

**Schädigungsmechanismen von sehr-langkettigen Fettsäuren  
(VLCFA) in Gliazellen und Neuronen**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

von **Diplom-Biologin Sabine Rönicke** (geb. Hein)  
geboren am 02.02.1982 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr. Georg Reiser  
Prof. Dr. Klaus-Armin Nave

vorgelegt am: 28.11.2012

verteidigt am: 29.08.2013

meinen Liebsten  
Raik  
Simen und Marvin

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen .....	1
1.1.1 Peroxisomen und die Einteilung peroxisomaler Stoffwechselerkrankungen.....	1
1.1.2 X-chromosomale Adrenoleukodystrophie .....	2
1.2 Freie Fettsäuren im Organismus .....	6
1.3 Sehr-langkettige Fettsäuren.....	8
1.3.1 Wirkung von VLCFA auf den Organismus .....	9
1.4 Entwicklung und Funktion von Oligodendrozyten .....	10
1.5 Zytokine und Chemokine .....	12
1.6 Zielstellung der Arbeit .....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Material .....	15
2.1.1 Versuchstiere .....	15
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3 Chemikalien und Substanzen .....	16
2.1.4 Medien und Lösungen .....	19
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	22
2.2.2 Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie .....	24
2.2.3 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie.....	26
2.2.4 Zelltod-Assay .....	27
2.2.5 Isolierte Mitochondrien .....	27
2.2.6 Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.7 Proteinbiochemische Methoden .....	32
2.2.8 Datenanalyse .....	34
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3.1 Einfluss von VLCFA auf zellphysiologische Parameter neuronaler Zellen .....	35
3.1.1 $\alpha$ -Cyclodextrin als Lösungsvermittler für VLCFA.....	35
3.1.2 Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration.....	38
3.1.3 Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials .....	47
3.1.4 ROS-Bildung.....	51
3.2 Langzeitauswirkung von VLCFA-Akkumulation.....	52
3.2.1 Induktion von Zelltod in Oligodendrozyten und Astrozyten .....	52
3.2.2 Zytokin-Bildung und Freisetzung in Astrozyten.....	54
3.2.3 Zellulärer Sauerstoffstress - HNE .....	58
3.2.4 Mitochondriales Membranpotential .....	59
3.2.5 Entwicklung von Oligodendrozyten.....	61
3.3 ABCD1-knockout Maus.....	64
3.3.1 Einfluss von VLCFA-Applikation auf zellphysiologische Parameter in Zellen aus ALDP- Knockout-Maus .....	65

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1	Akute Wirkung von VLCFA.....	67
4.2	Langzeitwirkung von VLCFA .....	74
4.3	X-ALD Knockout Maus-Modelle .....	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>92</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>93</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>94</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>95</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Magnet-Resonanz-Tomographie eines Kindes mit CCALD .	2
Abbildung 2: Struktur des ALDP. (modifiziert nach (Moser, 1997).	3
Abbildung 3: Vereinfachtes Schema des Abbaus von VLCFA	7
Abbildung 4: Darstellung einer sehr langkettigen (Hexacosanäure), einer verzweigt-kettigen (Phytansäure) und einer mittellangen gesättigten Fettsäure (Palmitinsäure).	8
Abbildung 5: Prozess der Oligodendrozytenentwicklung.	11
Abbildung 6: Nachweis der Expression von MBP (links, grün) und CNP (rechts, rot) in myelinisierenden Oligodendrozyten	12
Abbildung 7: Chemische Struktur und toroidale Form des $\alpha$ -Cyclodextrin Moleküls.	35
Abbildung 8: Messung der freien Fettsäurekonzentration in wässriger Umgebung.	37
Abbildung 9: VLCFA-induzierte Änderung der intrazellulären $Ca^{2+}$ Konzentration in primären Oligodendrozyten.	39
Abbildung 10: Identifizierung von Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen in einer primären hippocampalen Co-Kultur.	40
Abbildung 11: VLCFA-induzierte Änderung der intrazellulären $Ca^{2+}$ Konzentration in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen einer primären Co-Kultur.	41
Abbildung 12: Glutamat-induzierte Änderung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen einer primären Co-Kultur.	42
Abbildung 13: VLCFA-induzierte Änderung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen unter Norm- und $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen.	43
Abbildung 14: Inhibierung intrazellulärer Signalwege des VLCFA-induzierten $Ca^{2+}$ -Einstroms aus intrazellulären Speichern.	45
Abbildung 15: GPR40 mRNA-Expression im Gesamthirn und in primärer Zellkultur.	46
Abbildung 16: Einfluss von VLCFA auf das mitochondriale Potential von Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen.	47
Abbildung 17: Wirkung von VLCFA auf isolierte Mitochondrien.	50
Abbildung 18: ROS-Bildung in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen	51
Abbildung 19: VLCFA-induzierter Zelltod in (A) Oligodendrozyten und (B, C) Astrozyten.	53
Abbildung 20: Expression von IL-6, GRO/CINC-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ und GAPDH in primären Astrozyten nach Stimulation mit VLCFA für 24 h.	55
Abbildung 21: Expressionslevel der mRNA von TNF- $\alpha$ , GRO/CINC-1, IL-6 und IL-1 $\beta$ in primären Astrozyten.	56
Abbildung 22: Freisetzung von IL-6 nach VLCFA-Stimulation.	57
Abbildung 23: Freisetzung von GRO/CINC-1 nach VLCFA-Stimulation.	58
Abbildung 24: HNE-Färbung von Proteinbanden in primären Astrozyten nach 24-stündiger Inkubation mit VLCFA.	59
Abbildung 25: Wirkung der VLCFA-Langzeitinkubation auf das mitochondriale Membranpotential	60
Abbildung 26: Lokalisation von MBP und CNP in primären Oligodendrozyten nach Langzeit-Inkubation mit VLCFA.	62
Abbildung 27: Proteinlevel von CNP und MBP in primären Oligodendrozyten.	64
Abbildung 28: RT-PCR-Produkte der ABCD1-knockout Maus.	65
Abbildung 29: Toxische Wirkung von VLCFA auf Astrozyten aus Kontrollmäusen und ALDP-knockout Mäusen.	66
Abbildung 30: Wirkung von VLCFA in primären Gehirnzellen	73
Abbildung 31: Zusammenfassende Übersicht der Wirkung von VLCFA auf Hirnzellen.	78
Abbildung 32: Unterbrechung des X-ALD Gens in der Maus (Lu et al., 1997).	79

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a. u.	<i>arbitrary units</i> , willkürliche Einheiten
ABCD	<i>ATP-binding cassette protein</i> , Protein mit ATP-bindender Kasette, Unterfamilie D
ACALD	<i>adult cerebral ALD</i> , adulte zerebrale ALD-Form
AD	<i>alzheimer's disease</i> , Alzheimer's Erkrankung
ADIFAB	<i>Acrylodan labeled Intestinal Fatty Acid Binding protein</i> , Fettsäurebindendes-Protein
ALD	<i>Adrenoleukodystrophy</i> , Adrenoleukodystrophie
ALDP	<i>adrenoleukodystrophy protein</i> , Adrenoleukodystrophie Protein
ALDRP	<i>adrenoleukodystrophy related protein</i> , Adrenoleukodystrophie-verwandtes Protein
AMN	<i>Adrenomyeloneuropathy</i> , Adrenomyeloneuropathie
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
Anti A	Antimycin A
APB	Aminoethoxydiphenylborat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
CaG5N	Calcium Green-5N
CCALD	<i>childhood cerebral ALD</i> , zerebrale ALD-Form bei Kindern
cDNA	Komplementäre DNA
CNP	2',3'-Zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase
CoA	Coenzym A
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> , Zerebrospinalflüssigkeit
DHA	Docosahexaensäure
DHE	Dihydroethidium
DIV	<i>day in vitro</i> , Tage in Kultur
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPA	Docosapentaensäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-Tetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FABP	<i>fatty acid binding protein</i> , Fettsäurebinde-Protein
FCCP	Carbonyl-Cyanid-4-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FFA	<i>free fatty acid</i> , freie Fettsäure
FFAR	<i>free fatty acid receptor</i> , Rezeptor für freie Fettsäuren
FSBB	<i>fetal serum blocking buffer</i> , Blockierungspuffer
Fura-2 AM	Fura-2 Acetoxymethylester
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures gliales Faserprotein
GPR40	<i>G-protein coupled receptor</i> , G-Protein gekoppelter Rezeptor 40)
GRO/CINC-1	<i>growth-regulated oncogene/cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HNE	4-Hydroxy-2-Nonenal
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin

IMM	Innere Mitochondrienmembran
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> , induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
InsP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphat
KO	<i>Knock out</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	<i>myelin basic protein</i> , basisches Myelinprotein
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i> , mitochondriale Permeabilitäts- transitions-pore
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Versuche
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NMM	Neuronenmedium
NTP	Nukleosidtriphosphat
Oli	Oligomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PLC	Phospholipase C
PLL	Poly-D-Lysin
PLP	Proteolipid Protein
PT	Permeabilitätstransition
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RBM	<i>rat brain mitochondria</i> , Rattenhirnmitochondrien
RCF	<i>relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalkraft
RIPA	Radioimmunoprecipitation-Assay Puffer
RLM	Rattenlebermitochondrien
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> , reverse Transkription- Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulphat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Lösung
TBST	TBS/Tween
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor</i> , Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VLCFA	<i>very long chain fatty acids</i> , sehr-langkettige Fettsäuren
VLCS	<i>very long chain fatty acids synthetase</i> , Acyl-CoA Synthetase für sehr langkettige Fettsäuren
WT	Wildtyp
X-ALD	X-linked <i>adrenoleukodystrophy</i> , X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\Delta\psi$	Mitochondriales Membranpotential

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen

### 1.1.1 Peroxisomen und die Einteilung peroxisomaler Stoffwechselerkrankungen

Peroxisomen sind ubiquitär vorkommende Zellorganellen, die in allen eukaryotischen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten vorkommen. Sie sind von einer einfachen Membran umgeben, die eine Vielzahl integraler Membranproteine enthält. Die peroxisomale Matrix beinhaltet mehr als 50 Enzyme für anabole und katabole Stoffwechselwege, deren Zusammensetzung von den Stoffwechsellanforderungen der Zelle abhängt.

Anabole Reaktionen, die in den Peroxisomen ablaufen, sind zum Beispiel Plasmalogenbiosynthese sowie Cholesterol- und Gallensäuresynthese. Des Weiteren findet hier die Biosynthese der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA = *polyunsaturated fatty acids*) der  $\omega 3$  und  $\omega 6$  Gruppe, wie zum Beispiel der Docosahexaensäure (DHA, C22:6 $\omega 3$ ) und der Docosapentaensäure (DPA, C22:5 $\omega 6$ ) statt (Ferdinandusse et al., 2003, Sprecher, 2000). Wichtige katabolen Funktionen sind der Wasserstoffperoxidmetabolismus, Abbau von überlangkettigen Fettsäuren (VLCFA = *very long chain fatty acids*,  $\geq$  C22:0) sowie verzweigt-kettigen Fettsäuren (z.B. Phytan- und Pristansäure). Ursprüngliche Annahmen gingen davon aus, dass Peroxisomen autonome Organellen sind, ähnlich den Mitochondrien. Neueste Untersuchungen über die ontogenetische und evolutionäre Herkunft der Peroxisomen haben gezeigt, dass diese Organellen von dem Endoplasmatischen Retikulum abstammen (Hoepfner et al., 2005, Schlüter et al., 2006). Dass Peroxisomen essentiell für die Funktion der Zelle sind, wird durch schwerwiegende humane Erkrankungen deutlich, deren Grundlage eine gestörte Peroxisomenbildung oder eine gestörte  $\alpha$ - und/oder  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren ist (Weller and Gärnter, 2002, Brown and Baker, 2003).

Die Einteilung peroxisomaler Stoffwechselerkrankungen erfolgt in zwei Gruppen. In der Gruppe der Peroxisomenbiogenesedefekte werden Peroxisomen nicht oder nur unvollständig gebildet. Hierzu gehören das Zellweger-Syndrom, die neonatale Adrenoleukodystrophie, der infantile Morbus Refsum und die Rhizomelia chondrodysplasia punctata. Ein isolierter Defekt eines peroxisomalen Stoffwechselweges liegt dagegen bei der zweiten Gruppe vor. Hierzu zählen zum Beispiel die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD), der Morbus Refsum, die Hyperoxalurie Typ I und die Glutarazidurie Typ III (Weller and Gärnter, 2002).



### 1.1.2 X-chromosomale Adrenoleukodystrophie

Erstmals wurde X-ALD im Jahre 1923 von Siemerling und Creuzfeldt beschrieben. Der Name Adrenoleukodystrophie (ALD) wurde 1970 von den Symptomen der Nebenniereninsuffizienz und des Untergangs weißer Hirnsubstanz abgeleitet. X-ALD (OMIM 300100) tritt mit einer Inzidenz von 1:15 000 in Frankreich (Kemp et al., 2001) und 1:20 000 in den USA auf (Bezman et al., 2001) und ist somit eine der häufigsten peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen. Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch die Akkumulation von VLCFA in anormal hohen Konzentrationen, vor allem in der weißen Substanz des Gehirns, der Nebennierenrinde und im Blutplasma.

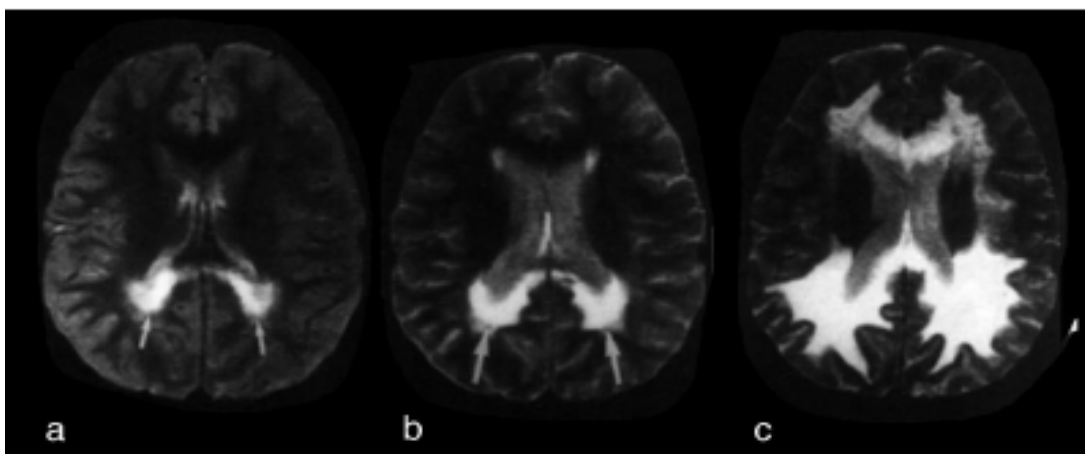


Abbildung 1: Magnet-Resonanz-Tomographie eines Kindes mit CCALD (Dubois-Dalcq et al., 1999).

Die Aufnahme zeigt eine schnell fortschreitende Demyelinisierung der weißen Substanz über eine Periode von drei Jahren. Bilder im Alter von (a) sieben, (b) acht und (c) neun Jahren.

Die klinischen Symptome dieser Erkrankung sind sehr variabel und abhängig vom Alter während des Krankheitsausbruchs. Im Kindesalter zeigt die Krankheit einen verheerenden Verlauf. Zwischen dem fünften und zwölften Lebensjahr tritt die zerebrale Form (CCALD, stellt ca. 40% der ALD-Formen dar) auf, die eine schnell voranschreitende Demyelinisierung des ZNS und einen schnellen neurologischen Verfall innerhalb von wenigen Jahren nach sich zieht. Im Endstadium zeigen sich eine ausgeprägte Demenz und der Verlust von lebenswichtigen Körperfunktionen (Moser, 1997, Moser et al., 1999, Aubourg, 1999). Die klinischen Symptome der zerebralen bzw. juvenilen Form reichen von multifokaler inflammatorischer Demyelinisierung des ZNS (Abb. 1) über Nebenniereninsuffizienz bis zum raschen tödlichen Ende innerhalb von wenigen Jahren (Aubourg, 1999, Miyoshi et al., 2010).

Somit ist es logisch, dass eine möglichst frühe Diagnose dieser Erkrankung neurologische Schäden verhindern und die Überlebenschance verbessern kann (Polgreen et al., 2011). Aktuell gibt es Daten, die darauf hinweisen, dass eine Früherkennung der Erkrankung innerhalb des Neugeborenen Screenings möglich ist (Hubbard et al., 2009).

Erwachsene erkranken an der Adrenomyeloneuropathie (AMN, stellt ca. 25% der ALD-Formen dar). Die Erwachsenenform AMN führt im Alter von 20 bis 40 Jahren zu einer fortschreitenden spastischen Paraparese. Etwa ein Drittel der Erkrankten entwickeln im späteren Verlauf eine fortschreitende Demyelinisierung des zentralen und peripheren Nervensystems mit einer ähnlichen Prognose wie der zerebralen Form (adulte zerebrale ALD, ACALD). Da die Krankheit X-chromosomal rezessiv vererbt wird, sind davon ausschließlich Männer betroffen (Semmler et al., 2008).

Die Ursache von X-ALD ist eine Mutation im ABCD1 Gen, lokalisiert auf dem Chromosom Xq28, welches einen ABC(ATP-bindende Kassette)-Transporter, das Adrenoleukodystrophie Protein (ALDP, Abb. 2), kodiert. Dieser Halbtransporter ist in der peroxisomalen Membran lokalisiert, wobei die ATP-bindende Domäne dem Zytosol zugewandt ist. Der Halbtransporter ALDP muss zum Homo- oder Heterodimer dimerisieren, um seine Funktion ausführen zu können.

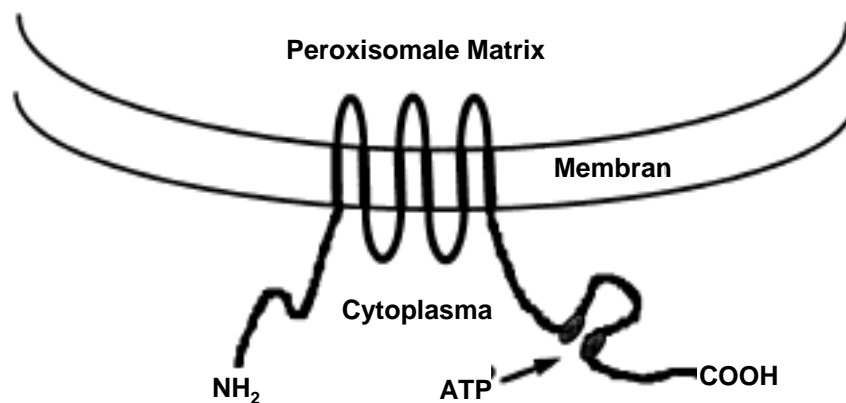


Abbildung 2: Struktur des ALDP. Ein Halbtransporter von dem typischen ABC Transporter-dimer (modifiziert nach (Moser, 1997)).

Die genaue Funktion von ALDP ist bisher noch unbekannt, wobei eine Transportfunktion von VLCFA oder VLCFA-CoA Derivaten vermutet wurde (Aubourg and Dubois-Dalcq, 2000, Kemp et al., 2011). Erst seit kurzem wurde diese Funktion bestätigt (van Roermund et al., 2008).

Es wurde nachgewiesen, dass eine Beeinträchtigung der ALDP Funktion zu einer Störung der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation (Reduktion der Aktivität um 60-80%) und somit zu einer Störung des VLCFA-Abbaus führt. Dies wiederum hat eine Anreicherung von VLCFA, vor allem Tetracosansäure (C24:0) und Hexacosansäure (C26:0), im gesamten Organismus zur Folge (Igarashi et al., 1976, Singh et al., 1984, Kemp et al., 2011).

Für ALDP wurde weiterhin eine kritische Rolle für die Aktivierung der Acyl-CoA Synthetase für den Abbau sehr langkettiger Fettsäuren (VLCS) vermutet. ALDP interagiert mit VLCS, wodurch ein funktioneller Komplex gebildet wird, der die VLCFA mit dem Co-Enzym A verestert und somit den initialen Schritt für den weiteren VLCFA-Abbau setzt. Eine fehlerhafte Interaktion von ALDP und VLCS könnte für den gestörten Abbau der VLCFA in X-ALD verantwortlich sein (Makkar et al., 2006). X-ALD ist die einzige bekannte genetische Krankheit, die durch einen Gendefekt eines ABC-Transporters (ABCD1) verursacht wird. Bis heute gibt es keine bekannte Genotyp-Phänotyp Korrelation, so dass innerhalb einer Familie bei gleicher Mutation des ABCD1-Gens unterschiedliche Ausprägungen der Krankheit beschrieben wurden. Das lässt darauf schließen, dass Modifier-Gene oder Umwelt-/Epigenetische-/Stochastische Faktoren das klinische Bild der X-ALD entscheidend modulieren (siehe Übersichtsarbeit (Singh and Pujol, 2010).

Es existieren drei weitere peroxisomale ABC-Halbtransporter: das ALD-verwandte Protein (ALDRP), das entfernt verwandte PMP70 Protein und das PMP70-verwandte (P70R) Protein (Aubourg and Dubois-Dalcq, 2000, Smith et al., 1999, Kemp et al., 2011). Diese vier humanen ABCD-Transporter teilen eine hohe Sequenzhomologie, was funktionelle Ähnlichkeiten vermuten lässt (Homologie zu ALDP: ALDRP 80%, PMP70 60% und P70R 46%) (Lombard-Platet et al., 1996, Shani et al., 1997).

Eine funktionelle Ähnlichkeit der ABCD-Transporter wurde in Fibroblasten von X-ALD-Patienten nachgewiesen. Die Überexpression von ABCD2 und/oder ABCD3 konnte die Beeinträchtigung der  $\beta$ -Oxidation kompensieren und somit die VLCFA Konzentration wieder normalisieren (Netik et al., 1999). Daher sind diese Transporter, vor allem aber ALDRP als therapeutisches Ziel von gesteigertem Interesse (Genin et al., 2011).

ALDP wird in fast allen Geweben exprimiert. Interessanterweise wurde die stärkste ALDP-Expression in Oligodendrozyten des *corpus callosum*, der *capsula interna* und der *commissura anterior* gefunden. Das sind gerade die stark myelinisierten Hirnregionen, die als erstes von der zerebralen ALD betroffen sind (siehe Übersichtsarbeit (Aubourg, 1999)). Im Gehirn von Maus und Mensch ist die Expression von ALDP auf Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten beschränkt. In Neuronen wurde ALDP bisher nicht gefunden (Fouquet et al., 1997). Dagegen werden die verwandten Proteine ALDRP und PMP70 auch in Neuronen exprimiert (siehe Übersichtsarbeit (Aubourg and Dubois-Dalcq, 2000)).

Obwohl die genetische Grundlage der meisten peroxisomalen Stoffwechselkrankheiten gut erforscht ist (Gould and Valle, 2000, Wanders and Waterham, 2005, Weller et al., 2003), ist der molekulare Mechanismus, der zu den beobachteten zellulären Veränderungen führt, bis jetzt unklar. So ist zum Beispiel die Wirkung einer VLCFA-Akkumulation auf die unterschiedlichen Zellen des Gehirns unbekannt. Therapien für eine vollständige Heilung von X-ALD Patienten gibt es bislang noch nicht. Um die Krankheit zu verlangsamen und/oder bestenfalls zu stoppen wird auf folgende Behandlungen zurückgegriffen: Hormonersatztherapie der Nebennierenhormone, diätetische Verabreichung von Lorenzo's Öl (Gemisch aus einfach ungesättigten Fettsäure) und Knochenmarkstransplantation. Wobei die Knochenmarkstransplantation die einzige Behandlung ist, die nachweislich Patienten in frühen Krankheitsstadien vor einer dramatischen Entwicklung der Krankheit schützt (siehe Übersichtsarbeit (Semmler et al., 2008, Moser et al., 2004)). Neue Therapieansätze werden zurzeit diskutiert, wie Gentherapie und protektive, antioxidante Medikamente, sind aber noch nicht für den Patienten verfügbar (Morita et al., 2011, Berger et al., 2010).

Es gilt als gesichert, dass die Anreicherung von VLCFA, vor allem im Gehirn, eine frühe biochemische Veränderung im Verlauf der X-ALD ist (Theda et al., 1992). Die VLCFA gehören zu der interessanten Stoffgruppe der Fettsäuren, die zum einen mannigfaltige physiologische Aufgaben erfüllen und zum anderen mit schwerwiegenden Erkrankungen assoziiert sind.

## 1.2 Freie Fettsäuren im Organismus

Fettsäuren sind Carbonsäureketten unterschiedlicher Länge sowie Sättigungsgrad und stellen ubiquitäre Bestandteile aller lebenden Organismen dar. Im Menschen werden sie mit der Nahrung aufgenommen oder selbst synthetisiert. Über das Blut werden unveresterte freie Fettsäuren (FFA = *free fatty acid*) mit Hilfe von Serumalbumin transportiert. Albumin besitzt 6 spezifische Bindungsstellen und kann darüber hinaus Fettsäuren auch unspezifisch binden. Die maximal gebundene Menge beträgt 6-13 mol Fettsäuren pro mol Albumin. Für den Transport von Fettsäuren in die Zelle sind zytoplasmatische Transportproteine (FABP = *fatty acid binding protein*) verantwortlich (Sigel et al., 1999, Stryer, 1996). In biologischen Systemen kommen Fettsäuren gewöhnlich mit einer geraden Anzahl von Kohlenstoffatomen vor, die sich typischerweise zwischen 14 und 26 bewegt. Die spezifischen Eigenschaften der Fettsäuren, ihr Abbau sowie ihre Signalwirkung hängen entscheidend von der Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen ab (Lima et al., 2002). So werden kurze bis mittellange Fettsäuren vollständig in den Mitochondrien oxidiert, während verzweigt-kettige Fettsäuren und sehr-langkettige Fettsäuren mit einer Länge von über 20 Kohlenstoffatomen in den Peroxisomen zu mittelkettigen Acyl-CoAs abgebaut werden (Abb. 3). Hier werden, im Gegensatz zur Oxidation in den Mitochondrien, die Elektronen ohne Energiegewinnung auf molekularen Sauerstoff übertragen und nicht zur Bildung von ATP genutzt. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird durch Katalasen in den Peroxisomen zu Wasser und Sauerstoff abgebaut.

Neben ihrer Funktion als Metabolit spielen Fettsäuren eine entscheidende Rolle als Signalstoff und regulieren viele Stufen von Inflammation, Chemotaxis, Zelladhäsion und Zellaktivierung. Darüber hinaus können Fettsäuren auch zytotoxisch wirken. Vor allem die chronische Überladung des Organismus mit nichtoxidierten, langkettigen Fettsäuren und Lipiden kann Lipoapoptose und damit Zelltod auslösen (siehe Übersichtsarbeit (Unger and Orci, 2002)). Dabei ist besonders das Nervensystem für hohe, zytotoxische Konzentrationen an FFA anfällig, wodurch bestimmte neurodegenerative Krankheiten im Zusammenhang mit Stoffwechselstörungen von Fettsäuren stehen. Somit kommt der Aufklärung des zugrunde liegenden Schädigungsmechanismus der toxischen FFA eine besondere Bedeutung zu, bietet diese doch Ansätze für therapeutische Interventionen. Frühere Arbeiten erklärten die zytotoxische Wirkung der FFA mit ihrer zerstörenden Wirkung auf Zellmembranen sowie der Akkumulation ihrer Metabolite (Raichle, 1983).

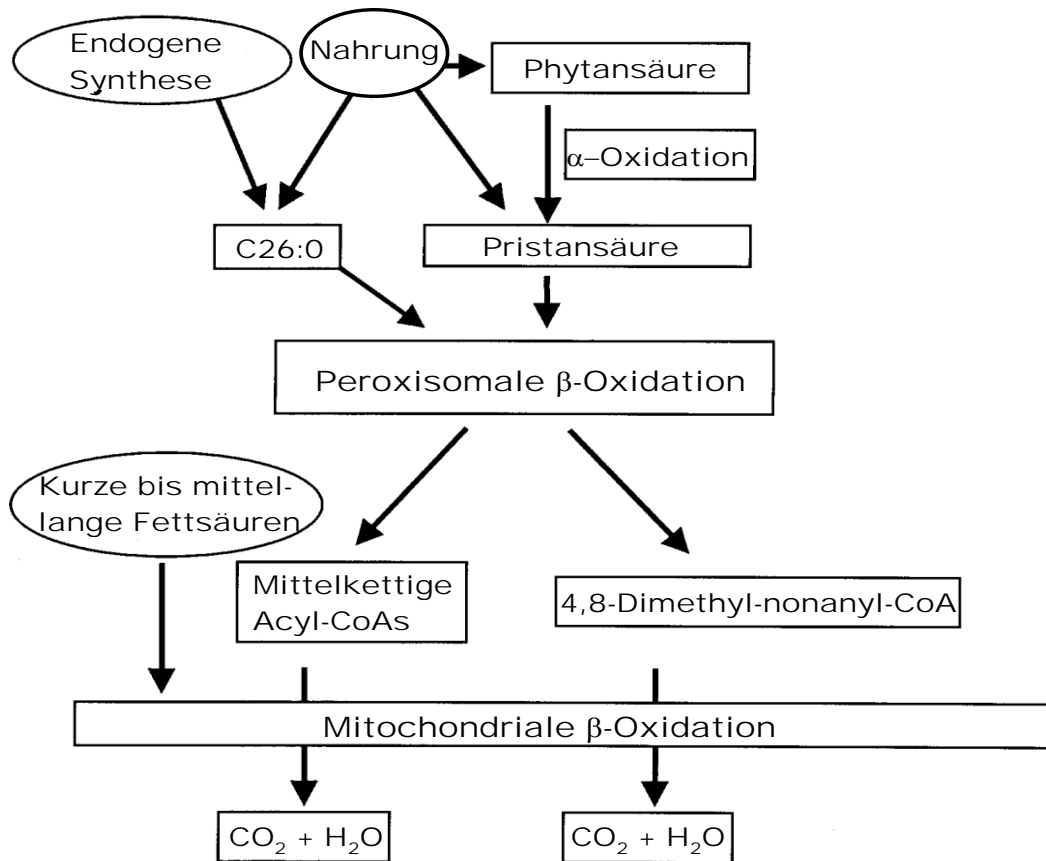


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema des Abbaus von VLCFA und verzweigt-kettigen Fettsäuren (modifiziert nach (Wanders et al., 2001)).

Mit einer Serie neuerer Untersuchungen wurde am Beispiel der Phytansäure (Abb. 4), einer verzweigt-kettigen, gesättigten Fettsäure, die ein Marker für die Refsum Krankheit darstellt, eine genaue Analyse des zytotoxischen Effekts von Fettsäuren durchgeführt. Zunächst wurde die Wirkung der Phytansäure auf Hirnzellen untersucht. Es zeigte sich, dass Phytansäure in nur kurzer Zeit Zelltod von primären Astrozyten auslöst. Phytansäure beeinträchtigte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase erheblich, führte zur Depolarisation der Mitochondrien und induzierte die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Palmitinsäure, eine ähnliche Fettsäure ohne Verzweigungen, hatte dagegen keine Wirkung auf Astrozyten (Kahlert et al., 2005a).

Ein Jahr zuvor zeigten bereits Experimente an isolierten Mitochondrien, dass Phytansäure Mitochondrien für die so genannte Permeabilitäts Transition (permeability transition, PT) sensibilisiert, was wiederum zellschädigend wirkt (Schönfeld et al., 2004). Die dramatische Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und mitochondriale Fehlfunktionen gelten als wichtige Auslöser von Zelltod. PT der inneren mitochondrialen Membran (IMM) führt zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi$ ) (Blomgren et al., 2003, Hunter et al., 1976).

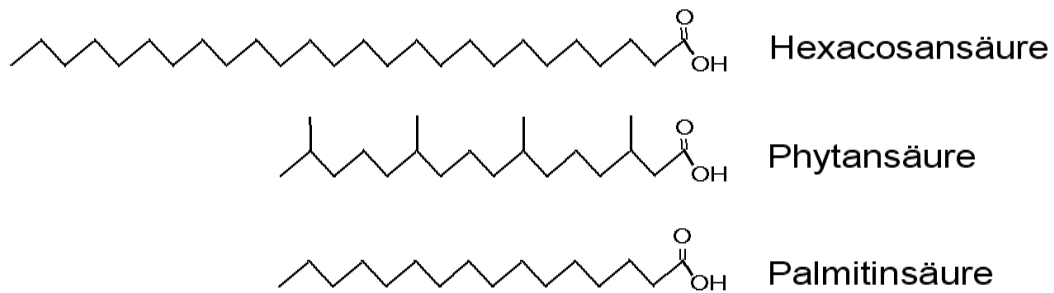


Abbildung 4: Darstellung einer sehr langkettigen (Hexacosanäure), einer verzweigt-kettigen (Phytansäure) und einer mittellangen gesättigten Fettsäure (Palmitinsäure).

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Phytansäure den Zelltod von Astrozyten durch eine Störung der Mitochondrien auslöst (Reiser et al., 2006). Es ist unwahrscheinlich, dass der vorgestellte komplexe Schädigungsmechanismus der Phytansäure für alle toxischen Fettsäuren generalisiert werden kann. Vielmehr sind unterschiedliche Wirkmechanismen verschiedener Fettsäuren verbunden mit einer differenzierten Wirkung auf die neuronalen Zelltypen denkbar. So stehen, wie bereits erwähnt, die bisher wenig untersuchten „sehr langkettigen Fettsäuren“ (VLCFA) ebenfalls mit neurodegenerativen Erkrankungen im Zusammenhang. Es ist jedoch noch gänzlich unbekannt, ob und in welchem Ausmaß VLCFA-Akkumulation für Hirnzellen toxisch ist.

### 1.3 Sehr-langkettige Fettsäuren

Unter dem Begriff sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA, z.B. Abb. 4 Hexacosansäure) werden alle gesättigten Fettsäuren die eine Länge von 22 Kohlenstoffatomen überschreiten zusammengefasst. Der initiale Abbau von VLCFA und verzweigt-kettigen Fettsäuren findet hauptsächlich in den Peroxisomen statt.

In Säugern ist das Gehirn und im speziellen das Myelin reich an langen und sehr langen Fettsäuren (Knoll et al., 2000). Vor allem Myelin beinhaltet bis zu 20% an Fettsäuren mit einer Länge von mehr als 18 Kohlenstoffatomen. Die Synthese von VLCFA ist essenziell für die normale Funktion der Myelinschicht. Andererseits führt die abnormale Akkumulation dieser Fettsäuren zu verheerenden Schäden im Gehirn. VLCFA, hauptsächlich C24:0 und C26:0, akkumulieren in hohen Konzentrationen in Patienten mit gestörter peroxisomaler Funktion, wie X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD), Zellwegers Syndrom und infantile Refsum Erkrankung. Wobei X-ALD eine der häufigsten Krankheiten dieser Art ist. (siehe Übersichtsarbeit (Moser, 1997).

Die Plasmakonzentration von C24:0 und C26:0 ist bei X-ALD-Patienten dramatisch erhöht (um das 3- bis 5-fache) und kann für C26:0  $1,52 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$  betragen (Wanders et al., 1992). Im Gegensatz dazu ist die Konzentration von C22:0 nur leicht erhöht (Paik et al., 2001). VLCFA wurde in X-ALD Patienten hauptsächlich in der weißen Substanz des Gehirns, in der Nebennierenrinde und im Blutplasma gefunden (Moser et al., 1999, Moser, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass sich VLCFA im Myelin vor allem in Gangliosiden, Phosphatidylcholinen, Proteolipiden und Cholesterinestern anreichern (Igarashi et al., 1976). Neueste Untersuchungen mit Hilfe der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie zeigten, dass die höchste Konzentration von VLCFA in Lyso-phosphatidylcholinen (LPC) zu finden ist (Hubbard et al., 2006).

### 1.3.1 Wirkung von VLCFA auf den Organismus

Die Wirkung von VLCFA auf den Organismus ist noch nicht im Detail analysiert worden. Auf Grund der Tatsache, dass es eine starke Korrelation zwischen Plasmakonzentration an VLCFA und dem Schweregrad des Phänotyps peroxisomaler Krankheiten gibt (Moser et al., 1999), sind multiple Auswirkungen auf Zell- und Organfunktionen sehr wahrscheinlich.

VLCFA werden als komplexe Lipide in Zellmembranen der weißen Hirnsubstanz und der Nebennierenrinde inkorporiert. Der Einbau von VLCFA an Seitenketten von Proteolipiden, Gangliosiden und Phospholipiden führt wahrscheinlich zu einer Destabilisierung und zum Zerfall der Myelinschicht (siehe Übersichtsarbeit (Aubourg and Dubois-Dalcq, 2000, Singh and Pujol, 2010)). Andere Studien haben gezeigt, dass VLCFA destabilisierend auf Zellmembranen wirken (Aubourg, 1999), in Myelin inkorporieren (Di Biase et al., 1997) oder die Mikroumgebung von Zellen stören können, was zu Fehlfunktionen und Zelltod der betreffenden Zellen führt (Powers and Moser, 1998).

