

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Untersuchungen einer intrazellulären Migrationsdynamik verschiedener Cardiolipine im  
Zusammenhang mit Pathomechanismen in Folge von Ischämie und Reperfusion beim  
Leberinfarkt**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. medic.

(doctor rerum medicarum)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Jan Christian Martens

aus Bremen

Magdeburg, 2016

Bibliographische Beschreibung:

Martens, Jan Christian

**Untersuchungen einer intrazellulären Migrationsdynamik verschiedener Cardiolipine im Zusammenhang mit Pathomechanismen in Folge von Ischämie und Reperfusion beim Leberinfarkt**  
- 2016. - 62 Bl., 22 Abb., 10 Tab., 13 Anl.

Dissertation, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Kurzreferat:

Cardiolipine (CL) sind Bestandteile der inneren Mitochondrienmembran. Sie sind vulnerabel gegenüber oxidativem Stress, in dessen Folge es zu Beeinträchtigungen mitochondrialer Funktionen kommt. Unklar ist, ob CL auch außerhalb der Mitochondrien eine Bedeutung haben. In dieser Arbeit wurde die Situation des ischämischen Leberinfarktes im Hinblick auf Mechanismen der Cardiolipine untersucht. Dazu wirkten Ischämie und Reperfusion auf intakte Ratten-Lebern ein. Daraufhin erfolgte ein Aufschluss des Gewebes durch Homogenisierung und Fraktionierung zellulärer Bestandteile des Gewebes entsprechend der Massendichte. Untersucht wurden Gehalt, Zusammensetzung und der oxidierte Anteil von CL mittels HPLC-MS/MS. Zur Lokalisation der Mitochondrien in den Fraktionen wurde die Aktivität von Citratsynthase gemessen. In einer zweiten Studie wurde die Wirkung von Hypoxie und Reoxygenierung auf isolierte Rattenleber-Mitochondrien unter Eskalation des Schädigungsreizes untersucht. Das Resultat des ersten Experimentes ist ein Verlust des Gesamt-Cardiolipins durch Ischämie und Reperfusion. Dieser wurde im Wesentlichen bei linol- und ölsäurehaltigen CL-Spezies beobachtet. Die Existenz unterschiedlicher CL in verschiedenen Fraktionen lässt vermuten, dass Cardiolipine auch außerhalb der Mitochondrien auftreten. Der Anteil oxidiertes Cardiolipine erhöhte sich selektiv in manchen Fraktionen. Außerdem kam es zu einer Dichteverchiebung des Maximums der Citratsynthase-Aktivität. Die zweite Studie lässt eine Beteiligung oxidiertes Cardiolipine an der Schädigung isolierter Mitochondrien durch hypoxischen Stress erkennen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass für die CL-Synthese intakte Mitochondrien notwendig sind. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse legt einen therapeutischen Nutzen einer Fettsäure-Substitution zur Gewebeprotektion beim ischämischen Leberinfarkt nahe.

**Schlüsselwörter**

Cardiolipinlokalisierung

In-situ-Perfusion der Leber

Ischämie / Reperfusion

Zellfraktionierung

Mitochondrienpräparation

Hypoxie / Reoxygenierung

Oxydierte Cardiolipine

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Tandem-Massenspektrometrie

---

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>2</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
2.1	Medizinischer Hintergrund und Motivation der Thematik	1
2.2	Cardiolipine	2
2.2.1	Bekannte Funktionen der Cardiolipine	2
2.2.2	Intrazelluläre Lokalisation von Cardiolipinen	3
2.2.3	CL-Synthese und Remodelling	5
2.2.4	Peroxidation von Fettsäuren	6
2.3	Leber-Mitochondrien	7
2.3.1	Oxidative Phosphorylierung	7
2.3.2	Produktion von Reactive Oxygen Species durch Mitochondrien	9
2.4	Erkrankungen im Zusammenhang mit Mitochondrien und Cardiolipinen	10
2.4.1	Barth-Syndrom	10
2.4.2	Nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD)	11
2.4.3	Maligne Neoplasien	11
2.4.4	Kardiale Schäden durch Ischämie und Reperfusion	12
2.5	Zielsetzung und Hypothesen	12
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1	Versuchstiere	14
3.2	Experimente mit Ischämie- und Reperfusion in-situ	14
3.2.1	Aufbau der Perfusionsanlage	15
3.2.2	Durchführung der Leberperfusionsexperimente	17
3.2.3	Temperaturregulation	17
3.2.4	Zellfraktionierung	19
3.2.5	Mikroskopische Untersuchungen	22
3.2.6	Klinisch-chemische Untersuchungen	23
3.3	Hypoxie-/Reoxygenierungs-Experimente mit isolierten Mitochondrien	23
3.3.1	Präparation von Mitochondrien aus Lebergewebe	23
3.3.2	Messung der Atmungsaktivität von Mitochondrien	24
3.3.3	Durchführung und Datenerhebung	24
3.4	Bestimmung des Proteingehaltes per Bradford-Methode	29
3.5	Abschätzung der Mitochondrien-Menge durch Messung der Citratsynthase-Aktivität	30
3.6	Extraktion von Cardiolipinen	30

---

3.7	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	31
3.8	Massenspektrometrie .....	33
3.8.1	Elektrospray-Ionisation .....	34
3.8.2	Analysatoren.....	35
3.9	Statistische Analysen.....	38
3.10	Übersicht über verwendete Geräte und Materialien.....	38
3.10.1	Verbrauchsmaterialien .....	38
3.10.2	Chemikalien .....	39
3.10.3	Geräte.....	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
4.1	Experimente mit Ischämie- und Reperfusion in-situ.....	42
4.1.1	Ergebnisse der klinisch-chemischen Untersuchungen.....	42
4.1.2	Histologische Untersuchungen.....	42
4.1.3	Verteilung von Citrat-Synthase-Aktivität und Cardiolipin-Gehalt in zellulären Fraktionen .....	43
4.1.4	Verteilung von oxidiertem Cardiolipin .....	46
4.1.5	Effekte von Ischämie und Reperfusion auf die Verteilung molekularer CL Spezies.....	47
4.2	Hypoxie-/Reoxygenierungs-Experimente mit isolierten Mitochondrien .....	49
4.2.1	Effekte von Hypoxie / Reoxygenierung und $Ca^{2+}$ auf die mitochondriale Atmung.....	49
4.2.2	Effekte von Hypoxie / Reoxygenierung und $Ca^{2+}$ auf Cardiolipine .....	51
4.2.3	Effekte von H/R und $Ca^{2+}$ auf die Fettsäure-Zusammensetzung von CL .....	53
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>I</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>8</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>IX</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>X</b>
<b>11</b>	<b>Anlagen .....</b>	<b>XII</b>
11.1	Zusammensetzungen verwendeter Lösungen .....	XII
11.1.1	Isolationsmedium Leber .....	XII
11.1.2	Inkubationsmedium Leber .....	XII
11.1.3	Krebs-Ringer-Lösung.....	XII
11.1.4	Perfusionslösung .....	XIII

---

11.1.5	HS-Puffer .....	XIII
11.2	Mit der Dissertation assoziierte Publikationen .....	XIV
11.3	Beteiligte Einrichtungen der Medizinischen Fakultät der OvG-Universität Magdeburg.....	XIV
11.4	Verwendete Software .....	XIV
11.5	Kontakt .....	XIV

## 1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase.
BSA	Bovine serum albumin
c	Stoffmengen-Konzentration (mmol/l)
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Kation
CL	Cardiolipin
(C18:2)	Carbonsäure, die aus 18 Kohlenstoff-Atomen besteht und zwei konjugierte Doppelbindungen aufweist (Linolsäure)
CoA	Coenzym A
CS	Citratsynthase
CaEGTA	Calciumsalz der Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (ethylene glycol tetraacetic acid)
Da	Dalton. Biochemisches Äquivalent zur atomaren Masseneinheit. 1 Da = 1,66 * 10 <sup>-27</sup> kg
DTNB	5,5-Dithio-bis-2-Nitrobenzoe-Säure
eV	Elektronenvolt ( $\approx 1,602 \cdot 10^{-19} \frac{\text{kg} \cdot \text{m}^2}{\text{s}^2}$ )
g	Erd-Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
FS	Fettsäure
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HESI	Heated Electrospray Ionization
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
H/R	Hypoxie / Reoxygenierung
I/R	Ischämie / Reperfusion

---

LDH	Laktatdehydrogenase
KCL	Kaliumchlorid
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
m/q	Masse-zu-Ladung-Verhältnis (Kilogramm / Coulomb)
M	Konzentrationsangabe (1 M = 1 mol / Liter)
$\text{MgSO}_4$	Magnesiumsulfat
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NAFLD	Non-alcoholic-fatty-liver-disease
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Natriumdihydrogenphosphat
$\text{NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NRP	Nicht-Radikal-Produkt
PBS	Phosphate buffered saline
PTFE	Polytetrafluorethylen
$\rho$	Massendichte ( $\text{g} / \text{cm}^3$ )
RCR	Respiratory control ratio
ROS	Reactive oxygen species
SEM	Standard error of the mean
Taz1	Tafazzin
U	Enzymaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )
v/v	Mischungsverhältnis Volumen zu Volumen
z	Ladungszahl

## 2 Einführung

### 2.1 Medizinischer Hintergrund und Motivation der Thematik

Der ischämische Leberinfarkt (K76.3 im ICD-10-System) stellt eine seltene, aber dennoch mit schweren Komplikationen verbundene Situation dar. Die Erkrankung kann in Folge von Links-Herzversagen eintreten, das zu einer arteriellen Minderperfusion der Leber führt (HENRION et al., 1994). Ebenso kann eine Thrombose der Arteria hepatica propria einen ischämischen Infarkt auslösen. Trotz der dualen Blutversorgung über Arterie und Pfortader (Vena portae hepatis) führt auch eine alleinige arterielle Minderperfusion zum ischämischen Infarkt (CARROLL, 1963).

Bei bestimmten chirurgischen Eingriffen muss die Blutzufuhr zur Leber iatrogen unterbrochen werden (Pringle-Manöver), wodurch es ebenfalls zur Ischämie kommt (CHOUKÈR et al., 2004). Die Lebertransplantation stellt schließlich einen Sonderfall dar, weil das Spenderorgan nach der Entnahme zwar nicht perfundiert wird, jedoch zur Protektion eine hypotherme Ischämie erfährt und in speziellem Medium aufbewahrt wird (GUIBERT et al., 2011).

Ischämie führt zu Nährstoffmangel und reduzierter Sauerstoffversorgung des Gewebes (Hypoxie). Dadurch kommt es zu einer Kaskade pathobiochemischer Prozesse, an der reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind. Eine Schlüsselrolle im hypoxischen Geschehen kommt dabei den Mitochondrien zu, weil ROS in ihnen produziert werden und insbesondere hier zu Schäden führen (OTT et al., 2007). Die Funktion der Mitochondrien ist essentiell an das Vorhandensein und die Intaktheit einer speziellen Gruppe von Phospholipiden gebunden, den **Cardiolipinen**. Diese stehen im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit.

Es ist bekannt, dass oxidativer Stress zu Schäden an den Cardiolipinen führt, wodurch es zu mitochondrialen Dysfunktionen bis hin zum Zelltod kommen kann (PETROSILLO et al., 2003). Das Ziel dieser Arbeit ist es, bisher unbekannte Pathomechanismen aufzudecken, an denen Cardiolipine beteiligt sind. Dabei spielt die intrazelluläre Verteilung von Cardiolipinen eine

besondere Rolle. Zugleich sollen aus den Erkenntnissen mögliche Wege zur Therapie und Prävention hypoxischer Schäden auf der Ebene der Cardiolipine in Betracht gezogen werden.

## 2.2 Cardiolipine

Cardiolipine sind saure, zweifach negativ geladene Moleküle, die aus zwei mit Glycerin veresterten Phosphatid-Säure-Resten bestehen (siehe Abbildung 1). Damit enthalten Cardiolipine 4 Carboxyl-Gruppen, an die je ein aliphatischer Monocarbonsäure-Rest (R) gebunden ist (LECOQ, BALLOU, 1964).

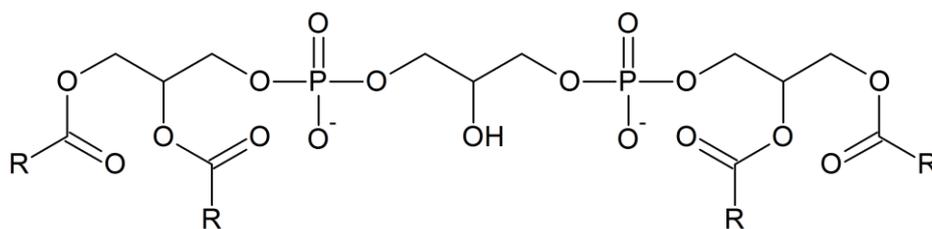


Abbildung 1: Struktur der Cardiolipine. R bezeichnen Fettsäurereste.

### 2.2.1 Bekannte Funktionen der Cardiolipine

Bisher sind mehrere Funktionen der Cardiolipine bekannt. Sie sind integraler Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran bei Eukaryonten. Dort wirken sie Membran-stabilisierend und tragen zur Entstehung und zum Erhalt der Mitochondrien-Morphologie bei (LUEVANO-MARTINEZ et al., 2015). Fusionen und Teilungen von Mitochondrien sind physiologisch und dienen unter anderem der Reparatur beschädigter Mitochondrien (YOULE, VAN DER BLIEK, ALEXANDER M, 2012). Es wurde beschrieben, dass diese Prozesse durch ein Defizit von Cardiolipinen gehemmt werden (GASPARD, McMASTER, 2015).

Von besonderer Bedeutung ist, dass Cardiolipine in den Mitochondrien an die Komplexe der Atmungskette, sowie an die ATP/ADP-Translokase gebunden sind (PARADIES et al., 2014b) (siehe hierzu Abschnitt 2.3.1).

Cardiolipine nehmen demnach eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Bioenergetik ein. Neben Verlusten führen auch Veränderungen in der Zusammensetzung der spezifischen Fettsäurereste sowie die Peroxidation zu schwerwiegenden Dysfunktionen der Mitochondrien (PARADIES et al., 2009).

Die meisten Gewebe haben eine spezifische Fettsäure-Zusammensetzung ihrer Cardiolipine (SHEN et al., 2015). Die am häufigsten anzutreffenden physiologischen CL-Spezies enthalten ein- oder zweifach-ungesättigte Carbonsäure-Reste mit 16 oder 18 Kohlenstoffatomen (SCHLAME et al., 1993). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ist dies von Bedeutung, weil Bezug zur Spezies (C18:2)<sub>4</sub> (Tetra-Linoleoyl-Cardiolipin) genommen wird, die aus vier Linolsäure-Resten besteht und Hauptbestandteil der Leber-Cardiolipine ist (HOUTKOOPER et al., 2009).

Neben diesen Zusammenhängen existiert eine direkte Verbindung zwischen Cardiolipinen und Apoptose aufgrund der Wechselwirkungen mit Cytochrom c. Es handelt sich dabei um einen essentiellen Elektronentransporter der Atmungskette. Gleichzeitig löst Cytochrom c bei Ausschüttung in das Cytosol rezeptorvermittelt die Apoptose der Zelle aus. Cardiolipine sorgen durch Wechselwirkung zwischen Membran-Lipiden und Cytochrom c für dessen Verankerung an der inneren Mitochondrienmembran (RYTOMAA, KINNUNEN, 1995). Löst sich diese Verbindung durch Peroxidation (PARADIES et al., 2001) oder Verlust (KAGAN et al., 2009) von CL führt dies zur Induktion der Apoptose.

### **2.2.2 Intrazelluläre Lokalisation von Cardiolipinen**

Bisher galten Cardiolipine als ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran auftretende Phospholipide (LEHNINGER et al., 2005). Diese Annahme liegt zunächst nahe, weil sich neben der Synthese (nächster Abschnitt) auch die genannten Funktionen lediglich auf dieses Zellkompartiment zu beschränken scheinen.

Im Zusammenhang mit oxidativem Stress und Apoptose konnte an isolierten Hirn-Mitochondrien beobachtet werden, dass bei der Freisetzung von Cytochrom c auch die Cardiolipine die innere Mitochondrienmembran verlassen (MORIN et al., 2003). Dies legt die

Frage nahe, ob sie auch in anderen Zellkompartimenten nach der Einwirkung von oxidativem Stress anzutreffen sind und ob sich ihre Zusammensetzung bzw. ihr Oxidationsstatus verändern, sobald sie außerhalb der Mitochondrien auftreten.

Struchkov et al. beschrieben hierzu eine Beobachtung, wonach DNA-gebundene Phospholipide, insbesondere Cardiolipine, im Zellkern nachgewiesen werden können. Damit besteht die Möglichkeit, dass Cardiolipine eine inhärente Signalfunktion besitzen (STRUCHKOV et al., 2002). Grundsätzlich liegt zumindest die Existenz von Transportprozessen der CL nahe. Darüber hinaus wurde durch Immunfluoreszenz mit Cardiolipin-Antikörpern nachgewiesen, dass Cardiolipine bei künstlich induzierter Apoptose in den Membranen anderer Zell-Kompartimente anzutreffen sind (SORICE et al., 2004). Chen et al. fanden schließlich in Hefezellen Veränderungen der intrazellulären Vakuolen, die durch fehlendes Cardiolipin hervorgerufen wurden. Damit konnte ein Signalweg vom Mitochondrium zur Vakuole aufgedeckt werden (CHEN et al., 2008).

Ebenso ist auch bekannt, dass die Morphologie von Mitochondrien einer hohen Dynamik unterliegt: Es kommt zu Spaltungs- und Fusionsprozessen (LACKNER, 2014), in die letztlich auch Cardiolipine eingebunden sein könnten.

In dieser Arbeit wird nun eine systematische Untersuchung der intrazellulären Cardiolipin-Verteilung in Kompartimenten mit unterschiedlicher Massendichte durchgeführt. Es soll aufgeklärt werden, ob verschiedene Cardiolipin-Spezies bestimmten Dichte-Milieus zuzuordnen sind.

Vor dem Hintergrund des ischämischen Geschehens beim Leberinfarkt werden dazu Rattenlebern als Modell verwendet. Im Rahmen eines Experimentes wirken Ischämie und Reperfusion auf das intakte Organ ein. Beobachtet werden soll, ob es im Vergleich zu Kontrolluntersuchungen zu einer Migration verschiedener Cardiolipine kommt (siehe Zielsetzung und Hypothesen).

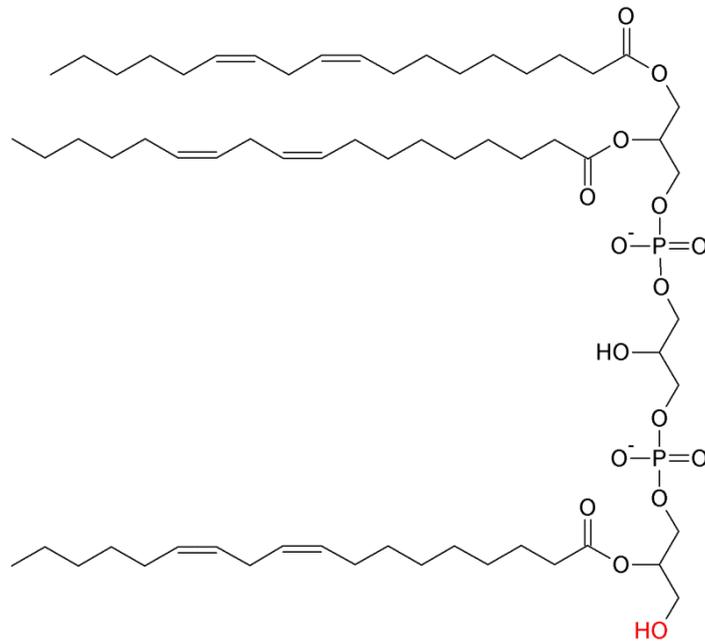
### 2.2.3 CL-Synthese und Remodelling

Bei Eukaryonten werden Cardiolipine im Gegensatz zu anderen Membranlipiden in der inneren Mitochondrienmembran synthetisiert. Dazu ist als Vorstufe Phosphatidsäure notwendig. Diese entsteht durch enzymatische Acylierung des Membranbausteins Glycerol-3-Phosphat in der äußeren Mitochondrienmembran (REN et al., 2014). Im ersten Schritt wird durch Glycerol-Phosphat-Acyltransferase Lyso-Phosphatidsäure generiert (GIMENO, CAO, 2008). Schließlich entsteht Phosphatidsäure durch Lysophospholipid-Acyltransferase (PRASAD et al., 2011). Diese muss anschließend von der äußeren in die innere Mitochondrienmembran transportiert werden. Der Mechanismus konnte bisher nur in Hefezellen nachgewiesen werden (CONNERTH et al., 2012) und ist damit für die Mitochondrien höherer Zellen bislang ungeklärt.

Es folgen vier weitere enzymatische Schritte in der inneren Mitochondrienmembran. In diesen wird Phosphatidsäure über Intermediärprodukte zu Cardiolipin umgewandelt.

Das entstandene CL ist durch einen hohen Anteil an gesättigten Fettsäureresten gekennzeichnet. Es kommt zu einem Austausch der Fettsäurereste in einem Reifeprozess, der als Remodelling bezeichnet wird. Katalysiert wird das Remodelling unter anderem durch Tafazzin (Taz1), das ebenfalls Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran ist. Es kommt zur Abspaltung von Fettsäureresten sowie zur Übertragung anderer Fettsäuren auf Cardiolipine. Typisch ist dabei die Entstehung des Intermediärproduktes Monolyso-Cardiolipin (siehe Abbildung 2), das nur über drei Fettsäurereste verfügt und an das im Remodelling-Prozess andere Fettsäurereste gebunden werden. Sehr häufig ist dies Linolsäure (C18:2), die aus Phosphatidylcholin stammt. Auch der Prozess der Reacylierung erfolgt über Tafazzin. Darüber hinaus existieren noch die Enzyme Monolyso-Cardiolipin-Acyltransferase und Acyl-CoA-Lysocardiolipin-Acyltransferase, die ebenfalls das Monolyso-Cardiolipin reacylieren können (SCHLAME, 2013).

In der Lipidanalytik der Experimente wird Monolyso-CL untersucht, um Einblicke in die Funktionalität des Remodelling-Prozesses im Zusammenhang mit hypoxischem Stress in der Leber zu gewinnen.

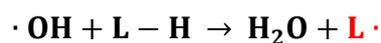


**Abbildung 2** Monolyso-Cardiolipin, C(18:2)<sub>3</sub>. Es besteht nur aus drei Acyl-Gruppen und entsteht durch Deacylierung im Rahmen des Remodellings.

#### 2.2.4 Peroxidation von Fettsäuren

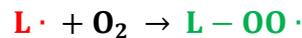
Der Einfluss von ROS führt zur Peroxidation von Fettsäuren und bewirkt somit eine Alteration der Cardiolipine mit den genannten Folgen. Dieser Prozess verläuft als dreistufige Kettenreaktion (YIN et al., 2011):

- 1. Initiation:** Durch Reaktion von ROS mit einer ungesättigten Fettsäure (L – H) kommt es zur Entstehung des **Fettsäureradikals L·**. Dies läuft beispielsweise unter Anwesenheit des Hydroxyl-Radikals (**·OH**) folgendermaßen ab:

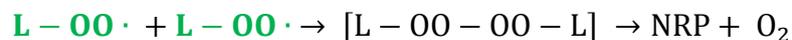


- 2. Prolongation:** Das entstandene **L·** wird nun durch radikalische Substitution mit O<sub>2</sub> zu einem **Lipidperoxyl-Radikal L - OO·** umgewandelt. Dieses reagiert mit anderen Fettsäuren zu einem **Fettsäureradikal** und Fettsäure-Hydroperoxyd (L-OOH; 2.

Reaktion). Die Folge ist eine Kettenreaktion, in der die entstandenen Fettsäureradikale wiederum mit  $O_2$  reagieren.



- 3. Termination:** Wenn zwei Lipidperoxyl-Radikale miteinander reagieren, entsteht dabei ein Nicht-Radikal-Produkt (NRP) und molekularer Sauerstoff. Die Kettenreaktion wird damit unterbrochen. Auslöser für diese Unterbrechung kann ein Antioxidans sein, das dann als Radikalfänger fungiert.



