123 Bernhard W, Böckmann K, Maas C, Mathes M, Hövelmann J, Shunova A, Hund V, Schleicher E, Poets CF, Franz AR: Choline and Choline-Related Nutrients in Regular and Preterm Infant Growth. *Eur J Nutr.* 2018 (under review)
- 124 Kuipers RS, Luxwolda MF, Ofringa PJ, Boersma ER, Dijck-Brouwer DA, Muskiet FA. (2012). Fetal intrauterine whole body linoleic, arachidonic and docosahexaenoic acid contents and accretion rates. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids.* 86:13–20.
- 125 Clandinin MT. (1999). Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid. *Lipids.* 34:131–7.
- 126 Fidler N, Koletzko B. (2000). The fatty acid composition of human colostrums. *Eur J Nutr.* 39:31–7.
- 127 Koletzko B, Rodriguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sauerwald T. (2001). Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev.* 65:S3–18.
- 128 Kharbanda KK, Mailliard ME, Baldwin CR, Beckenhauer HC, Sorrell MF, Tuma DJ. (2007). Betaine attenuates alcoholic steatosis by restoring phosphatidylcholine generation via the phosphatidylethanolamine methyltransferase pathway. *J Hepatol.* 2007 Feb;46(2).314-21.
- 129 Obeid R. (2013). The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients.* 5:3481-95.
- 130 Resseguie M, Song J, Niculescu MD, da Costa KA, Randall TA, Zeisel SH. (2007). Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene expression is induced by estrogen in human and mouse primary hepatocytes. *FASEB J.* 21:2622-32.

- 
- 131 Crivello NA, Blusztajn JK, Joseph JA, Shukitt-Hale B, Smith DE. (2010). Short-term nutritional folate deficiency in rats has a greater effect on choline and acetylcholine metabolism in the peripheral nervous system than in the brain, and this effect escalates with age. *Nutr Res.* 30:722-30.
- 132 Hollenbeck CB. (2012). An introduction to the nutrition and metabolism of choline. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 12:100-13.
- 133 Zeisel SH, Story DL, Wurtman RJ, Brunengraber H. (1980). Uptake of free choline by isolated perfused rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:4417-9.
- 134 Zhou J, You Y, Ryan AJ, Mallampalli RK . (2004). Upregulation of surfactant synthesis triggers ABCA1-mediated basolateral phospholipid efflux. *J Lipid Res.* 45:1758-67.
- 135 Lockman PR, Allen DD. (2002). The transport of choline. *Drug Dev Ind Pharm.* 28:749-71.
- 136 ChemIDplus-Database of the United States National Library of Medicine (NLM). Substance „Tamoxifen“. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/10540-29-1>
- 137 Ogawa Y, Murata Y, Nishioka A, Inomata T, Yoshida S. (1998). Tamoxifen-induced fatty liver in patients with breast cancer. *Lancet.* 351:725.
- 138 Nishino M, Hayakawa K, Nakamura Y, Morimoto T, Mukaihara S. (2003). Effects of tamoxifen on hepatic fat content and the development of hepatic steatosis in patients with breast cancer: high frequency of involvement and rapid reversal after completion of tamoxifen therapy. *AJR Am J Roentgenol.* 180:129–34.
- 139 Raith M, Shunova A, Poets CF, Bernhard W. (2019): Bedeutung von Estradiol und Progesteron für den perinatalen Cholin- und Phosphatidylcholinmetabolismus. 45. Jahrestagung der GNPI. ES-P05.

---

## 7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bernhard durchgeführt.

Die Konzeption der tierexperimentellen Studie sowie die Einreichung zur Begutachtung und Genehmigung durch das Regierungspräsidiums Tübingen erfolgte seitens Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bernhard. Dieser stellte auch die Anträge auf Verlängerung der Tierversuche.

Gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bernhard habe ich, Marco Raith, die massenspektrometrischen Methoden sowie die Excel-Makro-Dateien zur Auswertung der Rohdaten entwickelt und etabliert.

Ich habe den Zukauf und die Vermehrung der Versuchstiere organisiert, diese medikamentös behandelt sowie den Terminalversuch und die Organgewinnung durchgeführt. Die Verarbeitung der operativ entnommenen Organe und die Probenherstellung erfolgten durch mich. Die massenspektrometrische Messung und qualitative sowie quantitative Auswertung der Proben fand ebenfalls durch mich statt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bernhard.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die Beratung und Korrektur des Manuskriptes erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bernhard.

Ich, Marco Raith, war aufgrund der erfolgreichen Teilnahme am versuchstierkundlichen Privatissimum zur Erlangung tierschutz- und versuchstierkundlicher Fachkenntnisse nach § 9 Abs. 1 des TSchG seitens der Einrichtung für Tierschutz, tierärztlicher Dienst und Labortierkunde am Universitätsklinikum Tübingen befugt, tierexperimentelle Techniken selbständig auszuüben.

Stuttgart, den 20.10.2018