Es wird vermutet, dass VLCFA ähnlich wie andere Fettsäuren oxidativen Stress über die Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette und der Membranfluidität auslösen können (Schönfeld and Reiser, 2006, Schönfeld and Wojtczak, 2007). Tatsächlich konnte *in vitro* und *ex vivo* an organotypischen Schnitten des Rückenmarks gezeigt werden, dass VLCFA oxidativen Stress induzieren (Fourcade et al., 2008). Des Weiteren wies diese Arbeitsgruppe eine VLCFA vermittelte Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials in humanen Fibroblasten nach. Oxidativer Stress und zelluläre Schädigung scheinen also frühe Ereignisse innerhalb des pathologischen Verlaufs von VLCFA-assoziierten Erkrankungen zu sein.



Der oxidative Stress konnte als wichtiger Faktor im Verlauf der X-ALD Krankheit mit Hilfe von X-ALD Fibroblasten weiter belegt werden (Fourcade et al., 2008). Demnach korreliert der Funktionsverlust von ALDP mit einer gestörten Homöostase der oxidativen Stressantwort. Erhöhter oxidativer Stress und Schädigung wurde in vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel Alzheimersche Krankheit, Parkinson und Amyotrophe Lateralsklerose, gefunden (Ilieva et al., 2007, Pamplona et al., 2005). Neben den geschädigten Mitochondrien kommen weitere Quellen für die erhöhte Produktion von ROS durch die Wirkung von Fettsäuren in Frage: (I) die Umwandlung der ungesättigten Arachidonsäure über Lipoxygenase (Traystman et al., 1991) (II) und der Abbau von VLCFA in den Peroxisomen (Schlüter et al., 2007, Wanders et al., 2001).

Da, wie bereits erwähnt, die VLCFA-Konzentration im Myelin hoch ist und unter pathologischen Bedingungen eine Demyelinisierung der weißen Substanz einsetzt, kann eine zentrale Rolle der Oligodendrozyten beim Krankheitsverlauf angenommen werden. Ihre Funktion und Entwicklung ist im Folgenden kurz vorgestellt.

### **1.4 Entwicklung und Funktion von Oligodendrozyten**

Die zu den Gliazellen des ZNS gehörenden Oligodendrozyten sind hauptsächlich für die Bildung der Myelinschicht verantwortlich. Man unterscheidet 3 Klassen: Satelliten-, intermediäre und myelinbildende Oligodendrozyten, die sich in Ort, Morphologie und Funktion unterscheiden. Die myelinbildenden Oligodendrozyten umwickeln mit ihren Fortsätzen in mehrfachen spiraligen Schichten die Axone von Neuronen. Beim Myelin handelt es sich um eine spezialisierte Plasmamembran, die zu etwa 30% aus Membranproteinen und zu etwa 70% aus Phospholipiden, Glykolipiden und Cholesterin besteht. Ferner fehlen im kompakten Myelin Ionenkanäle fast vollständig, weshalb Axone von Myelin sehr gut elektrisch isoliert werden, was Myelin essentiell für die saltatorische Weiterleitung von Signalen macht. Ein Oligodendrozyt kann bis zu 40 Axonsegmente myelinisieren (Sigel et al., 1999, Agresti et al., 2005).

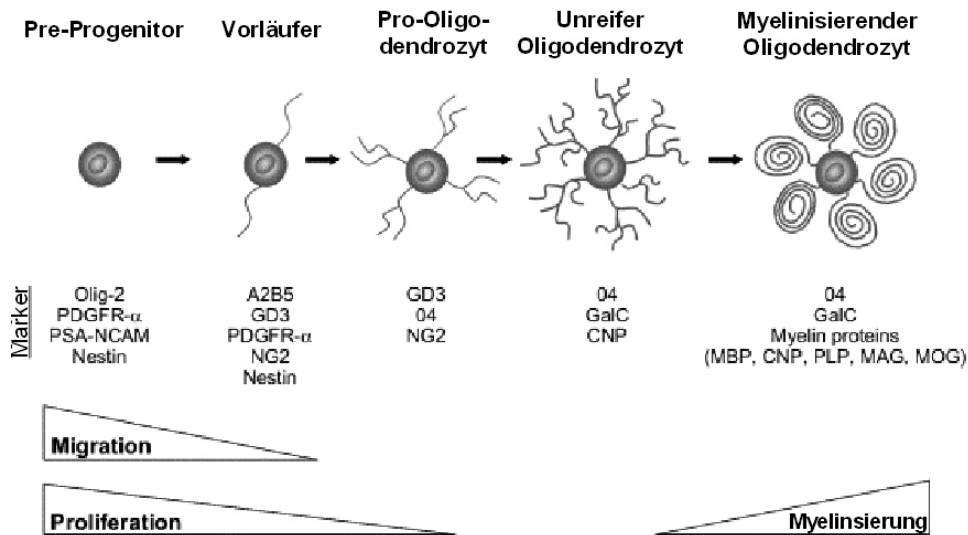


Abbildung 5: Prozess der Oligodendrozytenentwicklung (modifiziert nach (Agresti et al., 2005)).

Die Entwicklung bzw. Reifung von Oligodendrozyten verläuft über Zwischenstufen, die durch die Expression spezifischer Proteine gekennzeichnet sind. Während der Entwicklung zu myelinbildenden Oligodendrozyten verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Migration und Proliferation und bilden eine komplexe Morphologie aus.

Bevor Oligodendrozyten die Myelinschicht bilden können, durchlaufen sie mehrere Entwicklungsstadien, die jeweils durch die Expression spezifischer Proteine gekennzeichnet sind (Abb. 5). Oligodendrozyten stammen von neuroektodermalen Vorläuferzellen der Subventrikularzone ab. Die sich entwickelnden Progenitorzellen wandern dann zu ihren Zielorten. Im folgenden bipolaren Entwicklungsstadium können die Zellen entweder zu Oligodendrozyten oder zu Typ 2 Astrozyten differenzieren. Über eine weitere Zwischenstufe erreichen die Oligodendrozyten das unreife Stadium. Ab diesem Stadium lassen sich die Zellen durch die Expression von 2',3'-Zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (CNP) charakterisieren (Abb. 6). Die terminale Differenzierung zu myelinisierenden Oligodendrozyten ist durch die Expression der beiden Myelinproteine Proteolipid Protein (PLP) und basisches Myelinprotein (MBP) gekennzeichnet und folgt *in vitro* 2-3 Tage nach dem Beginn der CNP-Expression (Baumann and Pham-Dinh, 2001, Agresti et al., 2005, Sigel et al., 1999).

Der krankheitsbedingte Abbau der Myelinscheiden wird im Falle der X-ALD von einer erhöhten Ausschüttung von Zytokinen sowie Chemokinen begleitet.

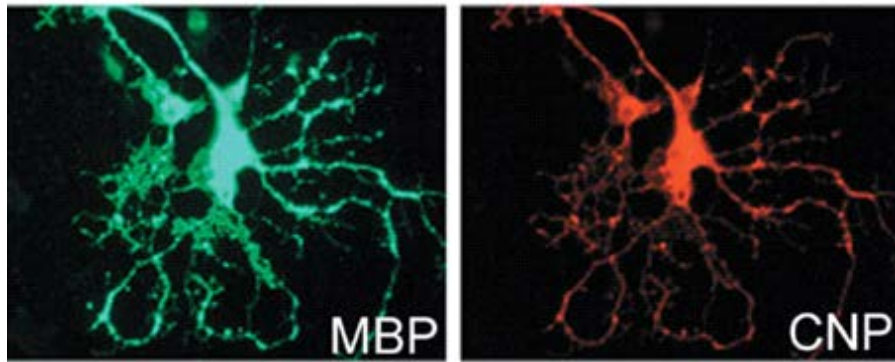


Abbildung 6: Nachweis der Expression von MBP (links, grün) und CNP (rechts, rot) in myelinisierenden Oligodendrozyten (modifiziert nach (Lappe-Siefke et al., 2003)).

## 1.5 Zytokine und Chemokine

In den von der Krankheit akut betroffenen Arealen des Gehirns von X-ALD-Patienten zeigten Makrophagen, Mikroglia und insbesondere Astrozyten eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukine, Chemokine und der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) (Gilg et al., 2000, Semmler et al., 2008, Powers et al., 1992). Zytokine sind eine Gruppe von löslichen oder membrangebundenen Proteinen, die komplexe Reaktionen innerhalb des Immunsystems regulieren. Dazu gehören unter anderem Angiogenese und Entzündungsreaktionen. Neben den vielfältigen Aufgaben im Immunsystem wirken Zytokine insbesondere im Nervensystem auf viele physiologische und pathologische Zellprozesse.

Eines der am meisten untersuchten Zytokine ist der Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). TNF $\alpha$  moduliert unter anderem Entzündungen, Immunreaktionen, Mitogenese und Ca<sup>2+</sup>-Homöostase. Eine andere Familie von Zytokinen sind Interleukine (IL), zum Beispiel IL-1 $\beta$  und IL-6. (siehe Übersichtsarbeit: (Ledeen and Chakraborty, 1998)).

Im ZNS, wo die Konzentration an Zytokinen unter normalen Bedingungen gering ist, spielen Zytokine vor allem während der Entwicklung eine wichtige Rolle. Eine starke Erhöhung der Zytokinexpression im Gehirn ist bei Infektionen, Verletzungen, Schlaganfall und Entzündungsreaktionen zu finden. Die physiologische Funktion des Interleukins IL-6 im ZNS ist komplex und reicht von neurotropher und neuroprotektiver Wirkung bis zu Inflammation, Demyelinisierung und Astroglia (Van Wagoner and Benveniste, 1999). Des Weiteren werden TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  im ZNS von Mikroglia, Astroglia, Neuronen und Endothelzellen freigesetzt (Rothwell, 1991).

Unter dem Begriff Chemokine wird eine Gruppe von mehr als 50 kleinen Proteinen (8-14 kDa) zusammengefasst, die eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen im ZNS spielen. Unter anderem sind sie involviert in pathologische Zustände von Multiple Sklerose (MS) und Alzheimers Erkrankung (AD) (Mennicken et al., 1999). Das Chemokin GRO/CINC-1 (*growth-regulated oncogene/cytokine-induced neutrophil chemoattractant*) der Ratte, ein Mitglied der C-X-C-Familie (entspricht dem humanen Proteinen GRO und IL-8. GRO/CINC-1), wird in inflammatorischen Zellen exprimiert und ist in der neutrophilen Infiltration und anderen inflammatorischen Prozessen involviert (Watanabe et al., 1989). In ischämischen Hirnregionen ist die Konzentration an GRO/CINC-1 zeitweise erhöht und bewirkt das Eindringen von Granulozyten in das Gehirn (Yamasaki et al., 1995).

## 1.6 Zielstellung der Arbeit

X-ALD ist eine unheilbare neurodegenerative peroxisomale Stoffwechselerkrankung, die zwar genetisch gut charakterisiert, deren pathochemischer Schädigungsmechanismus jedoch weitestgehend unverstanden ist. Da die Krankheit mit einer stark erhöhten Konzentration von VLCFA im Gehirn einhergeht und für die VLCFA bereits eine zellschädigende Wirkung an Fibroblasten und an Schnittkulturen des Rückenmarks beschrieben wurde, wird eine zentrale Rolle der VLCFA für die Vermittlung des neuronalen Zellschadens bei X-ALD angenommen. Somit sollen anhand von dezidierten Untersuchungen die zellphysiologischen Konsequenzen der VLCFA-Akkumulation für die drei bei der Krankheit wesentlich beeinflussten Zelltypen des Gehirns, das heißt Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, aufgeklärt werden. Die Stoffgruppe der VLCFA soll mit der Analyse von Docosansäure (C22:0, Behensäure), Tetracosansäure (C24:0, Lignocerinsäure) und Hexacosansäure (C26:0, Cerotinsäure) komplett analysiert werden, um eventuelle Unterschiede der zellschädigenden Potenz der einzelnen Fettsäuren beschreiben zu können. In Anlehnung an bereits gut beschriebene pathochemische Effekte der kurzkettigeren Phytansäure auf neuronale Zellen, wird die Wirkung von VLCFA auf die Produktion von ROS, das Mitochondriale Membranpotential, die intrazelluläre Kalziumkonzentration, die Zytokin /Chemokinausschüttung sowie den Zelltod untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sollen den biochemischen Schädigungsmechanismus der X-ALD auf zellulärer Ebene aufklären, um neue Ansätze für therapeutische Strategien finden zu können.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Maus ABCD1 (-/-) knockout	A. Pujol (Barcelona, Spanien)
Maus C57/Bl6	Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland
Ratte Wistar-Unilever	Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland

#### 2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bioruptor	Diagenode SA, Liège, Belgien
Brutschrank: Nuair IR Auto Flow CO <sub>2</sub> Water-	Zapf Instruments, Sarstedt, Deutschland
Cellulosenitrat (E) Protran BA83, 0,2 µm	Schleicher Schuell, Dassel, Deutschland
Deckgläser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Densitometer GS-800 Calibrated	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Eagle Eye Still Video System	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Emax precision micorplate reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Elektrophorese power supply	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Gewebekulturschalen	Greiner bio-one, Frieckenhausen, Deutschland
Gel-Plotting Papier	Schleicher Schuell, Dassel, Deutschland
Gelelektrophorese System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
iCycler für real-time PCR	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Kamera CCD, Inerline Transfer CCD Kamera IMAGO Typ VGA	Agilent Technologies/TILL Photonics, Gräfelfing,, Deutschland
Luminescence Spectrometer, LS 50B	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
Mikro-Infusions Pumpe, Mi60-2FBZ	World Precision Instruments
Mikroskop LSM510 Laserscan Konfokal Axiover 135 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop für Fluoreszenzimaging Axiovert 135	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop für Lichtmikroskopie invers Axiovert 25C	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Monochromator, Polychrome IV	Agilent Technologies/TILL Photonics, Gräfelfing,, Deutschland
Objektive für Mikroskope	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Perfusion, Schlauchpumpe MC-MS	ISMATEC, Glattbrugg, Schweiz
pH-Meter. pH763	Knick, Berlin, Deutschland
PP-Testubes Cellstar	Greiner bio-one, Frieckenhausen, Deutschland
Präparationsbesteck	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Spektrometer, UV/visible	Pharmacio Biotech, Freiburg, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
TILLvislon Programm, Version 4.0	Agilent Technologies/TILL Photonics, Gräfelfing,, Deutschland
Wasserbad, Typ: MP-PA/KUE	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Avanti 30	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Biofuge A, 13 R, 3.2 RS	Heraeus, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 35R Typ 1710	Hettrich Zentrifugen, Leipzig, Deutschland

## 2.1.3 Chemikalien und Substanzen

### 2.1.3.1 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
ADIFAB Free Fatty Acid Indicator (A3880)	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Albumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Antibiotika, Penicillin-Streptomycin (100x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Antimycin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-APB	Millipore/Chemicon, Billerica, MA, USA
ATP, Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Baysilone-Paste mittelviskos	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
B27	Gibco, Eggenstein, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
α-Cyclodextrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dihydroethidium	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DNase Typ IV	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Docosanoic acid, Docosansäure	Larodan/CPS , Aachen, Deutschland
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Entwickler G138i (Entwickler-Lösung)	AGFA, München, Deutschland
FCCP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fura-2 AM	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glucose H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin, stabilisiert	Biochrom, Berlin, Deutschland
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hexacosanoic acid, Hexacosansäure	Larodan/CPS , Aachen, Deutschland
Hoechst33342	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
4-Hydroxynonenal	Merck, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Immersionsöl, Immersol <sup>TM</sup> 518N	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Inaktiviertes Fötales Kälberserum FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgSO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na-Gluconat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nukleinsäure Standardmarker, GeneRuler 100bp DNA Ladder, GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Oligomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Palmitic acid, Palmitinsäure	ICN Pharmaceuticals (Plainview, NY, USA)
Penicillin und Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
PFA	Fluka Chemika, Sigma, Deutschland
Phytansäure	Ultra Scientific, LGC Promochem, Wesel, Deutschland
Pluronic acid	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S Solution (0,2% in Essigsäure)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Pristansäure	Larodan, Malmö, Schweden)
Protease Inhibitor Cocktail Complete	Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland
Protein A/G Plus Agarose	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

Protein Standardmarker, Precision Plus	Bio-Rad, München, Deutschland
Pyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rhodamin 123	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNAse	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schnellfixierbad G334i (Fixierlösung)	AGFA, München, Deutschland
Stab. Glutamin (Ala-Ala-Gln)	Biochrom, Berlin, Deutschland
SYTO 59	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Tetracosanoic acid, Tetracosansäure	Larodan/CPS , Aachen, Deutschland
TNB Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
TNB Protein-Lipid-Komplex	Biochrom, Berlin, Deutschland
Triton-X100	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin Inhibitor	Merck, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin Typ XI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
U73122	Merck, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
U73433	Merck, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ultrosor G Serum Replacement	Gibco, Eggenstein, Deutschland

2.1.3.2 Kits

Name	Nutzung	Hersteller
Cytotoxicity Detection Kit	Messung der LDH-Aktivität	Roch Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
ELISA-Kit IL-6 rat	Detektion von IL-6	Biosource International, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ELISA-Kit GRO/CINC-1 rat	Detektion von GRO/CINC-1	Amersham Bioscience, München, Deutschland
HotStarTaq Plus Master Mix kit	RT-PCR	Quiagen, Hilden, Deutschland
MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit	Isolation genomischer DNA	Epicentre, Medison, USA
Omniscript Reverse Transcription kit	Herstellung von cDNA	Quiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini kit	Isolation von RNA	Quiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Entfernen von genomischer DNA während der RNA-Isolation	Quiagen, Hilden, Deutschland
iScript cDNA synthesis kit	Herstellung von cDNA für real-time PCR	BioRAD, München, Deutschland
Supersignal West Pico kit	Detektion von Western Blot	Pierce, Rockford, IL, USA
iQ SYPr Green supermix	Real-time PCR	BioRAD, München, Deutschland



2.1.3.3 Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
chicken anti GFAP	Millipore/Chemicon, Billerica, MA, USA
donkey anti goat Alexa 488	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
goat anti MBP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
goat anti chicken Alexa 633	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
goat anti mouse Alexa 555	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
goat anti rabbit Alexa 488	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
mouse anti CNPase	Referenz (Reiser et al., 1994)
mouse anti HNE	R&D Systems, Minneapolis, USA
mouse anti Synapototagmin	Synaptic System, Göttingen, Deutschland
mouse anti GFAP (Western Blot)	Millipore/Chemicon, Billerica, MA, USA
peroxidase-conjugated anti mouse und anti rabbit IgG	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
rabbit anti Synaptotagmin 1	Synaptic System, Göttingen, Deutschland
rabbit anti GFAP	Millipore/Chemicon, Billerica, MA, USA

2.1.3.4 RT-PCR Primer

Primer	Sequence	Tm (°C)	PCR Produkt
Rn IL-6F	5'-CCA CTG CCT TCC CTA CTT-3'	55	499 bp
Rn IL-6R	5'-TTG GTC CTT AGC CAC TCC T-3'		
Rn IL-8F	5'-CTC CAG CCA CAC TCC AAC AGA-3'	55	670 bp
Rn IL-8R	5'-CAC CCT AAC ACA AAA CAC GAT-3'		
YFrnTNF-alphaFW	5'-GAT GCC CAC GTC GTA GCA AA-3'	50	350 bp
YFrnTNF-alphaRV	5'-CCC TTC TCC AGC TGG AAG AC-3'		
YFrnIL-1betaFW	5'-TGA TGT TCC CAT TAG ACA GC-3'	60	380 bp
YFrnIL-1betaRV	5'-GAG GTG CTG ATG TAC CAG TT-3'		
RNGAPDHF	5'-TAT GTC GTG GAG TCT ACT GGC GTC-3'	60	600 bp
RNGAPDHR	5'-GAA TGG GAG TTG CTG TTG AAG TCA-3'		
SRmmABCD1gen_d_fw	5'-CCA GAC CTA GCT TCA CAG ATC AAC C-3'	60	WT 200 bp KO 1200 bp
SRmmABCD1gen_c_rv	5'-TAG TCC CTG GAG CCT TG-3'		
SRmmABCD1gen_e_fw	5'-CAT TGG CGA ATT CGA ACA C-3'	55	WT 0 bp KO 1000 bp
SRmmABCD1gen_b_rv	5'-CCT CAG AAG AAC TCG TCA AG-3'		

2.1.3.5 Real-time PCR Primer

Primer	Sequence	Tm (°C)	PCR Produkt
Rn IL-6F	5'-CCA CTG CCT TCC CTA CTT-3'	55	499 bp
Rn IL-6R	5'-TTG GTC CTT AGC CAC TCC T-3'		
Rn IL-8F	5'-CTC CAG CCA CAC TCC AAC AGA-3'	55	670 bp
Rn IL-8R	5'-CAC CCT AAC ACA AAA CAC GAT-3'		
YFrnTNF-alphaFW	5'-GAT GCC CAC GTC GTA GCA AA-3'	50	350 bp
YFrnTNF-alphaRV	5'-CCC TTC TCC AGC TGG AAG AC-3'		
YFrnIL-1betaFW	5'-TGA TGT TCC CAT TAG ACA GC-3'	60	380 bp
YFrnIL-1betaRV	5'-GAG GTG CTG ATG TAC CAG TT-3'		
RNGAPDHF	5'-TAT GTC GTG GAG TCT ACT GGC GTC-3'	60	600 bp
RNGAPDHR	5'-GAA TGG GAG TTG CTG TTG AAG TCA-3'		

## 2.1.4 Medien und Lösungen

### 2.1.4.1 Zellkultur, Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie, Immunzytochemie

<u>Blockierungspuffer</u> <u>FSBB</u>	FCS	16%
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM
	NaCl	450 mM
	Triton-X 100	0,3%
<u>DMEM für Gliazellen</u> 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> 4,5 g/l D-Glucose stabilem Glutamin ohne Na-Pyruvat	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	FCS	0,1 ml/ml
<u>Hanks balanced salt</u> <u>solution (HBSS)</u>	KCl	5,44 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,34 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0,49 mM
	MgSO <sub>4</sub>	0,41 mM
	NaCl	132 mM
	HEPES	10 mM
	Glucose	5,56 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	4,17 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,26 mM
Ca <sup>2+</sup> frei	Ohne CaCl <sub>2</sub> EGTA	0,6 m M
<u>Hochsalz-Puffer</u>	NaCl	500 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM
<u>Neuronenmedium N</u> pH 7,3	TNB Medium	0,85 ml/l
	TNB Protein-Lipid- Komplex	0,02 ml/ml
	Pen/Strep	0,01 ml/ml
	Stab. Glutamin	0,01 ml/ml
	NaHCO <sub>3</sub>	4,8 µl/ml
	Glucose 1M	0,02 ml/ml
	Pyruvat (11mg/ml)	0,01 ml/ml
	HEPES 200mM	0,05 ml/ml
	B27	0,02 ml/ml
	FCS	0,02 ml/ml
<u>Niedrigsalz-Puffer</u>	NaCl	150 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
<u>PFA-Lösung 4%</u>	PFA	4 %
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	120 mM
	Saccharose	4 %

## Material und Methoden

---

<u>Präparationsmedium</u> Steril filtriert, pH 7,3	5% Modif-Lösung	HEPES	10 mM
		Pyruvat-Na	1 mM
		Glucose H <sub>2</sub> O	10 mM
		Stab. Gln (Ala-Ala-Gln)	2 mM
		DNase Typ IV	12 µg/ml
		Albumin	1 mg/ml
	95 % PBS Cl <sup>-</sup> arm	Antibiotika (100x)	0,01 ml/ml
		CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,25 mM
		MgCl <sub>2</sub>	5,8 mM
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	8,5 mM
		Na-Gluconat	120 mM
		NaCl	20 mM
		<u>Poly-L-Lysin</u>	0,1 mg/ml

### 2.1.4.2 Molekularbiologie/Proteinbiochemie

<u>60% Acrylamid/Bis</u>	Acrylamid	58.4 g/100ml
	N,N'-Methylen- bisacrylamid	1.6 g/100ml
<u>Ethidiumbromid-Lösung</u>	10 mg/ml	
<u>4 x Laemmli- Probenpuffer</u>	Tris/HCl, pH 6, 8	500 mM
	SDS	8%
	Glycerol	40%
	Bromophenolblue	0,005%
<u>Laufpuffer</u> pH 8,5	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1%
<u>1 x NaHBS</u> pH 7.4	NaCl,	145 mM
	KCl	5,4 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
	Glucose	25 mM
	HEPES	20 mM
<u>PER-Lösung</u>	Ammoniumper- oxodisulfat	10% (w/v) in H <sub>2</sub> O
<u>1 x PBS</u> pH 7.4	NaCl,	137 mM
	KCl	2,6 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM

## Material und Methoden

---

<u>RIPA-Puffer</u>	Tris, pH 7.4	50 mM	
	Igepal CA630	1%	
	Na-deoxycholate	0,25%	
	NaCl	150 mM	
	EDTA	1 mM	
	NaF	1 mM	
	Complete Protase Inhibitor Cocktail	1 Tablette pro 50 ml	
<u>Sammelgel-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 6.8	250 mM	
	SDS	10% (w/v) in H <sub>2</sub> O	
<u>SDS PAGE Gel für 2 Gele</u>	10% Trenngel	60% Acrylamide/Bis	2,0 ml
		Trenngel-Puffer	6,0 ml
		H <sub>2</sub> O	3,8 ml
		10% SDS-Lösung	0,12 ml
		1x PER-Lösung	0,06 ml
		TEMED	0,024 ml
	4% Sammelgel	60% Acrylamide/Bis	0,335 ml
		Sammelgel-Puffer	2,5 ml
		H <sub>2</sub> O	2,065 ml
		10% SDS-Lösung	0,05 ml
		1x PER-Lösung	0,04 ml
		TEMED	0,01 ml
		Bromophenolblau	0,002 ml
<u>Stripping-Puffer</u>	Tris, pH 6.8	62,5 mM	
	β-Mercaptoethanol	100 mM	
	SDS	2%	
<u>1 x TAE pH 7.4</u>	Tris	40 mM	
	NaOAc	5 mM	
	EDTA	1 mM	
<u>10 x TBST</u>	Tris, pH 7,6	24,2 g/l	
	NaCl	80 g/l	
<u>Transferpuffer</u>	Tris	25 mM	
	Glycine	192 mM	
	Methanol	20% (v/v)	
<u>Trenngel-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 8.8	750 mM	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Primäre hippokampale Co-Kultur

Die Präparation und Isolierung der primären Co-Kultur erfolgte unter sterilen Bedingungen (Kahlert et al., 2005b). Als Ausgangsmaterial dienten Gehirne von ein bis drei Tage alten Wistar-Ratten. Nach Dekapitierung wurde die Schädeldecke geöffnet und das Gehirn entnommen. Das Organ wurde mit eiskalter Präparationslösung gewaschen und entlang des Interhemisphärenspaltes durchtrennt. Die Hippokampi wurden herauspräpariert und in eiskalte Präparationslösung überführt. Nach der Entfernung von Blutgefäßen wurden sie mittels Gewebeschneider (Mikrotom) in 300 µm dicke Schnitte geteilt und dreimal in Präparationslösung gewaschen. Einzelzellen wurden durch Inkubation mit Trypsin XI (4 mg/ml, 37°C, 7 min) aus dem Gewebeverband herausgelöst. Anschließend wurde die Reaktion durch Trypsin-Inhibitor-Lösung gestoppt. Mit einer feuerpolierten Pasteurpipette wurde das Gewebe mit zehn Stößen trituiert. Nach der sich anschließenden Zentrifugation (30 s bei RCF 50) wurde der Überstand abgenommen. Das verbleibende Pellet wurde in Präparationslösung mittels verengter Pasteurpipette mit 20 Stößen nochmals trituiert. Erneut wurde der Überstand nach Zentrifugation (30 s bei RCF 50) abgenommen und zusammen mit dem ersten Überstand auf Eis gestellt.

Die Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasbodenschälchen in einer Dichte von 100 Zellen/mm<sup>2</sup> in 200 µl Neuronenmedium (NMM) ausgesät. Nach einer Stunde wurde das Medium abgesaugt und die Zellschale mit 1,5 ml NMM gefüllt. Die Kultivierung der Co-Kultur erfolge in einem Begasungsbrutschrank mit feuchtigkeits-gesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem Kohlendioxidanteil von 10%. Der Wechsel des halben Mediums erfolgte erstmalig nach 5 Tagen in Kultur und im Folgenden alle zwei Tage. Die hippokampale Co-Kultur wurde zwischen dem 16. und 22. Kulturtag für die Experimente verwendet.

#### 2.2.1.2 Primäre Gliazellen: Astrozyten und Oligodendrozyten

Reine Oligodendrozyten- bzw. Astrozytenkulturen wurden zunächst als gemischte Gliazellkultur von neugeborenen (ein bis 3 Tage alt) Wistar-Ratten oder Mäusen (C57Bl6 oder ABCD1-knockout) entsprechend veröffentlichter Präparationsmethoden hergestellt (Hamprecht and Loffler, 1985, Wang et al., 2006) und kultiviert in DMEM (10% hitze-inaktiviertes FCS, 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>.

Nach sieben Tagen in Kultur wurden die Oligodendrozyten von der Astrozytenschicht separiert (McCarthy and de Vellis, 1980). Nach dem Schütteln der gemischten Gliakultur (16 h in einem orbital Schüttler; Innova 4230) wurde der Überstand mit den abgelösten Oligodendrozyten durch ein Zellnetz (40  $\mu\text{m}$ ) gefiltert. Anschließend wurden die Oligodendrozyten für 24 h in einer Zellflasche (25  $\text{mm}^2$ ) kultiviert, bevor sie durch ein erneutes Schütteln per Hand von noch verbleibenden Astrozyten getrennt wurden. Oligodendrozyten ( $4 \cdot 10^4$  Zellen) wurden dann auf PLL-beschichtete Deckgläschen (22  $\text{mm}^2$ ) oder 48-Wellplatte ausgesät. Die nach dem 16-stündigen Schütteln verbleibende Astrozytenschicht wurde mit Trypsin/EDTA abgelöst und in einer Dichte von  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Well (48-Wellplatte) oder  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro Zellschale (21  $\text{cm}^2$ ) ausgesät. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 2 Tage und mindestens 24 h vor den Experimenten.

### 2.2.1.3 Primäre kortikale Neurone

Reine Neuronenzellkulturen wurden von Wistar-Ratten (P0) präpariert. Nach der Entnahme des Gehirns wurde mit eiskalter Puck's Lösung gespült und das Klein- und Stammhirn entfernt. Zwischen Hippokampus und Thalamus wurde ein Skalpell in den 3. Ventrikel eingeführt und das Stammhirn entfernt. Es folgte die Entfernung des Hippokampus und der Anteile die nicht zum Neokortex gehören. Der so präparierte Kortex wurde umgedreht und mit einer spitzen Pinzette die Pia mater mit den Blutgefäßen entfernt. Danach wurde der Kortex in eiskalte Puck's Lösung überführt, zerkleinert und in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben. Nach einer Inkubation von 1 min auf Eis wurde der Puffer abgesaugt und 2,5 ml Papain-Lösung zugegeben (2,4 ml Puck's Lösung + 100  $\mu\text{l}$  Papain). Bei mehrmaligem, vorsichtigem Schütteln wurde die Lösung mit den Gewebestücken für 7 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Papain-Lösung vollständig abgesaugt und das Gewebepellet mit Puck's Lösung gewaschen. Dann wurden die Einzelzellen aus dem Gewebverband durch mehrmaliges Trituieren mit einer 1-ml-Pipette herausgelöst. Die Zellsuspension wurde durch ein 100  $\mu\text{m}$  Nylon-Netz gegeben und anschließend zentrifugiert (5 min bei 200 g). Die Zellen wurden in Zellschalen mit 6 cm Durchmesser mit einer Dichte von 100 Zellen/ $\text{mm}^2$  in Neurobasalmedium ausgesät. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt.

### 2.2.1.4 Gewinnung von Zellpellets

Für die Isolation von RNA und die Extraktion von Proteinen aus Zellen wurden Zellpellets verwendet. Dafür wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 5 min in Trypsin/EDTA inkubiert.

Die Reaktion wurde unter Verwendung von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen gespült und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 500x g wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 500x g) und Verwerfen des Überstandes bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.2.2 Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie

Die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie erlaubt es, im Gegensatz zu den statischen Momentaufnahmen fixierter Präparate dynamische Prozesse in intakten Zellen zeitabhängig zu betrachten. So können zellphysiologische Merkmale wie z.B. Plasmamembranpotential, intrazelluläre Konzentration von Ionen, mitochondriales Membranpotential und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fluoreszenzmikroskopisch in lebenden Zellen analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die intrazelluläre Kalziumkonzentration, die Änderung des mitochondrialen Potentials und die Bildung von ROS fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

#### 2.2.2.1 Aufbau des Messplatzes

Die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioscope microscope), verbunden mit einem Imaging-System von TILL Photonics. Ein kontinuierliches Perfusionssystem sorgte alle 30 Sekunden für einen kompletten Austausch des Mediums (37°C) über den Zellen (Fluss: 0,8 ml/min). Im Gegensatz zum Experimentierpuffer HBSS (Hank's balanced salt solution), wurden alle anderen Lösungen über eine Microinfusions-Pumpe zugeleitet. Alle zuleitenden Schläuche wurden auf 37°C erwärmt. Während der Experimente wurde über den Zellen eine Temperatur von 36°C aufrechterhalten. Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit Hilfe des Programms TILLvisION und anschließend mit Microsoft Excel und SigmaPlot.

#### 2.2.2.2 Lösung und Applikation der VLCFA

Zuerst wurde  $\alpha$ -Cyclodextrin in einer Konzentration von 50 mg/ml in destilliertem Wasser gelöst. Die zu untersuchende VLCFA wurde in der Konzentration von 25 mM in einem Gemisch aus Methanol und Chloroform (C22:0 1:5, C24:0 1:3, C26:0 1:3) gelöst. Anschließend wurde die VLCFA-Lösung in die  $\alpha$ -Cyclodextrin-Lösung gegeben und für 10 Minuten bei hoher Intensität im Bioruptor mit Ultraschall behandelt. Die entstehende Stocklösung hatte eine Konzentration von 2 mM VLCFA. Die Herstellung der Stocklösung erfolgte jeweils frisch am Experimentiertag.

### 2.2.2.3 Messung des intrazellulären Kalziumlevels

Die Konzentration freier Kalziumionen wurde intrazellulär mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 AM ermittelt, wie zuvor beschrieben (Hein et al., 2008, Kahlert and Reiser, 2000). Das Exzitationsspektrum dieses Kalziumchelators ist von der Bindung freier Kalziumionen abhängig. Das Maximum des Exzitationsspektrums der kalziumgebundenen Form liegt bei  $\lambda_1 = 340$  nm, der kalziumfreien Form bei  $\lambda_2 = 380$  nm. Die Anregung von Fura-2 AM bei einer Wellenlänge von 360 nm ist kalziumunabhängig (Isosbestischer Punkt). Die maximale Emission wurde bei  $\lambda_E = 510$  nm detektiert.

Die Beladung der Zellen mit Fura-2 AM (2  $\mu$ M, 0,02% Pluronic) erfolgte für 30 min in HBSS bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Nach einer Nachinkubationszeit in HBSS von 10 min wurde mit der Kalziummessung begonnen. Die Intensität der Emission von 520 nm wurde nach Anregung mit 340 und 380 nm aufgenommen. Für die Analyse von  $[Ca^{2+}]_i$  wurde der Quotient R ( $F_{340nm}/F_{380nm}$ ) berechnet und mit dem Faktor 1000 multipliziert. Für die Auswertung wurde der intrazelluläre Bereich der Zellen markiert (*region of interest*; ROI).

### 2.2.2.4 Messung des mitochondrialen Potentials

Das mitochondriale Potential in lebenden Zellen wurde mit dem kationischen Farbstoff Rhodamin 123 (Rh123) detektiert (Kahlert et al., 2008). Rh123 ist membrangängig und akkumuliert in der mitochondrialen Matrix polarisierter Mitochondrien. Die akkumulierte Farbstoffmenge ist proportional zum mitochondrialen Potential. Die Beladung der Zellen für 30 min mit 10  $\mu$ M Rh123 erfolgte unter leichtem Schütteln in HBSS bei Raumtemperatur. Die Emission von 590 nm wurde nach Anregung bei einer Wellenlänge von 520 nm detektiert. Das mitochondriale Potential wurde über dem mitochondrienfreien Nukleus als Erhöhung der Rh123 Fluoreszenz errechnet, welche durch die kombinierte Gabe von Entkoppler Carbonyl-Cyanid-4-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone (FCCP, 4  $\mu$ M) und  $F_1F_0$ -ATPase-Inhibitor Oligomycin (Oli, 10  $\mu$ M) hervorgerufen wurde. Die durch FCCP/Oli hervorgerufene Depolarisation unter Kontrollbedingung wurde als 100% gesetzt. Führt eine zu testende Substanz zur Depolarisation des mitochondrialen Potentials, so war am Ende des Experiments der Fluoreszenzanstieg durch FCCP/Oli entsprechend geringer.