## 2.3 Leber-Mitochondrien

In den Mitochondrien ist die für höhere Organismen essentielle Atmungskette lokalisiert, wodurch sie den Ort der Produktion von ATP darstellen. Damit spielen Mitochondrien eine Schlüsselrolle für das Überleben der Zelle, weil ATP als universeller Energieträger eine notwendige Voraussetzung für die meisten biochemischen Prozesse in Lebewesen ist (LIPMANN, 1975).

Die durch MORIN et al. entdeckte Cardiolipin-Freisetzung aus Hirn-Mitochondrien bei Anoxie und Reoxygenierung soll in dieser Arbeit, die im Kontext des Leberinfarktes steht, durch Hypoxie- und Reoxygenierungs-Experimente auch an isolierten Leber-Mitochondrien nachgewiesen werden.

### 2.3.1 Oxidative Phosphorylierung

Es wurde nachgewiesen, dass es beim Verlust von Cardiolipinen zu Funktionseinschränkungen der Atmungskettenkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran kommt (CLAYPOOL et al., 2008). Daher führt der Verlust von CL auch

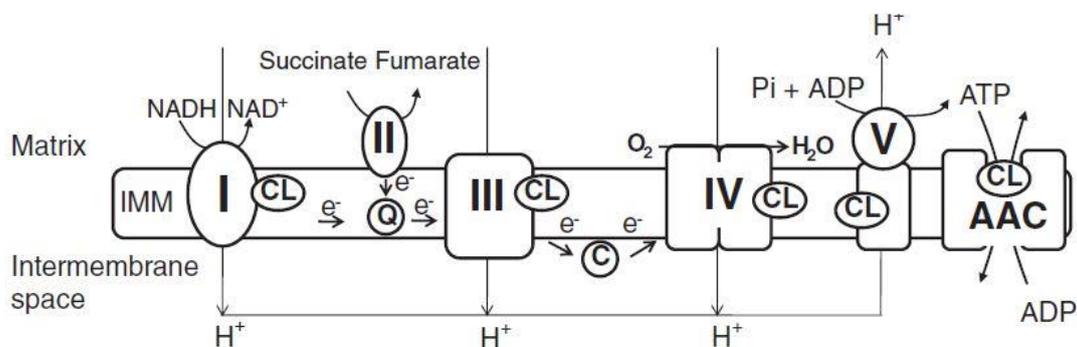
zum Zusammenbruch des mitochondrialen Protonengradienten. Dieser entsteht durch den Elektronentransport in den Komplexen der Atmungskette und ist notwendig für die ATP-Produktion, die durch ATP-Synthase (Komplex V) erfolgt (siehe Abbildung 3). Zellen müssen zur Erhaltung ihrer Struktur dauerhaft Ionengleichgewichte mit Hilfe ATP-abhängiger Ionenpumpen aufrechterhalten. ATP-Mangel führt daher zu einer intrazellulären Erhöhung von Natrium und Calcium, sowie zu einer Erniedrigung des Kaliums, wodurch es zum Zelltod kommt (ALISON M.R., SARRAF C.E., 1994).

ADP ist ein notwendiges Substrat für die oxidative Phosphorylierung. Daneben müssen die Coenzyme NADH und FADH als Energieträger vorhanden sein. Diese sind Metaboliten des Citratzyklus. Durch Zugabe von Malat und Glutamat wurde der Citratzyklus in den I/R-Experimenten aktiviert (LEHNINGER et al., 2005).

Auf funktioneller Ebene können bei isolierten Mitochondrien 5 verschiedene Atmungszustände unterschieden werden. Diese lassen sich unter Versuchsbedingungen durch das Vorhandensein oder Fehlen von Substraten, ADP und Sauerstoff realisieren.

In den Zuständen 1 – 4 ist eine ausreichende Menge an Sauerstoff vorhanden. Zustand 1 zeichnet sich durch einen Mangel an ADP und Substraten aus und ist durch eine erniedrigte Atmungsaktivität (Sauerstoffverbrauch pro Zeit) gekennzeichnet. Bei Zustand 2 ist ADP ausreichend vorhanden, jedoch fehlen die Substrate. Die Konsequenz ist ebenfalls eine reduzierte Atmungsaktivität. In Zustand 3 sind ADP und Substrate ausreichend vorhanden. Die Atmungsaktivität ist maximal und wird lediglich durch die Kapazität der Atmungskette limitiert. Dieser Zustand wird auch als **aktivierte Atmung** bezeichnet. Zustand 4 zeichnet sich durch einen ADP-Mangel bei ausreichend vorhandenen Substraten aus und beschreibt die **Ruheatmung**. Die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP kommt zum Erliegen. Dennoch in diesem Zustand gemessener Sauerstoffverbrauch resultiert daraus, dass die innere Mitochondrienmembran in geringem Maße für Protonen durchlässig ist, wodurch es unter Sauerstoffverbrauch zur Entstehung von Wasser kommt. Schließlich ist Zustand 5 durch kompletten Sauerstoffmangel (Anoxie) bei Vorhandensein von ausreichenden Mengen ATP und Substraten gekennzeichnet. Die Konsequenz ist die vollständige Hemmung der Atmung (CHANCE et al., 1955; CHANCE, WILLIAMS, 1955, 1956).

Im zweiten Experiment dieser Arbeit wurde bei den Untersuchungen an isolierten Leber-Mitochondrien zunächst die **Ruheatmung** gemessen und anschließend die **aktivierte Atmung** durch ADP-Zugabe induziert.



**Abbildung 3:** Die hohe Bedeutung der Cardiolipine ergibt sich durch die struktur- und funktionsgebende Integration in die Atmungskette. Quelle: PARADIES et al., 2014.

### 2.3.2 Produktion von Reactive Oxygen Species durch Mitochondrien

An der Entstehung von ROS ist insbesondere die mitochondriale Atmungskette beteiligt. Wenn die Reduktion von  $O_2$  zu  $H_2O$  unvollständig verläuft, werden ROS vor allem im Q-Zyklus (zwischen Komplex I und III) produziert. In diesem wird Ubihydrochinon ( $QH_2$ ) zu Ubichinon (Q) oxidiert. Dies erfolgt jedoch stufenweise, so dass zwischenzeitig das Radikal Ubisemichinon ( $QH\cdot$ ) entsteht. Wenn es zu einer Blockierung des weiteren Elektronentransportes kommt, was beispielsweise durch hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen bedingt sein kann, so entsteht ein Rückstau, der dazu führt, dass  $QH\cdot$  oxidiert wird und dabei ein Elektron auf molekularen Sauerstoff überträgt. Es kommt zur Entstehung von Superoxid-Anionen ( $O_2^- \cdot$ ). Durch das Enzym Superoxid-Dismutase wird daraus Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), aus dem durch Spaltung das Hydroxyl-Radikal ( $OH\cdot$ ) entsteht. Dieses wird unter anderem durch Glutathion eliminiert. Normalerweise wird die ROS-Produktion durch dieses antioxidative Schutzsystem soweit neutralisiert, dass keine Schäden entstehen (KIRKINEZOS, MORAES, 2001). Eine pathologische Überproduktion von ROS, die nicht kompensiert werden kann, führt zu einer Kettenreaktion, der ROS-induzierten-ROS-Freisetzung (ZOROV, 2000), wodurch sich der Schaden weiter vergrößert.

ROS führen in den Mitochondrien zur Umwandlung von Proteinen und Lipiden, aus denen die Atmungskette besteht. Dadurch entsteht ein rascher Abfall der oxidativen Phosphorylierung und damit der ATP-Konzentration.

Bei Hypoxie kommt es zu einer pathologischen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (LEMASTERS et al., 2009). Diese kann zu einer irreversiblen Öffnung der Mitochondrial permeability transition pore (MPTP) führen, wodurch es zum Zelltod kommt (BROOKES et al., 2004).

Im Rahmen der Experimente mit Lebermitochondrien wurde die Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes durch Anreicherung des Mediums mit verschiedenen Calcium-Ionen-Konzentrationen simuliert, um den Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf Mitochondrien realitätsnah darzustellen.

## **2.4 Erkrankungen im Zusammenhang mit Mitochondrien und Cardiolipinen**

Es ist eine Reihe von Erkrankungen bekannt, deren Entstehung auf Schädigungen der Mitochondrien durch oxidativen Stress beruht. In den folgenden Beispielen existiert ein Zusammenhang zu Cardiolipinen, sodass deren Erforschung mit einer hohen klinischen Relevanz assoziiert ist.

### **2.4.1 Barth-Syndrom**

Das Barth-Syndrom ist eine genetische Erkrankung, die X-chromosomal-rezessiv vererbt wird. Daher sind ausschließlich männliche Individuen betroffen.

Die Pathogenese des Barth-Syndroms beruht drauf, dass eine Mutation des Tafazzin-Genes die CL-Remodellierung behindert. Es kommt daher zu einem erhöhten Anteil an Monolysocardiolipin (VALIANPOUR et al., 2005). Dies hat mitochondriale Dysfunktionen zur Folge, die sich in erster Linie in einer dilatativen Kardiomyopathie, aber auch in

Wachstumsverzögerung, Skelettmuskelerkrankungen und einer Reduktion der Leukozytenzahl im Blut äußern (Hsu et al., 2015).

#### **2.4.2 Nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD)**

Die nicht-alkoholische Fettleber ist eine Erkrankung, die eng mit dem metabolischen Syndrom assoziiert ist. Sie tritt bei Menschen mit Übergewicht in ca. 50% der Fälle auf und verläuft oftmals symptomlos. Allerdings birgt sie das Risiko einer Progredienz hin zu einer Fibrose beziehungsweise Zirrhose der Leber (CALORI et al., 2011).

Neuere Forschungen gehen davon aus, dass die Pathogenese im Bereich mitochondrialer Dysfunktionen zu finden ist (BEGRICHE et al., 2013), wobei ROS-Produktion und Alterationen der Cardiolipin-Zusammensetzung eine Rolle spielen (WISWEDEL et al., 2010).

#### **2.4.3 Maligne Neoplasien**

Die Komposition der Cardiolipine im Hinblick auf die Acyl-Reste unterscheidet sich in Krebs-Zellen von gesunden Zellen. Generell haben Krebs-Zellen einen höheren Anteil an kurzkettigen, gesättigten Fettsäuren (KIEBISH et al., 2008). Diese Konstellation entspricht den nicht gereiften Cardiolipinen, die den Prozess des Remodellings nicht durchlaufen haben.

Übereinstimmend mit dieser Entdeckung konnte man zeigen, dass die Verfügbarkeit freier Fettsäuren Einfluss auf das Wachstum von Tumor-Zellen hat (MURRAY et al., 2015). Speziell konnte nachgewiesen werden, dass eine Veränderung der Cardiolipine von Tumor-Zellen durch die zur Verfügung stehenden Fettsäuren möglich ist. Im Speziellen bei Prostata-Krebs führt der Einfluss eines Milieus mit gesättigten Fettsäuren zu einer Proliferation. Im Gegensatz dazu hemmen ungesättigte Fettsäuren das Zellwachstum (SAPANDOWSKI et al., 2015).

#### **2.4.4 Kardiale Schäden durch Ischämie und Reperfusion**

Beim Herzinfarkt kommt es zu einem Verschluss von Koronararterien, wodurch das Myokard unterversorgt wird. Bekannt ist, dass es in einer solchen Situation zum Verlust von Cardiolipinen kommt (PARADIES et al., 1999). Dieser Aspekt wurde auch in dieser Arbeit in Bezug auf Leber-Ischämie untersucht.

#### **2.5 Zielsetzung und Hypothesen**

Das Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der intrazellulären Cardiolipin-Verteilung anhand verschiedener Dichtefractionen in Leberhomogenaten. Dazu wird ein Zellfraktionierungsverfahren angewendet. Die Analyse der CL-Spezies (HPLC-MS/MS) soll ferner Aufschluss darüber geben, ob es Spezies gibt, die bestimmten Dichtemilieus in der Zelle zuzuordnen sind.

Parallel dazu soll untersucht werden, ob Ischämie und Reperfusion, die den Vorgängen beim Leberinfarkt nachempfunden sind, eine Veränderung der Cardiolipin-Verteilung bewirken. Die Untersuchungen werden jeweils mit Kontrollexperimenten verglichen. In diesen findet ebenfalls eine Perfusion der präparierten Leber über den gleichen Zeitraum statt, jedoch ohne Ischämie- und Reperfusionsphase.

Zur Bestätigung einer tatsächlichen Schädigungsinduktion durch Ischämie und Reperfusion werden exemplarisch histologische Untersuchungen der behandelten Organe, sowie Laboranalysen typischer Leberschädigungsparameter (Aspartat-Amino-Transferase (ASAT), Glutamatdehydrogenase (GLDH), L-Laktatdehydrogenase (LDH)) exemplarisch durchgeführt.

In einer zweiten Versuchsreihe werden Hypoxie und Reoxygenierung auf isolierte Lebermitochondrien einwirken. Hier geht es um die Frage, ob die H/R-bedingte Freisetzung von Cardiolipinen aus Leber-Mitochondrien ebenso möglich ist, wie es an Hirnmitochondrien gezeigt wurde. Die Untersuchungen finden in einer Sauerstoffmesszelle statt, mit der die Atmungseigenschaften der Mitochondrien im Zeitverlauf verfolgt werden können. Die differentielle Lipidanalytik wird auch hier genutzt, um Aufschluss über das

Auftreten verschiedener Spezies zu gewinnen. Die vermutete Freisetzung von Cardiolipinen wird anhand von postinterventioneller Trennung der Mitochondrien vom umgebenden Medium erfasst.

Wenn in den genannten Experimenten spezifische Muster in der CL-Verteilung erkennbar sein sollten, die sich durch den Einfluss von hypoxischem Stress verändern, könnte daraus abgeleitet werden, dass es sich bei dieser Veränderung um einen Teil des Schädigungsprozesses handelt. Aus dieser Erkenntnis lassen sich gegebenenfalls therapeutische Strategien entwickeln.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

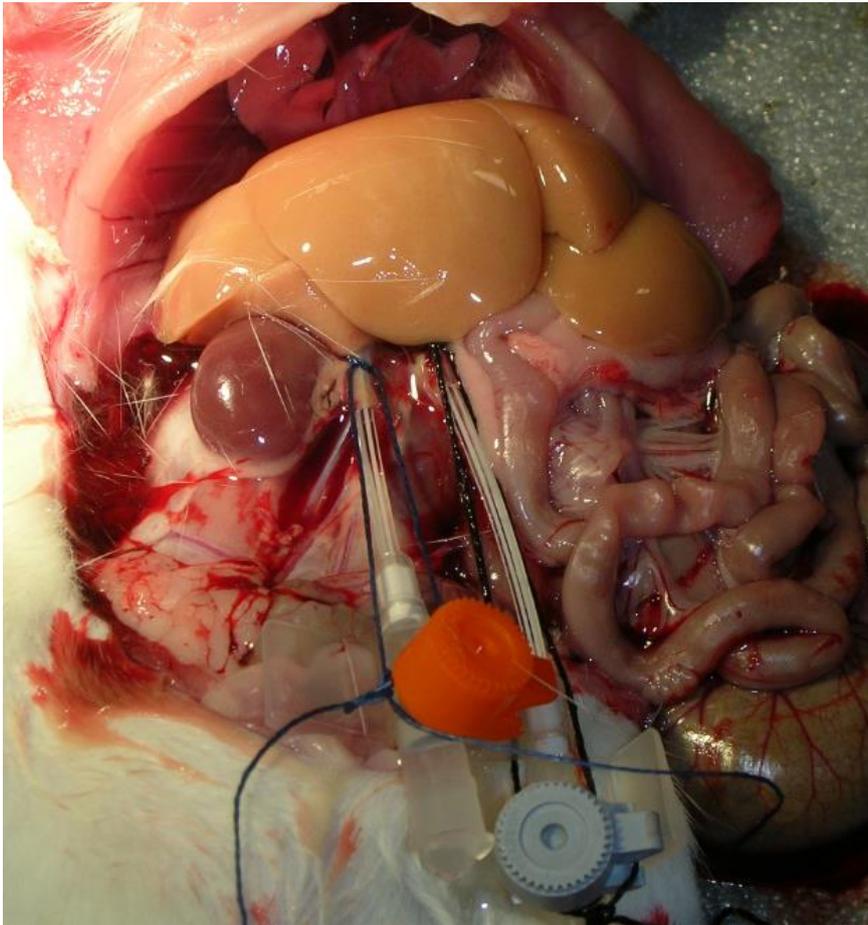
In den Experimenten wurden männliche Exemplare der Art *Rattus norvegicus* forma domestica Typ Wistar verwendet. Es handelt sich um einen Inzucht-Stamm, der von Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland vertrieben wurde. Die Tiere wurden in einem standardisierten Tag-Nacht-Zyklus von je 12 Stunden bei 22 °C gehalten und hatten Zugang zu beliebigen Mengen an Wasser und Nahrung. Die Tierschutzrichtlinien gemäß 86/609/EEC wurden eingehalten. Die Genehmigung der Tierversuche trägt das Aktenzeichen: 42502-2-912.

#### **3.2 Experimente mit Ischämie- und Reperfusion in-situ**

In der ersten Studie wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Leber eines Versuchstieres mit Krebs-Ringer-Lösung<sup>1</sup> + 0,25 mM EGTA (pH 7,4) perfundiert wurde. Das Efluat aus der Leber konnte dabei zur Analytik aufgefangen werden. Abbildung 4 zeigt die Leber eines Labortieres, die an die nachfolgend beschriebene Perfusionsanlage angeschlossen ist.

---

<sup>1</sup>Zusammensetzung siehe Abschnitt 10.1.3



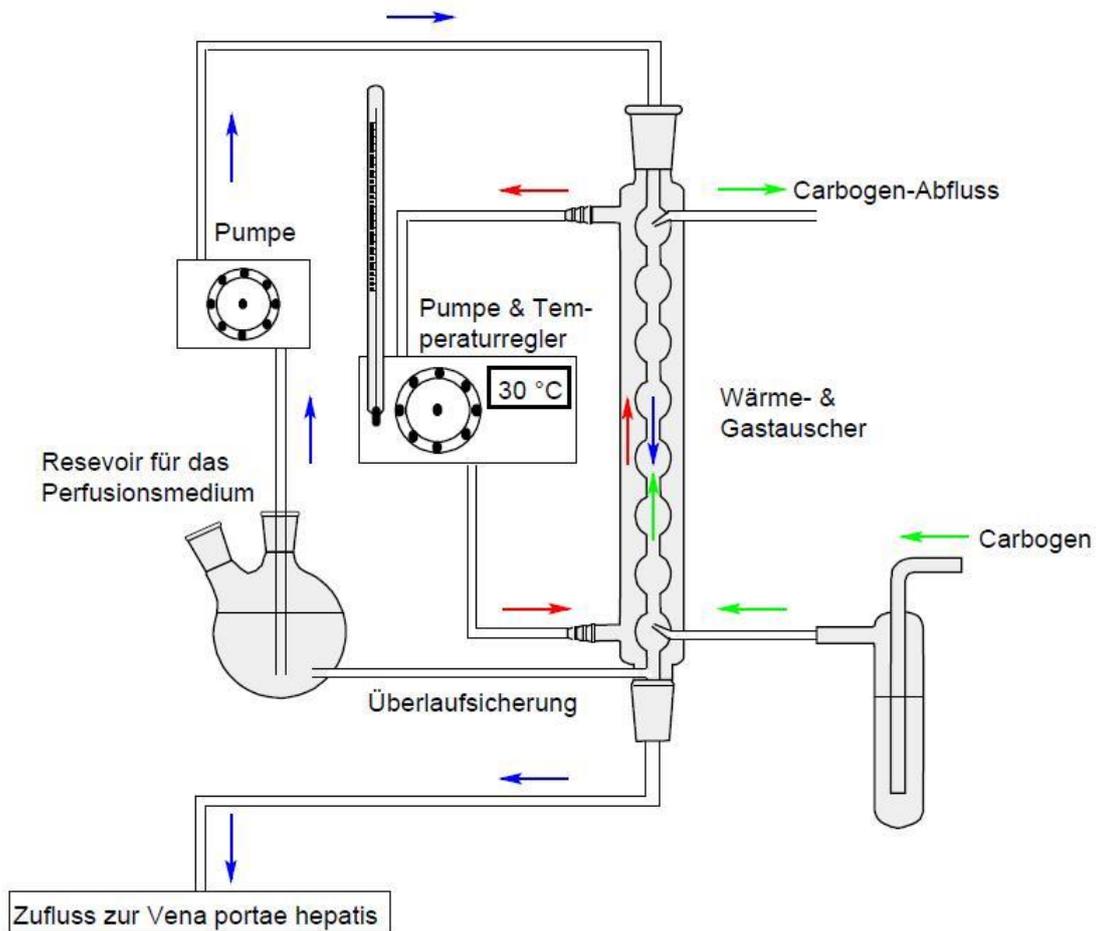
**Abbildung 4:** An die Perfusionsanlage angeschlossene Ratten-Leber.

### 3.2.1 Aufbau der Perfusionsanlage

Die Aufgabe der Perfusionsanlage war die Bereitstellung eines kontinuierlichen Stromes von Perfusionsmedium, dessen Temperatur und Sauerstoffgehalt in einem physiologischen Bereich lagen.

Die Anlage bestand aus drei Kreislaufsystemen. Zunächst wurde Wasser auf 37 °C erwärmt und durch die Außenseite eines Allihn-Kühlers gepumpt. Hierdurch erfolgte ein Wärmeaustausch. Durch das innere Rohr floss das Perfusionsmedium, das hier beheizt und zur Sauerstoffanreicherung mit entgegenströmendem Carbogen (95 Vol.-% O<sub>2</sub> + 5 Vol.-% CO<sub>2</sub>) in Kontakt kam. Das Carbogen-Gas wurde zunächst gereinigt, indem es durch eine Fritte geleitet wurde, die sich in einer Gaswaschflasche befand. Das behandelte

Perfusionsmedium wurde dann über eine Kanüle in die Vena portae hepatis des Versuchstieres geleitet.



**Abbildung 5:** Schema der Apparatur zur Perfusion der Leber in situ. Blaue Pfeile: Fluss des Perfusionsmediums. Rote Pfeile: Fluss von temperiertem Medium. Grüne Pfeile: Carbogen-Strom. Abbildung nach MARTENS et al., 2015.

