Identifizierung von geeigneten equinen Seren zur Zellkultivierung durch massenspektrometrische Bestimmung von Lipid-Biomarkern

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:	Timo Ditz
Geburtsdatum / Geburtsort:	10.12.1995 in Bad Nauheim
angefertigt am:	Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig Department für Innere Medizin Selbstständige Abteilung für Hämatologie, Internistische Onkologie und Hämostaseologie, Forschungslabor, Universitätsklinikum Leipzig AöR
Betreuer:	Dr. rer. nat. habil. Beate Fuchs Michael Cross, PhD

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrads vom:

25.01.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	3
1 Einführung	4
1.1 Allgemeine Einleitung	4
1.2 Factor dependent cells Paterson mixed potential (FDCPmix-Zelllinie)	5
1.3 Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin	7
1.4 Eikosanoide	10
1.5 Massenspektrometrie	11
1.5.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie	12
1.5.2 ESI-IT Massenspektrometrie	15
1.6 Ziele der Dissertation	15
2 Publikationsmanuskripte	17
2.1 Determination of the Phosphatidylcholine/Lysophosphatidylcholine Ratio in Intact Serum by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Prior Enzymatic Albumin Digestion	17
2.2 Phospholipase A2 products predict the hematopoietic support capacity of horse serum...	26
3 Zusammenfassung der Arbeit	37
4 Literaturverzeichnis	41
5 Nachweis über Anteile der Co-Autoren	45
6 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	47
7 Lebenslauf	48
8 Publikationen	49
9 Danksagung	50

Abkürzungsverzeichnis

anorg.	anorganisch
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
COX	Cyclooxygenase
CYP450	Cytochrom P450
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
EI	Electron impact
ESA	Equine serum albumin
ESI	Electrospray ionization
FBS	Fetal bovine serum
FDCPmix	Factor dependent cells Paterson mixed potential
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GM-Diff.	Granulocyte macrophage differentiation
HS	Horse serum
HSC	Hematopoietic stem cell
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IT	Ion trap
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low density lipoproteins
LOX	Lipoxygenase
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MS	Massenspektrometrie
TAGs	Triacylglycerole
TOF	Time-of-flight
PC	Phosphatidylcholin
PLA2	Phospholipase A2
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
ROS	Reactive oxygen species
9-AA	9-Aminoacridin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Zellkulturmedium und Differenzierungspotenzial der FDCPmix-Zellen	6
Abbildung 2	Strukturformeln von PC 18:0/18:2 und LPC 18:0.....	8
Abbildung 3	Einflussfaktoren auf das PC/LPC-Gleichgewicht	9
Abbildung 4	Schematische Übersicht über Eikosanoide	11
Abbildung 5	Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers	13
Abbildung 6	Massenspektrum von „intaktem“ Pferdeserum	14

1 Einführung

1.1 Allgemeine Einleitung

Die Etablierung und Untersuchung von Zellkulturmodellen nimmt einen großen Anteil der derzeitigen medizinischen und biochemischen Forschung ein [1], da solche Modelle besser zu standardisieren sind und geringere ethische Beschränkungen beinhalten als *in vivo* (Tier-)Studien [2–4]. Meist wird zur Ernährung und Kultivierung der jeweiligen Zellen Medium verwendet, welches neben einer physiologischen Salzlösung als Hauptbestandteil häufig Glucose, verschiedene Aminosäuren, Vitamine und Wachstumsfaktoren enthält. Zusätzlich werden dem Kulturmedium verschiedene animalische Blutseren hinzugefügt, um das Zellwachstum zu fördern und die Bereitstellung benötigter Moleküle zu gewährleisten [2, 5]. So liefert Serum zusätzliche Nährstoffe und essenzielle Wachstumsfaktoren [1]. Des Weiteren werden der Zellkultur durch die Serumzugabe Proteine, Lipide, Spurenelemente und Mineralien hinzugefügt, was eine Stabilisierung von pH-Wert und Osmolarität bewirkt und schädliche Substanzen puffern kann [5]. Neben dem häufig verwendeten fetalen bovinen Serum (FBS) finden sowohl humane als auch equine Seren ihre Anwendung in Zellkulturen. Teilweise werden sogar mehrere Seren gleichzeitig eingesetzt [6].

Abhängig von den zu kultivierenden Zellen und dem Ziel der Forschungsarbeit müssen die einzelnen Bestandteile des Kulturmediums sorgfältig gewählt werden. Besonders die *in vitro* Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen (HSC) erweist sich als schwierig, da diese hohe Anforderungen an die Zellkulturbedingungen stellen [7, 8]. Von allen Stammzellarten werden jedoch HSC derzeit am häufigsten klinisch eingesetzt, beispielsweise in Form von Stammzelltransplantationen bei malignen hämatologischen Erkrankungen, Thalassämien, Sichelzellanämie oder auch bei schweren kombinierten Immundefekten [7, 9].

Der Einsatz von Zellkulturen könnte dazu beitragen bestehende Risiken und Probleme der Transplantation zu minimieren oder zu vermeiden. Durch genetische *in vitro* Modifikation von Patienten-HSC könnten vermehrt autologe Transplantationen erfolgen. Damit würde die Schwierigkeit einen passenden Spender zu finden umgangen und die Gefahr einer Graft-versus-Host-Reaktion würde vermindert werden [7]. Durch die Zellkultur wäre zudem die Amplifikation von Stammzellen möglich und diese ständen somit für mehrmalige Transplantationen zur Verfügung. Ein fundamentales Problem der derzeitigen Kultivierung ist jedoch, dass HSC anfangen zu differenzieren, wenn sie über einen längeren Zeitraum kultiviert werden [7, 8]. Dies schränkt erheblich den möglichen therapeutischen Einsatz ein, da eine umfassende Testung oder auch eine Manipulation der Zellen mittels Gentherapie bisher nur ineffizient möglich ist [7]. Zellkulturmodelle wie die Factor dependent cells Paterson mixed potential (FDCPmix)-Zelllinie sollen daher dabei helfen die benötigten *in vitro* Bedingungen besser zu charakterisieren, um auch eine Kultivierung über längere Zeit zu ermöglichen. Ähnlich wie HSC selbst, stellen auch FDCPmix-Zellen hohe Anforderungen an die Zellkulturbedingungen. So reagieren sie sehr sensitiv auf die mitunter mangelhafte Qualität des Pferdeserums, das dem Medium zugesetzt wird [10]. Für die FDCPmix-Zelllinie ist es daher notwendig die verschiedenen und von unterschiedlichen Herstellern angebotenen Pferdeseren vor dem kommerziellen Erwerb einer größeren Blutserumcharge zu testen, da häufig große Qualitätsunterschiede zwischen den Seren bestehen [11, 12]. Diese Prüfungen bestehen häufig aus aufwendigen Labortests und Zellkulturversuchen, die nicht selten kostenintensiv sind und mehrere Wochen dauern. Die Erarbeitung einer effektiveren Testung der Serumqualität mittels MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser

desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie) bietet daher die Möglichkeit die Kultivierung der FDCPmix-Zellen weiter zu vereinfachen und hat das Potenzial in einer Vielzahl von Forschungsfeldern, die animalische Seren benötigen, eingesetzt zu werden.

1.2 Factor dependent cells Paterson mixed potential (FDCPmix-Zelllinie)

Bei der FDCPmix-Zelllinie handelt es sich um murine, Interleukin-3-abhängige hämatopoetische Vorläuferzellen [13], die vor allem eingesetzt werden, um die sogenannte hämatopoetische Stammzell-Nische zu erforschen [8–10]. Bei der Hypothese der HSC-Nische handelt es sich um die Überlegung, dass HSC ähnlich wie Neuronen [14] und Keimzellen [15, 16] nur in einer eng definierten Umgebung überleben bzw. ihre spezifischen Eigenschaften entfalten oder aufrechterhalten können [9]. So scheint die Entscheidung, ob eine Stammzelle sich selbsterneuert oder differenziert von bestimmten metabolischen Gegebenheiten, Wachstumsfaktoren und Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen abhängig zu sein [9, 17]. Die genaue Charakterisierung der HSC-Nische könnte dabei helfen die *in vitro* Kultivierung der HSC zu optimieren. Mittels optimierter *in vitro* HSC-Kulturen könnte die therapeutische Anwendung bei Stammzelltransplantationen sicherer gemacht [9] und der Einsatz von Gen-Therapien vereinfacht werden [7].

Aufgrund ihres multipotenten Charakters und ihrer Selbsterneuerungseigenschaften stellt die FDCPmix-Zelllinie ein potentes Zellkulturmodell dar, welches, im Gegensatz zu vielen anderen, nicht aus Tumorzellen gewonnen wurde [10]. Somit besitzen sie nicht die Nachteile von beispielsweise leukämischen Zelllinien, die veränderte Anforderungen an Wachstumsfaktoren stellen und ihren multipotenten Charakter weitgehend verloren haben [18]. Die FDCPmix-Zellen benötigen sowohl definierte Sauerstoff- und Interleukin-3-Verhältnisse [19] als auch spezifische animalische Seren. Hierbei ist zu beachten, dass der Einsatz von FBS die Zellen zu vermehrter Differenzierung anregt, wohingegen Pferdeserum (HS) den Erhalt der Selbsterneuerungseigenschaften begünstigt und die Differenzierung auf ein Minimum beschränkt [10]. Da die Zellen vorzugsweise in ihrer multipotenten Form untersucht werden, liegt das Hauptaugenmerk auf der Auswahl des passenden Pferdeserums. Die derzeitige Goldstandardmethode zu dessen Identifizierung sind Zellkulturexperimente, die meist mindestens vier Wochen Zeit beanspruchen und sehr kostenintensiv sind. Während dieses Zeitraums werden die Zellen in den jeweiligen Medien mit verschiedenen Pferdeseren kultiviert. Um zu bewerten, welches Pferdeserum am besten für die weitere Kultivierung geeignet ist, werden verschiedene Kriterien berücksichtigt. So werden Wachstum, Differenzierungseigenschaften und die Fähigkeit sogenannte Colony-forming-units (CFUs) auszubilden bewertet.

Die allgemeine Zellkultivierung dient sowohl der Wachstumsevaluation als auch der Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Pferdeserum. Wie in Abbildung 1 dargestellt, werden die Zellen in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit 20 % Pferdeserum kultiviert. Interleukin-3 und Glutamin werden ergänzt. Eine Zellkonzentration von $6 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter gilt als optimale Wachstumsvoraussetzung für die FDCPmix Zellen, weshalb die Zellen im Zweitages-Rhythmus gezählt und mit frischem Wachstumsmedium auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt werden [13].

Abbildung 1
A: Bestandteile des verwendeten Zellkulturmediums
B: Differenzierungspotenzial der FDCPmix-Zellen

Bei den CFUs handelt es sich um die Fähigkeit der FDCPmix-Zellen in semifestem CFU-Medium, welches ebenfalls Pferdeserum enthält, durch Zellteilung Zellkolonien zu bilden. Das CFU-Medium besteht aus dem für die allgemeine Kultivierung genutzten Medium und BactoAgar. Durch die Zugabe von erhitztem BactoAgar entsteht nach Abkühlung eine semifeste Konsistenz. In diesem festeren Medium können einzelne Zellen durch Zellteilung über einen Zeitraum von circa 14 Tagen Zellkolonien formen. Eine hohe Anzahl an geformten Zellkolonien weist hierbei auf eine gute Qualität des Pferdeserums hin. Sind die Zellen hingegen nicht in der Lage CFUs zu bilden, so gilt dies als Ausschlusskriterium für das jeweilige Pferdeserum. Zu beachten ist, dass eine zu geringe Osmolarität die CFU-Fähigkeiten ebenso mindern bzw. verhindern kann. Daher werden alle Kulturmedien jeweils auf 0,32 Osm/kg adjustiert.

Auch die multipotenten Eigenschaften sollten durch die Kultivierung mit dem passenden Pferdeserum nicht verloren oder verändert werden. Dies ist eines der derzeit größten Probleme der Kultivierung von HSC [7], für welche die FDCPmix-Zellen als Modell dienen [10]. FDCPmix-Zellen können zum einen erythroid differenzieren und zum anderen eine sogenannte GM-Differenzierung vollziehen (vgl. Abbildung 1B). Aus ihnen können folglich, abhängig von den eingesetzten Differenzierungsfaktoren, sowohl Erythrozyten (erythroide Differenzierung) als auch Granulozyten und Makrophagen (GM-Differenzierung) entstehen [18].

Da der Einsatz von Pferdeserum die Selbsterneuerungseigenschaften der FDCPmix-Zellen begünstigt, werden die Differenzierungsexperimente mit FBS-basiertem Medium durchgeführt. Diesem Medium werden je nach zu begutachtender Differenzierung die entsprechenden Differenzierungsfaktoren

hinzugefügt [13]. Für die Evaluation der Differenzierungseigenschaften werden nach mehreren Wochen normaler Kultivierung Experimente für beide Differenzierungsrichtungen angesetzt. Am Tag null sowie drei und sechs Tage nach begonnener Differenzierung werden die gefärbten Zellen unter einem Lichtmikroskop begutachtet und der Differenzierungsgrad ausgewertet.

Diese hier vorgestellte Qualitätsevaluation benötigt insgesamt mindestens vier, häufig sogar bis zu acht Wochen Zeit und ist daher sehr kosten- und arbeitsintensiv. Somit wäre es eine erhebliche Erleichterung, wenn die mühsame Selektion eines geeigneten Pferdeserums mittels Zellkultur durch einen anderweitigen Qualitätsindikator ersetzt werden könnte.

1.3 Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin

Ein potenzieller Biomarker für diese Qualitätsevaluation könnte das Glycerophospholipid Lysophosphatidylcholin (LPC) sein. Seine stressbedingte Bildung, aus vorrangig Phosphatidylcholin (PC) [20, 21], im Rahmen von Entzündungen, oxidativem Stress oder ungünstigen Lagerungsbedingungen könnte als Indikator für qualitätsmindernde Prozesse im Serum dienen. Des Weiteren könnte das vermehrte LPC selbst einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum von Zellen [22] haben und damit die Qualität von Seren widerspiegeln.

Glycerophospholipide sind nicht nur ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen [23], sondern wirken auch als Signalmoleküle innerhalb von und zwischen Zellen [24]. Sie bilden ebenfalls den Ausgangspunkt für zahlreichen Synthesen von bioaktiven Molekülen [23]. Des Weiteren kommen sie spezieübergreifend [25] vor und sind mittels Massenspektrometrie schnell und sicher zu detektieren [24], was ihre Eignung als potenzielle Biomarker weiter unterstreicht.

Das Grundgerüst beider Lipidspezies bildet Glycerophosphocholin, an welchem bei PC zwei Fettsäurereste und bei LPC nur einer angehängt sind. Diese Fettsäurereste definieren das jeweilige Glycerophospholipid und fließen mit der Anzahl der Kohlenstoffatome und der Anzahl ihrer Doppelbindungen in die Nomenklatur ein [26]. Somit besitzt PC 18:0/18:2 eine Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen und null Doppelbindungen an der *sn*-1 Position und eine weitere mit 18 Kohlenstoffatomen und zwei Doppelbindungen an der *sn*-2 Position (vgl. Abbildung 2). Die Fettsäure der LPC-Moleküle ist meist an der *sn*-1 Position und die *sn*-2 Position ist vakant [27].

Phosphatidylcholin 18:0/18:2

Lysophosphatidylcholin 18:0

Abbildung 2
Strukturformeln von PC 18:0/18:2 und LPC 18:0

Die *de-novo*-Synthese von PC in der Zelle erfolgt über den sogenannten Kennedy-Pathway mit Cholin als Ausgangspunkt [28]. PC kann durch enzymatische Aktivität, aber auch durch die Wirkung verschiedener Einflüsse, wie beispielsweise erhöhte Temperaturen oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS), in LPC konvertiert werden [20, 21]. Die enzymatische Konversion wird durch die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT; EC 2.3.1.43) und die Phospholipase A₂ (PLA₂; EC 3.1.1.4) katalysiert. Wie in Abbildung 3 dargestellt, ist auch eine Rückkonversion von LPC zu PC durch die Lysolecithin-Acyltransferase (EC 2.3.1.23) enzymatisch möglich. LPC kann ebenfalls weiter katabol durch das Enzym Autotaxin (EC 3.1.4.4) prozessiert werden. Hierbei entsteht aus LPC Lysophosphatidsäure [27]. Somit kann das PC/LPC-Gleichgewicht innerhalb eines Organismus reguliert und an veränderte Anforderungen angepasst werden.