### 2.2.2.5 Messung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Bildung von ROS wurde mit Hilfe des nicht fluoreszierenden Farbstoffs Dihydroethidium (DHE) gemessen. DHE wird durch Superoxid ( $O_2^{\cdot -}$ ) zu Ethidium oxidiert, welches an zelluläre DNA gebunden zur Fluoreszenz angeregt werden kann (Excitation: 520 nm; Emission: 610 nm). Für die Messung von ROS war keine Vorbeladung notwendig. DHE wurde in einer Konzentration von 1  $\mu$ M zusammen mit der zu testenden Substanz in HBSS direkt über die Mikroinfusionspumpe zu den Zellen gegeben. Fluoreszenzintensitäten wurden über dem Nukleus detektiert.

### 2.2.3 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Ein immunzytochemischer Nachweis von spezifischen Proteinen wurde durchgeführt, um die Zelltypen nach erfolgter Lebendzellfluoreszenzmikroskopie zu identifizieren und um die Expression und Lokalisation bestimmter Proteine nachzuweisen. Die Färbung von mindestens zwei Proteinen wurde parallel durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PFA für 25 min bei Raumtemperatur fixiert. Zu Beginn der immunzytochemischen Färbung wurden die fixierten Zellen mit 120 mM Natriumphosphat (10 min), dann mit Niedrigsalz-Puffer (10 min) und anschließend zweimal mit Hochsalz-Puffer (je 10 min) gewaschen. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit FSBB für 20 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern verdünnt in TBST inkubiert. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: mouse anti CNPase 1:200; chicken anti GFAP 1:200; rabbit anti Synaptotagmin 1:300, goat anti MBP 1:500, rabbit anti GFAP 1:1000, mouse anti Synaptotagmin 1:200. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Hochsalz-Puffer gewaschen. Es folgte eine 1,5-stündige Inkubation mit sekundären Antikörpern (Alexa IgG-konjugierte Antikörper) verdünnt in FSBB. Im Anschluss wurden die Zellen erst mit Hochsalz-Puffer, dann mit 120 mM Natriumphosphat und mit 5 mM Natriumphosphat je 10 min gewaschen. Die Zellkerne wurden unter Verwendung des Farbstoffes Hoechst 33342 (1:1000) in 5 mM Natriumphosphat angefärbt. Zweimaliges Waschen mit 5 mM Natriumphosphat schloss die Färbung ab. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopen untersucht. Die Identifizierung der Zelltypen: Oligodendrozyt, Astrozyt und Neurone erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axioscope (Zeiss), verbunden mit einem Imaging-System von TILL Photonics. Auf Grund einer Markierung konnte somit den bei der kinetischen Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie beobachteten Zellen je ein Zelltyp zugeordnet werden. Alle anderen Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgten an einem Zeiss LSM 510 META konfokalem Laserscanmikroskop.

### **2.2.4 Zelltod-Assay**

Zellen wurden in PLL-beschichtete 48-Well-Platten in einer Dichte von  $2 \cdot 10^4$  / Well (Astrozyten) oder  $4 \cdot 10^4$  / Well (Oligodendrozyten) ausgesät. Nach 3 Tagen in Kultur im DMEM mit FCS (10%) wurde auf das Medium NMM ohne FCS gewechselt und die Substanzen appliziert. Der Überstand wurde nach Inkubationszeit abgenommen und die Lactat-Dehydrogenase (LDH) Aktivität bei 492 nm im Wellplatreader (Genion Plus) gemessen (Cytotoxicity Detection Kit; Roch). Für die Quantifizierung der gesamten LDH-Aktivität wurde die LDH-Aktivität des Überstandes mit der des Zelllysates der verbleibenden Zellen summiert und ergaben somit 100 Prozent.

### **2.2.5 Isolierte Mitochondrien**

#### **2.2.5.1 Präparation**

Die Isolation von Mitochondrien aus Zellen der Rattenleber und des Rattengehirns erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Prof. Peter Schönfeld und Heidelore Goldammer (Zentrum für zelluläre Bildgebung und innovative Krankheitsmodelle ZEBIK, Magdeburg).

Mitochondrien aus dem Gehirn und der Leber von Ratten wurden wie zuvor beschrieben (Schönfeld and Struy, 1999, Liu et al., 2002) präpariert. Für die Präparation wurden adulte Wistar-Ratten (150 – 180 g Körpergewicht) verwendet. Nach der Dekapitierung der Ratte wurde das entsprechende Organ entnommen und in eiskaltes Isolierungs-Medium gegeben. Anschließend erfolgte die Waschung und Homogenisierung des Organs im Isolierungs-Medium, versetzt mit Protease 1 mg/ml. Es folgte eine Zentrifugation von 3 min bei 2000 g. Der Überstand wurde durch eine Mullbinde gefiltert. Danach wurde erneut zentrifugiert (8 min 11000 g). Das entstandene Pellet wurde in 2 ml Isolierungs-Medium, versetzt mit Digitonin (0,6 mg/ml), aufgenommen und für 10 min darin inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (8 min, 11000 g) wurde das Pellet in 225 mM Saccharose-Lösung aufgenommen und die Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode bestimmt. Die Experimente wurden in 1 ml Experimentiermedium mit 0,5 – 1 mg Protein durchgeführt.

### 2.2.5.2 Fluorimetrische Messungen

Die fluorimetrischen Messungen wurde an einem Perkin-Elmer Luminescence Spectrometer LS 50B durchgeführt. Die Messung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch isolierte Mitochondrien erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Calcium Green-5N (CaG5N). Mitochondrien (1 mg Protein) wurden in 1 ml Experimentier-Medium, versetzt mit Malat (5 mM), Glutamat (5 mM) und CaG5N (0,05  $\mu\text{M}$ ), suspendiert. Änderungen der extra-mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden detektiert durch kontinuierliche Aufnahme der CaG5N-Fluoreszenz bei 506 nm Exzitation und 532 nm Emission bei Raumtemperatur.

Die Bildung von ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) durch isolierte Mitochondrien wurde wie folgt gemessen: 0,2 mg Protein (Mitochondrien) wurden zu 1 ml Experimentier-Medium, versetzt mit Amplex Red (5  $\mu\text{M}$ ), Succinate (10 mM), Peroxidase (2 U/ML) und Cu,Zn-Superoxiddismutase (2 U/ml), gegeben. Gebildetes ROS verursacht die Oxidation von Amplex Red (nicht fluoreszierend) zum fluoreszierenden Resorufin, welches durch Anregung bei 560 nm eine Emission mit einer Wellenlänge von 590 nm abgibt. Das Fluoreszenzsignal von Resorufin wurde durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (insgesamt 90 pmol) kalibriert.

## 2.2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.6.1 RNA-Isolation aus Zellen/Gewebe

RNA-Isolation aus Zellpellets oder Gewebe erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini/Midi Kit (Qiagen). Homogenisierung und Zelllyse der Zellpellets erfolgten in 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer. Das Gewebe ( $-80^\circ\text{C}$ ) wurde mit einem Rotor-Stator-Homogenisator in 4 ml RLT-Puffer homogenisiert. Zur homogenisierten Suspension wurde 700  $\mu\text{l}$  / 4 ml 70% Ethanol gegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurde das gesamte Volumen auf die Mini / Midi-Säule gegeben und für 1 / 5 min bei 10000 / 5000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit 350  $\mu\text{l}$  / 3,8 ml RW1-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Ein DNA-Verdau mit DNase (2,73 Units/ $\mu\text{l}$ ) in RDD-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur wurde durchgeführt, um Verunreinigungen der RNA-Präparation durch genomische DNA zu verhindern. Es folgte ein zweiter Waschschrift mit RW1-Puffer und anschließendem Zentrifugieren. Die RNeasy Säule wurde dann in ein neues Sammelgefäß (2 ml / 15 ml) gegeben. Danach wurde RPE-Puffer (500  $\mu\text{l}$  / 2,5 ml) auf die Säule gebracht und für 1 / 5 min bei 10000 / 5000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, um die Membran der Säule vollständig zu trocknen.

Die RNeasy Säule wurde erneut in ein frisches Sammelgefäß (1,5 ml / 15 ml) überführt. 30 µl / 150 µl RNase-freies Wasser wurde direkt auf die Membran der Säule pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Ganze für 2 / 5 min bei 12000 / 5000 rpm zentrifugiert und die RNA bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.6.2 Isolation von genomischer DNA aus Zellen oder Gewebe

Die Isolation von genomischer DNA aus Zellen oder Gewebe des Maushirns erfolgte nach Herstellerprotokoll unter der Verwendung des MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit.

### 2.2.6.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantität und Qualität von isolierter DNA und RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines Spectrometers (Ultrospec 2000) ermittelt. Eine 1:10 Verdünnung der Probe wurde in eine Quarzküvette gegeben und die Absorption bei 260 nm (Absorption von Nukleinsäuren), 280 nm (Absorption von Proteinen) und 320 nm (Salzanteil) gemessen. Die Konzentration der Probe wurde in ng/ml ermittelt, indem der Messwert der Absorption bei 260 nm mit dem Faktor 20 multipliziert wurde. Dabei gab der Absorptionsquotient von 260 nm / 280 nm die Qualität der Nukleinsäurepräparation an (Quotient > 1,7).

### 2.2.6.4 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und semiquantitative Auswertung

Für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zunächst mittels des Enzyms reverse Transkriptase cDNA aus der isolierten RNA synthetisiert. Die Reaktion erfolgte mit 1 µg Gesamt-RNA und Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen) wie folgt:

RNA	1 µg
RT-Puffer (10x)	2 µl
dNTP Mix (je 5 mM)	2 µl
Oligo-dT Primer (0,5 µg/µl)	2 µl
Omniscript Reverse Transcriptase (4 U/µl)	1 µl
<u>RNase-freies Wasser</u>	<u>variabel</u>
Gesamtvolumen	20 µl

Die Reaktion wurde in einem T3 Thermocycler durchgeführt und erfolgte für 1 h bei 37°C gefolgt von 5 min bei 95°C und anschließender Herunterkühlung auf 4°C. Die cDNA wurde frisch hergestellt und am selben Tag für PCR verwendet.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) diente der spezifischen Amplifizierung von cDNA-Sequenzen, welche zuvor aus isolierter Gesamt-RNA hergestellt wurde. Für die Durchführung der PCR wurde HotStarTaq Plus Master Mix von Quiagen verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde wie folgt pipettiert:

cDNA	2 µl
HotStarTaq Plus Master Mix (2x)	10 µl
5' Primer (10 pmol/µl)	2 µl
3' Primer (10 pmol/µl)	2 µl
<u>RNase-freies Wasser</u>	<u>4 µl</u>
Gesamtvolumen	20 µl

Das folgende Programm wurde im T3 Thermocycler durchgeführt:

Deckeltemperatur	100°C		
Vorheizen	On		
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	} 30/35 Zyklen
Denaturierung	94°C	1 min	
Primerhybridisierung	variabel	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Pause	4°C		

Für eine semiquantitative RT-PCR wurde die Zyklusanzahl jeweils so gewählt, dass sich diese in der Mitte des exponentiellen Bereichs der Amplifizierung befand. Die semiquantitative Auswertung der Expression erfolgte anschließend an Hand der DNA-Banden auf einem 1,5%igen Agarosegel mit Hilfe des Programms Quantity One (Bio-Rad). Es wurde die Differenz von Intensität der Bande und Hintergrundintensität berechnet, um die Werte zu normieren.

### 2.2.6.5 Real-time PCR

Für die Analyse der Expression bestimmter Gene in verschiedenen primären Zellen wurde eine real-time PCR mit Hilfe des iCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Zunächst wurde die isolierte Gesamt-RNA (0,5 µg) unter Verwendung von iScript Kit in cDNA umgeschrieben.

Die Reaktion hierfür wurde wie folgt angesetzt:

RNA	0,5 µg
iScript-Mix (5x)	2 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl
<u>RNase-freies Wasser</u>	<u>variabel</u>
Gesamtvolumen	20 µl

Das Reaktionsgemisch wurde im T3 Thermocycler für 5 min bei 25°C erwärmt, dann für 30 min auf 42°C erhitzt, gefolgt von 5 min Inkubation bei 85°C und anschließendem Herunterkühlen auf 4°C. Die entstandene cDNA wurde am gleichen Tag für die real-time PCR verwendet.

Die real-time PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit der zuvor produzierten cDNA wie folgt angesetzt:

SYBR Green Supermix	8,5 µl
Primer-Mix (fw + rv 1:1)	2 µl
cDNA	1 µl
RNase-freies Wasser	13,5 µl

Durchgeführt wurde die Reaktion im iCycler (Bio-Rad) mit folgendem Gradientenprogramm:

Initiale Denaturierung	95°C	3 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec	
Primerhybridisierung	Gradient	90 sec	
Elongation	72°C	1 min	
	95°C	1 min	
	56°C	1 min	
Pause	4°C		

Die Spezifität der Amplifizierung wurde mit Hilfe der Schmelzkurve und Agarosegel überprüft. Die relative Quantifizierung der Expression wurde anschließend an Hand des Schwellenwert-Zyklus (CT) durchgeführt. Die Berechnung erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode:

$$\begin{aligned}\Delta\text{CT}_{\text{normiert}} &= \text{CT}_{\text{Gen}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}} \\ \Delta\Delta\text{CT} &= \Delta\text{CT}_{\text{normiert\_Stimulation}} - \Delta\text{CT}_{\text{normiert\_Kontrolle}} \\ \text{n-fache Expression} &= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}\end{aligned}$$

### 2.2.6.6 Agarosegelelektrophorese zur Analyse von DNA

Zur Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt unter Verwendung von 1 – 2 % Agarosegel (hergestellt mit TAE-Puffer). Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt, um die Nukleotide sichtbar zu machen. Vor der Beladung mit den Nukleotidproben wurden diese in 6x Ladepuffer (versetzt mit Bromophenolblau) aufgenommen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in 1x TAE für 30 min bei 80 V.

In Abhängigkeit von der Fragmentengröße wurde der GeneRuler 100 bp DNA Ladder (1 kb) oder der GeneRuler DNA Ladder Mix (10 kb) als Standard verwendet. Die Nukleotidbanden wurden unter dem UV-Transilluminator in einem Eagle Eye II video System (Stratagene) sichtbar gemacht.

## 2.2.7 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.7.1 Gesamtproteinextraktion

Für die Gesamtextraktion der Proteine aus kultivierten Zellen wurden diese zunächst in eiskaltem PBS gewaschen und in RIPA-Puffer für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate für 30 min bei 4°C gemischt (Rotator). Das Gemisch wurde dann 15 min bei 4°C zentrifugiert (14.0000 x g). Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels der Bradford-Methode unter Verwendung von Serumalbumin (0,3 bis 5 mg/ml) als Standard bestimmt. Bis zur Verwendung wurde die Gesamtproteinextraktion bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde in Multitestplatten (96-Well) durchgeführt. Die optische Dichte  $OD_{620\text{ nm}}$  der Probe wurde im Triplettsatz mit einem ELISA-Reader (Emax precision microplate reader) bestimmt und gegen eine BSA-Eichreihe ausgerechnet. Die Proteinproben wurden in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:200 mit 1:5 Bradford-Reagenz versetzt. Nach 10minütiger Inkubation wurde die Messung der optischen Dichte vorgenommen.

### 2.2.7.3 Proteinbestimmung nach Biuret

Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Mitochondriensuspensionen wurde die Biuret-Methode angewandt. Zunächst wurden 100  $\mu\text{l}$  Proteinlösung mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 2 ml aufgefüllt und anschließend durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Trichloressigsäure (3 M) 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach der anschließenden Zentrifugation (10 min bei 1000 x g) wurde das Proteinpellet in 2 ml Biuret Reagenz gelöst und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Lösung wurde nach Zugabe von 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bei 546 nm gemessen. Anschließend wurde nach Zugabe von KCN die unspezifische Trübung der Lösung durch erneute Messung der Extinktion bestimmt. Der Proteingehalt der Probe wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{mg Protein} = [(E_{546} - E_{\text{KCN}}) - E_{\text{Blindwert Biuretregenz}}] \times 7$$

### 2.2.7.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot

Für die Versuche wurde 10%ige Polyacrylamidgele benutzt. 20  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt wurde in 1 x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt. Bei zu geringer Proteinkonzentration wurden die Proteine (20  $\mu\text{g}$ ) zuvor gefällt. Dafür wurde das 4-fache Volumen an Methanol/Aceton 1:1 zu den Proben gegeben (15 min, 37°C) und die gefällten Proteine abzentrifugiert (14.000 x g, 15 min). Das anschließend getrocknete Proteinpellet wurde in 1 x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und im Laufpuffer für 60 min bei 200 V aufgetrennt (Vertical-Minigel Apparatur, Bio-Rad). Die aufgetrennten Proteine wurden im Transferpuffer vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA79, 0,2  $\mu\text{m}$ ) unter Verwendung eines semi-trocknen Transfersystems (Bio-Rad) bei 200 mA und konstanter Spannung von 10 V für 60 min übertragen. Die Transfereffizienz wurde durch Anfärbung der Proteine mit 0,2% Ponceau S überprüft. Nach dem Auswaschen der Färbelösung wurden unspezifische Bindungen blockiert, indem die Membran mit Roti-Block in TBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde.



Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in TBST verdünnt inkubiert (Primäre Antikörper: mouse anti CNP 1:10 000, goat anti MBP 1:2000, mouse anti GFAP 1:10 000, mouse anti HNE 1:1000 oder mouse anti  $\beta$ -Tubulin 1:20 000) Anschließend wurde die Membran 3-mal für 10 min mit TBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugierter anti mouse IgG 1:20 000 oder anti goat IgG 1:10 000) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dann erneut gewaschen und mit ECL-Reagenz (Supersignal West Pico Kit) für 5 min inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde durch Exposition mit einem Chemilumineszenz-Film (Hyperfilm ECL) detektiert und anschließend entwickelt.

### 2.2.7.5 Stripping-Prozedur von Western-Blot-Membranen

Folgende Behandlung wurde durchgeführt, um die Membran für eine erneute Inkubation mit einem primären Antikörper zu verwenden: Das ECL-Reagenz wurde mit Hilfe von TBST ausgewaschen und die Membran anschließend im Stripping-Puffer für 30 min bei 55°C inkubiert. Danach wurde die Membran erst intensiv in H<sub>2</sub>O und TBST gewaschen, um Reste von  $\beta$ -Mercaptoethanol zu entfernen und dann erneut mit der Blockierung von unspezifischen Bindungen, wie zuvor beschrieben, begonnen.

### 2.2.7.6 ELISA-Assay

Extrazelluläre Freisetzung der Proteine IL-6 und GRO/CINC-1 wurde nach Herstellerprotokoll unter der Verwendung von IL-6 und GRO/CINC-1 ELISA Kits analysiert. Dafür wurden primäre Astrozyten unter serumfreien Bedingungen in HBSS mit Fettsäuren für 24 h inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die ELISA-Analyse verwendet. Die Menge an IL-6 und GRP/CINC-1 wurde nach Messung der Absorption bei 450 nm (OD<sub>450</sub>) errechnet. Grundlage bildete die Analyse von IL-6 und GRO/CINC-1 Standard.

## 2.2.8 Datenanalyse

Die Berechnung und Bearbeitung der Daten wurden mit den Programmen Microsoft Excel und SigmaPlot durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Unterschiede zwischen Stichproben wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% betrug (\*,  $P > 0,005$ ; ns = nicht signifikant). Zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für parametrische Daten der one-way ANOVA test mit Tukey Posttest und für nicht parametrische Daten der Kruskal-Wallis Test verwendet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Einfluss von VLCFA auf zellphysiologische Parameter neuronaler Zellen

##### 3.1.1 $\alpha$ -Cyclodextrin als Lösungsvermittler für VLCFA

Sehr langkettige gesättigte Fettsäuren sind im Gegensatz zu kurzen Fettsäuren in wässriger Umgebung schwer löslich und erfordern daher die Anwendung von Lösungsvermittlern. Da für die Arbeit an lebenden Zellen nur physiologische Puffer zur Anwendung kommen sollten, stellte das Experimentieren mit VLCFA eine große Herausforderung dar. Es musste ein Lösungsvermittler gefunden werden, der die VLCFA den Zellen zugänglich macht, aber selbst keine Wirkung auf die untersuchten Parameter der Zellen ausübt. Zwei Lösungsvermittler finden bei vergleichbaren Experimenten anderer Arbeitsgruppen häufig Verwendung. Zum einen Albumin, wobei die maximale Bindungskapazität mit der Fettsäurelänge abnimmt und für Fettsäuren um 26 Kohlenstoffatome sehr niedrig ist (Choi et al., 2002), und zum anderen Cyclodextrine (Hall et al., 2005, Lazo et al., 1988, Pahan et al., 1998, McGuinness et al., 2003, Singh and Poulos, 1986, Pillai et al., 2009). Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, bestehend aus 6, 7 oder 8 Glucopyranoseeinheiten, allgemein bezeichnet als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Cyclodextrin (Abb. 7). Sie besitzen eine innere lipophile Pore und eine hydrophobe Außenfläche. Die drei Cyclodextrintypen unterscheiden sich in ihrer Ringgröße und Löslichkeit (siehe Übersichtsarbeit (Challa et al., 2005)). Ihre Funktionsweise besteht darin, dass lipophile/hydrophobe Moleküle in die Ringstruktur des Cyclodextrins unter Bildung eines Komplexes inkorporieren und diese somit wasserlöslich gemacht werden. Die treibende Kraft der Komplexbildung ist das Auswechseln der Wassermoleküle gegen die hydrophoben Gastmoleküle.

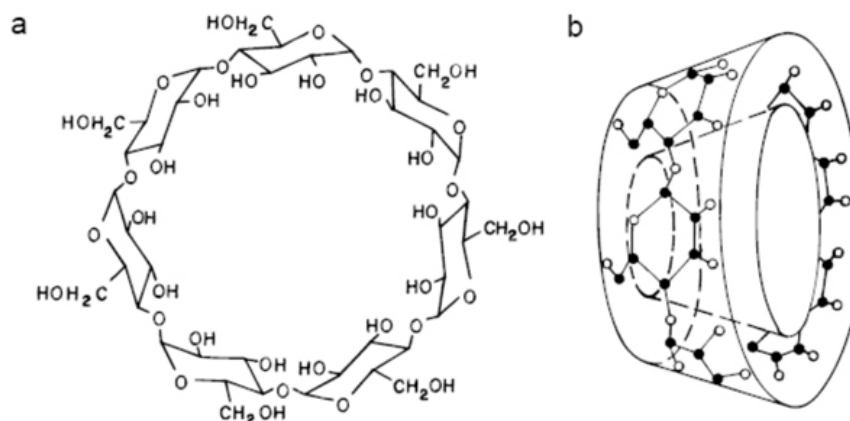


Abbildung 7: Chemische Struktur (a) und toroidale Form (b) des  $\alpha$ -Cyclodextrin Moleküls (siehe Übersichtsarbeit (Challa et al., 2005)).

Bei der Verwendung von Cyclodextrinen als Lösungsvermittler für VLCFA mussten zwei Punkte kritisch hinterfragt werden. Zum einen, ob eine erfolgreiche Lösung der VLCFA vorlag, das heißt, ob VLCFA und  $\alpha$ -Cyclodextrin einen wasserlöslichen Komplex bilden konnten. Zum anderen, ob der gebildete Komplex hinreichend schnell in wässriger Lösung dissoziiert, um die biologische Aktivität der VLCFA zu erlauben.

Zunächst wurden  $\alpha$ -Cyclodextrin,  $\beta$ -Cyclodextrin sowie das Derivat Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin charakterisiert, um ihre Anwendbarkeit für die geplanten Experimente zu überprüfen. Zur Untersuchung ihrer Löslichkeit wurden die Substanzen einzeln unter sukzessiver Erhöhung ihrer Konzentration mit dem physiologischen Puffer HBSS versetzt. Die Löslichkeitsgrenze war erreicht, wenn ein weißer Niederschlag in der Lösung beobachtet wurde.  $\alpha$ -Cyclodextrin konnte bis zu einer Konzentration von 50 mg/ml,  $\beta$ -Cyclodextrin bis zu einer Konzentration von 0,01 mg/ml und Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin bis zu einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst werden. Da geplant war, die Lösungsvermittler in einer Konzentration von 1 mg/ml zu applizieren, waren  $\alpha$ -Cyclodextrin sowie Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin für eine Anwendung als Lösungsvermittler von VLCFA hinreichend löslich.

Um eventuelle überlagernde Effekte der Lösungsvermittler auszuschließen, folgte anschließend eine Testung der Toxizität auf neuronale Zellen mit Hilfe des LDH-Assays. Während Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin bereits in einer Konzentration von 0,5 mg/ml Zelltod auslöste, zeigte  $\alpha$ -Cyclodextrin bis zu einer Konzentration von 3 mg/ml keine zelltoxischen Wirkungen (Daten nicht dargestellt). Daher wurde für alle folgenden Versuche auf  $\alpha$ -Cyclodextrin als Lösungsvermittler für die VLCFA zurückgegriffen.

Um zu überprüfen, in wieweit  $\alpha$ -Cyclodextrin die biochemische Verfügbarkeit bzw. Aktivität der VLCFA beeinflusst, wurde ein Experiment zur Messung der Bindungsfähigkeit der mit  $\alpha$ -Cyclodextrin gelösten VLCFA durchgeführt. Die Fettsäuren wurden mit 1 mg/ml  $\alpha$ -Cyclodextrin in einer Konzentration von 20  $\mu$ M gelöst und mit einem Fettsäurebindenden-Protein (ADIFAB) versetzt. Dieses Protein ändert nach Anregung mit 386 nm seine Emission nach Fettsäurebindung von 432 nm (ungebunden) zu 505 nm (gebunden). Der Quotient 505/432 nm gibt demzufolge ein Maß für die Menge an verfügbarer/freier Fettsäure an. Die Messung der Fluoreszenzintensität wurde mit einem Lumineszenz-Spektrometer im Messpuffer HBSS durchgeführt, welcher unter anderem bei den nachfolgenden Lebendzellfluoreszenz-Messungen benutzt wurde.

Die Abb. 8 zeigt den Verlauf der ADIFAB (0,2  $\mu\text{M}$ ) Fluoreszenz (Quotient) nach Zugabe der Fettsäuren (Pfeil): C16:0, C22:0, C24:0 und C26:0 (jeweils 20  $\mu\text{M}$  gelöst mit 1 mg/ml  $\alpha$ -Cyclodextrin). Unter Kontrollbedingungen ( $\alpha$ -Cyclodextrin, 1 mg/ml) wurde keine Änderung der Fluoreszenz beobachtet. Die kürzeste Fettsäure C16:0 (20  $\mu\text{M}$ ), die eine höhere Löslichkeit als VLCFA in wässriger Umgebung besitzt, erreichte einen maximalen Quotient von 0,83. Folgende Maxima wurden für die überlangkettigen Fettsäuren erreicht: C22:0 0,63; C24:0 0,86; C26:0 0,91.

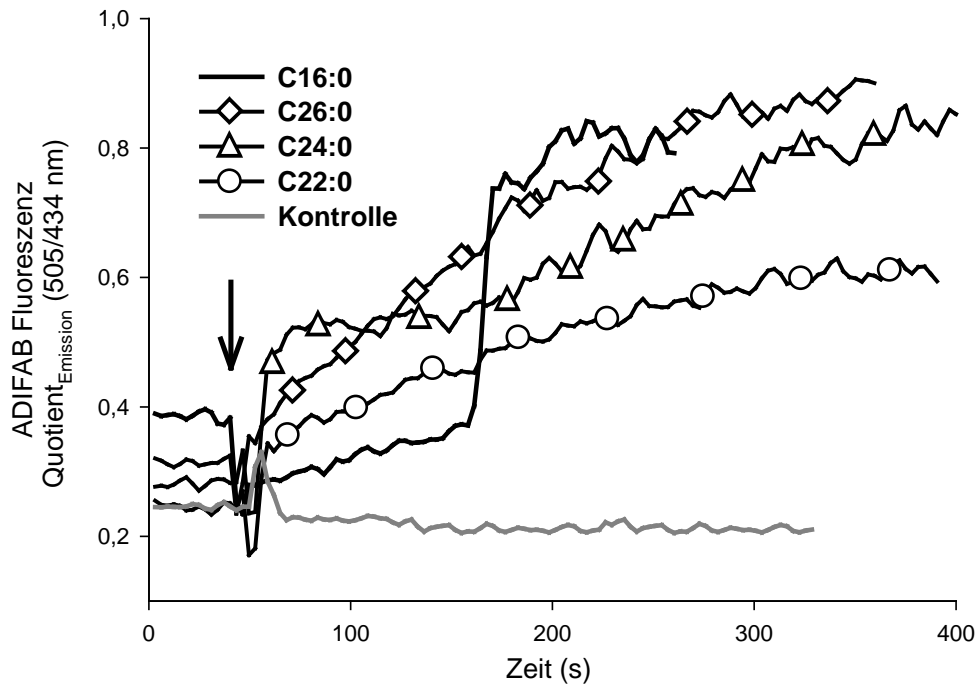


Abbildung 8: Messung der freien Fettsäurekonzentration in wässriger Umgebung.

Es wurde das Vorhandensein freier Fettsäuren (C16:0, C22:0, C24:0 und C26:0) im physiologischen Puffer HBSS gemessen. Der Zeitpunkt der Zugabe der Fettsäuren (20  $\mu\text{M}$ ) gelöst in  $\alpha$ -Cyclodextrin (1 mg/ml, Kontrolle) ist als Pfeil dargestellt. Die Anregung des Fettsäurebindenden Proteins ADIFAB (0,2  $\mu\text{M}$ ) erfolgte bei 386 nm.

Daraus lässt sich schließen, dass die VLCFA- $\alpha$ -Cyclodextrin-Komplexe dissoziieren, was eine darauffolgende Bindung der VLCFA an ADIFAB ermöglicht. Da der  $K_d$ -Wert von ADIFAB für die einzelnen Fettsäuren nicht bekannt ist, lassen sich zwei Rückschlüsse aus den gewonnenen Daten ziehen:

- 1.) die zuvor beschriebene Methode zur Lösung von VLCFA in wässriger Lösung war erfolgreich und
- 2.) in einer Lösung mit dem Lösungsvermittler  $\alpha$ -Cyclodextrin liegen VLCFA zumindest in großen Teilen biochemisch verfügbar vor.

### 3.1.2 Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration

#### 3.1.2.1 Kalziumreaktion primärer Oligodendrozyten auf VLCFA-Applikation

Als Erstes wurde die Änderung des intrazellulären Kalziumniveaus nach VLCFA-Zugabe (C22:0, C24:0, C26:0) in primären Oligodendrozyten untersucht. Die kurzkettigere, gesättigte Fettsäure Palmitinsäure (C16:0) diente als Kontrollsubstanz, da diese eine neutrale, nicht pathogene Fettsäure darstellt (Kahlert et al., 2005a). Die Fettsäuren wurden mit  $\alpha$ -Cyclodextrin (1 mg/ml) in einer Konzentration von 10 - 40  $\mu$ M auf primäre Oligodendrozyten appliziert (Abb. 9 B, schwarzer Balken). Innerhalb des Applikationszeitraums von 7 min konnte eine dramatische, konzentrationsabhängige Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet werden. Die Fettsäuren C24:0 und C26:0 induzierten vergleichbare zelluläre Reaktionen (Kurven nicht dargestellt), während Palmitinsäure keinen Effekt hatte. Der Maximalwert der  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion erhöhte sich mit steigender Fettsäurekonzentration (Abb. 9 A). 40  $\mu$ M VLCFA verursachten eine 6-8fache Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveaus: Selbst 10  $\mu$ M der VLCFA verursachte einen signifikanten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Oligodendrozyten. (Abb. 9 A: maximale intrazelluläre Kalziumkonzentration nach Applikation von 10  $\mu$ M: C22:0  $1,7 \pm 0,3$ ; C24:0  $2,1 \pm 0,5$ ; C26:0  $2,2 \pm 0,5$ ; und 40  $\mu$ M: C22:0  $8,8 \pm 0,9$ ; C24:0  $5,8 \pm 0,6$ ; C26:0  $7,1 \pm 0,7$ ; C16:0  $1,1 \pm 0,2$ ).

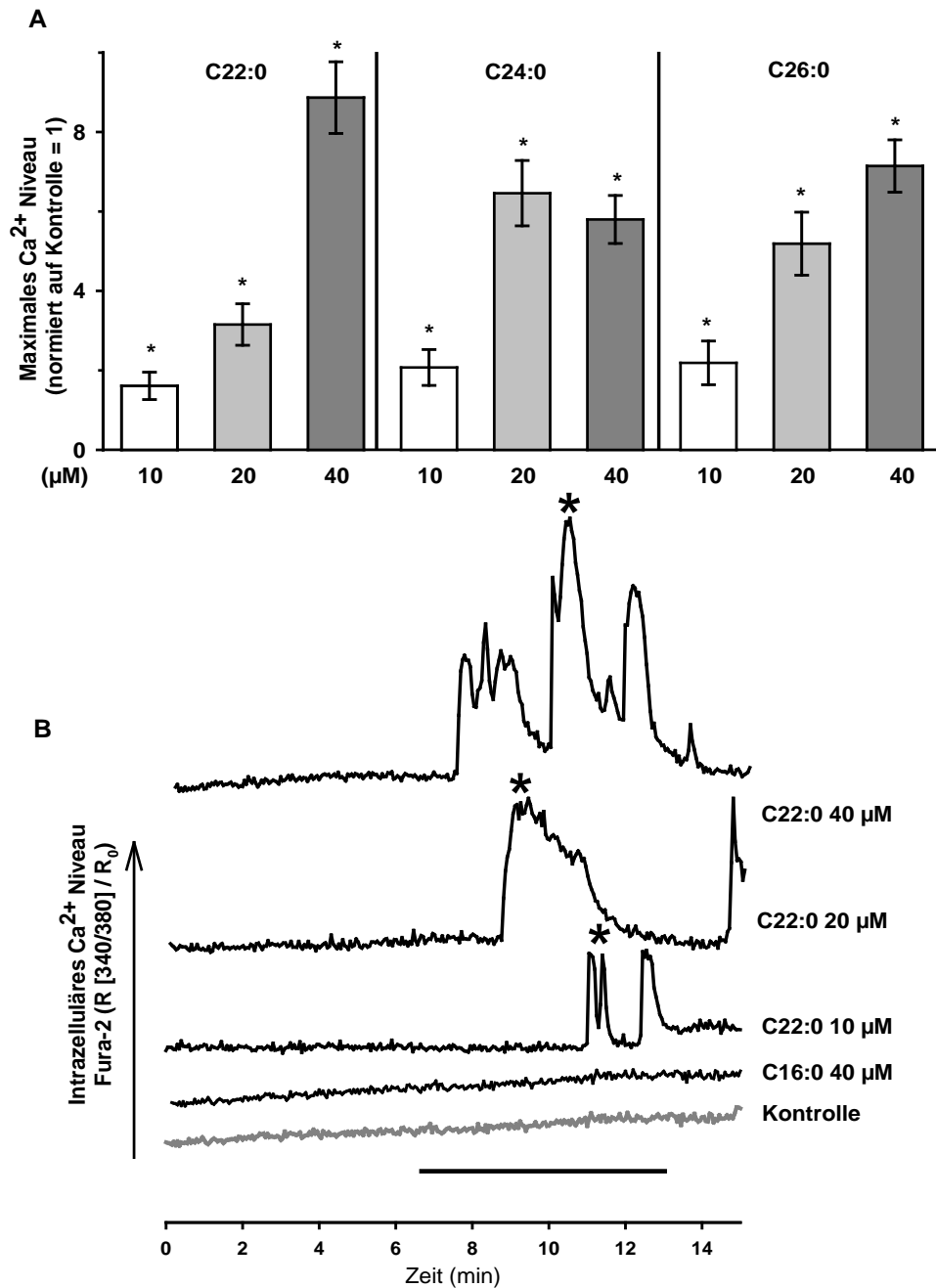


Abbildung 9: VLCFA-induzierte Änderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration in primären Oligodendrozyten.