### 3.2.2 Durchführung der Leberperfusionsexperimente

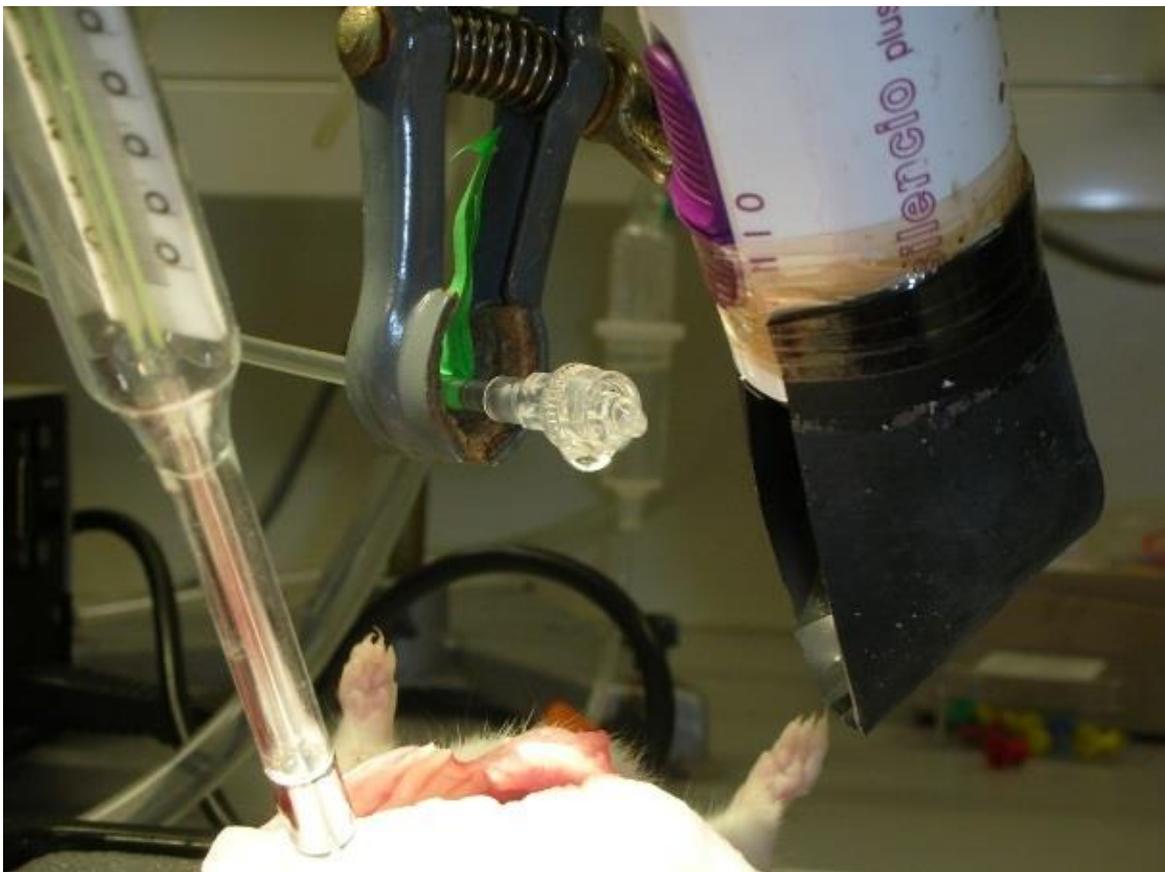
Nach der Temperierung des Systems auf 37 °C und der Präkonditionierung des Mediums durch Carbogen, wurde das Versuchstier durch eine intraperitoneale Injektion von 3-4 ml Chloralhydrat (35 mg/ml) anästhesiert und auf einem Styroporblock fixiert. Es erfolgte eine Präparation zur Freilegung der Leber und der lebernahen Gefäße. Nach Kanülierung der Vena portae hepatis und der Vena cava inferior wurde das Versuchstier an die Perfusionsanlage angeschlossen. Das Perfusionsmedium trat über die Vena portae hepatis in die Leber ein. Nach der Perfusion, floss es über die Venae hepaticae in die Vena cava inferior und wurde dort über die zweite Kanüle abgelassen. Eine Ligatur an der Vena cava superior dichtete diese nach kranial ab. Sollte aus der Vena cava inferior nicht, wie zu erwarten, Medium austreten, so wurde auf diese Ligatur verzichtet, um das Medium über die Vena cava superior nach cranial abfließen zu lassen (COLLINS, SKIBBA, 1980). Zu diesem Zeitpunkt trat der Herzstillstand des Versuchstieres ein.

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt: Kontroll- und Hypoxie-Experimente. Im Falle der Kontrollversuche wurde die Leber 60 Minuten lang perfundiert. Bei den Hypoxie-Experimenten erfolgte die Perfusion zunächst für 30 min. Daran schloss sich eine perfusionsfreie Hypoxie-Zeit von 20 min an. Zum Schluss erfolgte eine Reperfusion von 10 Minuten. Nach dieser Prozedur wurde die Leber in beiden Fällen vollständig aus der Abdominalhöhle entnommen, in eisgekühltes Inkubationsmedium überführt und im Rahmen der Zellfraktionierung weiter bearbeitet.

### 3.2.3 Temperaturregulation

Bei Vorversuchen zur Studienplanung stellte sich heraus, dass sich die Leber trotz Perfusion mit vorgewärmtem Medium stark abkühlte (bis zu 29 °C). Außerdem waren bereits nach ca. 20 Minuten makroskopische Austrocknungen sichtbar. Ein Absinken der Gewebetemperatur während des Experimentes, insbesondere während der Hypoxie-Zeit, musste vermieden werden, da dies einen protektiven Effekt gegenüber dem hypoxischen Stress gehabt und somit zu Ergebnisverfälschungen geführt hätte (KATO et al., 2002).

Um diese Probleme zu lösen, wurde ein Temperaturregelungs- und Befeuchtungssystem entwickelt. Der thermostatische Mechanismus bestand aus einem Luftstrom, der durch einen Föhn erzeugt wurde. Dieser wurde über ein Kontaktthermometer, das an ein Steuergerät angeschlossen war, ein- und ausgeschaltet. Zusätzlich wurde eine Komresse auf die Leber aufgelegt. Dieser wurde mit 37 °C warmer phosphatgepufferter Kochsalzlösung betropft.



**Abbildung 6:** Thermostatischer Aufbau zur Temperaturregelung der perfundierten Leber. Links ist das Kontaktthermometer sichtbar; in der Mitte ein Infusionsschlauch, durch den PBS auf eine im unteren Teil sichtbare Komresse, die die Leber bedeckt, getropft wird. Rechts befindet sich der Föhn, der über das Kontaktthermometer geregelt wurde.

Durch diesen Versuchsaufbau konnte ein konstant auf 37 °C erwärmtes Organ gewährleistet werden, das auch nach Versuchsende keine makroskopischen Austrocknungen der Oberfläche aufwies.

### 3.2.4 Zellfraktionierung

Das Lebergewebe wurde im Anschluss homogenisiert. Dazu wurden 400 mg nach zweimaligem Waschen in 0,7 ml eiskalte Pufferlösung gegeben. Diese Pufferlösung enthielt 250 mM Saccharose, 10 mM Citrat, 0,5 mM EGTA, 1 mM  $\text{MgSO}_4$  und war mit NaOH auf pH 6,0 adjustiert. Benutzt wurde ein Potter-Elvehjem-Homogenisator, mit dem 3 Hübe bei einer Drehzahl von  $2000 \text{ min}^{-1}$  appliziert wurden. Es folgte eine Zentrifugation mit 500 g für 5 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde von dem entstandenen Pellet getrennt, das wiederum in 0,7 ml Pufferlösung resuspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert wurde.

Es erfolgte eine Zusammenführung der Überstände beider Zentrifugationen.

Der zusammengeführte Überstand wurde nun zur Dichtegradientenzentrifugation auf 8,5 ml einer Lösung gegeben, die im Volumenverhältnis 1:2 (v/v) aus Percoll und der o.g. Pufferlösung bestand. Die Zentrifugation erfolgte mit 50.000 g für 45 Minuten bei 4 °C.

In Abhängigkeit von der Massendichte sedimentierten die Zellfragmente unterschiedlich weit und bildeten einen Dichtegradienten. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde dieser durch eine Rollerpumpe mit einer Hohnadel angesaugt und dabei in 46 Fraktionen mit identischem Volumen aufgeteilt. Die erste Fraktion enthielt Partikel mit der höchsten Dichte, weil sie vom Boden des Gefäßes entnommen wurde, der den größten Abstand zum Rotationszentrum aufwies. Die folgende, aus Vorstudien stammende Zuordnung von Dichtewerten zu bestimmten Fraktionen wurde verwendet (Tabelle 1):

Fraktion	Dichte (g cm <sup>-3</sup> )
5	1,152
7	1,133
10	1,112
12	1,101
16	1,085
19	1,079
29	1,063
37	1,056

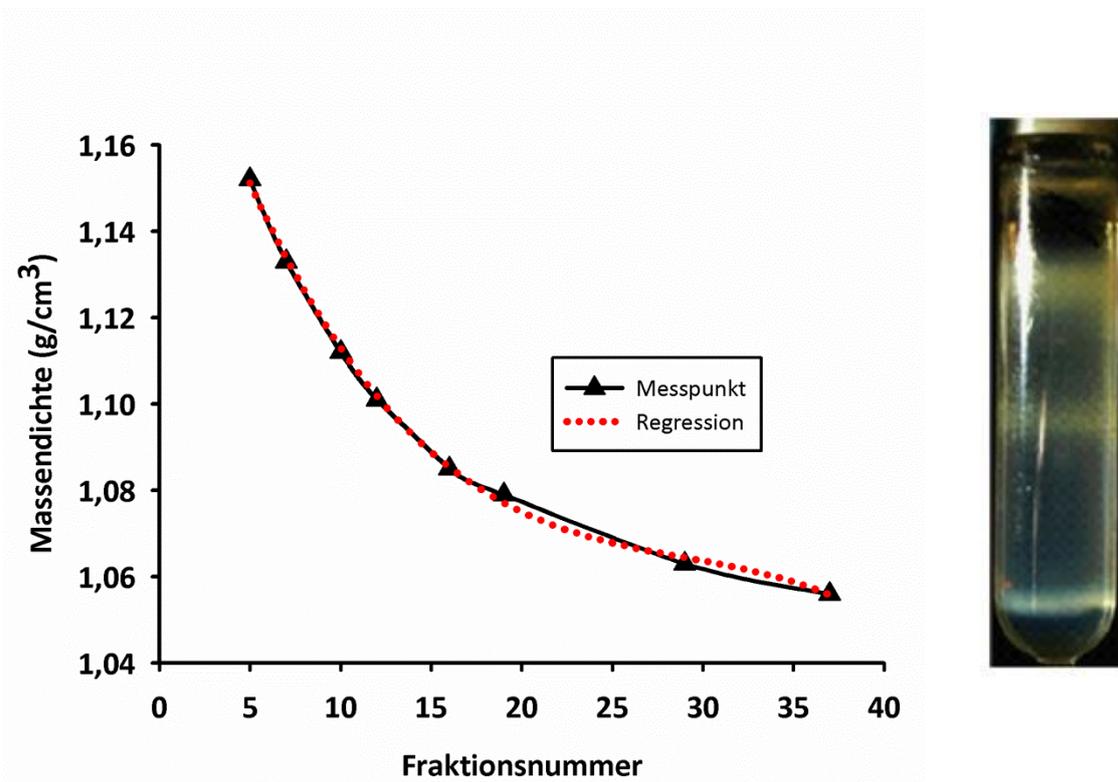
**Tabelle 1:** Fraktionen und zugehörige experimentell ermittelte Dichtewerte, Quelle: Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Bereich Experimentelle Operative Medizin. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Aus diesen Werten wurde die folgende Regression ermittelt:

$$\rho(F) = -4,895 \cdot 10^{-6} F^3 + 4,269 \cdot 10^{-4} F^2 - 1,318 \cdot 10^{-2} F + 1,207$$

Die Korrelation mit den oben genannten Werten beträgt:  $R^2 = 0,9989$ .

Abbildung 7 zeigt den gemessenen und den berechneten Zusammenhang zwischen der Fraktionsnummer und der jeweiligen Massendichte.



**Abbildung 7:** Zusammenhang zwischen der Dichte und der Fraktion. Schwarz: Ergebnisse von Messungen. Rot: Regression mit o.g. Formel. Daneben: Foto eines Zentrifugenröhrchens nach einer Präparation mit erkennbaren Vesikel-Banden. Abbildung nach MARTENS et al., 2015.

### Poolung

Zur Lipidanalytik wurden Pools aus je 4 bzw. 3 benachbarten Fraktionen gebildet. Die mittlere Dichte eines Pools mit den Fraktionen  $n$  bis  $k$  wurde folgendermaßen berechnet:

$$\rho_{n-k} = \frac{1}{k - n + 1} \sum_{i=n}^k \rho(F_i)$$

Tabelle 2 zeigt die sich ergebenden 11 Fraktionspools, die letztendlich lipid-analytisch (s.u.) untersucht wurden:

Fraktionspool	Mittlere Dichte (g cm <sup>-3</sup> )
F <sub>5-8</sub>	1,138
F <sub>9-12</sub>	1,110
F <sub>13-16</sub>	1,091
F <sub>17-20</sub>	1,078
F <sub>21-24</sub>	1,071
F <sub>25-28</sub>	1,066
F <sub>29-32</sub>	1,063
F <sub>33-36</sub>	1,059
F <sub>37-40</sub>	1,053
F <sub>41-44</sub>	1,042
F <sub>45-47</sub>	1,027

**Tabelle 2:** Berechnete mittlere Dichtewerte für die gebildeten Fraktionspools. Die Fraktionen 1-3 enthielten hauptsächlich Zellkerne und wurden nicht untersucht.

### 3.2.5 Mikroskopische Untersuchungen

Um ein morphologisches Korrelat zur Schädigung durch Ischämie und Reperfusion zu erhalten, wurden exemplarisch histologische Untersuchungen des perfundierten Lebergewebes vom Institut für Biochemie und Zellbiologie, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg durchgeführt.

Hierzu wurde ein Teilstück der entnommenen Leber in eiskalte Formalinlösung (4%) überführt und für 24 Stunden gelagert. Danach erfolgte eine weitere 24-stündige Lagerung in Saccharose-Lösung (30 %). Das Präparat wurde tiefgefroren. Durch Dünnschicht-Kryotomie wurden Schnitte einer Dicke von 20 µm erzeugt, die schließlich mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden (HE-Färbung). Die Bildgebung erfolgte mit einem Axio-Imager (Zeiss, Jena, Deutschland).

### 3.2.6 Klinisch-chemische Untersuchungen

Bei einigen typischen Leberperfusionsexperimenten wurde exemplarisch Efluat aus der Vena cava jeweils vor und nach der Ischämie (10 Minuten und 50 Minuten nach Perfusionsbeginn) entnommen. Analog erfolgte eine Entnahme bei Kontrollexperimenten.

Das Efluat wurde hinsichtlich der induzierten Leberschädigung untersucht. Dazu wurden die Enzymaktivitäten von ASAT, GLDH und LDH bestimmt.

Die Untersuchungen erfolgten mit einem automatisierten Routineverfahren (Cobas 6000 analyzer, Roche, Rotkreuz Risch, Schweiz).

### 3.3 Hypoxie-/Reoxygenierungs-Experimente mit isolierten Mitochondrien

Die zweite Versuchsreihe umfasste Untersuchungen an isolierten Leber-Mitochondrien. Dabei wurden neben der Lipidanalytik die Atmungseigenschaften gemessen.

#### 3.3.1 Präparation von Mitochondrien aus Lebergewebe

Nach der Tötung des Versuchstieres durch Nackenschlag und Dekapitation wurde die Leber frei präpariert, entnommen und in eiskaltes Leber-Isolationsmedium<sup>2</sup> zur Spülung gegeben. Nach dreimaligem Waschen wurde diese zerschnitten und homogenisiert. Darauf folgten 3 Zentrifugationsschritte:

- Zentrifugation des Homogenats mit 1050 g, 5 min.
- Zentrifugation des gewonnenen Überstandes mit 14111 g, 10 min.
- Resuspension des Pellets in 6 ml Leber-Isolationsmedium und Homogenisierung. Zugabe von 1,4 ml Percoll-Lösung. Zentrifugation mit 14111 g für 10 min.

---

<sup>2</sup> Zusammensetzung siehe Abschnitt 10.1.1

- Resuspension in 6 ml Leber-Isolationsmedium (ohne BSA) mit anschließender Homogenisierung. Erneute Zentrifugation mit 14111 g für 10 min.
- Resuspension des Pellets in 0,7 ml Isolationsmedium und Homogenisierung.

Die fertige Mitochondriensuspension wurde in einem offenen Gefäß auf Eis aufbewahrt (HAAPARANTA et al., 1983; SPELSBERG et al., 1984).

Bei jedem Experiment wurde sichergestellt, dass die Mitochondriensuspension einen Proteingehalt von 1-2 mg/ml hatte (Bradford-Methode).

### **3.3.2 Messung der Atmungsaktivität von Mitochondrien**

Die Hypoxie/Reoxygenierungs-Experimente wurden in einer Messkammer (Oxygraph, Paar Physica, Graz, Österreich) durchgeführt. In diese wurden Medium, Mitochondriensuspension und Substrate gegeben. Sie war beheizbar und mit einem Magnetührer ausgestattet. In der Kammer befand sich eine Sauerstoffelektrode (CLARK, L C JR et al., 1953), mit der die Sauerstoffkonzentration in der Messzelle polarimetrisch gemessen wurde. Der Verschluss dichtete die Messkammer mit O-Ringen von der Atmosphäre ab. Er enthielt einen Kanal, durch den Substanzen mit einer Kanüle in die Kammer injiziert werden konnten, ohne dass eine Öffnung des Systems notwendig war.

### **3.3.3 Durchführung und Datenerhebung**

Zur Bestimmung der Atmungseigenschaften von Mitochondrien wurde der Zeitverlauf der Sauerstoffkonzentration in der geschlossenen, auf 30 °C temperierten Kammer gemessen. Zur Beschreibung der Mitochondrienatmung diente die zeitliche Veränderung (Slope) der Sauerstoffkonzentration im Medium der Messkammer.

Zur Durchführung wurde ein Inkubationsmedium<sup>3</sup> verwendet. Die Zugabe von Malat und Glutamat lieferte zwei essentielle Substrate des Citratzyklus. Die Experimente wurden jeweils unter 4 verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde für jede Bedingung frische Mitochondriensuspension verwendet.

- 1. Kontrolle**
- 2. Hypoxie/Reoxygenierung**
- 3. Hypoxie/Reoxygenierung + 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$**
- 4. Hypoxie/Reoxygenierung + 4  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$**

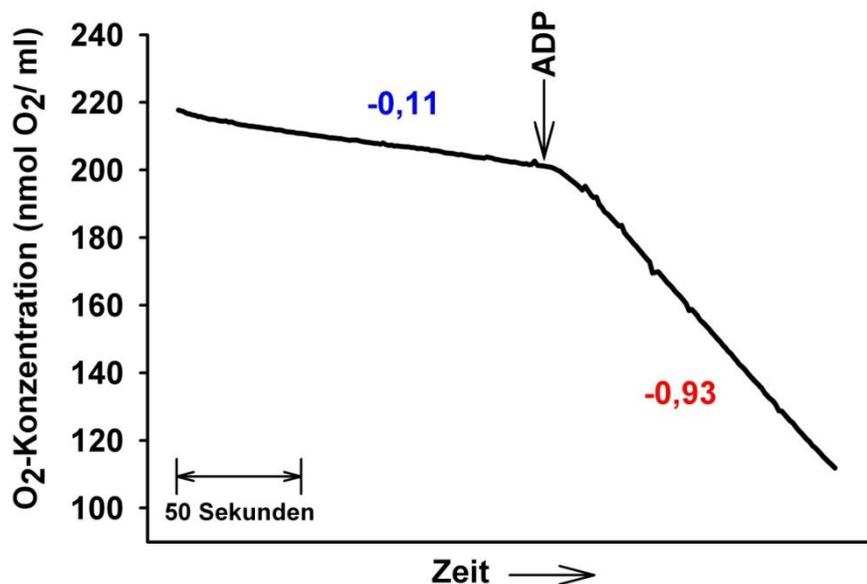
### **1. Kontrolle**

Nach der Injektion von 90  $\mu\text{l}$  der präparierten Mitochondriensuspension, sowie Malat und Glutamat in die Messkammer konnte bereits die *Ruheatmung* mit einem relativ geringen Sauerstoffverbrauch beobachtet werden. Nach dem sich ein konstanter Sauerstoffverbrauch im Gefälle der Sauerstoff-Zeit-Kurve abzeichnete (80-100 sec; Abbildung 8), wurde durch ADP-Zugabe die Mitochondrienatmung aktiviert.

Ein deutlicher und unverzüglicher Sprung des Slopes in der Sauerstoffkonzentrationskurve ließ dabei auf funktionelle Intaktheit der präparierten Mitochondrien schließen.

---

<sup>3</sup> Zusammensetzung siehe Abschnitt 10.1.2



**Abbildung 8:** Beispiel für eine Kontrollmessung. ADP wurde zum markierten Zeitpunkt in die Messzelle appliziert. Davor ist das Gefälle (Slope) der Ruheatmung relativ niedrig. Unverzüglich nach der Applikation vergrößert sich dieses erheblich und beschreibt die aktivierte Atmung. Diese muss bei intakten Mitochondrien deutlich größer sein als die Ruheatmung. Slope-Angaben in nmol / (ml·s). Abbildung nach MARTENS et al., 2014.

## 2. Hypoxie und Reoxygenierung

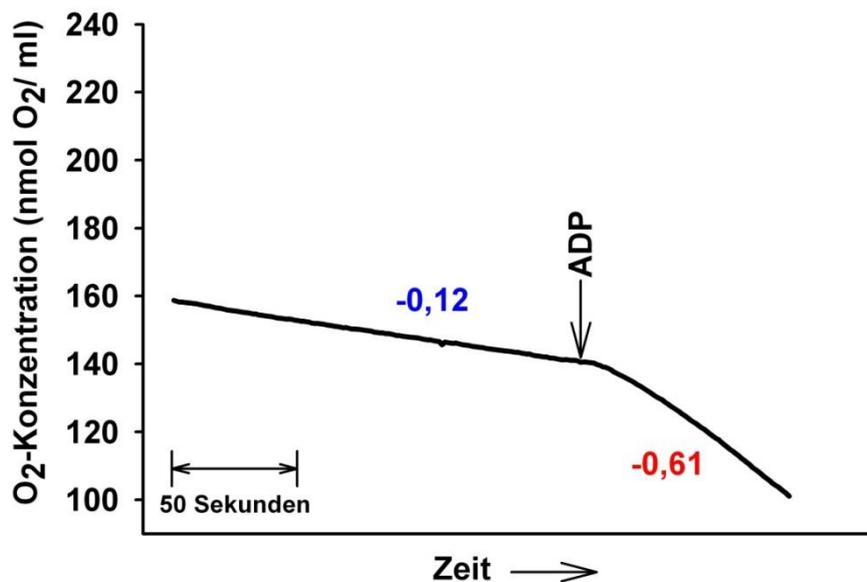
Im zweiten Teil der H/R-Experimente wurde vor der Atmungsmessung über einen Zeitraum von 10 Minuten eine Hypoxie erzeugt. Dies geschah durch die Vorbehandlung des Inkubationsmediums in der Messkammer mit Stickstoffgas. Erst nachdem durch Insufflation eine Sauerstoffkonzentration von unter 1 Vol.-% der Luftsättigung erreicht war, wurde die Mitochondriensuspension appliziert. Danach wurde der lufthaltige Bereich der Messzelle kurz mit Stickstoff gespült und die Messkammer luftdicht verschlossen. Ab diesem Zeitpunkt begann die Hypoxiephase.

Die Vorarbeiten von Schild et.al. ließen eine Hypoxiezeit von 10 Minuten, gefolgt von einer 5-minütigen Reoxygenierungszeit sinnvoll erscheinen, um eine hierdurch verursachte deutliche Schädigung der isolierten Mitochondrien zu erzielen (SCHILD et al., 1997).

Zu Beginn der anschließenden Reoxygenierungsphase wurde die Messkammer geöffnet und es wurden 2 ml frisches Inkubationsmedium hinzu gegeben, das nicht mit Stickstoff vorbehandelt wurde.

Nach der Reoxygenierung wurden die Substrate Glutamat und Malat hinzu gegeben.

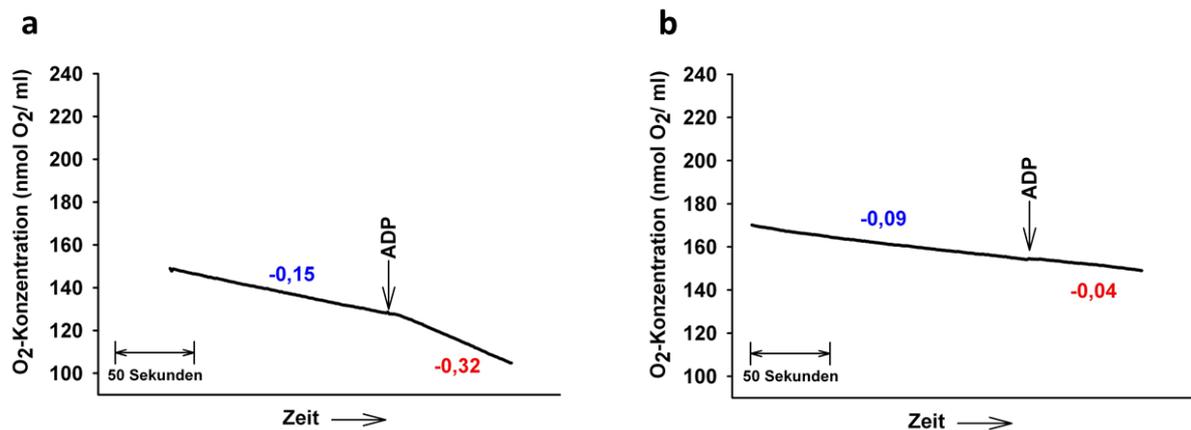
Analog zu den Kontrollexperimenten wurde bei der anschließenden Atmungsmessung zunächst die Ruheatmung gemessen. Schließlich erfolgte die Zugabe von ADP zur Messung der aktivierten Atmung (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Beispiel für eine Hypoxie-Reoxygenierungs-Messung. Deutlich zu erkennen, dass gegenüber dem Kontrollexperiment (Abbildung 8) insbesondere die aktivierte Atmung nach der Zugabe von ADP erheblich eingeschränkt ist. Abbildung nach MARTENS et al., 2014.