Ist dieses Gleichgewicht allerdings dauerhaft gestört bzw. verändert, so kann dies auf eine pathologische Situation hinweisen. Bei einer Vielzahl von Erkrankungen und pathologischen Zuständen wurde ein verändertes PC/LPC-Verhältnis nachgewiesen, darunter Multiple Sklerose [29], verschiedene Krebsarten [30] sowie rheumatoide Arthritis [20]. Auch Apoptose führt zu einer veränderten Glycerophospholipid-Zusammensetzung in FDCPmix-Zellen und der Freisetzung von LPC in das Zellkulturmedium [31]. Eine reziproke Korrelation zwischen LPC-Spezies und der Qualität von Spermien konnte ebenfalls nachgewiesen werden [32]. Zudem wurde gezeigt, dass bestimmte LPC-Spezies auf verschiedene Zellen diverse Wirkungen entfalten. So können natürliche Killerzellen über einen T-Zell-Rezeptor Lysophospholipide als Antigene, präsentiert durch CD1d, erkennen. Diese

Erkennung spielt vor allem bei der Entzündungsantwort eine Rolle [6]. Durch Ca^{2+} -vermittelte Signalwege können LPCs neutrophile Granulozyten stimulieren, die Aktivität der NADPH-Oxidase fördern und somit den „respiratory burst“ als Teil der Immunabwehr begünstigen [33]. Über TRPC1/TRPC3-Kanal vermittelte Ca^{2+} -Signale können LPC-Spezies Apoptose in glatten Muskelzellen auslösen [34]. Auch wirken LPC 16:0, LPC 18:0 und LPC 18:1 im μM -Konzentrationsbereich zytotoxisch auf die Jurkat-T-Zelllinie [35]. Interessanterweise ist Albumin in der Lage diese Zytotoxizität zu vermindern und somit protektiv auf Zellen zu wirken [35, 36]. Hierbei spielt es keine Rolle, ob Albumin direkt oder indirekt durch Serumzugabe hinzugefügt wird. Albumin ist in der Lage Lysophosphatidylethanolamine (LPE) zu binden und es ist möglich, dass die Bindung von LPC gleichermaßen funktioniert [37]. Allerdings kann die protektive Wirkung von Albumin antagonisiert werden, beispielsweise durch Erhitzen. Dies führt zu einer Polymerisation des Albumins [36], welches dann nicht mehr in der Lage ist LPC zu binden. Ein weiterer LPC-Scavenger ist das akute-Phase-Protein α_1 -Glykoprotein [38]. Besonders bei Entzündungen kommen seine zytoprotektiven Eigenschaften zum Tragen. Ein weiterer Transportmechanismus von LPC im Serum ist die Einbindung in Lipoproteine. Vor allem in oxidierten „low density lipoproteins“ (LDL) bilden LPCs die größte Phospholipidklasse [27]. Oxidierte LDL sind für die Entstehung von atherosklerotischen Plaques essenziell [39, 40] und somit von hoher klinischer Relevanz. LPCs weisen somit im Menschen, wie auch in anderen Säugetieren [25], eine enorme Funktionsvariabilität auf, wobei besonders die inflammatorischen und immunologischen Aspekte hervortreten.

Abbildung 3

A: Schematische Darstellung des Phosphatidylcholin-Lysophosphatidylcholin-Zyklus
B: Beeinflussung des PC/LPC-Gleichgewichts durch verschiedene Arten von Stress

Die am häufigsten im Pferdeserum vorkommenden Glycerophospholipide sind PC 16:0/18:2, PC 18:0/18:2 sowie LPC 16:0 und LPC 18:0 [41]. Mit einer Konzentration von circa 106 mg/dl liegen die Phosphatidylcholinpezies deutlich über den 5,4 mg/dl an Lysophosphatidylcholinpezies [41]. Wie in Abbildung 3 dargestellt, kann das PC/LPC-Gleichgewicht zu Gunsten von LPC durch äußere (Temperatureinflüsse) und innere (ROS, vermehrte enzymatische Aktivität der PLA₂) Einflüsse verschoben werden.

Anstelle der direkten Quantifizierung von ROS und der nicht durchführbaren Bewertung des Temperatureinflusses im Zuge suboptimaler Lagerung soll daher das PC/LPC-Verhältnis ermittelt und LPC quantifiziert werden. Die enge physiologische Regulation innerhalb des Organismus, die hohe Sensibilität gegenüber ungünstigen Einflüssen und die einfache Detektierbarkeit mittels Massenspektrometrie prädestinieren die beiden Glycerophospholipide als potenzielle Qualitätsmarker. Somit wird im Zuge dieser Dissertation die Eignung des PC/LPC-Verhältnisses bzw. der LPC-Konzentration als übergeordneter Marker für die Qualität von Pferdeseren evaluiert. Auch ein direkter Einfluss von LPC auf die FDCPmix-Zellen wird untersucht.

1.4 Eikosanoide

Neben den Glycerophospholipiden stellen auch Eikosanoide mögliche Qualitätsmarker für Pferdeseren dar. Diese hochaktiven Biomoleküle werden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) synthetisiert und besitzen vielfältige Funktionen [42]. Unter anderem werden Entzündungsreaktionen sowohl pro- als auch antiinflammatorisch von Eikosanoiden beeinflusst. An der Synthese der verschiedenen Eikosanoide sind drei Schlüsselenzyme beteiligt, die gleichzeitig eine Einteilung der Eikosanoide ermöglichen. So produzieren Cyclooxygenasen (COX) zum Beispiel Prostaglandine und Thromboxane, Lipoxygenasen (LOX) bilden Leukotriene und Lipoxine und auch Cytochrom P450 (CYP450)-abhängige Enzyme sind in der Lage Eikosanoide zu bilden (vgl. Abbildung 4A) [42]. Die aus dem Alltag bekannte Acetylsalicylsäure hemmt beispielsweise die Cyclooxygenase COX-1 und wirkt somit schmerzstillend, entzündungshemmend, fiebersenkend und gerinnungshemmend [43]. Wegen der intensiven Beteiligung von Eikosanoiden bei der Entzündungsreaktion liegt die Hypothese nahe, dass über die Eikosanoidzusammensetzung des Pferdeserums Rückschlüsse auf dessen Qualität gezogen werden können. Zum Beispiel wird bei der Konversion von PC in LPC Linolsäure (18:2) im Pferdeserum freigesetzt, welche in eine Vielzahl von Eikosanoiden metabolisiert werden kann. Abbildung 4B zeigt exemplarisch die mannigfaltigen Produkte, die durch enzymatische und nicht-enzymatische Einflüsse aus Linolsäure entstehen können.

Der Nachteil der Eikosanoide verglichen mit Lysophosphatidylcholinen ist die sehr geringe Konzentration der einzelnen Eikosanoide. Dies macht es nötig hochsensitive Messverfahren mit aufwändigerer präanalytischer Vorbereitung zu verwenden, um aussagekräftige Daten zu erhalten [44]. Auf Grund der relativen Instabilität der Eikosanoide verglichen mit Lysophosphatidylcholinen und der kostenintensiveren Detektion liegt das Hauptaugenmerk der Dissertation auf LPC.

Abbildung 4

A: Schematische Eikosanoidsynthese aus PUFA; modifiziert nach [42]

B: Ausgewählte Eikosanoidprodukte, die aus Linolsäure entstehen können; modifiziert nach [42]

EpOME: Epoxy-octadecensäure(-methylester); DiHOME: Dihydroxy-octadecensäure(-methylester);

HODE: Hydroxy-octadecadiensäure; OxoODE: Oxo-octadecadiensäure;

1.5 Massenspektrometrie

Die unter 1.2 beschriebenen aufwendigen Zellkulturversuche zur Qualitätsevaluation von Pferdeseren sollen gegen die massenspektrometrische Bestimmung der beiden Glycerophospholipide Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin im Pferdeserum getestet werden, um eine mögliche Arbeits- und Kostenreduktion zu erreichen.

Massenspektrometrie wird von der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) sinngemäß als Untersuchung von Molekülen durch die Erzeugung gasförmiger Ionen bezeichnet, die fragmentiert oder unfragmentiert über ihr Masse/Ladungsverhältnis und ihre relative Häufigkeit charakterisiert werden [45]. Ein Massenspektrometer besteht aus drei essenziellen Hauptkomponenten: einer Ionenquelle, einem Analysator zur Ionenauftrennung nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis und einem nachgeschalteten Detektor zum Ionennachweis [46].

Bei der ursprünglichen Massenspektrometrie mittels „Elektronen-Stoßanregung“ (EI: electron impact) wird eine zuvor vaporisierte Probe mit Elektronen beschossen. Dies führt zur Entstehung von Radikalkationen, welche durch Elektronenverschiebungen in Fragmente zerfallen können. Im Gegensatz dazu werden die neueren massenspektrometrischen Verfahren Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) MS und Electrospray ionization (ESI) MS als

„soft ionization“-Methoden bezeichnet [24]. Bei den „soft ionization“-Methoden bleiben zumindest Teile des Analyten intakt, welche ohne Fragmentierung in die korrespondierenden Ionen konvertiert und analysiert werden können [47]. Der Unterschied zwischen MALDI und ESI MS liegt in der Art ihrer Ionenquelle. Zu ihren vielfältigen Einsatzbereichen zählt auch das Lipidomics-Forschungsfeld und somit die Untersuchung von bioaktiven Lipiden wie beispielsweise PC und LPC [24, 48, 49].

Neben der einfachen Massenspektrometrie gibt es auch die Möglichkeit der Tandem-Massenspektrometrie (auch MS/MS genannt). Hierbei wird ein Precursor-Molekül, welches weiter hinsichtlich seiner molekularen Eigenschaften analysiert werden soll, fragmentiert. Anhand der charakteristischen Fragmentierungsmoleküle können Rückschlüsse auf das Precursor-Molekül gezogen werden. So ermöglicht die Tandem-Massenspektrometrie zum Beispiel die Identifikation der Acylreste am Glycerol-Rückgrat von PC, LPC und ähnlichen Molekülspezies [50]. Auch eine erneute Fragmentierung der erzeugten Fragmente (MS^3) ist möglich, um noch detailliertere Erkenntnisse bezüglich des Analyten zu gewinnen. Sowohl mit der einfachen als auch mit der Tandem-Massenspektrometrie können qualitative und quantitative Rückschlüsse auf den Analyten gezogen werden [48]. Zudem gibt es eine Vielzahl von etablierten Verfahren [42, 51], welche chromatographische Methoden mit Massenspektrometrie verbinden und so die Auftrennung von Konstitutions- und Stereoisomeren ermöglichen.

Die Vorteile der Massenspektrometrie gegenüber anderen Mess- und Detektionsverfahren sind die relativ geringe Messdauer, die hohe Sensitivität und das Potenzial komplexe Proben direkt zu messen [24]. Besonders die Fähigkeit komplex zusammengesetzte Proben zu analysieren, ermöglicht die breite Verwendung von Massenspektrometern sowohl in verschiedensten Forschungsbereichen als auch im klinischen Alltag. Durch die Verwendung von MALDI-TOF MS, welche besonders tolerabel gegenüber Probenverunreinigungen ist [52], war eine direkte Detektion von PC und LPC in Pferdeserum möglich.

1.5.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Diese massenspektrometrische Methode fußt auf einer matrix-unterstützten Ionisation des festen Analyten und bietet eine Vielzahl von Applikationsmöglichkeiten, da die Matrix an den jeweiligen Analyten und gegebenenfalls an dessen Lösungsmittel angepasst werden kann. Meist werden aromatische Moleküle als Matrix eingesetzt, da die Hauptaufgabe der Matrix die Absorption der emittierten Laserenergie ist. Dementsprechend wird die Matrix-Wahl auch von der Art des Lasers und der emittierten Wellenlänge beeinflusst [24]. Durch die Absorption der Laserenergie wird die Matrix vaporisiert und dabei werden intakte Analytmoleküle mit in die Gasphase transportiert. Bei diesem Vorgang werden Ionen zwischen der Matrix und dem Analyten ausgetauscht. Häufig entstehen hierbei positiv geladene Protonen- oder Natrium-Analyt-Addukte [24]. Je nach Elektrolytzusammensetzung der Probenflüssigkeit können jedoch unterschiedliche Ionen-Analyt-Addukte erzeugt werden [53]. Somit befinden sich ungeladene wie geladene Analyt- und Matrixmoleküle in der Gasphase.

Wie Abbildung 5 zeigt, werden die geladenen Moleküle durch die Verwendung eines elektrischen Feldes beschleunigt und durchqueren anschließend einen feldfreien Raum, in dem sie nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt werden [24]. Nicht selten kommt ein sogenannter Reflektor zum Einsatz, der den Weg der Ionen im feldfreien Raum verlängert und somit zu einer besseren Auftrennung beiträgt. Die Auftrennung der geladenen Addukte erfolgt mittels „time-of-flight“ (TOF): Die verschiedenen Moleküle der Probe besitzen unterschiedliche Massen und können

unterschiedlich viele Ladungen tragen. Da die Flugzeit proportional zum Verhältnis aus Masse zu Ladung ist, benötigen die Moleküle unterschiedlich viel Zeit, um den feldfreien Raum zu passieren. Am Ende der Flugstrecke befindet sich ein Detektor, an dem die geladenen Moleküle beim Auftreffen ein elektrisches Signal erzeugen.

Abbildung 5

Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers im Positiv-Detektionsmodus; modifiziert nach [24]

A: Vaporisation des Probe-Matrix-Gemisches durch die Absorption von Laserenergie

B: Auftrennung und Detektion der entstandenen Ionen

Vorteile der MALDI-TOF Massenspektrometrie sind vor allem die schnelle Datenerhebung, die Robustheit gegenüber Verunreinigungen, das niedrige Mindestvolumen des Analyten und die analytspezifische Optimierung der Versuchsparameter [24]. Besonders die Robustheit dieser massenspektrometrischen Methode [48, 52] war ein Kernkriterium für die Auswahl der Analyseverfahren, da die Analyse möglichst im nativen Serum stattfinden soll und tiefgreifende präanalytische Eingriffe wie beispielsweise Extraktionen und Fällungen möglichst vermieden werden sollten.

Auch das PC/LPC-Verhältnis kann unter Zuhilfenahme der sogenannten „Sandwich-Methode“ mittels MALDI-TOF MS aus „intaktem“ Pferdeserum bestimmt werden [54]. Hierbei wird zuerst die verdünnte Probe auf die MALDI-Probenplatte aufgetragen und trocknen gelassen, anschließend wird die Matrix in hoher Konzentration auf die getrocknete Probe appliziert. Bei Vergleichsmessungen mit MALDI-TOF MS nach Extraktion und mit „Nuclear magnetic resonance“ (NMR) wurde eine adäquate Übereinstimmung der PC/LPC-Verhältnisse vorbeschrieben. Die Matrices 9-Aminoacridin (9-AA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure zeigten dabei vergleichbare Ergebnisse [54].

Aufgrund einiger Vorteile der 9-AA-Matrix (30mg/ml in 2-Propanol/Acetonitril (60/40; v/v) wurde diese in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich verwendet. Bei subjektiv einfacherer Handhabung ermöglicht sie die zufriedenstellende Detektion von Glycerophospholipiden. Dadurch, dass bei der Verwendung von 9-AA als Matrix keine Ionisation von Triacylglycerolen (TAGs) stattfindet [55], ist die Auswertung der aufgenommenen Spektren bedeutend einfacher und die Ionen-Unterdrückung (ion suppression) von Glycerophospholipiden durch TAGs wird vermieden [53]. Bei der Ionen-Unterdrückung handelt es sich um ein Phänomen, bei dem die Peakintensität nicht mit der korrekten Konzentration korreliert, sondern von der Neigung Ionen zu bilden abhängt [53].

Abbildung 6
Massenspektrum von „intaktem“ Pferdeserum im Positiv-Detektionsmodus mittels MALDI-TOF MS aufgenommen

Wie Abbildung 6 zeigt, können die am häufigsten im Pferdeserum vorkommenden (Lyso-)Phosphatidylcholine [41] gut mittels MALDI-TOF MS detektiert werden. Das mit der in [54] beschriebenen „Sandwich“-Methode aufgenommene Spektrum weist Protonenaddukte auf. Zudem sind die dazu korrespondierenden Natriumaddukte ebenfalls detektierbar. Diese befinden sich immer in dem erwarteten Massenabstand von 22 Dalton zu den Protonenaddukten, da die detektierten Moleküle alle gleich geladen sind.

Quantifizierungen sind mittels MALDI-TOF MS nur mit Einschränkungen möglich. Da über die Peakintensität keine direkten quantitativen Rückschlüsse gezogen werden können, ist die Verwendung eines internen Standards erforderlich. Erst durch die Zugabe eines Moleküls in einer vorher definierten Konzentration, welches nicht inhärent im Analysegemisch vorkommt, und anschließendem Vergleich der Peakintensitäten können quantitative Aussagen getroffen werden [28, 55, 56]. Es ist notwendig ein Molekül der gleichen Stoffklasse und einer ähnlichen Masse zu wählen, da beide Aspekte Einfluss auf die Detektion nehmen [57].