(A) Quantitative Analyse des Mittelwerts der Ca<sup>2+</sup>-Maxima während der VLCFA-(C22:0, C24:0 und C26:0) und C16:0 Applikation. Die Werte des Fura-2 AM Fluoreszenzquotienten R (340/380 nm) wurden auf den Fluoreszenzquotienten der Kontrolle ( $\alpha$ -Cyclodextrin, 1 mg/ml) normiert. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen mit jeweils mehr als 15 einzelnen Oligodendrozyten  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  VLCFA vs. Kontrolle (B) Repräsentative Beispielkurven des Verlaufs der Ca<sup>2+</sup>-Kinetik nach Zugabe von C22:0 (10 – 40  $\mu$ M) und C16:0. Innerhalb der 7-minütigen Applikation (schwarzer Balken) bewirkte C22:0 einen Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Niveaus mit unregelmäßigen Oszillationen, die nicht synchron unter den einzelnen Zellen verliefen. Es wurde der maximale Wert der intrazellulären Kalziumkonzentration (markiert mit \*) ausgewertet. Als Kontrolle diente  $\alpha$ -Cyclodextrin (1 mg/ml). Der Fura-2 AM Fluoreszenzquotient R (340/380 nm) wurde auf den Anfangswert (R<sub>0</sub>) zum Zeitpunkt 1,5 min normiert.

### 3.1.2.2 Kalziumreaktion primärer Hirnzellen auf VLCFA-Applikation

Um mögliche zelltypspezifische Reaktionen zu ermitteln, wurden die VLCFA nun auf eine hippocampale Co-Kultur appliziert, welche neben Oligodendrozyten auch Astrozyten und Neurone enthält. Die Zelltypen konnten nach jedem Experiment mit Hilfe der immunzytochemischen Färbung identifiziert werden (Abb. 10).

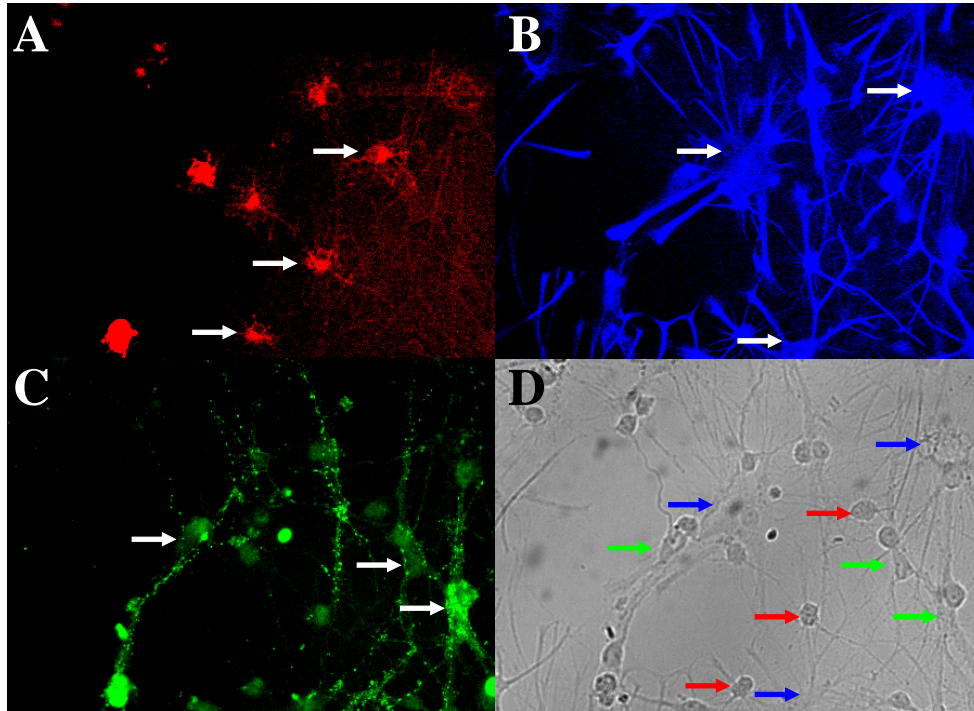


Abbildung 10: Identifizierung von Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen in einer primären hippocampalen Co-Kultur.

Immunzytochemische Färbung der hippocampalen Co-Kultur am 19. Tag in Kultur. Die Zelltypen wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert: (A) Oligodendrozyten (B) Astrozyten (C) Neurone (D) Durchlichtbild der gleichen Kultur. Die Pfeile markieren die unterschiedlichen Zelltypen: Oligodendrozyten rot, Astrozyten blau und Neurone grün.

Hier zeigte sich, dass VLCFA (40  $\mu\text{M}$ ) auch in Astrozyten und Neuronen einen starken Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hervorriefen, während C16:0 keinen Effekt auf die Zellen ausübte (Werte entsprechen denen unter Kontrollbedingung). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte waren um das Drei- bis Vierfache gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 11: Astrozyten: C22:0  $3,1 \pm 0,6$ ; C24:0  $5 \pm 0,5$ ; C26:0  $4,7 \pm 0,7$ ; Neurone: C22:0  $3,4 \pm 0,9$ ; C24:0  $4,4 \pm 1$ ; C26:0  $3,3 \pm 1$ ). In den myelinbildenden Oligodendrozyten war der Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveaus am größten (Abb. 11: C22:0  $10,8 \pm 2$ ; C24:0  $13,3 \pm 1,6$ ; C26:0  $11,5 \pm 1,9$ ). Da die drei Zelltypen parallel in einer Zellkultur analysiert wurden, kann von identischen Bedingungen während der Experimente ausgegangen werden. Es konnte kein Unterschied zwischen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktionen auf die unterschiedlichen Fettsäuren (C22:0, C24:0 und C26:0) festgestellt werden.

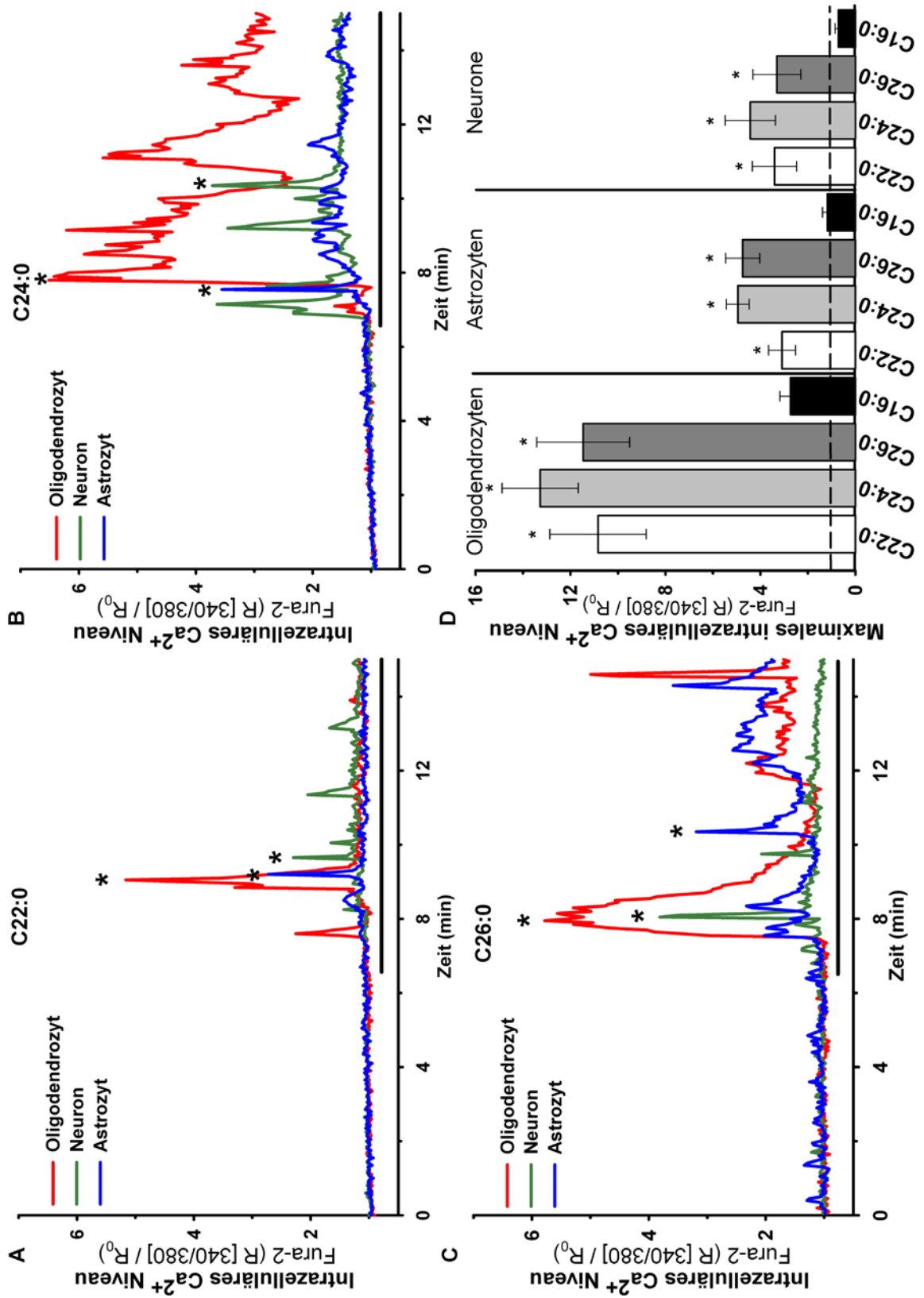


Abbildung 11: VLCFA-induzierte Änderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen einer primären Co-Kultur.



Abb. 11: (A – C) Repräsentative Kinetiken der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen nach VLCFA-Applikation (40  $\mu\text{M}$ ). C22:0, C24:0 und C26:0 bewirkten in allen drei Zelltypen einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wobei auch in Astrozyten und Neuronen unregelmäßige Oszillationen beobachtet wurden. Für die Auswertung wurde der maximal erreichte  $\text{Ca}^{2+}$ -Wert herangezogen (mit \* markiert). Der Zugabezeitraum (von 6,5 bis 13,5 min) ist als schwarzer Balken dargestellt. Der Fura-2 AM Fluoreszenzquotient R (340/380 nm) wurde auf den Anfangswert ( $R_0$ ) zum Zeitpunkt 1,5 min normiert. (D) Quantitative Analyse der Mittelwerte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Maxima während der Fettsäureapplikation (C22:0, C24:0 und C26:0) in den jeweiligen Zelltypen. Als Kontrollfettsäure wurde Palmitinsäure (C16:0, 40  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Der maximale Wert des Fura-2 AM Fluoreszenzquotients R (340/380 nm) wurde auf den Kontrollwert ( $\alpha$ -Cyclodextrin 1 mg/ml) normiert. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen mit jeweils mehr als 15 einzelnen Zellen pro Zelltyp  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  VLCFA vs. Kontrolle

Für die Beurteilung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wurde Glutamat (500  $\mu\text{M}$ ) als Positivkontrolle appliziert. Ähnlich der VLCFA löste Glutamat eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in allen drei Zelltypen der hippocampalen Co-Kultur aus (Abb. 12: Oligodendrozyten 14,2fach, Astrozyten 6,3fach und Neuronen 6,0fach über dem Kontrolllevel).

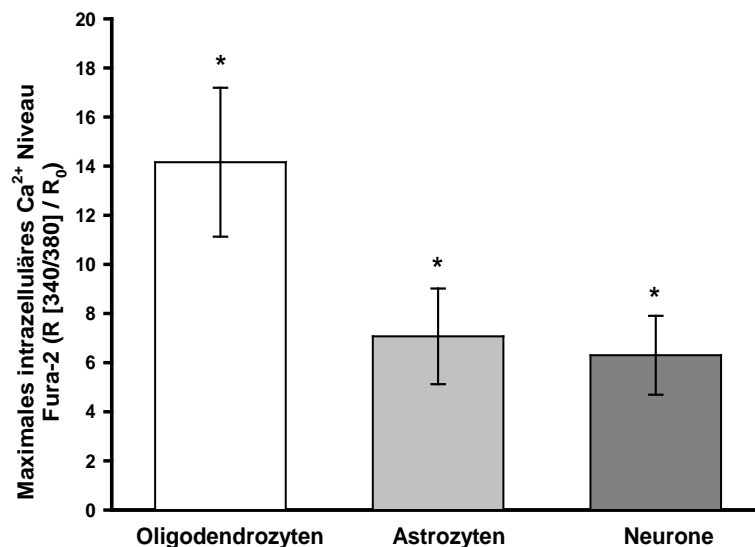


Abbildung 12: Glutamat-induzierte Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen einer primären Co-Kultur.

Quantitative Analyse der Mittelwerte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Maxima während der Glutamat-Applikation (500  $\mu\text{M}$ ) in den jeweiligen Zelltypen. Der maximale Wert des Fura-2 AM Fluoreszenzquotients R (340/380 nm) wurde auf den Kontrollwert (hat in HBBS den Wert 1 und ist hier nicht dargestellt) normiert. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen mit jeweils mehr als 15 einzelnen Zellen pro Zelltyp  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  Glutamat vs. Kontrolle.

## 3.1.2.3 Analyse der Kalzium-Quelle der VLCFA-vermittelten zellulären Antwort

Es war unbekannt, über welchen Mechanismus die VLCFA die starke Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vermittelt und sollte daher im Folgenden analysiert werden. Zunächst wurde die Quelle für den Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration untersucht. Dafür wurden Experimente in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer (HBSS + EGTA) durchgeführt, wodurch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum ausgeschlossen wurde. Abb. 13 zeigt die maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen nach Zugabe von VLCFA (40  $\mu\text{M}$ ) sowohl unter Norm- (HBSS)-, als auch unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen (HBSS + EGTA).

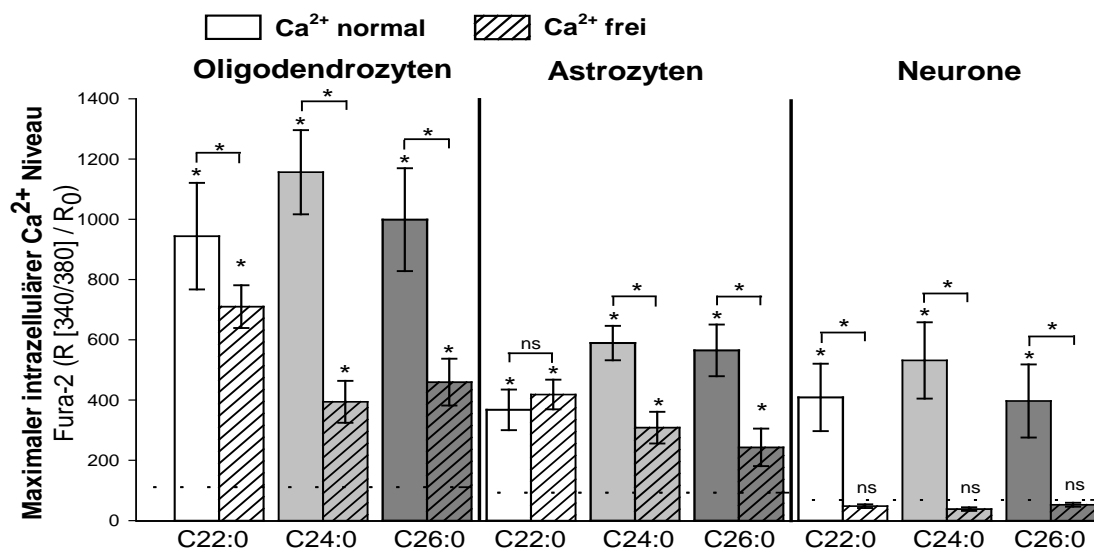


Abbildung 13: VLCFA-induzierte Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen unter Norm- und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen.

Quantitative Analyse des Mittelwerts der  $\text{Ca}^{2+}$ -Maxima während der Fettsäure-Applikation (C22:0, C24:0 und C26:0) im  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien HBSS. Differenz des maximalen Wertes des Fura-2 AM Fluoreszenzquotienten R (340/380 nm) und dem Anfangswert  $R_0$  zum Zeitpunkt 1,5 min. Die gestrichelte Linie gibt  $R/R_0$  unter Kontrollbedingungen ( $\alpha$ -Cyclodextrin 1 mg/ml) im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien HBSS an. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen mit jeweils mehr als 15 einzelnen Zellen pro Zelltyp  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  VLCFA vs. Kontrolle sowie VLCFA  $\text{Ca}^{2+}$  normal vs. VLCFA  $\text{Ca}^{2+}$  frei.

Der durch VLCFA-Applikation verursachte  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg war unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen in allen Zellen auffällig vermindert. Dabei wurde ein deutlicher Unterschied zwischen Gliazellen und Neuronen offenkundig. Während Gliazellen unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen einen reduzierten, aber signifikanten VLCFA-vermittelten Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveaus zeigten, konnte in Neuronen keine Änderung der Kalziumkonzentration festgestellt werden (Abb. 13). Bei Gliazellen spielt demzufolge die Öffnung intrazellulärer Kalziumspeicher eine kritische Rolle.

### 3.1.2.4 Beteiligung von sekundären Botenstoffen am VLCFA-induzierten Kalzium-einstrom aus intrazellulären Speichern

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse, die die Beteiligung von intrazellulären Speichern an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung vermuten lassen, wurde der zugrunde liegende intrazelluläre Signalweg genauer untersucht. Die Beteiligung von intrazellulären sekundären Botenstoffen wurde durch Coapplikation spezifischer Inhibitoren analysiert. Die durch VLCFA (40  $\mu\text{M}$ ) verursachte maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen ist in der Abb. 14 dargestellt. Die Coapplikation von U73122 (5  $\mu\text{M}$ ), einem Inhibitor der Phospholipase C (PLC), führte sowohl in Oligodendrozyten als auch in Astrozyten zu einer nahezu vollständigen Blockierung des durch C22:0 (Abb. 14 A), C24:0 (Abb. 14 B) und C26:0 (Abb. 14 C) hervorgerufenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Der resultierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Wert lag auf Kontrollniveau. Zur Überprüfung der Substanzspezifität des Inhibitors U73122 wurde zusätzlich das inaktive Analogon U73433 (5  $\mu\text{M}$ ) appliziert. U73433 hatte keinen Einfluss auf die VLCFA-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion. Daraufhin folgte eine Coapplikation von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB, 50  $\mu\text{M}$ ), einem Inhibitor des  $\text{InsP}_3$ -Rezeptors, um die PLC nachgeschalteten Effektoren zu untersuchen. Vergleichbar mit U73122 bewirkte auch der Inhibitor 2-APB eine vollständige Blockierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, wobei 2-APB die VLCFA-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion stärker inhibierte.

Es wurden keine Effekte durch die oben genannten Inhibitoren in Neuronen beobachtet. Da der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in Neuronen ausschließlich von einem extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom herrührt, wurde im Folgenden die Expression eines zellmembranständigen Rezeptors für VLCFA untersucht.

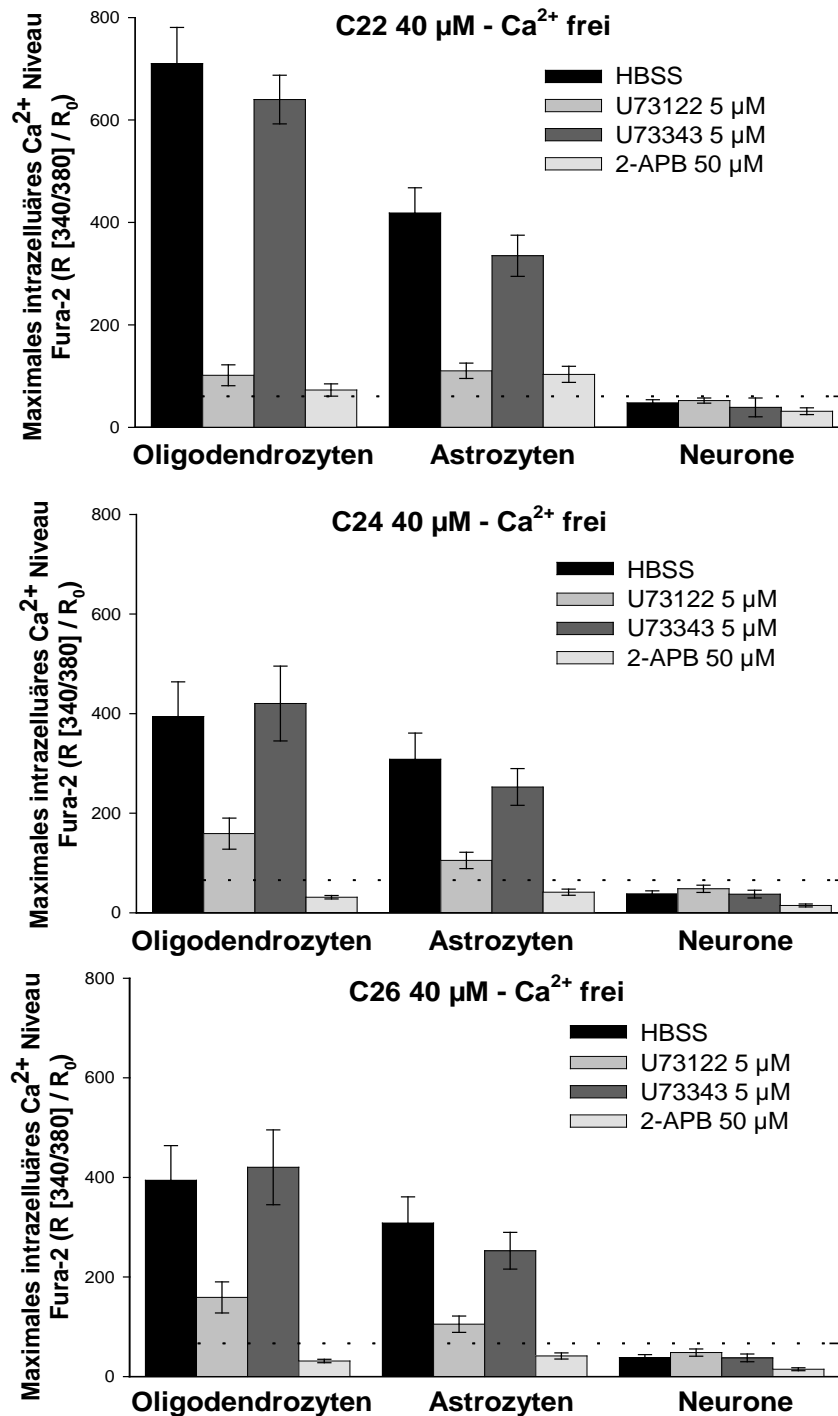


Abbildung 14: Inhibierung intrazellulärer Signalwege des VLCFA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms aus intrazellulären Speichern.

Quantitative Analyse der maximalen Ca<sup>2+</sup>-Reaktion von Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen auf VLCFA unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen. Der Inhibitor der Phospholipase C U73122 (5 μM), das strukturelle inaktive Analogon U73343 (5 μM) und der Inhibitor des InsP<sub>3</sub>-Rezeptors, 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB, 50 μM), wurden 5 min vor und während der gesamten VLCFA-Zugabe appliziert. Dargestellt ist die Differenz des maximalen Wertes vom Fura-2 AM Fluoreszenzquotienten R (340/380 nm) nach VLCFA-Zugabe bzw. unter Kontrollbedingung ( $\alpha$ -Cyclodextrin 1 mg/ml, markiert als gestrichelte Linie) und dem Anfangswert R<sub>0</sub> zum Zeitpunkt 1,5 min. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen mit jeweils mehr als 15 einzelnen Zellen pro Zelltyp  $\pm$  SEM. \* P < 0,05 VLCFA vs. Kontrolle, Ca<sup>2+</sup>-freier Puffer.

### 3.1.2.4. Zelluläre Expression eines zellmembranständigen Rezeptors für VLCFA

Von den bekannten Rezeptoren für FFA ist der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR40 (FFAR1) der wahrscheinlichste Kandidat für einen VLCFA-sensitiven Rezeptor. Denn dieser Orphan-Rezeptor wird hauptsächlich durch mittellange bis lange, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren aktiviert (Briscoe et al., 2003, Stewart et al., 2006). Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression des Rezeptors in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen in einer annähernd reinen Primärkultur aus dem Rattenhirn analysiert.

Die mRNA Expression von GPR40 und GAPDH wurde mit Hilfe der RT-PCR überprüft (Abb. 15). Es wurden sowohl für das Gesamthirn der Ratte als auch für die einzelnen Zelltypen Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone eine mRNA Expression des GPR40 detektiert.

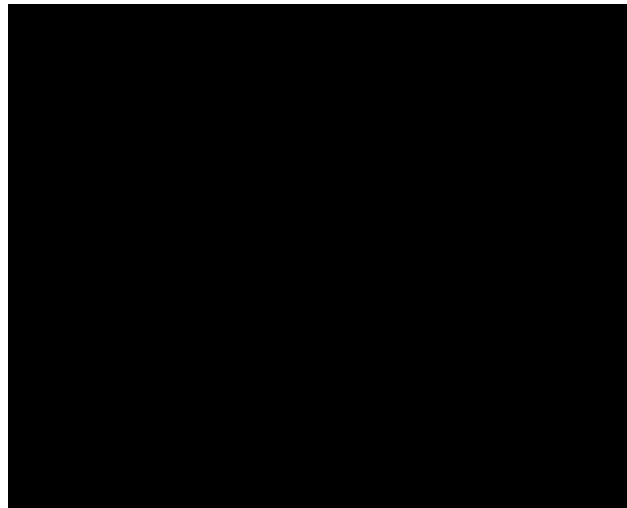


Abbildung 15: GPR40 mRNA-Expression im Gesamthirn und in primärer Zellkultur.

Auftrennung der RT-PCR Produkte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Die mRNA wurde aus den Gehirnen von 2 Tage alten Raten oder aus primären, nahezu reinen Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen Kulturen gewonnen. Es sind die Banden der GAPDH (600 bp) und GPR40 (456 bp) dargestellt. Die Negativkontrolle (keine Verwendung von cDNA) ergab kein detektierbares Signal für GPR40.

### 3.1.3 Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials

#### 3.1.3.1 Wirkung von VLCFA auf das mitochondriale Membranpotential primärer Zellen

Sowohl die starke Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration als auch die mitochondriale Depolarisation sind Schlüsselereignisse bei der Induktion von Zelltod. Deshalb wurde als nächstes der Einfluss von VLCFA auf das mitochondriale Potential ( $\Delta\Psi$ ) von Oligodendrozyten, Astrozyten und Neurone in der hippocampalen Co-Kultur untersucht (siehe Kahlert et al., 2008). Die Fettsäuren (C22:0, C24:0 und C26:0) wurden über einen Zeitraum von 10 min appliziert und anschließend die Freisetzung des Farbstoffes Rh123 nach Gabe des Entkopplers Carbonyl-Cyanid-4-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone (FCCP, 4  $\mu$ M) und  $F_1F_0$ -ATPase-Inhibitor Oligomycin (Oli, 10  $\mu$ M) analysiert. Die durch FCCP/Oli hervorgerufene Depolarisation unter Kontrollbedingung ( $\alpha$ -Cyclodextrin 1 mg/ml) wurde auf 100% normiert (Abb. 16, gestrichelte Linie) und gibt den Wert von  $\Delta\Psi$  für normal polarisierte Mitochondrien an.

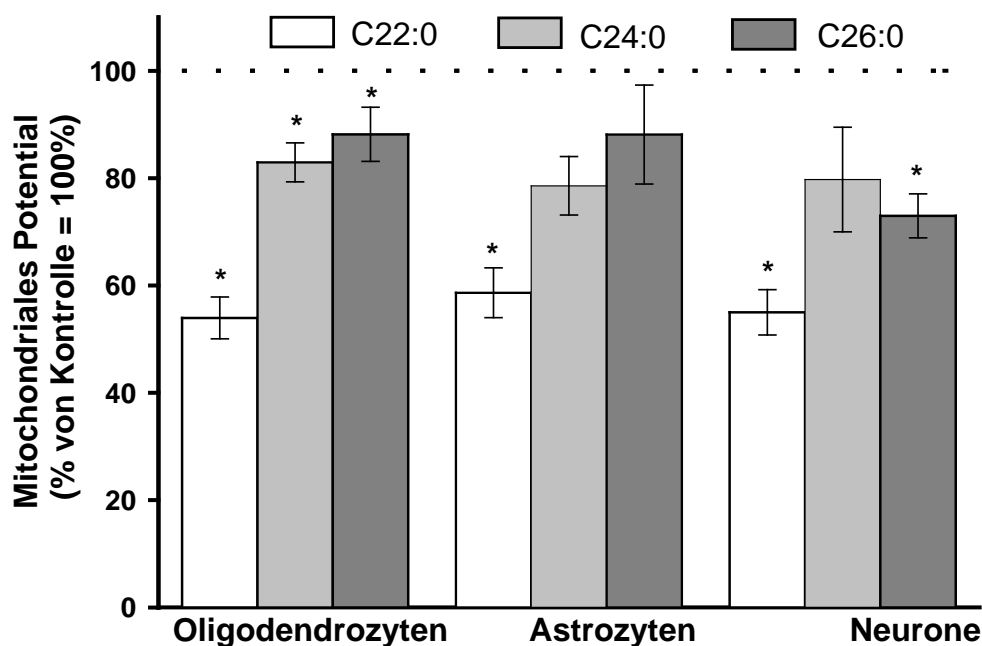


Abbildung 16: Einfluss von VLCFA auf das mitochondriale Potential von Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen.

Die Zellen wurden für 10 min mit C22:0, C24:0 und C26:0 (40  $\mu$ M) inkubiert und anschließend die Rh123-Freisetzung quantitativ ermittelt. Die Werte repräsentieren die Rh123-Freisetzung nach kombinierter Gabe des Entkopplers FCCP (4  $\mu$ M) und des  $F_1F_0$ -ATPase Inhibitors Oligomycin (10  $\mu$ M). Alle Werte wurden auf den zelltypspezifischen Kontrollwert normiert ( $\alpha$ -Cyclodextrin 1 mg/ml; 100%, markiert als gestrichelte Linie). Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen mit jeweils mehr als 15 einzelnen Zellen pro Zelltyp  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle.

Die Inkubation der hippokampalen Co-Kultur mit VLCFA (40  $\mu\text{M}$ ) führte in allen drei Zelltypen zu einer reduzierten Rh123 Freisetzung, was auf eine Reduktion bzw. Depolarisation von  $\Delta\Psi$  schließen lässt. Die Reduktion von  $\Delta\Psi$  in Bezug zur Kontrolle war durch C22:0-Applikation am stärksten ausgeprägt, C24:0 und C26:0 verminderten  $\Delta\Psi$  um etwa 20% ( $\Delta\Psi$ -Reduktion: Oligodendrozyten: C22:0 46%  $\pm$  3,9, C24:0 17%  $\pm$  3,6, C26:0 12%  $\pm$  5; Astrozyten: C22:0 42%  $\pm$  4,6, C24:0 21%  $\pm$  5,5, C26:0 12%  $\pm$  9,2; Neurone: C22:0 45%  $\pm$  4,2, C24:0 21%  $\pm$  9,7, C26:0 27%  $\pm$  4,1).

Ferner wird aus der Abb. 16 deutlich, dass die Wirkung von VLCFA auf  $\Delta\Psi$  keine zelltypspezifischen Unterschiede aufweist. Zum Vergleich hatte Palmitinsäure (C16:0) auch in höherer Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) keinen Einfluss auf  $\Delta\Psi$  (Daten nicht dargestellt).

### 3.1.3.2 Wirkung von VLCFA auf das Membranpotential isolierter Mitochondrien

Zur genaueren Analyse der Wirkung von VLCFA auf das mitochondriale Membranpotential wurden isolierte Mitochondrien untersucht. Die Messung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Prof. Peter Schönfeld und Heidelore Goldammer (Zentrum für zelluläre Bildung und innovative Krankheitsmodelle ZEBIK, Magdeburg).

Als eine dafür geeignete, sensitive Methode wurde die Auswertung der durch reversen Elektronentransport (RET)-vermittelten ROS-Bildung herangezogen (Schönfeld and Wojtczak, 2007). Für die Analyse der ROS-Produktion wurde die Bildung des fluoreszierenden Farbstoffes Resorufin gemessen, welches durch Oxidation nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung aus Amplex Red gebildet wird. In Abb. 17 A ist die basale RET-vermittelte ROS-Produktion durch Succinat-verstoffwechselnde Mitochondrien (Rattenhirn, RBM) zu sehen. Die Zugabe des Entkopplers FCCP (0,5  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der ROS-Bildung. Das kann als Nachweis der depolarisierenden Wirkung von FCCP auf die innere mitochondriale Membran (IMM) verstanden werden.

Der Effekt von VLCFA auf die IMM ist in der Abb. 17 B dargestellt. Alle drei Fettsäuren (C22:0, C24:0 und C26:0; 50 und 100 nmol/mg Protein) reduzierten die RET-vermittelte ROS-Produktion, was auf eine Depolarisation der IMM schließen lässt. Dabei vermittelte C22:0 die stärkste Wirkung auf die IMM und reduzierte die ROS-Bildung um etwa 35% (ROS-Reduktion: 50 nmol/mg: C22:0 66,9%  $\pm$  2,2; C24:0 67,2%  $\pm$  13,5; C26:0 89,3%  $\pm$  8,5; 100 nmol/mg: C22:0 57,3%  $\pm$  19,8, C24:0 75,6%  $\pm$  14,1, C26:0 78,8%  $\pm$  8,8). Der Lösungsvermittler  $\alpha$ -Cyclodextrin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die RET-vermittelte Bildung von ROS (0,25 mg/ml: 120%  $\pm$  22,2; 0,5 mg/ml: 92%  $\pm$  15,2).

Mit einem Kontrollversuch, bei dem nur Mitochondrien in physiologischer Lösung, der Fluoreszenzfarbstoff Resorufin und VLCFA zueinander gegeben wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass die Fettsäuren selbst keinen Anstieg der ROS Produktion bewirkten (Daten nicht dargestellt).

Die Öffnung der Permeabilitätstransitions-pore (PTP) in der IMM wird durch die Depolarisation der Membran verstärkt (Bernardi et al., 2002). Deshalb wurde ein möglicher Zusammenhang der VLCFA-vermittelten mitochondrialen Depolarisation und der Öffnung der PTP in isolierten Mitochondrien untersucht. Dafür wurde die Freisetzung von akkumuliertem  $\text{Ca}^{2+}$  aus Rattenlebermitochondrien (RLM) gemessen. RLM wurde hier als etabliertes Modellsystem für die Messung PTP-abhängiger Signale verwendet.

Isolierte Mitochondrien wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoffe CaG5N (0,05  $\mu\text{M}$ ), welcher extra-mitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  nachweist, inkubiert. Abb. 17 C zeigt den repräsentativen Verlauf der CaG5N Fluoreszenz. Nach Gabe eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Pulses ( $\text{CaCl}_2$ ) erhöhte sich zunächst die Fluoreszenz von CaG5N. Durch schnelle Aufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien erreichte die Fluoreszenz nach kurzer Zeit wieder ihren Ausgangspunkt. Nach der Stimulation mit  $\text{Ca}^{2+}$  wurden die Fettsäuren (10 und 20 nmol/mg Protein), gelöst in  $\alpha$ -Cyclodextrin, appliziert. C22:0, C24:0 und C26:0 bewirkten nach unterschiedlichen Latenzzeiten einen Anstieg der CaG5N-Fluoreszenz und somit eine vollständige Freisetzung des zuvor gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$ , welches ein Öffnen der PTP vermuten lässt.

Die schnellste  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurde durch die kürzere Fettsäure C22:0 bewirkt (4 min). Dagegen betrug der Zeitraum bei C24:0 8 min und bei C26:0 10 min. Der Zeitraum bis zur Freisetzung von 50% der maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge aus den Mitochondrien ( $\tau_{50\%}$  RT) wurde als Index für die Vulnerabilität der Mitochondrien verwendet (Schönfeld et al., 2004). VLCFA beeinflussen die Vulnerabilität von isolierten Mitochondrien in unterschiedlichem Maße, wobei C26:0 eine signifikant geringe Wirkung hatte als C22:0 und C24:0. ( $\tau_{50\%}$  PT: 10 nmol/mg: C22:0 435 s, C24:0 647 s, C26:0 900 s; 20 nmol/mg: C22:0 437 s, C24:0 545 s, C26:0 792 s).