### 3./4. *Zusätzliche Schädigung durch Ca<sup>2+</sup>*

In Bedingung 3 und 4 wurde ebenfalls die H/R-Prozedur durchgeführt. Um eine Eskalation der mitochondrialen Schädigung zu ermöglichen, wurde das Medium mit CaEGTA angereichert, um Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in Höhe von 2 bzw. 4  $\mu$ M zu erzeugen. Dies wird in Abbildung 10 durch den Slope deutlich, der nach der Zugabe von ADP gegenüber dem Kontrollexperiment stark reduziert ist und somit eine verringerte Mitochondrienatmung repräsentiert.



**Abbildung 10:** Beispiele für ein Hypoxie-Reoxygenierungs-Experiment mit Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ . a:  $2 \mu\text{M}$ . b:  $4 \mu\text{M}$ . Bei letzterer Konzentration ist die Schädigung bereits so stark, dass die Zugabe von ADP nicht mehr die Aktivierung der Atmung bewirken kann. Abbildung nach MARTENS et al., 2014.

Nach jeder Messung wurde das entstandene Gemisch aus Mitochondriensuspension, Inkubationsmedium, ggf. CaEGTA und Substraten in Eppendorf-Cups (1,5 ml) pipettiert. Zur Trennung von Bestandteilen mit geringerer und mit höherer Dichte wurde das Gemisch 30 s bei  $16060 \text{ g}$  zentrifugiert. Im Pellet sammeln sich dabei Partikel höherer Dichte, z.B. intakte Mitochondrien. Der Überstand enthielt leichtere Mitochondrienbruchstücke. Alle Proben wurden in flüssigem Stickstoff ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) schockgefroren.

Nach jedem Experiment wurde die Versuchskammer 3-fach mit Milli-Q-Wasser gespült, um Kontaminationen der Folgeexperimente zu vermeiden. Die Proben wurden bis zur Analytik bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### Protokoll des Kontrolleexperimentes

- Eingabe von 2 ml Inkubationsmedium in die Messzelle.
- Zugabe von  $40 \mu\text{l}$  1 M Glutamatlösung und Zugabe von  $40 \mu\text{l}$  1 M Malatlösung.
- Zugabe von  $90 \mu\text{l}$  der präparierten Mitochondriensuspension.
- Verschließen der Messzelle.
- Aufzeichnung der Ruheatmungskurve.
- Zugabe von  $40 \mu\text{l}$  50 mM ADP-Lösung.
- Aufzeichnung der Kurve der aktivierten Atmung.

### Protokoll der Hypoxie-/Reoxygenierungs-Experimente

- Zugabe von 2 ml vorgewärmtem (30 °C) Inkubationsmedium (mit 0, 40 bzw. 80 µl CaEGTA) in die Messzelle.
- Insufflation des Mediums mit N<sub>2</sub>(g), zur Senkung der Sauerstoffkonzentration im Medium auf 1 Vol.-% der Luftsättigung.
- Zugabe eines zuvor ermittelten Volumens der präparierten Mitochondriensuspension.
- Überschichten des Messzelloinhaltes mit N<sub>2</sub>(g).
- Verschließen der Messzelle.
- Abwarten einer **Hypoxie-Zeit** von 10 min.
- Öffnen der Zelle. Zugabe von 2ml vorgewärmtem (30 °C) Inkubationsmedium (mit 0, 40 bzw. 80 µl CaEGTA).
- Abwarten einer **Reoxygenierungs-Zeit** von 5 Minuten.
- Zugabe von 40 µl 1 M Glutamatlösung und Zugabe von 40 µl 1 M Malatlösung.
- Verschließen der Messzelle.
- Aufzeichnung der Ruheatmungskurve.
- Zugabe von 40 µl 50 mM ADP-Lösung.
- Aufzeichnung der Kurve der aktivierten Atmung.

### 3.4 Bestimmung des Proteingehaltes per Bradford-Methode

Die Bradford-Methode wurde eingesetzt, um Proteinkonzentrationen zu bestimmen.

Die zu untersuchende Lösung wurde mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 versetzt. Dies führte zu einer Komplexierung mit gelöstem Protein. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt im ungebundenen Zustand bei einer Wellenlänge von 465 nm und verschiebt sich durch Bindung an Protein auf 595 nm. Die Messungen erfolgten entsprechend bei  $\lambda = 595$  nm. Veränderungen der optischen Dichte (Extinktion) wurden photometrisch (Cary 1E, Varian, Palo Alto, CA, USA) in dreifacher Bestimmung ermittelt und lieferten die Proteinkonzentration (BRADFORD, 1976).

### 3.5 Abschätzung der Mitochondrien-Menge durch Messung der Citratsynthase-Aktivität

Citratsynthase katalysiert im Citratzyklus die Reaktion von Oxalacetat und Acetyl-Coenzym A zu Citrat. Dieser Prozess findet bei Eukaryonten in der Matrix von Mitochondrien statt. Daher stellt die Aktivität der Citratsynthase damit einen charakteristischen Biomarker für Mitochondrien dar (LARSEN et al., 2012). Der Nachweis erfolgte durch photometrische 3-fach-Bestimmung von TNB bei  $\lambda = 412 \text{ nm}$ .

Reaktionen:



Im Messansatz enthalten waren 100 mM Tris-HCl-Puffer (adjustiert auf pH 8,0), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM DTNB (= 5,5-Dithio-bis-2-Nitrobenzoe Säure), 0,2 mM Acetyl-CoA und 1 mM Oxalacetat (SRERE et al., 1963).

### 3.6 Extraktion von Cardiolipinen

Die Extraktion der Cardiolipine aus den gewonnenen Proben erfolgte in modifizierter Form nach Folch, wobei es zu einer totalen Lipidextraktion kommt (FOLCH et al., 1957).

Gewonnene Pellets wurden zunächst in 1 ml PBS resuspendiert. Die flüssigen Überstandsproben wurden direkt verwendet.

Im ersten Schritt wurden zu 10  $\mu\text{l}$  jeder Probe 50 ng  $(\text{C14:0})_4\text{-CL}$  (Tetramyristinsäure-Cardiolipin) gegeben. Dieses diente als interner Standard für die nachfolgende HPLC-MS/MS-Messung.

Die Extraktion erfolgte durch Zusatz von 4,2 ml Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 (v/v). Das Extraktionsmittel enthielt außerdem 0,05 Vol.-% Hydroxyethylbutanol zum Oxidationsschutz. Durch Zugabe von 0,8 ml 0,01 M Salzsäure, 5-minütiges Schütteln, sowie

Zentrifugation kam es zur Ausfällung von Protein und zur Separation von wässriger (Methanol) und hydrophober Phase (Chloroform). Danach wurde die wässrige Methanolhaltige Phase entfernt. Damit blieb die organische Chloroformphase übrig. Diese wurde schließlich unter Stickstoffatmosphäre vollständig eingetrocknet.

Zur Wiederaufnahme der eingetrockneten Probe wurden 2 ml Methanol, 1 ml Chloroform, sowie 1 ml 0,1 M Salzsäure zur Säuerung hinzu gegeben. Nach intensivem Schütteln wurde eine 5 Minuten lange Inkubationszeit in eiskalter Umgebung abgewartet. Schließlich wurden noch einmal 1 ml Chloroform und 1 ml 0,1 M Salzsäure hinzugegeben.

Erneut erfolgte eine Einengung der organischen Phase in Stickstoffatmosphäre. Zum Schluss wurde die Probe dann in einem Chloroform-/Methanol-/Wassergemisch im Verhältnis 50/45/5 (v/v/v) gelöst. Um größere Partikel zu entfernen, die die Funktionalität der HPLC-Säule beeinträchtigt hätten, erfolgte noch eine Filterung durch einen 0,2 µm PTFE-Filter.

### **3.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

Zur Analyse der Cardiolipine wurde eine Kombination aus Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) verwendet. Die Untersuchungen wurden gekoppelt durchgeführt, so dass MS/MS als Detektormethode für die HPLC eingesetzt wurde.

Verwendet wurde ein Surveyor HPLC-System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Das Trennprinzip in der Flüssigkeitschromatographie beruht auf den molekularen Wechselwirkungen unterschiedlicher Analyt-Moleküle mit einer stationären Phase, wodurch es zu verschiedenen Retentionszeiten kommt (siehe Abbildung 11).

Der Eluent (mobile Phase) wird unter Druck gesetzt. Am Injektor wird die Probe zugeführt. Zur Überführung vom Atmosphärendruck in das Hochdrucksystem wird ein 6-Wege-Ventil verwendet, das die Einspeisung ohne Druckverlust ermöglicht.

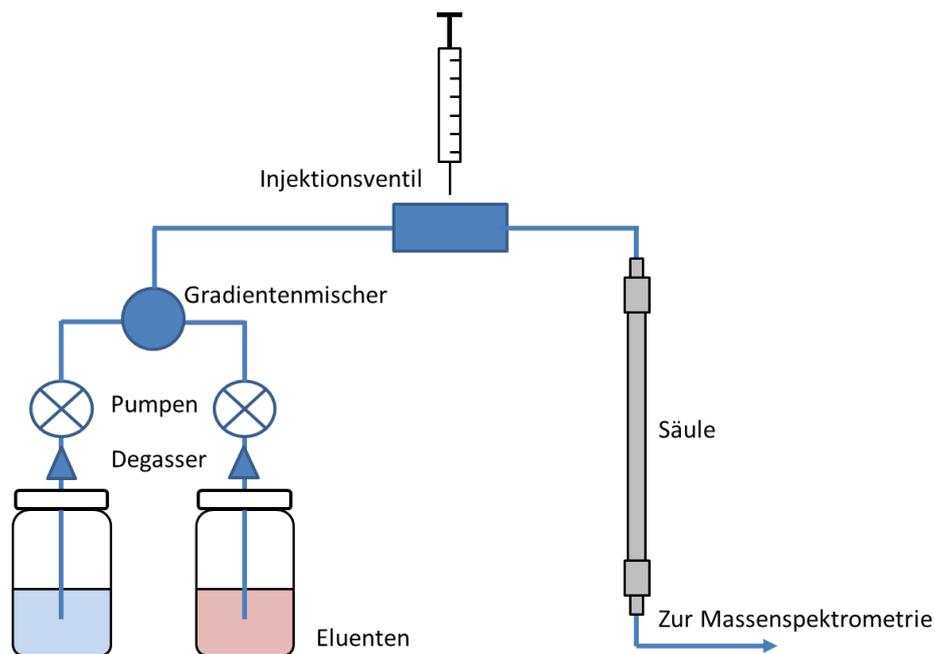
Die mobile Phase mit der zu untersuchenden Probe gelangt schließlich in die Säule (LiCrospher60, Merck, Darmstadt, Deutschland), in der sie auf die stationäre Phase trifft. Diese besteht aus feinporigem Kieselgel mit 5 µm Teilchen-Durchmesser.

Durch zeitliche Veränderungen der Lösungsmittelkonzentration wurde ein Gradient erzeugt (siehe Tabelle 3). Dieser hat eine schnellere Trennung, so wie eine höhere Trennschärfe zur Folge (HARRIS et al., 2014). Dazu wurde das Lösungsmittel in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Als Lösungsmittel A wurde Chloroform, als Lösungsmittel B Methanol/Wasser 9/1 (v/v). Beide Lösungsmittel enthielten 0,1 ml/l Ammoniakwasser (25 % (v/v)) als Additiv zur Ionenbildung in der anschließenden Massenspektrometrie.

Der zeitliche Verlauf des Konzentrationsgradienten war wie folgt konfiguriert:

<b>Zeitintervall [min]</b>	<b>Lösungsmittel</b>
<b>0,0 - 0,2</b>	<b>92 % A + 8 % B</b>
<b>0,2 - 4,5</b>	<b>92-30 % A + 8-70 % B</b>
<b>4,5 - 6,0</b>	<b>30 % A + 70 % B</b>
<b>6,0 - 6,5</b>	<b>30-92 % A + 70-8 % B</b>
<b>6,5 - 11,0</b>	<b>92 % A + 8 % B</b>

**Tabelle 3:** Gradientenschema für die Lösungsmittel A (Chloroform) und B (Methanol/Wasser 9:1 (v/v)). Die Ermittlung der Zeiten erfolgte durch Vorversuche mit Dünnschichtchromatographie.



**Abbildung 11:** Aufbau der HPLC mit Gradientenelution.

Die Flussrate des Eluenten war 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Arbeitstemperatur betrug 8 °C. Das Eluat zwischen 0,3 und 6 Minuten wurde zur Detektion in das Massenspektrometer überführt. Dieses Zeitintervall wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Phospholipid-Standardlösungen ermittelt. Es umfasst die gemessene Elutionszeit für Cardiolipine. Mit dieser Vorgehensweise konnte die Aufnahme anderer Phospholipide in das Massenspektrometer eingeschränkt werden (MARTENS et al., 2015).

### 3.8 Massenspektrometrie

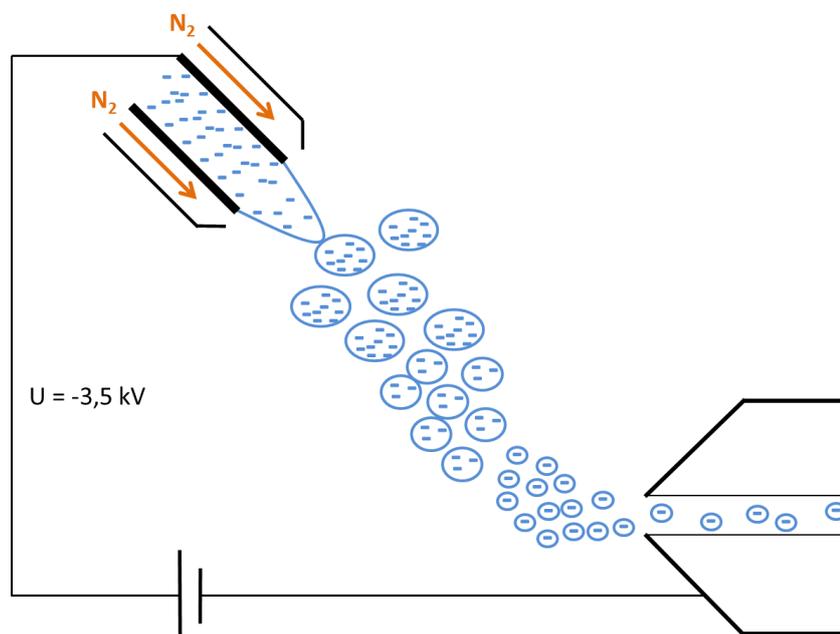
Massenspektrometrie (MS) ist ein Verfahren zur quantitativen und qualitativen Detektion von Molekülen. Durch Ionisierung entstehen je nach Molekül-Art Ionen mit bestimmten Masse-zu-Ladung-Verhältnissen  $m/q$ . In Analysatoren werden Ionen mit unterschiedlichen  $m/q$  selektiert und getrennt detektiert.

### 3.8.1 Elektrospray-Ionisation

Das verwendete Massenspektrometer (TSQ Quantum Discovery Max, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) erzeugt Ionen durch Elektrospray-Ionisation mit Beheizung der Sprühkapillare (HESI). Da es sich bei Cardiolipinen um saure Moleküle handelt, werden negativ geladene Ionen erzeugt. Dabei bilden sich aus den zu untersuchenden Molekülen mit der Masse  $M$ , deprotonierte, doppelt-negativ geladene Molekül-Ionen mit dem Verhältnis  $\frac{m}{q} = \frac{(M-2H)^{2-}}{2}$ . Diese werden im Folgenden auch als „Mutter-Ionen“ bezeichnet.

Das Verfahren wird den *sanften Ionisationstechniken* zugerechnet. Für die Untersuchung von organischen Phospholipid-Molekülen ist es sehr geeignet, weil die Moleküle zwar ionisiert, aber weitgehend nicht weiter fragmentiert werden (YAMASHITA, FENN, 1984). Bei der HESI wird der Analyt in seiner wässrigen Lösung zusammen mit einem heißen Vernebelungsgas (Stickstoff) durch eine Sprühkapillare geführt. Diese war in den durchgeführten Untersuchungen zur Verdampfung des Lösungsmittels auf 375 °C temperiert. Die Kapillare war gegenüber einer Gegenelektrode mit -3,5 kV geladen. Aufgrund des elektrischen Feldes zwischen Sprühkapillare und Gegenelektrode bildet sich ein sogenannter Taylor-Konus aus negativ geladenen Teilchen. Dieser verjüngt sich. An der Spitze kommt es schließlich zu einer strahlförmigen Bewegung geladener Tröpfchen hin zur Gegenelektrode (Abbildung 12). Dabei ordnet sich die negative Ladung auf der Tröpfchenoberfläche an. Im Verlauf des Fluges verkleinert sich der Radius. Sobald die Tröpfchen so klein sind, dass in ihnen eine kritische Ladungsmenge (Rayleigh-Limit) enthalten ist, zerreißen sie aufgrund der Coulombabstoßung, die nun den Zusammenhalt durch die Oberflächenspannung übersteigt. Die entstandenen kleineren Tröpfchen verkleinern sich erneut, bis es wieder zu einer Teilung kommt (TAFLIN et al., 1989). Dieser Vernebelungsprozess schreitet so lange fort, bis schließlich nur noch Ionen übrig bleiben.

Die Ionisierung per HESI erfolgt unter atmosphärischem Druck. Die Teilchen werden durch eine negativ geladene Ionen transferkapillare (-30 V) geführt, dabei durch Ionenoptiken fokussiert und über eine Druckschleuse (Skimmer) in ein Hochvakuum überführt. Hier beginnt der eigentliche Analyseprozess.

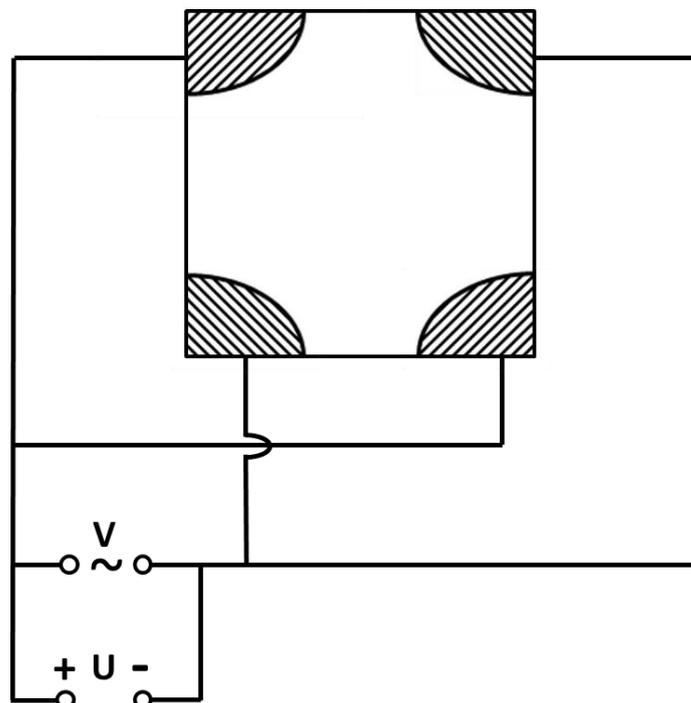


**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisierung. Aus der beheizten, negativ geladenen Sprühkapillare tritt der Analyt aus. Dazu wird Stickstoff als Vernebelungsgas verwendet. Aus dem entstandenen Taylor-Konus lösen sich Tröpfchen heraus, die im Verlauf des Fluges hin zur Gegenelektrode immer kleiner werden. Letztendlich erreichen Ionen die Gegenelektrode, die dann durch eine Ionentransferkapillare in die Ionenoptik und das Hochvakuumssystem eingekoppelt werden.

### 3.8.2 Analysatoren

Der Ionenstrahl wird in einen vier-poligen Massenfilter (Quadrupol) eingekoppelt (Abbildung 13). Dieser besteht aus vier Stäben, die jeweils um 90° zueinander versetzt sind und auf der Innenseite eine hyperbolische Oberfläche haben. Gegenüberliegende Stäbe sind elektrisch gekoppelt. Zwischen den Stabpaaren werden sowohl eine Hochfrequenz-Wechselspannung (V), als auch eine Gleichspannung (U) angelegt.

Die Trajektorie, die die Ionen mit einem bestimmten Verhältnis  $m/q$  im elektrischen Feld durchlaufen, wird durch die angelegten Spannungen U und V beschrieben. Es existieren Werte, mit denen die Ionen auf stabilen Bahnen oszillierend den Quadrupolfilter passieren können. Außerdem können durch die Wahl von U und V instabile Bahnen entstehen, durch die es zur Kollision mit den Stäben oder zum Austritt aus dem Quadrupol kommt. In diesem Fall verlässt das Ion den Analysator nicht und wird somit eliminiert.



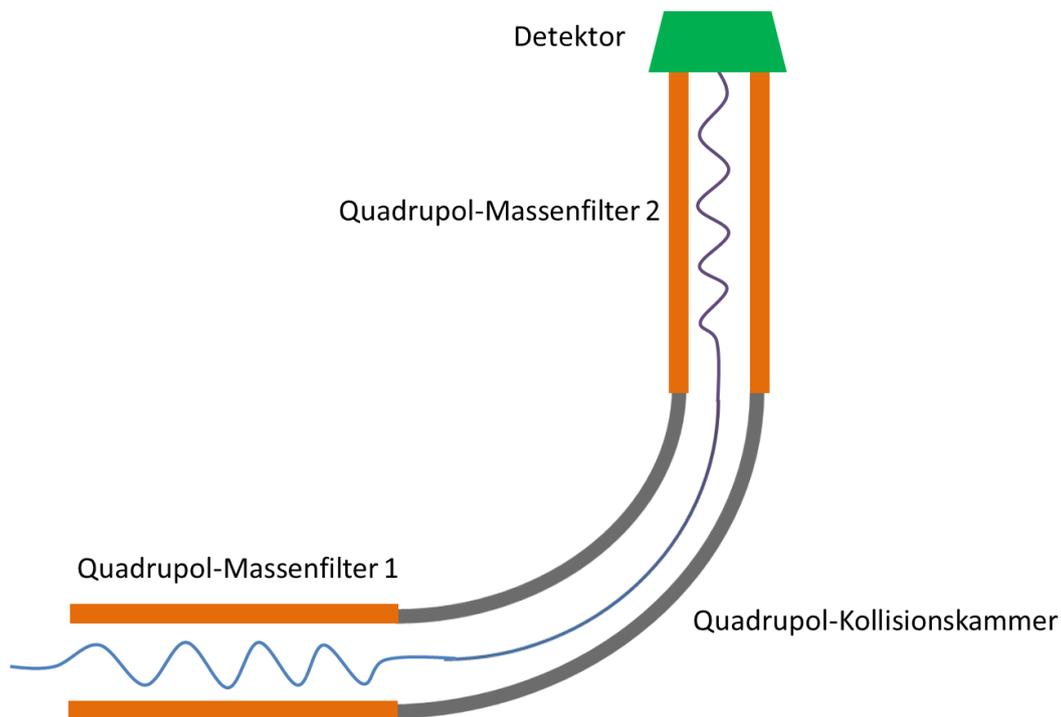
**Abbildung 13:** Querschnitt des Quadrupol-Massenfilters und Schaltskizze. V bezeichnet die Wechselspannung und U die Gleichspannung.

Die Untersuchungen wurden im Tandem-Verfahren (MS/MS) durchgeführt. Dazu waren zwei Masseanalytoren hintereinander geschaltet, zwischen denen sich eine argongefüllte Kollisionskammer befand (1,5 mTorr; siehe Abbildung 14).

Die Untersuchungen erfolgten mit *Selected Reaction Monitoring*. In diesem Modus werden zum Nachweis einzelner Cardiolipin-Spezies Mutter-Ionen einer bestimmten Masse im ersten Analysator selektiert und zur Kollision gebracht. Dadurch kommt es zur Fragmentierung mit Entstehung von Tochter-Ionen (Fettsäuren), deren Masse ebenfalls bekannt ist. Diese werden nun im zweiten Analysator gefiltert und detektiert. Mit diesem Verfahren konnte abgesehen von wenigen Fällen, die nicht einer eindeutigen CL-Spezies zuzuordnen waren (siehe Tabellen), eine sehr präzise Massenbestimmung der 17 häufigsten Cardiolipin-Spezies erreicht werden. Die Kollisionsenergie war auf 36 eV justiert. Frühere Experimente haben gezeigt, dass Energie in diesem Bereich geeignet ist, um Tochterfragmente der CL-Spezies zu erzeugen (SCHILD et al., 2012).