1.5.2 ESI-IT Massenspektrometrie

Im Gegensatz zu MALDI-TOF MS werden die Ionen bei der Electrospray ionization Massenspektrometrie direkt aus der flüssigen in die gasförmige Phase überführt. Dies hat zum Vorteil, dass die flüssige Probe als homogen angenommen werden kann, wohingegen die Kristallisation auf der MALDI-Probenplatte eine Beeinträchtigung der MALDI-TOF Massenspektrometrie darstellt, da dies häufig eine Heterogenisierung der Probe bedeutet [48]. Wie in [58] beschrieben, wird bei der ESI-Massenspektrometrie die sich in einem geeigneten Lösungsmittel befindliche Probe über eine Spritze in eine Kapillare eingeschleust. Durch die Anlage eines starken elektrischen Felds ($E \approx 10^6$ V/m) an der Spitze der ES-Kapillare bilden sich geladene Tropfen. Durch die Evaporation des Lösungsmittels werden die Tropfen verkleinert, so dass sich das Ladung/Volumen-Verhältnis zugunsten der Ladung verschiebt. Dies ermöglicht es den Ionen in die Gasphase überzutreten (Coulomb-Explosion) [47] und anschließend analysiert zu werden. Eine Möglichkeit ist die Analyse mittels „ion trap“ (IT). Hierbei werden Ionen durch elektrische und magnetische Felder festgehalten, über unterschiedliche Anregungsfrequenzen analysiert und nach ihrem m/z-Verhältnis als Spektrum aufgetragen [59].

Die Quantifizierung von Analyten mittels ESI-MS ist meist genauer und daher auch weiter verbreitet als die Quantifizierung über MALDI-MS [58]. Dies liegt vor allem daran, dass sich bei ESI-MS der Analyt in einer homogenen Probe befindet und die Messergebnisse deutlich reproduzierbarer sind [58]. Wie auch bei anderen quantitativen massenspektrometrischen Verfahren wird ein interner Standard benötigt. Jedoch sind ESI-Massenspektrometer häufig anfälliger gegenüber Proben-Verunreinigungen, was für die Messung des „intakten“ Serums hinderlich sein kann [52]. ESI-IT-Massenspektrometrie wurde daher in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich verwendet, um die MALDI-TOF MS Messergebnisse zu überprüfen und zu unterstützen.

1.6 Ziele der Dissertation

Zellkulturen bilden einen Kernbestandteil der aktuellen biomedizinischen Forschung. Die Anwendungsbereiche reichen von Grundlagenforschung bis hin zur kommerziellen Synthese verschiedenster Moleküle [1], wie beispielsweise Vakzine [60]. Des Weiteren ermöglichen Zellkulturen eine Reduktion von Tierversuchen, was sowohl ethische als auch wissenschaftliche Vorteile mit sich bringt. So sind Zellkultur-Ergebnisse im Vergleich zu Tierversuchen meist aufgrund der geringen Komplexität besser reproduzierbar und zugleich besser beeinflussbar, um distinkte Forschungsaspekte zu untersuchen [2].

Derzeit benötigen die meisten Zellkulturen animalisches Serum als Ergänzung zum artifiziell hergestellten Grundmedium, damit eine ausreichende Kultivierung gewährleistet werden kann. Obwohl serum-freie Zellkulturen existieren, bilden diese nur einen Bruchteil der aktuellen Forschung, da meist zelltypspezifische Kulturmedien aufwendig erforscht und hergestellt werden müssen [3]. Animalisches Serum, als azellulärer Bestandteil geronnenen Blutes, bringt jedoch aufgrund seiner natürlichen Schwankungen in der Zusammensetzung [11] eine gewisse Unkalkulierbarkeit und damit Unsicherheit in die Zellkultur. Somit ist es notwendig mehrere Serumchargen von verschiedenen Herstellern zu testen, um ein adäquates Serum für die weitere Zellkultur zu identifizieren. Je nach verwendeter Zelllinie bestehen unterschiedlich hohe Anforderungen an die Zellkultur.

FDCPmix-Zellen benötigen, ähnlich wie hämatopoetische Stammzellen, für die sie als Modell dienen, eng definierte Kulturbedingungen. Können die erforderlichen Bedingungen nicht bereitgestellt werden, verlieren sie ihr Wachstums- und Differenzierungspotenzial [8, 10]. Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben benötigen die FDCPmix Zellen Pferdeserum als Zusatz zum Kulturmedium und die derzeitige Testung der Pferdeseren findet mittels Probekultivierung der verschiedenen Pferdeserumchargen statt. Dies ist nicht nur kostenintensiv, sondern die Testung muss auch über mindestens vier Wochen erfolgen. Eine effektivere Testung würde somit eine erhebliche Vereinfachung in der derzeitigen Zellkulturforschung bedeuten und wäre in einer Vielzahl von Forschungsfeldern einsetzbar.

Das Potenzial der massenspektrometrischen Detektion der Glycerophospholipide PC und LPC als alternative Qualitätsbestimmung soll daher in dieser Arbeit evaluiert werden. Wegen der stressbedingten Umwandlung von PC in LPC, insbesondere durch Temperatureinflüsse und vermehrte ROS, besteht Grund zur Annahme, dass LPC als Indikator für eine generelle Stressbelastung dienen kann. Des Weiteren gibt es zahlreiche Dokumentationen in der Literatur [22, 33, 35], die einen direkten Einfluss von verschiedenen LPC-Spezies auf unterschiedliche Zellarten beschreiben. Diese Einflüsse reichen von direkter Zytotoxizität [22, 35] bis hin zur Modulation der Immunabwehr [33]. Da beide Phospholipide speziesübergreifend bei Säugetieren vorkommen [25], besteht das Potenzial die gewonnenen Erkenntnisse auf andere Zellkulturen zu übertragen. Somit ist neben der grundsätzlichen Frage, ob LPC als Qualitätsmerkmal für Pferdeseren einsetzbar ist, auch zu klären, ob LPC direkten Einfluss auf die FDCPmix-Zellen ausübt oder ob es als rein übergeordneter Marker für ungünstige Einflüsse verstanden werden kann. Bei der massenspektrometrischen Messung muss berücksichtigt werden, dass Lysophospholipide auch proteingebunden im Serum vorkommen [32], was die Detektierbarkeit beeinträchtigen könnte.

Zusammenfassend ist es also notwendig eine Methode zu etablieren, die ohne weitläufige Präanalytik eine sichere Bestimmung der beiden Markerlipide im „intakten“ Serum ermöglicht, um valide Aussagen über die Eignung des Serums für die Zellkultur treffen zu können.

2 Publikationsmanuskripte

2.1 Determination of the Phosphatidylcholine/Lysophosphatidylcholine Ratio in Intact Serum by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Prior Enzymatic Albumin Digestion

Ditz T, Fuchs B.

Lipids. 2018; doi:10.1002/lipd.12106.

Determination of the Phosphatidylcholine/Lysophosphatidylcholine Ratio in Intact Serum by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Prior Enzymatic Albumin Digestion

Timo Ditz¹ · Beate Fuchs²

Received: 10 February 2018 / Revised: 30 September 2018 / Accepted: 22 October 2018
© 2018 AOCS

Abstract Lysophosphatidylcholine (lysoPtdCho) is a well-known biomarker in body fluids for inflammation and oxidative stress and provides a possible clinical screening marker for certain diseases where inflammation is involved. It was shown in our previous article that the measurement of intact serum using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) provides the phosphatidylcholine (PtdCho)/lysoPtdCho ratios faster than the measurements after organic extraction, while the standard deviations of those “intact” measurements are even smaller. Surprisingly, the PtdCho/lysoPtdCho ratio is about two times higher in the intact serum MALDI-TOF MS measurement than in the MALDI-TOF MS analysis of the organic extracts. Albumin binding of lysoPtdCho seems to be a very likely reason for increased PtdCho/lysoPtdCho ratios in the intact serum measurements. In this article, this hypothesis is tested on horse serum as a biological sample. Albumin (equine and bovine) addition to serum shows an increase in the PtdCho/lysoPtdCho ratio detected by MALDI-TOF MS. Further experiments with a comparable lipid model suspension verify that pepsin and trypsin are able to liberate the bound lipids. Under different conditions, the effects of both enzymes on

the lipid model suspension are compared. Finally, an improved MALDI-TOF MS measurement of the PtdCho/lysoPtdCho ratio in intact serum after a prior pepsin digestion step was established. As is known that lysoPtdCho is cytotoxic and albumin is capable of decreasing this cytotoxicity by binding lysoPtdCho, this study proposes to consider both PtdCho/lysoPtdCho ratios—with and without albumin-bound lysoPtdCho—that could be superior diagnostic markers for inflammation and oxidative stress.

Keywords Albumin binding · Horse serum · Lysophosphatidylcholine · MALDI-TOF MS · Pepsin · Phosphatidylcholine

Lipids (2018) 53: 971–977.

Abbreviations

BSA	bovine serum albumin
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid
ESA	equine serum albumin
LS	lipid standards
lysoPtdCho	lysophosphatidylcholine
NMR	nuclear magnetic resonance
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
PBS	phosphate-buffered saline
PBSLS	PBS-lipid-standard suspension
PtdCho	phosphatidylcholine

Supporting information Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

✉ Correspondence to: Timo Ditz
timo.ditz@medizin.uni-leipzig.de

¹ Faculty of Medicine, Institute of Medical Physics and Biophysics, University of Leipzig, Härtelstr. 16-18, D-04107, Leipzig, Germany

² Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, D-18196, Dummerstorf, Germany

Introduction

Lipids, especially glycerophospholipids such as phosphatidylcholine (PtdCho) and lysophosphatidylcholine (lysoPtdCho),

have been receiving more and more attention in the scientific field during the last decade, acknowledging their physiological and pathophysiological role in all kinds of organisms. Especially, the capability of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to determine the ratio of PtdCho to lysoPtdCho in mammalian body fluids such as (but not limited to) blood serum (Del Boccio et al., 2011) or synovial fluid (Fuchs et al., 2009) has already been demonstrated. Measurements by MALDI-TOF MS will give semiquantitative results without the use of internal standards when the response factors of the compared compounds are equal. When the sum of the intensities of each lipid peak (proton and sodium adduct) is used and only values of one instrument under exactly the same conditions are compared with each other, the calculation of the ratio between two lipids is possible (Schiller et al., 2004). In combination with a considerable speed of the MALDI-TOF MS, it can be used as an excellent tool for the analysis of relative changes in lipids of many different biological samples.

It was further shown that the PtdCho/lysoPtdCho ratio of body fluids is an indicator for (oxidative) stress and may, therefore, serve as a quality marker (after storage and/or handling), or as an indicator for the severity of certain diseases such as rheumatoid arthritis (Fuchs et al., 2005). Another application field might be cell culture, where animal serum is often used as an integral part of the medium (van der Valk et al., 2004) and the ratio of PtdCho to lysoPtdCho might be of interest for quality assessment. In Angelini et al. (2014), it was shown that the characterization of intact serum by MALDI-TOF MS provides an easier approach of the PtdCho/lysoPtdCho ratios as by MS or nuclear magnetic resonance (NMR) measurements after organic extraction, while the standard deviations of those "intact" measurements are even slightly smaller. Surprisingly, it was observed that the PtdCho/lysoPtdCho ratio in the intact serum sample is about two times higher than in the corresponding organic extracts. As interactions of lysoPtdCho with proteins (especially with serum albumins) are well documented in the literature (Guo et al., 2009; Kim et al., 2007), the albumin binding of lysoPtdCho seems to be a probable reason for increased PtdCho/lysoPtdCho ratios in the intact serum.

The sequestration of lysoPtdCho is likely to alter the properties of the serum, affecting the potential use of the serum for example in cell culture (Spooncer et al., 1986). After testing this hypothesis in this article, an improved intact measurement protocol of the PtdCho/lysoPtdCho ratio in serum by MALDI-TOF MS will be provided. To simplify the complexity of horse serum as a biological sample, a model suspension containing phosphate-buffered saline (PBS) and lipid standards (LS) was used for the experiments prior to the experiments with horse serum. Pepsin and trypsin enzymatically digest proteins, thus

liberating albumin-bound lysoPtdCho. This leads to an increased detection of lysoPtdCho in intact MALDI-TOF MS. To find the most efficient protocol for an improved MALDI-TOF MS determination of lysoPtdCho in native body fluids (i.e. without extraction step), the differences in the albumin digestion effectiveness of pepsin and trypsin will be investigated in the present study.

Materials and Methods

Materials

All lipids were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) with a stock concentration of 10 mg/mL in CHCl_3 . The bovine serum albumin (BSA), PBS, lyophilized pepsin (EC 3.4.23.1), 9-Aminoacridine (9-AA) and 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) as the MALDI matrix, as well as 2-propanol, acetonitrile, hydrochloric acid, and acetic acid as solvents were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The lyophilized equine serum albumin (ESA) was obtained from Equitech-Bio (Kerrville, TX, USA) and lyophilized trypsin (EC 3.4.21.4) from SERVA (Heidelberg, Baden-Württemberg, Germany). The used horse serum was purchased from Gibco (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA Lot: 8133158).

MALDI-TOF Mass Spectrometry

All MALDI-TOF MS measurements (except for the extracts) used the "Sandwich" technique for target preparation as described by Angelini et al. (2014). The method was slightly modified as follows: After treatment and/or preparation, the samples were diluted 1:2 (v:v) with distilled water. 1 μL droplets of the samples were deposited per spot onto the MALDI target. After evaporation to dryness, 0.5 μL of matrix solution (9-aminoacridine, 30 mg/mL in 2-propanol/acetonitrile, 60/40, v/v) was added onto each spot. To measure the extracts, each extract was diluted 1:10 with 2-propanol/acetonitrile (60/40; v/v) and subsequently mixed 1:2 with the matrix solution (9-aminoacridine, 10 mg/mL in 2-propanol/acetonitrile, 60/40, v/v) (Angelini et al., 2014). 0.5 μL of the resulting solution were deposited on each spot. A Bruker Autoflex MALDI mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) with a pulsed nitrogen laser emitting at 337 nm was used for analysis in the positive ion detection mode with the reflector detector gain set to 3.9 $\times$. 200 single laser shots were cumulated for each mass spectrum. The relative laser intensity fluctuates between 45% and 55%, depending on which experiment was carried out. DataAnalysis 4.1 from Bruker

(Bremen, Germany) was used for further analysis of the spectra.

Enzymatic Digestion of Albumins by Pepsin and Trypsin

Digestion experiments with pepsin were based on an in-solution digestion protocol provided by Promega (Part# 9PIV1959, revised 8/16). The protocol was modified by reducing the digestion temperature to 20°C and the digestion time to 3 h. A pepsin stock solution was prepared with a concentration of 10 mg/mL in 0.01 M hydrochloric acid. After thawing, the horse serum (stored at −18°C) hydrochloric acid with a final concentration of 0.04 M and pepsin in varying enzyme to protein ratios were added. The mixture was incubated in a shaker at varying temperatures for varying time intervals. No denaturation of pepsin by heating the whole sample up to 90°C was performed to prevent alterations of the PtdCho/lysoPtdCho ratio by heat. This could be done because our experiments suggest that a dedicated enzyme denaturation to stop the reaction is not necessary if the enzyme digestion time is long enough. As a compromise between the heat sensibility of the PtdCho/lysoPtdCho ratio and the effectiveness of pepsin (and trypsin), we decided to perform the digestion experiments at 20°C for 3 h. The PBS-lipid-standard suspension (PBSLS) containing lysophospholipid and phospholipid standards (lysoPtdCho 16:0; lysoPtdCho 18:0; PtdCho 16:0/18:2 and PtdCho 18:0/18:2) was treated in a comparable way. Digestion experiments with trypsin were based on a protocol provided by SERVA (Cat. No. 37284, Product Information). Lyophilized trypsin was reconstituted in 25 µL 50 mM acetic acid to a final concentration of 1 µg/µL and added to the PBSLS containing ESA. For the comparison between pepsin and trypsin, the same enzyme to protein ratio (1:100, w/w) was used.

Lipid Extraction

Lipid extraction was performed according to Bligh and Dyer (1959) with slight modifications. After dilution of the serum sample with distilled water (1:2), the sample was mixed with methanol/chloroform (chloroform/methanol/sample + water, 1:1:1, by volume). After vortexing and centrifuging at 350 g for 10 min, the lower chloroform phase was used for further analysis.