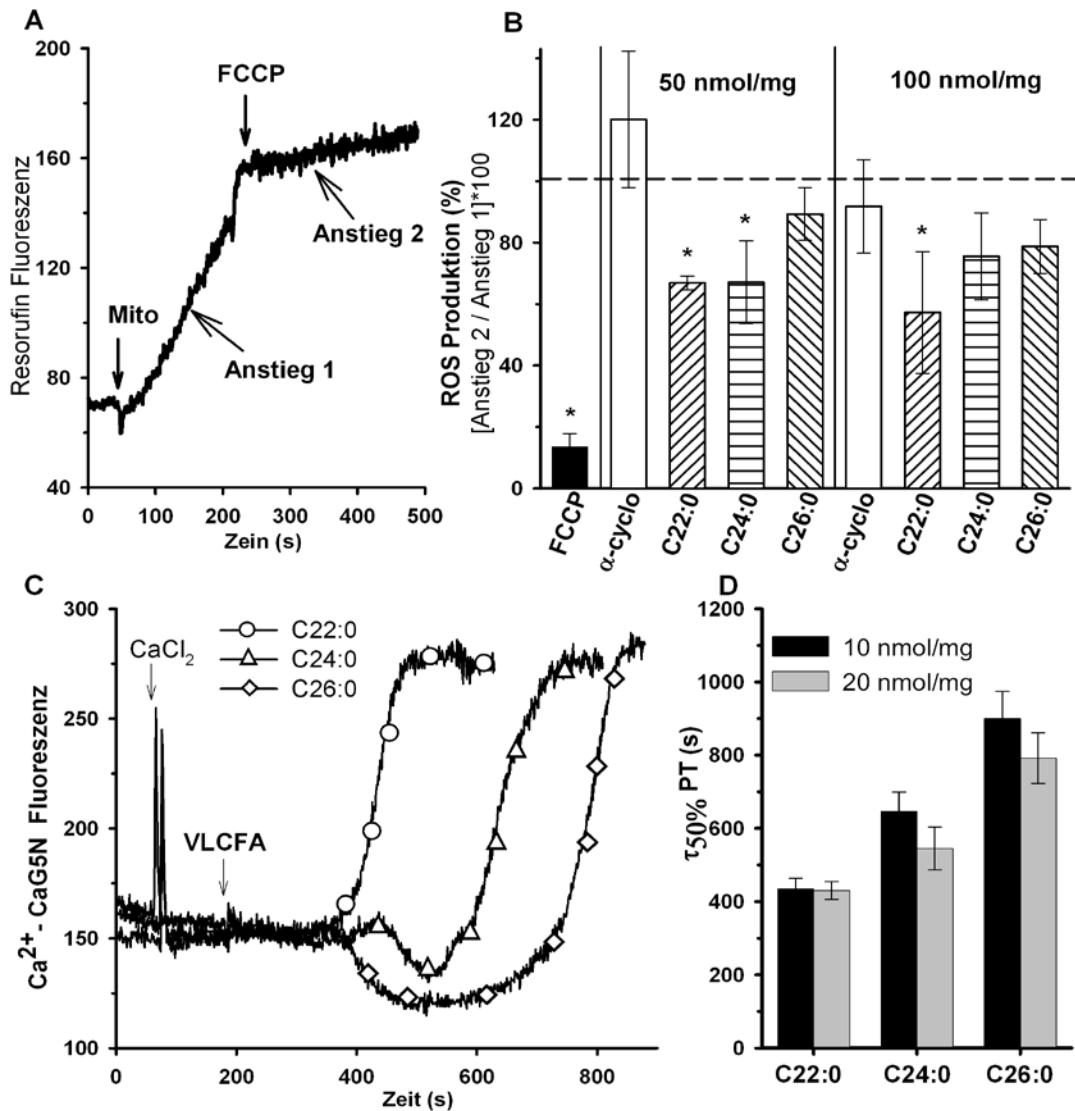


Abbildung 17: Wirkung von VLCFA auf isolierte Mitochondrien.

(A und B) Mitochondriales Potential, indirekt gemessen als Verringerung der durch reversen Elektronentransport vermittelten ROS-Produktion in isolierten RBM. (A) Beispielkurve der ROS-Messung mit Amplex Red. Die Freisetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch RBM wurde mit Hilfe der Oxidation des nichtfluoreszierenden Amplex Red zum fluoreszierenden Resorufin untersucht. Gemessen wurde die Bildung von ROS durch Succinat (10 mM)-oxidierende RBM. Nach der Zugabe der Mitochondrien (Mito, 0,2 mg Protein) zum Inkubationsmedium (1 ml) erfolgte ein schneller Anstieg der Resorufinfluoreszenz (Anstieg 1). FCCP (0,5  $\mu$ M) reduzierte die ROS-Produktion nahezu vollständig (Anstieg 2). (B) VLCFA (50 und 100 nmol/mg) induzierten eine Inhibierung der ROS-Produktion von Succinat-oxidierenden RBM. Die Darstellung der Daten erfolgte als prozentuales Verhältnis des Anstiegs 2 in Bezug auf den Anstieg 1. Als Kontrolle wurde der Lösungsvermittler  $\alpha$ -Cyclodextrin (0,25 und 0,5 mg/ml) verwendet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Quotienten bei gleichem Anstieg 1 und 2 (=100%). (C und D) VLCFA-vermittelte Stimulation der PT von RLM. Analyse der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus RLM durch VLCFA-Applikation. Mitochondrien (1 mg Protein) wurden in 1 ml Inkubationsmedium mit Glutamat/Malat (5 mM/5 mM) und 0,05  $\mu$ M CaG5N suspendiert. (C) Repräsentative Beispielkurven der CaG5N Fluoreszenz. Die Aufnahme von Ca<sup>2+</sup> aus dem Medium erfolgte nach Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (50 nmol). VLCFA (C22:0, C24:0, C26:0; 10 nmol/mg Protein) führten zu einer Freisetzung des Akkumulierten Ca<sup>2+</sup> aus den Mitochondrien. (D) Analyse der Zeit zum Erreichen von 50% der maximalen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung ( $\tau_{50\%}$  PT) nach Zugabe von VLCFA (10 und 20 nmol/mg). Alle Daten stammen aus mindestens 3 unabhängigen Mitochondrienpräparationen  $\pm$  SEM. \* P < 0,05 VLCFA vs. Kontrolle.

### 3.1.4 ROS-Bildung

Die zuvor beschriebenen Experimente zeigten, dass VLCFA-Applikation sowohl auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als auch auf Mitochondrien dramatische Auswirkungen hat. In welchem Maße die Bildung von ROS bei der Toxizität der Fettsäuren in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten eine Rolle spielt, sollte mit Hilfe des Farbstoffes Dihydroethidium (DHE) geklärt werden. Die 15-minütige VLCFA-Applikation ( $40 \mu\text{M}$ ) hatte in den drei untersuchten Zelltypen keine Auswirkung auf die ROS-Produktion (Abb. 18). Dagegen verursachte Antimycin A, welches einen Inhibitor des Komplex III der mitochondrialen Atmungskette darstellt und als Positivkontrolle diente, eine starke Erhöhung der ROS-Bildung in Oligodendrozyten  $6,4\text{-fach} \pm 0,5$ , Astrozyten  $5\text{-fach} \pm 0,3$  und Neuronen  $13,2\text{-fach} \pm 2,9$ . Die Bildung von ROS scheint daher bei der akuten Wirkung von VLCFA keine entscheidende Rolle zu spielen.

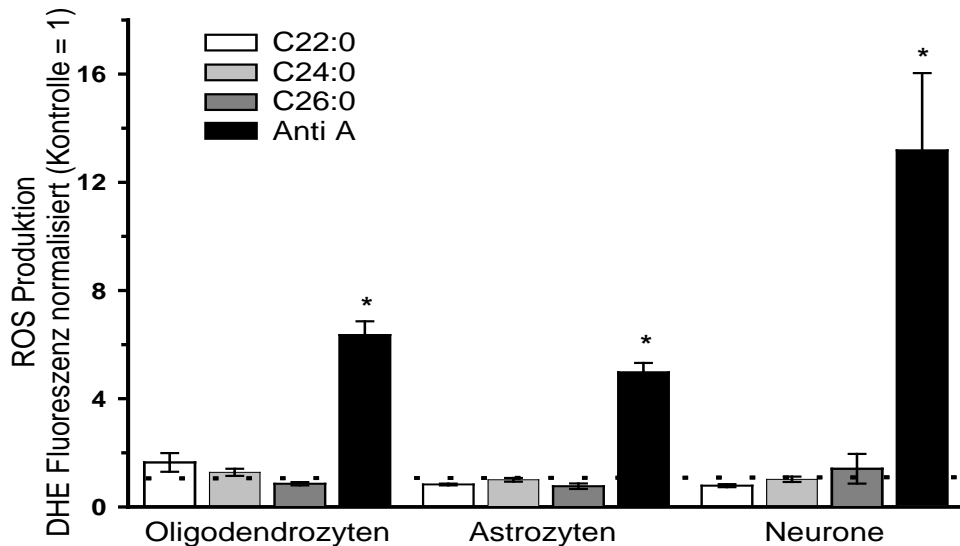


Abbildung 18: ROS-Bildung in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen nach Applikation von VLCFA ( $40 \mu\text{M}$ ) für 15 min.

Die Bildung von ROS wurde durch Messung der Ethidiumkationen Fluoreszenz, welche nach Oxidation von DHE durch ROS entstehen, ermittelt. DHE ( $1 \mu\text{M}$ ) wurde zusammen mit der Substanz für 15 min zu den Zellen gegeben: VLCFA (C22:0, C24:0 und C26:0) wurde in einer Konzentration von  $40 \mu\text{M}$  und Antimycin A (Anti A) in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  appliziert. Die Fluoreszenz von DHE (dargestellt als Differenz des Wertes nach der Substanzapplikation und des Wertes vor der Substanzapplikation) wurde auf die Kontrolle ( $\alpha$ -Cyclodextrin  $1 \text{ mg/ml}$ , gestrichelte Linie) normiert. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen mit jeweils mehr als 15 einzelnen Zellen pro Zelltyp  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  Anti A vs. Kontrolle

## 3.2 Langzeitauswirkung von VLCFA-Akkumulation

### 3.2.1 Induktion von Zelltod in Oligodendrozyten und Astrozyten

Nachdem die akute Wirkung von VLCFA auf zellphysiologische Parameter umfassend analysiert wurde, fanden Untersuchungen zur Auswirkung einer chronischen Inkubation mit VLCFA statt. Von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der Toxizität von VLCFA ist ihre Fähigkeit, Zelltod auszulösen. Darum wurden primäre Oligodendrozyten und Astrozyten für 1 bis 3 Tage mit VLCFA (10  $\mu$ M - 40  $\mu$ M) versetzt und der Zelltod mit Hilfe der Lactat Dehydrogenase (LDH)-Freisetzung gemessen. In beiden Zelltypen konnte ein signifikanter Anstieg der LDH-Freisetzung nachgewiesen werden. Oligodendrozyten zeigten nach Inkubation mit VLCFA für 24 h eine deutlich erhöhte Zelltodrate (Abb. 19 A). C24:0 und C26:0 verursachten einen 6-fach erhöhten Zelltod im Vergleich zur Kontrolle ( $\alpha$ -Cyclodextrin 1 mg/ml). Die Wirkung von C22:0 auf Oligodendrozyten war dagegen etwas geringer (C24:0 und C26:0 40  $\mu$ M: 6,5-fache Erhöhung, C22:0 40  $\mu$ M: 3,3-fache Erhöhung).

Auch in Astrozyten konnte nach 24-stündiger Inkubation mit VLCFA (40  $\mu$ M) eine stark erhöhte Zelltodrate beobachtet werden. Es gab jedoch keinen Unterschied in der schädigenden Potenz zwischen den drei Fettsäuren (Zelltod-Erhöhung Abb. 19 B; C22:0 3,7-fach; C24:0 4,7-fach; C26:0 4,3-fach). Da die Astrozyten nach eintägiger VLCFA-Applikation einen geringeren Zelltod als die Oligodendrozyten aufwiesen, wurden VLCFA anschließend für 3 Tage zu Astrozytenkulturen appliziert. Dadurch erhöhte sich die Zelltodrate deutlich (Abb. 19 C: 40  $\mu$ M: C22:0 6,9-fach; C24:0 6,8-fach; C26:0 4,8-fach). Palmitinsäure (C16:0) hatte selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M keine toxischen Auswirkungen auf Oligodendrozyten und Astrozyten.

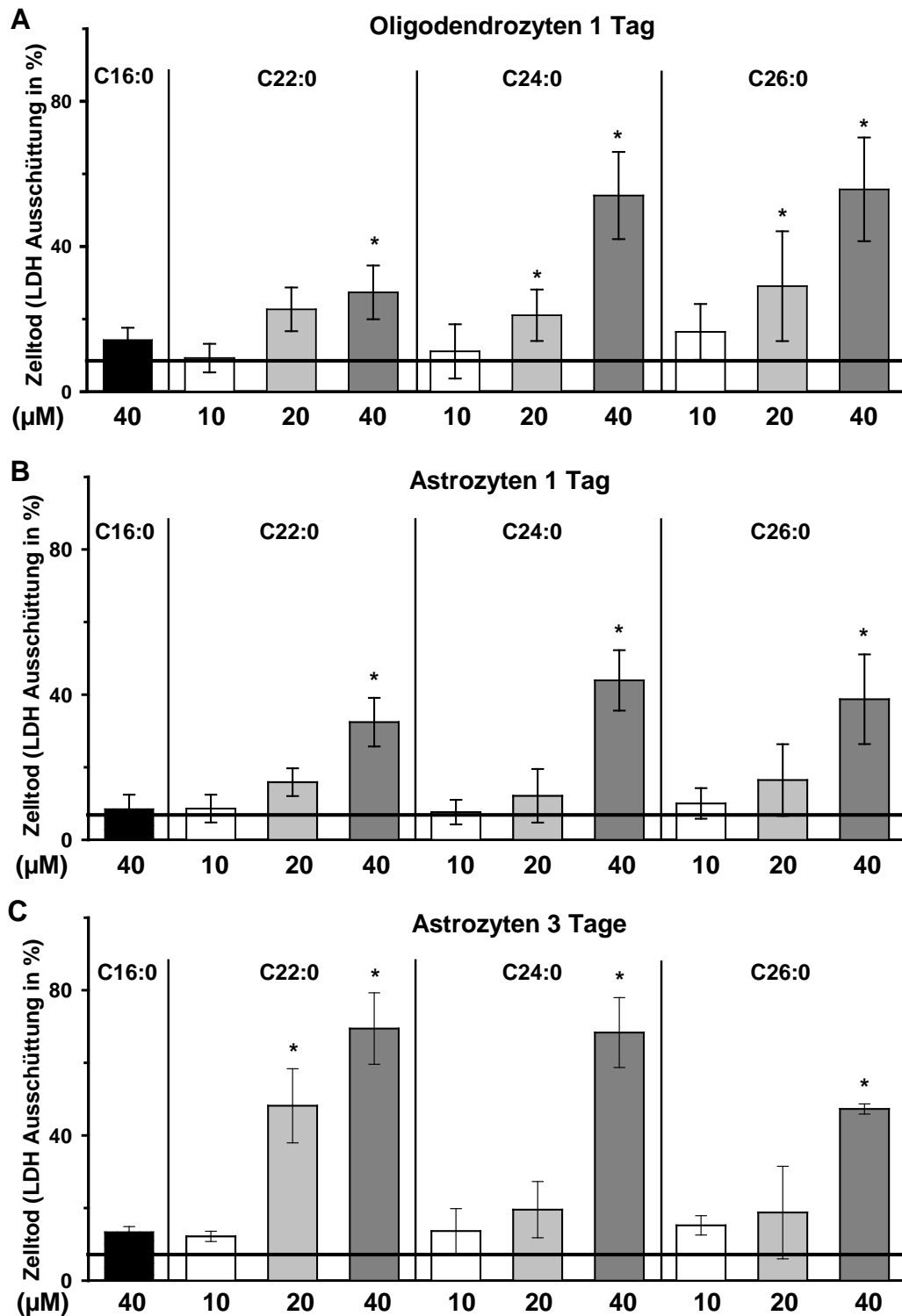


Abbildung 19: VLCFA-induzierter Zelltod in (A) Oligodendrozyten und (B, C) Astrozyten.

Die Zellen wurden mit C22:0, C24:0, C26:0 und C16:0 in der angegebenen Konzentration für 1 bis 3 Tage versetzt. Anschließend wurde die LDH-Aktivität im Überstand als Prozent von der gesamten LDH Aktivität (LDH-Gesamt) berechnet. Die Menge an LDH-Gesamt ergibt sich aus der Summierung der LDH Aktivität aus dem Überstand und der verbleibenden LDH Aktivität aus lysierten Zellen. Die horizontale Linie gibt die LDH-Aktivität unter Kontrollbedingungen an ( $\alpha$ -Cyclodextrin, 1 mg/ml). Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen, wobei eine Doppelbestimmung für jede Bedingung durchgeführt wurde. \*  $P < 0,05$  VLCFA vs. Kontrolle.

### 3.2.2 Zytokin-Bildung und Freisetzung in Astrozyten

#### 3.2.2.1 mRNA Analyse

In X-ALD-Patienten wurde besonders bei Astrozyten eine gesteigerte Expression des Zytokins TNF- $\alpha$  in geschädigten Bereichen des Gehirns gefunden. Allerdings konnte ein direkter Zusammenhang zwischen VLCFA-Akkumulation und inflammatorischen Reaktionen bisher noch nicht nachgewiesen werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von VLCFA auf das Expressionsniveau ausgewählter Zytokine und Chemokine in primären Astrozyten untersucht. Dafür wurde die mRNA Expression von IL-6, GRO/CINC-1, IL-1 $\beta$ , und TNF- $\alpha$  nach 24-stündiger Inkubation mit VLCFA (20  $\mu$ M) mittels RT-PCR analysiert. Als Positivkontrolle diente LPS (10 ng/ $\mu$ l), das als Baustein der Membran von gramnegativen Bakterien die Zytokinbildung stimuliert.

In der Abb. 20 A sind deutliche Unterschiede in der Expression der verschiedenen Zytokine bei unterschiedlicher Stimulation zu erkennen. Zur genaueren Analyse wurde die RT-PCR semiquantitativ ausgewertet, wobei die Expression von GAPDH als Referenz diente. LPS erhöhte die Expression von allen vier Zytokinen um das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20 B). Die Stimulation mit VLCFA bewirkte einen tendenziellen, aber nicht signifikanten Anstieg der Expression von IL-6, aber einen signifikanten Anstieg von GRO/CINC-1. Keine Erhöhung der Expression war für TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu beobachten. (Expressions-Anstieg von IL-6: C22:0 45%  $\pm$  76, C24:0 22%  $\pm$  53, C26:0 27%  $\pm$  66, LPS 148%  $\pm$  76; von GRO/CINC-1: C22:0 72%  $\pm$  23, C24:0 96%  $\pm$  48, C26:0 35%  $\pm$  38, LPS 161%  $\pm$  33).

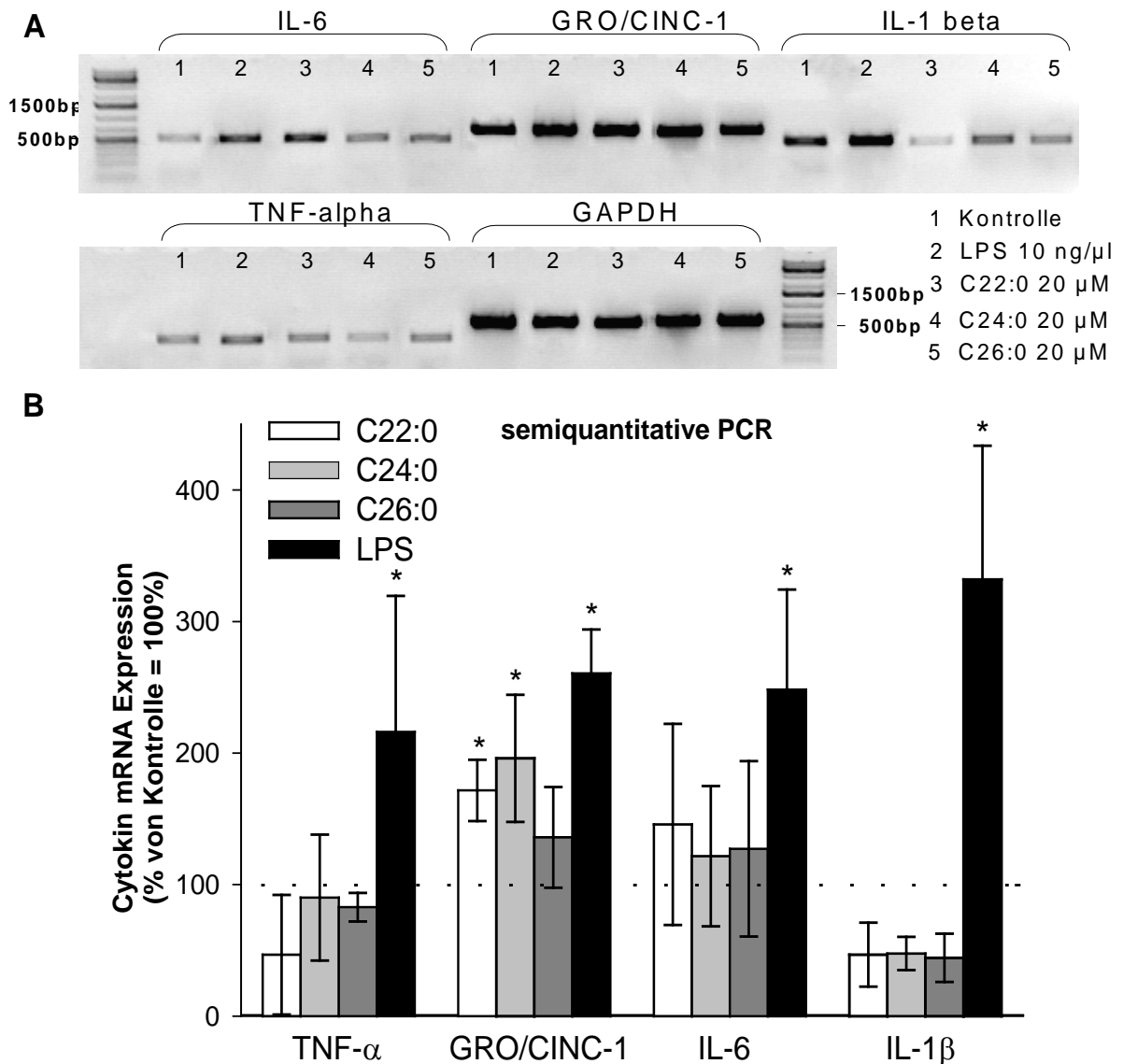


Abbildung 20: Expression von IL-6, GRO/CINC-1, IL-1β, TNF-α und GAPDH in primären Astrozyten nach Stimulation mit VLCFA für 24 h.

Primäre Astrozyten wurden mit VLCFA (20 μM) und LPS (10 μg/μl) für 24 h unter serumfreien Bedingungen (DMEM) stimuliert. Der mRNA Expressionslevel von TNF-α, GRO/CINC-1, IL-6 und IL-1β wurde mit Hilfe der semiquantitativen Analyse der RT-PCR (30 Zyklen) ermittelt. (A) Auftrennung von RT-PCR Produkten durch Agarosegelelektrophorese: IL-6 (499 bp), GRO/CINC-1 (670 bp), IL-1β (380 bp), TNF-α (350 bp) und GAPDH (600 bp). (B) Semiquantitative Analyse der RT-PCR-Produkte. Als Kontrolle wurden die Zellen mit α-Cyclodextrin (0,5 mg/ml) stimuliert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ± SEM. \* P < 0,05 VLCFA vs. Kontrolle.

Für eine genaue Analyse des Expressionsniveaus von TNF- $\alpha$ , GRO/CINC-1, IL-6 und IL-1 $\beta$  wurde unter Verwendung der zuvor benutzten RT-PCR-Primer eine real-time PCR durchgeführt (Abb. 21). Wie zuvor, wurden primäre Astrozyten mit VLCFA (20  $\mu$ M) und LPS (10  $\mu$ g/ml) für 24 h unter serumfreien Bedingungen stimuliert. Ähnlich den Ergebnissen aus der semiquantitativen RT-PCR, bewirkten auch hier die Fettsäuren einen Anstieg der IL-6 und GRO/CINC-1 Expression. Den stärksten Anstieg zeigte erneut die Expression von GRO/CINC-1. Das mRNA Expressionslevel von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde nicht beeinflusst. (Anstieg Expression IL-6: C22:0 10-fach  $\pm$  4, C24:0 9-fach  $\pm$  4, C26:0 3-fach  $\pm$  1,4; Anstieg Expression GRO/CINC-1: C22:0 90-fach  $\pm$  8, C24:0 84-fach  $\pm$  13, C26:0 17-fach  $\pm$  9).

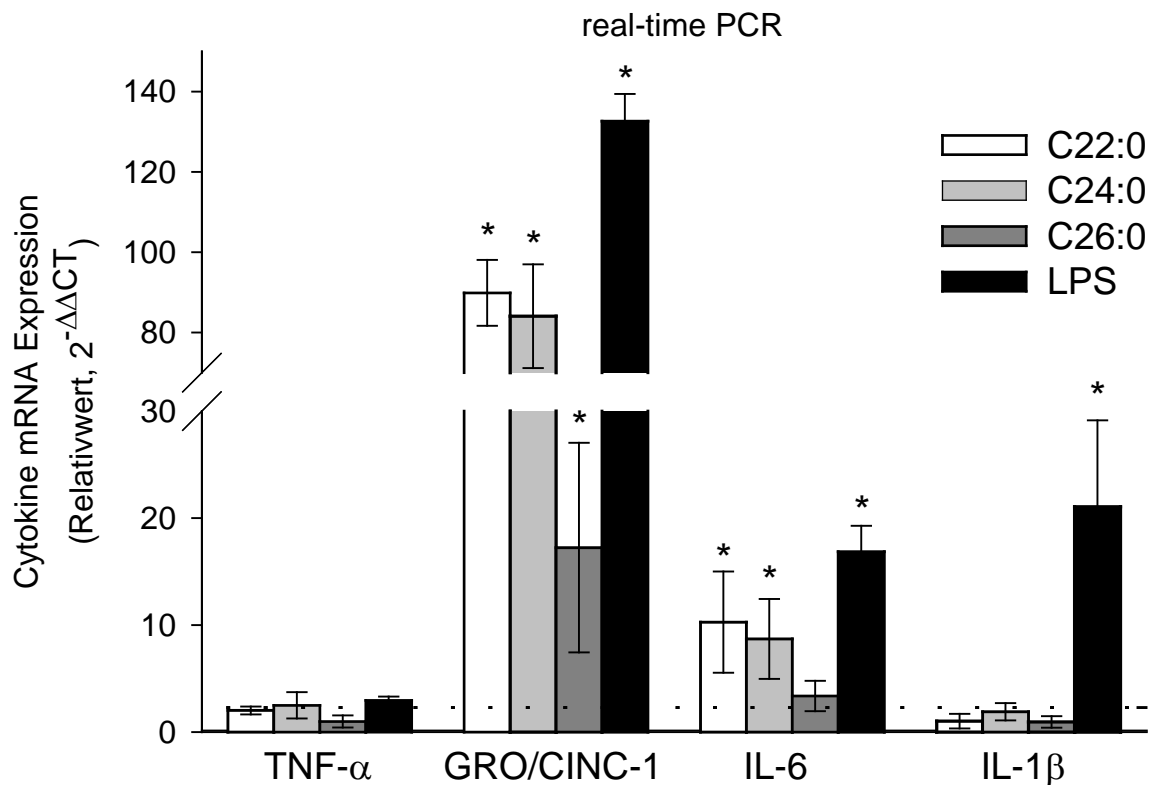


Abbildung 21: Expressionslevel der mRNA von TNF- $\alpha$ , GRO/CINC-1, IL-6 und IL-1 $\beta$  in primären Astrozyten.

Primäre Astrozyten wurden stimuliert mit VLCFA (20  $\mu$ M) und LPS (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) für 24 h unter serumfreien Bedingungen (DMEM). Der mRNA-Expressionslevel von TNF- $\alpha$ , GRO/CINC-1, IL-6 und IL-1 $\beta$  wurde mit Hilfe der real-time PCR-Methode ermittelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit  $\alpha$ -Cyclodextrin (0,5 mg/ml) stimuliert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM. \* P < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle.

## 3.2.2.2 Peptidanalyse

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Zytokinexpression durch VLCFA in einer erhöhten Zytokinfreisetzung resultiert, wurde der Zellüberstand nach 24-stündiger VLCFA-Applikation mit Hilfe eines Zytokin-Elisas analysiert.

Die Freisetzung von IL-6 ist in der Abb. 22 dargestellt. Die Applikation von Glutamat (100  $\mu$ M) und Thrombin (2 U/ml) diente als Positivkontrolle und rief einen starken Anstieg der IL-6 Freisetzung aus primären Astrozyten hervor. Die Inkubation mit C24:0 und C26:0 (20  $\mu$ M) bewirkte im Vergleich zur Kontrolle ( $\alpha$ -Cyclodextrin 0,5 mg/ml) eine um das 2,1- und 1,6-fach erhöhte IL-6 Menge im Überstand. LPS (20  $\mu$ g/ml) löste eine vergleichbare IL-6-Freisetzung aus. C 16:0 und C22:0 beeinflussten die Zytokinfreisetzung nicht.

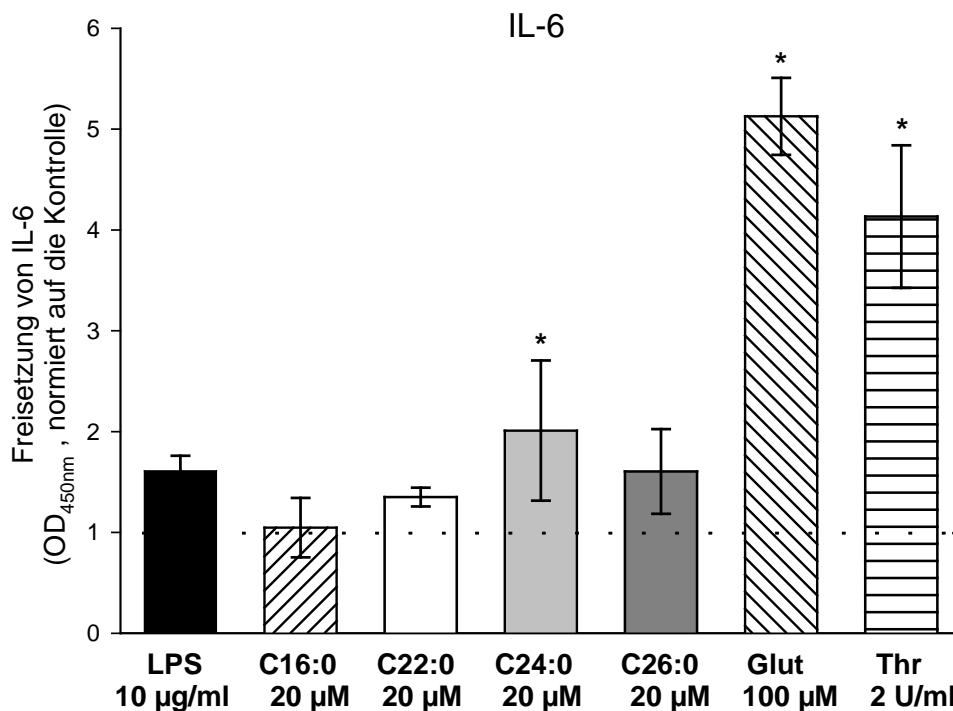


Abbildung 22: Freisetzung von IL-6 nach VLCFA-Stimulation.

Primäre Astrozyten wurden für 24 h mit VLCFA (20  $\mu$ M), LPS (10  $\mu$ g/ml), Glutamat (Glut, 100  $\mu$ M) und Thrombin (Thr, 2 U/ml) stimuliert. Die anschließende Bestimmung der freigesetzten Menge an IL-6 erfolgte mittels IL-6 Elisa. Die gemessenen Werte wurden auf den Wert unter Kontrollbedingungen ( $\alpha$ -Cyclodextrin 0,5 mg/ml) normiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  Glutamat, Thrombin, LPS, C26:0, C24:0 vs. Kontrolle.



Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Analyse der GRO/CINC-1-Freisetzung gefunden (Abb. 23). Die Fettsäure C22:0 änderte die GRO/CINC-1-Freisetzung von Astrozyten nicht. Die Stimulation mit C24:0 und C26:0 bewirkte dagegen im Vergleich zur Kontrolle einen Anstieg um das 1,8- und 2,1-Fache der GRO/CINC-1 Menge im Überstand.

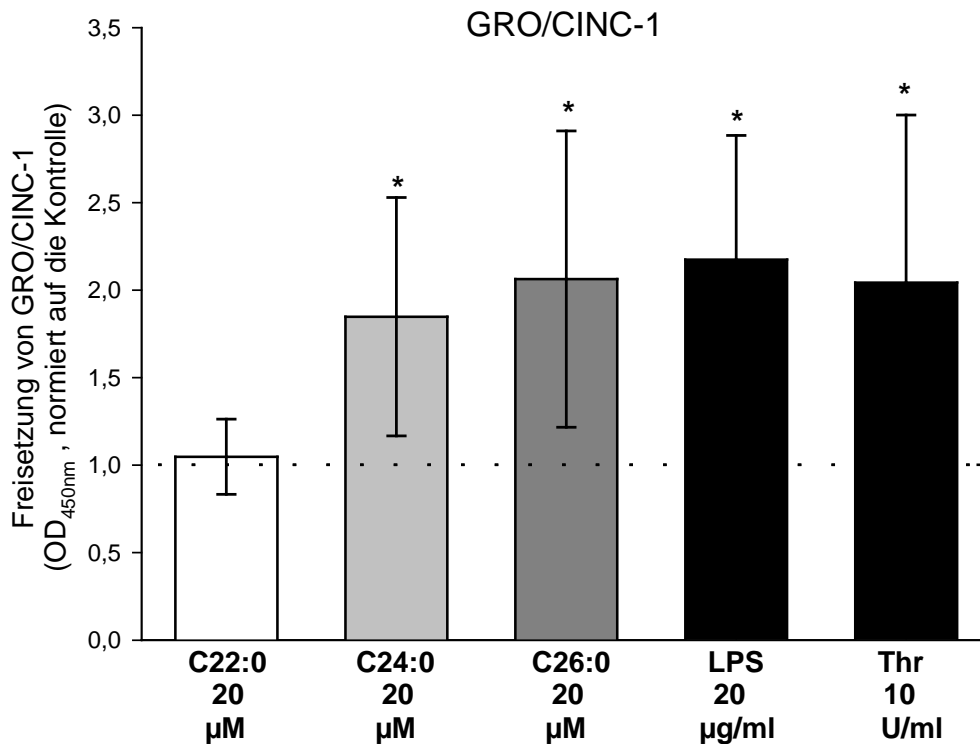


Abbildung 23: Freisetzung von GRO/CINC-1 nach VLCFA-Stimulation.

Primäre Astrozyten wurden für 24 h mit VLCFA (C22:0, C24:0, C26:0; 20 µM), LPS (10 µg/ml), und Thrombin (Thr, 10 U/ml) stimuliert. Die anschließende Bestimmung der freigesetzten Menge an GRO/CINC-1 wurde mittels GRO/CINC-1 Elisa durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden auf den Wert unter Kontrollbedingungen ( $\alpha$ -Cyclodextrin 0,5 mg/ml) normiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  Thrombin, LPS, C26:0, C24:0 vs. Kontrolle.

### 3.2.3 Zellulärer Sauerstoffstress - HNE

Im Folgenden sollte die Auswirkung der chronischen VLCFA-Applikation auf den oxidativen Stress der Zellen untersucht werden, nachdem, wie zuvor beschrieben, dass nach kurzzeitiger Applikation keine Bildung von ROS zu beobachten war. Dafür wurde die Menge an gebildetem 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) in Astrozyten nach 24-stündiger Inkubation mit VLCFA analysiert. Im Speziellen wurden HNE-Protein-Konjugate mit Hilfe der Western-Blot Methode am Gesamtproteinextrakt aus Astrozytenkulturen untersucht. HNE wird für viele zytotoxische Effekte, die während oxidativem Stress beobachtet wurden, verantwortlich gemacht (Muralikrishna Adibhatla and Hatcher, 2006).

Es wurde keine deutliche Erhöhung der HNE-Produkte nach VLCFA-Inkubation beobachtet (Abb. 24). Sowohl unter Kontrollbedingungen ( $\alpha$ -Cyclodextrin 0,5 mg/ml), als auch nach Applikation von C26:0 (20  $\mu$ M) und C24:0 (20  $\mu$ M) war nur eine leichte Färbung der Proteinbanden zu erkennen. Als Positivkontrolle wurde eine direkte Gabe von HNE (20  $\mu$ M) zu kultivierten Astrozyten gewählt. Hierbei zeigte sich eine stärkere Färbung der Proteinbanden.

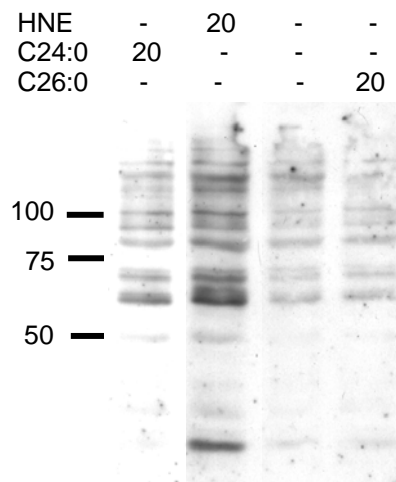


Abbildung 24: HNE-Färbung von Proteinbanden in primären Astrozyten nach 24-stündiger Inkubation mit VLCFA.