Beispiel zum SRM: Tetra-Linoleoyl-Cardiolipin,  $(C18:2)_4$ , bildet durch Elektrospray-Ionisation Mutter-Ionen mit  $\frac{(M-2H)^{2-}}{2} = 723,6$  kg/C. Diese wurden im ersten Analysator selektiert. In der Kollisionskammer entstanden dann Linolsäure-Tochter-Ionen mit 279,2 kg/C. Diese wurden schließlich im zweiten Massenfilter selektiert und detektiert. Anhand dieses Massenüberganges war in diesem Fall die Spezies  $(C18:2)_4$  eindeutig identifizierbar.

Mit entsprechenden Massenwerten wurden die anderen Cardiolipin-Spezies bestimmt.



**Abbildung 14:** MS/MS-Tandem. Die durch den ersten Massenfilter selektierten Mutter-Ionen werden in der Kollisionskammer fragmentiert. Die Tochter-Ionen werden schließlich im zweiten Massenfilter gefiltert und detektiert.

Der interne Standard diente als Referenz, um Extraktions-Fehler in den Messungen auszugleichen. Verwendet wurde  $(C14:0)_4$ -CL (Tetramyristinsäure-Cardiolipin).

Da nicht für jede Cardiolipin-Spezies ein Standard vorhanden war, wurden die einzelnen Spezies als Kompromiss auf  $(C18:2)_4$  bezogen, das den meisten Spezies ähnlicher ist, als der interne Standard. Dazu wurde zunächst eine Eichkurve für  $(C18:2)_4$  erzeugt. Der Begriff „Gesamt-Cardiolipin“ bezeichnet damit die Summe der gemessenen Cardiolipine mit Bezug auf  $(C18:2)_4$ -CL und nicht die reale Summe aller vorkommenden Cardiolipine in der Probe.

Dieses Verfahren hat sich bei vorherigen Untersuchungen mit einer hohen Wiederfindungsrate bewährt (WISWEDEL et al., 2010). Die Messungen erfolgten jeweils in dreifacher Bestimmung.

### 3.9 Statistische Analysen

Zur statistischen Auswertung wurden Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Die Daten sind (soweit nicht anders angegeben) als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Einzelne Vergleiche wurden als Student's T-Test durchgeführt, wobei  $p < 0,05$  als signifikant angenommen wurde. In die Auswertung der Hypoxie-/Reoxygenierungs-Untersuchung wurden die Daten von 10 Experimenten eingeschlossen. In der Ischämie-/Reperfusionstudie waren es 6 Experimente.

Zur statistischen Analyse wurde die Beratung des Instituts für Biometrie und Medizinische Informatik der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (IBMI) in Anspruch genommen.

### 3.10 Übersicht über verwendete Geräte und Materialien

Die Tabellen 4,5 und 6 zeigen eine Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien.

#### 3.10.1 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller	Ggf. Bezeichnung
<b>Infusionssysteme</b>	B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Intrafix Primeline
<b>Pipettenspitzen (verschiedene Größen)</b>	Eppendorff AG, Hamburg, Deutschland	03-033-0100, 03-013-0103, 03-023-0101
<b>Probengefäße (1,5 ml)</b>	Eppendorff AG, Hamburg, Deutschland	3810 X

<b>Skalpelle</b>	B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Sterilskalpell
<b>Tupfer</b>	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland	Pur-Zellin 143 212/3
<b>Venenverweilkanülen 14 GA</b>	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA	BD Venflon Pro Safety / 393230
<b>Venenverweilkanülen 16 GA</b>	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA	BD Venflon Pro Safety / 393229

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

### 3.10.2 Chemikalien

Artikel	Hersteller	Ggf. Bezeichnung
<b>Acetyl-CoA</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	K-5054
<b>ADP</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	A0752
<b>CaEGTA</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	124H5711
<b>CARBOGEN 5% CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub></b>	Air Liquide, Paris, Frankreich	301044
<b>Chloralhydrat</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	K 318
<b>Chloroform (&gt; 99%)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	C 2234
<b>Coomassie Brilliant Blue</b>	BioRad, Hercules, California, USA	161-0436
<b>DTNB</b>	Abnova GmbH, Heidelberg, Deutschland	ABN-H00001838-R04-10
<b>Glutamat</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	G1251

<b>KCl</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	76H10395
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	P0662
<b>Malat</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	W237418
<b>Methanol (99,8%)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	322415
<b>MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	M 7774
<b>NaCl</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3957.1
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	123H08675
<b>Oxalacetat</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	O-4126
<b>Proteinstandard</b>	BioRad, Hercules, California, USA	1610303
<b>Tris-HCl</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	T-8529
<b>Tetramyristinsäure-Cardiolipin</b>	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama, USA	63988-20-5

Tabelle 5: Chemikalien

### 3.10.3 Geräte

Gerät	Hersteller	Ggf. Bezeichnung
<b>Föhn</b>	Braun Procter & Gamble Service GmbH, Schwalbach am Taunus, Deutschland	Silencio plus
<b>Heizpumpe</b>	Haake PSL Systemtechnik GmbH, Osterode	E52

	am Harz, Deutschland	
<b>Homogenisator</b>	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden, Deutschland	
<b>HPLC-Gerät</b>	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	Finnigan Surveyor
<b>HPLC-Säule</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland	LiCrospher Si60
<b>Küvetten (Photometer)</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland	67.742
<b>Magnetrührer</b>	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland	Ikamag Ret
<b>Massenspektrometer</b>	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA	TSQ Quantum Discovery Max
<b>Mikroskop</b>	Zeiss, Jena, Deutschland	Axio-Imager M1
<b>Oxygraph</b>	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich	Fiber-Lite HI-150R
<b>pH-Meter</b>	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland	pH320
<b>Photometer</b>	Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, California, USA	Cary 1 E
<b>Pipetten</b>	Eppendorff AG, Hamburg, Deutschland	Research
<b>Rollerpumpe Perfusionsmedium</b>	Ismatec, Wertheim, Deutschland	ISM 831
<b>Rollerpumpe Zellfraktionierung</b>	Pharmacia, Uppsala, Schweden	LKB Pump P1
<b>Routinelabor-Automat</b>	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz	Cobas 6000
<b>Thermometer</b>	VEB MLW, Leipzig, Deutsche Demokratische Republik	EBR
<b>Infusionspumpe</b>	Doltron, Uster, Schweiz	PIM 303
<b>Vortex</b>	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA	Vortex Genie 2
<b>Waage</b>	Sartorius, Göttingen, Deutschland	Kern
<b>Wärmeblock</b>	Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, UK	Block heater SBH 130
<b>Wasseraufbereiter</b>	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	Milli-Q Synthesis A10
<b>Zentrifuge Gradientenzentrifugation</b>	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland	Biofuge fresco
<b>Zentrifuge Mitochondrienpräparation</b>	Du Pont Instruments, Wilmington, Delaware, USA	Sorvall RD-58
<b>Zentrifuge MS- Probenaufarbeitung</b>	Hettich, Tuttlingen, Deutschland	Universal 320R
<b>Zentrifuge Versuch 2</b>	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland	Biofuge pico

Tabelle 6: Geräte

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Experimente mit Ischämie- und Reperfusion in-situ

#### 4.1.1 Ergebnisse der klinisch-chemischen Untersuchungen

Im Perfusionsexperiment wurde das Efluat aus der Vena cava inferior klinisch-chemisch im Hinblick auf Routine-Parameter einer Leberschädigung hin untersucht (GIANNINI, 2005). Die Ergebnisse (siehe Tabelle 7) verdeutlichen qualitativ und exemplarisch die Schädigung des Gewebes durch Ischämie im Gegensatz zum Kontrollexperiment. Es wurde dazu in zwei Experimenten Perfusionsmedium zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen.

Experiment	Zeit nach Perfusionsbeginn (Minuten)	ASAT ( $\mu\text{mol}/(\text{sl})$ )	GLDH ( $\mu\text{mol}/(\text{sl})$ )	LDH ( $\mu\text{mol}/(\text{sl})$ )
Kontrolle 1	10	0,02	3	0,03
	50	0,01	1	0
Kontrolle 2	10	0	2	0,03
	50	0	3	0,04
I/R 1	10	0,01	3	0
	50	0,13	24	0,64
I/R 2	10	0,01	5	0,03
	50	0,1	13	0,25

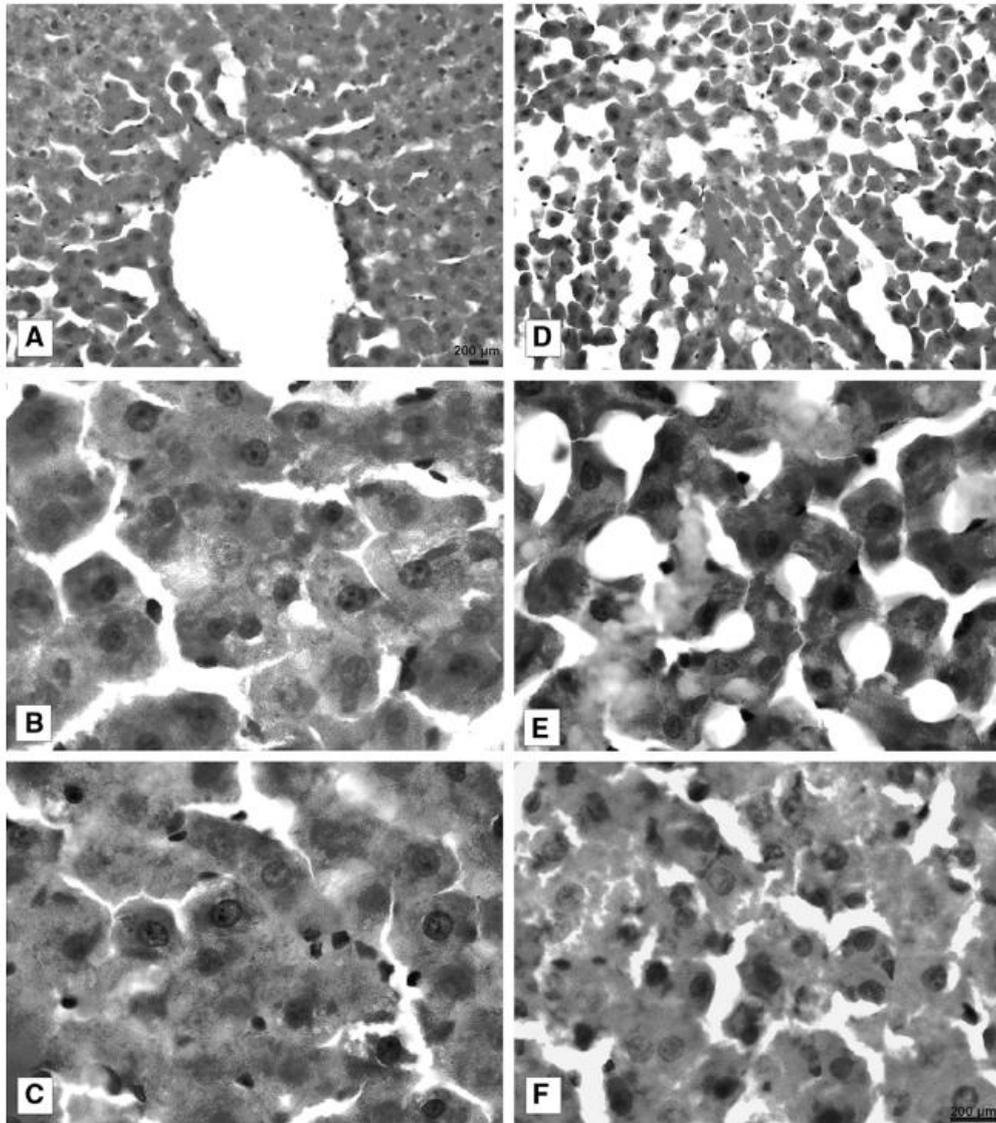
**Tabelle 7:** Darstellung von exemplarischen Laboruntersuchungen zur Verdeutlichung einer hepatischen und insbesondere mitochondrialen Schädigung durch Ischämie und Reperfusion. Einer Erhöhung von LDH ist mit der Zerstörung von Zellmembranen assoziiert. ASAT und GLDH sind Parameter, die auf eine mitochondriale Schädigung hindeuten. I/R = Ischämie / Reperfusion. Aus MARTENS et al., 2015.

In den Ischämie/Reperfusionsexperimenten lässt sich im Vergleich zu den Kontrollen grundsätzlich ein Anstieg zellulärer Enzymaktivitäten im Efluat beobachten. Hierdurch kann von einem erheblichen Schaden sowohl der Zellmembranen der Hepatozyten (repräsentiert durch den LDH-Wert), als auch der Mitochondrien (ASAT, GLDH) ausgegangen werden.

#### 4.1.2 Histologische Untersuchungen

Abbildung 15 zeigt ein repräsentatives histologisches Bild von Lebergewebe in verschiedenen Vergrößerungen. Es ist ein deutlicher morphologischer Unterschied zwischen

Ischämie / Reperfusion und dem Kontrollexperiment erkennbar. Die Zellen sind geschrumpft und vereinzelt. In Abbildung 15 F lassen sich bei stärkerer Vergrößerung auch nicht-geschädigte Bereiche erkennen.

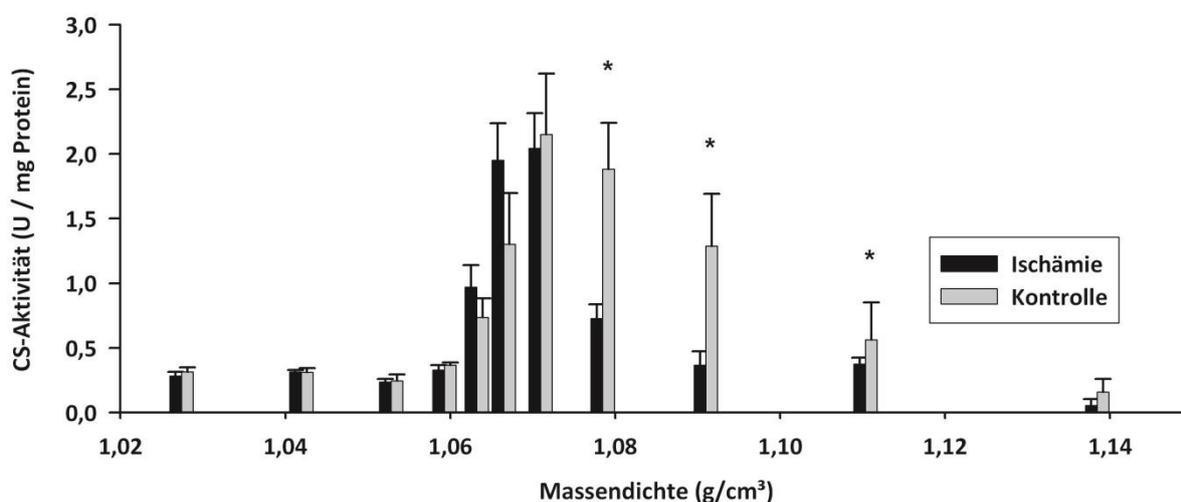


**Abbildung 15:** Licht-mikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe. A-C zeigen die Kontrolluntersuchung. D-F: Ischämie und Reperfusion. A und D: 15-fache Vergrößerung. Übrige Bilder: 32-fache Vergrößerung (MARTENS et al., 2015).

#### 4.1.3 Verteilung von Citrat-Synthase-Aktivität und Cardiolipin-Gehalt in zellulären Fraktionen

Die folgenden Abbildungen stellen eine Verbindung zwischen der gemessenen Citratsynthase-Aktivität als mitochondrienspezifischem Marker und dem Gesamt-

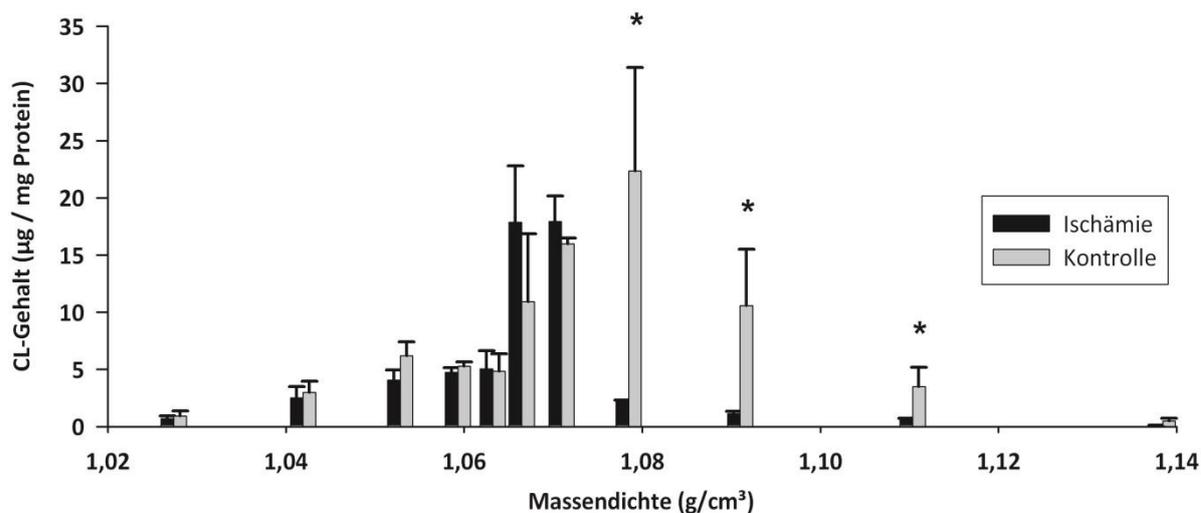
Cardiolipin-Gehalt her. Das Maximum der CS-Aktivität im Kontrollexperiment ist im Fraktionspool  $F_{21-24}$  mit  $\rho = 1,071 \text{ g/cm}^3$  zu finden (Abbildung 16). In diesem wird daher der höchste Gehalt an Mitochondrien vermutet. Im Falle von Ischämie und Reperfusion ergab sich eine tendenzielle Verschiebung des gesamten Citratsynthase-Profiles hin zu einer niedrigeren Dichte. Das Maximum liegt in diesem Fall bei ungefähr  $1,068 \text{ g/cm}^3$ . Die Summation der gesamten Citratsynthase-Aktivität ergibt im Falle von Ischämie und Reperfusion eine Reduktion um 17 % gegenüber den Kontrollexperimenten.



**Abbildung 16:** Citratsynthase-Aktivität der Fraktionen für Ischämie und Kontrolle. Darstellung:  $MW \pm SEM$ . \*:  $p < 0,05$ . Abb. nach MARTENS et al., 2015.

Die Dichte-Verteilung des Gesamtcardiolipins (Abbildung 17) hat in der Kontrolle ihren Maximalwert im Bereich zwischen  $1,071$  und  $1,078 \text{ g/cm}^3$ . Dieses verschob sich bei I/R auf etwa  $1,07 \text{ g/cm}^3$ . Damit ähneln sich die Profile von CS und CL.

Der aus allen Fraktionen summierte Gesamtcardiolipin-Gehalt ist bei Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Kontrolle um 30 % reduziert.

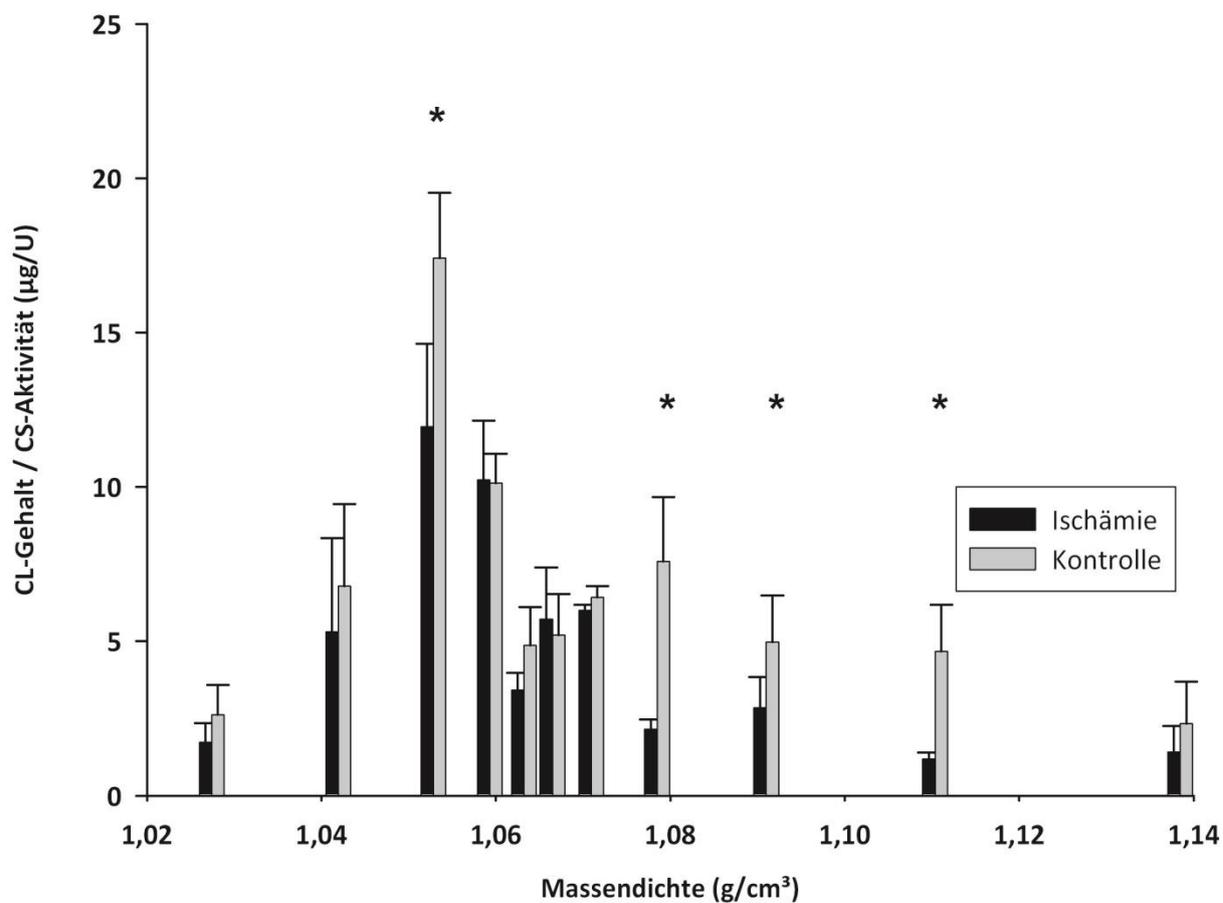


**Abbildung 17:** Gesamt-Cardiolipin-Gehalt der Fraktionen jeweils für Ischämie und Kontrolle. Darstellung: MW  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ . Abb. nach MARTENS et al., 2015.

Abbildung 18 zeigt das Verhältnis von Cardiolipin zu Citratsynthase-Aktivität der einzelnen Fraktionen, das durch Quotientenbildung ermittelt wurde, für beide Bedingungen. Im Falle der Kontrolle war dieses im Bereich von  $1,063 \text{ g/cm}^3$  bis ca.  $1,11 \text{ g/cm}^3$  jeweils ungefähr  $5,57 \pm 0,48 \text{ µg/U}$ .

Bei einer Dichte von  $1,053 \text{ g/cm}^3$  war der Wert mit  $17,42 \pm 2,11 \text{ µg/U}$  in etwa dreimal so groß.