Statistical Methods

OriginPro 8G was used for data processing and statistical evaluation. All presented data in this study are shown as mean values with error bars indicating their standard deviation. The Mann–Whitney-U-test was chosen for calculating

the level of significance. To simplify data presentation, only the most significant differences are marked.

Results

In the first step, the influence of two different albumins (bovine and equine) on the PtdCho/lysoPtdCho ratio in intact serum was investigated by MALDI-TOF MS. Horse serum was used for the subsequent investigations, as it is easily commercially available. Therefore, the corresponding (equine) serum albumin was chosen and compared with BSA. According to Majorek et al. (2012), there are some differences in the structural and immunological characteristics of serum albumins from different species. Nevertheless, albumins from different species are capable of binding lysoPtdCho (Kim et al., 2007), and the extent of this binding could affect the properties of the corresponding serum. Prior to the experiments, BSA and ESA as well as the pepsin were checked for impurities by dissolution of each protein in distilled water and subsequent extraction according to Bligh and Dyer (1959). lysoPtdCho 17:0 and PtdCho 19:0/19:0 were used as internal standards for the quantification of the extracted lipids. As shown in the supplements (Supporting information 1 and 2), only minor impurities compared to the used lipid amount could be found. In Fig. 1, the ESA-caused effect on the PtdCho/lysoPtdCho ratio in horse serum detected by MALDI-TOF MS of the aqueous samples is shown. After 10 min of incubation of horse serum with ESA, the PtdCho/lysoPtdCho ratio is increased by approximately 25%. This increase is even more pronounced using an incubation time of 1.5 h. Here,

Fig. 1 The influence of equine serum albumin (ESA) addition on the phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine (PtdCho/lysoPtdCho) ratio of horse serum detected by intact MALDI-TOF MS. The results from 15 independent measurements are shown. The level of significance was calculated using the Mann–Whitney-U-test (* $p < 0.01$)

Fig. 2 The influence of different albumins (equine serum albumin [ESA] and bovine serum albumin [BSA]) and different albumin concentrations (40 and 60 mg/mL) on the detected phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine (PtdCho/lysoPtdCho) ratio by intact MALDI-TOF MS after 1.5 and 4.5 h of incubation in an artificial lipid mix. The lipid-binding effect after addition of albumins and subsequent pepsin digestion and lipid extraction is further shown in time point 4.5 h

an increase of approximately 50% is detected. These results suggest a decrease of the lysoPtdCho detectability after adding ESA into serum because of the albumin binding effect. BSA addition shows similar results to ESA addition. A comparison between ESA and BSA addition is shown in Fig. 2.

As described by Angelini et al. (2014), the investigation of intact serum by MALDI-TOF MS provides about two times higher PtdCho/lysoPtdCho values than the analysis of the corresponding organic extracts. As albumin is an integral part of mammalian serum, albumin binding of lysoPtdCho is a probable reason for this difference. Therefore, we were interested to know if it is possible to exclude the albumin-binding effect of lysoPtdCho directly in a biological (i.e. serum) sample to be able to detect all the existing lysoPtdCho by the intact serum measurement by MALDI-TOF MS without prior extraction. In the following experiments, a PBSLS was used instead of the serum samples to simplify the complexity of serum. Only in this way, the real PtdCho/lysoPtdCho ratio of the initial lipid suspension can be accurately determined. LS (lysoPtdCho 16:0, lysoPtdCho 18:0, PtdCho 16:0/18:2 and PtdCho 18:0/18:2) were added in defined concentrations to the PBS. The phospholipids used for the PBS lipid model suspension are the most abundant ones in horse serum and the concentrations were chosen similar to the concentrations found in horse serum. The PBS suspension for the experiments contained 2.4×10^{-5} mol/L lysoPtdCho 16:0, 7.2×10^{-5} mol/L lysoPtdCho 18:0, 7.9×10^{-5} mol/L PtdCho16:0/18:2, and 2.34×10^{-4} mol/L PtdCho18:0/18:2. The suspension was divided, and two different albumins were added to the different fractions (40 or 60 mg/mL ESA or BSA). After 1.5 h

of incubation, those four fractions were measured as well as the PBSLS as control. Fig. 2 clearly indicates that the PtdCho/lysoPtdCho ratio more than doubled after the addition of 40 mg/mL ESA or BSA to the serum samples. After albumin addition at a higher concentration (60 mg/mL ESA or BSA) the PtdCho/lysoPtdCho ratio does not increase significantly, which implies a saturation effect. Surprisingly, the ESA addition has a more pronounced impact on the PtdCho/lysoPtdCho ratio than the BSA addition. ESA seems to be able to bind more lysoPtdCho than BSA. The reasons are so far unknown and outside the scope of the present study. However, it is known that BSA and ESA have different structural properties and this might lead to different binding properties of lysoPtdCho (Majorek et al., 2012).

One major aim of this study was to cancel the effect of albumin binding of lysoPtdCho directly in a lipid suspension (serum or other body fluid). Heating up the suspension until the hydrogen bonds are broken is not an option for denaturation of albumin because the PtdCho/lysoPtdCho ratio is also altered by heating the (biological) samples. Therefore, an enzymatic digestion protocol with pepsin was used, which was slightly altered because of the heat sensitivity of the PtdCho/lysoPtdCho ratio in that it was performed at 20°C over a reduced time of only 3 or 6 h. No denaturation of pepsin by heating the whole sample up to 90°C was performed to prevent alterations of the PtdCho/lysoPtdCho ratio by heat. This could be done because our experiments suggest that an enzyme denaturation is not necessary if the incubation time with the enzyme is long enough (cf. Fig. 4). For further comparison of an albumin digestion by pepsin with an extraction based on Bligh and Dyer (1959), the ESA and BSA 40 mg/mL samples were divided into two fractions. In Fig. 2, the pepsin digestion shows a significant reduction of the PtdCho/lysoPtdCho ratio after 4.5 h: particularly, the PtdCho/lysoPtdCho ratio of the lipid mix in the presence of ESA decreases by more than 50%. However, the values of the PBSLS, which served as control, were not reached. The PtdCho/lysoPtdCho ratios after the extraction are much lower, surprisingly, even significantly lower than the control. To further investigate into this issue, we repeated the experiment using both 9-AA and DHB as matrices. Furthermore, we investigated the PBSLS and both albumin extracts with electrospray ionization mass spectrometry. All three measurements indicated a reduced PtdCho/lysoPtdCho ratio in the extracts compared with the PBSLS. This suggests that PtdCho is chemically degraded to corresponding lysoPtdCho during sample processing.

In Fig. 3a, the influence of different pepsin concentrations (pepsin to BSA ratio) on the digestion capacity was tested. One and a half hour after adding 40 mg/mL BSA to the PBS lipid model suspension, pepsin was added in two different concentrations (enzyme to protein ratios 1:60 and

Fig. 3 (a) Effect of different pepsin concentrations on the bovine serum albumin (BSA) digestion capacity in an artificial lipid mix after 3 (data point 4.5) and 6 (data point 7.5) h of digestion. The results from 15 independent and averaged intact MALDI-TOF MS measurements are shown. The level of significance was calculated using the two-tailed Mann-Whitney U-test ($*p < 0.01$) PBSLS: Lipid standards in PBS as model solution. (b) Comparison of pepsin and trypsin digestion of equine serum albumin (ESA) in an artificial lipid mix. The results from 15 independent and averaged intact MALDI-TOF MS measurements are shown. The level of significance was calculated using the two-tailed Mann-Whitney U-test ($*p < 0.01$) PBSLS: Lipid standards in PBS as model solution

1:20, w/w) and incubated for further 3 h (data point 4.5 h). It is obvious from Fig. 3a that the addition of pepsin decreases the PtdCho/lysoPtdCho ratio by approximately a factor of 2. However, there are only slight differences between the PtdCho/lysoPtdCho ratios obtained at the two different pepsin concentrations. Therefore, the lower pepsin albumin ratio (1:60) was used for further experiments. Similarly, there is no significant difference between the incubation periods. After digestion times shorter than 3 h, the digestion process is not complete because the PtdCho/lysoPtdCho ratio is still decreasing (as shown later on in Fig. 4). Even if the PtdCho/lysoPtdCho ratio decreases significantly upon the digestion of the added BSA, the initial PtdCho/lysoPtdCho ratio determined in the PBS lipid model suspension is still higher.

Fig. 4 Phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine (PtdCho/lysoPtdCho) ratio detected by intact MALDI-TOF MS after time-dependent enzymatic digestion of horse serum using pepsin. Please note: The acidification causes surprisingly an increase in the control group

A second enzyme that could inhibit the albumin binding effect of lysoPtdCho in lipid mixtures is trypsin. In Fig. 3b, the PtdCho/lysoPtdCho ratios of the initial PBS lipid model suspension at the starting time point (0 h) and after 1.5, 4.5, and 7.5 h of digestion are shown. After the addition of 60 mg/mL ESA to the PBS lipid model suspension and incubation for 1.5 h at room temperature, the PtdCho/lysoPtdCho ratio increases by more than 600%. After digestion of 40 μ L of the ESA-PBS lipid model suspension each by either trypsin or pepsin (both with an enzyme to albumin ratio of 1:100) for 3 (data point 4.5) and 6 (data point 7.5) h, the PtdCho/lysoPtdCho ratio of both enzymes decreases. However, the results suggest that trypsin digests less ESA than pepsin and decreases PtdCho/lysoPtdCho by only about 30%, whereby pepsin digestion leads to a PtdCho/lysoPtdCho ratio comparable to the initial PBS lipid model suspension. Pepsin and trypsin are both endopeptidases and are not very selective in the proteins that they digest. They are also characterized by different pH optima. Furthermore, pepsin is known to cleave the amino acid sequence behind aromatic amino acids, whereas trypsin prefers basic amino acids as cleavage sites. However, it is likely that both enzymes would show similar efficiencies if each protocol is optimized for the corresponding enzyme.

Finally, pepsin digestion was applied to horse serum as a biological sample. As pepsin requires acidic conditions for optimum activity, the horse serum that serves as control was acidified as well. Fig. 4 displays that this acidification surprisingly causes an increase in the PtdCho/lysoPtdCho ratio in the control. The pepsin digestion leads, however, to

the expected decrease of about 40% in the PtdCho/lysoPtdCho ratio when compared to the starting point (HS without modification). A digestion time of 3 h is required, but longer digestion times do not lead to any further changes in the PtdCho/lysoPtdCho ratio.

Discussion

This study supports the hypothesis that albumin from different species binds lysoPtdCho (Guo et al., 2009; Kim et al., 2007). We believe that this albumin binding is responsible for the reduced PtdCho/lysoPtdCho ratio if MALDI-TOF MS analysis is performed on intact sample solutions (such as serum) without prior lipid extraction. As previously shown (Angelini et al., 2014), the albumin-bound lysoPtdCho can be released from the protein by an enzymatic digestion step prior to MS analysis. The slightly modified “Sandwich” technique was used for sample preparation without prior extraction, as described by Angelini et al. (2014), combined with albumin digestion. Both enzymes, trypsin and pepsin, are able to release albumin-bound lysoPtdCho. However, significant differences in the effectiveness of both enzymes were observed: the release of lysoPtdCho from the protein by pepsin is much more efficient and the obtained data match the “real” PtdCho/lysoPtdCho ratio of the lipid suspension very well. While the PtdCho/lysoPtdCho ratio after albumin digestion by pepsin is still about 50% higher than the initial PtdCho/lysoPtdCho ratio, the PtdCho/lysoPtdCho ratio after classical extraction with organic solvents is—surprisingly—more than 50% lower than the initial ratio. Further investigations suggest that the standard extraction protocol by Bligh and Dyer (1959) is insufficient for this application and an optimization would be necessary to improve the lysoPtdCho yield. These results show that it is difficult to find a perfect sample preparation method to determine the “correct” PtdCho/lysoPtdCho ratio. This study indicates that sample preparation is a crucial step even if “only” relative quantification is planned. It is important for the comparison of different samples that all the samples are prepared in exactly the same way. Because 3 h of incubation with the respective enzyme and enzyme/albumin ratio of 1:60 gave the best results, we suggest incubation for 3 h at 20°C under shaking. In the case of pepsin, acidification of the sample is required to obtain optimum digestion yields. The smallest sample volume used in this study was 40 µL for enzymatic digestion, the original intact measurement of the PtdCho/lysoPtdCho ratio by MALDI-TOF MS needs only 1–2 µL (Angelini et al., 2014). A direct digestion on the MALDI target might be problematic, because the sample volume of 1–2 µL would dry before the necessary minimum of 3 h of

digestion is reached. It is well known that on the one hand, lysoPtdCho exhibits cytotoxicity (Park et al., 2009) and on the other hand, albumin is capable of decreasing this effect by binding lysoPtdCho (Kim et al., 2007; Park et al., 2009). It should be considered if maybe both PtdCho/lysoPtdCho ratios—with and without albumin-bound lysoPtdCho—might represent superior diagnostic markers for inflammation and oxidative stress.

In conclusion, the present study proposes a prior pepsin digestion step as a new preparation method for the measurement of the PtdCho/lysoPtdCho ratio in aqueous serum by MALDI-TOF MS to release most of the bound, and thus MS-invisible, lysoPtdCho. The determination of the PtdCho/lysoPtdCho ratio in intact serum by MALDI-TOF MS is a convenient method for the determination of a lipid biomarker of inflammation. For this improved intact measurement by MALDI-TOF MS, only 40 µL serum and a prior 3 h digestion step are required. This setup can be easily automatized for a multitude of samples and does not require previous tedious sample workup. However, suitable control samples must be run frequently, because changes in the MALDI setup (such as changes in the laser fluence due to the aging of the laser) affect the data to a significant extent.

Acknowledgements This study was supported by the German Research Council (DFG FU771/1-3). T.D. was furthermore supported with a scholarship from the Medical Faculty Leipzig. The authors would like to thank Astrid Abel and Dr. Jürgen Schiller from the Institute of Medical Physics and Biophysics (Leipzig) for their advice on this manuscript.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Angelini, R., Vortmeier, G., Corcelli, A., & Fuchs, B. (2014) A fast method for the determination of the PC/LPC ratio in intact serum by MALDI-TOF MS: An easy-to-follow lipid biomarker of inflammation. *Chemistry and Physics of Lipids*, **183**:169–175. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.07.001>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**:911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Del Boccio, P., Pieragostino, D., Di Ioia, M., Petrucci, F., Lugaresi, A., De Luca, G., ... Urbani, A. (2011) Lipidomic investigations for the characterization of circulating serum lipids in multiple sclerosis. *Journal of Proteomics*, **74**:2826–2836. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.023>
- Fuchs, B., Bondzio, A., Wagner, U., & Schiller, J. (2009) Phospholipid compositions of sera and synovial fluids from dog, human and horse: A comparison by 31P-NMR and MALDI-TOF MS. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **93**:410–422. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2008.00822.x>
- Fuchs, B., Schiller, J., Wagner, U., Häntzschel, H., & Arnold, K. (2005) The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human

- plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: Investigations by ³¹P NMR and MALDI-TOF MS. *Clinical Biochemistry*, **38**: 925–933. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.06.006>
- Guo, S., Shi, X., Yang, F., Chen, L., Meehan, E. J., Bian, C., & Huang, M. (2009) Structural basis of transport of lysophospholipids by human serum albumin. *The Biochemical Journal*, **423**:23–30. <https://doi.org/10.1042/BJ20090913>
- Kim, Y.-L., Im, Y.-J., Ha, N.-C., & Im, D. S. (2007) Albumin inhibits cytotoxic activity of lysophosphatidylcholine by direct binding. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, **83**:130–138. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2006.10.006>
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., ... Minor, W. (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, **52**:174–182. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>
- Park, C. H., Kim, M. R., Han, J.-M., Jeong, T. S., & Sok, D. E. (2009) Lysophosphatidylcholine exhibits selective cytotoxicity, accompanied by ROS formation, in RAW 264.7 macrophages. *Lipids*, **44**:425–435. <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3286-6>
- Schiller, J., Süss, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Lessig, J., Müller, M., ... Arnold, K. (2004) Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research*, **43**:449–488. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.08.001>
- Spooncer, E., Heyworth, C. M., Dunn, A., & Dexter, T. M. (1986) Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation*, **31**:111–118. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1986.tb00391.x>
- van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., ... Baumans, V. (2004) The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology In Vitro*, **18**:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.08.009>

Supplementary Figure 1 & 2: Protein impurities

Supplement 1 Protein impurities (9-AA)

Quantified impurities of BSA, ESA and pepsin after extraction according to Bligh and Dyer are shown. 10 mg of each protein were dissolved in 1 mL distilled water and measured by MALDI-TOF-MS using 9-AA as matrix and LysoPtdCho 17:0 and PtdCho 19:0/19:0 as internal standards.