Primäre Astrozyten wurden mit VLCFA (C24:0 20  $\mu$ M, C26:0 20  $\mu$ M) und HNE (20  $\mu$ M) für 24 h inkubiert. Das Zelllysate der stimulierten Zellen wurde subfraktioniert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunfärbung von Proteinen, die nach oxidativem Stress mit dem hochreaktiven HNE kovalent gebunden sind, erfolgte nach der Western-Blot Methode mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen HNE. Nach der Immunfärbung der Proteine wurden die Proteinbanden anschließend auf Fotopapier entwickelt. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Beispiel für eine entwickelte Western-Blot-Membran.

### 3.2.4 Mitochondriales Membranpotential

Die Reduzierung des mitochondrialen Membranpotentials, sowohl in lebenden Zellen als auch in isolierten Mitochondrien, wurde bereits als wichtiges Ereignis der akuten Wirkung von VLCFA dargestellt. Das warf nun die Frage auf, ob VLCFA das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) dauerhaft schädigen können. Deshalb wurden die Zellen der hippocampalen Co-Kultur für 14 Tage (vom 7. bis zum 21. Kulturtag) in Anwesenheit von VLCFA in sub-letaler Konzentration (5  $\mu$ M C22:0, 10  $\mu$ M C24:0, 10  $\mu$ M C26:0) kultiviert. Da die Fettsäure C22:0 im Vergleich zu C24:0 und C26:0 ein höheres toxisches Potential zeigte, wurde ihre Konzentration um 50% gesenkt.

Für die Bestimmung von  $\Delta\Psi$  wurde die Freisetzung von Rh123 aus den Mitochondrien gemessen (Abb. 25). Dafür wurden die Mitochondrien unter Verwendung des Entkopplers FCCP und des Inhibitors für  $F_1F_0$ -ATPase Oligomycin vollständig depolarisiert. Je größer  $\Delta\Psi$ , desto größer ist die durch FCCP-Oligomycin freigesetzte Menge an Rh123 in das Zytosol und die daraus resultierende Fluoreszenzintensität.

Die chronische Gabe von VLCFA über 14 Tage bewirkte in allen drei Zelltypen eine deutliche Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 25). In Oligodendrozyten war das resultierende  $\Delta\Psi$  etwas größer als in Astrozyten und Neuronen ( $\Delta\Psi$ -Reduktion: Oligodendrozyten: C22:0 22%  $\pm$ 10, C24:0 17%  $\pm$ 10, C26:0 11%  $\pm$ 6; Astrozyten: C22:0 15%  $\pm$ 12, C24:0 37%  $\pm$ 9, C26:0 30%  $\pm$ 7; Neurone: C22:0 38%  $\pm$ 10, C24:0 27%  $\pm$ 6, C26:0 7%  $\pm$ 10).

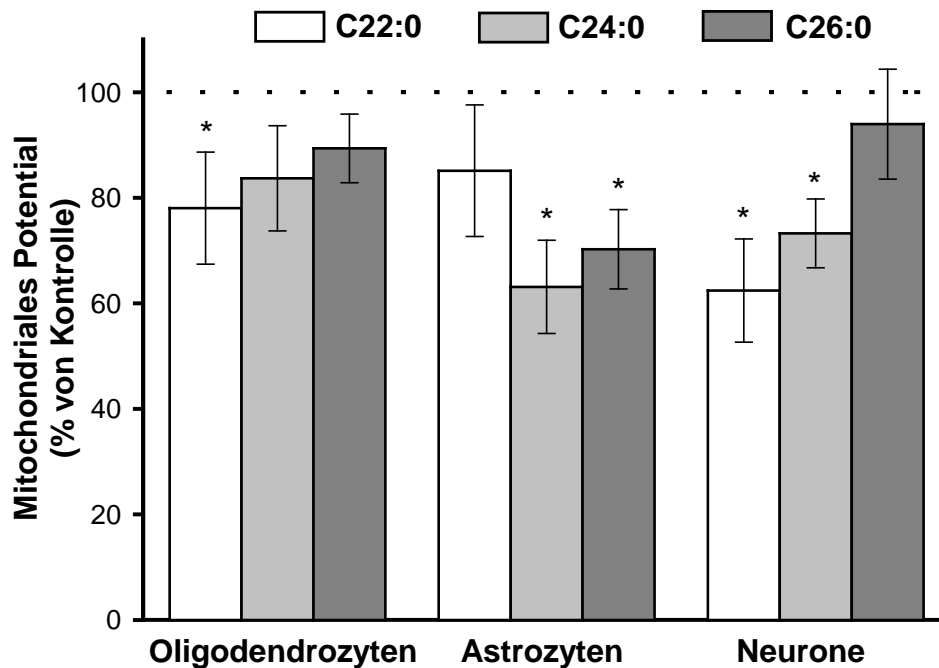


Abbildung 25: Wirkung der VLCFA-Langzeitinkubation auf das mitochondriale Membranpotential

Eine hippocampale Co-Kultur wurde für 14 Tage (vom 7. bis zum 21. Kulturtag) mit VLCFA (C22:0 5  $\mu$ M, C24:0 10  $\mu$ M, C26:0 10  $\mu$ M) behandelt. Es wurde die Rh123-Freisetzung nach kombinierter Gabe des Entkopplers FCCP (4  $\mu$ M) und des  $F_1F_0$ -ATPase Inhibitors Oligomycin (10  $\mu$ M) gemessen. Alle Werte wurden auf die Kontrolle des jeweiligen Zelltyps normiert ( $\alpha$ -Cyclodextrin 0,25 mg/ml, dargestellt als gestrichelte, horizontale Linie). Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen mit jeweils mehr als 15 einzelnen Zellen pro Zelltyp  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  VLCFA vs. Kontrolle.

### 3.2.5 Entwicklung von Oligodendrozyten

#### 3.2.5.1 Lokalisation und Expression von CNP und MBP

Ein zentraler Punkt für die Beschreibung der schädigenden Potenz von VLCFA ist die Analyse ihrer chronischen Wirkung auf die myelinbildenden Oligodendrozyten, da sowohl der Tod dieser Zellen, als auch die Demyelinisierung in X-ALD beobachtet wurde (siehe Übersichtsarbeit (Aubourg and Dubois-Dalcq, 2000)). Deshalb wurden primäre Oligodendrozyten in Anwesenheit von VLCFA (5  $\mu$ M C22, 10  $\mu$ M C24:0, 10  $\mu$ M C26:0) für 14 Tage ab dem 7. Kulturtag kultiviert. Auf Grund der schon beschriebenen deutlich toxischen Wirkung von C22:0 wurde hier eine Konzentration von 5  $\mu$ M verwendet.

Nach den 14 Tagen der VLCFA-Behandlung (Kultur war 21 DIV) wurde eine immunzytochemische Färbung der 2',3'-zyklischen Nucleotid-3'-Phosphodiesterase (CNP) und des basischen Myelinproteins (MBP) durchgeführt (Abb. 25). In Vorversuchen wurde beobachtet, dass MBP, ein Markerprotein für reife myelinbildende Oligodendrozyten, circa am 18. Kulturtag expremiert wurde. Das zytoplasmatische Membran-assoziierte Protein CNP, ein früher Marker der Oligodendrozytendifferenzierung, konnte ab dem 16. Kulturtag nachgewiesen werden.

Abb. 26 zeigt beispielhafte Fluoreszenzbilder von Oligodendrozyten unter Kontrollbedingungen und nach Stimulation mit VLCFA. Das Markerprotein MBP war unter Kontrollbedingungen ( $\alpha$ -Cyclodextrin, 0,25 mg/ml) im Zytosol und überwiegend in den weit verzweigten Fortsätzen der Oligodendrozyten lokalisiert. CNP und MBP zeigten in vielen Bereichen der Fortsätze Colokalisation mit Ausnahme der Bereiche mit sehr feinen Ausläufern, die zwischen den großen Fortsätzen lagen. In diesen Bereichen konnte ausschließlich MBP nachgewiesen werden.

Die Inkubation mit VLCFA über 14 Tage führte zu einem deutlichen Rückgang der MBP-exprimierenden Oligodendrozyten. Außerdem wurde eine veränderte Lokalisation des Proteins festgestellt. MBP war nach VLCFA-Stimulation (C22:0, C24:0 und C26:0) vorwiegend in Vesikel-ähnlichen Strukturen des Zytosols lokalisiert und wurde nur selten in Fortsätzen der Oligodendrozyten gefunden. Alle drei Fettsäuren hatten ähnliche Auswirkungen auf die MBP-Lokalisation. Das immunzytochemische Muster des Proteins CNP hingegen war in den Oligodendrozyten aller Versuchsgruppen gleichartig verteilt. So konnte CNP unter Kontroll- und VLCFA-Bedingungen im gesamten Zytosol und in den meisten Ausläufern der Oligodendrozyten gefunden werden.

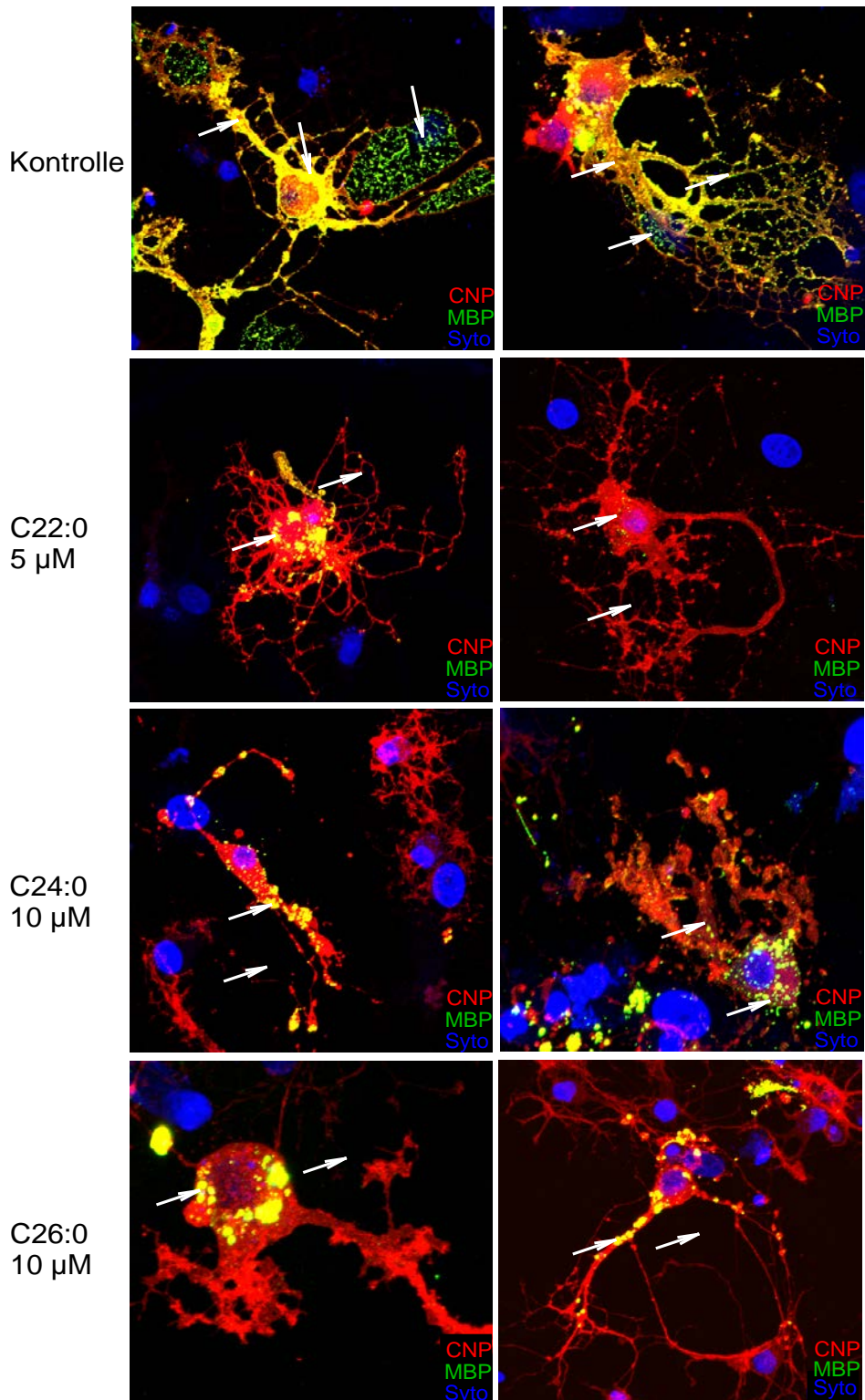


Abbildung 26: Lokalisation von MBP und CNP in primären Oligodendrozyten nach Langzeit-Inkubation mit VLCFA.

Primäre hippocampale Co-Kulturen wurden für 14 Tage (vom 7. bis zum 21. Kulturtag) mit VLCFA (C22:0 5 µM, C24:0 10 µM, C26:0 10 µM) inkubiert. Die primären Oligodendrozyten der Co-Kultur wurden immunzytochemisch gefärbt: anti CNP (rot), anti MBP (grün) und Syto59 (Zellkern, blau). Die Bilder sind repräsentative Beispiele von mindestens 3 unterschiedlichen Präparationen mit je 2 stimulierten Co-Kulturen pro Bedingung. Es ist eine Umverteilung des MBD durch Behandlung der Zellen mit VLCFA zu erkennen (markiert als weiße Pfeile).

3.2.5.2 Proteinexpressionslevel von CNP und MBP

Nach der deskriptiven Analyse der subzellulären Verteilung von CNP und MBP sollte nun die Menge dieser Proteine mit Hilfe der Wester-Blot Methode quantitativ untersucht werden. Primäre Oligodendrozyten wurden erneut für 14 Tage (vom 7. bis zum 21. Kulturtag) mit VLCFA (C22:0 5  $\mu$ M, C24:0 10  $\mu$ M, C26:0 10  $\mu$ M) kultiviert. Es zeigte sich, dass der Proteinlevel von MBP nach Stimulation mit VLCFA deutlich reduziert war (Abb. 27). Dagegen blieb die Proteinmenge von CNP sowie den Referenzproteinen GFAP und  $\beta$ -Tubulin unverändert. (Abb.: 27: Reduktion von MBP nach Behandlung mit 5  $\mu$ M C22:0: 22,5%  $\pm$  14,5; 10  $\mu$ M C24:0: 34,8%  $\pm$  13,5 und 10  $\mu$ M C26:0: 26,6%  $\pm$  15,7).

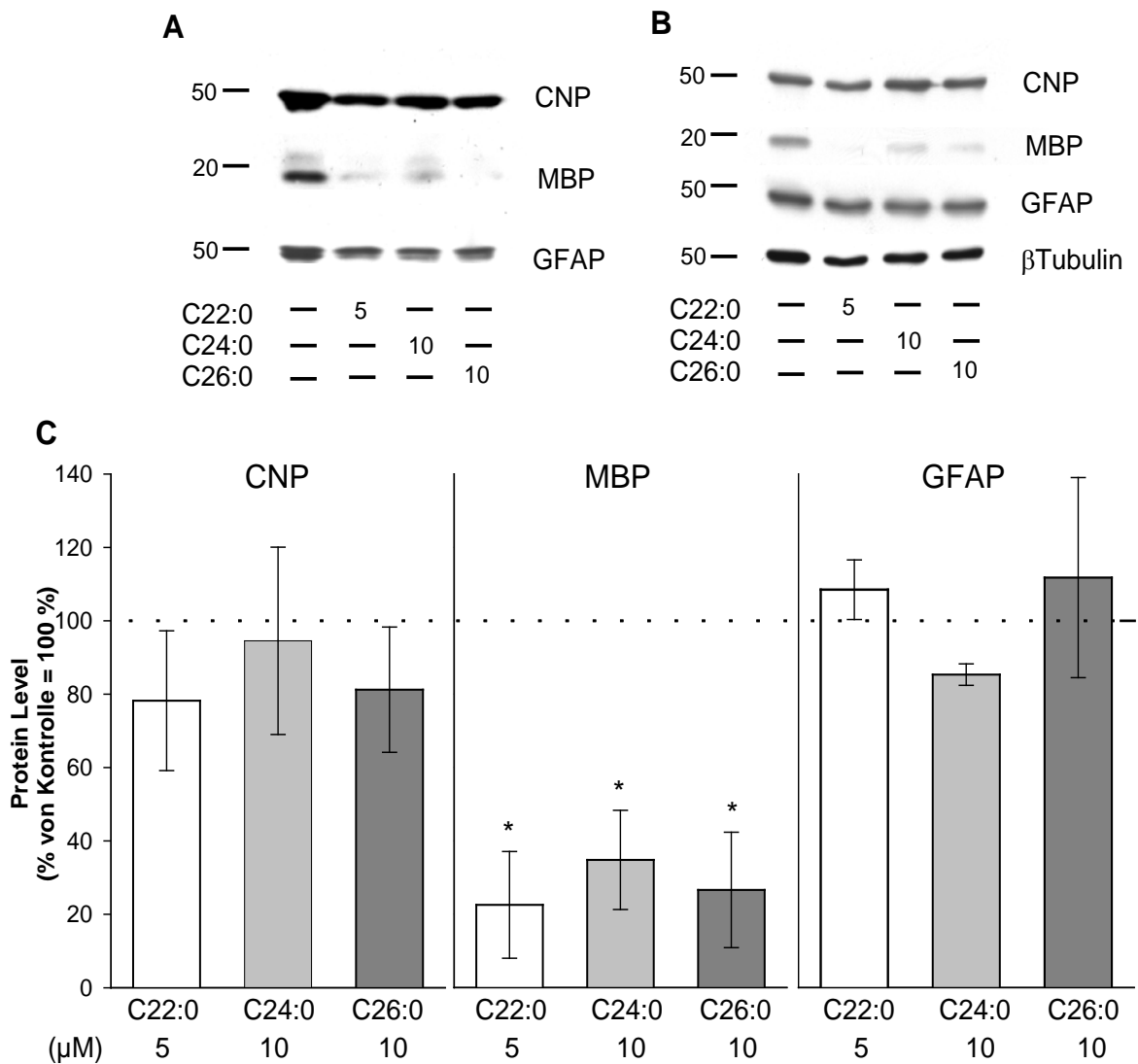


Abbildung 27: Proteinlevel von CNP und MBP in primären Oligodendrozyten.

Abb. 27: Western-Blot Analyse der Proteine: CNP, MBP (Isoform 18,5 kDa), GFAP und  $\beta$ -Tubulin. Primäre Oligodendrozyten wurden mit VLCFA (C22:0 5  $\mu$ M, C24:0 10  $\mu$ M, C26:0 10  $\mu$ M) für 14 Tage ab dem 7. Kulturtag behandelt. Das Zelllysate der stimulierten Zellen wurde subfraktioniert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunfärbung der Proteine: CNP, MBP, GFAP und  $\beta$ -Tubulin erfolgte nach der Wester-Blot und Stripping-Methode. Nach der Immunfärbung der Proteine wurden die Proteinbanden auf Fotopapier entwickelt. Die entwickelten Filme wurden densitometrisch durch einen GS-800 kalibrierten Densitometer (Bio-Rad) ausgewertet, indem die optische Dichte der Banden in einen entsprechenden Grauwert umgerechnet wurde. Der Proteinlevel wurde mit Hilfe des Programms Quantity One (Bio-Rad) bestimmt. Dabei dienten die Proteine GFAP und  $\beta$ -Tubulin als Referenzproteine, um eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Geltaschen zu überprüfen. (A) und (B) zeigen beispielhaft die Proteinbanden ohne und mit Stimulation. (C) Quantitative Analyse der Proteinbanden in Prozent bezogen auf den Proteinlevel unter Kontrollbedingungen ( $\alpha$ -Cyclodextrin 0,25 mg/ml). Die Daten sind als Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Präparationen dargestellt  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  VLCFA vs. Kontrolle

### 3.3 ABCD1-knockout Maus

Wie zuvor beschrieben, liegt die genetische Ursache der X-ALD wahrscheinlich in einer *loss of function* Mutation des ALD-Gens, was dann zu der pathologischen Anreicherung der VLCFA im Organismus führt (Aubourg et al., 1993). Die bereits in dieser Arbeit beschriebenen zellulären Schädigungen durch erhöhte extrazelluläre VLCFA-Konzentrationen sollten nun mit Hilfe von Untersuchungen an ALD-knockout Mäusen weiter untermauert werden. Die ALDP-knockout Mäuse (ABCD1  $-/-$ ) wurden von Dr. A. Pujol (Barcelona, Spanien) zur Verfügung gestellt. Daraufhin wurde eine institutseigene Zuchtkolonie angelegt.

Bei der Nachkommenschaft der ALDP-knockout Mäuse wurde der Gen-knockout mittels PCR überprüft. Nach der Isolation der genomischen DNA aus Maushirn (ALDP-knockout und Wildtyp) wurden zum einen die Primer Forward\_d und Reverse\_c verwendet, die außerhalb der  $neo^f$ -Kassette im Exon 2 binden. Zum anderen wurden die Primer Forward\_e und Reverse\_b verwendet, die innerhalb der  $neo^f$ -Kassette binden.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese nach Größe getrennt und sind in der Abb. 28 dargestellt.

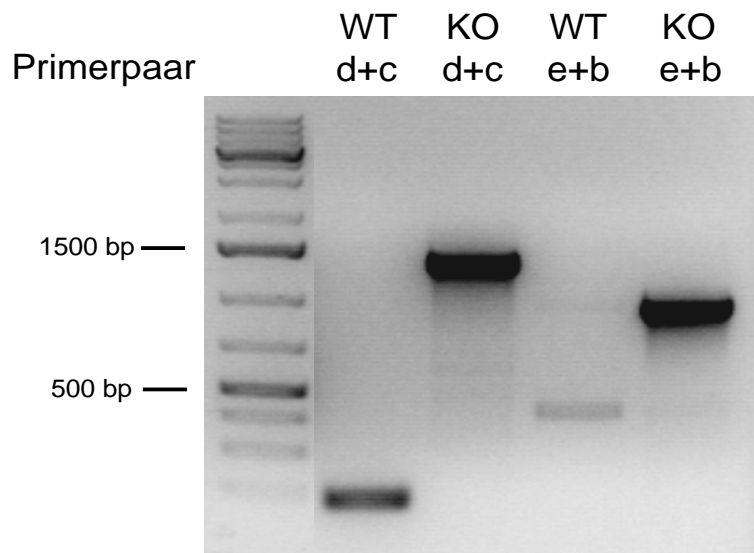


Abbildung 28: RT-PCR-Produkte der ABCD1-knockout Maus.

Auftrennung der RT-PCR-Produkte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Die genomische DNA wurde aus dem Gehirn von X-ALD-Mäusen und Wildtypmäusen gewonnen. Das Primerpaar d + c ergab in Knockout-Mäusen ein 1200 bp großes Produkt. Das Primerpaar e + b resultierte in einem 1000 bp großen Produkt, welches der  $neo^f$ -Kassette entsprach.

### 3.3.1 Einfluss von VLCFA-Applikation auf zellphysiologische Parameter in Zellen aus ALDP- Knockout-Maus

In Anlehnung an die Messung zellphysiologischer Parameter in primären Zellen des Rattenhirns wurden primäre Astrozyten aus der Maus (Wildtyp und Knockout-Maus) untersucht. Ziel der Experimente war ein Vergleich der Empfindlichkeit sowie die Vulnerabilität von Zellen mit und ohne funktionstüchtigem ALDP. Wie in dem vorhergehenden Ergebnisteil gezeigt, üben VLCFA eine starke Toxizität auf Gliazellen des Rattenhirns aus. Deshalb wurde nun untersucht, wie vulnerabel Astrozyten aus der ALDP-knockout Maus im Vergleich zu ihrem Gegenstück aus nichttransgenen Wurfgeschwistern für VLCFA sind. Astrozyten aus der ALDP-knockout und Wildtypmaus wurden für drei Tage mit VLCFA inkubiert (10  $\mu$ M – 40  $\mu$ M) und anschließend die Freisetzung des Enzyms LDH bestimmt (Abb. 29 A und B). Interessanterweise zeigte sich bei Astrozyten aus X-ALD Mäusen eine erhöhte toxische Wirkung der VLCFA im Vergleich zu Zellen aus Kontrolltieren. Die größten Unterschiede wurden mit der Fettsäure C24:0 (40  $\mu$ M) gefunden. 68,3% ( $\pm$  12,2) der Gesamt-LDH-Aktivität war nach dreitägiger Inkubation der X-ALD-Astrozyten mit C24:0 im Überstand detektierbar, dagegen nur 17,4% ( $\pm$  3,7) im Überstand von Wildtyp-Astrozyten. Ein ähnlicher Unterschied zwischen Wildtyp- und X-ALD-Astrozyten wurde für die Applikation von C22:0 und C26:0 beobachtet (C22:0: WT 38,1%  $\pm$  18,3, KO 64,8%  $\pm$  13,1; C26:0: WT 9,6%  $\pm$  2,2, KO 40,9%  $\pm$  23,9).



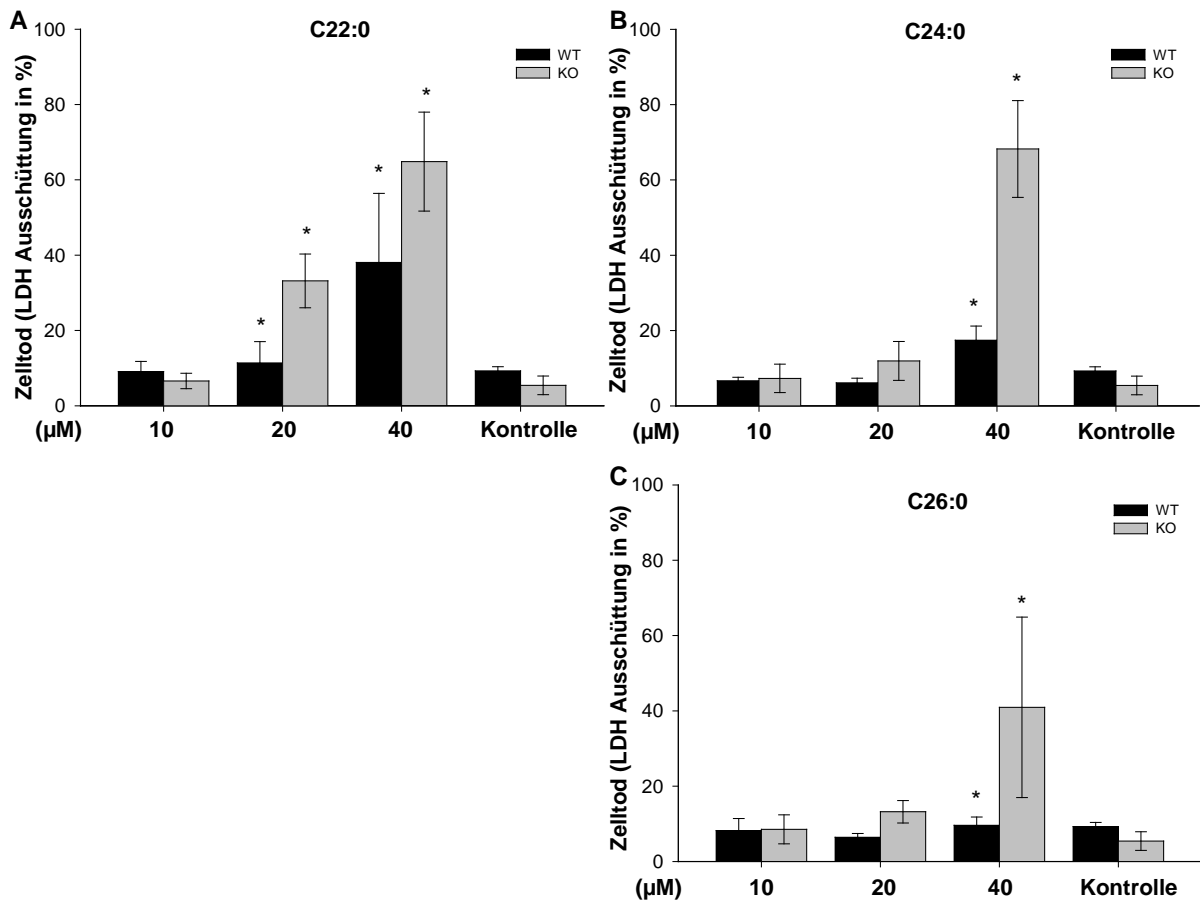


Abbildung 29: Toxische Wirkung von VLCFA auf Astrozyten aus Kontrollmäusen (WT) und ALDP-knockout Mäusen (KO).

Die primären Astrozyten wurden mit C22:0 (A), C24:0 (B), C26:0 (C) und  $\alpha$ -Cyclodextrin (1 mg/ml, Kontrolle) in der angegebenen Konzentration für 3 Tage versetzt. Anschließend wurde die LDH-Aktivität im Überstand als Prozent von der gesamten LDH-Aktivität (LDH-Gesamt) berechnet. Die Menge an LDH-Gesamt wurde errechnet durch Summierung der LDH-Aktivität aus dem Überstand und der LDH-Aktivität aus den verbleibenden, lysierten Zellen. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Präparationen, wobei eine Doppelbestimmung für jede Bedingung durchgeführt wurde. \*  $P < 0,05$  WT versus KO.

## 4 DISKUSSION

Die Akkumulation abnormal hoher Konzentrationen von VLCFA mit mehr als 22 Kohlenstoffatomen ist ein Merkmal verschiedener, zum Teil schwerer Erkrankungen die eine Ursache in Störungen im peroxisomalen Fettsäureabbau haben. Die häufigste aller peroxisomalen Erkrankungen ist die X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie (X-ALD). Diese Krankheit ist durch eine progressive, entzündliche Demyelinisierung der zerebralen weißen Substanz bei gleichzeitiger Nebenniereninsuffizienz gekennzeichnet. Der zugrunde liegende genetische Defekt ist eine Mutation des peroxisomalen Membranproteins ALDP (Moser, 1997, Dubois-Dalcq et al., 1999). Der zelluläre Mechanismus, der zu Demyelinisierung und Inflammation im Gehirn und peripheren Nervensystem der Patienten führt ist bis jetzt weitestgehend unverstanden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die zellulären und biochemischen Zusammenhänge näher beleuchtet werden.

### 4.1 Akute Wirkung von VLCFA

Für die Aufklärung des Schädigungsmechanismus durch VLCFA in Patienten mit einer Störung im peroxisomalen Fettsäureabbau wurden modellhaft primäre Zellen aus dem Gehirn von Ratten und Mäusen untersucht. Zunächst wurde eine mögliche akute, zellphysiologische Wirkung von VLCFA analysiert. Die Untersuchung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveaus stellte dabei eine grundlegende Methode dar, da für Zellen die Aufrechterhaltung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ein essentieller Prozess ist. Vor allem ein starker Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  kann zellschädigende Prozesse auslösen und somit einen pathologischen Zustand der Zelle anzeigen.

In dieser Arbeit wurde ein dramatischer Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveaus nach VLCFA-Applikation in Oligodendrozyten, den Myelin bildenden Zellen des Gehirns, verzeichnet. Auch in Neuronen und Astrozyten war eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$  Änderung (Abb. 30 (1)) zu messen, wobei der Gesamtanstieg etwas geringer als in Oligodendrozyten ausfiel. Einen Hinweis auf die Tragweite dieser VLCFA-induzierten Reaktion bietet der Vergleich mit dem Glutamat-induzierten Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ . Wie der Vergleich der Abb. 11 und Abb. 12 zeigt, wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase durch VLCFA in Hirnzellen ähnlich stark beeinträchtigt wie durch die neurotoxische Substanz Glutamat. Es ist seit langem bekannt, dass die Applikation von Glutamat in neuronalen Zellen Exzitotoxizität auslöst (Olney et al., 1986, Arundine and Tymianski, 2004, Butt, 2006, Kahlert et al., 2005b).

Eine wesentliche initiale zelluläre Reaktion auf das Glutamat ist eine starke Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Viele Arbeiten haben gezeigt, dass diese überhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort stark mit der induzierten Zellschädigung korreliert, da pathologische Kalziumkonzentrationen zytotoxische Reaktionen, wie eine Entkopplung der mitochondrialen Elektronentransportkette von der ATP-Synthese oder die Überaktivierung von zellschädigenden Enzymen wie Calpain oder Stickoxidsynthetase (NOS), anstoßen (Arundine and Tymianski, 2004).

Da die Höhe der VLCFA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort ähnlich groß wie die Glutamatreaktion war, kann die Induktion zellschädigender Prozesse vermutet werden. Es ist beim Vergleich beider Substanzen hinsichtlich des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  jedoch einzuwenden, dass die Auswirkungen auf die Zellen nicht nur von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängen, sondern auch von der Quelle des  $\text{Ca}^{2+}$  und von der intrazellulären Verteilung  $\text{Ca}^{2+}$ -bindender Effektoren (Bading et al., 1993). Wenn sich diese Faktoren voneinander unterscheiden, können trotz vergleichbarer intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unterschiedliche zelluläre Signalwege angeworfen werden, die auch verschiedene zelluläre Auswirkungen haben können. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der gegensätzliche Effekt der Aktivierung von synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren (NMDAR, (Hardingham et al., 2002)). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über synaptische NMDAR ist vornehmlich protektiv, während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über extrasynaptische NMDAR Zelltod auslöst. Diese Charakteristik der sogenannten „Quellenspezifität“ der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Zellschädigung kann natürlich auch für den VLCFA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zutreffen.

Alle nachfolgenden Experimente dieser Arbeit belegten eine Toxizität der VLCFA, womit der kausale Zusammenhang einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung und der dadurch ausgelösten Zellschädigung für die Applikation der VLCFA angenommen werden kann.

Im Folgenden wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Quelle, die für den Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  durch VLCFA verantwortlich ist, genauer untersucht. Mit Hilfe der Experimente unter kalziumfreien Bedingungen konnte gezeigt werden, dass der VLCFA-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verschiedene Quellen hat, wie den Extrazellulärraum (Abb. 30 (2)) oder intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrium, Abb. 30 (3) und (4)). Hierbei wurde ein zelltypspezifisches Verhalten offenkundig. In Neuronen war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch VLCFA unter kalziumfreien Bedingungen vollständig verschwunden. Es wurde geschlossen, dass die beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in Neuronen ausschließlich auf einen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zurückzuführen war.

Interessanterweise war die  $\text{Ca}^{2+}$ -Reaktion unter kalziumfreien Bedingungen sowohl in Oligodendrozyten als auch in Astrozyten nur leicht reduziert. Dies deutete darauf hin, dass in Oligodendrozyten und Astrozyten der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zum großen Teil aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern stammte und extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  nur eine untergeordnete Rolle spielte.

Ob sich die Mechanismen von Gliazellen und Neuronen bezüglich der Reaktion auf die VLCFA grundlegend unterscheiden, konnte experimentell nicht geklärt werden. Das Ausbleiben der Öffnung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher in Neuronen kann prinzipiell auf zweierlei Weise begründet werden. Entweder wird der VLCFA-Effekt in Neuronen über einen anderen Mechanismus und somit über eine andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Quelle als in den Gliazellen vermittelt oder die Schädigungsmechanismen sind in den Zelltypen gleich, auch wenn unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Quellen für das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal verantwortlich sind.

Es wurde jedoch schon von Kahlert et al. 2005 beschrieben, dass innerhalb einer neuronalen Co-Kultur, die für 5 min Glutamat in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ausgesetzt wurde, Astrozyten mit der Öffnung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher reagierten, Neurone dagegen nicht. Dieses analoge Verhalten der Neurone auf einen Glutamat- bzw. VLCFA-Reiz spricht dafür, dass intrazelluläre Speicher in Neuronen träger sind als in Gliazellen und sich seltener entleeren. Grundsätzlich sind aber intrazelluläre neuronale  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher aktivierbar und in vielen physio- und pathologischen Signalwegen eingebunden (Rizzuto, 2001).

Für die Vermittlung der VLCFA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wurde als Ergebnis dieser Arbeit ein Fettsäurerezeptor vorgeschlagen. Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor für freie Fettsäuren, GPR40, ein Orphan Rezeptor, der durch mittel- und langkettige, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren aktiviert werden kann (Briscoe et al., 2003, Stewart et al., 2006), wurde als möglicher VLCFA-Rezeptor analysiert. Dieser Rezeptor wurde in Primaten in verschiedenen Hirnregionen, vor allem aber in Astrozyten und Neuronen gefunden (Ma et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass GPR40 sowohl in Neuronen und Astrozyten als auch in Oligodendrozyten exprimiert wird. Daher ist es möglich, dass der Rezeptor GPR40 eine entscheidende Rolle im Mechanismus der VLCFA-Toxizität spielt (Abb. 30 (5)).