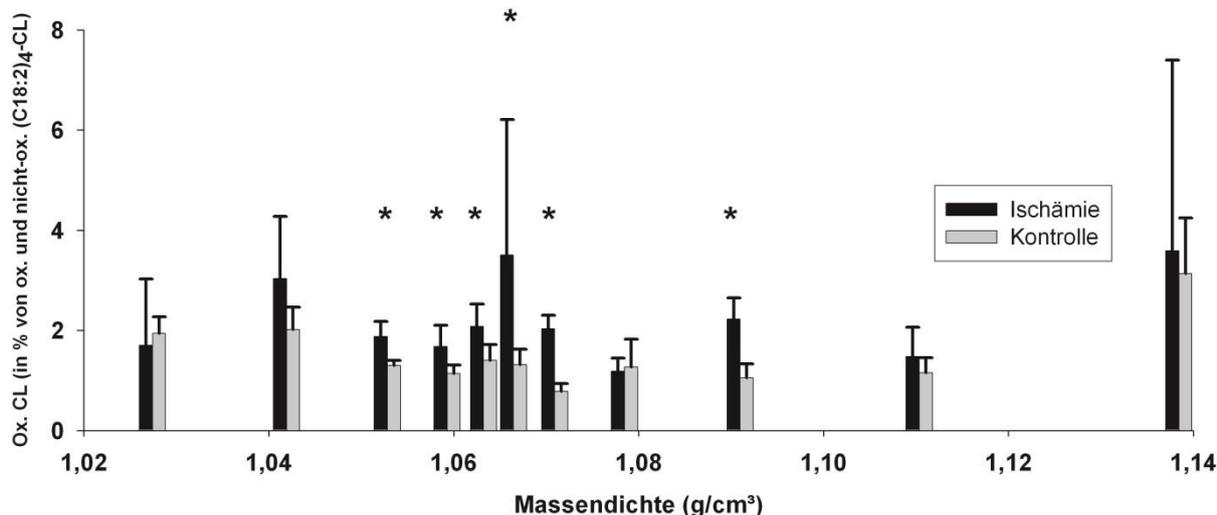
Den stärksten Einfluss auf das Verhältnis CL/CS hatte I/R im Bereich höherer Dichte. Hier kam es teilweise zu einer signifikanten Reduktion.



**Abbildung 18** : Verhältnis von CL-Gehalt mit Bezug auf (C18:2)4-CL zu CS-Aktivität der Fraktionen jeweils für Ischämie und Kontrolle. Darstellung: MW  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ . Abb. nach MARTENS et al., 2015.

#### 4.1.4 Verteilung von oxidiertem Cardiolipin

Zur Beurteilung des durch Ischämie und Reperfusion hervorgerufenen oxidativen Stresses wurde der Oxidationsstatus der Cardiolipine ermittelt (siehe Kapitel 4.2.2). Abbildung 19 zeigt den Vergleich der beiden Bedingungen.



**Abbildung 19** : Oxidiertes Cardiolipin der Fraktionen jeweils für Ischämie und Kontrolle. Darstellung: MW  $\pm$  SEM des Anteils am gesamten CL der Spezies C(18:2)<sub>4</sub>. \*:  $p < 0,05$ . Abb. nach MARTENS et al., 2015.

Es wurde eine signifikante Erhöhung des Anteils an oxidiertem CL in der I/R-Bedingung gegenüber der Kontrolle in den Fraktionen mit folgenden Massendichtewerten gefunden: 1,091; 1,071; 1,066; 1,063; 1,059 und 1,053 g/cm<sup>3</sup>.

#### 4.1.5 Effekte von Ischämie und Reperfusion auf die Verteilung molekularer CL Spezies

##### *Analyse der CL-Zusammensetzung in den Mitochondrienfraktionen beider Bedingungen*

Verglichen wurden die beiden mitochondrienhaltigen Fraktionen ( $\rho = 1,071$  g/cm<sup>3</sup> in der Kontrolle und 1,066 g/cm<sup>3</sup> bei I/R). Diese wurden durch das jeweilige Maximum der Citratsynthase-Aktivität identifiziert. Zwischen H/R und Kontrolle konnte kein signifikanter Unterschied des Gehaltes der häufigsten drei CL-Spezies (C(18:2)<sub>4</sub>-CL, (C(18:2)<sub>3</sub>/C18:1-CL und (C(18:2)<sub>2</sub>(C18:1)<sub>2</sub>-CL festgestellt werden. Lediglich der Gehalt an Spezies, die Palmitinsäure (C16:0, gesättigt) enthielten, zeigte einen Trend zu leichter Erhöhung bei I/R (siehe Tabelle 8).

### Analyse der CL-Zusammensetzung bei identischer Dichte in beiden Bedingungen

Die Behandlung mit I/R führte bei der Fraktion mit der Dichte  $\rho = 1,078 \text{ g/cm}^3$  zu einer erheblichen Reduktion des Gesamt-CL-Gehaltes gegenüber der Kontrolle. Diese Fraktion wurde deshalb ebenso im Hinblick auf die Verteilung der Spezies in den Bedingungen Kontrolle und I/R untersucht. Dabei wurden signifikante Unterschiede für den Anteil einiger CL-Spezies gefunden. Diese sind in Tabelle 8 markiert. Auffallend ist, dass die Spezies, deren Gehalt durch I/R signifikant Anstieg, palmitinsäurehaltig waren (C16:0, gesättigt).

Signifikante Verluste hingegen waren nur für Cardiolipine zu beobachten, die die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (C18:1) und Linolsäure (C18:2) enthielten.

CL-Spezies	Jeweilige Mitochondrien-Fraktion		Fraktion mit $\rho = 1,078 \text{ g/cm}^3$	
	Kontrolle (1,071 $\text{g/cm}^3$ )	I/R (1,066 $\text{g/cm}^3$ )	Kontrolle	I/R
(C18:2) <sub>4</sub> -CL	38,859 ± 2,248	39,177 ± 3,737	39,18 ± 1,21	35,2 ± 4,97
(C18:2) <sub>3</sub> /C18:1-CL	28,473 ± 1,855	25,883 ± 1,162	27,5 ± 0,74	22,88 ± 2,03*
(C18:2) <sub>2</sub> /(C18:1) <sub>2</sub> -CL	9,730 ± 0,345	8,612 ± 0,472	9,05 ± 0,28	7,92 ± 0,48*
C18:2/C18:1/(C16:0) <sub>2</sub> -CL	0,174 ± 0,081	0,274 ± 0,086	0,41 ± 0,24	0,45 ± 0,14
(C18:1) <sub>2</sub> /(C16:0) <sub>2</sub> -CL	0,679 ± 0,152	2,154 ± 1,637	0,76 ± 0,13	5,27 ± 2,33*
(C18:2) <sub>3</sub> /C16:1-CL	4,738 ± 0,919	4,103 ± 0,338	4,67 ± 0,29	3,83 ± 0,36
(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C16:1-CL o. (C18:2) <sub>3</sub> /C16:0-CL	3,270 ± 0,637	2,921 ± 0,482	3,58 ± 0,40	2,91 ± 0,43
(C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C16:1-CL o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C16:0-CL	1,529 ± 0,189	1,585 ± 0,390	1,53 ± 0,12	1,81 ± 0,41
(C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C16:0-CL	0,677 ± 0,187	0,856 ± 0,270	0,77 ± 0,16	1,14 ± 0,34
(C18:1) <sub>3</sub> /C16:0-CL	0,330 ± 0,122	1,617 ± 1,294	0,60 ± 0,21	3,50 ± 1,61*
(C18:1) <sub>2</sub> /(C18:3) <sub>2</sub> -CL	0,115 ± 0,071	0,217 ± 0,036	0,21 ± 0,08	0,28 ± 0,05
(C18:1) <sub>3</sub> /C18:2-CL	1,582 ± 0,274	1,577 ± 0,266	1,61 ± 0,09	1,64 ± 0,31
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:4-CL	1,005 ± 0,402	1,207 ± 0,033	1,12 ± 0,32	1,36 ± 0,25
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:3-CL o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:4-CL	2,997 ± 0,637	3,211 ± 0,172	2,64 ± 0,25	3,70 ± 0,63
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:2-CL o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:3-CL	3,746 ± 0,483	4,167 ± 0,232	3,96 ± 0,42	4,98 ± 0,97
(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:2-CL	1,697 ± 0,215	1,939 ± 0,135	1,84 ± 0,42	2,34 ± 0,54
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:0-CL-CL o. (C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C20:2-CL	0,390 ± 0,215	0,490 ± 0,056	0,56 ± 0,21	0,78 ± 0,24

**Tabelle 8:** Differentielle Analytik der Verteilung verschiedener Cardiolipin-Spezies. Angaben in % der Gesamt-Cardiolipin-Masse bezogen auf (C18:2)<sub>4</sub>-CL. \* = Es existiert ein signifikanter Unterschied zum Kontrollexperiment ( $p < 0,05$ , T-Test). Aus MARTENS et al., 2015.

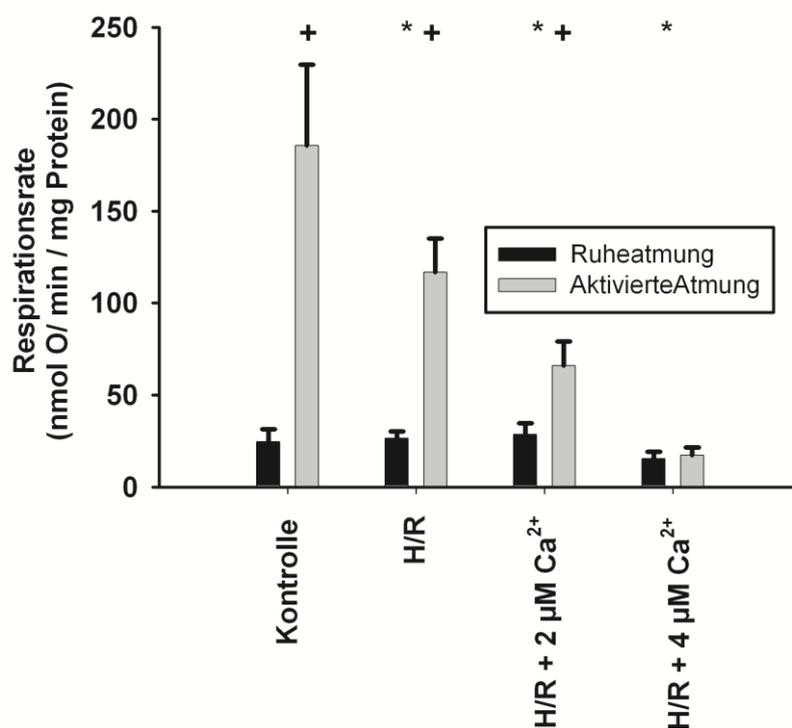
## 4.2 Hypoxie-/Reoxygenierungs-Experimente mit isolierten Mitochondrien

### 4.2.1 Effekte von Hypoxie / Reoxygenierung und $\text{Ca}^{2+}$ auf die mitochondriale Atmung

Es wurden insgesamt 6 Mitochondrienpräparationen durchgeführt. Der Ablauf der Hypoxie und Reoxygenierung gestaltete sich wie in Kapitel 3.3 beschrieben. Es existierten 4 Bedingungen:

- Kontrolle
- H/R
- H/R + 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$
- H/R + 4  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$

Die Atmungsaktivität wurde ermittelt, indem der Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit gemessen wurde. Durch Quotientenbildung erfolgte jeweils der Bezug zum Proteingehalt des Mitochondrienpräparates als Indikator für die Anzahl der enthaltenen Mitochondrien.



**Abbildung 20:** Respirationsraten der 4 verschiedenen Bedingungen. \* = Signifikanter Unterschied zur aktivierten Atmung der Bedingung "Kontrolle". + = Differenz zwischen Ruheatmung und aktivierter Atmung der jeweiligen Bedingung ist signifikant. Nach MARTENS et al., 2014.

Abbildung 20 zeigt das folgende Resultat: In den Bedingungen Kontrolle, H/R und H/R + 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  war die Aktivität der Ruheatmung signifikant kleiner als die der jeweiligen

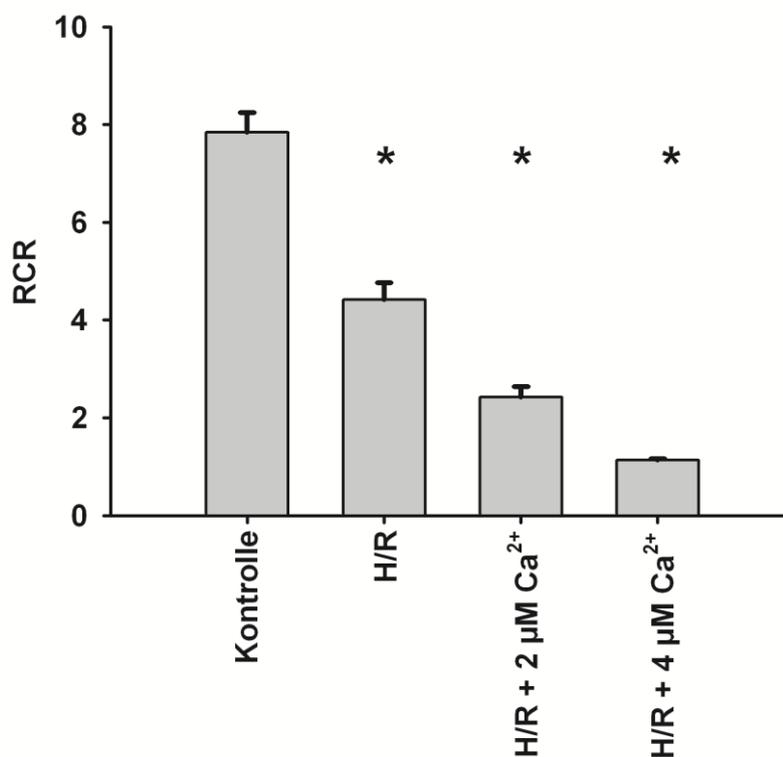
aktivierten Atmung ( $p < 0,05$ ; T-Test). Unter dem Einfluss von  $4 \text{ mM Ca}^{2+}$  konnte dieser Unterschied nicht nachgewiesen werden. Es kam also in Folge der Calcium-Überladung nicht mehr zu einer Aktivierung der Atmung.

Die aktivierte Atmung in den Bedingungen H/R, H/R +  $2 \text{ } \mu\text{M Ca}^{2+}$  und H/R +  $4 \text{ } \mu\text{M Ca}^{2+}$  war gegenüber der Kontrollbedingung jeweils signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ; T-Test).

Die Ruheatmung in den Bedingungen H/R und H/R +  $2 \text{ } \mu\text{M Ca}^{2+}$  wurde gegenüber der Kontrollbedingung nicht durch Hypoxie / Reoxygenierung, beeinflusst. Die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkte erst ab  $4 \text{ } \mu\text{M Ca}^{2+}$  eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ , T-Test).

Zur Verdeutlichung wurde das Verhältnis RCR (Respiratory Control Ratio) als Quotient aus aktivierter Atmung und Ruheatmung berechnet (vgl. Abbildung 21):

$$\text{RCR} = \frac{\text{Aktivierte Atmungsaktivität}}{\text{Ruhe - Atmungsaktivität}}$$



**Abbildung 21:** Respiratory Control Ratio. Darstellung: MW  $\pm$  SEM. \*: Signifikanter Unterschied zur Bedingung „Kontrolle“ mit  $p < 0,05$ . Nach MARTENS et al., 2014.

#### 4.2.2 Effekte von Hypoxie / Reoxygenierung und $\text{Ca}^{2+}$ auf Cardiolipine

Das Gemisch aus Mitochondriensuspension, Inkubationsmedium, ggf. CaEGTA und Substraten, wurde nach H/R aus dem Oxygraphen entnommen und durch Zentrifugation in Pellet und Überstand getrennt. Damit erfolgte eine Trennung der intakten Mitochondrien (höhere Dichte im Pellet) von anderen Fragmenten (z. B. Bruchstücken) mit geringerer Dichte.

In beiden Fraktionen wurde die Aktivität der Mitochondrien-spezifischen Citratsynthase mittels Photometrie gemessen.

Außerdem wurden mit HPLC und MS/MS die folgenden Parameter bestimmt: Gesamt-Cardiolipin (ges.CL), Anteil der Monolyso-Cardiolipine  $(\text{C18:2})_3$  und  $(\text{C18:2})_2\text{C18:1}$ . Darüber hinaus wurde der Oxidationsstatus der Cardiolipine bestimmt. Dazu wurden Berechnungen mit der folgenden Überlegung durchgeführt:

Die Oxidation von Cardiolipinen führt zur Entstehung verschiedener oxidierten CL-Spezies.  $(\text{C18:2})_4$  wird aufgrund der 4 ungesättigten Fettsäuren leicht oxidiert. Das Produkt, das eine Hydroxy-Fettsäure enthält ( $(\text{C18:2})_3$ -Monohydroxy-Linolsäure-Cardiolipin, siehe Abbildung 22), ist relativ stabil und deshalb geeignet zur massenspektrometrischen Analytik. Berechnet wurde der prozentuale Anteil des oxidierten Cardiolipins der Spezies  $(\text{C18:2})_4$ :

$$\text{oxCL}(\%) = \frac{(\text{C18:2})_3\text{-Monohydroxy-Linolsäure-CL}}{(\text{C18:2})_3\text{-Monohydroxy-Linolsäure-CL} + (\text{C18:2})_4\text{-CL}} \cdot 100 \%$$

Folgende Ergebnisse wurden für die Bedingungen Kontrolle, H/R und H/R + 4  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  ermittelt:

	CS-Aktivität (U/ mg Prot.)	CL-Gehalt (µg/ mg Prot.)	CL/CS (µg/U)	ox.CL \$	ML-CL (C18:2) <sub>3</sub> #	ML-CL (C18:2) <sub>2</sub> C18:1 #
<b>Überstand</b>						
Kontrolle	1,64 ± 0,26	8,43 ± 1,85	6,24 ± 2,50	0,49 ± 0,053	10,9 ± 1,83	6,22 ± 1,74
H/R	2,05 ± 0,61	7,32 ± 3,44	4,33 ± 2,72	0,49 ± 0,19	18,35 ± 3,04 *	8,67 ± 1,63
H/R + 4 µM Ca <sup>2+</sup>	2,15 ± 0,24 *	7,97 ± 1,76	4,93 ± 2,17	1,37 ± 0,706 *	11,31 ± 2,15	5,33 ± 1,08
<b>Pellet</b>						
Kontrolle	10,70 ± 2,40	27,82 ± 6,00	3,85 ± 0,93	0,77 ± 0,049	13,98 ± 3,10	7,00 ± 1,96
H/R	12,49 ± 2,18	31,14 ± 17,07	4,26 ± 2,21	0,68 ± 0,17	21,87 ± 3,29 *	9,56 ± 1,80
H/R + 4 µM Ca <sup>2+</sup>	10,90 ± 2,42	31,14 ± 6,97	3,97 ± 1,16	0,68 ± 0,069	14,41 ± 4,99	6,65 ± 2,89

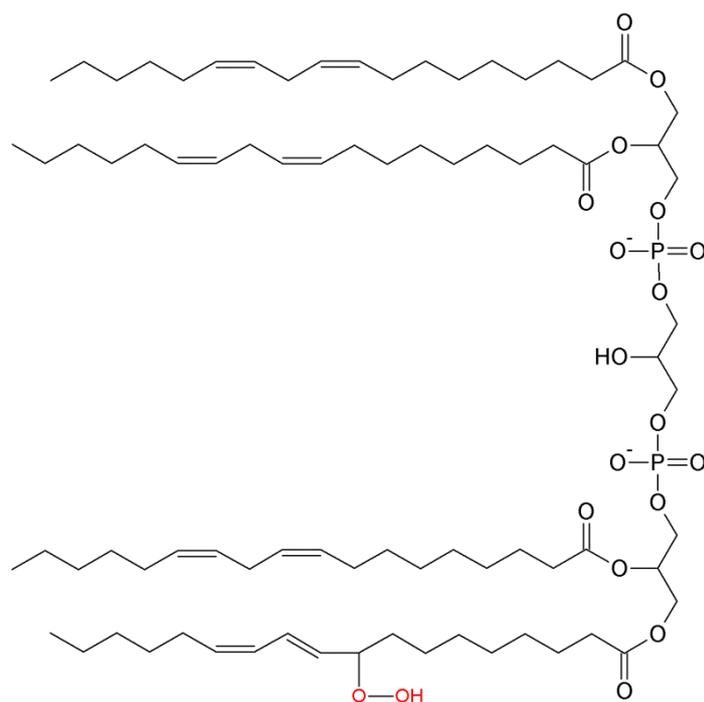
**Tabelle 9:** Ergebnisse der Cardiolipin-Analytik und Citratsynthase-Aktivität-Messungen der Hypoxie- / Reoxygenierungs-Experimente. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Kontrolluntersuchung, die H/R-Intervention und die H/R-Intervention mit 4 µM Ca<sup>2+</sup> gegenübergestellt. Im Anschluss an das Experiment wurde das Material entnommen und durch Zentrifugation in Mitochondrien (Pellet) und Überstand separiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung. \* = Signifikanter Unterschied zum Mittelwert der jeweiligen Kontrolle mit p < 0,05. \$ = Anteil von (C18:2)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure-Cardiolipin an der Summe aus oxidiertem und nicht-oxidiertem (C18:2)<sub>4</sub>-CL; # = Massen-% des Gesamt-CL mit Bezug auf die Cardiolipin-Spezies (C18:2)<sub>4</sub>. Aus MARTENS et al., 2014.

H/R hatte allein und im Zusammenspiel mit 4 µM Ca<sup>2+</sup> keine Änderung des CL-Gehaltes und der CS-Aktivität im **Pellet** gegenüber dem Kontrollexperiment zur Folge. Es konnte ebenso keine Veränderung der CL-Oxidation beobachtet werden.

Jedoch führten H/R zusammen mit einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 4 µM im **Überstand** zu signifikanten Erhöhungen der CS-Aktivität und des Anteils an oxidiertem CL.

H/R ohne den Zusatz von Ca<sup>2+</sup> hatte eine signifikante Erhöhung von Monolyso-Cardiolipin (C18:2)<sub>3</sub> sowohl im **Pellet** als auch im **Überstand** zur Folge.

Es kam sowohl im Überstand als auch im Pellet in keiner Bedingung zu einem signifikanten Cardiolipin-Verlust (vgl. Tabelle 9).



**Abbildung 22:** (C18:2)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure-Cardiolipin (nach Kim et al., 2011). Diese Spezies ist das Oxidationsprodukt des am häufigsten auftretenden (C18:2)<sub>4</sub>-CL und wurde als Marker für oxidiertes Cardiolipin (oxCL) in beiden Experimenten dieser Arbeit mittels HPLC-MS/MS analysiert.

#### 4.2.3 Effekte von H/R und Ca<sup>2+</sup> auf die Fettsäure-Zusammensetzung von CL

Ein weiterer Aspekt der Lipid-Analytik bezieht sich auf die Frage, ob der Einfluss von Hypoxie / Reoxygenierung, sowie Calcium-Überladung zu einer Veränderung der Fettsäure-Zusammensetzung von Cardiolipinen führt. Tabelle 10 zeigt die Analyse der 17 häufigsten Spezies.