Supplement 2 Protein impurities (DHB)

Quantified impurities of BSA, ESA and pepsin after extraction according to Bligh and Dyer are shown. 10 mg of each protein were dissolved in 1 mL distilled water and measured by MALDI-TOF-MS using DHB as matrix and LysoPtdCho 17:0 and PtdCho 19:0/19:0 as internal standards.

2.2 Phospholipase A2 products predict the hematopoietic support capacity of horse serum

Ditz T, Schnapka-Hille L, Noack N, Dorow J, Ceglarek U, Niederwieser D, et al. Differentiation. 2019; doi:10.1016/j.diff.2018.12.002

Phospholipase A2 products predict the hematopoietic support capacity of horse serum

Timo Ditz^{a,b,*}, Lydia Schnapka-Hille^b, Nicole Noack^b, Juliane Dorow^c, Uta Ceglarek^c, Dietger Niederwieser^b, Jürgen Schiller^a, Beate Fuchs^{a,d}, Michael Cross^b

^a Institute of Medical Physics and Biophysics, Medical Faculty, University of Leipzig, Härtelstr. 16-18, D-04107 Leipzig, Germany

^b Department of Hematology and Oncology, Medical Faculty, University of Leipzig, Leipzig, Germany

^c Institute of Laboratory Medicine Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital Leipzig, Leipzig, Germany

^d Leibniz-Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, D-18196 Dummerstorf, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Horse serum
Cell culture
Eicosanoids
Hematopoiesis
Lysophosphatidylcholine

ABSTRACT

Horse serum is commonly used as an additive to support the maintenance of hematopoietic progenitor cells in culture. However, the wide variability in the performance of different lots calls for parallel testing of multiple batches over extended periods of culture. Identification of the serum components that determine hematopoietic support would therefore save considerable time and effort and would help to standardize culture procedures. We report here that the ability of horse serum to support the self-renewal of multipotent murine hematopoietic progenitor FDCP-Mix cells is correlated to the concentration of specific fatty acid products of phospholipase A2 and more closely to the spectrum of eicosanoids generated by their further processing through cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. Supportive sera have low levels of lysophosphatidylcholine and inflammatory eicosanoids. This links known markers of inflammation, infection and platelet activation to the ability of serum to maintain progenitor cells in an undifferentiated state, providing a means for prospective identification of suitable sera as well as quality control of the production process.

1. Introduction

Early in the development of hematopoietic culture systems from various species, it was noted that fetal bovine serum tends to induce differentiation while carefully selected batches of horse serum help to maintain stem and progenitor cell potential, presumably reflecting their lower content of activating growth factors. Serum components can affect the establishment of the non-hematopoietic, supportive stroma (Dexter and Lajtha, 1974). However, there are also direct effects on the hematopoietic progenitor cells themselves as evidenced by the requirement for selected batches of horse serum to maintain the undifferentiated state of the FDCP-Mix (Factor Dependent Cell Paterson Institute – Mixed potential) cell lines (Sponcer et al., 1986). FDCP-Mix cells were originally derived from murine long-term bone marrow cultures, but can be maintained and expanded as multipotent

progenitors in stromal-free culture if provided with high concentrations of interleukin 3 and a suitable horse serum. In contrast, the use of fetal bovine serum leads to differentiation and clonal extinction. Indeed, the replacement of horse serum by fetal bovine serum and the addition of myeloid growth factors or erythropoietin leads to progressive commitment and differentiation along the myeloid or erythroid lineages, respectively (Sponcer et al., 1986; Heyworth et al., 1995). These properties make FDCP-Mix cells a valuable model for studying the regulation of hematopoiesis, and particularly for studies requiring large numbers of cells at distinct stages of differentiation (e.g. Billing et al., 2017). However, even under optimal conditions, the FDCP-Mix cells typically retain their full differentiation potential for only 1–2 months, after which the outgrowth of progressively transformed cells can generate cultures that are highly proliferative but have reduced IL-3 dependence and differentiation potential. The use of suboptimal conditions,

Abbreviations: AA, Arachidonic acid; CFU, Colony forming unit; COX, Cyclooxygenase; DHA, Docosahexaenoic acid; DHGLA, Dihomo- γ -linolenic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; Epo, Erythropoietin; FBS, Fetal bovine serum; G-CSF, Granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, Granulocyte macrophage colony stimulating factor; HEPE, Hydroxyeicosapentaenoic acid; HETE, Hydroxyeicosatetraenoic acid; HHT, Hydroxyheptadecatrienoic acid; IL-3, Interleukin 3; IMDM, Iscove's Modified Dulbecco's Medium; LA, Linoleic acid; LOX, Lipoxygenase; LPC, Lysophosphatidylcholine; LTB4, Leukotriene B4; MALDI, Matrix-assisted laser desorption and ionization; PC, Phosphatidylcholine; PLA2, Phospholipase A2; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; TOF, Time-of-flight; TXB, Thromboxane B

* Corresponding author at: Institute of Medical Physics and Biophysics, University of Leipzig, Medical Faculty, Härtelstr. 16-18, D-04107 Leipzig, Germany.

E-mail address: timo.ditz@medizin.uni-leipzig.de (T. Ditz).

<https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.12.002>

Received 22 August 2018; Received in revised form 16 November 2018; Accepted 6 December 2018

Available online 06 December 2018

0301-4681/© 2018 International Society of Differentiation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

including unsuitable horse sera, accelerates this process. Correct and reliable use of the system therefore requires intensive screening for functionally suitable batches of horse serum as well as regular monitoring of differentiation potential and clonogenicity. The identification of the serum parameters that affect progenitor cell maintenance would greatly simplify this procedure and make the FDCP-Mix cells more widely accessible.

The products of phospholipase A2 (PLA2)-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine (PC) are obvious candidates in this respect. PLA2 releases the *sn*-2 fatty acid from PC to generate lysophosphatidylcholine (LPC) and a free fatty acid. Plasma LPC levels have repeatedly been correlated to inflammatory and disease conditions, and both LPC and the eicosanoids produced by further processing of linoleic and arachidonic acid released from the *sn*-2 position provide signals in inflammatory processes (Khanapure et al., 2007). Here, we investigate whether LPC or eicosanoid content is indicative of the ability of horse serum to maintain multipotent FDCP-Mix progenitor cells in an undifferentiated state.

2. Materials and methods

2.1. Sera

Horse sera were obtained from: Biochrom GmbH (Berlin, Germany); Biowest (Nuaillé, France); Bioconcept Ltd. (Allschwil, Switzerland); Euroclone S.p.A (Pero, Italy); Gibco / Hyclone / PAA / Thermo Fischer (Waltham, USA); PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Germany) and Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany). Fetal bovine serum used for the liquid differentiation assay was from PAN Biotech GmbH. Sera were stored at -20°C prior to use.

2.2. Cell culture

FDCP-Mix cells were maintained by passaging to 6×10^4 cells per ml every two days in IMDM (Biochrom) supplemented with 10 U/ml recombinant murine IL-3 and 20% horse serum. We have found the use of IL-3 at 10 U/ml rather than 100 U/ml results in a slight reduction in proliferation rate, but a reproducible increase in the frequency of colony forming cells (unpublished). All growth factors were obtained from PeproTech (Hamburg, Germany). Cultures were incubated at 37°C , 5% CO_2 in air at 95% humidity. Viable cell numbers were determined by manual counting of cells stained with trypan blue (Sigma Aldrich, Munich, Germany) in a hemocytometer. Clonality assays were carried out by suspending 3300 cells in 10 ml of IMDM containing 20% horse serum and 100 U/ml IL-3, mixing in 1.1 ml of molten 3.3% agar and immediately dividing 3.3 ml aliquots into each of 3 wells of a 6-well tissue culture plate. The gaps between wells were flooded with sterile water to maintain high humidity in the plates. Visible colonies were counted after 12 days of incubation.

The differentiation potential of cells maintained under self-renewal conditions was assessed by washing the cells in PBS to remove the high concentrations of IL-3, then re-suspending in IMDM containing 10% FBS combined with supplements supporting myeloid differentiation (1 U/ml IL-3, 1000 U/ml G-CSF, 50 U/ml GM-CSF, cells seeded at 6×10^4 /ml) (Sponcer et al., 1986; Just et al., 1991) or erythroid differentiation (2 U/ml IL-3, 2 U/ml Epo, 0.2 mM Hemin, cells seeded at 8×10^4 /per ml) (Heyworth et al., 1995). The progress of differentiation was monitored by morphological typing of cytospun cells stained with May-Grunwald Giemsa (Roth, Karlsruhe, Germany) together with o-Dianisidine (Sigma Aldrich) to identify hemoglobinised cells. A minimum of 100 cells were typed for each sample.

2.3. MALDI-TOF mass spectrometry

LPC 16:0, LPC 17:0 and LPC 18:0 at a stock concentration of 10 mg/ml were purchased from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabama, USA).

Lyophilized pepsin and 9-aminoacridine matrix, as well as the solvents 2-propanol, acetonitrile and hydrochloric acid were from Sigma Aldrich. All measurements with MALDI-TOF-MS used a modification of the “Sandwich”-technique for target preparation previously described (Angelini et al., 2014). The serum samples were diluted 1:2 (v:v) with distilled water and 1 μl droplets per spot were deposited directly onto the target. After evaporation to dryness, 0.5 μl matrix solution (9-aminoacridine, 30 mg/ml in 2-propanol/acetonitrile, 60/40 v:v) was added per spot. The Bruker Autoflex mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) was used in the positive detection mode. Cations were detected in the reflector mode ($3.9 \times$). Two hundred laser shots from a pulsed nitrogen laser at 337 nm were averaged for each mass spectrum. The relative laser intensity was set to 45%. Quantification of LPC 16:0 and LPC 18:0 was performed using an internal standard of LPC 17:0 at 0.1 mg/ml or 0.2 mg/ml for pre-digest and post-digest samples respectively. DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics, Germany) was used for analysis of the recorded spectra.

2.4. Enzymatic digestion with Pepsin

Pepsin digestion of sera was carried out using a modification of the protocol provided by the supplier (Promega, Part# 9PIV1959, revised 8/16). A pepsin stock solution was prepared at 10 mg/ml in 0.01 M hydrochloric acid. After thawing the horse serum at room temperature, hydrochloric acid was added to a final concentration of 0.04 M. Pepsin was then added to an enzyme:protein ratio of approximately 1:60 and digestion was performed for 3 h at 20°C . The high temperature denaturation described in the manufacturer's protocol was omitted in this case in order to protect active components of the horse serum that may be heat-labile.

2.5. On-line SPE-LC-MS/MS analysis of PUFAs and eicosanoids

Sample preparation of horse sera and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis were performed as previously described (Kortz et al., 2013). In brief, 100 μl water, 50 μl internal standard solution and 400 μl precipitation reagent containing methanol:310 mM zinc sulfate (Merck, Darmstadt, Germany) at a ratio of 4:1 (v/v) were added to 100 μl serum. Samples were vortexed for 2 min and centrifuged for 5 min at $10,000 \times g$. The clear supernatant was transferred to a HPLC vial and stored at -80°C before analysis. For on-line solid phase extraction, 200 μl of the sample solution were injected onto a Strata-X extraction column (20×2 i.d., 25 μm , Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). A Kinetex C18 column (100×2.1 mm i.d., 2.6 μm , Phenomenex) was used for chromatographic separation. The MS/MS analysis was performed on a 5500 QTRAP mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) operating in negative electrospray ionization mode with scheduled multiple-reaction monitoring (MRM) experiments. Multiquant 2.1 was used for the quantification of metabolites.

2.6. Statistics

OriginPro 8.0 and Microsoft Excel 2010/2016 were used for data processing. Measured values are shown as mean and standard deviation of replicates as indicated in the respective figure legend.

3. Results

We have previously reported a variation of more than 5-fold in the ratio between PC and LPC in fourteen batches of horse serum assayed by MALDI-TOF mass spectrometry and ^{31}P -NMR spectroscopy (Angelini et al., 2014). Since PLA2 activity would be expected to vary with inflammatory states in the donor animals and/or the degree of stress encountered during processing of the plasma, we hypothesized that this might reflect the ability of a horse serum to support hematopoietic

Fig. 1. PC:LPC ratio and hematopoietic support of 14 horse sera. Lipid concentrations determined by ^{31}P NMR are shown as mean (solid squares) and standard deviation (black lines) of triplicate extracts. The frequencies of FDCP-Mix cells retaining colony forming activity after 28 days suspension culture in media containing the respective serum are shown as mean (white bars) and standard deviation (grey lines) of triplicates. The PC/LPC ratios were calculated from the major species PC 16:0/18:2 + 18:0/18:2 and LPC 16:0 + 18:0 and are reproduced with permission from Elsevier (Angelini et al. 2014).

progenitor cells. To test this hypothesis, FDCP-Mix cells were cultured for 28 days in each of the 14 sera and the proportion of cells that retained the capacity for independent self-renewal in a semi-solid medium (colony forming cells) was determined. Although there was no clear correlation at lower PC:LPC ratios, the four sera with the highest PC:LPC ratio, which is indicative of the lowest PLA-2 activity (HS 10, 11, 12 and 13), were indeed the most effective at maintaining the colony forming capacity of FDCP-Mix (Fig. 1). This association between phospholipid composition and hematopoietic support was then further investigated by prospective, blinded analysis of an independent set of 8 different horse sera.

Proliferation curves for FDCP-Mix cells maintained in media containing each of the 8 sera are shown in Fig. 2A. Four of the sera (HS 1, 2, 7 and 8) supported steady and continuous proliferation. Cells placed into medium containing HS 6 underwent an initial lag, but proliferated exponentially from day 8 onwards. Horse sera 3, 4 and 5 all failed to sustain survival and proliferation in suspension culture.

The ability of each serum to support colony formation in semi-solid media was tested firstly by direct seeding of cells from a stock suspension culture with no period of adjustment (shown in Fig. 2B as CFU day0) and in a separate experiment by seeding cells that had been pre-cultured for 8 or 28 days in the respective test serum (shown in Fig. 2B as CFU day8 and CFU day28). Cells seeded directly into the new conditions formed colonies in medium containing HS 7 and, to a lesser extent, in those containing HS 1 or 8, but in none of the other media. The high colony supporting ability of HS 7 under this (d0) condition differs significantly from that of all other sera ($P \leq 0.01$, Tukey's HSD test). FDCP-Mix cells that had been maintained in liquid culture for 8 days in the presence of HS2 or 6 were then capable of initiating colonies in semi-solid media containing the respective serum, suggesting that a period of adaptation was required in these cases. Sera 3, 4 and 5 supported little or no colony formation, consistent with their inability to support sustained proliferation in suspension culture. The colony forming activities seen at day 28 were similar in all cases to those seen at day 8.

As a test of the ability of each serum to maintain the multi-lineage potential of FDCP-Mix, cells were removed from each of the surviving cultures on day 16 and introduced into FBS-containing media supporting differentiation along the granulocyte/macrophage or erythroid lineages. Differentiation typically results in a population of predominantly mature, post-mitotic cells by day 7–10, depending on the lineage (Sponcer et al., 1986; Just et al., 1991; Kan et al., 1993; Heyworth et al., 1995). However, there is usually a significant degree of

cell death by this time, so that a more accurate measure of differentiation capacity can be obtained by examination of the cultures at intermediate days 3 and 6. A multipotent population of FDCP-Mix should accumulate maturing cells over this period. The cell phenotypes generated under myeloid and erythroid conditions are shown in Fig. 2C and D, respectively. All of the sera that had sustained both proliferation in liquid culture and colony forming activity in semi-solid media (see above) also maintained both myeloid and erythroid potential, with HS 7 and 8 supporting the most progressive generation of granulocytes and macrophages as well as high erythroid potential. The late increase in the proportion of myeloid cells detected under erythroid differentiation conditions in HS 1, 2, 6 and 8 suggests that the expansion phase of erythropoiesis in these cultures is relatively short, with erythroid maturation occurring earlier than myeloid maturation.

Taken together, the functional assays identified sera 3, 4 and 5 to be unsuitable for FDCP-Mix culture. Of the remaining candidates, sera 7 and 8 retained the highest differentiation potential, with HS 7 being the serum of choice based on the consistently high level of CFU support.

In parallel with the functional assays described above, LPC 16:0 and LPC 18:0 were measured by a MALDI-TOF-MS technique that has a high sensitivity for the glycerophospholipids of interest and does not require prior extraction of the horse sera (Angelini et al., 2014). The analysis was focussed on LPC 16:0 and 18:0 as these species are the most prevalent lysophospholipids in horse sera (Fuchs et al., 2009). Measurements were carried out on each of the 8 sera both in the native state and following treatment with pepsin in order to release any phospholipid that may be sequestered on serum albumin (TD and BF, manuscript under revision). Fig. 3 shows the LPC concentrations detected in each of the 8 sera before and after pepsin digestion.