Ob eine tatsächliche Aktivierung des GPR40 durch VLCFA erfolgte, wurde innerhalb dieser Arbeit nicht gezeigt. Jedoch ist bereits gut belegt, dass eine Aktivierung von GPR40 durch langkettige Fettsäuren hauptsächlich die Phospholipase C aktiviert, die daraufhin eine Freisetzung von Diazylglyzerol und Inositoltrisphosphat mit anschließender Öffnung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher bewirkt (Abb. 30, Morgan and Dhayal, 2009).

Bisher wurde nicht untersucht, ob VLCFA die gleiche Signalkaskade über die Aktivierung des GPR40 initiieren. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings eine eindeutige Beteiligung der PLC und des  $\text{InsP}_3$ -Rezeptors in Gliazellen beim VLCFA-Effekt beobachtet (Abb. 30 (6)), was eine vorausgegangene Aktivierung des GPR40 vermuten lässt. Aufbauend auf dieser Vermutung, muss postuliert werden, dass der GPR40 in Neuronen und Gliazellen zwar gleichermaßen exprimiert wird, aber anscheinend andere Effektoren aktiviert. Hier könnte der Grund liegen, warum es in Neuronen zu einem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  kommt, hingegen in Gliazellen intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher geöffnet werden.

Neben einer rezeptorvermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort über GPR40 ist auch ein unspezifischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Membran der Zelle oder einzelner Zellorganellen denkbar. Es ist bisher nicht beschrieben inwieweit VLCFA direkt oder indirekt zellmembranständige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle öffnen können, was einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle zur Folge hätte. Jedoch wurde im Rahmen einer Studie von Ho et al. 1995 mit Hilfe einer Modellzellmembran aus Phospholipiden eine hohe Affinität der C26:0 Fettsäure beschrieben in Membranen zu interkalieren (Ho et al., 1995). C26:0 zeichnet sich durch eine spezifische störende Wirkung auf die Membranintegrität aus, die so bei anderen Fettsäuren nicht beobachtet werden konnte. Darüber hinaus war die Dissoziation dieser Fettsäure aus der Modellmembran heraus deutlich verlangsamt, was den störenden Effekt auf Membranen noch verstärkt. Es ist daher denkbar, dass diese Inkorporation von VLCFA auch in Zellmembranen stattfindet, was dann jene Strukturen destabilisieren würde. Dieser Effekt könnte zu einem unspezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch die gestörte Membran in die Zelle führen (Abb. 30 (7)). Wie bereits in dieser Arbeit postuliert wurde, ist die beobachtete Deregulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verantwortlich für die Vermittlung der zellschädigenden Wirkung der VLCFA. Eine Störung der mitochondrialen Funktion stellt ebenfalls einen zentralen Schädigungsmechanismus im Zusammenhang vieler pathologischer Prozesse dar (Krieger and Duchon, 2002).

In einer weiteren Analyse sollte daher herausgefunden werden, ob neben überhöhter intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auch eine mitochondriale Fehlfunktion im Schädigungsmechanismus von VLCFA eine Rolle spielt.

Intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  gelangt in die Mitochondrien über einen hoch selektiven Kaliumuniporter (Kirichok et al., 2004). Die treibende Kraft dafür ist das stark negative Membranpotential von  $-180$  mV. Somit steht das mitochondriale Membranpotential im direkten Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der homöostatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma. Eine pathologische Überladung der Zelle mit  $\text{Ca}^{2+}$  induziert wiederum auch eine übermäßige Anreicherung von  $\text{Ca}^{2+}$  in den Mitochondrien. Dadurch interagiert  $\text{Ca}^{2+}$  in der mitochondrialen Matrix mit Cyclophilin D, was die PTP öffnet. Dies bewirkt einen Abfall des Membranpotentials und eine ungehinderte Anreicherung von gelösten Stoffen im Mitochondrium. Folglich diffundiert Wasser verstärkt ein und das Mitochondrium schwillt. Dies schädigt die äußere mitochondriale Membran und somit die Funktion des gesamten Organells (Hajnóczky et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduzierung des mitochondrialen Potentials durch VLCFA an isolierten Mitochondrien sowie an *in situ* untersuchten Mitochondrien von kultivierten Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen beobachtet werden (Abb. 30 (8)). Es kann geschlussfolgert werden, dass VLCFA eine zerstörende Wirkung auf die innere mitochondriale Membran haben. Darüber hinaus sensibilisieren VLCFA Mitochondrien für die Öffnung der PTP. In ähnlicher Weise wurde eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Kombination mit einer funktionellen Beeinträchtigung von Mitochondrien bereits für die toxische verzweigtkettige Fettsäure Phytansäure nachgewiesen (Kahlert et al., 2005a, Reiser et al., 2006, Schönfeld et al., 2006, Schönfeld and Reiser, 2008). Diesbezüglich scheinen verschiedene toxische Fettsäuren analoge Schädigungsmechanismen auszulösen.

Eine Folge der gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase sowie der mitochondrialen Fehlfunktionen ist häufig eine übermäßige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die Störung der mitochondrialen Funktion durch die Überladung mit  $\text{Ca}^{2+}$  kann unter Umständen eine Entkopplung der Atmungskette bewirken, womit durch den unterbrochenen Elektronentransport vermehrt Sauerstoffradikale gebildet werden. Die Bildung von ROS stellt ein Merkmal vieler neurodegenerativer Krankheiten dar. So spielen zum Beispiel freie Radikale eine wichtige Rolle im Verlauf der Parkinsonschen Krankheit, Alzheimer Erkrankung, des Schlaganfalls und der Multiplen Sklerose (Reznick and Packer, 1993). Auch im Krankheitsverlauf von X-ALD scheinen ROS kritisch beteiligt zu sein (Powers et al., 2005, Al-Omar, 2006, Di Biase et al., 2004, Fourcade et al., 2008, Uto et al., 2008, Singh and Pujol, 2010). Es gibt sogar einen neuen Therapieansatz mit Valproat, in dem gezeigt wurde dass Valproat die oxidative Schädigungen in X-ALD Patienten und im Mausmodell verbessern kann (Fourcade et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde keine Erhöhte ROS-Produktion durch VLCFA in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten gefunden. Die fehlende Stimulation der ROS-Produktion durch VLCFA steht jedoch im Gegensatz zu Untersuchungen anderer toxischer Fettsäuren, wo eine Generierung reaktiven Sauerstoffs durch Inhibierung des Elektronentransportes in der Atmungskette beschrieben wurde (Schönfeld et al., 2006, Schönfeld and Wojtczak, 2007, Cocco et al., 1999). Diese Beobachtungen weisen auf einen distinkten Schädigungsmechanismus der VLCFA im Vergleich zu kürzeren Fettsäuren hin. Wie sind die Daten dieser Arbeit aber mit dem gut belegten Sauerstoffstress im Gehirn der X-ALD Patienten (Powers et al., 2005) zu vereinen? Es ist zu betonen, dass ein für die Vermittlung inflammatorischer pathologischer Prozesse wichtiger Zelltyp in dieser Arbeit nicht speziell untersucht wurde. Mikrogliazellen repräsentieren das Immunsystem des Gehirns. Unter bestimmten Umständen können Mikroglia überaktiviert werden, was eine Ausschüttung von ROS zur Folge hat und das umliegende Gewebe schädigt (Block et al., 2007). So könnten Mikrogliazellen die hauptsächliche Quelle von ROS im VLCFA geschädigten Gehirn sein. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass isolierte Makrophagen auf eine Anreicherung von VLCFA mit einer erhöhten Ausschüttung von ROS reagieren (Yanagisawa et al., 2008). Bei der Analyse der Mitochondrien des Gesamthirns, wo keine vermehrte ROS-Produktion gefunden wurde, spielten Mikroglia/Makrophagen nur eine untergeordnete Rolle, da sie mit etwas 10% nur geringen Anteil der Hirnzellen ausmachen. In weiterführenden Experimenten könnten Mitochondrien aus isolierten Mikroglia auf die VLCFA induzierte ROS-Ausschüttung untersucht werden.

Die Abb. 30 fasst die oben beschriebenen Ergebnisse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Experimente und der Experimente an Mitochondrien in Hirnzellen der Ratte anschaulich zusammen.

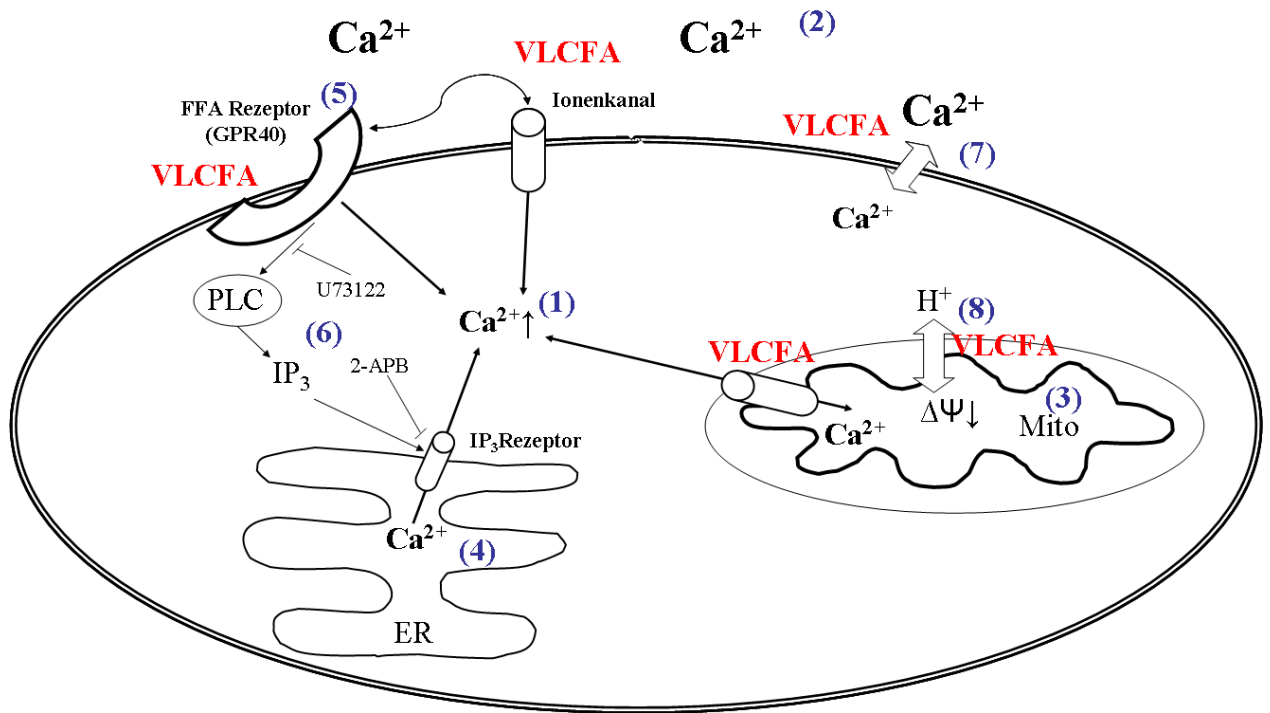


Abbildung 30: Wirkung von VLCFA in primären Gehirnzellen

VLCFA führt zu einer Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  (1) durch Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  (2) und Öffnen von intrazellulären Speichern (3, 4). VLCFA aktivieren einen Membranrezeptor für freie Fettsäuren, möglicherweise den GPR40 (5). Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor aktiviert PLC (6), was über die Freisetzung von  $\text{IP}_3$  intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher öffnet. Darüber hinaus bewirkt VLCFA über die direkte oder indirekte Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und/oder die Destabilisierung der Zellmembran (7) einen direkten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum. Des Weiteren wirken VLCFA schädigend auf Mitochondrien ein, indem sie das mitochondriale Membranpotential reduzieren (8) und sie für Permeabilitäts Transition sensibilisieren. VLCFA bewirken dabei keine gesteigerte Produktion von ROS.



## 4.2 Langzeitwirkung von VLCFA

Die zuvor beschriebenen akuten Effekte der VLCFA auf Zellen des zentralen Nervensystems warfen die Frage auf, inwieweit diese persistente, pathologische Veränderungen oder anhaltende Schädigungen auslösen können. Für die Untersuchung wurden erneut Zellen aus dem Rattenhirn kultiviert, chronisch mit VLCFA behandelt und zelltypspezifisch analysiert.

Als Erstes wurde die Zytotoxizität von VLCFA auf Gliazellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass C22:0, C24:0 und C26:0 innerhalb von 24 Stunden Zelltod induzieren. Dabei offenbarte sich eine höhere Zelltodrate der Oligodendrozyten, was auf eine höhere Vulnerabilität hinwies. Anscheinend spiegelte dieser *in vitro* Versuch Aspekte der *in vivo* Situation der X-ALD Patienten wieder, denn in den Gehirnen der Betroffenen wird vor allem ein Verlust von Oligodendrozyten und deren Produkt, dem Myelin, beobachtet (siehe Übersichtsarbeiten (Aubourg, 1999, Aubourg and Dubois-Dalcq, 2000, Dubois-Dalcq et al., 1999, Powers et al., 1992).

Neben der Demyelinisierung, die wahrscheinlich mit einer Beeinträchtigung der Oligodendrozyten zusammenhängt, wurde in X-ALD Patienten auch eine Aktivierung von Astrozyten beschrieben. Diese Beobachtung lässt auf eine anhaltende pathologische Zustandsänderung der Gliazellen durch VLCFA-Akkumulation schließen. Es ist bekannt, dass eine Astroglieose allein dadurch schädigend wirkt, indem die unterstützende Funktion der Astrozyten, zum Beispiel die Aufnahme von Glutamat aus dem Extrazellulärraum oder die Versorgung von Neuronen mit Energieäquivalenzen reduziert ist (Frederickson, 1992). Darüber hinaus schütten aktivierte Astrozyten unter anderem proinflammatorische Zytokine aus, die zusätzlich ihre benachbarten Zellen beeinträchtigen und inflammatorische Demyelinisierung auslösen können (Powers et al., 1992).

Zelltod und Inflammation scheinen auch im akuten Verlauf der X-ALD eine duale Rolle zu spielen (Dubois-Dalcq et al., 1999, Eichler et al., 2008, Semmler et al., 2008, Powers and Moser, 1998, Gilg et al., 2000, Powers et al., 2005, Aubourg and Dubois-Dalcq, 2000, Singh and Pujol, 2010). Daher wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen VLCFA-Akkumulation und Zytokinausschüttung in Astrozyten untersucht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine deutliche Stimulation der Expression von GRO/CINC-1 sowie IL-6 durch VLCFA in Astrozyten. Diese Ergebnisse wurden durch Analysen der mRNA genannter Zytokine mittels RT-PCR, real-time PCR als auch mittels spezifischen Zytokin-ELISA gestützt. Folglich sind VLCFA in der Lage, in Astrozyten die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine GRO/CINC-1 und IL-6 zu induzieren.

Dies steht im Einklang mit der beobachteten Entzündungsreaktion im Krankheitsverlauf der X-ALD, vor allem der juvenilen X-ALD. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit keine Stimulation der TNF- $\alpha$  Expression nachgewiesen werden, was im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Labore steht, die eine gesteigerte Expression des Zytokins TNF- $\alpha$  in geschädigten Bereichen des Gehirns, im speziellen in Astrozyten, gefunden haben (Pahan et al., 1998, Powers et al., 1992, Yanagisawa et al., 2008). In diesen Studien wurde allerdings kein direkter Zusammenhang zwischen der VLCFA-Akkumulation und Zytokinausschüttung analysiert. Es ist daher möglich, dass die gefundene erhöhte TNF- $\alpha$  Expression in X-ALD Patienten nur eine sekundäre Auswirkung der erhöhten VLCFA-Konzentration ist. Die Freisetzung von GRO/CINC-1 und IL-6 aus Astrozyten könnte eine TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus benachbarten Gliazellen und/oder Neuronen anstoßen.

Wie bereits erwähnt, wurde eine Beteiligung von ROS beim Verlauf der X-ALD von einigen Arbeitsgruppen postuliert. Zur Analyse der chronischen Wirkung von VLCFA wurde die zu erwartende chronische ROS-Ausschüttung mit Hilfe der Messung gesteigerter Lipidperoxidation gemessen. Lipidperoxidation ist ein autokatalytischer Prozess, der durch ROS ausgelöst wird und demzufolge in Zellen stattfindet, die unter Sauerstoffstress stehen. Die Peroxidation von Lipiden, vor allem mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA), kann die Membranstruktur zerstören, metabolische Prozesse inhibieren und den Transport von Ionen verändern. Die Schädigung der Mitochondrien durch Lipidperoxidation führt wiederum zur Bildung weiterer ROS (Miyaguchi et al., 2004, Cejas et al., 2004). Die Peroxidation von PUFA initiiert die Bildung von hochreaktiven Lipidaldehyden, unter anderem des ungesättigten Aldehyd 4-Hydroxy-trans-2-nonenal (HNE). Solche Lipidaldehyde binden durch eine Reaktion mit Thiolgruppen kovalent an Proteine und verändern dadurch deren Funktion. HNE wird für viele zytotoxische Effekte, die während oxidativem Stress beobachtet wurden, verantwortlich gemacht (Muralikrishna Adibhatla and Hatcher, 2006). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass eine chronische VLCFA-Applikation keine deutliche Erhöhung der HNE-Produkte auslöst. Folglich wurde, wie bereits schon nach Kurzzeitapplikation beobachtet, auch durch Langzeitapplikation von VLCFA keine nennenswerte Ausschüttung von ROS gefunden.

Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben wurde, löst die akute Applikation von VLCFA eine Störung des mitochondrialen Membranpotentials sowohl in lebenden Zellen als auch in isolierten Mitochondrien aus. Diese Befunde warfen die Frage auf, ob VLCFA das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) dauerhaft schädigen können oder ob es sich um einen kurzzeitigen Effekt handelt, der von der betroffenen Zelle schnell kompensiert werden kann. Aus diesem Grund wurden Hirnzellen in Anwesenheit von VLCFA kultiviert und die Auswirkung auf das mitochondriale Potential nach 14 Tagen analysiert. Die Untersuchung zeigte eine deutliche Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials in den drei Zelltypen. Es ist wahrscheinlich, dass diese dauerhafte Verminderung von  $\Delta\Psi$  zu einer zellulären energetischen Depression und somit zu einer nachhaltigen Störung der Zellphysiologie führt (Seppet et al., 2009). Somit kann vermutet werden, dass zellphysiologische Fehlfunktionen und sogar Zelltod in X-ALD-Patienten zu einem erheblichen Teil auf einer Funktionsstörung der Mitochondrien beruhen.

Diese Ergebnisse ergänzen die durch andere Studien belegten Veränderungen der mitochondrialen Struktur und Funktion. So wurden im Mausmodell des Zellweger Syndroms sowie in betroffenen Patienten Veränderungen der mitochondrialen Ultrastruktur und Änderungen in der Expression und Aktivität der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe festgestellt (Baumgart et al., 2001, Goldfischer et al., 1973). Auch in X-ALD Patienten wurde eine kritische Beteiligung von mitochondrialen Fehlfunktionen diskutiert (McGuinness et al., 2003, Oezen et al., 2005) und in einem Mausmodell (ABCD2-knockout), welches hohe VLCFA-Konzentrationen aufweist, bereits beschrieben (Ferrer et al., 2005).

Ein für die *in vitro* Modellierung der X-ALD-Erkrankung kritischer Punkt ist die Reproduktion der Funktionsstörung der Myelinbildenden Oligodendrozyten durch VLCFA, da sowohl der Tod dieser Zellen als auch die Demyelinisierung des Gewebes im Gehirn von Betroffenen beobachtet wurde. Auch in dieser Arbeit wurde eine Störung der Oligodendrozyten untersucht. Hier zeigte sich eine deutliche Beeinträchtigung der Entwicklung zu reifen, MBP-exprimierenden Oligodendrozyten. Die Inkubation mit VLCFA über 14 Tage führte zu einem deutlichen Rückgang der MBP-exprimierenden Oligodendrozyten. Außerdem wurden eine Reduktion der MBP-Menge und eine veränderte Lokalisation festgestellt. Dies zeigte deutlich, dass Langzeitinkubation mit VLCFA zu einer gestörten Expression von MBP führt, was die Myelinisierung im ZNS negativ beeinflussen kann.

Möglicherweise beeinflussen VLCFA Oligodendrozyten neben den bereits beschriebenen zellphysiopathologischen Effekten dadurch, dass die sehr langkettigen Fettsäuren auch direkt das Myelin verändern.

Es wurde gezeigt, dass das Hauptmyelinprotein Proteolipid Protein (PLP) in X-ALD Patienten abnormal mit VLCFA acyliert ist (Übersichtsarbeit Aubourg, Dubois-Dalcq 2000). Aktuell gibt es Hinweise darauf, dass das Stoppen der Demyelinisierung durch insulinähnliche Wachstumsfaktoren (*Insuline-like growth factor*, IGF) und Neurotrophin-3 in einem Mausmodell einen möglichen Therapieansatz für X-ALD Patienten darstellt (Mastroeni et al., 2009).

Die Ergebnisse der Wirkung von VLCFA auf Hirnzellen der Ratte sind zusammenfassend in der Abb. 31 dargestellt.

Insgesamt reproduziert der *in vitro* Ansatz, kultivierte Primärkulturen langfristig mit VLCFA zu behandeln, charakteristische Merkmale der X-ALD Erkrankung, womit dieses Modell geeignet ist, um die Krankheit zu untersuchen und therapeutische Strategien zu entwickeln.

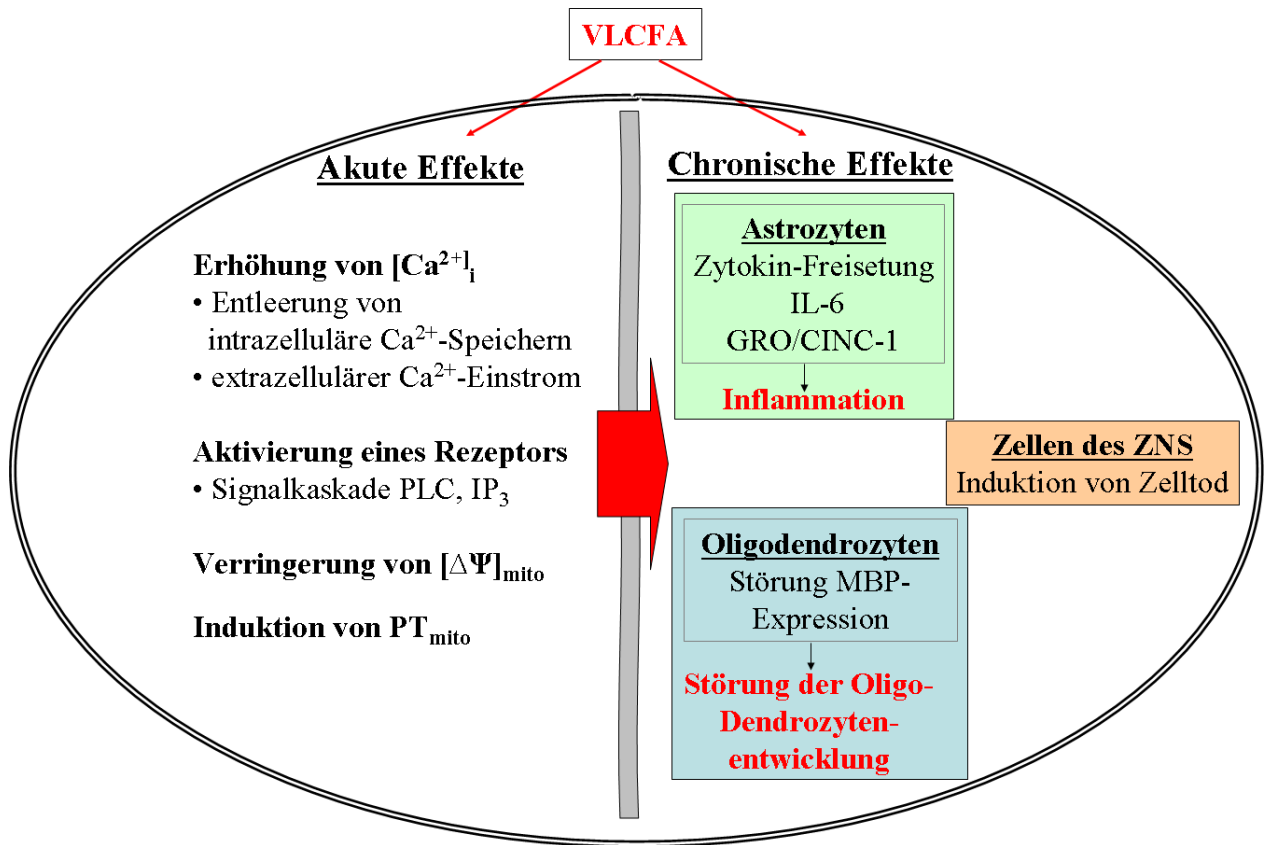


Abbildung 31: Zusammenfassende Übersicht der Wirkung von VLCFA auf Hirnzellen.

Dargestellt sind die komplexen Auswirkungen von VLCFA auf Zellen des Gehirns. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl akute Effekte als auch chronische Effekte beobachtet. Zum einen bewirkten die drei untersuchten Fettsäuren eine starke Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Als Ursache dafür wurde die Aktivierung eines Rezeptors (GPR40) und einer intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Signalkaskade gefunden (PLC,  $IP_3$ ). In diesem Zusammenhang verringerte sich das mitochondriale Potential deutlich ( $[\Delta\Psi]_{mito}$ ). Die Mitochondrien zeigten eine VLCFA-vermittelte Permeabilitäts Transition ( $PT_{mito}$ ). Zum Anderen bewirkten die VLCFA dauerhafte toxische Veränderungen in Hirnzellen. Durch die chronische Exposition der Zellen mit VLCFA folgten aus den akuten Effekten dauerhafte Veränderungen der Zellen, die nicht zuletzt in Inflammation und Zelltod münden. Astrozyten schütten unter dem Einfluss von VLCFA Zytokine aus, die dann ihrerseits eine Entzündung in den umliegenden Zellen und Geweben verursachen. Die Myelinbildenden Zellen werden durch VLCFA empfindlich in ihrer Entwicklung gestört und reduzieren drastisch die Bildung des für die Myelinschicht wichtigen Protein MBP.

### 4.3 X-ALD Knockout Maus-Modelle

Die Ergebnisse der externen Applikation von VLCFA auf primäre Zellen des Rattenhirns sollten mit Hilfe eines Knockout-Mausmodell, das durch die Expression einer funktionsunfähigen Form des ALDP (ABCD1-knockout) entscheidende Merkmale der X-ALD Erkrankung ausprägt, untermauert werden. Verschiedene Arbeitsgruppen etablierten 1997 dieses X-ALD-Mausmodell durch Gentergeting (Lu et al., 1997). Der Funktionsverlust des ALDP wird erreicht, indem das ABCD1 Gen durch eine Neomycin-Resistenzkassette ( $neo^r$ ) unterbrochen wird, die durch homologe Rekombination in das Exon 2 eingebracht ist. (Abb. 32). (Lu et al., 1997, Kobayashi et al., 1997, Forss-Petter et al., 1997).

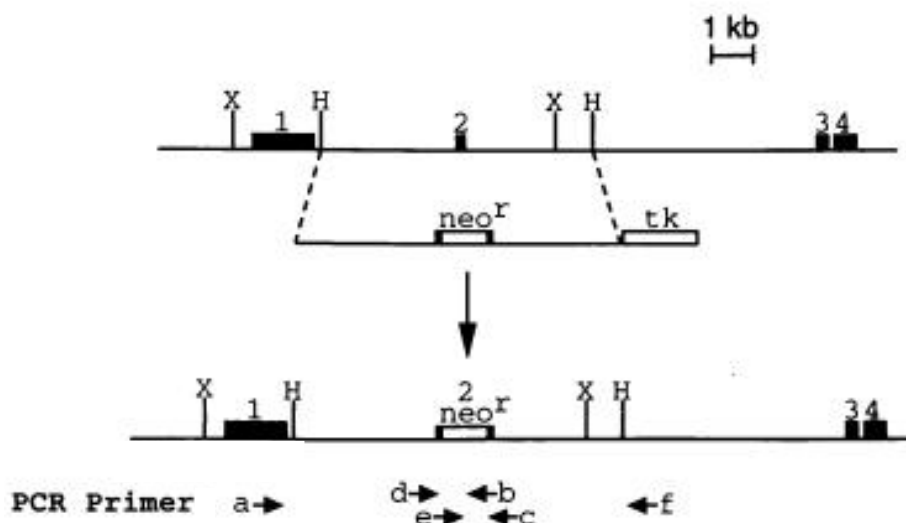


Abbildung 32: Unterbrechung des X-ALD Gens in der Maus (Lu et al., 1997).

Genomische Struktur des Maus X-ALD Gens von Exon 1 bis 4. Gene Targeting des X-ALD Gens mit Hilfe eines Austauschvektors ( $neo^r$ ), der die Region zwischen den gestrichelten Linien abdeckt. Nach homologer Rekombination führt dann die  $neo^r$ -Kassette zur Unterbrechung des Exons 2 und damit zum Funktionsverlust des daraus resultierenden ALDP.

Im Gehirn der ALD-Maus ist ein um das 5-fache erhöhter C26:0 Spiegel zu finden und auch in anderen Organen, wie der Lunge oder den Nieren sind stark erhöhte Werte für C26:0 nachweisbar. Die Aktivität der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation ist im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf 35-50% reduziert. Überraschenderweise kann die Maus den Verlust des ALD-Proteins bis zum mittleren Alter (etwa 14 Monate) symptomatisch kompensieren, was anhand des Ausbleibens eines krankhaften Phänotyps oder fehlenden Anzeichen von Inflammation, wie sie für X-ALD Patienten typisch sind, offensichtlich wird (Forss-Petter et al., 1997, Kobayashi et al., 1997, Lu et al., 1997, Kemp et al., 2011, Pujol et al., 2002).

Ab dem 15. Lebensmonat entwickeln ältere ABCD1-knockout Mäuse signifikante neurologische Störungen und Verhaltensauffälligkeiten. Diese sind von einem neurodegenerativen Phänotyp mit Axonopathie im Rückenmark und peripheren Nerven begleitet (Pujol et al., 2004, Pujol et al., 2002). Darüber hinaus wurden in den ALDP-knockout Mäusen Beeinträchtigungen der Mitochondrien, des Golgiapparates und des Endoplasmatischen Retikulums sowie eine gestörte Kommunikation zwischen den einzelnen Organellen gefunden (McGuinness et al., 2003). Die Akkumulation von VLCFA in Makrophagen scheint entscheidend zum inflammatorischen Prozess der X-ALD Krankheit beizutragen. So führte die Stimulation von ALDP-knockout Makrophagen mit Lipopolysacchariden (LPS) zu einer deutlich stärkeren Erhöhung von NO als in Makrophagen von Wildtypmäusen, was auf eine gesteigerte oxidative Reaktion hinweist (Yanagisawa et al., 2008).

Ähnlich den Beobachtungen von Yanagisawa et al. konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nur eine indirekt schädigende Wirkung des ALDP-knockouts auf Zellen nachgewiesen werden. Während die intrazelluläre Kalzium-Antwort in primären Astrozyten der Knockout-Maus vor und nach Applikation von VLCFA unauffällig blieb, wurde eine erhöhte Vulnerabilität selbiger Zellen nach dreitägiger VLCFA-Exponierung festgestellt. Anscheinend sensibilisiert die erhöhte C26:0-Konzentration innerhalb des Gehirns der Maus die glialen Zellen gegenüber einem weiteren schädigenden VLCFA-Reiz.

Doch warum ist die ALPD knockout bedingte C26:0-Erhöhung unzureichend für die Auslösung eines Zelltodes und erst die zusätzliche Applikation von VLCFA hinreichend, um Zelltod zu initiieren? Experimente an dieser Maus weisen darauf hin, dass die Akkumulation von VLCFA allein keine Fehlfunktionen der Mitochondrien auslöst (Oezen et al., 2005). Eine Erhöhung des C26:0/C22:0-Quotienten in Hirnmitochondrien um das 4-Fache führte zu keiner Beeinträchtigung der Schlüsselenzyme der Atmungskette.

Die Funktionsanalyse von ALDP und dem verwandten ALDRP offenbarte überlappende Bereiche. So führte die Überexpression oder Hochregulation von ALDRP sowohl in X-ALD-Fibroblasten als auch im ALD-Mausmodell zu einer deutlichen Verbesserung der gestörten peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation und zu einer Verringerung der hohen VLCFA-Konzentration (Kemp et al., 1998, Netik et al., 1999, Pujol et al., 2004, Weinhofer et al., 2002, Fourcade et al., 2009).

Andere Gruppen haben aufgezeigt, dass das ABCD2 Gen (welches das ALDRP verschlüsselt) in Nagern und menschlichen Zellen durch 3,5,3-Trijodthyronin Hormon ( $T_3$ ) aktivierbar ist. Die Aktivierung des Thyroidrezeptors durch  $T_3$  kann die ABCD2-Expression induzieren und dadurch den VLCFA-Level verbessern (Fourcade et al., 2003). Solche kompensatorischen Prozesse könnten in der hier verwendeten X-ALD Maus stattgefunden und dazu geführt haben, dass VLCFA zwar deutlich erhöht war, aber dennoch im subletalen Bereich lag.

Analog dazu, führt die Inaktivierung von ALDRP (ABCD2  $-/-$ ) bei Mäusen bis zum 6. Lebensmonat zu keiner Beeinflussung des normalen VLCFA-Levels im zentralen und peripheren Nervensystem (Pujol et al., 2004) und beeinträchtigt auch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation nicht. In diesem Modell kann eine kompensatorische Funktion des ALDP vermutet werden.

Zur Verbesserung des X-ALD Mausmodells und Intensivierung des Maus Phänotyps, müssten entweder beide Gene ausgeschaltet werden oder durch gezielter Eingriffe die X-ALD Krankheit besser nachgeahmt werden. Tatsächlich wurden bereits Doppelknockout Mäuse entwickelt, die neben ALDP auch ein funktionsunfähiges ALDRP (ABCD2) aufweisen (Ferrer et al., 2005). Diese Doppelknockout Mäuse zeigen einen deutlich früheren und schwereren Ausbruch der Krankheit sowie eine signifikant höhere VLCFA-Konzentration als ABCD1-knockout Tiere.

Des Weiteren wurde ein Mausmodell entwickelt, in dem selektiv das Peroxin-5 (Pex5) Gen in Oligodendrozyten inaktiviert wurde (Kassmann et al., 2007). Pex5 ist ein zytosolischer Rezeptor, der essentiell für den Import von Proteinen in die peroxisomale Matrix ist. Die Pex5 knockout Maus zeigt zwar vergleichbar hohe VLCFA-Konzentrationen wie die ABCD1-knockout Maus, aber sie entwickelt eine ausgeprägte Inflammation und Demyelinisierung (siehe Übersichtsarbeit (Semmler et al., 2008).



## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

### Zusammenfassung

X-ALD ist eine schwerwiegende, neurodegenerative X-chromosomal vererbte Erkrankung, die mit einer stark erhöhten Konzentration von sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA, *very long chain fatty acids*) im Plasma und Geweben einhergeht. Da die VLCFA offensichtlich eine schädigende Wirkung auf das zentrale Nervensystem ausüben, wurden in dieser Arbeit grundlegende Aspekte der direkten pathophysiologischen Schädigungsmechanismen von VLCFA in Neuronen, Astroglia und Oligodendrozyten untersucht. Es zeigte sich, dass die drei Fettsäuren C22:0, C24:0 und C26:0 in ähnlicher Weise kurz- und langfristige Effekte auf die genannten Zellen ausüben. Kurzfristig führen VLCFA zu einem erheblichen Konzentrationsanstieg von intrazellulärem Kalzium. Als Quelle konnte das Öffnen von intrazellulären Kalziumspeichern in Astrozyten und Oligodendrozyten ermittelt werden. Dagegen war in Neuronen die Quelle für den Kalziumanstieg der extrazelluläre Raum. Interessanterweise könnte dabei der Fettsäurerezeptor GPR40 wesentlich beteiligt sein. In den drei untersuchten Hirnzellentypen wurde sowohl die Expression von GPR40 als auch die Beteiligung der Phospholipase C (PLC) und des intrazellulären Botenstoffes Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) am Kalziumsignal nachgewiesen. Es ist zu erwarten, dass aufgrund der gestörten Kalziumhomöostase Mitochondrien durch VLCFA geschädigt werden. Letzteres machte sich durch ein verringertes mitochondriales Potential bemerkbar. Die Verringerung des mitochondrialen Potentials war auch nach Langzeitapplikation der VLCFA zu finden und zeigte eine anhaltende mitochondriale Funktionsstörung an, welche wahrscheinlich die betroffenen Zellen in eine energetische Schädigung und letzten Endes in den Zelltod trieb. Subletale VLCFA-Konzentration bewirkten langfristig in Astrozyten die Expression und Ausschüttung von Zytokinen, sowie in Oligodendrozyten einen Rückgang und Delokalisation des basischen Myelinproteins. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass VLCFA direkt die Struktur des Myelins stören und Inflammation auslösen. Mit Hilfe von ABCD1-knockout Mäusen, einem X-ALD Mausmodell, wurde die zellschädigende Wirkung von VLCFA bestätigt.

Da viele zelluläre Reaktionen innerhalb unserer *in vitro* Studie Beobachtungen in X-ALD-Patienten entsprechen, kann man schlussfolgern, dass bedeutende zelluläre Schädigungsmechanismen der X-ALD aufgeklärt wurden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse können nun pharmakologische Interventionen, wie eventuell die Blockade des GPR 40, in Hinblick auf eine Behandlungsstrategie der X-ALD getestet werden.

### Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a severe hereditary neurodegenerative disease, which is accompanied by a strongly increased plasma concentration of very long chain fatty acids (VLCFA). As VLCFA likely impair the central nervous system, that work focused on the investigation of detrimental patho-physiological mechanism and effects of VLCFA on neurons, astrocytes and oligodendrocytes. The three fatty acids C22:0, C24:0 and C26:0 equally affected the respective cells during short-term and long-term periods. Application of VLCFA caused a rapid increase of intracellular calcium level. In astrocytes and oligodendrocytes the calcium was of intracellular origin. In contrast, influx of extra-cellular calcium was the source in neurons. Interestingly, the activation of the free fatty acid receptor GPR40 was found out to be crucial. The GPR40 expression as well as the involvement of the second messenger PLC and IP<sub>3</sub> in the calcium signal was confirmed in the three investigated brain cell types. Probably, that disrupted calcium homeostasis led to impairment of mitochondrial function, indicated by a decreased mitochondrial membrane potential. The diminished mitochondrial membrane potential was also observed during long-term application of VLCFA, indicating a persistent dysfunction of mitochondria, which likely induces cellular energy depression and, consequently, cell death. Application of sublethal VLCFA concentration caused release of proinflammatory cytokines from astrocytes as well as a decrease and translocation of the myelin basic protein in oligodendrocytes. This provides the first evidence for a direct disturbance of myelin structure by VLCFA and stimulation of inflammation in X-ALD. Utilizing the ABCD 1 knock out mouse, a model for X-ALD, the detrimental effect of VLCFA on neuronal cells has been further confirmed.

As cellular responses found within that *in vitro* approach reflect observation done in X-ALD patients, we conclude that important cellular mechanisms of X-ALD have been enlightened. Based on these results, future investigations on possible pharmacological inventions, e.g. inhibition of GPR 40, can be done to find new therapeutic strategies against X-ALD.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- AGRESTI, C., MEOMARTINI, M. E., AMADIO, S., AMBROSINI, E., VOLONTÉ, C., ALOISI, F. & VISENTIN, S. 2005. ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. *Brain Res Brain Res Rev*, 48, 157-65.
- AL-OMAR, M. A. 2006. The X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) and oxidative stress. *J Herb Pharmacother*, 6, 125-34.
- ARUNDINE, M. & TYMIANSKI, M. 2004. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci*, 61, 657-68.
- AUBOURG, P. 1999. On the front of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurochem Res*, 24, 515-20.
- AUBOURG, P. & DUBOIS-DALCQ, M. 2000. X-linked adrenoleukodystrophy enigma: how does the ALD peroxisomal transporter mutation affect CNS glia? *Glia*, 29, 186-90.
- AUBOURG, P., MOSSER, J., DOUAR, A. M., SARDE, C. O., LOPEZ, J. & MANDEL, J. L. 1993. Adrenoleukodystrophy gene: unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. *Biochimie*, 75, 293-302.
- BADING, H., GINTY, D. D. & GREENBERG, M. E. 1993. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science*, 260, 181-6.
- BAUMANN, N. & PHAM-DINH, D. 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, 81, 871-927.
- BAUMGART, E., VANHOREBEEK, I., GRABENBAUER, M., BORGERS, M., DECLERCQ, P. E., FAHIMI, H. D. & BAES, M. 2001. Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse). *Am J Pathol*, 159, 1477-94.
- BERGER, J., PUJOL, A., AUBOURG, P. & FORSS-PETTER, S. 2010. Current and future pharmacological treatment strategies in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol*, 20, 845-56.
- BERNARDI, P., PENZO, D. & WOJTCZAK, L. 2002. Mitochondrial energy dissipation by fatty acids. Mechanisms and implications for cell death. *Vitam Horm*, 65, 97-126.
- BEZMAN, L., MOSER, A. B., RAYMOND, G. V., RINALDO, P., WATKINS, P. A., SMITH, K. D., KASS, N. E. & MOSER, H. W. 2001. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol*, 49, 512-7.
- BLOCK, M. L., ZECCA, L. & HONG, J. S. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8, 57-69.
- BLOMGREN, K., ZHU, C., HALLIN, U. & HAGBERG, H. 2003. Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, 551-9.
- BRISCOE, C. P., TADAYYON, M., ANDREWS, J. L., BENSON, W. G., CHAMBERS, J. K., EILERT, M. M., ELLIS, C., ELSHOURBAGY, N. A., GOETZ, A. S., MINNICK, D. T., MURDOCK, P. R., SAULS, H. R., JR., SHABON, U., SPINAGE, L. D., STRUM, J. C., SZEKERES, P. G., TAN, K. B., WAY, J. M., IGNAR, D. M., WILSON, S. & MUIR, A. I. 2003. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*, 278, 11303-11.
- BROWN, L. A. & BAKER, A. 2003. Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med*, Band 7, 388-400.
- BUTT, A. M. 2006. Neurotransmitter-mediated calcium signalling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia*, 54, 666-75.
- CEJAS, P., CASADO, E., BELDA-INIESTA, C., DE CASTRO, J., ESPINOSA, E., REDONDO, A., SERENO, M., GARCIA-CABEZAS, M. A., VARA, J. A., DOMINGUEZ-CACERES, A., PERONA, R. & GONZALEZ-BARON, M. 2004. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control*, 15, 707-19.
- CHALLA, R., AHUJA, A., ALI, J. & KHAR, R. K. 2005. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6, E329-57.

- CHOI, J. K., HO, J., CURRY, S., QIN, D., BITTMAN, R. & HAMILTON, J. A. 2002. Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin. *J Lipid Res*, 43, 1000-10.
- COCCO, T., DI PAOLA, M., PAPA, S. & LORUSSO, M. 1999. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*, 27, 51-9.
- DI BIASE, A., AVELLINO, C., PIERONI, F., QUARESIMA, T., GRISOLIA, A., CAPPÀ, M. & SALVATI, S. 1997. Effects of exogenous hexacosanoic acid on biochemical myelin composition in weaning and post-weaning rats. *Neurochem Res*, 22, 327-31.
- DI BIASE, A., DI BENEDETTO, R., FIORENTINI, C., TRAVAGLIONE, S., SALVATI, S., ATTORRI, L. & PIETRAFORTE, D. 2004. Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis. *Neurochem Int*, 44, 215-21.
- DUBOIS-DALCQ, M., FEIGENBAUM, V. & AUBOURG, P. 1999. The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends Neurosci*, 22, 4-12.
- EICHLER, F. S., REN, J. Q., COSSOY, M., RIETSCH, A. M., NAGPAL, S., MOSER, A. B., FROSCHE, M. P. & RANSOHOFF, R. M. 2008. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Ann Neurol*, 63, 729-42.
- FERDINANDUSSE, S., DENIS, S., DACREMONT, G. & WANDERS, R. J. 2003. Studies on the metabolic fate of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 44, 1992-7.
- FERRER, I., KAPFFHAMMER, J. P., HINDELANG, C., KEMP, S., TROFFER-CHARLIER, N., BROCCOLI, V., CALLYZOT, N., MOOYER, P., SELHORST, J., VREKEN, P., WANDERS, R. J., MANDEL, J. L. & PUJOL, A. 2005. Inactivation of the peroxisomal ABCD2 transporter in the mouse leads to late-onset ataxia involving mitochondria, Golgi and endoplasmic reticulum damage. *Hum Mol Genet*, 14, 3565-77.
- FORSS-PETTER, S., WERNER, H., BERGER, J., LASSMANN, H., MOLZER, B., SCHWAB, M. H., BERNHEIMER, H., ZIMMERMANN, F. & NAVE, K. A. 1997. Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J Neurosci Res*, 50, 829-43.
- FOUQUET, F., ZHOU, J. M., RALSTON, E., MURRAY, K., TROALEN, F., MAGAL, E., ROBAIN, O., DUBOIS-DALCQ, M. & AUBOURG, P. 1997. Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system. *Neurobiol Dis*, 3, 271-85.
- FOURCADE, S., LÓPEZ-ERAUSKIN, J., GALINO, J., DUVAL, C., NAUDI, A., JOVE, M., KEMP, S., VILLARROYA, F., FERRER, I., PAMPLONA, R., PORTERO-OTIN, M. & PUJOL, A. 2008. Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet*.
- FOURCADE, S., RUIZ, M., CAMPS, C., SCHLUTER, A., HOUTEN, S. M., MOOYER, P. A., PAMPOLS, T., DACREMONT, G., WANDERS, R. J., GIROS, M. & PUJOL, A. 2009. A key role for the peroxisomal ABCD2 transporter in fatty acid homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296, E211-21.
- FOURCADE, S., RUIZ, M., GUILERA, C., HAHNEN, E., BRICHTA, L., NAUDI, A., PORTERO-OTIN, M., DACREMONT, G., CARTIER, N., WANDERS, R., KEMP, S., MANDEL, J. L., WIRTH, B., PAMPLONA, R., AUBOURG, P. & PUJOL, A. 2010. Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet*, 19, 2005-14.
- FOURCADE, S., SAVARY, S., GONDCAILLE, C., BERGER, J., NETIK, A., CADEPOND, F., EL ETR, M., MOLZER, B. & BUGAUT, M. 2003. Thyroid hormone induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2). *Mol Pharmacol*, 63, 1296-303.
- FREDERICKSON, R. C. 1992. Astroglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 13, 239-53.
- GENIN, E. C., GEILLON, F., GONDCAILLE, C., ATHIAS, A., GAMBERT, P., TROMPIER, D. & SAVARY, S. 2011. Substrate specificity overlap and interaction between adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2). *J Biol Chem*, 286, 8075-84.
- GILG, A. G., SINGH, A. K. & SINGH, I. 2000. Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of patients with X-adrenoleukodystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59, 1063-9.

- GOLDFISCHER, S., MOORE, C. L., JOHNSON, A. B., SPIRO, A. J., VALSAMIS, M. P., WISNIEWSKI, H. K., RITCH, R. H., NORTON, W. T., RAPIN, I. & GARTNER, L. M. 1973. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science*, 182, 62-4.
- GOULD, S. J. & VALLE, D. 2000. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet*, 16, 340-5.
- HAJNÓCZKY, G., CSORDÁS, G., DAS, S., GARCIA-PEREZ, C., SAOTOME, M., SINHA ROY, S. & YI, M. 2006. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, 40, 553-60.
- HALL, A. M., WICZER, B. M., HERRMANN, T., STREMMEL, W. & BERNLOHR, D. A. 2005. Enzymatic properties of purified murine fatty acid transport protein 4 and analysis of acyl-CoA synthetase activities in tissues from FATP4 null mice. *J Biol Chem*, 280, 11948-54.
- HAMPRECHT, B. & LOFFLER, F. 1985. Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol*, 109, 341-5.
- HARDINGHAM, G. E., FUKUNAGA, Y. & BADING, H. 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, 5, 405-14.
- HEIN, S., SCHÖNFELD, P., KAHLERT, S. & REISER, G. 2008. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum Mol Genet*, 17, 1750-61.
- HO, J. K., MOSER, H., KISHIMOTO, Y. & HAMILTON, J. A. 1995. Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest*, 96, 1455-63.
- HOEPFNER, D., SCHILDKNEGT, D., BRAAKMAN, I., PHILIPSEN, P. & TABAK, H. F. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell*, 122, 85-95.
- HUBBARD, W. C., MOSER, A. B., LIU, A. C., JONES, R. O., STEINBERG, S. J., LOREY, F., PANNY, S. R., VOGT, R. F., JR., MACAYA, D., TURGEON, C. T., TORTORELLI, S. & RAYMOND, G. V. 2009. Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): validation of a combined liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method. *Mol Genet Metab*, 97, 212-20.
- HUBBARD, W. C., MOSER, A. B., TORTORELLI, S., LIU, A., JONES, D. & MOSER, H. 2006. Combined liquid chromatography-tandem mass spectrometry as an analytical method for high throughput screening for X-linked adrenoleukodystrophy and other peroxisomal disorders: preliminary findings. *Mol Genet Metab*, 89, 185-7.
- HUNTER, D. R., HAWORTH, R. A. & SOUTHARD, J. H. 1976. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*, 251, 5069-77.
- IGARASHI, M., SCHAUMBURG, H. H., POWERS, J., KISHIMOTO, Y., KOLODNY, E. & SUZUKI, K. 1976. Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *J Neurochem*, 26, 851-60.
- ILIEVA, E. V., AYALA, V., JOVE, M., DALFO, E., CACABELOS, D., POVEDANO, M., BELLMUNT, M. J., FERRER, I., PAMPLONA, R. & PORTERO-OTIN, M. 2007. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 130, 3111-23.
- KAHLERT, S. & REISER, G. 2000. Requirement of glycolytic and mitochondrial energy supply for loading of  $\text{Ca}^{2+}$  stores and  $\text{InsP}_3$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in rat hippocampus astrocytes. *J Neurosci Res*, 61, 409-20.
- KAHLERT, S., SCHÖNFELD, P. & REISER, G. 2005a. The Refsum disease marker phytanic acid, a branched chain fatty acid, affects  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes. *Neurobiol Dis*, 18, 110-8.
- KAHLERT, S., ZÜNDORF, G. & REISER, G. 2005b. Glutamate-mediated influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is coupled with reactive oxygen species generation in cultured hippocampal neurons but not in astrocytes. *J Neurosci Res*, 79, 262-71.
- KAHLERT, S., ZÜNDORF, G. & REISER, G. 2008. Detection of de- and hyperpolarization of mitochondria of cultured astrocytes and neurons by the cationic fluorescent dye rhodamine 123. *J Neurosci Methods*, 171, 87-92.

- KASSMANN, C. M., LAPPE-SIEFKE, C., BAES, M., BRUGGER, B., MILDNER, A., WERNER, H. B., NATT, O., MICHAELIS, T., PRINZ, M., FRAHM, J. & NAVE, K. A. 2007. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet*, 39, 969-76.
- KEMP, S., PUJOL, A., WATERHAM, H. R., VAN GEEL, B. M., BOEHM, C. D., RAYMOND, G. V., CUTTING, G. R., WANDERS, R. J. & MOSER, H. W. 2001. ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. *Hum Mutat*, 18, 499-515.
- KEMP, S., THEODOULOU, F. L. & WANDERS, R. J. 2011. Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance. *Br J Pharmacol*.
- KEMP, S., WEI, H. M., LU, J. F., BRAITERMAN, L. T., MCGUINNESS, M. C., MOSER, A. B., WATKINS, P. A. & SMITH, K. D. 1998. Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med*, 4, 1261-8.
- KIRICHOK, Y., KRAPIVINSKY, G. & CLAPHAM, D. E. 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427, 360-4.
- KNOLL, A., SALLES, J., SARGUEIL, F., CASSAGNE, C. & GARBAY, B. 2000. Peroxisomal beta-oxidation enzyme gene expression in the developing mouse brain. *Neurosci Lett*, 285, 201-4.
- KOBAYASHI, T., SHINNOH, N., KONDO, A. & YAMADA, T. 1997. Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*, 232, 631-6.
- KRIEGER, C. & DUCHEN, M. R. 2002. Mitochondria, Ca<sup>2+</sup> and neurodegenerative disease. *Eur J Pharmacol*, 447, 177-88.
- LAPPE-SIEFKE, C., GOEBBELS, S., GRAVEL, M., NICKSCH, E., LEE, J., BRAUN, P. E., GRIFFITHS, I. R. & NAVE, K. A. 2003. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet*, 33, 366-74.
- LAZO, O., CONTRERAS, M., HASHMI, M., STANLEY, W., IRAZU, C. & SINGH, I. 1988. Peroxisomal lignoceroyl-CoA ligase deficiency in childhood adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7647-51.
- LEDEEN, R. W. & CHAKRABORTY, G. 1998. Cytokines, signal transduction, and inflammatory demyelination: review and hypothesis. *Neurochem Res*, 23, 277-89.
- LIMA, T. M., KANUNFRE, C. C., POMPEIA, C., VERLENGIA, R. & CURTI, R. 2002. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. *Toxicol In Vitro*, 16, 741-7.
- LIU, Y., FISKUM, G. & SCHUBERT, D. 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*, 80, 780-7.
- LOMBARD-PLATET, G., SAVARY, S., SARDE, C. O., MANDEL, J. L. & CHIMINI, G. 1996. A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1265-9.
- LU, J. F., LAWLER, A. M., WATKINS, P. A., POWERS, J. M., MOSER, A. B., MOSER, H. W. & SMITH, K. D. 1997. A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9366-71.
- MA, D., TAO, B., WARASHINA, S., KOTANI, S., LU, L., KAPLAMADZHIEV, D. B., MORI, Y., TONCHEV, A. B. & YAMASHIMA, T. 2007. Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the central nervous system of adult monkeys. *Neurosci Res*, 58, 394-401.
- MAKKAR, R. S., CONTRERAS, M. A., PAINTLIA, A. S., SMITH, B. T., HAQ, E. & SINGH, I. 2006. Molecular organization of peroxisomal enzymes: Protein-protein interactions in the membrane and in the matrix. *Arch Biochem Biophys*, 451, 128-40.
- MASTROENI, R., BENSADOUN, J. C., CHARVIN, D., AEBISCHER, P., PUJOL, A. & RAOUL, C. 2009. Insulin-like growth factor-1 and neurotrophin-3 gene therapy prevents motor decline in an X-linked adrenoleukodystrophy mouse model. *Ann Neurol*, 66, 117-22.
- MCCARTHY, K. D. & DE VELLIS, J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85, 890-902.

- MCGUINNESS, M. C., LU, J. F., ZHANG, H. P., DONG, G. X., HEINZER, A. K., WATKINS, P. A., POWERS, J. & SMITH, K. D. 2003. Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Cell Biol*, 23, 744-53.
- MENNICKEN, F., MAKI, R., DE SOUZA, E. B. & QUIRION, R. 1999. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 73-8.
- MIYAGUCHI, C., MURANAKA, S., KANNO, T., FUJITA, H., AKIYAMA, J., YOSHIOKA, T. & YASUDA, T. 2004. 17beta-estradiol suppresses ROS-induced apoptosis of CHO cells through inhibition of lipid peroxidation-coupled membrane permeability transition. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 36, 21-35.
- MIYOSHI, Y., SAKAI, N., HAMADA, Y., TACHIBANA, M., HASEGAWA, Y., KIYOHARA, Y., YAMADA, H., MURAKAMI, M., KONDOU, H., KIMURA-OHBA, S., MINE, J., SATO, T., KAMIO, N., UEDA, H., SUZUKI, Y., SHIOMI, M., OHTA, H., SHIMOZAWA, N. & OZONO, K. 2010. Clinical aspects and adrenal functions in eleven Japanese children with X-linked adrenoleukodystrophy. *Endocr J*, 57, 965-72.
- MORGAN, N. G. & DHAYAL, S. 2009. G-protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signalling in the pancreatic beta-cell. *Biochem Pharmacol*, 78, 1419-27.
- MORITA, M., SHIMOZAWA, N., KASHIWAYAMA, Y., SUZUKI, Y. & IMANAKA, T. 2011. ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. *Curr Drug Targets*, 12, 694-706.
- MOSER, A. B., KREITER, N., BEZMAN, L., LU, S., RAYMOND, G. V., NAIDU, S. & MOSER, H. W. 1999. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol*, 45, 100-10.
- MOSER, H., DUBEY, P. & FATEMI, A. 2004. Progress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr Opin Neurol*, 17, 263-9.
- MOSER, H. W. 1997. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*, 120, 1485-508.
- MURALIKRISHNA ADIBHATLA, R. & HATCHER, J. F. 2006. Phospholipase A<sub>2</sub>, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*, 40, 376-87.
- NETIK, A., FORSS-PETTER, S., HOLZINGER, A., MOLZER, B., UNTERRAINER, G. & BERGER, J. 1999. Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum Mol Genet.*, 8, 907-13.
- OEZEN, I., ROSSMANITH, W., FORSS-PETTER, S., KEMP, S., VOIGTLÄNDER, T., MOSER-THIER, K., WANDERS, R. J., BITTNER, R. E. & BERGER, J. 2005. Accumulation of very long-chain fatty acids does not affect mitochondrial function in adrenoleukodystrophy protein deficiency. *Hum Mol Genet*, 14, 1127-37.
- OLNEY, J. W., PRICE, M. T., SAMSON, L. & LABRUYERE, J. 1986. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett*, 65, 65-71.
- PAHAN, K., KHAN, M. & SINGH, I. 1998. Therapy for X-adrenoleukodystrophy: normalization of very long chain fatty acids and inhibition of induction of cytokines by cAMP. *J Lipid Res*, 39, 1091-100.
- PAIK, M. J., KIM, K. R., YOON, H. R. & KIM, H. J. 2001. Diagnostic patterns of very-long-chain fatty acids in plasma of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 760, 149-57.
- PAMPLONA, R., DALFO, E., AYALA, V., BELLMUNT, M. J., PRAT, J., FERRER, I. & PORTERO-OTIN, M. 2005. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem*, 280, 21522-30.
- PILLAI, B. K., JASUJA, R., SIMARD, J. R. & HAMILTON, J. A. 2009. Fast diffusion of very long chain saturated fatty acids across a bilayer membrane and their rapid extraction by cyclodextrins: implications for adrenoleukodystrophy. *J Biol Chem*, 284, 33296-304.
- POLGREEN, L. E., CHAHLA, S., MILLER, W., ROTHMAN, S., TOLAR, J., KIVISTO, T., NASCENE, D., ORCHARD, P. J. & PETRYK, A. 2011. Early diagnosis of cerebral X-

- linked adrenoleukodystrophy in boys with Addison's disease improves survival and neurological outcomes. *Eur J Pediatr*.
- POWERS, J. M., LIU, Y., MOSER, A. B. & MOSER, H. W. 1992. The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 51, 630-43.
- POWERS, J. M. & MOSER, H. W. 1998. Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol*, 8, 101-20.
- POWERS, J. M., PEI, Z., HEINZER, A. K., DEERING, R., MOSER, A. B., MOSER, H. W., WATKINS, P. A. & SMITH, K. D. 2005. Adrenoleukodystrophy: oxidative stress of mice and men. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64, 1067-79.
- PUJOL, A., FERRER, I., CAMPS, C., METZGER, E., HINDELANG, C., CALLIZOT, N., RUIZ, M., PÀMPOLS, T., GIRÓS, M. & MANDEL, J. L. 2004. Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet*, 13, 2997-3006.
- PUJOL, A., HINDELANG, C., CALLIZOT, N., BARTSCH, U., SCHACHNER, M. & MANDEL, J. L. 2002. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet*, 11, 499-505.
- RAICHLE, M. E. 1983. The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol*, 13, 2-10.
- REISER, G., KUNZELMANN, U., STEINHILBER, G. & BINMOLLER, F. J. 1994. Generation of a monoclonal antibody against the myelin protein CNP (2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) suitable for biochemical and for immunohistochemical investigations of CNP. *Neurochem Res*, 19, 1479-85.
- REISER, G., SCHÖNFELD, P. & KAHLERT, S. 2006. Mechanism of toxicity of the branched-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment. *Int J Dev Neurosci*, 24, 113-22.
- REZNICK, A. Z. & PACKER, L. 1993. *Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders*, Basel, Birkhäuser.
- RIZZUTO, R. 2001. Intracellular Ca<sup>2+</sup> pools in neuronal signalling. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 306-11.
- ROTHWELL, N. J. 1991. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci*, 12, 430-6.
- SCHLÜTER, A., FOURCADE, S., DOMÈNECH-ESTÉVEZ, E., GABALDÓN, T., HUERTACEPAS, J., BERTHOMMIER, G., RIPP, R., WANDERS, R. J., POCH, O. & PUJOL, A. 2007. PeroxisomeDB: a database for the peroxisomal proteome, functional genomics and disease. *Nucleic Acids Res.*, 35, D815-22.
- SCHLÜTER, A., FOURCADE, S., RIPP, R., MANDEL, J. L., POCH, O. & PUJOL, A. 2006. The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Mol Biol Evol*, 23, 838-45.
- SCHÖNFELD, P., KAHLERT, S. & REISER, G. 2004. In brain mitochondria the branched-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition. *Biochem J*, 383, 121-8.
- SCHÖNFELD, P., KAHLERT, S. & REISER, G. 2006. A study of the cytotoxicity of branched-chain phytanic acid with mitochondria and rat brain astrocytes. *Exp Gerontol*, 41, 688-96.
- SCHÖNFELD, P. & REISER, G. 2006. Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Biol Chem*, 281, 7136-42.
- SCHÖNFELD, P. & REISER, G. 2008. Comment concerning the article: 'Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action' by Komen et al.: Branched chain phytanic acid inhibits the activity of the mitochondrial respiratory chain. *Cell Mol Life Sci*, 65, 2266-9.
- SCHÖNFELD, P. & STRUY, H. 1999. Refsum disease diagnostic marker phytanic acid alters the physical state of membrane proteins of liver mitochondria. *FEBS Lett*, 457, 179-83.
- SCHÖNFELD, P. & WOJTCZAK, L. 2007. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta*, 1767, 1032-40.
- SEMMLER, A., KOHLER, W., JUNG, H. H., WELLER, M. & LINNEBANK, M. 2008. Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Expert Rev Neurother*, 8, 1367-79.



- SEPPET, E., GRUNO, M., PEETSALU, A., GIZATULLINA, Z., NGUYEN, H. P., VIELHABER, S., WUSSLING, M. H., TRUMBECKAITE, S., ARANDARCIKAITE, O., JERZEMBECK, D., SONNABEND, M., JEGOROV, K., ZIERZ, S., STRIGGOW, F. & GELLERICH, F. N. 2009. Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology. *Int J Mol Sci*, 10, 2252-303.
- SHANI, N., JIMENEZ-SANCHEZ, G., STEEL, G., DEAN, M. & VALLE, D. 1997. Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum Mol Genet*, 6, 1925-31.
- SIGEL, G., AGRANOFF, B., ALBERS, R., FISHER, S. & UHLER, M. 1999. *Basic Neurochemistry*, Philadelphia, Lippencott-Raven.
- SINGH, H. & POULOS, A. 1986. A comparative study of stearic and lignoceric acid oxidation by human skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*, 250, 171-9.
- SINGH, I., MOSER, A. E., GOLDFISCHER, S. & MOSER, H. W. 1984. Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 4203-7.
- SINGH, I. & PUJOL, A. 2010. Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. *Brain Pathol*, 20, 838-44.
- SMITH, K. D., KEMP, S., BRAITERMAN, L. T., LU, J. F., WEI, H. M., GERAGHTY, M., STETTEN, G., BERGIN, J. S., PEVNER, J. & WATKINS, P. A. 1999. X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem Res*, 24, 521-35.
- SPRECHER, H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1486, 219-31.
- STEWART, G., HIRA, T., HIGGINS, A., SMITH, C. P. & MCLAUGHLIN, J. T. 2006. Mouse GPR40 heterologously expressed in *Xenopus* oocytes is activated by short-, medium-, and long-chain fatty acids. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290, C785-92.
- STRYER, L. 1996. *Biochemie*, New York, Spektrum Akademischer Verlag.
- THEDA, C., MOSER, A. B., POWERS, J. M. & MOSER, H. W. 1992. Phospholipids in X-linked adrenoleukodystrophy white matter: fatty acid abnormalities before the onset of demyelination. *J Neurol Sci*, 110, 195-204.
- TRAYSTMAN, R. J., KIRSCH, J. R. & KOEHLER, R. C. 1991. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol*, 71, 1185-95.
- UNGER, R. H. & ORCI, L. 2002. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1585, 202-12.
- UTO, T., CONTRERAS, M. A., GILG, A. G. & SINGH, I. 2008. Oxidative imbalance in nonstimulated X-adrenoleukodystrophy-derived lymphoblasts. *Dev Neurosci*, 30, 410-8.
- VAN ROERMUND, C. W., VISSER, W. F., IJLST, L., VAN CRUCHTEN, A., BOEK, M., KULIK, W., WATERHAM, H. R. & WANDERS, R. J. 2008. The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *FASEB J*, 22, 4201-8.
- VAN WAGONER, N. J. & BENVENISTE, E. N. 1999. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol*, 100, 124-39.
- WANDERS, R. J., VAN ROERMUND, C. W., LAGEWEG, W., JAKOBS, B. S., SCHUTGENS, R. B., NIJENHUIS, A. A. & TAGER, J. M. 1992. X-linked adrenoleukodystrophy: biochemical diagnosis and enzyme defect. *J Inherit Metab Dis*, 15, 634-44.
- WANDERS, R. J., VREKEN, P., FERDINANDUSSE, S., JANSEN, G. A., WATERHAM, H. R., VAN ROERMUND, C. W. & VAN GRUNSVEN, E. G. 2001. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans*, 29, 250-67.
- WANDERS, R. J. & WATERHAM, H. R. 2005. Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin Genet*, 67, 107-33.
- WANG, Y., LUO, W., STRICKER, R. & REISER, G. 2006. Protease-activated receptor-1 protects rat astrocytes from apoptotic cell death via JNK-mediated release of the chemokine GRO/CINC-1. *J Neurochem*, 98, 1046-60.
- WATANABE, K., KONISHI, K., FUJIOKA, M., KINOSHITA, S. & NAKAGAWA, H. 1989. The neutrophil chemoattractant produced by the rat kidney epithelioid cell line NRK-52E is a protein related to the KC/gro protein. *J Biol Chem*, 264, 19559-63.

- WEINHOFER, I., FORSS-PETTER, S., ZIGMAN, M. & BERGER, J. 2002. Cholesterol regulates ABCD2 expression: implications for the therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet.*, 11, 2701-8.
- WELLER, S. & GÄRNTER, J. 2002. Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 150, 226-237.
- WELLER, S., GOULD, S. J. & VALLE, D. 2003. Peroxisome biogenesis disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 4, 165-211.
- YAMASAKI, Y., MATSUO, Y., MATSUURA, N., ONODERA, H., ITOYAMA, Y. & KOGURE, K. 1995. Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke*, 26, 318-22; discussion 322-3.
- YANAGISAWA, N., SHIMADA, K., MIYAZAKI, T., KUME, A., KITAMURA, Y., SUMIYOSHI, K., KIYANAGI, T., IESAKI, T., INOUE, N. & DAIDA, H. 2008. Enhanced production of nitric oxide, reactive oxygen species, and pro-inflammatory cytokines in very long chain saturated fatty acid-accumulated macrophages. *Lipids Health Dis*, 7, 48.

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben und ohne deren Hilfe und Ansporn die vorliegende Arbeit vielleicht nie zu einem erfolgreichen Ende gekommen wäre.

Allen voran gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Georg Reiser. Nicht nur für die Bereitstellung des interessanten Themas, sondern auch für seine vortwährende Betreuung, Diskussionsbereitschaft und seinem stetigen Interesse am Fortgang der Arbeit. Sein großer beruflicher Erfahrungsschatz halfen mir dabei, mein wissenschaftliches Denken und Handeln stets weiterzuentwickeln.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Peter Schönfeld für seine intensive Unterstützung bei den Experimenten an isolierten Mitochondrien. Nur durch sein Angebot diese Experimente in seinem Labor durchzuführen, konnte die vorliegende Arbeit durch wertvolle Ergebnisse bereichert werden. Für die lehrreichen, aber vor allem herzlichen Diskussionen bin ich ihm sehr dankbar. Dabei half eifrig Frau Heidelore Goldammer. Ihr möchte ich auf diesem Weg ganz herzlich Danken.

Herrn Dr. Stefan Kahlert gebührt mein Dank für die Einarbeitung in das Thema, die Einführung im Umgang mit dem Fluoreszenz-Imaging-Setup sowie für die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen. Des Weiteren bin ich Herrn Dr. Theodor Hanck, Frau Dr. Fariba Sedehizadeh und Herrn Dr. Rolf Stricker für die Einführung in die molekularbiologische Methodik und Diskussionsbereitschaft sehr dankbar. Nicht zu vergessen danke ich natürlich auch Herrn Dr. Gregor Zündorf für seine vortwährende Hilfe mit dem konfokalen Laserscanmikroskop und seine Gesellschaft als "Zimmergenosse". Frau Petra Grüneberg und Abidat Schneider danke ich für die unermüdliche technische Beratung und Unterstützung, sowie für die qualitativ stets hochwertigen Zellpräparationen.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Neurobiochemie „Haus 21“, insbesondere Dorothee Terhardt, Ilka Kramer und Evi Busse für ihre technische Unterstützung. Dankbar bin ich auch für die gute Atmosphäre im Labor, die vor allem durch Denise Ecke, Carolin Nordmann, Michael Haas, Dr. Mikhail Strokin, und Andrea Haase aufrecht erhalten wurde. Für die Unterstützung in allen organisatorischen Angelegenheiten möchte ich mich bei Frau Ines Klaes und Frau Manuela Dullin-Viehweg bedanken.

Danken möchte ich auch meinen neuen Kollegen vom Labor für Neugeborenen-screening und dem Fehlbildungsmonitoring. Sie haben mich durch ihr stetes Nachfragen motiviert, durchzuhalten und die Arbeit zu Ende zu bringen.

Mein ganz Besonderer Dank gilt meiner Familie und im Besonderen meinem Mann Dr. Raik Rönicke. Er stütze und stärkte mich während der gesamten Arbeit und weit darüber hinaus. Sein geduldiges Zuhören, seine aufopfernde Hilfe, seine tröstenden Umarmungen aber auch sein steter Ansporn halfen mir ungemein. Meine Familie Bianka Hein, Heidi und Helmut Rönicke sowie Petra und Wolf-Dietrich Hein waren während meiner gesamten Arbeit moralisches Rückgrat, spendeten seelischen Halt und suchten eifrig nach Rechtschreibfehlern.

Meinen Söhnen Marvin und Simen danke ich vom Herzen für die turbulente Unterbrechung meiner Arbeit für die schönste Sache der Welt, der Erziehung unserer Kinder, denn ihnen gehört die Zukunft.

## PUBLIKATIONEN

1. Toxic effect of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture.  
**Hein S**, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G.  
Hum Mol Genet. 2008, 17, 1750-61
2. The influence of the branched-chain fatty acids pristanic acid and Refsum disease-associated phytanic acid on mitochondrial functions and calcium regulation of hippocampal neurons, astrocytes, and oligodendrocytes.  
**Rönicke S**, Kruska N, Kahlert S, Reiser G.  
Neurobiol Dis. 2009, 36, 401-10
3. Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors.  
Rönicke R, Mikhaylova M, **Rönicke S**, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG.  
Neurobiol Aging. 2010 Feb 2.

## **LEBENS LAUF**

Dipl.-Biologin  
Sabine Rönicke  
Kormoranweg 6  
39114 Magdeburg

E-Mail: sabine.roenicke@gmx.de

### **Zur Person**

---

Geburtsdatum/-ort: 02.02.1982, Magdeburg  
Geburtsname: Hein  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder  
Standsangehörigkeit: deutsch

### **Schulische und akademische Ausbildung**

---

1994 – 2000	Gymnasium mit Abitur in Schönebeck/Elbe
10/2000 – 09/2002	Grundstudium Diplom-Biologie in Halle/Saale
10/2002 – 03/2006	Hauptstudium Neurobiologie in Magdeburg
03/2006 – 03/2009	Promotion an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Institut für Neurobiochemie, Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin Thema: Schädigungsmechanismen von sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA) in Gliazellen und Neuronen

### **Beruflicher Werdegang**

---

Seit 06/2010	Stellvertretende Laborleiterin im Labor für Neugeborenen- screening und Stoffwechselfdiagnostik, Kinderklinik der Me- dizinischen Fakultät Magdeburg
--------------	--

## **SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Sabine Rönicke  
Kormoranweg 6  
39114 Magdeburg

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema

### **Schädigungsmechanismen von sehr-langkettigen Fettsäuren (VLCFA) in Gliazellen und Neuronen**

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 22.11.2012

Sabine Rönicke