CL-Spezies	Überstand			Pellet		
	Kontrolle	H/R	H/R + 4 $\mu\text{M Ca}^{2+}$	Kontrolle	H/R	H/R + 4 $\mu\text{M Ca}^{2+}$
(C18:2) <sub>4</sub> -CL	37,79 ± 2,53	37,24 ± 1,70	37,1 ± 2,12	36,59 ± 2,44	37,33 ± 1,29	36,58 ± 2,11
(C18:2) <sub>3</sub> /C18:1-CL	26,50 ± 0,46	28,20 ± 1,15	26,79 ± 0,17	26,89 ± 0,75	27,13 ± 0,18	27,14 ± 0,69
(C18:2) <sub>2</sub> /(C18:1) <sub>2</sub> -CL	8,83 ± 0,33	9,30 ± 0,71	9,03 ± 0,45	9,14 ± 0,46	8,93 ± 0,45	8,91 ± 0,40
C18:2/C18:1/(C16:0) <sub>2</sub> -CL	0,19 ± 0,03	0,22 ± 0,06	0,25 ± 0,06	0,23 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,22 ± 0,03
(C18:1) <sub>2</sub> /(C16:0) <sub>2</sub> -CL	0,72 ± 0,15	0,67 ± 0,09	0,8 ± 0,26	0,69 ± 0,12	0,72 ± 0,05	0,70 ± 0,09
(C18:2) <sub>3</sub> /C16:1-CL	4,61 ± 0,67	4,09 ± 0,37	4,82 ± 0,52	4,80 ± 0,69	4,46 ± 0,25	4,81 ± 0,64
(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C16:1-CL	3,29 ± 0,50	2,99 ± 0,28	3,36 ± 0,29	3,27 ± 0,48	3,10 ± 0,26	3,34 ± 0,56
o. (C18:2) <sub>3</sub> /C16:0-CL						
(C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C:16:1-CL	1,62 ± 0,13	1,53 ± 0,15	1,50 ± 0,16	1,58 ± 0,14	1,51 ± 0,15	1,58 ± 0,12
o.(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C16:0-CL						
(C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C16:0-CL	0,64 ± 0,04	0,70 ± 0,08	0,72 ± 0,14	0,65 ± 0,08	0,69 ± 0,04	0,68 ± 0,06
(C18:1) <sub>2</sub> /C16:0-CL	0,32 ± 0,07	0,28 ± 0,06	0,34 ± 0,11	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,04	0,30 ± 0,05
(C18:1) <sub>2</sub> /(C18:3) <sub>2</sub> -CL	0,24 ± 0,04	0,24 ± 0,08	0,31 ± 0,07	0,37 ± 0,07	0,35 ± 0,04	0,33 ± 0,04
(C18:1) <sub>3</sub> /C18:2-CL	1,45 ± 0,21	1,42 ± 0,16	1,48 ± 0,18	1,47 ± 0,22	1,47 ± 0,18	1,46 ± 0,17
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:4-CL	2,23 ± 0,16	2,13 ± 0,24	2,15 ± 0,27	2,18 ± 0,18	2,24 ± 0,15	2,19 ± 0,21
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:3-CL	5,45 ± 0,46	5,29 ± 0,33	5,43 ± 0,56	5,62 ± 0,40	5,49 ± 0,28	5,58 ± 0,39
o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:4-CL						
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:2-CL	4,34 ± 0,33	3,95 ± 0,15	4,09 ± 0,43	4,26 ± 0,30	4,17 ± 0,10	4,28 ± 0,30
o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:3-CL						
(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:2-CL	1,51 ± 0,16	1,46 ± 0,17	1,48 ± 0,23	1,61 ± 0,23	1,54 ± 0,04	1,59 ± 0,15
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:0-CL	0,27 ± 0,09	0,28 ± 0,10	0,35 ± 0,18	0,31 ± 0,05	0,32 ± 0,03	0,30 ± 0,05
o. (C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C20:2-CL						

**Tabelle 10:** Übersicht über die Verteilung der 17 häufigsten Cardiolipin-Spezies in Pellet und Überstand. Maßeinheit: % vom Gesamtcardiolipin mit Bezug auf (C18:2)<sub>4</sub>-CL. Darstellung: Mittelwert ± Standardabweichung. Aus MARTENS et al., 2014.

Durch den Einfluss von H/R und  $\text{Ca}^{2+}$  konnten sowohl im Pellet als auch im Überstand keine signifikanten Unterschiede in der Fettsäure-Zusammensetzung der Cardiolipine gefunden werden.

## 5 Diskussion

Ischämie und Reperfusion im Gewebe führen zu mitochondrialen Schädigungen. Dies ist zahlreich und deutlich belegt worden. Letztlich kommt es in Form von Apoptose und Nekrose oder Mischformen zum Zelltod (WEBSTER, 2012).

Cardiolipine erfüllen wichtige Funktionen im Zusammenhang mit Mitochondrien. Hierzu gehören Membran-Strukturbildung, Stabilisierung der Atmungskettenkomplexe und intrazelluläre pH-Regulation.

Darüber hinaus sind weitere Funktionen von Cardiolipinen bisher wenig erforscht worden. Insbesondere fehlen Informationen darüber, ob ihnen auch Funktionen außerhalb der Mitochondrien zugeschrieben werden können. Der Forschungsansatz in dieser Arbeit war daher auf die Lokalisation von Cardiolipinen innerhalb der Zelle fokussiert. Dazu wurde durch Provokation mit hypoxischem Stress in Folge von Ischämie und Reperfusion eine pathologische Situation erzeugt, die mit Kontrollexperimenten ohne Schädigungsreiz verglichen wurde. Darunter wurde beobachtet, ob sich Veränderungen der intrazellulären CL-Verteilung in 11 verschiedenen Dichte-Fraktionen ereignen. Der Ansatz beschränkt sich auf unterschiedliche Dichtemilieus, die bisher nicht eindeutig konkreten Zellorganellen zugeordnet werden können.

### **Ischämie- und Reperfusion an Rattenlebern in situ**

In dem Ischämie- und Reperfusionsexperiment wurden Rattenlebern in situ durch Unterbrechung der Perfusion in einem ischämischen Zustand versetzt und schließlich reperfundiert. Damit wurde die Situation des Leberinfarktes in vivo nachgestellt. Aufgrund der Temperaturregelung kann man von einer „warmen Ischämie“ sprechen, in der es nicht zur Gewebeprotektion durch Kühlung gekommen ist. Dies entspricht der realistischen Pathophysiologie des Leberinfarktes.

Zur Bestätigung eines durch I/R bedingten Schadens wurden die Laborparameter ASAT, GLDH und LDH im Perfusionsmedium nach der Reperfusionszeit bzw. der

korrespondierenden Zeit im Kontrollexperiment untersucht. Die gefundene Erhöhung im Falle von Ischämie und Reperfusion gegenüber dem Kontrollexperiment deutet auf eine Schädigung der Leberzellen hin (EBERT, 2006). Darüber hinaus konnten histologische Untersuchungen starke Veränderungen zeigen. Im Kontrollexperiment war in den untersuchten Proben normales Lebergewebe mit typischer Zellarchitektur zu sehen. Im I/R-Experiment waren Schrumpfungen der Zellkerne und eine Auflockerung des Gewebeverbandes erkennbar. Diese werden als Folge des induzierten hypoxischen Schadens interpretiert (JARRAR, TAIB, 2012).

Die Lebern wurden durch Dichtegradientenzentrifugation in Fraktionen mit unterschiedlicher Massendichte zerlegt. Als Indikator für das Vorhandensein von Mitochondrien wurde die Aktivität der Citratsynthase gemessen. Das Maximum der CS-Aktivität wurde bei den Kontrollexperimenten in der Zell-Fraktion mit einer mittleren Massendichte von  $1,071 \text{ g/cm}^3$  ermittelt. Diese Fraktion wurde als Mitochondrien-Fraktion betrachtet. Nach der Behandlung mit I/R zeigte sich eine Verschiebung dieses Maximums hin zu einer Dichte, die aus Symmetriegründen bei ungefähr  $1,068 \text{ g/cm}^3$  liegen muss (siehe Abbildung 16). Damit ist diese Fraktion für I/R die Mitochondrien-Fraktion. Die Verschiebung kann als Konsequenz einer Mitochondrien-Schwellung angesehen werden, die bei hypoxischem Stress auftritt. Es kommt dabei zu einer Dichtereduktion der Mitochondrien. Ischämie-induzierte Mitochondrien-Schwellungen sind, wie eingangs beschrieben, bekannte Phänomene (PEDIADITAKIS et al., 2010).

Die Verteilung des Gesamt-Cardiolipins (Abbildung 17) lässt eine ähnliche Verschiebung erkennen. Das Maximum, das im Kontrollexperiment zwischen  $1,07$  und  $1,08 \text{ g/cm}^3$  lag, verschob sich auf ungefähr  $1,07 \text{ g/cm}^3$  nach I/R. Diese Verschiebung war zu erwarten, da Cardiolipine vornehmlich in Mitochondrien vorkommen (PARADIES et al., 2009; PARADIES et al., 2014a).

Ischämie- und Reperfusion führten zu einem Verlust in der Gesamt-Cardiolipin-Summe aller Fraktionen in Höhe von ca. 30 m%. Das Phänomen des CL-Verlustes wurde bereits in anderen Studien für Herzmitochondrien beschrieben (PETROSILLO et al., 2005). Es liefert unter anderem eine Erklärung des Funktionsverlustes der Atmungskette in Folge von hypoxischem

Stress. Mit diesem Versuch wurde Cardiolipinverlust in Folge von I/R nun auch für die Leber identifiziert. Betroffen waren insbesondere Spezies, die Linolsäure und Ölsäure enthielten.

Die Gesamtaktivität der Citratsynthase aus allen Fraktionen reduzierte sich gleichzeitig um 17 %. Dieser Befund kann als Mitochondrienverlust interpretiert werden.

In der weiteren Analyse ist zu jeder Fraktion das Verhältnis aus CL-Gehalt zur Aktivität der Citratsynthase berechnet worden. In den Kontrollexperimenten entspricht dieses Verhältnis im Dichterbereich von  $1,063 \text{ g/cm}^3$  bis  $1,110 \text{ g/cm}^3$  ungefähr dem Wert, der bei isolierten Mitochondrien gefunden wurde (ca.  $5 \mu\text{g/U}$ ). In diesen Bereich eingeschlossen sind damit auch die Fraktionen, die als primär mitochondrienhaltig angenommen werden ( $1,071 \text{ g/cm}^3$  für die Kontrolle und  $1,066 \text{ g/cm}^3$  für I/R). Eine Erklärung für das Vorhandensein mehrerer Fraktionen mit ähnlichem CL/CS-Verhältnis ergibt sich auch hier aus dynamischen Prozessen, die durch Spaltung und Fusionierung die Homöostase der Mitochondrien aufrecht erhalten (YOULE, VAN DER BLIEK, ALEXANDER, 2012). Durch derartige Vorgänge kann es zu Mitochondrienpopulationen unterschiedlicher Dichte kommen. Auffallend war, dass es in diesem Bereich in 3 von 6 Fraktionen zu einer signifikanten Reduktion des Verhältnisses CL/CS kam. Diese ist, so das Ergebnis der anderen Studie (H/R-Experimente), atypisch für den Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung in einer reinen Mitochondrien-Suspension. H/R führte zu keiner Veränderung von CL/CS. Darüber hinaus wurden in der I/R-Studie Cardiolipine auch in Fraktionen mit deutlich abweichendem CL/CS-Verhältnis gefunden (z.B.  $17 \mu\text{g/U}$  bei  $\rho = 1,053 \text{ g/cm}^3$ ). Demnach hat sich in einem Teil der Nicht-Mitochondrien-Fraktionen eine andere Reaktion gegenüber I/R-Stress gezeigt, als in der Mitochondrien-Fraktion. Da die anderen Fraktionen ebenfalls Cardiolipine enthielten, unterstützt dies die Hypothese, dass es durch I/R möglicherweise zu einer Veränderung des Gehaltes an mitochondrienunabhängigem Cardiolipin in anderen Kompartimenten als der Mitochondrien-Fraktion gekommen ist. Es kann spekuliert werden, dass es sich dabei um CL-Transportvesikel handelt, die für eine Migration von apolarem CL durch das weitgehend wässrige Cytosol notwendig wären. Dazu passt einerseits die Beobachtung, dass Cardiolipin bereits im Zellkern gefunden wurde (STRUCHKOV et al., 2002). Darüber hinaus unterstützt dieses Ergebnis die Entdeckung, dass Cardiolipine in Membranen verschiedener Kompartimente im Falle der artifiziell induzierten Apoptose (SORICE et al., 2004) anzutreffen

sind. Somit konnte gezeigt werden, dass für die Cardiolipin-Migration nicht die gesamte Kaskade einer induzierten Apoptose notwendig ist. Offenbar zeigt sich dieses Phänomen in Leberzellen auch durch Ischämie und Reperfusion. Damit erscheint auch eine Funktion von Cardiolipinen sowie der Oxidationsprodukte im Hinblick auf Apoptose naheliegend.

Der Oxidationsstatus der Cardiolipine wurde durch das Verhältnis von (C18:2)<sub>3</sub>-Monohydrox-Linolsäure-Cardiolipin zur Summe aus (C18:2)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure-Cardiolipin und (C18:2)<sub>4</sub> ermittelt. Dabei konnte in 6 von 11 Fraktionen ein durch I/R verursachter signifikanter Anstieg des oxCL-Anteils festgestellt werden. Die selektive oxidative Wirkung auf die Fraktionen kann damit erklärt werden, dass es in der Kontrollbedingung signifikante Unterschiede in der Fettsäure-Zusammensetzung der Cardiolipine zwischen den Fraktionen gab. Fettsäuren ohne Doppelbindungen (gesättigte FS) weisen eine geringere Tendenz zur Oxidation auf als Fettsäuren mit Doppelbindungen (ungesättigte FS) (GROSCH, 1975). Ein interfraktioneller Unterschied in der Zusammensetzung war auch nach I/R vorhanden.

Ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Vermeidung von Schäden, die beim Leberinfarkt entstehen können, wäre die selektive Substitution der durch hypoxischen Stress verlorengegangenen Cardiolipin-Spezies, da der Verlust von CL auch in der Leberzelle ein Bestandteil des pathologischen Geschehens zu sein scheint. Es ist bekannt, dass ein CL-Verlust in Herz-Zellen teilweise kompensiert werden kann (PETROSILLO et al., 2001). Die Resultate der Experimente deuten darauf hin, dass möglicherweise auch Leberzellen davon profitieren könnten.

Des Weiteren wurden signifikante Unterschiede in der CL-Zusammensetzung der Fraktionen bei der Kontrolle beobachtet. Daraus kann man ableiten, dass es sich bei den CL-haltigen Fraktionen offenbar nicht nur um unterschiedliche Mitochondrienpopulationen gehandelt hat, sondern möglicherweise auch um Fragmente anderer intrazellulärer Bestandteile. Auch hier hat I/R signifikante Veränderungen in einigen Fraktionen hervorgerufen.

Insgesamt konnte dieses Experiment zeigen, dass es durch Ischämie und Reperfusion zum Verlust von Cardiolipinen und zum Anstieg des oxidierten Anteils der Cardiolipine kam. Außerdem führte I/R zu Veränderungen in der Verteilung und Zusammensetzung der

intrazellulären Cardiolipine in Bezug auf die Massendichte. Da die Situation, durch die es zu diesen Veränderungen gekommen ist, derjenigen beim Leberinfarkt entspricht, ist davon auszugehen, dass es sich um Phänomene der Pathophysiologie handelt. Zu Verlusten kam es insbesondere bei CL-Spezies, die Ölsäure und Linolsäure enthalten. Daher könnte in der gezielten Fettsäure-Substitution ein therapeutischer Ansatz liegen.

### **Hypoxie und Reoxygenierung an isolierten Rattenleber-Mitochondrien**

Die Ergebnisse der zweiten Studie sind vor dem Hintergrund zu betrachten, dass es sich hier nicht um ein in-situ perfundiertes Organ handelt, sondern um isolierte Mitochondrien.

Es wurde unter Variation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit einer moderaten Hypoxie-Phase (10 min) an isolierten Lebermitochondrien inszeniert. Dabei zeigte sich mit steigendem Schädigungsreiz (H/R, H/R + verschieden hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen) eine Reduktion der Respirationsrate. Auffallend war, dass die Ruheatmung, die nicht aus der oxidativen Phosphorylierung resultiert, erst im Falle der maximalen Schädigung ( $4 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ) reduziert ist. Im Gegensatz dazu ist die Funktionalität der Atmungskette bereits in der ersten Stufe der eskalierenden Schädigung beeinträchtigt worden. Offenbar existiert hier eine stärkere Vulnerabilität. Die bei  $4 \mu\text{M Ca}^{2+}$  entstandene Reduktion der Ruheatmung deutet letztlich auf eine Desintegration der Mitochondrien hin, so wie sie auch bei anderen Zelltypen bereits gefunden wurde (SCHILD, REISER, 2005).

Einen weiteren Hinweis auf die Zerstörung der Integrität der Mitochondrien bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $4 \mu\text{M}$  liefert das Ergebnis einer erhöhten Citratsynthase-Aktivität im Überstand. Die Mitochondriensuspension wurde nach den Experimenten durch Zentrifugation getrennt. Dabei entstanden ein mitochondrienhaltiges Pellet und ein Überstand. Eine Erhöhung der Citratsynthase im Überstand muss durch Zerstörung mitochondrialer Strukturen entstanden sein. Hierdurch kam es zum Austreten der normalerweise intramitochondrialen Citratsynthase. In den Experimenten mit geringerem Schädigungsreiz gab es keinen signifikanten Unterschied zum Kontrollexperiment, woraus eine noch vorhandene Intaktheit der mitochondrialen Membranen abgeleitet werden kann. Zusätzlich wurde ausschließlich in dieser Bedingung im Überstand auch eine Erhöhung des

Anteils an oxidierten Cardiolipinen gefunden. Dies deutet auf eine Beteiligung von oxidierten Cardiolipinen an der Zerstörung von Mitochondrien durch hypoxischen Stress hin.

Die Gesamtcardiolipin-Menge hat sich in der Situation jedoch nicht verändert. Dies steht im Widerspruch zu der bekannten Situation bei Herz-Mitochondrien. Ein Verlust der Atmungsaktivität ist mit einem CL-Verlust assoziiert (MULLIGAN et al., 2012). Eine Erklärung hierfür könnte die Gewebespezifität der Cardiolipine sein. Möglicherweise sind die Cardiolipine des Herzens stärker vulnerabel gegenüber oxidativem Stress. Damit kann das von Morin et al. beschriebene Austreten von CL aus Hirn-Mitochondrien bei hypoxischem Stress für die Leber nur im Falle von Monolyso-Cardiolipin und oxidiertem Cardiolipin bestätigt werden. Letztlich war der experimentelle Ansatz nicht genau derselbe: Bei Morin et al. wurde nach den mit kürzerer Hypoxiezeit konfigurierten Experimenten ebenso eine Trennung der Mitochondriensuspension durch Zentrifugation vorgenommen. Es wurde jedoch nur der Überstand untersucht. Methodisch kam hier lediglich ein Assay zum unspezifischen fluoreszenzspektroskopischen Nachweis von CL zum Einsatz (MORIN et al., 2003).

Grundsätzlich kommt es durch Verlust von Cardiolipinen zu Funktionseinschränkungen der Atmungskette und in Folge dessen zu einer Reduktion des Membranpotentials (JIANG et al., 2000). Die Konsequenz ist ein reduzierter Sauerstoffverbrauch. Dieser wurde in den durchgeführten Experimenten in Folge von H/R, wie beschrieben, festgestellt. Entgegen der Erwartung war jedoch in keiner Bedingung eine Reduktion des Cardiolipin-Gehaltes im Pellet zu beobachten. Die Erklärung hierzu ist, dass das Pellet weitgehend intakte Mitochondrien enthielt, die eine höhere Dichte aufwiesen. Im Gegensatz dazu waren im Überstand geschädigte Mitochondrien, deren Dichte durch Schwellungen reduziert war.

Der Anteil an Monolyso-Cardiolipin (MLCL, siehe Abbildung 2) hat sich durch H/R sowohl im Überstand als auch im Pellet gegenüber der Kontrolle erhöht. Monolyso-Cardiolipin ist ein Intermediärprodukt auf dem Remodelling-Pfad, den das primär synthetisierte Cardiolipin durchläuft. MLCL entsteht durch Deacylierung des unreifen, de-novo-synthetisierten Cardiolipins. Im Anschluss an die Deacylierung, findet eine Acylierung in der Regel mit einer anderen, gewebespezifischen Acylgruppe statt. Das Auftreten eines erhöhten Anteils an

MLCL bei H/R legt die Vermutung nahe, dass es zu einer Beschädigung des Remodelling-Mechanismus gekommen ist, der zu übermäßiger Deacylierung führte. Im Falle der maximalen Schädigung unter Einfluss von  $4 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , bei der es zur strukturellen Desintegration der Mitochondrien kam, konnte hingegen diese Veränderung nicht mehr beobachtet werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass für den Remodelling-Prozess intakte Mitochondrien notwendig sind.

Untersucht wurden 17 der häufigsten Cardiolipin-Spezies. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung der Acyl-Gruppen zwischen Kontrollexperiment, H/R und HR+  $4 \mu\text{M Ca}^{2+}$  gefunden werden. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen hatte die H/R-Schädigung bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen offenbar keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Cardiolipine. Einzelne Spezies wurden also nicht selektiv geschädigt. Es kam offenbar im Rahmen des Schädigungsmodus nicht zu pathologischen Veränderungen die, z.B. bei Krebserkrankungen der Prostata zu finden sind.

Es stellt sich die Frage, weshalb es in beiden Experimenten zur Cardiolipin-Oxidation, aber nur beim H/R-Experiment zu einem Cardiolipin-Verlust gekommen ist. Möglicherweise unterscheiden sich die Wirkung von Hypoxie und Reoxygenierung auf isolierte Mitochondrien und intaktes Gewebe. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass die Hypoxie-Zeit in der ersten Studie 20 min, in der zweiten lediglich 10 min betrug. Damit ist der Effekt nicht direkt vergleichbar.

### **Fazit**

Insgesamt zeigte die I/R-Studie, dass es durch Ischämie und Reperfusion zum Verlust von Cardiolipinen und zum Anstieg des oxidierten Anteils kommt. Außerdem führte die Intervention zu Veränderungen in der Verteilung und Zusammensetzung der intrazellulären Cardiolipine in Bezug auf die Massendichte. Da die Situation, durch die es zu diesen Veränderungen gekommen ist, derjenigen beim Leberinfarkt entspricht, ist davon auszugehen, dass es sich um Phänomene der entsprechenden Pathophysiologie handelt.

Der CL-Remodelling-Mechanismus in isolierten Mitochondrien wird durch Hypoxie und Reoxygenierung gestört und es kommt zu einer Überproduktion von Monolyso-Cardiolipin. Bei zusätzlicher Schädigung durch Calcium-Ionen ist diese Erhöhung jedoch nicht mehr festzustellen. Daraus lässt sich schließen, dass das Remodelling an das Vorhandensein intakter Mitochondrien gebunden ist. Daneben sind oxidierte Cardiolipine offenbar in das pathobiochemische Geschehen der Mitochondrienzerstörung durch oxidativen Stress eingebunden.

Da es insbesondere bei CL-Spezies, die Öl- und Linolsäure enthielten, zu Verlusten kam, könnte in der gezielten Substitution ein therapeutischer Ansatz liegen. Grundsätzlich ist es denkbar, dass eine diätetische Supplementierung mit entsprechenden Fettsäuren einen präventiven Effekt bezüglich der Spätfolgen des Leberinfarktes haben könnte. Anders herum könnte auch eine Akuttherapie auf diesem Prinzip aufbauen. In der Anästhesie wird bereits zur Therapie von Intoxikationen mit Lokalanästhetika eine sogenannte „Lipid-rescue“-Therapie durchgeführt, in der eine unspezifische 20 vol%-Lipidemulsion verabreicht wird (ROTHSCHILD et al., 2010). Inwiefern eine derartige Therapie im Speziellen mit den oben genannten Fettsäuren beim ischämischen Leberinfarkt Erfolg hätte und welche Applikationsart möglich ist, muss in weiterführenden Studien geklärt werden. Ebenso kann eine mögliche Anwendung als Prä- und Postkonditionierung bei Eingriffen an der Leber erwogen werden, sofern diese zur Durchführung eine iatrogene Unterbrechung der Blutzufuhr erfordern.

## 6 Zusammenfassung

Der ischämische Leberinfarkt führt zu Gewebehypoxie und bei Reperfusion zu Reoxygenierung. Dabei kommt es insbesondere in den Mitochondrien zu ROS-induzierten Schäden. Die Intaktheit der Mitochondrien ist an das Vorhandensein einer speziellen Gruppe von Phospholipiden, den Cardiolipinen (CL), gebunden. Bisher sind nicht alle Funktionen bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass Cardiolipine auch außerhalb der Mitochondrien eine Rolle spielen. In Mittelpunkt dieser Arbeit stehen daher Untersuchungen zur intrazellulären CL-Verteilung und deren Veränderungen im Kontext von Ischämie und Reperfusion. Es wurden zwei Experimente durchgeführt. Experiment 1: Rattenlebern wurden mit Nährlösung in situ perfundiert. Dabei wurde eine warme Ischämie erzeugt. Die behandelten Lebern wurden im Vergleich zu Kontrolleexperimenten ohne Ischämie durch Differentialzentrifugation in Fraktionen unterschiedlicher Dichte aufgeteilt und die enthaltenen Cardiolipine mit HPLC-MS/MS quantitativ untersucht. Experiment 2: Isolierte Rattenleber-Mitochondrien wurden Hypoxie und Reoxygenierung bei verschiedenen Calcium-Ionen-Konzentrationen ausgesetzt und ebenfalls mit Kontrollen verglichen. Dabei wurden Messungen der Atmungsaktivität sowie Lipid-Analysen der Mitochondriensuspensionen durchgeführt. Mit dem ersten Experiment wurde gezeigt, dass es durch Ischämie und Reperfusion zu einer Verschiebung des maximalen Cardiolipin-Gehaltes hin zu einer geringeren Dichte kommt. Darüber hinaus wurden signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Fettsäurereste in den Fraktionen gefunden. Außerdem wurden Cardiolipin-Verluste beobachtet. Dabei waren vornehmlich CL-Spezies betroffen, die Öl- und Linolsäure enthielten. Der Anteil oxidierter Cardiolipine erhöhte sich durch I/R in einigen Fraktionen. Das Ergebnis des zweiten Experimentes zeigte, dass Hypoxie und Reoxygenierung bei isolierten Rattenleber-Mitochondrien zu einer signifikanten Erhöhung von oxidierten Cardiolipinen führen. Diese scheinen mit der Zerstörung von Leber-Mitochondrien direkt in Verbindung zu stehen. Die Zusammensetzung der Fettsäurereste änderte sich dabei nicht. Es kam trotz nachgewiesener Einschränkung der Atmungskettenfunktion in dem Fall zu keinen Cardiolipin-Verlusten.