Pepsin treatment of the sera did indeed release protein-bound phospholipids, increasing the levels detected in some sera by more than 50%. Following pepsin digestion, each serum differed significantly in terms of LPC content from all of the others ($p \leq 0.05$, Mann Whitney U test). The lowest LPC concentrations were seen in HS 7 and 8 and the highest in HS 4 and 5. The measurement of LPC levels therefore successfully identified the two sera most capable of maintaining FDCP-Mix (HS 7 and 8 with the lowest LPC) and two of the three sera that were least suitable (HS 4 and 5 with high LPC). In this respect, the results of prospective testing confirmed the hypothesis arising from the retrospective analyses of 14 horse sera described above, that serum LPC levels reflect the ability to maintain FDCP-Mix cells. However, the correlation is not absolute, since the functionally poor HS 3 did not have the high LPC levels found in HS 4 and 5. This raised the question of whether LPC itself affects the hematopoietic support capacity of the horse serum, or whether it is serving as an indirect marker.

To resolve this issue, three sera with moderate to low LPC levels (HS 1, 6 and 7) were supplemented with LPC 16:0 and 18:0 to levels double or triple the original concentration, following which the ability of the modified sera to maintain FDCP-Mix cells was tested firstly in suspension culture over a period of 36 days and secondly in colony assays, which provide the most sensitive measure of self-renewal potential. The colony assays were set up using cells removed from the respective suspension culture on day 27. Supplementing LPC into the suspension culture had no marked effect on proliferation rate or subsequent differentiation capacity (Supplementary Fig. 2). However, supplementation into the suspension culture and/or into the subsequent colony assay significantly decreased the number of colonies generated from sera 1 and 6 (Fig. 4, Tukey test, $p \leq 0.05$). The effects were weaker in HS 7, which started with the lowest level of LPC. Here, tripling the LPC level in both suspension culture and colony assay significantly reduced colony forming activity ($p \leq 0.05$) while doubling the level them did not. These results are consistent with there being a concentration dependent, detrimental effect of LPC up to a threshold level, with no further effect at higher levels. This is consistent with the original observation shown in Fig. 1, in which the association between PC/LPC ratio and colony forming activity was lost at lower ratios

Fig. 2. Maintenance of FDCP-Mix potential during culture in 8 different horse sera. A: cumulative cell yield over 20 days of suspension culture, calculated from mean viable cell numbers in triplicate cell cultures. B: colony forming activity (colonies per 1000 cells) of cells removed from suspension cultures after 0, 8 and 28 days. Data are expressed as mean and standard deviations of triplicate assays. C and D: Morphologies of cells removed on day 16 from proliferating suspension cultures (HS 1, 2, 6, 7 and 8) and differentiated under myeloid (C) and erythroid (D) conditions. Morphologies were determined after 0, 3 and 6 days of differentiation. Live and dead cell counts from each differentiation time point are presented in [Supplementary fig. 1](#).

Fig. 3. Levels of LPC detected in 8 different horse sera by MS before and after pepsin digestion. Values indicate the mean and SD of $\times 15$ (before pepsin treatment) or 30 (after pepsin treatment) replicate measurements.

(corresponding to higher LPC levels). LPC therefore appears to be associated with, but not directly responsible for, the differential levels of support observed, suggesting that related products of lipid processing maybe more relevant.

The most obvious candidates in this respect include a range of eicosanoids produced from arachidonic acid (AA) and other

Fig. 4. Lysophosphatidylcholine reduces the proportion of semi-solid colony forming cells in liquid culture and the formation of colonies in semi-solid media. Media containing 20% HS 1, 6 or 7 were used in the original formulation (1 $\times$) or supplemented with lysophosphatidyl choline 16:0 and 18:0 to double (2 $\times$) or triple (3 $\times$) the original levels. FDCP-Mix cells cultured in these media for 26 days were then plated into colony assays employing the same serum, again containing either the original or supplemented levels of LPC as shown. Data represent the mean and standard deviation of triplicate colony assays.

Fig. 5. : A selection of polyunsaturated fatty acids and metabolites detected in the 8 horse sera. Horse serum numbers are indicated on the x-axis. Polyunsaturated fatty acids are shown in the upper panel. Eicosanoids were grouped according to their synthesis pathways and substrate. For the sake of clarity, the relative differences in the amounts of each derivative detected between the sera are shown without units, with the absolute values being presented in [Supplementary Table 1](#). Horse serum numbers are indicated below the x axis. AA: Arachidonic acid; COX: Cyclooxygenase; DHA: Docosahexaenoic acid; DHGLA: Dihomo- γ -linolenic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; HEPE: Hydroxyeicosapentaenoic acid; HETE: Hydroxyeicosatetraenoic acid; HHT: Hydroxyheptadecatrienoic acid; LA: linoleic acid; LOX: Lipoxygenase; LTB4: leukotriene B4; TXB: thromboxane B.

polyunsaturated fatty acids (PUFAs) released from the *sn*-2 position of PC by PLA2 (Khanapure et al., 2007). In support of this, LC MS/MS analysis of a total of 28 PUFAs and eicosanoids that were detectable in all of the eight sera revealed a close association between hematopoietic support and the concentration of eicosanoids generated by specific enzyme pathways (Fig. 5). Most strikingly, HS 3, 4 and 5 that were unable to sustain FDCP-Mix for more than a few days in culture contained high levels of thromboxanes B1 and B2 and of 12(S) hydroxyheptadecatetraenoic acid, which are produced from AA via cyclooxygenase pathways, and the lowest levels of hydroxyeicosapentaenoic acid (HEPE) derivatives produced from eicosapentaenoic acid via lipoxygenases. Considered together with the relatively high linoleic acid (LA) and LPC levels in HS 3, 4 and 5, this suggests a high level of PLA2 activity (generation of LPC, AA and LA) coupled with a high rate of AA processing by cyclooxygenases. Sera 7 and 8, which were most effective at maintaining the potential of FDCP-Mix cells, had the highest AA levels but low levels of LPC and LA, suggesting not just low PLA2 activity but also low rates of further processing of AA. The serum eicosanoid profile is therefore closely associated with the hematopoietic support capacity.

4. Discussion

Commercial animal sera intended for cell culture applications are routinely tested for sterility and endotoxin level and may also be analysed for specific metabolite, protein and ion content. For particularly

demanding applications it is important to confirm the support provided in cell culture by functional testing, which can be both labor intensive and time consuming. Functional screening for the ability to maintain multipotent hematopoietic progenitor cells in an undifferentiated state requires culture in serum-containing media for several weeks, followed by tests of stem/progenitor cell activity, including clonogenic growth and multi-lineage differentiation. In our experience with the FDCP-Mix cells, this procedure takes 6–8 weeks starting each time with a minimum of 8 sera and, depending on the shelf-life of the sera, needs to be repeated every 1–2 years. Our demonstration that horse sera with high levels of LPC are unsuitable for the maintenance of multipotent FDCP-Mix cells now provides a prospective marker that can be used to reduce this screening effort. Of the 8 sera tested, the 2 with the highest LPC level were among the worst and the 2 with the lowest LPC level were the best performers. On this basis, it should be possible to halve the functional screening effort by eliminating sera with LPC levels above the median, without running the risk of excluding the most suitable serum.

It is feasible that LPC itself contributes to the progressive loss of the stem/progenitor cell phenotype during extended culture by activating myeloid cells via the GP-2A receptor (Silliman et al., 2003). However, our add-back experiments showed that LPC is unlikely to be the major determinant for the maintenance of FDCP-Mix cells. LPC production is accompanied by the release of polyunsaturated fatty acids that then serve as substrates for the synthesis of a wide range of eicosanoids involved in regulation of both homeostasis and the response to infection

and inflammation (Dennis and Norris, 2015). Indeed, the eicosanoid profile revealed features that were more closely associated with serum quality than was LPC. Sera bearing the hallmarks of high PLA2 activity (high LPC, and LA) coupled with high COX activity (low AA, high TBX) proved to be the least suitable, while those with eicosanoid profiles indicative of low PLA2 activity (low LPC) and a low level of subsequent AA processing (high AA, low TBX, low HEPE) were most supportive. Given that the COX products of AA tend to be strong pro-inflammatory signals, while LOX products can have anti-inflammatory properties (Dennis and Norris, 2015), it seems that the non-supportive horse sera had an inflammatory profile of AA-derived eicosanoids which was absent in the most supportive sera HS 7 and HS 8.

It is noteworthy that HS 7, which was the only serum to support efficient colony formation without a period of adaptation (Fig. 2B), contained the highest level of LOX products of AA. Some products of this pathway act as ligands for the aryl hydrocarbon receptor (Chiaro et al., 2008), which is one of the few regulators capable of influencing the balance between self-renewal and differentiation in hematopoietic stem cells (Fares et al., 2015; Boitano et al., 2010). This highlights the diverse activities of individual eicosanoid species derived from the same substrate and the value of eicosanoid profiling over single product determinations. The involvement of the aryl hydrocarbon receptor in stem cell maintenance in both mice (Singh et al., 2011) and humans (Boitano et al., 2010) suggests that the eicosanoids affecting FDCP-Mix maintenance may affect primary stem cells across species in a similar way. It has been noted previously that horse sera selected for the maintenance of primary murine progenitors are also supportive for FDCP-Mix (Sponcer et al., 1993). It will now be interesting to test the suitability of sera with favorable eicosanoid profiles for their ability to support human hematopoiesis in long term culture initiating cell assays, in which horse serum is routinely used.

From the viewpoint of quality control, it is interesting to consider the source of the variation seen among the different batches of serum. It is possible that the eicosanoid spectrum is influenced by the health of the donor animals, since infection or inflammation can certainly influence plasma LPC levels. However, the eicosanoids tend to be short lived, locally acting regulators so it is equally feasible that the eicosanoid spectrum of the sera tested reflects variations in the collection, clotting and clearing procedures used. For the same reason, the eicosanoid profile may be affected by serum storage conditions and repeated cycles of freeze/thawing (Dorow et al., 2016), although it should be noted that all of the serum samples compared in this study were stored together at -20°C and underwent the same number of freeze-thaw cycles. Now that we have found the eicosanoid profile to be indicative of serum quality, more extensive profiling should reveal in detail the decisive parameters and the donor/process variables that determine them. This information should facilitate both the quality control of serum preparation and the prospective selection of sera for specific applications.

Acknowledgements

This research was supported by Zusammen gegen den Krebs (grant 934500-045 to MC) and the German Research Council (DFG FU 771/1–3, DFG Schi 476/12-2, DFG Schi 476 16/1 and SFB 1052/23).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.12.002>.

References

- Angelini, Roberto, Vortmeier, Gerrit, Corcelli, Angela, Fuchs, Beate, 2014. A fast method for the determination of the PC/LPC ratio in intact serum by MALDI-TOF MS: an easy-to-follow lipid biomarker of inflammation. *Chem. Phys. Lipids* 183, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.07.001>.
- Billing, Claudia, Walker, Michael, Noack, Nicole, Böhme, Christian, Ceglarek, Uta, Niederwieser, Dietger, et al., 2017. Features of lineage-specific hematopoietic metabolism revealed by mitochondrial proteomics. *Proteomics* 17 (15–16). <https://doi.org/10.1002/pmic.201700053>.
- Boitano, Anthony E., Wang, Jian, Romeo, Russell, Bouchez, Laure C., Parker, Albert E., Sutton, Sue E., et al., 2010. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329 (5997), 1345–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1191536>.
- Chiaro, Christopher R., Morales, J. Luis, Prabhu, K. Sandeep, Perdev, Gary H., 2008. Leukotriene A4 metabolites are endogenous ligands for the Ah receptor. *Biochemistry* 47 (32), 8445–8455. <https://doi.org/10.1021/bi800712f>.
- Dennis, Edward A., Norris, Paul C., 2015. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 15 (8), 511–523. <https://doi.org/10.1038/nri3859>.
- Dexter, T.M., Lajtha, L.G., 1974. Proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *Br. J. Haematol.* 28 (4), 525–530.
- Dorow, Juliane, Becker, Susen, Kortz, Linda, Thiery, Joachim, Hauschildt, Sunna, Ceglarek, Uta, 2016. Preanalytical investigation of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biopreservation Biobanking* 14 (2), 107–113.
- Fares, Iman, Rivest-Khan, Laura, Cohen, Sandra, Sauvageau, Guy, 2015. Small molecule regulation of normal and leukemic stem cells. *Curr. Opin. Hematol.* 22 (4), 309–316. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000151>.
- Fuchs, B., Bondzio, A., Wagner, U., Schiller, J., 2009. Phospholipid compositions of sera and synovial fluids from dog, human and horse: a comparison by ^{31}P NMR and MALDI-TOF MS. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93 (4), 410–422. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2008.00822.x>.
- Heyworth, C.M., Alauldin, M., Cross, M.A., Fairbairn, L.J., Dexter, T.M., Whetton, A.D., 1995. Erythroid development of the FDCP-Mix A4 multipotent cell line is governed by the relative concentrations of erythropoietin and interleukin 3. *Br. J. Haematol.* 91 (1), 15–22 (S.).
- Just, U., Stocking, C., Sponcer, E., Dexter, T.M., Ostertag, W., 1991. Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* 64 (6), 1163–1173 (S.).
- Kan, O., Whetton, A.D., Heyworth, C.M., 1993. Development of haemopoietic cells in liquid culture. In: Nydia G Testa und Graham Molineux (Ed.), *Haemopoiesis. A Practical Approach*. IRL Press (The Practical Approach Series, 111), Oxford, pp. 123–137 (S.).
- Khanapure, Subhash P., Garvey, David S., Janero, David R., Letts, L. Gordon, 2007. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem.* 7 (3), 311–340 (S.).
- Kortz, Linda, Dorow, Juliane, Becker, Susen, Thiery, Joachim, Ceglarek, Uta, 2013. Fast liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry analysis of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human plasma. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 927, 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.012>.
- Silliman, Christopher C., Elzi, David J., Ambruso, Daniel R., Musters, Rene J., Hamiel, Christine, Harbeck, Ronald J., et al., 2003. Lysophosphatidylcholines prime the NADPH oxidase and stimulate multiple neutrophil functions through changes in cytosolic calcium. *J. Leukoc. Biol.* 73 (4), 511–524 (S.).
- Singh, Kameshwar P., Garrett, Russell, W., Casado, Fanny, L., Gasiewicz, Thomas A., 2011. Aryl hydrocarbon receptor-null allele mice have hematopoietic stem/progenitor cells with abnormal characteristics and functions. *Stem Cells Dev.* 20 (5), 769–784. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0333>.
- Sponcer, E., Heyworth, C.M., Dunn, A., Dexter, T.M., 1986. Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differ.; Res. Biol. Divers.* 31 (2), 111–118.
- Sponcer, E., Boettiger, D., Dexter, T.M., 1993. Isolation and culture of factor-dependent haemopoietic cells. In: Nydia G Testa und Graham Molineux (Ed.), *Haemopoiesis. A Practical Approach* 111. IRL Press (The practical approach series), Oxford, pp. 123–137.

Supplementary Figure 1: FDCP-Mix cell yield and viability during differentiation.

Differentiation cultures were set up using cell pre-cultured in media containing horse serum 1,2,5,6,7 or 8. The numbers of viable and dead cells were determined by trypan blue exclusion on day 3 and day 6 of differentiation culture. These are the same cultures and time points from which cytopsin were prepared for the morphological assessment of differentiation shown in manuscript Fig. 2C and D.

Supplementary Figure 2: The effect of LPC supplementation on proliferation

Cumulative cell numbers over 36 days of culture in media containing horse serum 1, 6 or 7 containing the intrinsic level of LPC (1x) or with LPC supplemented to 2x and 3x the intrinsic level. These are the cultures from which cells were removed on day 27 for colony assays in LPC-supplemented media (results shown in manuscript Fig. 4).

Supplementary Figure 3: The efficiency of myeloid differentiation on day 5 of differentiation culture initiated using cells from self-renewal cultures maintained in media containing different sera and LPC concentrations.

The surface expression of CD117 (cKit, marker of progenitor cells) was reduced while that of CD11b (myeloid marker) was increased similarly under all conditions. 1x = intrinsic LPC content of respective serum, 2x and 3x = double or triple intrinsic LPC levels, respectively. These differentiation cultures were set up at the same time and from the same cultures as the colony assays shown in manuscript Fig. 4.

Supplementary Table 1: Measured concentrations of eicosanoids in 8 horse sera as determined by LC-MS/MS. These absolute determinations were used to prepare the graphs of relative differences shown in Figure 5.

AA: Arachidonic acid; COX: Cyclooxygenase; DHA: Docosahexaenoic acid; DHGLA: Dihomo- γ -linolenic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; HEPE: Hydroxyeicosapentaenoic acid; HETE: Hydroxyeicosatetraenoic acid; HHT: Hydroxyheptadecatrienoic acid; LA: linoleic acid; LOX: Lipoxigenase; LTB₄: leukotriene B₄ ; TXB: thromboxane B.

	PUFA (ng/ml)				COX (AA) products (pg/ml)				LOX (AA) products (pg/ml)				LOX (EPA) products (pg/ml)				
	AA	LA	EPA	DHGLA	DHA	TXB1	TXB2	12(S)-HHT	5-HETE	5(S),15(S)- DHETE	8(S)HETE	15(S)- HETE	11-HETE	6-trans- LTB4	5(S)HEPE	11(S)HEPE	12(S)HEPE
HS 1	1774	45660	1529	1494	727	1100	27023	132838	54991	6673	156733	12710	13641	4971	76107	24099	211109
HS 2	1980	52832	1354	1837	753	1039	26013	134748	45545	3557	175620	12899	14102	2600	42536	17698	190168
HS 3	2100	71908	901	861	774	2184	70705	419924	61358	8826	237471	18927	22193	4199	16602	5652	43866
HS 4	1692	57637	819	693	792	1962	57406	322161	61272	7948	193708	18488	19974	5382	15453	4383	33825
HS 5	1543	61034	543	529	637	2719	88406	504324	83975	17364	274556	28258	32713	13853	6120	1347	13371
HS 6	1357	48644	1389	1269	669	968	23822	122550	80312	7580	185258	14483	15251	3790	79108	20834	174320
HS 7	2484	46108	702	797	637	1342	31123	130414	154746	19564	469089	48744	48372	21894	25747	7387	44523
HS 8	2394	47750	694	750	675	952	30898	154505	42986	4958	272228	19582	20746	3558	18154	10685	79958

3 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: Identifizierung von geeigneten equinen Seren zur Zellkultivierung durch massenspektrometrische Bestimmung von Lipid-Biomarkern

eingereicht von: Timo Ditz

angefertigt am: Institut für Medizinische Physik und Biophysik,
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Department für Innere Medizin
Selbstständige Abteilung für Hämatologie,
Internistische Onkologie und Hämostaseologie,
Forschungslabor, Universitätsklinikum Leipzig AÖR

betreut von: Dr. rer. nat. habil. Beate Fuchs
Michael Cross, PhD

eingereicht im: Januar 2020

Die Verwendung von Zellkulturen ist in der derzeitigen medizinischen und biochemischen Forschung weit verbreitet und deckt den gesamten Anwendungsbereich von der Grundlagenforschung bis zur kommerziellen Synthese ab. Im Vergleich zu Tierversuchen sind Zellkulturen einfacher zu standardisieren und Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten sind meist besser reproduzierbar. Dies ermöglicht eine gezieltere Untersuchung von physiologischen und pathologischen Phänomenen [3]. Der vermehrte Einsatz von Zellkulturen trägt zudem zu einer Reduktion von Tierversuchen bei.

Bei der Zellkultivierung wird dem artifiziell hergestellten Grundmedium meist tierisches Serum hinzugefügt, um ein adäquates Wachstum der Zellen zu gewährleisten [3]. So liefert das Serum zusätzliche Nährstoffe, essenzielle Wachstumsfaktoren und eine Vielzahl weiterer Moleküle [12]. Die Seren werden kommerziell aus tierischem Vollblut hergestellt und normalerweise vor ihrer Auslieferung auf bestimmte Parameter, wie zum Beispiel Aminosäure-Gehalt und Albumin-Konzentration, getestet. Trotz dieser Testung seitens der vertreibenden Unternehmen bestehen große Qualitätsunterschiede bei den Zellkulturanwendungen [12]. Somit sind Forschungslabore häufig gezwungen, Probeseren anzufordern und diese in eigenen zeitaufwendigen und kostenintensiven Zellkulturversuchen zu testen, bevor ein Serum ausgewählt und in den eigentlichen Versuchen eingesetzt werden kann. Auch die serumvertreibenden Unternehmen müssen demzufolge alle Serumchargen bis zum Abschluss der Testversuche in ausreichenden Mengen bereithalten, was einen bedeutenden Mehraufwand darstellt.

Aus diesen Gründen wäre es eine entscheidende Vereinfachung, wenn ein geeigneter Biomarker zur Testung der Serumtauglichkeit gefunden werden könnte, der diese aufwendigen Vorversuche ersetzt. Ein potenzieller Biomarker könnte das Glycerophospholipid Lysophosphatidylcholin (LPC) sein. Seine stressbedingte Bildung, vorrangig aus Phosphatidylcholin (PC) [20, 21], im Rahmen von Entzündungen, oxidativem Stress oder ungünstigen Lagerungsbedingungen könnte als Indikator für qualitätsmindernde Prozesse im Serum dienen. Des Weiteren könnte das vermehrte LPC selbst einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum von Zellen haben und somit die Qualität von Seren widerspiegeln. Durch das spezieübergreifende Vorkommen von LPC ist seine Verwendung in einer Vielzahl von Forschungsbereichen denkbar, da je nach verwendeter Zelllinie unterschiedliche tierische Seren eingesetzt werden.

Massenspektrometrische Analyseverfahren erlauben die direkte Detektion und Charakterisierung von Lipiden, wie beispielsweise LPC und anderer Lipidoxidationsprodukte meist in nur einer einzigen Messung. Insbesondere Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) eignet sich aufgrund ihrer Robustheit gegenüber Verunreinigungen und der hohen Messgeschwindigkeit für die Detektion in biologischen Materialien [24]. Besonders diese hohe Toleranz gegenüber Verunreinigungen macht auch eine direkte MALDI-TOF MS-Detektion von Lipiden ohne aufwendige Probenpräparation im „intakten“ Serum möglich. Dies wurde als sogenannte „Sandwich“-Messmethode [54] beschrieben, bei der auf eine vorangehende Lipidextraktion verzichtet wird. Bei dieser MALDI-TOF MS Methode wird das Serum 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt, direkt auf die Messplatte aufgetragen und nach vollständiger Trocknung mit Matrix bedeckt. Nach erneuter Trocknung des Gemisches kann unverzüglich gemessen werden.

Zur weiteren Vereinfachung der Bestimmung der LPC-Konzentration mittels MALDI-TOF MS wird oft auf den Zusatz eines internen Standards verzichtet, um zusätzliche Fehlerquellen zu vermeiden. Hierbei wird LPC ausschließlich relativ zur PC-Konzentration ermittelt (PC/LPC-Verhältnis) [20]. Bei der beschriebenen „intakten“ MALDI-TOF MS-Methode wurde allerdings festgestellt, dass das PC/LPC-Verhältnis bei allen gemessenen Serumproben etwa zweimal größer ist als bei MALDI-TOF MS-Messungen von Lipidextrakten [54].

Diese unerwartete Diskrepanz der PC/LPC-Verhältnisse, die mit bzw. ohne vorangegangener Lipidextraktion gemessen wurden, wirft die Frage nach möglichen Ursachen und Einflussfaktoren auf. Durch die Identifizierung der Ursache ergibt sich zudem die Möglichkeit einer potenziellen Optimierung oder Erweiterung des Versuchsprotokolls. Da es sich bei Serum um eine komplexe, biologische Probe handelt, könnten Molekülinteraktionen, wie beispielsweise Protein-Lipid-Interaktionen Grund für die unterschiedlichen PC/LPC-Verhältnisse sein. Albumin als ubiquitär im Serum vorhandenes Protein kann eine Vielzahl von Molekülen binden, darunter auch bestimmte Lysophospholipide [37]. Somit ist es wichtig zu klären, inwieweit Albumin eine adäquate Detektion von Lysophosphatidylcholin verhindern beziehungsweise beeinflussen kann. Dafür wurde Pferdeserum als biologische Probe verwendet, da es auch für die weiteren Zellkultur-Experimente im zweiten Teil der Arbeit eingesetzt wurde. Albumin-Zusatz (von Pferd und Rind) führt zu einem Anstieg des detektierten PC/LPC-Verhältnisses im „intakten“ Serum. Umgekehrt sinkt das PC/LPC-Verhältnis beim enzymatischen Verdau des Albumins wieder, weil nun mehr LPC detektiert werden kann. Die weitergehenden Experimente zur Optimierung des enzymatischen Verdau wurden in Modell-Lipid-Suspensionen durchgeführt, um vorab fest definierte Versuchsparameter zu schaffen. Den gelösten Glycerophospholipiden in bekannter Konzentration wurde Albumin hinzugefügt, welches anschließend

enzymatisch verdaut wurde. Die Lipid- und Albuminkonzentrationen wurden so gewählt, dass sie den im Pferdeserum vorkommenden Verhältnissen entsprechen. Der Einfluss von Pepsin und Trypsin, die durch den enzymatischen Verdau des Albumins zu einer verbesserten LPC-Detektion führen, wurde unter verschiedenen Bedingungen (Konzentration, Inkubationszeit, Temperatur) verglichen. Abschließend wurde ein verbessertes Protokoll für die MALDI-TOF MS-Messungen des PC/LPC-Verhältnisses im „intakten“ Serum durch einen vorausgehenden Pepsin-Verdau vorgeschlagen. Dabei muss vor allem darauf geachtet werden, möglichst niedrige Temperaturen zu verwenden, um die temperaturbedingte Konversion von PC zu LPC zu minimieren. Bei einer dreistündigen Inkubation bei 20°C mit Pepsin im Verhältnis 1:60 (Enzym:Albumin, w/w) wurden die besten Ergebnisse erzielt. Das minimal erforderliche Serumvolumen dafür war 40 µl. Ein direkter Verdau auf der MALDI-Probenplatte, als weitere Versuchs- und Messvereinfachung, ist jedoch nicht möglich, da die Probe dabei austrocknen würde.

Sowohl das ursprüngliche als auch das erweiterte Messprotokoll fand im zweiten Teil der Arbeit Anwendung. Hier wurde die aufwendige konventionelle Qualitätstestung von Pferdeseren mittels Zellkultur mit der massenspektrometrischen Messung von LPC als Biomarker verglichen, um eine etwaige Vereinfachung der Serumselektion zu evaluieren. Die verwendeten FDCPmix-Zellen sind murine hämatopoetische Vorläuferzellen [18], die beispielsweise zur Untersuchung der hämatopoetischen Stammzellnische verwendet werden. Die Hypothese der Stammzellnische beschreibt die Überlegung, dass Stammzellen nur unter fein definierten Bedingungen überleben bzw. ihre spezifischen Eigenschaften entfalten oder aufrechterhalten können [9]. Ähnlich wie die hämatopoetischen Stammzellen selbst, stellen die FDCPmix-Zellen hohe Anforderungen an die Zellkulturbedingungen. Wird inadäquates Medium bzw. Serum verwendet, können Wachstum und Differenzierungspotential negativ beeinflusst werden, wodurch die Zellen nicht mehr für weitere Versuche geeignet sind [10]. Folglich ist die achtsame Auswahl des Pferdeserums essenziell. Acht Pferdeseren von verschiedenen Anbietern wurden zur Kultivierung nach derzeitigem Goldstandard eingesetzt. Als Evaluationsparameter für die Qualität des jeweiligen Serums wurden Zellwachstum, Differenzierungspotenzial nach Kultivierung und die Fähigkeit Zellkolonien im semifesten Medium (colony forming units - CFUs) zu bilden, verwendet. Diese Evaluationsparameter werden auch bei der routinemäßigen Testung neuer Seren verwendet und sind somit gut etabliert. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Seren. Insbesondere in der Fähigkeit CFUs auszubilden und im Wachstum waren die größten Unterschiede zu erkennen. Diese Zellkultur-Ergebnisse wurden mit MALDI-TOF MS-Messungen des PC/LPC-Verhältnisses vor und nach Pepsinverdau im „intakten“ Serum verglichen. Jedoch korrelierte das PC/LPC-Verhältnis nicht mit den Ergebnissen der Zellkulturexperimente. Dies ist mit den Unterschieden in der PC-Konzentration zwischen den verschiedenen Seren zu erklären. Enthält ein Serum generell viel PC, so kann trotz eines hohen PC/LPC-Verhältnisses die LPC-Konzentration im Serum zu hoch sein und die Zellkultivierung negativ beeinflussen. Deshalb wurde LPC mit Hilfe eines internen Standards (LPC 17:0) quantifiziert. Bei den für die Kultivierung ungeeigneten Seren lag, sowohl vor als auch nach Proteinverdau, eine hohe LPC-Konzentration vor. Umgekehrt konnten die Pferdeseren mit geringen LPC-Konzentrationen mit günstigen Zellkultur-Ergebnissen assoziiert werden. Dieser negative Einfluss einer hohen LPC-Konzentration konnte durch die artifizielle Zugabe von LPC zur Zellkultur weiter bestätigt werden. Hierfür wurden Zellkulturversuche analog zur initialen Testung durchgeführt. Dabei wurde jeweils die einfache und doppelte Menge LPC 16:0 und LPC 18:0, berechnet anhand der gemittelten Konzentrationen der acht Pferdeseren, zugegeben. Im Gegensatz zum nicht manipulierten Kontrollmedium zeigten die Proben mit artifiziell erhöhter LPC-Konzentration vor allem eine deutlich

geringere Fähigkeit CFUs auszubilden, welches ein Kernkriterium für die Verwendbarkeit des Serums ist. Insgesamt konnte folglich der negative Einfluss von LPC auf die Zellkultur gezeigt werden, was seine Eignung als Indikator für die Serumqualität bestätigt.

Zusätzlich zur LPC-Konzentration wurden weitere Mediator- und Signalmoleküle untersucht, die im Zuge des PC/LPC-Stoffwechsels entstehen können und unter anderem Entzündungsprozesse beeinflussen. Bei der Konversion von PC zu LPC durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) oder durch oxidativen Stress [20, 21] wird die Fettsäure (z.B. Arachidonsäure oder Linolsäure) an der *sn*-2-Position vom Glycerolrückgrat freigesetzt und steht zur weiteren Metabolisierung durch beispielsweise Cyclooxygenasen oder Lipoxygenasen zur Verfügung. Hierbei können Eikosanoide wie Thromboxane, Prostaglandine oder Leukotriene entstehen. Daher wurden die Pferdeseren weiterhin auf Eikosanoide mittels Flüssigchromatographie (LC)-MS/MS getestet. Hierbei zeigte sich, dass erhöhte Thromboxan B1-, Thromboxan B2- und 12-S-Hydroxy-Heptadecatriensäure-Konzentrationen ebenfalls auf eine ungünstige Serumqualität hinweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Seren mit hohen LPC-Konzentrationen und daher schlechten Zellkultur-Ergebnissen ebenfalls hohe Konzentrationen an Linolsäure aufweisen. Diese Fettsäure wird typischerweise bei der Konversion von im Pferdeserum vorkommenden PC zu LPC aus der *sn*-2-Position freigesetzt. Somit scheint neben der LPC-Konzentration auch das Eikosanoidprofil qualitative Aussagen über das jeweilige Pferdeserum zu erlauben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl niedrige absolute LPC- als auch niedrige entzündungsfördernde Eikosanoid-Level mit einer günstigen Serumqualität korrelieren. Jedoch benötigt die Bestimmung des Eikosanoidprofils im Gegensatz zur LPC-Bestimmung anspruchsvollere Messmethoden wie LC-MS/MS. Die LPC-Konzentration kann mittels MALDI-TOF MS zuverlässig ermittelt werden. Diese robuste, schnelle und preiswerte Methode ermöglicht die direkte Messung im „intakten“ Serum. Dabei ist die Zugabe eines internen Standards zur Bestimmung der absoluten LPC-Konzentration notwendig, da sich das PC/LPC-Verhältnis als ungeeignet für die Qualitätsevaluation von Zellkulturseren erwiesen hat.

Weil Glycerophospholipide speziesübergreifend vorkommen, ist eine Übertragung auf andere Zellkulturmodelle mit anderen tierischen Seren gut vorstellbar. Auch der klinische Einsatz von LPC als Qualitätsmarker bei beispielsweise humanen Blutspenden ist durchaus denkbar. Hierbei sollte jedoch jeweils auf die Interaktionen mit Proteinen, wie zum Beispiel Albumin, geachtet werden, welche gegebenenfalls einen enzymatischen Verdau oder eine Extraktion notwendig machen.

4 Literaturverzeichnis

1. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, et al. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2017. doi:10.1007/s11626-017-0177-7.
2. Gstraunthaler G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture. *Altex* 20. 2003. PubMed-ID:14671707.
3. Bjare U. Serum-free cell culture. *Pharmacology & Therapeutics* 1992. doi:10.1016/0163-7258(92)90056-6.
4. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J.* 2015;23:223–9. doi:10.1016/j.jsps.2013.11.002.
5. van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro* 2004. doi:10.1016/j.tiv.2003.08.009.
6. Fox LM, Cox DG, Lockridge JL, Wang X, Chen X, Scharf L, et al. Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol* 2009. doi:10.1371/journal.pbio.1000228.
7. Nagree MS, López-Vásquez L, Medin JA. Towards in vivo amplification: Overcoming hurdles in the use of hematopoietic stem cells in transplantation and gene therapy. *World J Stem Cells* 2015. doi:10.4252/wjsc.v7.i11.1233.
8. Cross M, Alt R, Niederwieser D. The case for a metabolic stem cell niche. *Cells Tissues Organs* (Print) 2008. doi:10.1159/000114206.
9. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nature Reviews Immunology* 2017. doi:10.1038/nri.2017.53.
10. Spooncer E, Heyworth CM, Dunn A, Dexter TM. Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* 1986. doi:10.1111/j.1432-0436.1986.tb00391.x.
11. Price PJ, Gergory EA. Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro* 1982. doi:10.1007/BF02810081.
12. Nims RW, Harbell JW. Best practices for the use and evaluation of animal serum as a component of cell culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017. PubMed-ID:28733930.
13. Molineux, G and Testa, NG (eds). *Haemopoiesis: A practical approach*: IRL Press; 1993. ISBN:0199633665.
14. Pellerin L. How Astrocytes Feed Hungry Neurons. *Molecular Neurobiology* 2005. doi:10.1385/MN:32:1:059.
15. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* 2003. doi:10.1093/humupd/dmg009.
16. Boussouar F, Benahmed M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2004. doi:10.1016/j.tem.2004.07.003.
17. Lee D, Kim DW, Cho J-Y. Role of growth factors in hematopoietic stem cell niche. *Cell Biol Toxicol* 2020. doi:10.1007/s10565-019-09510-7.
18. Heyworth CM, Dexter TM, Kan O, Whetton AD. The Role of Hemopoietic Growth Factors in Self-Renewal and Differentiation of IL-3-Dependent Multipotential Stem Cells. *GGRF* 1990. doi:10.3109/08977199009071506.
19. Fuchs B, Schnapka-Hille L, Schiller J, Cross MA. Oxygen and cytokine-dependent changes in choline phospholipid saturation in hematopoietic progenitor cells detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Chem Phys Lipids* 2011. doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.06.003.

20. Fuchs B, Schiller J, Wagner U, Hantzschel H, Arnold K. The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by ³¹P NMR and MALDI-TOF MS. *Clin Biochem* 2005. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.06.006.
21. Schober C, Schiller J, Pinker F, Hengstler JG, Fuchs B. Lysophosphatidylethanolamine is - in contrast to - choline - generated under in vivo conditions exclusively by phospholipase A2 but not by hypochlorous acid. *Bioorg Chem* 2009. doi:10.1016/j.bioorg.2009.09.002.
22. Park CH, Kim MR, Han J-M, Jeong T-S, Sok D-E. Lysophosphatidylcholine exhibits selective cytotoxicity, accompanied by ROS formation, in RAW 264.7 macrophages. *Lipids* 2009. doi:10.1007/s11745-009-3286-6.
23. Furse S, Kroon AIPM de. Phosphatidylcholine's functions beyond that of a membrane brick. *Mol Membr Biol* 2015. doi:10.3109/09687688.2015.1066894.
24. Fuchs B, Suss R, Schiller J. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res* 2010. doi:10.1016/j.plipres.2010.07.001.
25. Fuchs B, Bondzio A, Wagner U, Schiller J. Phospholipid compositions of sera and synovial fluids from dog, human and horse: a comparison by ³¹P-NMR and MALDI-TOF MS. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2009. doi:10.1111/j.1439-0396.2008.00822.x.
26. Cevc, G (ed). *Phospholipids handbook*: Marcel Dekker; 1993. ISBN:978-0-8247-9050-9.
27. Anna Drzazga, Agata Sowinska, Maria Koziolkiewicz. Lysophosphatidylcholine And Lysophosphatidylinositol - Novel Promising Signaling Molecules And Their Possibletherapeutic Activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2014. PubMed-ID:25745761.
28. Bauer A, Schumann A, Gilbert M, Wilhelm C, Hengstler JG, Schiller J, Fuchs B. Evaluation of carbon tetrachloride-induced stress on rat hepatocytes by ³¹P NMR and MALDI-TOF mass spectrometry: lysophosphatidylcholine generation from unsaturated phosphatidylcholines. *Chem Phys Lipids* 2009. doi:10.1016/j.chemphyslip.2009.02.006.
29. Del Boccio P, Pieragostino D, Di Ioia M, Petrucci F, Lugaesi A, Luca G de, et al. Lipidomic investigations for the characterization of circulating serum lipids in multiple sclerosis. *J Proteomics* 2011. doi:10.1016/j.jprot.2011.06.023.
30. Taylor LA, Arends J, Hodina AK, Unger C, Massing U. Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids Health Dis* 2007. doi:10.1186/1476-511X-6-17.
31. Fuchs B, Schiller J, Cross MA. Apoptosis-associated changes in the glycerophospholipid composition of hematopoietic progenitor cells monitored by ³¹P NMR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *Chem Phys Lipids* 2007. doi:10.1016/j.chemphyslip.2007.08.005.
32. Fuchs B, Muller K, Paasch U, Schiller J. Lysophospholipids: Potential Markers of Diseases and Infertility? *MRMC* 2012. doi:10.2174/138955712798868931.
33. Silliman CC, Elzi DJ, Ambruso DR, Musters RJ, Hamiel C, Harbeck RJ, et al. Lysophosphatidylcholines prime the NADPH oxidase and stimulate multiple neutrophil functions through changes in cytosolic calcium. *J Leukoc Biol* 2003. doi:10.1189/jlb.0402179.
34. Wang Y, Wang Y, Li G-R. TRPC1/TRPC3 channels mediate lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in cultured human coronary artery smooth muscles cells. *Oncotarget* 2016. doi:10.18632/oncotarget.10853.
35. Kim Y-L, Im Y-J, Ha N-C, Im D-S. Albumin inhibits cytotoxic activity of lysophosphatidylcholine by direct binding. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007. doi:10.1016/j.prostaglandins.2006.10.006.

36. Takeda A, Palfree RG, Forsdyke. Role of serum in inhibition of cultured lymphocytes by lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1982. doi:10.1016/0005-2760(82)90194-1.
37. Guo S, Shi X, Yang F, Chen L, Meehan EJ, Bian C, Huang M. Structural basis of transport of lysophospholipids by human serum albumin. *Biochem J* 2009. doi:10.1042/BJ20090913.
38. Ojala PJ, Hermansson M, Tolvanen M, Polvinen K, Hirvonen T, Impola U, et al. Identification of alpha-1 acid glycoprotein as a lysophospholipid binding protein: a complementary role to albumin in the scavenging of lysophosphatidylcholine. *Biochemistry* 2006. doi:10.1021/bi061657l.
39. Schrijvers DM, Meyer GRY de, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* 2007. doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.005.
40. Goncalves I, Edsfeldt A, Ko NY, Grufman H, Berg K, Bjorkbacka H, et al. Evidence supporting a key role of Lp-PLA2-generated lysophosphatidylcholine in human atherosclerotic plaque inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012. doi:10.1161/ATVBAHA.112.249854.
41. Yamamoto M, Tanaka Y, Sugano M. Serum and liver lipid composition and lecithin: Cholesterol acyltransferase in horses, *Equus caballus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 1979. doi:10.1016/0305-0491(79)90309-2.
42. Kortz L, Dorow J, Ceglarek U. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of eicosanoids and related lipids in human biological matrices: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014. doi:10.1016/j.jchromb.2014.01.046.
43. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145.
44. Dorow J, Becker S, Kortz L, Thiery J, Hauschildt S, Ceglarek U. Preanalytical Investigation of Polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Biopreserv Biobank* 2016. doi:10.1089/bio.2015.0005.
45. Nič, M, Jirát, J, Košata, B, Jenkins, A and McNaught, A (eds). *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*: IUPAC; 2009. ISBN:0-9678550-9-8.
46. Schröder E. *Massenspektrometrie: Begriffe und Definitionen*: Springer; 1991. ISBN:354053329X.
47. Brügger B. Lipidomics: analysis of the lipid composition of cells and subcellular organelles by electrospray ionization mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2014. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035324.
48. Pulfer M, Murphy RC. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev* 2003. doi:10.1002/mas.10061.
49. Lam SM, Shui G. Lipidomics as a principal tool for advancing biomedical research. *J Genet Genomics* 2013. doi:10.1016/j.jgg.2013.06.007.
50. Hsu F-F, Turk J. Differentiation of 1-O-alk-1'-enyl-2-acyl and 1-O-alkyl-2-acyl glycerophospholipids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 2007. doi:10.1016/j.jasms.2007.08.019.
51. Kortz L, Dorow J, Becker S, Thiery J, Ceglarek U. Fast liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry analysis of polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013. doi:10.1016/j.jchromb.2013.03.012.
52. Fuchs B, Schiller J. *Mass Spectrometry of Biological Molecules*. In: Meyers (Hg.) 2016 – *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. doi:10.1002/9780470027318.a0209.pub3.

53. Popkova Y, Schiller J. Addition of CsCl reduces ion suppression effects in the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra of triacylglycerol/phosphatidylcholine mixtures and adipose tissue extracts. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2017. doi:10.1002/rcm.7806.
54. Angelini R, Vortmeier G, Corcelli A, Fuchs B. A fast method for the determination of the PC/LPC ratio in intact serum by MALDI-TOF MS: an easy-to-follow lipid biomarker of inflammation. *Chem Phys Lipids* 2014. doi:10.1016/j.chemphyslip.2014.07.001.
55. Sun G, Yang K, Zhao Z, Guan S, Han X, Gross RW. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of cellular glycerophospholipids enabled by multiplexed solvent dependent analyte-matrix interactions. *Anal Chem* 2008. doi:10.1021/ac801200w.
56. Petković M, Müller J, Müller M, Schiller J, Arnold K, Arnhold J. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for monitoring the digestion of phosphatidylcholine by pancreatic phospholipase A2. *Analytical Biochemistry* 2002. doi:10.1016/S0003-2697(02)00236-1.
57. Benard S, Arnhold J, Lehnert M, Schiller J, Arnold K. Experiments towards quantification of saturated and polyunsaturated diacylglycerols by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry. *Chem Phys Lipids* 1999. doi:10.1016/S0009-3084(99)00045-6.
58. Cole, RB (ed). *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*. 2nd ed.: John Wiley & Sons; 2011. ISBN:1118211553.
59. Brancia FL. Recent developments in ion-trap mass spectrometry and related technologies. *Expert Rev Proteomics* 2006. doi:10.1586/14789450.3.1.143.
60. Hegde NR. Cell culture-based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future. *Hum Vaccin Immunother* 2015. doi:10.1080/21645515.2015.1016666.

5 Nachweis über Anteile der Co-Autoren

Titel: Determination of the Phosphatidylcholine/Lysophosphatidylcholine Ratio in Intact Serum by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Prior Enzymatic Albumin Digestion

Journal: Lipids

Autoren: Timo Ditz, Beate Fuchs

Timo Ditz (Erstautor):

- Probenpräparation
- MALDI-TOF Massenspektrometrie
- Analyse und Verarbeitung der Daten
- Erstellen der Abbildungen
- Projektidee
- Verfassen der Publikation

Beate Fuchs (Autor 2):

- Projektidee
- Verfassen der Publikation

Timo Ditz

Beate Fuchs

Titel: Phospholipase A2 products predict the hematopoietic support capacity of horse serum
Journal: Differentiation
Autoren: Timo Ditz, Lydia Schnapka-Hille, Nicole Noack, Juliane Dorow, Uta Ceglarek, Dietger Niederwieser, Jürgen Schiller, Beate Fuchs, Michael Cross

Timo Ditz (Erstautor):

- Zellkultur
- Probenpräparation
- MALDI-TOF Massenspektrometrie
- Analyse und Verarbeitung der Daten
- Erstellen der Abbildungen
- Verfassen der Publikation

Lydia Schnapka-Hille (Autor 2):

- Initialversuch: NMR-Messung und Zellkultur von 14 Seren

Nicole Noack (Autor 3):

- Zellkultur

Juliane Dorow (Autor 4):

- LC-MS/MS-Messung
- Verfassen der Publikation

Uta Ceglarek (Autor 5):

- Projektidee

Dietger Niederwieser (Autor 6):

- Projektidee

Jürgen Schiller (Autor 7):

- Unterstützung bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie

Beate Fuchs (Autor 8):

- Projektidee
- Verfassen der Publikation

Michael Cross (Autor 9):

- Projektidee
- Verfassen der Publikation

Timo Ditz

Lydia Schnapka-Hille

Nicole Noack

Juliane Dorow

Uta Ceglarek

24/7/19
Dietger Niederwieser

Jürgen Schiller

Beate Fuchs

Michael Cross

6 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

20.01.2020

.....

Datum

.....

Unterschrift

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Timo Ditz
Geburtsdatum: 10.12.1995
Geburtsort: Bad Nauheim, Deutschland
Eltern: Uwe Ditz, Dipl.-Ing.
Rita Ditz, Dipl.-Ing.
Geschwister: Achim Ditz

Schulischer Werdegang

2002 – 2006: Grundschule Schwalheim (Wettertalschule)
2006 – 2014: Ernst-Ludwig-Schule, Bad Nauheim

Studium

Seit 2014: Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig
2015: Teilnahme an der Autumn School für Medizinstudierende der Deutschen Krebsgesellschaft, Berlin
2016: Abschluss des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Praktika

2013: Praktikum Gesundheitszentrum Wetterau
2014 – 2016: 90-tägiges Krankenpflegepraktikum am Universitätsklinikum Leipzig
2018 – 2019: 30-tägige Famulatur im Fachbereich Strahlenmedizin
30-tägige Famulatur im Fachbereich Allgemeinmedizin
30-tägige Famulatur im Fachbereich Hämatologie/Onkologie
15-tägige Famulatur im Fachbereich Interdisziplinäre Notfallaufnahme

Promotion

Seit 2016: Promotion am Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig
2016 – 2017: Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät Leipzig
2017: Teilnahme am 6th European Lipidomic Meeting, Toulouse

8 Publikationen

- 2017 Poster - 6th ELM (European Lipidomic Meeting), Toulouse, France
Optimized detection of the PC/LPC ratio in intact blood serum used for cell cultivation
by enzymatic digestion of albumin
- 2018 Ditz T, Fuchs B.
Determination of the Phosphatidylcholine/Lysophosphatidylcholine Ratio in Intact
Serum by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Prior
Enzymatic Albumin Digestion
Lipids. 2018; doi:10.1002/lipd.12106
- 2019 Ditz T, Schnapka-Hille L, Noack N, Dorow J, Ceglarek U, Niederwieser D, et al.
Phospholipase A2 products predict the hematopoietic support capacity of horse serum
Differentiation. 2019; doi:10.1016/j.diff.2018.12.002

9 Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre nicht zustande gekommen ohne die zahlreiche Hilfe von einer Vielzahl von Personen!

Als erstes möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. habil. Beate Fuchs bedanken. Nicht nur die Auswahl des spannenden Themas und die umfassende Betreuung, sondern auch das angenehme Arbeitsverhältnis trugen sehr zum Erstellen dieser Doktorarbeit bei.

Herrn Michael Cross, PhD möchte ich gleichermaßen für die exzellente Co-Betreuung seitens des hämatologischen Forschungslabors danken. Dank ihm und Nicole Noack war es mir möglich einige Einblicke in die Welt der Zellkulturen zu gewinnen.

Des Weiteren möchte ich Herrn PD Dr. Jürgen Schiller für die „Adoption“ in seine Arbeitsgruppe danken. Herr Dr. Schiller half mir nicht nur bei unzähligen fachlichen Fragen und Experimenten, sondern baute mich immer wieder mit den ausgefallensten Zitaten auf.

Ebenfalls möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für das wunderbare Arbeitsklima und die unzähligen Tipps danken. Besonderer Dank gilt meinen Zimmernachbarinnen Katharina und Ariane für die fachlichen und weniger fachlichen Gespräche, sowie Jenny, Yulia und Anja für die Unterstützung und Einarbeitung in die verschiedensten Versuche.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung und Motivation danken. Dank euch war es mir überhaupt möglich eine Doktorarbeit zu beginnen.

Meiner Freundin Lucie danke ich für die unermüdliche Hilfe, den fachlichen Austausch und die aufbauenden Worte einer Leidensgenossin.