Insgesamt zeigen die Experimente, dass Ischämie und Reperfusion zu einer Verschiebung der CL-Verteilung in Leberzellen führen. Die Verteilung innerhalb der Zelle ist nicht homogen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass sie auch außerhalb der Mitochondrien in der Leberzelle auftreten. Zur Therapie bzw. aufgrund des selektiven Verlustes bestimmter CL-Spezies könnte eine Therapie mit Öl- und Linolsäure oxidative Schäden durch Kompensation von Lipid-Verlusten reduzieren. Eine adjuvante Anwendung im Rahmen der Leberchirurgie erscheint denkbar.

## 7 Literaturverzeichnis

1. ALISON M.R., SARRAF C.E., 1994: Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* **5** (35), 577–581.
2. BEGRICHE, K., J. MASSART, M.-A. ROBIN, F. BONNET, B. FROMENTY, 2013: Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (Baltimore, Md.) **58** (4), 1497–1507.
3. BRADFORD, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.
4. BROOKES, P. S., Y. YOON, J. L. ROBOTHAM, M. W. ANDERS, S.-S. SHEU, 2004: Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology. Cell physiology* **287** (4), C817-33.
5. CALORI, G., G. LATTUADA, F. RAGOGNA, M. P. GARANCINI, P. CROSIGNANI, M. VILLA, E. BOSI, G. RUOTOLO, L. PIEMONTE, G. PERSEGHIN, 2011: Fatty liver index and mortality: the Cremona study in the 15th year of follow-up. *Hepatology* (Baltimore, Md.) **54** (1), 145–152.
6. CARROLL, R., 1963: Infarction of the human liver. *Journal of Clinical Pathology* **16** (2), 133–136.
7. CHANCE, B., G. R. WILLIAMS, 1955: A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* **176** (4475), 250–254.
8. CHANCE, B., G. R. WILLIAMS, W. F. HOLMES, J. HIGGINS, 1955: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. V. A mechanism for oxidative phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **217** (1), 439–451.
9. CHANCE, B., G. R. WILLIAMS, 1956: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **221** (1), 477–489.
10. CHEN, S., D. LIU, R. L. FINLEY, M. L. GREENBERG, 2010: Loss of mitochondrial DNA in the yeast cardiolipin synthase *crd1* mutant leads to up-regulation of the protein kinase Swe1p that regulates the G2/M transition. *The Journal of biological chemistry* **285** (14), 10397–10407.
11. CHEN, S., M. TARSIO, P. M. KANE, M. L. GREENBERG, 2008: Cardiolipin mediates cross-talk between mitochondria and the vacuole. *Molecular biology of the cell* **19** (12), 5047–5058.
12. CHOUKÈR, A., T. SCHACHTNER, R. SCHAUER, M. DUGAS, F. LÖHE, A. MARTIGNONI, B. POLLWEIN, M. NIKLAS, H. G. RAU, K. W. JAUCH, K. PETER, M. THIEL, 2004: Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. *British journal of anaesthesia* **93** (2), 204–211.

13. CLARK, L C JR, R. WOLF, D. GRANGER, Z. TAYLOR, 1953: Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of applied physiology* **6** (3), 189–193.
14. CLAYPOOL, S. M., Y. OKTAY, P. BOONTHEUNG, J. A. LOO, C. M. KOEHLER, 2008: Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology* **182** (5), 937–950.
15. COLLINS, F. G., J. L. SKIBBA, 1980: Improved in situ rat liver perfusion technique. *Journal of Surgical Research* **28** (1), 65–70.
16. CONNERTH, M., T. TATSUTA, M. HAAG, T. KLECKER, B. WESTERMANN, T. LANGER, 2012: Intramitochondrial transport of phosphatidic acid in yeast by a lipid transfer protein. *Science (New York, N.Y.)* **338** (6108), 815–818.
17. EBERT, E. C., 2006: Hypoxic liver injury. *Mayo Clinic proceedings* **81** (9), 1232–1236.
18. FENN, J. B., M. MANN, C. K. MENG, S. F. WONG, C. M. WHITEHOUSE, 1989: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)* **246** (4926), 64–71.
19. FOLCH, J., M. LEES, SLOANE STANLEY, G H, 1957: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* **226** (1), 497–509.
20. GASPARD, G. J., C. R. MCMASTER, 2015: The mitochondrial quality control protein Yme1 is necessary to prevent defective mitophagy in a yeast model of Barth syndrome. *The Journal of biological chemistry* **290** (14), 9284–9298.
21. GIANNINI, E. G., 2005: Liver enzyme alteration. A guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal* **172** (3), 367–379.
22. GIMENO, R. E., J. CAO, 2008: Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. *Journal of lipid research* **49** (10), 2079–2088.
23. GROSCH, W., 1975: Ablauf und Analytik des oxydativen Fettverderbs. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **157** (2), 70–83.
24. GUIBERT, E. E., A. Y. PETRENKO, C. L. BALABAN, A. Y. SOMOV, J. V. RODRIGUEZ, B. J. FULLER, 2011: Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* **38** (2), 125–142.
25. HAAPARANTA, T., J. A. GUSTAFSSON, H. GLAUMANN, 1983: Isolation of mitochondria, lysosomes, and microsomes from the rat ventral prostate with a note on inverted microsomal vesicles. *Archives of biochemistry and biophysics* **223** (2), 458–467.
26. HARRIS, D. C., G. WERNER, T. WERNER, 2014: *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*, 8. Auflage. Berlin, Heidelberg, Imprint: Springer Spektrum, 1 online resource (XV, 977 S.).

27. HENRION, J., O. DESCAMPS, R. LUWAERT, M. SCHAPIRA, A. PARFONRY, F. HELLER, 1994: Hypoxic hepatitis in patients with cardiac failure: incidence in a coronary care unit and measurement of hepatic blood flow. *Journal of Hepatology* **21** (5), 696–703.
28. HOUTKOOPER, R. H., M. TURKENBURG, B. T. POLL-THE, D. KARALL, C. PÉREZ-CERDÁ, A. MORRONE, S. MALVAGIA, R. J. WANDERS, W. KULIK, F. M. VAZ, 2009: The enigmatic role of tafazzin in cardiolipin metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **1788** (10), 2003–2014.
29. HSU, P., X. LIU, J. ZHANG, H.-G. WANG, J.-M. YE, Y. SHI, 2015: Cardiolipin remodeling by TAZ/tafazzin is selectively required for the initiation of mitophagy. *Autophagy* **11** (4), 643–652.
30. JARRAR, B. M., N. T. TAIB, 2012: Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. *Saudi journal of biological sciences* **19** (2), 203–210.
31. JIANG, F., M. T. RYAN, M. SCHLAME, M. ZHAO, Z. GU, M. KLINGENBERG, N. PFANNER, M. L. GREENBERG, 2000: Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *The Journal of biological chemistry* **275** (29), 22387–22394.
32. KAGAN, V. E., H. A. BAYIR, N. A. BELIKOVA, O. KAPRALOV, Y. Y. TYURINA, V. A. TYURIN, J. JIANG, D. A. STOYANOVSKY, P. WIPF, P. M. KOCHANEK, J. S. GREENBERGER, B. PITT, A. A. SHVEDOVA, G. BORISENKO, 2009: Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free radical biology & medicine* **46** (11), 1439–1453.
33. KATO, A., S. SINGH, K. R. MCLEISH, M. J. EDWARDS, A. B. LENTSCH, 2002: Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **282** (4), G608-16.
34. KIEBISH, M. A., X. HAN, H. CHENG, J. H. CHUANG, T. N. SEYFRIED, 2008: Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *Journal of lipid research* **49** (12), 2545–2556.
35. KIM, J., P. E. MINKLER, R. G. SALOMON, V. E. ANDERSON, C. L. HOPPEL, 2011: Cardiolipin: characterization of distinct oxidized molecular species. *Journal of lipid research* **52** (1), 125–135.
36. KIRKINEZOS, I. G., C. T. MORAES, 2001: Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Seminars in cell & developmental biology* **12** (6), 449–457.
37. LACKNER, L. L., 2014: Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC biology* **12**, 35.
38. LARSEN, S., J. NIELSEN, C. N. HANSEN, L. B. NIELSEN, F. WIBRAND, N. STRIDE, H. D. SCHRODER, R. BOUSHEL, J. W. HELGE, F. DELA, M. HEY-MOGENSEN, 2012: Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of physiology* **590** (14), 3349–3360.

39. LECOCQ, J., C. E. BALLOU, 1964: On the Structure of Cardiolipin \*. *Biochemistry* **3** (7), 976–980.
40. LEHNINGER, A. L., M. M. COX, D. L. NELSON, 2005: *Lehninger principles of biochemistry*, 4. Auflage. New York, W.H. Freeman, 1130 S.
41. LEMASTERS, J. J., T. P. THERUVATH, Z. ZHONG, A.-L. NIEMINEN, 2009: Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochimica et biophysica acta* **1787** (11), 1395–1401.
42. LIPMANN, F., 1975: The roots of bioenergetics. *Ciba Foundation symposium* (31), 3–22.
43. LUEVANO-MARTINEZ, L. A., M. F. FORNI, DOS SANTOS, VALQUIRIA TIAGO, N. C. SOUZA-PINTO, A. J. KOWALTOWSKI, 2015: Cardiolipin is a key determinant for mtDNA stability and segregation during mitochondrial stress. *Biochimica et biophysica acta* **1847** (6-7), 587–598.
44. MARTENS, J.-C., G. KEILHOFF, A. GARDEMANN, L. SCHILD, 2014: Oxidation of cardiolipin is involved in functional impairment and disintegration of liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation in the presence of increased Ca<sup>2+</sup> concentrations. *Molecular and cellular biochemistry* **394** (1-2), 119–127.
45. MARTENS, J.-C., G. KEILHOFF, W. HALANGK, T. WARTMANN, A. GARDEMANN, I. PÄGE, L. SCHILD, 2015: Lipidomic analysis of molecular cardiolipin species in livers exposed to ischemia/reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry* **400** (1-2), 253–263.
46. MORIN, C., R. ZINI, J.-P. TILLEMENT, 2003: Anoxia-reoxygenation-induced cytochrome c and cardiolipin release from rat brain mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* **307** (3), 477–482.
47. MULLIGAN, C. M., G. C. SPARAGNA, C. H. LE, A. B. DE MOOY, M. A. ROUTH, M. G. HOLMES, D. L. HICKSON-BICK, S. ZARINI, R. C. MURPHY, F. Y. XU, G. M. HATCH, S. A. MCCUNE, R. L. MOORE, A. J. CHICCO, 2012: Dietary linoleate preserves cardiolipin and attenuates mitochondrial dysfunction in the failing rat heart. *Cardiovascular research* **94** (3), 460–468.
48. MURRAY, M., A. HRAIKI, M. BEBAWY, C. PAZDERKA, T. RAWLING, 2015: Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. *Pharmacology & therapeutics* **150**, 109–128.
49. OTT, M., V. GOGVADZE, S. ORRENIUS, B. ZHIVOTOVSKY, 2007: Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **12** (5), 913–922.
50. PARADIES, G., V. PARADIES, V. DE BENEDICTIS, F. M. RUGGIERO, G. PETROSILLO, 2014a: Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta* **1837** (4), 408–417.
51. PARADIES, G., V. PARADIES, V. DE BENEDICTIS, F. M. RUGGIERO, G. PETROSILLO, 2014b: Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta* **1837** (4), 408–417.

52. PARADIES, G., G. PETROSILLO, V. PARADIES, F. M. RUGGIERO, 2009: Role of cardiolipin peroxidation and Ca<sup>2+</sup> in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell calcium* **45** (6), 643–650.
53. PARADIES, G., G. PETROSILLO, M. PISTOLESE, N. DI VENOSA, D. SERENA, F. M. RUGGIERO, 1999: Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine* **27** (1-2), 42–50.
54. PARADIES, G., G. PETROSILLO, M. PISTOLESE, F. M. RUGGIERO, 2001: Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion* **1** (2), 151–159.
55. PEDIADITAKIS, P., J.-S. KIM, L. HE, X. ZHANG, L. M. GRAVES, J. J. LEMASTERS, 2010: Inhibition of the mitochondrial permeability transition by protein kinase A in rat liver mitochondria and hepatocytes. *The Biochemical journal* **431** (3), 411–421.
56. PETROSILLO, G., N. DI VENOSA, F. M. RUGGIERO, M. PISTOLESE, D. D'AGOSTINO, E. TIRAVANTI, T. FIORE, G. PARADIES, 2005: Mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia/reperfusion can be attenuated by oxygen tension control. Role of oxygen-free radicals and cardiolipin. *Biochimica et biophysica acta* **1710** (2-3), 78–86.
57. PETROSILLO, G., F. M. RUGGIERO, G. PARADIES, 2003: Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17** (15), 2202–2208.
58. PETROSILLO, G., F. M. RUGGIERO, M. PISTOLESE, G. PARADIES, 2001: Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS letters* **509** (3), 435–438.
59. PRASAD, S. S., A. GARG, A. K. AGARWAL, 2011: Enzymatic activities of the human AGPAT isoform 3 and isoform 5: localization of AGPAT5 to mitochondria. *Journal of lipid research* **52** (3), 451–462.
60. REN, M., PHOON, COLIN K L, M. SCHLAME, 2014: Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Progress in lipid research* **55**, 1–16.
61. ROTHSCHILD, L., S. BERN, S. OSWALD, G. WEINBERG, 2010: Intravenous lipid emulsion in clinical toxicology. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine* **18**, 51.
62. RYTOMAA, M., P. K. KINNUNEN, 1995: Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid-protein interactions. *The Journal of biological chemistry* **270** (7), 3197–3202.

63. SAPANDOWSKI, A., M. STOPE, K. EVERT, M. EVERT, U. ZIMMERMANN, D. PETER, I. PÄGE, M. BURCHARDT, L. SCHILD, 2015: Cardiolipin composition correlates with prostate cancer cell proliferation. *Molecular and cellular biochemistry* **410** (1-2), 175–185.
64. SCHILD, L., U. LENDECKEL, A. GARDEMANN, I. WISWEDEL, C. A. SCHMIDT, C. WOLKE, R. WALTHER, P. GRABARCZYK, C. BUSEMANN, 2012: Composition of molecular cardiolipin species correlates with proliferation of lymphocytes. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) **237** (4), 372–379.
65. SCHILD, L., T. REINHECKEL, I. WISWEDEL, W. AUGUSTIN, 1997: Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification. *The Biochemical journal* **328** (Pt 1), 205–210.
66. SCHILD, L., G. REISER, 2005: Oxidative stress is involved in the permeabilization of the inner membrane of brain mitochondria exposed to hypoxia/reoxygenation and low micromolar Ca<sup>2+</sup>. *FEBS Journal* **272** (14), 3593–3601.
67. UKSCHLAME, M., S. BRODY, K. Y. HOSTETLER, 1993: Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. *European journal of biochemistry / FEBS* **212** (3), 727–735.
68. SCHLAME, M., 2013: Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. *Biochimica et biophysica acta* **1831** (3), 582–588.
69. SEVERINGHAUS, J. W., P. B. ASTRUP, 1986: History of blood gas analysis. VI. Oximetry. *Journal of clinical monitoring* **2** (4), 270–288.
70. SHEN, Z., C. YE, K. MCCAIN, M. L. GREENBERG, 2015: The Role of Cardiolipin in Cardiovascular Health. *BioMed research international* **2015**, 891707.
71. SORICE, M., A. CIRCELLA, I. M. CRISTEA, T. GAROFALO, L. DI RENZO, C. ALESSANDRI, G. VALESINI, M. DEGLI ESPOSTI, 2004: Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis. *Cell death and differentiation* **11** (10), 1133–1145.
72. SPELSBERG, T. C., G. D. REINHART, S. BARHAM, 1984: The isolation of large quantities of undamaged cellular organelles and cytosolic enzymes using a low-shear continuous tissue homogenizer. *Analytical biochemistry* **143** (2), 237–248.
73. SRERE, P. A., H. BRAZIL, L. GONEN, M. TAKAHASHI, 1963: The Citrate Condensing Enzyme of Pigeon Breast Muscle and Moth Flight Muscle. *Acta Chemica Scandinavica* **17** suppl, 129–134.
74. STRUCHKOV, V. A., N. B. STRAZHEVSKAYA, R. I. ZHDANOV, 2002: Specific natural DNA-bound lipids in post-genome era. The lipid conception of chromatin organization. *Bioelectrochemistry* (Amsterdam, Netherlands) **56** (1-2), 195–198.
75. TAFLIN, D. C., T. L. WARD, E. J. DAVIS, 1989: Electrified droplet fission and the Rayleigh limit. *Langmuir* **5** (2), 376–384.

76. VALIANPOUR, F., V. MITSAKOS, D. SCHLEMMER, J. A. TOWBIN, J. M. TAYLOR, P. G. EKERT, D. R. THORBURN, A. MUNNICH, WANDERS, RONALD J A, P. G. BARTH, F. M. VAZ, 2005: Monolysocardiolipins accumulate in Barth syndrome but do not lead to enhanced apoptosis. *Journal of lipid research* **46** (6), 1182–1195.
77. WEBSTER, K. A., 2012: Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future cardiology* **8** (6), 863–884.
78. WISWEDEL, I., A. GARDEMANN, A. STORCH, D. PETER, L. SCHILD, 2010: Degradation of phospholipids by oxidative stress--exceptional significance of cardiolipin. *Free radical research* **44** (2), 135–145.
79. YAMASHITA, M., J. B. FENN, 1984: Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry* **88** (20), 4451–4459.
80. YIN, H., L. XU, N. A. PORTER, 2011: Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews* **111** (10), 5944–5972.
81. YOULE, R. J., VAN DER BLIEK, ALEXANDER, 2012: Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)* **337** (6098), 1062–1065.
82. ZOROV, D. B., 2000: Reactive Oxygen Species (ROS)-induced ROS Release: A New Phenomenon Accompanying Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Cardiac Myocytes. *Journal of Experimental Medicine* **192** (7), 1001–1014.

## 8 Danksagungen

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung der Promotionsarbeit unterstützt haben. In alphabetischer Reihenfolge sind dies:

**Bärbel Brauns** für die technische Unterstützung.

**Dipl.-Ing. Heidemarie Faber** für die technische Unterstützung.

**Prof. Dr. Dr. Andreas Gardemann** für die Möglichkeit meine Promotion im Institut für pathologische Biochemie durchführen zu können und die wissenschaftliche Beratung.

**Prof. Dr. Walther Halangk** für die Möglichkeit der Durchführung von Experimenten in der experimentellen operativen Medizin.

**Prof. Dr. Gerburg Keilhoff** für die Hilfe bei den mikroskopischen Untersuchungen und die wissenschaftliche Beratung.

**Karla Klingenberg** für die technische Unterstützung bei der Probenaufarbeitung.

**Prof. Dr. Siegfried Kropf** für die statistische Beratung.

**M.A. Catrin Martens** für das Lektorat der Arbeit.

**Dr. Christian Müller** für die Beratung und Hilfestellung bei den Experimenten.

**Silke Niemann** für die technische Unterstützung.

**Dr. Ilona Päge** für die Laboruntersuchungen in der klinischen Chemie.

**Dipl.-Chem. Daniela Peter** für die Einführung in die Techniken der HPLC und MS sowie die technische Unterstützung.

**Prof. Dr. Lorenz Schild** für die Überlassung des Promotions-Themas und die unermüdliche Betreuung, Beratung und Organisation.

**Astrid Schneider** für die administrative Unterstützung.

**Dr. Thomas Wartmann** für die Einführung in die Techniken Dichtegradientenzentrifugation und Zellfraktionierung, sowie die technische Unterstützung.

**Dr. Ingrid Wiswedel** für die wissenschaftliche Beratung.

**Elke Wölfel** für die technische Unterstützung.

## 9 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Untersuchungen einer intrazellulären Migrationsdynamik verschiedener Cardiolipine im Zusammenhang mit Pathomechanismen in Folge von Ischämie und Reperfusion beim Leberinfarkt**

im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
mit der Unterstützung durch

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Lorenz Schild

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 24. November 2016

.....  
Jan Christian Martens

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.**

## 10 Anlagen

### 10.1 Zusammensetzungen verwendeter Lösungen

#### 10.1.1 Isolationsmedium Leber

Substanz	Molare Masse [g mol <sup>-1</sup> ]	Konzentration [mmol l <sup>-1</sup> ]	Masse pro l [g]
BSA 1%			10
EGTA	380,35	1	0,38
Saccharose	342,3	250	85,57
Tris	121,14	20	2,42

#### 10.1.2 Inkubationsmedium Leber

Substanz	Molare Masse [g mol <sup>-1</sup> ]	Konzentration [mmol l <sup>-1</sup> ]	Masse pro l [g]
EGTA	380,35	0,5	0,1902
KCl	74,55	120	8,9472
MgCl <sub>2</sub>	203,3	2	0,4066
NaCl	58,44	15	0,8766
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	137,99	5	0,6809
Saccharose	342,3	10	3,4423
Tris	121,14	20	2,4228

#### 10.1.3 Krebs-Ringer-Lösung

Substanz	Molare Masse [g mol <sup>-1</sup> ]	Konzentration [mmol l <sup>-1</sup> ]	Masse pro l [g]
KCl	74,55	4,8	0,36
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	1,2	0,163
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	246,48	1,2	0,296
NaCl	58,44	120	7
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	24	2,016

Einstellung auf pH 7,4 mit HCl.

**10.1.4 Perfusionslösung**

- Krebs-Ringer-Lösung + 0,25 mM EGTA:
  - ➔ 100 mg EGTA pro Liter EGTA
- Begasung mit Carbogen für 1,5 h.
- Einstellung auf pH 7,4 mit HCl.

**10.1.5 HS-Puffer**

Substanz	Molare Masse [g mol <sup>-1</sup> ]	Konzentration [mmol l <sup>-1</sup> ]	Masse / Volumen pro 50 ml
EGTA	380,35	0,5	9,5 mg
Citrat	192,13	10	96 mg
H <sub>2</sub> O	18		45,1 ml
MgSO <sub>4</sub>	120,37	1,2	500 µg
Saccharose	342,3	250	4,28 g

## 10.2 Mit der Dissertation assoziierte Publikationen

- MARTENS, J.-C., G. KEILHOFF, A. GARDEMANN, L. SCHILD, 2014: Oxidation of cardiolipin is involved in functional impairment and disintegration of liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation in the presence of increased  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. *Molecular and cellular biochemistry* **394** (1-2), 119–127.
- MARTENS, J.-C., G. KEILHOFF, W. HALANGK, T. WARTMANN, A. GARDEMANN, I. PÄGE, L. SCHILD, 2015: Lipidomic analysis of molecular cardiolipin species in livers exposed to ischemia/reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry* **400** (1-2), 253–263.

## 10.3 Beteiligte Einrichtungen der Medizinischen Fakultät der OvG-Universität Magdeburg

- Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
- Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie  
Bereich Experimentelle Operative Medizin
- Institut für Biochemie und Zellbiologie
- Institut für Biometrie und Medizinische Informatik

## 10.4 Verwendete Software

- Microsoft Office 2010
- ACD / ChemsSketch Version 12.01
- SigmaPlot Version 8.0

## 10.5 Kontakt

Kontakt zum Verfasser dieser Arbeit:

