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

Direktor: Prof. Dr. med. Berend Isermann
Bereich Pathobiochemie
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Andreas Gardemann

Untersuchungen zum Einfluss von Tafazzin und des Fettsäuremilieus auf die Cardiolipinzusammensetzung und das Wachstum von Tumorzellen am Beispiel der C6-Glioma-Zelllinie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
(doctor medicinae)

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

vorgelegt von: Theresa Ohlig
aus: Offenbach am Main
Magdeburg 2018

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Ohlig, Theresa:
Untersuchungen zum Einfluss von Tafazzin und des Fettsäuremilieus auf die Cardiolipinzusammensetzung und des Wachstums von Tumorzellen am Beispiel der C6-Glioma-Zelllinie. -2018. - 86 Bl., 2 Tab., 18 Abb., 2 Anl.

Kurzreferat

Gliome sind sehr schnell wachsende Hirntumore. Die Prognose für betroffene Patienten ist zumeist infaust. Tafazzin, ein Remodeling-Enzymkomplex der Cardiolipinsynthese, hat neben dem Fettsäureangebot wesentlichen Einfluss auf die Struktur molekularer Cardiolipinspezies. In der Literatur gibt es deutliche Hinweise darauf, dass die Cardiolipinzusammensetzung eine regulative Rolle bei der Zellproliferation besitzt. Eine Aufklärung des Cardiolipin- und Lipideinflusses auf die Proliferation von Tumorzellen könnte einen neuen Ansatz in der Karzinombehandlung eröffnen. In der vorliegenden Arbeit wurde Tafazzin in C6-Gliomazellen durch den Einsatz von entsprechender siRNA in seiner Aktivität stark limitiert und Linolsäure dem Kulturmedium zugesetzt, um den Einfluss der Cardiolipinzusammensetzung und des CL-Gehalts auf die Zellproliferation zu untersuchen. Durch eine Untersuchung des zellulären Fettsäuremilieus konnte dessen Auswirkungen auf die Bioenergetik und Zellproliferation von den Cardiolipin bedingten Effekten differenziert beurteilt werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Kock-down des Tafazzin in Kombination mit Linolsäureapplikation signifikante Veränderungen in der Cardiolipinmenge und Zusammensetzung, im zellulären Lipidstoffwechsel und in der Zellaktivität hervorruft. Zudem ist das Downknocken des Remodeling-Enzyms für eine Minderung des Zellwachstums verantwortlich. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass funktionstüchtiges Tafazzin für die Bioenergetik der Zelle und für die schnelle Tumorproliferation unabdingbar ist.

Schlüsselwörter

Tafazzin, Linolsäure, Cardiolipin, C6-Glioma-Zellen, Glioblastom, Zellproliferation, Zellaktivität

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung 1
1.1 Glioma-Tumore 1
1.1.1 Einteilung 1
1.1.2 Therapie und Prognose 2
1.2 Cardiolipin 2
1.2.1 Synthese 3
1.2.2 Spezies 5
1.2.3 Funktion 6
1.3 Zellproliferation 6
1.4 Cardiolipin und Zellproliferation 7
1.5 Warburg-Effekt 7
1.6 Zielstellung 10
2 Material und Methoden 11
2.1 Materialien 11
2.2 Methoden 11
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion-Bestimmung (PCR) 11
2.2.2 Versuchsaufbau 11
2.2.3 Zellen auftauen 13
2.2.4 Beschichten der Petrischalen 14
2.2.5 Zellzählung und Zellaussaat 14
2.2.6 Nährmediumwechsel 15
2.2.7 Erste Chemikalienzugabe 15
2.2.8 2-Stundenwert-Messungen 15
2.2.8.1 Probenvorbereitung für Cardiolipin-, Fettsäure- und Citratsynthase-Messung 15

2.2.8.2 Zellatmung ... 16
2.2.8.3 Proteinbestimmung nach Lowry ... 17
2.2.8.4 MTT-Reduktion ... 18
2.2.9 Zweite Chemikalienzugabe ... 19
2.2.10 72-Stundenwert-Messungen ... 20
2.2.11 Cardiolipinbestimmung ... 20
2.2.12 Im Cardiolipin gebundene Fettsäuren ... 20
2.2.13 Zelluläre freie Fettsäuren ... 21
2.2.14 Citratsynthasebestimmung ... 22
2.2.15 Proteinbestimmung nach Bradford-BioRad ... 24
2.2.16 Statistische Auswertung ... 25
3 Ergebnisse ... 26
3.1 Polymerase-Kettenreaktion-Bestimmung (PCR) ... 26
3.2 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Cardiolipin ... 27
3.2.1 Cardiolipinmenge ... 27
3.2.2 Molekulare Cardiolipinspezies ... 30
3.2.3 Im Cardiolipin gebundene Fettsäuren ... 34
3.3 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf zellulären Lipidstoffwechsel ... 40
3.4 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Mitochondrien ... 43
3.4.1 Citratsynthaseaktivität ... 43
3.4.2 Zellatmung ... 44
3.5 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Zellwachstum und Zellaktivität ... 46
3.5.1 Proteinbestimmung ... 46

3.5.2 MTT-Bestimmung 47

4 Diskussion 49

4.1 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf den zellulären Lipidstoffwechsel 50

4.2 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Cardiolipin 51

4.2.1 Cardiolipinmenge 51

4.2.2 Cardiolipinspezies 54

4.2.3 Im CL gebundene Fettsäuren 56

4.3 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Mitochondrien 58

4.4 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Zellaktivität und Zellwachstum 60

4.4.1 Zellwachstum 60

4.4.2 Zellaktivität 61

5 Zusammenfassung 63

6 Literaturverzeichnis 65

Danksagung 72

Ehrenerklärung 73

Darstellung des Bildungsweges 74

Anlage: Materialien 76

Anlage: Darstellungsverzeichnis 79

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
CDK	Zyklin-abhängige-Kinase
CDP	Cytidindiphosphat
CL	Cardiolipin
CL $(18:2)_4$	Tetralinolsäure-Cardiolipin
CMP	Cytidinmonophosphat
CO_2	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CTP	Cytidintriphosphat
Cu	Kupfer
$CuSO_4$	Kupfersulfat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Medium (Dulbecco's modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	Ellmans Reagenz, 5,5′-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EE	Extinktionseinheit
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
FS	Fettsäure
GC	Gaschromatographie
H_2O	Wasser
HCL	Chlorwasserstoff
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LPC	Lysophosphatidylcholin
LS	Linolsäure, C18:2
Meth.	Methanol
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MLCL	Monolysocardiolipin
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MTT	3-[4,5Dimethylthiazol-2-yl] -2,2-diphenyltetrazoliumbromide
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
O_2	Sauerstoff
Opti-MEM	Minimal Essential Medium
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PS	Petrischalen
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler (Standard Error of Mean)
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
TAZ	Tafazzin-Enzymkomplex
Taz	Lipofektamin RNAiMAX Reagenz + Taz siRNA
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einführung

1.1 Glioma-Tumore

Gliome sind Hirntumore aus der Gruppe der neuroepithelialen Tumore. Sie stammen von Zellen des Gliagewebes ab. Dieses dient im Nervensystem als Stützgewebe und zur elektrischen Isolation der Nervenzellen (Glia = Leim, Virchow 1858) [1]. Gliome machen etwa 40 % aller Gehirntumore aus und sind damit die häufigste Gruppe der Tumore des menschlichen Gehirns. Im Erwachsenenalter treten die Gliome, mit einer Häufigkeit von etwa 1,5 % aller im Körper vorkommenden Tumore, nur selten auf. Im Kindesalter sind sie jedoch mit etwa 20 % zweithäufigster maligner Tumor nach den Leukämien. Am häufigsten unter den Gliomen treten mit etwa 50 % die hochmalignen Glioblastome auf. Glioblastome zeichnen sich durch ein aggressives und schnelles Wachstum aus [2,3]. Für die Arbeit wurden die aus dieser Gruppe stammenden C6-Glioblastomzellen ausgewählt.

1.1.1 Einteilung

Gliome können je nach zytogenetischem Ursprung in Astrozytome (Grad I-III), Glioblastome (Astrozytom Grad IV), Ependymome, Oligodendrogliome und Medulloblastome eingeteilt werden. Eine weitere Einteilung nach Dignitätsgraden erfolgt durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO). Die WHO-Klassifikation nutzt die mittlere Überlebenszeit als Malignitätskriterium. Die Tumore selbst unterschieden sich histologisch, zytologisch, immunhistochemisch sowie molekulargenetisch voneinander. Die Tumore werden dabei in vier Grade eingeteilt (I und II niedrigmaligne, III und IV hochmaligne) [2], [3]. Beispiele sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Gliome, nach [3]

WHO-Grad	**Mittlere Überlebenszeit**	**Häufige Tumore**
I	>5 Jahre	Pilozytisches Astrozytom (= Astrozytom Grad I) Ependymom (WHO-Grad I)
II	3-5 Jahre	Fibrilläres Astrozytom (= Astrozytom Grad II) Oligodendrogliom (WHO-Grad II) Ependymom (WHO-Grad II)
III	2-3 Jahre	Anaplastisches Astrozytom (= Astrozytom Grad III)

		Oligodendrogliom (WHO-Grad III) Ependymom (WHO-Grad III)
IV	6-15 Monate	Glioblastom (= Astrozytom Grad IV) Medulloblastom (WHO-Grad IV)

1.1.2 Therapie und Prognose

Die Therapie der Gliome ist, abhängig von dem Subtyp und der WHO-Klassifikation, sehr unterschiedlich [4]. Prinzipiell wird eine komplette Resektion angestrebt. Da die vollständige Entfernung maligner Gliome meist wegen des invasiven Wachstums nicht möglich ist, wird eine makroskopisch vollständige Entfernung als radikale Exstirpation bezeichnet [5]. Bei Tumoren ab WHO Grad II erfolgt individuell eine adjuvante Strahlen- und/oder Chemotherapie. Zusätzlich werden Kortikosteroide zur Reduzierung von perifokalen Ödemen verabreicht. Je nach Klassifikation ist die Prognose sehr unterschiedlich und schwankt zwischen einer Heilungsrate von 80 % nach operativer Therapie (Pilozytisches Astrozytom WHO-Grad I) bis hin zu einer Lebenserwartung von etwa 14 Monaten (Glioblastom). Die Prognose ist von Geschlecht, Patientenalter, Tumorlokalisation, Karnofsky-Index und weiteren Faktoren abhängig [5]. Die Diagnose eines hochmalignen Glioblastoms ist infaust und kann trotz bisher bekannter Pathomechanismen und Genomentschlüsselung nicht kurativ behandelt werden [5]. Erstmalig nach 30 Jahren konnte die Lebenserwartung durch die Chemotherapie mit Temozolomid in Kombination mit Strahlentherapie signifikant verbessert werden [6]. Viele weitere Studien zur Verbesserung der Therapie des Glioblastoms sind derzeit angemeldet.
Besondere Hoffnungen liegen auf der weiteren Aufklärung der molekularen Grundlagen des Tumorwachstums. Darauf beruhende neue Erkenntnisse könnten dadurch zielgerichtet gegen das weitere Wachstum eingesetzt werden. In dieser Hinsicht könnte das Phospholipid Cardiolipin eine wichtige Rolle spielen.

1.2 Cardiolipin

Cardiolipine (CL) sind Diphosphatidylglycerine (1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl) -sn-glycerol). CL sind Phospholipide bei denen zwei Phosphatgruppen über Glycerin verknüpft sind. Jede Phosphatgruppe ist mit einem weiteren Molekül Glycerin über dessen OH-Gruppe des C-Atom 1 verbunden. Die OH-Gruppen der C-Atome 2 und 3 sind mit je zwei Fettsäureresten verestert [7]. Den Trivialnamen CL haben diese Phospholipide erhalten, da sie erstmalig 1942 aus dem Herzgewebe isoliert wurden [8]. CL sind vorwiegend in der mitochondrialen Innenmembran

lokalisiert. Auch wenn CL nicht exklusiv in Mitochondrien vorkommt, ist es nur in geringen Mengen in anderen menschlichen Zellkompartimenten zu finden [9].

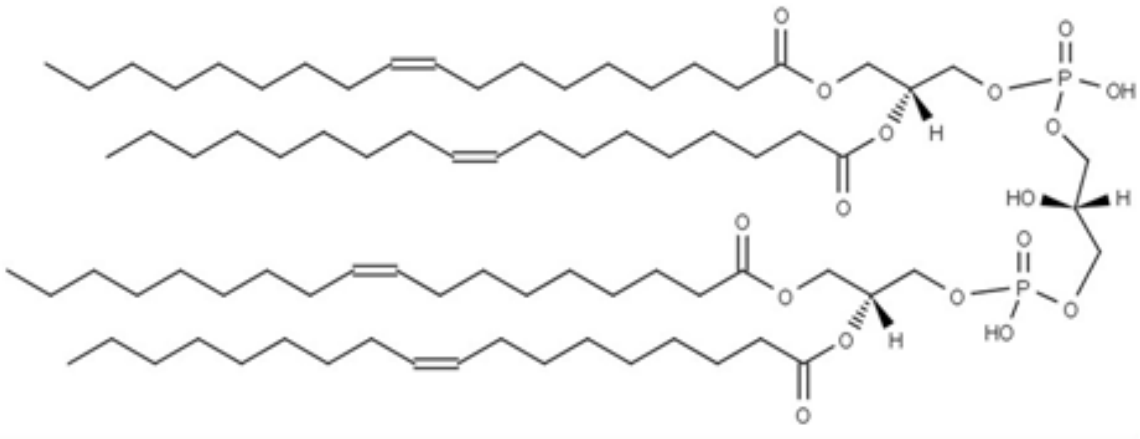

Abbildung 1: Cardiolipinstruktur, [7]

1.2.1 Synthese

Die Synthese von CL findet in der inneren Membran der Mitochondrien statt [10]. Die Synthese läuft wie in Abbildung 2 dargestellt ab: Phosphatidat wird unter Verbrauch von CTP und ATP zu CDP-Diacylglycerin aktiviert. Im nächsten Schritt wird CDP-Diacylglycerin mit Glycerin-3-Phosphat verknüpft und zu Phosphatidylglycerinphosphat umgewandelt. Dabei wird CMP freigesetzt. Unter Abspaltung von Phosphat entsteht Phosphatidylglycerin. Dieses reagiert mit einem zweiten CDP-Diacylglycerin zu Cardiolipin. Erneut wird CMP freigesetzt [11]. Das entstandene CL ist unreif und enthält überwiegend kurze gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäurereste [12,13].

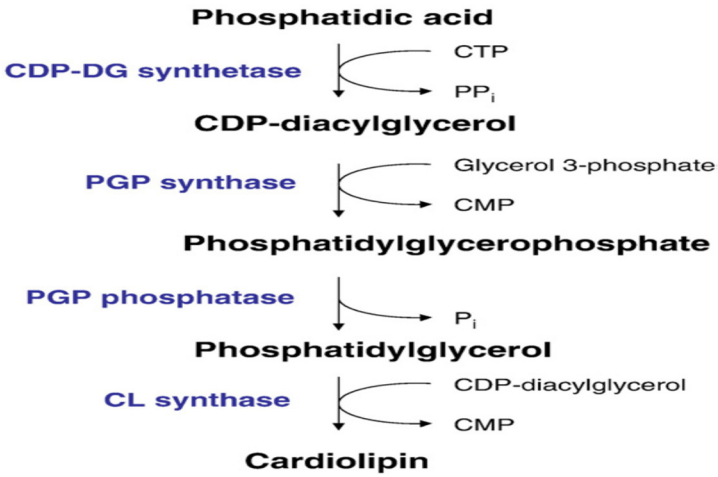

Abbildung 2: Cardiolipinsynthese, [14]

Postsynthetisch kommt es zu weiteren Modifikationen, sodass reifes CL entsteht. Die kurzen Acylreste des Lipids werden gegen längere Ketten ausgetauscht. Für dieses Remodeling ist der Enzymkomplex Tafazzin (TAZ) verantwortlich, welcher zwischen innerer und äußerer

Mitochondrienmembran lokalisiert ist [15]. Nach wie vor ist der katalytische Funktionsmechanismus des Tafazzin noch nicht vollständig aufgeklärt [16]. Es besitzt wahrscheinlich selbst eine Phospholipid-Lysophospholipid Transacylase-Aktivität [10].
Tafazzin kann dabei das Remodeling über zwei verschiedene Mechanismen steuern. Es kann entweder eine zweischrittige Deacylation-Reacylations-Reaktion katalysieren oder in nur einem Schritt die Umwandlung zwischen Phospholipid und Lysophospholipid bedingen [10].
Abbildung 3 stellt den zweischrittigen Reifungsprozess dar. Zunächst werden die Acylgruppen des CL durch Phospholipasen entfernt. Durch diese Deacyclaseaktivität entsteht Monolysocardiolipin (MLCL) (Abbildung 3, 1). Anschließend werden Acylgruppen von Phosphatidylcholin mittels Reacyclaseaktivität auf das CL übertragen (Abbildung 3, 2). Antriebskraft dafür könnte die Hydrolyse des Acetyl-Coenzym A mittels Acyltransferase sein (Abbildung 3, 3) [17,12].

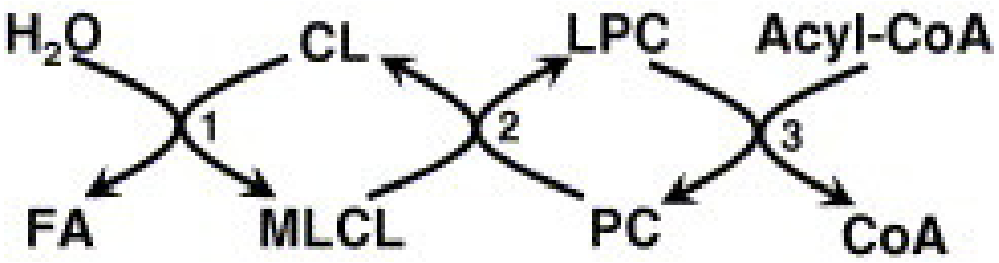

Abbildung 3: Cardiolipin-Remodeling mittels Tafazzin, [17]
MLCL: Monolysocardiolipin, FA: Fettsäure, PC: Phosphatidylcholin, LPC: Lysophosphatidylcholin

Der Enzymkomplex TAZ vermittelt dabei den Austausch von gesättigten Acylketten zu ungesättigten Acylresten [9]. Bei der alternativen Umwandlung werden die Acylgruppen der Phospholipide und Lysophospholipide direkt durch eine einschrittige Transacyclaseaktivität ausgetauscht. Hier sind keine CL-Phospholipasen für die Entstehung von MLCL erforderlich. Die Transacylierungsreaktion zwischen Lysophospholipid und CL kann direkt ein Phospholipid und ein MLCL erzeugen. Durch die anschließende Transacylierung zwischen MLCL und einem Phospholipid entsteht ein remodeltes CL und ein Monolysophospholipid [10]. In Säugetieren besitzt das Cardiolipin nach dem Remodeling einen hohen Anteil an zweifach ungesättigten Linolsäureresten (LS, C18:2) [17,18]. Der spezifische Aufbau der Acylkette ist nach dem Remodeling auch von der Membran abhängig, an die das Tafazzin bindet und damit vom spezifischen Gewebe abhängig [19]. Die Bedeutung des Tafazzin-Gens und der konkreten Cardiolipinzusammensetzung konnten bis heute nicht komplett aufgedeckt werden [20,16].
Es wird angenommen, dass ohne Tafazzin kein ausreichendes Remodeling ablaufen kann. Bei einer Mutation des TAZ-Gens, welches für Tafazzin codiert, kommt es zur Veränderung der

CL-Struktur. Dies ist beim Barth-Syndrom der Fall und die Ursache für die klinischen Konsequenzen [13,9].

1.2.2 Spezies

Es existieren viele verschiedene CL-Moleküle. Diese unterscheiden sich in der Kombination der eingebauten vier Acylketten (Fettsäurereste). Die Zusammensetzung molekularer CL-Spezies ist spezies- und organabhängig. Beispielsweise zeigt die HT1080 Zelllinie der Fibrosarkome eine andere Cardiolipinzusammensetzung als die nichttumorösen Gewebe von Säugetieren [21]. Darüber hinaus gibt es in verschiedenen Tumoren innerhalb eines Organs Unterschiede in der Zusammensetzung und Menge des CL. In Untersuchungen zum CL-Aufbau und Menge in Hirntumoren von Mäusen konnten über 100 molekulare CL-Spezies in einem Ependymoblastom gefunden werden, während aus einem Mikrogliom lediglich 45 CL-Spezies isoliert werden konnten [12]. Im menschlichen Organismus kommt vor allem die FS C18:2 im CL vor, welche häufig alle vier möglichen Fettsäurereste des CL stellt, wodurch Tetralinolsäure-CL (CL $(C18:2)_4$) entsteht [21]. Das Herzmuskelgewebe von Säugetieren besitzt zu etwa 80 % Tetralinolsäure-CL, die menschliche Leber etwa 50 % und humane Lymphoblasten nicht einmal 10 % dieser Spezies [19]. Das menschliche Gehirn enthält neben Tetralinolsäure-CL vor allem auch noch Spezies mit mehrfach ungesättigten FS wie Arachidonsäure (C20:4) und Docosahexaensäure (C22:6) [22]. Verantwortlich für die Vielzahl an CL-Spezies ist das Remodeling mittels Tafazzin. Kommt es durch Umwelteinflüsse (oxidativem Stress oder Mangel an Nährstoffen) zur negativen Beeinflussung des Tafazzin, kann das Remodeling unvollständig bleiben. Obwohl die Spezies durch ihre eingebauten Fettsäuren spezifisch sind, können sie durch Umwelteinflusse oder bestimmte Reize eine Veränderung erfahren [23]. Unreifes CL akkumuliert, was eine Funktionseinschränkung des CL und damit der ganzen Zelle zur Folge haben kann. Dies könnte die Tumorgenese stimulieren [24,12]. Der Aufbau des CL ist folglich vom Zustand der Zelle abhängig. In einer regelrechten Zelle besitzen fast alle CL-Spezies eine symmetrische Verteilung ihrer vier Fettsäurereste. Krankes Gewebe zeigt jedoch einen Verlust des symmetrischen Phospholipidaufbaus. Sowohl Tumorzellen, Mausmodelle mit Diabetes als auch oxidiertes CL weisen eine Veränderung in Form von Asymmetrien der Fettsäurereste auf [21]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen kurzes, stärker gesättigtes CL besitzen [24,25]. In einer Studie an Lymphozyten wurde festgestellt, dass schnell proliferierende Lymphozyten im Gegensatz zu langsam wachsenden Lymphozyten eine CL-Spezies mit weniger Doppelbindungen, mehr C16-Acylketten und weniger C18-Acylketten besitzen. Hingegen neigen die langsam

wachsenden Lymphozyten zu einer ungesättigten C18-Acylkette. Diese Entdeckung ließ vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen der vorliegenden CL-Spezies und der Zellproliferation gibt [24].

1.2.3 Funktion

CL ist mit verschiedenen Komponenten der mitochondrialen Atmungskette assoziiert. Das Phospholipid bindet an die Komplexe II, III und IV der Atmungskette, Cytochrom c und die ATP-Synthase in der inneren Mitochondrienmembran. Dadurch werden sie in ihrer aktiven Form stabilisiert und funktionsfähig [26,27,25,28]. Damit hat CL einen wesentlichen Einfluss auf die oxidative Phosphorylierung [11]. Bei oxidativem Stress kommt es zur Oxidierung des CL und damit zum Funktionsausfall [29]. Dies führt zur Störung der Elektronentransportkette. Beispielsweise kann oxidiertes CL seine Aufgabe, den Atmungskomplex I in seiner funktionsfähigen Form zu stabilisieren, nicht mehr ausführen. Dabei kann die Funktion des CL von keinem anderen Phospholipid übernommen werden [30]. Weiterhin ist Cardiolipin für die Freisetzung des Apoptosemediators Cytochrom c im intrinsischen Signalweg der Apoptose mitverantwortlich [31,32]. Somit reguliert CL die Apoptose mit. Für die Funktion des CL ist seine Struktur entscheidend. Die Forschungsgruppe unter Ammoscato et al. geht davon aus, dass kurze sowie gesättigte und einfach ungesättigte CL-Spezies hauptsächlich strukturelle Anforderungen erfüllen. Dahingegen sind lange CL-Spezies für die Signalübertragung notwendig [18].

1.3 Zellproliferation

Die Proliferation einer eukaryotischen Zelle läuft geregelt im Zellzyklus ab. Ziel ist die identische Verdopplung des Genoms und gleichmäßige Aufteilung auf zwei Tochterzellen.
rssDer Zellzyklus besteht aus den vier Phasen G1-, S- und G2-, welche auch als Interphase zusammengefasst werden, sowie der M-Phase (Mitose). Ferner kann eine Zelle unter bestimmten Voraussetzungen den Zellzyklus verlassen und in die G0-Phase eintreten, in welcher die Zelle ruht. In der G1-Phase wächst die Zelle, die S-Phase dient der DNA Replikation, in der G2-Phase werden zellteilungsspezifische Proteine und RNA-Moleküle synthetisiert und schließlich folgt die Zellteilung in der M-Phase [33].
Zur Regulation des Zellwachstums und Vermeidung von Tumorbildung gibt es ein komplexes Zellzyklus-Kontrollsystem. An mehreren Restriktionspunkten wird der geregelte Ablauf überprüft, eventuelle Schäden behoben oder die Apoptose eingeleitet. Hierfür verantwortlich sind periodisch aktive Zyklin-abhängige-Kinasen (CDKs). Ihre eigene Synthese wird durch

mehrere mitogene Signalwege beeinflusst. Ihre Aktivität wird durch heterodimere Komplexbildung mit Zyklin und zusätzlicher Phosphorylierung stimuliert und durch Dephosphorylierung und CDK-Inhibitorproteine (CKI) gehemmt. Die Aktivierung der Zykline wird von Wachstumsfaktoren beeinflusst, die Phosphorylierung der CDKs hängt von Proteinkinasen ab [34].

Das komplexe Zusammenspiel von vielen verschiedenen wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Faktoren entscheidet über den Eintritt der Zelle in die einzelnen Phasen des Zellzyklus und damit über die Zellproliferation.

1.4 Cardiolipin und Zellproliferation

Schild et al. konnten 2012 zeigen, dass die CL-Komposition mit der Zellproliferation korreliert. Sie untersuchten das CL von Lymphozyten und stellen fest, dass schnell proliferierende Zellen weniger Doppelbindungen als langsam wachsende Zellen enthalten sowie eine höhere Anzahl an C16 Acylketten und eine geringere Menge an C18 Acylketten aufweisen [24]. 2015 konnte in einem klinischen Experiment die Korrelation zwischen CL-Spezies und Zellproliferation bestätigt werden. An Gewebeproben von Prostatakarzinomen wurden signifikante Unterschiede zwischen den CL-Spezies des Tumorgewebes und CL-Spezies des gesunden Prostatagewebes aufgedeckt [35]. Des Weiteren wurde CL selbst als ein bedeutendes Signalmolekül der Apoptose identifiziert [36].

Es gibt viele weitere Studien, welche die Rolle der CL-Komposition in Bezug zur Zellproliferation untersuchen. Dabei gelang es jedoch keiner Studie einen eindeutigen Bezug zwischen Proliferation und der CL-Zusammensetzung herzustellen. Ursächlich dafür ist, dass nicht zwischen den Effekten bedingt durch die Veränderung der CL-Komposition und den Effekten bedingt durch Veränderungen des CL-Gehalts unterschieden werden kann. Zudem wurde anhand verschiedener Zellen versucht durch Hinzugabe von Fettsäuren (FS) die CL-Zusammensetzung zu verändern und dadurch Modifikationen im Zellwachstum zu erzeugen [35,37]. Zwar konnte die Proliferation beeinflusst werden, jedoch konnte dies nicht eindeutig auf Veränderungen der CL-Strukturen zurückgeführt werden. Durch die Zugabe von Fettsäuren könnten auch andere Phospholipide der Zelle beeinflusst worden sein, welche Einfluss auf das Zellwachstum ausgeübt haben könnten.

1.5 Warburg-Effekt

Der Warburg-Effekt ist eine Hypothese, die der Biochemiker und Arzt Otto Warburg (1883–1970) aufstellte und dafür 1931 mit dem Nobelpreis geehrt wurde. Er beobachtete, dass

Krebszellen einen anderen Stoffwechsel als Zellen von gesunden Geweben besitzen. Gewöhnlich wird ATP zum größten Teil mittels ATP-Synthase am Ende der Zellatmungskette aerob gewonnen. Tumorzellen bevorzugen stattdessen einen anaeroben Weg, indem sie während der Glykolyse Glukose zu Milchsäure vergären. Dies sei selbst dann der Fall, wenn genügend Sauerstoff zur Verfügung steht. Warburg gibt an, dass dieser Effekt allerdings stark von Umwelteinflüssen abhängig sei und somit kein zuverlässiger Indikator für einen Tumormetabolismus darstelle [12,38,39].

2006 konnte eine Forschungsarbeit einige Aussagen Warburgs unterstützen. Sie manipulierten Tumorzellen so, dass diese zum aeroben Stoffwechsel gezwungen wurden. Dadurch konnte die Proliferation sowohl in vitro als auch in vivo gehemmt werden [40]. Entgegengesetzt wurde bewiesen, dass Tumorwachstum unter anaeroben Stoffwechselbedingungen mittels Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion gefördert wird [41].

In einer weiteren Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor p53, welcher in Tumorzellen sehr häufig mutiert vorliegt, Einfluss auf die Atmungskette besitzt. Wenn p53 in Krebszellen ausfällt, wirkt sich dies negativ auf die Synthese der Cytochrom-c-Oxidase 2 (SCO2) aus. Cytochrom c stellt ein wichtiges Protein in der Zellatmung dar und kann nun seine Funktion nicht mehr wahrnehmen. Folglich fällt die Atmungskette aus und es kommt zum anaeroben Stoffwechsel. Mit diesem Zusammenhang zwischen p53 Mutation und Ausfall der oxidativen Phosphorylierung sei der Warburg-Effekt erklärbar [42].

Auch die Forschungsgruppe Kiebish et al. kommt im Jahr 2008 zu dem Ergebnis, dass Hirntumorzellen eine signifikant geringere Mitochondrienfunktion besitzen, sodass diese gezwungen werden auf die Glykolyse zur Energiegewinnung zurück zu greifen [12].

Hier könnte ein Zusammenhang zwischen der CL-Spezies und der Funktion der Elektronentransportkette bestehen, da CL mitverantwortlich für die Funktion der Atmungskette ist. Die selbe Forschungsgruppe zeigte, dass eine Abnahme der CL-Masse in Hirntumoren zu einer Abnahme der Elektronentransportkette-Aktivität, vor allem des Komplex I führt [12].

Da die Veränderung in der CL-Zusammensetzung wahrscheinlich irreversibel ist, gilt die Schädigung der Atmungskette ebenfalls als irreversibel. Durch hohe Reproduzierbarkeit ist sichergestellt, dass jeder Hirntumor einem bestimmten CL-Phänotyp zugehörig ist. Die Arbeit kommt damit zu dem Fazit, dass es eine Verknüpfung zwischen dem Warburg-Effekt und den Anomalitäten des CL gibt.

Fraglich bleibt, ob das CL-Remodeling zur Tumorentstehung führt oder die Mutation des Tumors für das Remodeling verantwortlich ist, wobei nicht jede CL-Veränderung

unmittelbaren Zusammenhang mit Krebs hat. Zu beachten gilt, dass auch das Wachstum einer Kultur in vitro zu Veränderungen der CL-Spezies führt und dadurch die eigentlichen Veränderungen im Tumor verdeckt [12,25].

1.6 Zielstellung

Ziel der Arbeit ist es, zu prüfen, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Veränderungen des Cardiolipins und der Zellproliferation sowie Bioenergetik besteht. Dabei soll zwischen CL bedingten Effekten und Auswirkungen bedingt durch freie zelluläre Fettsäuren unterschieden werden. Damit soll eine wissenschaftliche Grundlage für die Beeinflussung der Zellproliferation durch gezielte Manipulation der Cardiolipinzusammensetzung gelegt werden.

Als Untersuchungsobjekt wurde die schnell proliferierende C6-Glioma-Zelllinie gewählt, da eine nebenwirkungsarme Hemmung der Proliferation dieser Zellen klinisch wünschenswert ist. Um eine isolierte Modifikation der Cardiolipinzusammensetzung zu erreichen, soll der CL-Stoffwechsel durch Downknocken des CL-Remodeling-Enzyms Tafazzin beeinflusst werden.

Die CL-Zusammensetzung wird mittels Massenspektrometrie, die zelluläre Fettsäureverteilung mittels Gaschromatografie analysiert. Die Mitochondrienfunktion wird anhand von Sauerstoffverbrauchsmessungen und der Citratsynthaseaktivität analysiert. Schließlich erfolgt die Charakterisierung der Zellproliferation durch Proteinbestimmung und der MTT Reduktion. Durch Zugabe von Linolsäure zum Kulturmedium soll darüber hinaus geprüft werden, ob durch ein entsprechendes Lipidumfeld die Cardiolipinzusammensetzung und die Proliferation der Tumorzellen beeinflusst werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

In den Versuchen wurden Glioblastomzellen einer C6-Glioma-Zellinie (ACC550) verwendet, welche aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) aus Braunschweig in Deutschland bezogen wurden.

Eine Übersicht aller in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Messinstrumente ist im Anhang einzusehen.

Alle Arbeiten an den Zellkulturen zur Vorbereitung der Messungen erfolgten unter einer sterilen Werkbank.

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion-Bestimmung (PCR)

Zur Untersuchung der Rolle von Tafazzin im CL-Stoffwechsel wurde das TAZ-Gen der C6-Glioma-Zellen downgeknockt. Dadurch wird die TAZ-mRNA Synthese eingeschränkt, sodass das Genprodukt TAZ in verminderter Menge vorliegt.

Dafür wurde der Hälfte der Zellkulturen Lipofektamin RNAiMAX Reagenz und Taz siRNA (Taz) zugegeben, alle anderen Zellkulturen dienten als Wildtyp Kontrolle. Um zu sehen ob diese Manipulation tatsächlich zum Knock-down des TAZ-Gens führte, wurde die Expression des TAZ mittels Echtzeit-RT-PCR gemessen. Diese Messung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Lendeckel des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Die Analyse erfolgte exemplarisch an vier unabhängigen Zellproben. 24 Stunden, 48 Stunden sowie 72 Stunden nach der Chemikalienzugabe wurde die relative TAZ-mRNA-Menge sowohl bei den mit Taz siRNA als auch bei den mit Opti-MEM behandelten Zellen gemessen.

Dafür wurde die Gesamt-RNA der C6-Zellen mit und ohne Taz siRNA unter Verwendung des innuPrep-RNA-Mini-Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die RNA wurde mit einem Revert AidTM Erststrang-cDNA-Synthesekit unter Verwendung von Oligo-dT-Primern revers transkribiert. Die RT-qPCR wurde in einem CFX96-Thermocycler durchgeführt und anschließend mit Hilfe einer Software ausgewertet. Ein detaillierter Ablauf ist der zugehörigen Publikation zu entnehmen [43].

2.2.2 Versuchsaufbau

In diesem Abschnitt ist der Aufbau und Ablauf der Untersuchungen dargestellt.

Die Untersuchungen beinhalteten Experimente mit 6 Zellkulturen, die unter gleichen Voraussetzungen durchgeführt wurden. Jedes der Experimente umfasste einen elftägigen Zeitrahmen. Am Tag 1 wurden die Gliomzellen aufgetaut und in eine Zellkulturflasche überführt. Tag 2 beinhaltete die Beschichtung der Petrischalen. Am Tag 4 wurden die Zellen ausgesät. Am Tag 7 erfolgte ein Mediumwechsel. Tag 8 beinhaltete die Zugabe des Chemikaliengemischs mit Lipofektamin RNAiMAX Reagenz und Taz siRNA, beziehungsweise des Kontrollgemischs Opti-MEM (Minimal Essential Medium) und die 2-Stundenwert-Messungen (Atmung, Protein, MTT). Des Weiteren wurden 2-Stundenwert-Proben für die Cardiolipin-, FS- und Citratsynthasebestimmung gefrierkonserviert. Am Tag 9 erfolgte der Zusatz von Linolsäure (LS), beziehungsweise Methanol (Meth.) zur Kontrolle. Am Tag 11 fanden die 72-Stundenwert-Messungen (Atmung, Protein, MTT) statt. 72-Stundenwert-Proben wurden für die spätere Cardiolipin-, FS- und Citratsynthasebestimmung konserviert. Die Auswertung der eingefrorenen Proben erfolgte separat nach Ablauf dieser Versuche. Zur Übersicht ist der zeitliche Ablauf in Abbildung 4 dargestellt.

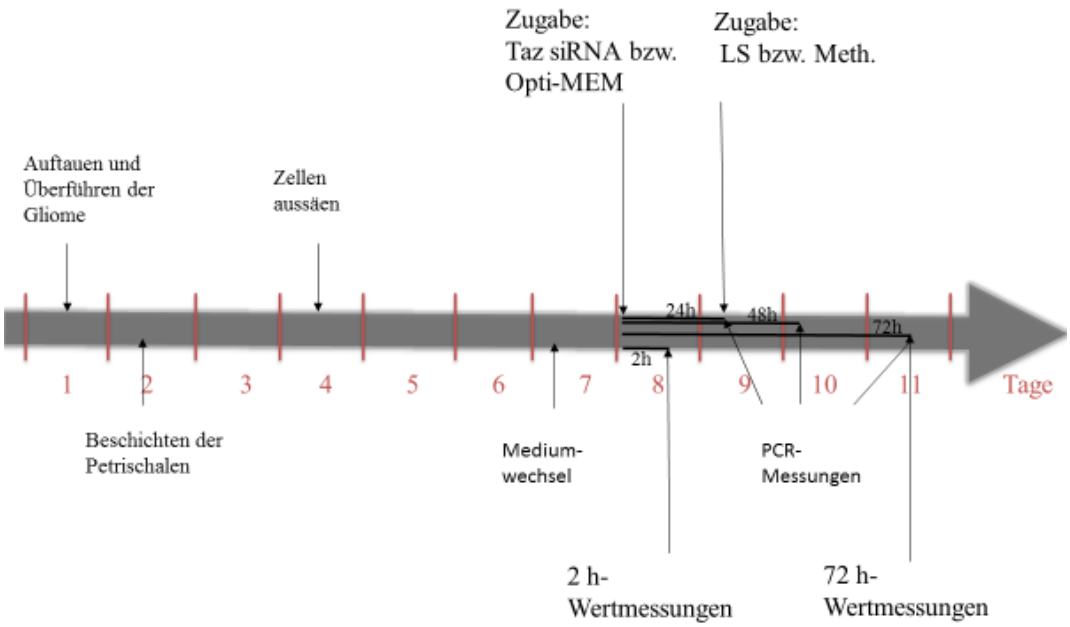

Abbildung 4: Zeitstrahl zum Ablauf der Untersuchungen

Jedes Experiment hatte einen Umfang von 88 Kulturschalen. Die Hälfte der Kulturschalen wurde mit dem Lipofektamin RNAiMAX Reagenz und Taz siRNA behandelt. Diese Zellen

wurden mit „Taz siRNA“ gekennzeichnet. Die andere Hälfte der Petrischalen erhielt zur Kontrolle die gleiche Menge Opti-MEM. Erste Messungen zur Auswirkung der Chemikalien mit jeweils 16 Petrischalen pro Ansatz folgten nach 2 Stunden. Jeweils die Hälfte der 28 verbliebenen Zellkulturen eines Ansatzes wurde mit Linolsäure, die andere Hälfte mit gleicher Menge Methanol zur Kontrolle versetzt. So entstanden vier Ansätze mit je 14 Kulturschalen der gleichen Chemikalienzugaben, mit denen weitere Messungen erfolgten. Ein Überblick ist in Abbildung 5 dargestellt.

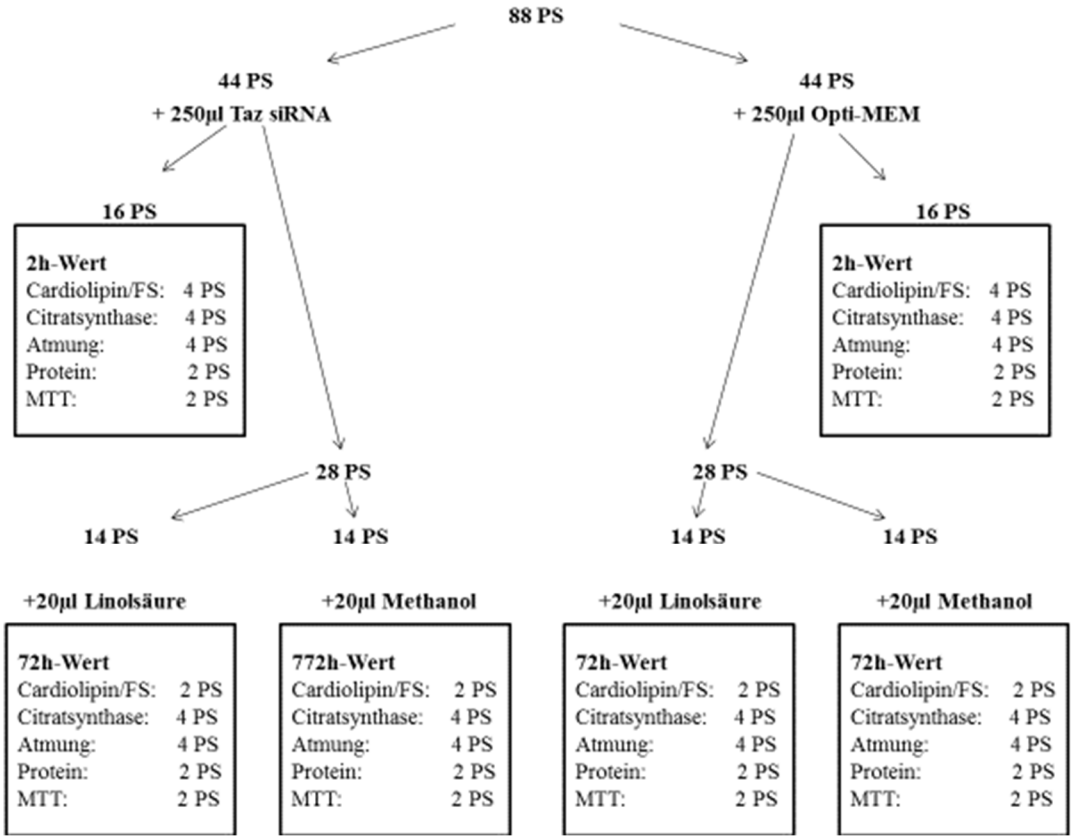

Abbildung 5: Übersicht der Organisation der Messungen
PS: Petrischalen

2.2.3 Zellen auftauen

Die C6-Glioma-Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff (-195 °C) im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Es folgte die Überführung der Zellen zusammen mit 5 ml ihres Nährmediums Dulbecco's Modifiziertes Medium (DMEM) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen. Einem ein Liter Medium wurde zuvor 30 ml 3 % FKS (-20 °C) und 5 ml 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (-20 °C), 1,5 g Glucose und 3,7 g $NaHCO_3$ hinzugefügt. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 1500 U/min durch eine Zentrifuge 5403 von Eppendorf zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Nährmedium resuspendiert und zu

weiteren 5 ml Medium in eine Zellkulturflasche (25 cm^2/50 ml) gegeben. Die Zellen kultivierten bei leichter Öffnung der Zellkulturflasche bei 37 °C unter 5 % CO_2 im Brutschrank für 72 Stunden.

2.2.4 Beschichten der Petrischalen

Für das spätere Aussäen der Zellen wurden 88 beschichtete Petrischalen (Durchmesser: 35 mm, Volumen: 2ml) benötigt. Die Beschichtung diente zur Haftung der Tumorzellen am Petrischalenboden. Dazu wurde Poly-D-lysine hydrobromide, in Aqua dest. gelöst, verwendet. Das Poly-D-lysin-Aliquot (100 µg/ml) wurde im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest. gemischt (Endkonzentration 1 µg/ml) und davon je 1 ml in jede Petrischale pipettiert. Die Schalen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen, anschließend wurde der lose Rest abgesaugt und die Petrischalen mit je 2 ml sterilem PBS (Phosphate buffered saline) satt gespült. So wurde mit allen 88 Petrischalen verfahren. Bis zur Aussaat wurden die Petrischalen in der sterilen Werkbank belassen.

2.2.5 Zellzählung und Zellaussaat

Nach 72-stündiger Inkubation im Brutschrank konnte das Medium aus der Zellkulturflasche abgekippt und zur Reinigung zweimalig mit warmen PBS gespült werden. Um die Tumorzellen vom Boden zu lösen wurden 2 ml warmes Trypsin-EDTA (0,05%/0,02% in D-PBS) in die Flasche gegeben und für 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C belassen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipette vom Boden gelöst, in 5 ml Medium im 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und das Zellsuspensat geschwenkt.

Zum Zählen der Zellen fand die Neubauer-Zählkammer (9 Quadrate) Verwendung. Hierfür wurden 100 µl des Suspensats in 1 ml Medium verdünnt (1:11) und daraus je 10 µl von beiden Seiten in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden bei 20-facher Vergrößerung alle Zellen der großen Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit dem Volumen eines Quadranten (10^4) und mit dem Verdünnungsfaktor (11) multipliziert und durch die Anzahl der Quadranten (9) dividiert. Das Ergebnis entsprach der Anzahl der Zellen pro Milliliter.

Die Aussaat sollte eine Zelldichte von 5x 10^3 Zellen/ml besitzen. Deswegen wurde die Menge des Zellsuspensats errechnet, welche zu 250 ml Medium gegeben werden muss, um eine Lösung herzustellen, welche bei Entnahme von 2 ml Lösung etwa 5×10^3 Tumorzellen enthält. Dafür wurde die Menge des Mediums (250 ml) mit 5 x 10^3 multipliziert und durch die zuvor errechnete Zellzahl dividiert. Das Ergebnis ist die Menge des Zellsuspensats in ml, die zu

250 ml Medium gegeben wurde. Aus diesem Gemisch wurden je 2 ml in alle 88 Petrischalen gegeben. Die Petrischalen kultivierten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2.

$$\frac{250 \text{ ml Medium} \times 5 \times 10^3 Zellen/ml}{\text{Zellzahl} \times 10^3 \text{ Zellen/ml}} = \text{Aussaatvolumen in ml}$$

2.2.6 Nährmediumwechsel

Für ein optimales Tumorzellwachstum erfolgte ein Mediumwechsel 72 Stunden nach Aussaat der Zellen. Dafür wurde das alte Medium aus den Petrischalen abgesaugt und erneut 2 ml DMEM 3 % FKS in jede Schale gegeben. Anschließend wurden die Petrischalen in den Brutschrank zurückgesetzt.

2.2.7 Erste Chemikalienzugabe

Einen Tag nach dem Mediumwechsel war das Zellwachstum weit genug fortgeschritten, es folgte die Chemikalienbehandlung. Dafür wurde ein Chemikaliengemisch aus 15 ml Opti-MEM, 450 µl Lipofektamin RNAiMAX Reagenz und 150 µl Taz siRNA angesetzt. In die Hälfte aller Petrischalen (44 Stück) wurde 250 µl des angesetzten Gemischs zugegeben. Dadurch kommt es durch Insertion von Fremd-DNA zum gezielten Herunterfahren des TAZ-Gens im Tumor, sodass kein vollständiges Transkript gebildet werden kann. Diese Zellkulturen wurden mit „Taz siRNA“ gekennzeichnet. In die andere Hälfte wurde zur Kontrolle die gleiche Menge Opti-MEM zugegeben und die Petrischalen mit „Opti-MEM“ beschriftet. Dies ist ein Nährmedium, welches weder die Wachstumsrate noch die Morphologie der Zellen beeinflusst und damit zu keiner Manipulation führt. Für die Zellkultivierung wurden die Petrischalen wieder in den Brutschrank gestellt.

2.2.8 2-Stundenwert-Messungen

2.2.8.1 Probenvorbereitung für Cardiolipin-, Fettsäure- und Citratsynthase-Messung

Für die Probenvorbereitung zur 2-Stundenwert-Messung von Cardiolipin/FS und Citratsynthase wurden 16 Petrischalen aus dem Brutschrank benötigt. Davon war die Hälfte den mit Taz siRNA manipulierten Kulturen zugehörig, die restlichen Petrischalen gehörten zur Kontrollgruppe. Es wurden von den Proben einer Chemikalienzugabe vier Petrischalen für die Cardiolipin- und FS-Bestimmung, sowie vier Schalen für die Citratsynthasebestimmung benötigt. Aus allen Schalen wurden die Zellen vom Boden abgeschabt und das gesamte Volumen in zuvor beschriftete 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (Datum, Messmethode, Taz

siRNA oder Opti-MEM-Kontrolle, Anzahl des Experiments, Zeit nach Chemikalienzugabe) überführt. Die Kulturen wurden für 5 Minuten bei 2000 U/min mittels der Zentrifuge 5403 von Eppendorf zentrifugiert. Nun konnte der Überstand vorsichtig abgesaugt werden, sodass lediglich das Zellmaterial im Gefäß verblieb. Zur Haltbarmachung der Zellen wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße schnellstmöglich in flüssigen Stickstoff (-195 °C) gegeben und anschließend bei -80 °C gefrierkonserviert. Die Messungen mithilfe des Zellmaterials erfolgten aufgrund des hohen Arbeitsaufwands zu einem späteren Zeitpunkt.

2.2.8.2 Zellatmung

Die Bestimmung der Zellatmung diente dem Zweck, die Funktionalität der Mitochondrien zu untersuchen. Gemessen wurde dabei die Konzentration von O_2 in Abhängigkeit von der Zeit. Da Sauerstoff ein unabdingbares Edukt der oxydativen Phosphorylierung ist, lässt eine Verringerung der O_2-Konzentration auf eine aktive Atmungskette schließen. Gemessen wurde dabei die Maximalatmung, also jener Zustand, bei dem eine maximale Menge O_2 verbraucht wird. Um freien Zugang zu den Mitochondrien zu gewinnen, wurden die Proben homogenisiert und die Plasmamembranen permeabilisiert. Zur Bestimmung wurden vier Petrischalen mit dem Taz siRNA-Chemikaliengemisch und vier Schalen mit der Opti-MEM-Zugabe benötigt. Alle Zellen einer Zugabe wurden aus den vier Petrischalen abgeschabt und zusammen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Das Pellet wurde unter Verwendung eines Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert und für 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Zum Resuspendieren wurde dem Pellet 4 ml eines Mediums zugegeben, welches aus 10 mM KH_2PO_4, 0,5 mM EGTA, 60 mM KCl, 60 mM Tris- HCL-Puffer, 110 mM Mannitol und 1 mM freies Mg^{2+} (pH 7,4) besteht. Ein Aliquot aus 2 ml dieser Suspension wurde zur Messung des Sauerstoffverbrauchs in die Inkubationskammer der Clark-type-Elektrode gegeben. Die Temperatur wurde auf 30 °C festgelegt. Dafür musste der Oxygraph durch den Sauerstoffgehalt eines luftgesättigten Mediums mit 435 ng Atom/mL bei 30° C kalibriert werden. Anschließend wurden die Substrate zugegeben. Zunächst wurde 5 mM Glutamat und 5 mM Malat hinzugfügt, um die basale NADH-abhängige Atmung einzustellen. Dann erfolgte die Zugabe von 500 µM ADP, um die Atmung zu stimulieren. Durch die Zugabe von 10 mM Succhinat konnte die maximale Atmung erreicht werden. Die Atmung wurde für jede Zugabe für mindestens 3 Minuten aufgezeichnet, um so einen stabilen Wert ermitteln zu können.

Jede Atmungsrate wurde zunächst in %/mg/s ermittelt und der Mittelwert aller sechs Messwerte jeder Zugabe inklusive Standardfehler (SEM) bestimmt.

2.2.8.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry [44]. Im ersten Schritt wird ein blau-violetter Kupfer-Protein-Komplex im alkalischen Milieu gebildet. Im nächsten Schritt reduziert der Komplex ein zugegebenes Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagens, wobei Cu^{2+} im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu^{+} reduziert wird. Durch die Reduktion von Molybdat, beziehungsweise Wolframat des Reagens (von der Wertigkeitsstufe VI zur Wertigkeitsstufe IV) entstehen Mischoxide. Es kommt in Abhängigkeit von der Menge der vorhandenen Proteine zur intensiven Blauverfärbung. Unter Zuhilfenahme einer Eichkurve kann die Proteinmenge bestimmt werden.

Um erste Effekte des Chemikalienzusatzes zu untersuchen, wurden die Zellen für 2 Stunden im Brutschrank kultiviert. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung. Dies ist ein allgemeiner Parameter für die Zellmenge. Da sowohl die Proteine lebender wie auch toter Zellen bestimmt werden, gibt sie keine Auskunft über die Stoffwechselaktivität. Alternativ können die Zellen gezählt werden. Zur Bestimmung wurden zwei Petrischalen mit Taz siRNA und zwei Petrischalen der Kontrollgruppe mit Opti-MEM verwendet. Mit den vier Petrischalen wurde gleichermaßen verfahren. Das Medium wurde abgesaugt und zweimalig mit 2,5 ml kaltem PBS zur Reinigung gespült. Dabei war darauf zu achten, die Zellen nicht vom Boden zu lösen. Weiter wurde 500 µl der Detergens 1 % SDS/0,1M NaOH in die Petrischale gegeben. Durch die Kombination von Natriumdodecylsulfat (SDS) und NaOH kam es zur Lyse der Zellen, sodass die Proteine verfügbar wurden. Dann wurden die Zellen vorsichtig vom Petrischalenboden abgeschabt und das gesamte Volumen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Damit das Detergens besser reagieren konnte wurde das Eppendorfgefäß bei 95 °C in destilliertem Wasser gekocht. Es folgte ein kurzes Vortexen und Zentrifugieren (quick run bis 10.000 U). Von der Probe wurden 20 µl in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Hierzu wurde 1 ml Lösung C gegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehen gelassen. Lösung C musste dafür immer frisch angesetzt werden. Sie besteht aus Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50:1. Lösung A ist zusammengesetzt aus 0,1M NaOH, 4,0 g 2 % Na_2CO_3, 0,2 g 0,1 % SDS und 200 ml Aqua dest. Lösung B besteht aus 0,5 g 0,5 % $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, 1,0 g 1 % Natriumcitrat und 100 ml Aqua dest. Nach einer zehnminütigen Inkubation wurde 100 µl Folin-Reagenz (1:2 mit Aqua dest. verdünnt) zu den Proben gegeben, gevortext und bei Raumtemperatur für 30 Minuten stehen gelassen. Anschließend konnte bei 700 nm die Extinktion der Proben photometrisch bestimmt werden. Hierfür wurde ein Varian Cary 100 UV-Vis-Spektrometer verwendet. Zur Beurteilung der Messwerte kam ein Standard aus Rinderalbumin zum Einsatz. Zuvor vorbereitete Bovine Serum Albumin-Standards (BSA 0, 1,

2,5 mg/ml Aqua dest.) wurden als Duplikate aus -20 °C aufgetaut. Mit ihnen wurde gleichermaßen verfahren wie mit den Proben: Zugaben von 20 µl 1 % SDS/0,1 M NaOH, 1 ml Lösung C, 10-minütige Inkubation, 100 µl Folin-Reagenz, Vortexen, 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließende photometrische Messung.
Die gemessenen Extinktionswerte der Standarddoppelbestimmung wurden gemittelt und gegen deren bekannten Proteingehalt im Koordinatensystem aufgetragen. Es entstand eine Standardkurve y = a × x als Funktion des Proteingehalts (Abbildung 6). Diese Funktion war für alle gemessenen Proteinproben gültig.

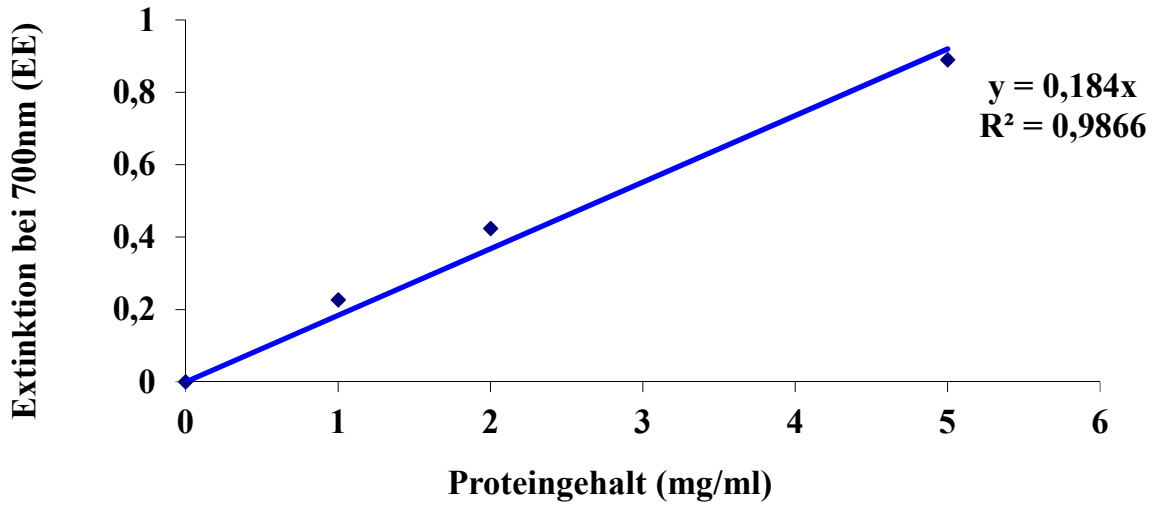

Abbildung 6: Beispiel einer Protein-Standardkurve nach Lowry

y: Absorption bei 700 nm
a: Steigung der Geraden (EE/mg/ml)
x: Proteingehalt (mg/ml)
Durch Umstellung der Gleichung in $x = \frac{y}{a}$ konnte der Proteingehalt der Proben ermittelt und der Mittelwert der beiden gleichen Versuche bestimmt werden. Auch der SEM wurde ermittelt.

2.2.8.4 MTT-Reduktion

Um die Stoffwechselaktivität aufzuzeigen muss die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt werden. Dafür eignete sich die MTT-Bestimmung. MTT (= 3- [4,5 Dimethylthiazol-2-yl] -2,2-diphenyltetrazoliumbromide) zeigt eine gelbe Farbe. Wenn MTT mittels Oxidoreduktase reduziert wird bildet sich der blau-violette Farbstoff Formazan. Formazan kann mit Hilfe von DMSO aus den Zellen gewonnen werden. Zur extrahierten Menge des Formazan ist die metabolische Aktivität der Zellen proportional. Da

eine starke Verfärbung sowohl an einer hohen Zellzahl mit geringer Aktivität als auch an wenigen Zellen mit hoher Aktivität liegen kann, muss das Ergebnis im Verhältnis zum Proteinwert (Zellzahl) gebracht werden.

Zur MTT-Bestimmung nach 2 Stunden wurden zwei Petrischalen mit TAZ-Knock-down und zwei Schalen mit Opti-MEM-Zugabe aus dem Brutschrank verwendet. In alle Schalen wurden 50 µl MTT-Stammlösung gegeben (6 mg MTT/1 ml PBS), die Petrischalen geschwenkt und dann für 30 Minuten im Brutschrank belassen, sodass die Reduktion ablaufen konnte. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und 1 ml DMSO-Gemisch (250 ml DMSO +2,5 ml 0,1 M NaOH) hinzugefügt. Nun konnte die Extinktion des Formazans bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden. Zum Nullen wurde ein 1 ml DMSO-Gemisch verwendet. Falls die Messwerte über dem Wert 2 lagen, mussten die Proben stärker mit dem DMSO-Gemisch verdünnt werden und der Messwert anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Dadurch konnte eine Trübung der Proben und das damit verbundene Streulicht vermieden werden.

Die Extinktionswerte jeder Doppelbestimmung wurden gemittelt und der SEM Wert bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert der MTT-Messung ins Verhältnis zum Mittelwert des Proteingehalts des gleichen Versuchs gesetzt. Somit konnte eine Aussage über die Stoffwechselaktivität in Abhängigkeit zur Zellmenge getroffen werden. Als Angabe wurde der relative Wert %-Kontrolle gewählt. Als Kontrollwert wurde die Zugabe Opti-MEM + Meth. festgelegt.

2.2.9 Zweite Chemikalienzugabe

24 Stunden nach der ersten Chemikalienzugabe folgte der zweite Zusatz zu den Kulturen. Dafür wurde eine 10 ml 5 mM Linolsäurelösung aus 16,5 µl Linolsäure und 10 ml Methanol als Lösungsmittel angesetzt. In die Hälfte aller noch vorhandenen Petrischalen, die in der ersten Chemikalienzugabe das Lipofectamin und die Taz siRNA erhalten haben (28 Stück), wurde nun 20 µl der hergestellten Linolsäurelösung zugegeben. Diese Zellen erhielten die Bezeichnung „Taz + LS“. Damit die andere Hälfte der Zellkulturen als Kontrollgruppe herangezogen werden konnte, erhielten sie 20 µl Methanol und wurden mit „Taz + Meth.“ bezeichnet. Diese Menge an Methanol nimmt erfahrungsgemäß keinen Einfluss auf die Zellkulturen. Die Kontrollkulturen, welche zuvor unter Opti-MEM gewachsen sind, erhielten ebenfalls hälftig 20 µl 5 mM Linolsäurelösung, beziehungsweise 20 µl Methanol. Sie wurden zur Unterscheidung mit „Opti-MEM + LS“ und „Opti-MEM + Meth.“ gekennzeichnet. Es entstanden dadurch vier verschiedene Zellkulturen mit den Chemikalienzugaben

Taz + Linolsäure, Taz + Methanol, Opti-MEM + Linolsäure und Opti-MEM + Methanol mit jeweils 14 Petrischalen.

2.2.10 72-Stundenwert-Messungen

72 Stunden nach der ersten Chemikalienbehandlung erfolgten dieselben Bestimmungen wie nach 2 Stunden. Für die Probenvorbereitungen der Cardiolipinbestimmung wurden je zwei Schalen pro Zugabe verwendet (insgesamt acht Schalen), die Citratsynthasebestimmung und die Zellatmung benötigten je vier Petrischalen pro Chemikaliengruppe (jeweils insgesamt 16 Schalen). Der Ablauf der Bestimmungen glich den 2-Stundenwert-Bestimmungen.

Für die Protein- und MTT-Bestimmung wurden ebenfalls je zwei Petrischalen pro Chemikalienzugabe untersucht (jeweils 2× Taz + LS, 2× Taz + Methanol, 2× Opti-MEM + LS, 2× Opti-MEM + Methanol). Auch hier glichen die Arbeitsschritte denen der Bestimmungen nach 2 Stunden.

2.2.11 Cardiolipinbestimmung

Anschließend erfolgten die Bestimmung der Cardiolipinmenge und eine Analyse des molekularen Cardiolipinmusters. Dafür wurde die Massenspektrometrie verwendet. Zur Bestimmung wurden die in -80 °C konservierten Proben aufgetaut und durch eine modifizierte Methode nach Folch das CL extrahiert [45]. Die Probe wurde in das Massenspektrometer eingebracht und mittels Elektrospray-Ionisation ionisiert. Die Tochter-Fragmente wurden nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis aufgetrennt und die getrennten Ionen detektiert.

Aus den Massenspektren konnten Rückschlüsse auf die Struktur und die Menge der Verbindung gezogen werden. Die Menge der molekularen Spezies wurde in Relation zum Gehalt an $(C18:2)_4$-CL gesetzt.

Anschließend konnte hierdurch der gesamte CL-Gehalt als Rechengröße ermittelt werden. Der detaillierte Ablauf der Bestimmung kann dem Methodenteil der Publikation „Cardiolipin composition correlates with prostate cancer cell proliferation" entnommen werden [35]. Ferner wurde die Menge des oxidierten Cardiolipin ($(C18:2)_3$-Monohydroxylinoley-CL) als Übergang von m/z 731,6 zu m/z 279,2 (Linolsäure) erfasst und in Relation zu [$(C18:2)_4$-CL + $C18:2)_3$-Monohydroxylinoley-CL] prozentual angegeben.

2.2.12 Im Cardiolipin gebundene Fettsäuren

Jedes CL besitzt vier gebundene FS. Diese FS unterscheiden sich in ihrer Kettenlänge und der Anzahl und Position der Doppelbindungen. Um festzustellen, welche Menge einer bestimmten

FS unter der Manipulation der Zellkulturen in das CL eingebaut wurde, wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Spezies und die Menge des Gesamt-CL in µg/mg Protein aus den CL-Ergebnissen verwendet. Aus diesen drei Werten wurde die Menge einer FS in der CL-Spezies in pmol/mg Protein berechnet. Die dazugehörige Formel lautet:

$$\text{FS-Menge im CL (pmol/mg Protein)} = \frac{\text{Anteil der Spezies (\%)} \times \text{Gesamt-CL (µg/mg Protein)} \times 1000000}{100 \times \text{Molmasse}}$$

Um von der im CL vorkommenden FS-Menge auf die gesamte Menge jeder einzelnen FS zu schließen, musste für jede FS erfasst werden, wie oft sie in den CL-Spezies vorkommt. Beispielsweise ist die FS C18:2 viermalig in CL $(18:2)_4$ enthalten, sodass die FS-Menge im CL mit 4 multipliziert wurde. So wurde die Menge der FS C18:2 in allen CL-Spezies berechnet und anschließend die Mengen summiert. Um die Einheit pmol/mg Protein in die Einheit nmol/ug CL umzurechnen, wurde das Ergebnis durch die CL-Gesamtmenge in µg/mg Protein geteilt. Anschließend wurde der Sättigungsgrad ermittelt, indem die FS-Menge in µg/mg Protein durch die Anzahl der Doppelbindungen geteilt wurde. Genauso wurde mit den FS C18:2, C18:1, C18:3, C16:0, C16:1, C20:0, C20:2, C20:3, C20:4 und C22:6 verfahren. Aus allen sechs Werten eines Ansatzes wurden für jede FS der Mittelwert mit dazugehörigem SEM sowie der Mittelwert der Doppelbindungen bestimmt. Zusätzlich wurde pro Versuchsansatz die Menge aller FS einer Kettenlänge erfasst (C16, C18 und C20).

2.2.13 Zelluläre freie Fettsäuren

Neben den im Cardiolipin gebundenen FS gibt es weiterhin freie zelluläre FS. Genauso wie die Untersuchung der im CL eingebauten FS wurden hierfür die Zellpellets der Cardiolipinbestimmung verwendet. Die verwendete Analysemethode zur Untersuchung der freien zellulären FS stellt die Gaschromatographie (GC) dar. Die Methode der Probengewinnung erfolgte wie bei Nourooz-Zadeh et al. beschrieben [46]. Dafür wurden 100 µl der Zellsuspension mit 20 µl (20 µg in Ethylacetat) Heptadecanoic Säure als interner Standard gemischt. Zum Homogenat wurden 900 µl Wasser und 1980 µl Ethylacetat zugefügt und gevortext und für 5 Minuten bei 2500 x g zentrifugiert. Die obere Schicht konnte anschließend in ein Reagenzglas abgeschöpft werden und 1,0 ml Ethylacetat zur verbleibenden wässrigen Phase zugegeben werden. Erneut erfolgten Vortexen und Zentrifugation. Die organische Schicht verdampfte unter Stickstoffzufuhr. Nach der Entfernung aller wasserlöslichen Bestandteile der Zellpellets, konnte das Lipidextrakt aufbereitet werden. Dafür wurden 500 µl Boron Trifluoride-Methanol (14 %) Lösung zum getrockneten Lipid zugegeben und bei 60 °C

für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 500 µl Wasser und 1,0 ml n-Hexan zugegeben, gevortext und zentrifugiert. Die n-Hexan beinhaltende Schicht wurde gewonnen und getrocknet. Der Rückstand wurde erneut in 100 µl n-Hexan gelöst und davon 1 µl in das CP-WAX 58 (FFAP), in die Säule (25 m x 0,32 mm innere Abmessung) injiziert und bei einem Temperaturgradienten von 120- 250 °C/min gemessen. Das Signal wurde von einem Ionisationsdetektor GC 3800 generiert. Die Bestimmung der FS Gehalte erfolgte anhand von Eichkurven mit entsprechenden Standardlösungen.
Die Auswertung der GC Daten beschränkte sich auf die Menge der FS C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 und C20:4 in µg/mg Protein. Weiterhin wurden ihre prozentualen Anteile an der Gesamtmenge der freien FS bestimmt. Die Gesamtmenge der FS besteht dabei nur aus den benannten FS-Formen. Die Ergebnisse eines jeden Ansatzes wurden gemittelt und zugehörige SEM Werte angegeben.

2.2.14 Citratsynthasebestimmung

Die Citratsynthase ist ein mitochondriales Markerenzym, damit ist die Citratsynthaseaktivität ein Maß für die Mitochondrienmenge. der Tumorzellen. Um die Aktivität zu erfassen, läuft folgende Reduktion mithilfe der Citratsynthase ab:

Acetyl-CoA + Oxalacetat + H_2O → Citrat + CoA

Anschließend erfolgt durch das Produkt CoA die Reduktion von DTNB zum Farbkomplex CoA-DTNB, dessen Extinktion mittels Photometer gemessen wird. Diese ist proportional zur Konzentration des Farbkomplexes.
Alle Chemikalien (außer Tris-HCl-Puffer) mussten während der Messungen gekühlt werden. Der Puffer wurde vor der Messung im 30°C warmen Wasserbad erwärmt und während der Messung dort belassen. Die bei -80°C konservierten Citratsynthaseproben (4-fach) wurden aufgetaut und je zwei Pellets der 2- beziehungsweise 72-Stunden-Messungen miteinander gepoolt. Alle Proben wurden dreimalig in flüssigen Stickstoff (-195 °C) schockgefroren und anschließend im warmen Wasserbad (30 °C) aufgetaut, um durch Zerstörung der Zellmembran Zugang zu intrazellulären Bestandteilen zu erhalten. Zur photometrischen Messung fand das Programm Kinetics Verwendung. Es waren folgende Einstellungen vorzunehmen:

Cary 100 UV-Vis-Spektrometer: Wellenlänge 412 nm, Ave Time 1,000 s, 0,00-5,00 min,
Options: UV/VIS, Block 30 °C, Probe 1,

Analyse: Display Fit,
Report: Results, Graph, Parameters.

Das Gerät wurde mit 1 ml Tris-Puffer (pH 8,0) genullt. Anschließend erfolgte die eigentliche Messung. Dafür wurden 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTNB, 1 mM Oxalacetat und 0,2 mM Acetyl-CoA in eine Küvette gegeben und vermischt. 30 Sekunden nach dem Start der Messung erfolgte der Zusatz von 20 µl Citratsynthaseprobe. Nachdem die Reaktion stattfand, errechnete das Programm über die Funktion Recalculate aus einem Extinktionsgraphen den Slopewert (Extinktionsänderung pro Zeiteinheit). Die Messung wurde mit allen Citratsynthasepellets zweifach ausgeführt, sodass zu jedem Versuchsansatz eine zweifache Doppelbestimmung ablief. Der Slopewert gibt die Mitochondrienanzahl unabhängig vom Probevolumen und der Proteinmenge an. Im Verhältnis zum Probevolumen und in Referenz zur Proteinmenge der Probe ist er ein Parameter für die Zellaktivität ($\frac{\text{Slope Probevolumen (ml)}}{\text{Proteinmenge (mg)}}$). Zur besseren Darstellung wurde die Gesamtaktivität weiterhin in Unit/mg angegeben. Zur Berechnung wurde das Lambert-Beer'sche-Gesetz angewandt und nach c aufgelöst:

$$c = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times d}$$

E: Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ($\frac{1}{\text{min}}$), entspricht dem Slope

c: Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit ($\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$)

ε: dekadischer Extinktionskoeffizient ($\frac{\text{l}}{\text{mmol} \times \text{cm}}$), = 13,6 $\frac{\text{l}}{\text{mmol} \times \text{cm}}$

d: Schichtdicke des durchstrahlten Körpers (cm), hier Dicke der Küvette, = 1 cm

Wenn die Konzentration der absorbierenden Substanz (c) auf das verwendete Probevolumen bezogen wird, erhält man die katalytische Aktivität des Enzyms, angegeben in Unit (U):

$$U = \frac{\text{Slope}}{\varepsilon \times d \times V}$$

U: International Unit ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$)

V: Volumen der Probe (ml), 0,02 ml

Eine Unit entspricht der Enzymmenge, die einen Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute katalysiert. Wenn man die katalytische Aktivität auf die Proteinmenge bezieht, erhält man die spezifische katalytische Aktivität (Unit/mg).

Aus den vier Bestimmungen eines Versuchsansatzes wurden anschließend der Mittelwert sowie der SEM berechnet.

2.2.15 Proteinbestimmung nach Bradford-BioRad

Um die Zellaktivität in Abhängigkeit von der Zellmenge darzustellen, wird ein Proteinwert benötigt, welcher ins Verhältnis gestellt werden kann. Dafür wurde die Proteinbestimmung nach Bradford-BioRad genutzt. Diese zweite Methode stellt eine schnelle, im Rahmen des komplexen Versuchsablaufs einfach zu handhabende Möglichkeit zur Proteinbestimmung dar. Die Messung der Proteinmenge erfolgt aus den gleichen Pellets wie die Citratsynthasebestimmung, sodass die Werte unmittelbar aufeinander bezogen werden können. Dadurch kann eine Aussage über die spezifische Aktivität der Citratsynthase getroffen werden. Der Bestimmung liegt die Farbveränderung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau als Folge der Komplexbildung mit Proteinen zugrunde. Wenn der Farbstoff an Protein bindet liegt er in einer dunkelblauen Farbe vor. Ohne Protein ist er braun-blau. Die Extinktionswerte der Lösungen sind bei ihrem Absorptionsmaximum 595 nm direkt proportional zu ihrer Proteinkonzentration. Die genaue Proteinmenge lässt sich mithilfe von Eichlösungen mit Rinderserumalbumin (RSA) bestimmen. Für diese Lösungen wurden vier standardisierte 100 µl RSA-Proben mit unterschiedlichen Verdünnungen vorbereitet. Die Vorbereitung und photometrische Messung der Proben erfolgte in Doppelbestimmung wie bei Bradford beschrieben [47]. Die Zeit wurde dabei auf 3,0 Sekunden eingestellt. Die Absorptionswerte der gleichen Standards wurden gemittelt und als lineare Funktion dargestellt. So konnte der genaue Proteingehalt der Proben errechnet werden. Die Zellaktivität (Slope/Probevolumen) konnte nun ins Verhältnis zum Proteingehalt gestellt werden. Der Wert gibt die Zellaktivität in Abhängigkeit zur Zellmenge an. Auch hier wurde der Mittelwert eines Versuchs aus vier Proben ermittelt und die zugehörigen SEM Werte angegeben.

2.2.16 Statistische Auswertung

Für alle Bestimmungen eines Experiments wurden Duplikate angefertigt. Aus allen sechs Experimenten wurden für jede Bestimmung die Werte der gleichen Zugabe zu einem Mittelwert zusammengefasst und die Standardfehler berechnet. Nun konnten die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze mit und ohne Manipulation miteinander verglichen werden. Zur Analyse der statistischen Signifikanz wurde für die 72-Stunden-Werte die Varianzanalyse ANOVA in Kombination mit Post-hoc-Tests (Tukey, Sidak, Dunn) durchgeführt und ist in den Abbildungen speziell aufgeführt. Es wurde festgelegt, dass alle Ergebnisse als signifikant gelten, die kleiner als das Signifikanzniveau von $p= 0,05$ sind. Für eine bessere Übersicht sind nachfolgend die Ergebnisse, welche diese Anforderung im Sinne einer konzentrationsabhängigen Signifikanz in Bezug zum dazugehörigen Kontrollwert erfüllen, gesondert mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Als Kennzeichnung gilt: * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$, ** - $p<0,001$ und **** - $p<0,0001$. Als Kontrolle fungiert der Versuchsansatz Opti-MEM + Meth.

3 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse des Zellkulturexperiments dargestellt. Dabei liegt der Schwerpunkt bei der Präsentation der 72-Stunden-Werte. Die Versuchsansätze nach 2 Stunden stellen dagegen die Kontrolle einer ordentlichen Kultivierung dar. Eine Erklärung für die Bevorzugung dieser Darstellungsweise findet sich im Diskussionsteil.

3.1 Polymerase-Kettenreaktion-Bestimmung (PCR)

Um den Einfluss des CL auf die Bioenergetik und Zellproliferation zu untersuchen, wurde ein Knock-down des Tafazzin-Gens mittels Lipofektamin RNAiMAX Reagenz und der Taz siRNA angewandt. Die Erfolgskontrolle des Knock-downs erfolgte mittels PCR-Messung der relativen TAZ-mRNA-Menge nach 24, 48 und 72 Stunden. Das Zellexperiment wurde mit vier unabhängigen Zellproben wiederholt. Es konnte bei allen durchgeführten Experimenten festgestellt werden, dass die Manipulation des TAZ-Gens zur signifikanten Verminderung der TAZ-mRNA-Synthese führte. 72 Stunden nach der gezielten Insertion von Fremd-DNA konnte im Mittel eine Reduzierung der mRNA-Menge auf unter 15 % des ursprünglichen Wertes festgestellt werden. Die Kontrollgruppen zeigten dagegen keinen Knock-down des TAZ-Gens, ihr Mittelwert wurde auf 100 % gesetzt. Dieses Ergebnis beweist, dass das Zellmodell funktionierte und daher die Grundvoraussetzung der Arbeit erfüllt ist: Die Aktivität des Remodeling-Enzymkomplex Tafazzin ist limitiert. Die Untersuchungen der relativen TAZ-mRNA-Menge nach 24 Stunden und 48 Stunden beinhalten ähnliche Verminderungen des Transkripts wie nach 72 Stunden und zeigen somit, dass die verminderte Expression schon zu einem frühen Zeitpunkt besteht und über die gesamte Kulturzeit von 72 Stunden konstant anhält.

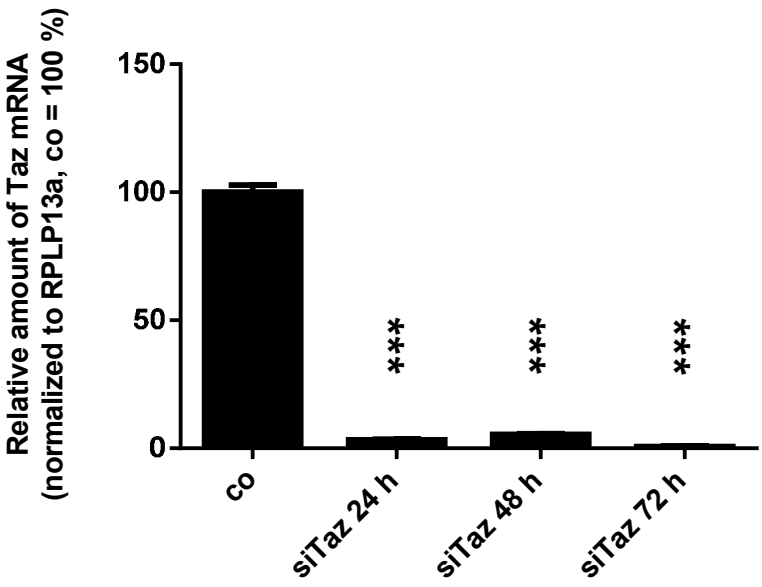

Abbildung 7: Relative TAZ-mRNA-Menge in % (normiert durch RPLP13a, Kontrolle (co) = 100 %), Prof. Dr. Uwe Lendeckel, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Die Abbildung zeigt die mittlere Menge der TAZ-mRNA von vier separaten Zellproben 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit dem Lipofektamin RNAiMAX Reagenz und der Taz siRNA. Diese Ansätze sind mit siTaz gekennzeichnet. Die Kontrolle (co), stellt die mit Opti-MEM behandelten Zellproben dar und wurde auf 100 % gesetzt. In den Taz siRNA-Versuchsansätzen kam es durch Insertion von Fremd-DNA zum gezielten Knock-down des TAZ-Gens der Tumorzellen, sodass kein vollständiges Transkript gebildet werden konnte.

3.2 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Cardiolipin

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Zellproliferation und Cardiolipin wurden in der Arbeit zwei Strategien verfolgt, um die Zellproliferation zu beeinflussen: Die Aktivitätslimitierung von Tafazzin und Applikation von Linolsäure. Zunächst wird der Einfluss dieser Interventionen auf das Cardiolipin dargestellt. Dafür erfolgte 2 und 72 Stunden nach der Manipulation des TAZ jeweils eine Analyse des CL. Ferner wurde der CL-Metabolismus durch die Zugabe von LS beeinflusst. Die Applikation von LS beeinflusst einerseits den zellulären Fettsäurestoffwechsel und andererseits den CL Stoffwechsel, da LS bevorzugt in CL eingebaut wird und somit zu einer Variation der CL Zusammensetzung führt.

3.2.1 Cardiolipinmenge

Es erfolgte die Untersuchung der Gesamt-CL-Menge und dessen Abhängigkeit von TAZ sowie Veränderungen der CL-Menge durch die Zugabe von LS. Diese konnte durch die Summe des Gehalts aller molekularen CL-Spezies kalkuliert werden. In diesem Zusammenhang war die Beeinflussung der Cardiolipinoxidation von Interesse, um eine mögliche Schädigung des CL

zu erfassen. Daher wurde als Ausdruck der oxidativen Prozesse auch der prozentuale Gehalt an oxidiertem Cardiolipin untersucht. Hierfür diente als Referenzspezies das (C18:2)$_3$-Monohydroxylinoleyl-Cardiolipin.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse für das Gesamt-CL nach 72 Stunden graphisch dargestellt, die Abbildung 9 enthält die Daten der oxidierten CL-Menge nach 72 Stunden.

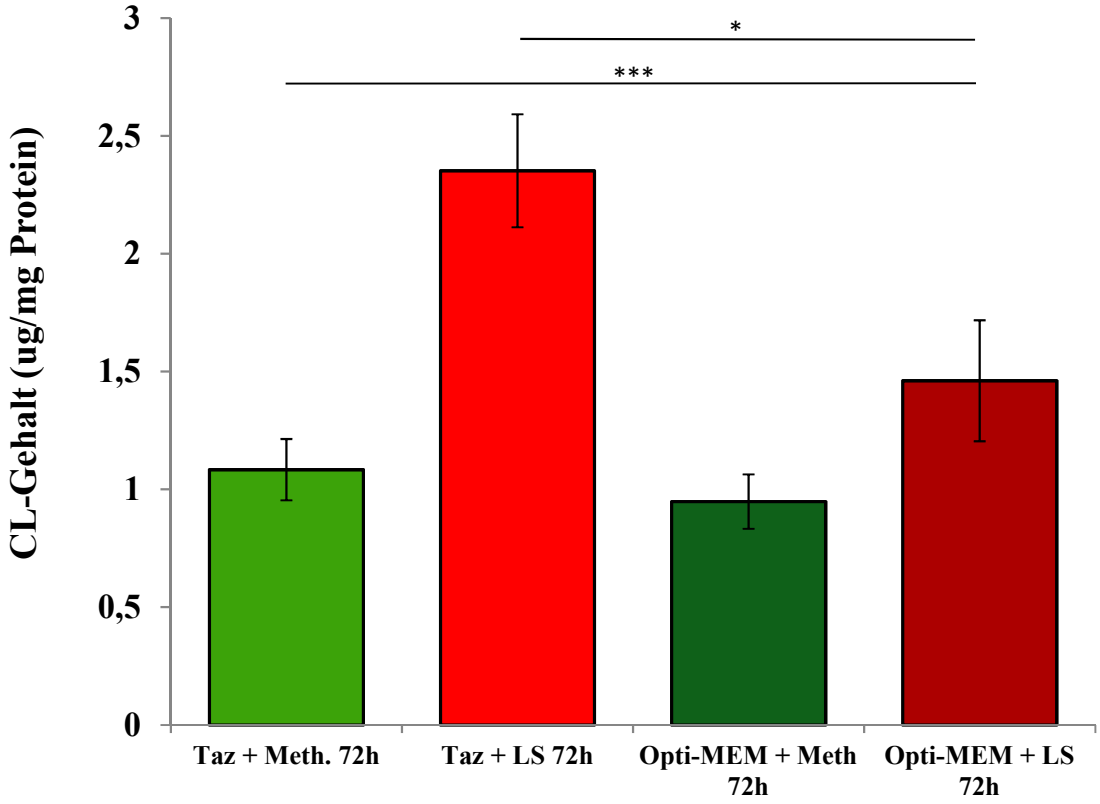

Abbildung 8: Messung der CL-Gesamtmenge
Die Zellkulturen wurden mit den Zugaben Taz oder Opti-MEM und später mit Methanol oder Linolsäure beimpft. 72 Stunden nach dem ersten Zusatz konnte die CL-Menge gemessen werden. Jede Säule zeigt den Mittelwert der Gesamtmenge in µg pro mg Protein eines Versuchsansatzes. Der SEM ist für jeden Versuchsansatz dargestellt. Mittels ANOVA in Kombination mit dem Tukeys Post-hoc-Test wurde eine Analyse der signifikanten Veränderung im CL-Gehalt durchgeführt. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Säulen zeigen signifikante Unterschiede der CL-Mengen: * - $p<0.05$ und *** - $p<0.001$.

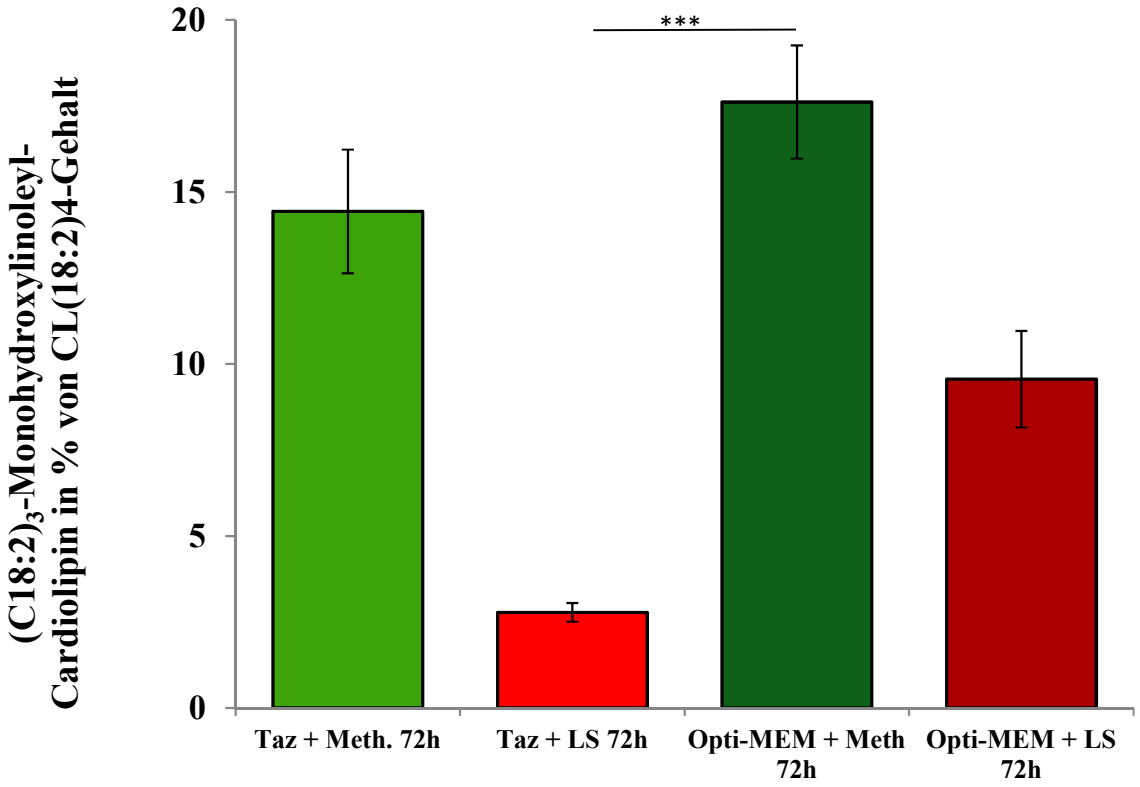

Abbildung 9: prozentualer Gehalt an oxidiertem Cardiolipin
72 Stunden nach der ersten Manipulation wurde die Menge der Referenzspezies $(C18:2)_3$-Monohydroxylinoleyl-Cardiolipin gemessen. Jede Säule stellt den Mittelwert eines Versuchsansatzes prozentual von der Menge an CL $(18:2)_4$ dar. Der SEM ist für jeden Versuchsansatz dargestellt. Mittels des nichtparametrigen ANOVA-Tests kombiniert mit dem Dunn Post-hoc-Test konnte eine Analyse der signifikanten Veränderung dargestellt werden. Die mit Sternen (*** - $p<0.001$) gekennzeichnete Säulen zeigt einen signifikanten Unterschied der CL-Menge.

Der Versuchsansatz Taz nach 2 Stunden zeigt eine mittlere CL-Menge von 0,954 ± 0,124 µg/mg Protein. Der zu $(C18:2)_3$-Monohydroxylinoley-CL oxidierte Anteil liegt bei 19,64 %. Der Ansatz der Zugabe Opti-MEM, welcher ebenfalls nach 2 Stunden ausgewertet wurde, besitzt eine mittlere CL-Menge von 1,261 ± 0,457 µg/mg Protein und einen oxidierten Anteil von 22,02 %. Nach 72 Stunden liegt die CL-Menge des Ansatzes Taz + Meth. bei 1,083 ± 0,130 µg/mg Protein. Der oxidierte CL-Anteil liegt bei 14,43 %. Bei Zugabe von Taz + LS kann im Mittel eine CL-Menge von 2,351 ± 0,40 µg/mg Protein ermittelt werden. Lediglich ein CL-Anteil von 2,78 % zeigt sich oxidiert. Der Ansatz Opti-MEM + Meth. 72 h besitzt eine CL-Menge von 0,948 ± 0,115 µg/mg Protein. Der oxidierte Anteil beläuft sich auf 17,61 %. In dem Versuchsansatz Opti-MEM + LS 72 h kann gemittelt eine CL-Menge von 1,461 ± 0,257 µg/mg Protein festgestellt werden. 9,56 % der CL-Menge erfährt eine Oxidierung.

Da es keine signifikanten Differenzen im Gesamt-CL zwischen den Ansätzen Taz + Meth. und Opti-MEM + Meth. gibt, kann der Knock-down des TAZ alleine den Gehalt nicht beeinflussen.

Dafür beeinflusst die Zugabe von LS die CL-Menge, zwischen der Kontrolle Opti-MEM + Meth. und dem Ansatz Opti-MEM + LS konnte der CL-Gehalt etwa auf das 1,5-fache gesteigert werden. Diese Veränderung gilt jedoch nicht als signifikant. Etwas deutlicher, jedoch ebenfalls nicht signifikant verändert ist der LS-bedingte Anstieg des CL-Gehalts bei Vergleich des Ansatzes mit heruntergefahrenem TAZ mit dem Ansatz mit zusätzlicher LS-Zufuhr. Auch die signifikante Erhöhung des CL-Gehalts im Ansatz Opti-MEM + LS im Vergleich zum Ansatz Taz + Meth. kann für eine Erhöhung des CL-Gehalts durch LS sprechen.
Unter Anwesenheit von LS zeigt sich eine signifikante Erhöhung der CL-Gesamtmenge bei Knock-down des TAZ im Vergleich zu dem Ansatz mit funktionsfähigem TAZ. Der TAZ-Knock-down bedingt in Kombination mit LS eine verstärkte CL-Synthese, wodurch die CL-Menge des Versuchsansatzes Taz + LS besonders stark erhöht ist.
Es zeigt sich, dass die TAZ-Inhibition nur gemeinsam mit der Zugabe von LS die CL-Spezies stark vermehrt. Die Verminderung der TAZ-Expression scheint folglich direkten Zusammenhang mit der Synthese großer Mengen an CL zu besitzen, die allerdings nur unter LS-Gabe sichtbar wird. Ein hohes Angebot an LS, aber ein voll funktionstüchtiges TAZ-Gen, so wie es bei dem Versuchsansatz Opti-MEM + LS zutrifft, lässt die CL-Menge im Vergleich zum Ansatz Taz + Meth. ebenfalls signifikant steigen. Alleiniger Knock-down des Gens, aber fehlender Überschuss an LS führt zu keiner starken Veränderung der Gesamt-CL-Menge.

Die Menge des oxidierten CL nach 72 Stunden wurde mittels ANOVA und des Dunn Post-hoc-Tests untersucht. Sie unterschied sich bis auf den Vergleich zwischen dem Ansatz Taz + LS und dem Kontrollversuchsansatz Opti-MEM + Meth. in den Versuchsansätzen nicht signifikant voneinander. Der p-Wert liegt bei der einzigen signifikanten Veränderung bei $p = 0{,}0003$. In allen Versuchsansätzen bis auf Taz + LS ist die oxidierte Anzahl mit Werten zwischen 10 % und 22 % recht hoch. Der Ansatz Taz + LS dagegen zeigt mit einer oxidierten Menge von unter 3 % des CL-Gehalts einzig eine deutliche Verminderung der Oxidation. Daraus kann man folgern, dass die Inhibition des TAZ bei einem guten Angebot an LS die Oxidierung mindert. Ein gutes Angebot an LS reicht dagegen alleine nicht aus, um die Oxidierung signifikant zu mindern.

3.2.2 Molekulare Cardiolipinspezies

Es wurde die CL-Menge von 19 molekularen CL-Spezies bestimmt und prozentual zur Gesamtmenge angegeben. Die Bestimmung der absoluten Menge der molekularen CL Spezies

erfolgte unter Verwendung eines $(C18:2)_4$-Standards. Alle 72-Stunden-Werte der 19 Spezies sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: prozentuale Verteilung der 19 analysierten CL-Spezies
Die Experimente unterscheiden sich anhand der Zugabe Taz oder Opti-MEM und der zweiten Zugabe Methanol oder LS. Zusätzlich zum Mittelwert wurde der SEM ermittelt. Weiterhin ist die Masse der CL-Spezies angegeben. Die farblich markierten Spezies zeigen innerhalb einer Reihe signifikante Unterschiede, diese wurde mittels des zweifaktoriellen ANOVA-Tests in Kombination mit dem Sidak Post-hoc-Test bestimmt. Dabei gilt * - p<0.05; ** - p<0.01, *** - p<0.001, **** - p<0.0001, a: Differenz zwischen Taz + Meth. und Opti-MEM + Meth. mit *; b/c: Differenz zwischen Opti-MEM + Meth. und Opti-MEM + LS mit b = **** und c= **; d/e/f: Differenz zwischen Taz + Meth. und Taz + LS mit d= ****, e= **, f= *; g/h: Differenz zwischen Opti-MEM + LS und Taz + LS mit g= **** und h= *.

Zugaben		TAZ + Meth.	TAZ + LS	Opti-MEM + Meth	Opti-MEM + LS
CL-Spezies	Masse	CL-Menge (% des Anteils aller gemessenen Spezies)			
$(C18:2)_4$	723.6	**0,371 ± 0,159 d**	**11,599 ± 4,100 d, g**	**0,326 ± 0,159 b**	**5,715 ± 3,6269 b, g**
$(C18:2)_3$/C18:1	724.6	**0,582 ± 0,257 d**	**18,968 ± 1,637 d, g**	**0,489 ± 0,212 b**	**10,880 ± 3,835 b, g**
$(C18:2)_2$/$(C18:1)_2$	725.6	**1,778 ± 0,512 d**	**16,322 ± 2,560 d**	**2,078 ± 0,433 b**	**14,802 ± 2,140 b**
C18:2/C18:1/$(C16:0)_2$	700.6	0,398 ± 0,146	0,83 ± 0,460	0,487 ± 0,127	0,73 ± 0,270
$(C18:1)_2$/$(C16:0)_2$	701.6	**29,917 ± 6,298 d**	**7,521 ± 0,578 d**	**25,980 ± 5,139 b**	**9,202 ± 2,158 b**
$(C18:2)_3$/C16:1	710.6	**0,126 ± 0,137 f**	**3,599 ± 0,570 f**	0,15 ± 0,064	2,455 ± 0,646
$(C18:2)_2$/C18:1/C16:1 o. $(C18:2)_3$/C16:0	711.6	**1,070 ± 0,230 d**	**6,427 ± 1,282 d**	**1,420 ± 0,281 b**	**6,375 ± 0,825 b**
$(C18:1)_2$/C18:2/C16:1 o. $(C18:2)_2$/C18:1/C16:0	712.6	5,38 ± 0,746	**4,940 ± 1,644 h**	6,403 ± 1,334	**8,149 ± 2,978 h**
$(C18:1)_2$/C18:2/C16:0	713.6	2,374 ± 0,367	3,049 ± 0,090	2,629 ± 0,245	3,907 ± 0,748
$(C18:1)_3$/C16:0	714.6	**51,020 ± 7,543 a, d**	**5,469 ± 1,912 d**	**52,048 ± 4,414 a, b**	**8,311 ± 2,800 b**
$(C18:1)_2$/$(C18:3)_2$	723.6	0,942 ± 0,427	0,797 ± 0,106	0,981 ± 0,366	1,904 ± 0,367
$(C18:1)_3$/C18:2	726.6	4,205 ± 0,578	6,402 ± 1,715	5,334 ± 1,100	8,393 ± 2,972
$(C18:2)_3$/C20:4	735.6	0,100 ±0,045	1,228 ± 0,252	0,102 ± 0,048	1,53 ± 0,854
$(C18:2)_3$/C20:3 o. $(C18:2)_2$/C18:1/C20:4	736.6	0,133 ± 0,095	3,018 ± 0,311	**0,132 ± 0,068 b**	**4,796 ± 1,715 b**
$(C18:2)_3$/C20:2 o. $(C18:2)_2$/C18:1/C20:3	737.6	**0,270 ± 0,201 e**	**4,833 ± 1,730 e**	**0,252 ± 0,102 b**	**6,281 ± 2,164 b**
$(C18:2)_2$/C18:1/C20:2	738.6	0,339 ± 0,198	3,482 ± 1,233	**0,366 ± 0,068 c**	**4,651 ± 1,069 c**
$(C18:2)_3$/C20:0 o. $(C18:1)_2$/C18:2/C20:2	739.6	0,432 ± 0,191	1,389 ± 0,477	0,512 ± 0,099	1,800 ± 0,275
C22:6/$(C18:2)_3$	747.6	0,362 ± 0,535	0,086 ± 0,046	0,198 ± 0,172	0,075 ± 0,031
C22:6/$(C18:2)_2$/C18:1	748.6	0,201 ± 0,173	0,044 ± 0,032	0,110 ± 0,101	0,041 ± 0,021

Einige der 19 CL-Spezies waren nur in sehr geringen Mengen vorhanden oder kamen in allen Versuchsansätzen in sehr ähnlichen Mengen vor. Daher beschränkt sich die weitere Auswertung auf diejenigen Spezies, welche sich über die verschiedenen Versuchsansätze hinweg mindestens einmal durch signifikante Differenzen auszeichneten. Diese Spezies sind in Tabelle 2 farblich gekennzeichnet. Spezies, die mittels der angewandten Untersuchung

aufgrund gleicher Massen nicht voneinander unterschieden werden konnten, wurden zusammengefasst. Abbildung 10 stellt diese CL-Spezies als Säulendiagramm dar.

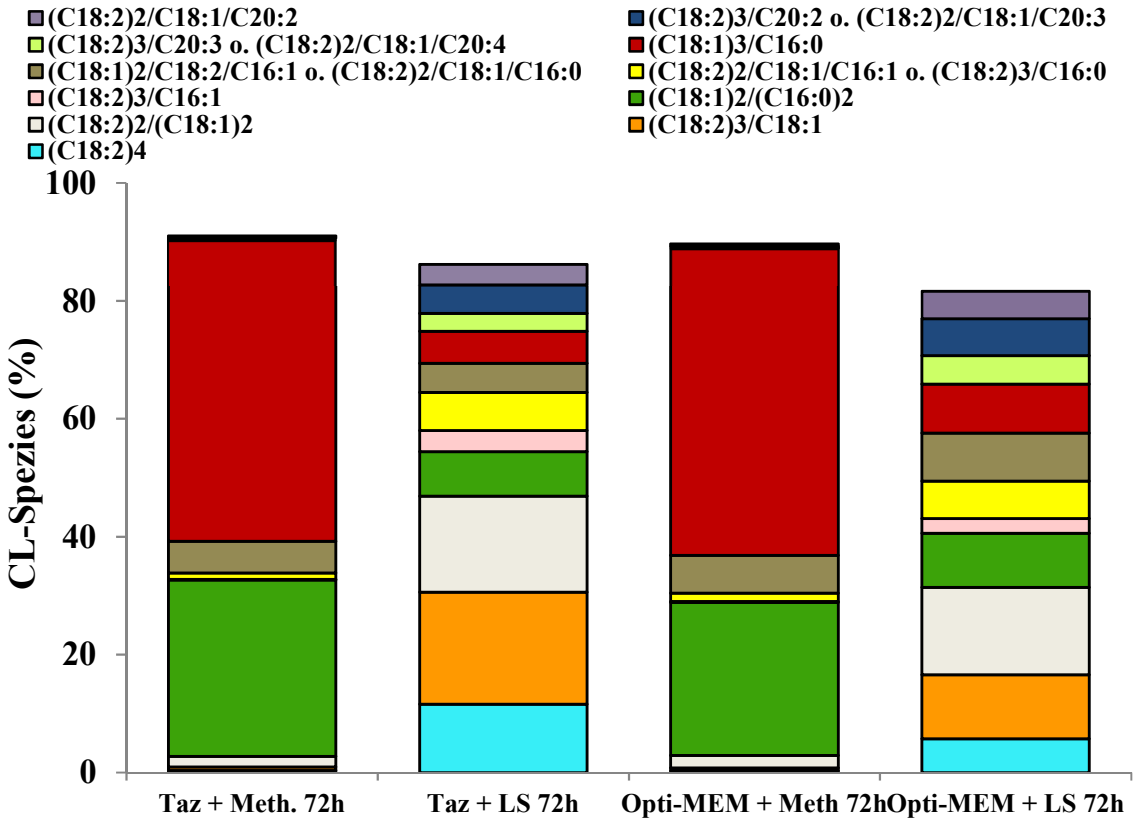

Abbildung 10: prozentuale Verteilung der CL-Spezies welche sich in ihrer Menge signifikant voneinander unterscheiden
19 CL-Spezies wurden auf ihr Vorkommen über alle Ansätze hinweg untersucht. Die Versuchsansätze unterscheiden sich in der Verabreichung von Taz siRNA oder Opti-MEM und der weiteren Zugabe von Methanol oder LS. Die Auswertung fand 72 Stunden nach dem ersten Zusatz statt. Pro Versuchsansatz wurde die Menge jeder Spezies als Mittelwert aller Experimente angegeben und prozentual in Bezug zur CL-Gesamtmenge des gleichen Versuchsansatzes angegeben. Aufgeführt sind alle Spezies, welche sich über die Ansätze hinweg in ihrer Menge mindestens einmal signifikant voneinander unterscheiden. Mittels der Untersuchung aufgrund gleicher Masse nicht voneinander unterscheidbare Spezies wurden zusammengefasst und können aus der Legende entnommen werden.

Aus der Abbildung 10 geht hervor, dass die Zugabe von LS zu einer starken Beeinflussung des Vorkommens der CL-Spezies führt. Die Ansätze Taz + LS 72 h und Opti-MEM + LS 72 h zeichnen sich durch einen ähnlichen Säulenaufbau aus und setzten sich deutlich von den anderen Versuchsansätzen ab. LS scheint folglich eine zentrale Rolle für die Synthese bestimmter CL-Spezies zu spielen.

Das türkis dargestellte CL $(18:2)_4$ wird nur bei den Versuchsansätzen Taz + LS (11,60 %) und Opti-MEM + LS (5,72 %) in nennenswerten Mengen synthetisiert. Bedingt durch die erhöhte Zufuhr von LS wird diese vermehrt in das CL eingebaut, sodass Tetralinolsäure-CL entsteht.

Die orange dargestellte Spezies $(C18:2)_3$/C18:1-CL wird ebenfalls vor allem in Taz + LS (18768 %) und Opti-MEM + LS (10,88 %) vorgefunden. Auch hierfür liegt die Erklärung in dem LS-Angebot, welches dreimalig in das CL eingebaut wurde. Genauso verhält es sich mit der weiß dargestellten Spezies $(C18:2)_2$/$(C18:1)_2$-CL, welche in den Zusätzen Taz + LS (16,32 %) und Opti-MEM + LS (14,80 %) in größeren Mengen vorzufinden sind.

Die grün dargestellte Spezies $(C18:1)_2$/$(C16:0)_2$-CL ist nur in geringen Mengen in den LS-Ansätzen aufzufinden. Bei hohem LS-Vorrat werden folglich selten CL-Spezies ohne LS synthetisiert. Die anderen vier Versuchsansätze ohne LS zeigen dahingegen einen großen prozentualen Teil dieser Spezies. CL des Ansatzes Taz besteht zu 34,86 %, CL des Ansatzes Opti-MEM zu 34,15 % aus der grün markierten Spezies $(C18:1)_2$/$(C16:0)_2$-CL. Im Versuchsansatz Taz + Meth. liegt der Anteil an $(C18:1)_2$/$(C16:0)_2$-CL bei 29,92 % und im Ansatz Opti-MEM + Meth. bei 25,98 % der Gesamt-CL-Menge. Somit ist diese Spezies eine sehr häufig vorkommende, unter der Bedingung, dass keine LS hinzugegeben wird.

Die rosa markierte Spezies $(C18:2)_3$/(C16:1)-CL macht bei LS-Zufuhr etwa 3 % der Gesamt-CL aus, ansonsten ist sie nahezu nicht vorzufinden.

Auch die gelb markierte Spezies $(C18:2)_2$/C18:1/C16:1-CL oder $(C18:2)_3$/C16:0-CL werden unter den vorhandenen Bedingungen nur selten synthetisiert. Allerdings sind auch sie dann leicht gehäuft, wenn die Zugabe von LS erfolgte.

Die braungrau markierte Spezies $(C18:1)_2$/C18:2/C16:1-CL oder $(C18:2)_2$/C18:1/C16:0-CL macht etwa 5 % des Gesamt-CL aus. Ein unterschiedlich starkes Vorkommen zeichnet sich zwischen den Ansätzen Taz + LS und Opti-MEM + LS ab, ohne Taz siRNA Manipulation kommt es etwas häufiger vor.

Die rot dargestellte Spezies $(C18:1)_3$/C16:0-CL ist stark vertreten, wenn kein Angebot an LS vorhanden ist. Im Ansatz Taz stellt sie 34,15 % des Gesamt-CL dar, im Ansatz Opti-MEM nimmt sie 34,24 % ein. Im Versuchsansatz Taz + Meth. stellt die Spezies mit 51,02 % die Mehrheit dar, genauso wie im Ansatz Opti-MEM + Meth. mit 52,05 % der Gesamtmenge. Damit erweist sich die Spezies $(C18:1)_3$/C16:0-CL als die Häufigste.

Die gelbgrün markierte Spezies $(C18:2)_3$/C20:3-CL oder $(C18:2)_2$/C18:1/C20:4-CL ist dann vertreten, wenn es eine LS-Zufuhr gibt, wobei sie auch dort mit 3-4 % selten auftritt.

Genauso trifft es auf die blau dargestellte Spezies $(C18:2)_3$/C20:2-CL oder $(C18:2)_2$/C18:1/C20:3-CL zu. Auch diese treten praktisch nur bei einem LS-Angebot auf.

Gleiches gilt für die lila markierte Spezies $(C18:2)_2$/C18:1/C20:2-CL.

Bei den Versuchen der Zugaben Taz + LS und Opti-MEM + LS fällt auf, dass trotz des hohen LS-Angebots CL $(18:2)_4$ nicht die häufigste Spezies darstellt, sondern LS meist nur zwei oder

drei der vier FS-Reste ausmacht. CL mit 16 oder 20 C-Atomen langen FS-Resten sind sowohl im Ansatz Taz + LS als auch im Ansatz Opti-MEM + LS etwas seltener vorzufinden.
Zusammenfassend besteht ohne Zufuhr von LS das CL vor allem aus den Spezies $(C18:1)_2/(C16:0)_2$-CL und $(C18:1)_3/C16:0$-CL. Die meisten CL-Spezies bestehen nicht aus LS, sondern bevorzugt aus Ölsäure und Palmitinsäure. Das Vorkommen der CL-Spezies ist größtenteils unbeeinflusst von dem Zusatz Taz siRNA. Ein Knock-down des TAZ kann als einzige Auswirkung die Menge der CL-Spezies $(C18:1)_2/(C16:0)_2$-CL (von 25,98 % unter Opti-MEM + Meth. auf 29,92 % unter Taz + Meth.) signifikant erhöhen. Sobald ein Angebot an LS vorhanden ist, wird diese auch eingebaut, bevorzugt zwei- oder dreimalig. Die anderen ein oder zwei FS-Reste sind dabei ebenfalls meist 18 C-Atome lang. LS ruft dabei zahlreiche signifikante Veränderungen hervor, neun der insgesamt 19 untersuchten Spezies ändern ihre Verteilung bei einem Vergleich der Ansätze Opti-MEM + LS und Opti-MEM + Meth. Beispielsweise kommt die grün dargestellte Spezies $(C18:1)_2/(C16:0)_2$-CL unter LS-Zufuhr sehr viel seltener vor, während die orange markierte Spezies $(C18:2)_3/(C18:1)$-CL deutlich zunimmt. Ein Vergleich der Ansätze Taz + LS und Taz + Meth. zeigt acht signifikante Verteilungsänderungen der CL-Spezies, diese sind ebenfalls durch die Zugabe der LS bedingt. Unter LS-Gabe haben die Zugaben Taz, beziehungsweise Opti-MEM einen deutlichen Einfluss auf die Spezies. Der Knock-down von TAZ führt zu einer starken Erhöhung des CL $(18:2)_4$ von 5,72 % auf 11,60 % der Gesamt-CL-Menge, CL $(C18:2)_3/C18:1$ wird von 10,88 % auf 18,97 % und $(C18:1)_2/C18:2/C16:1$-CL oder $(C18:2)_2/C18:1/C16:0$-CL wird von 4,94 % auf 8,15 % erhöht. Tafazzin scheint während des Remodeling den Einbau von LS zu hemmen, da die Zellen mit heruntergefahrenem Tafazzin vermehrt LS-CL synthetisieren können. Die Minderung der TAZ-Expression führt folglich unter LS-Einfluss zu einer Erhöhung von Linolsäure-CL.

3.2.3 Im Cardiolipin gebundene Fettsäuren

Unter den gebundenen FS versteht man diejenigen, welche fest in das CL eingebaut werden. Mittels der Manipulation der Zellkulturen verändern sich die im CL gebundenen FS in ihrer Kettenlänge und im Sättigungsgrad.
Untersucht wurden die FS C18:2, C18:1, C18:3, C16:0, C16:1, C20:0, C20:2, C20:2, C20:3, C20:4 und C22:6 auf die Menge ihres Vorkommens pro Versuchsansatz. Dazu wurde die Menge jeder FS sowohl in nmol/µg CL als auch prozentual zur eingebauten Gesamt-FS-Menge angegeben. Der SEM wurden für jeden Mittelwert bestimmt. Anschließend wurde für die 72-Stunden-Werte eine Signifikanzanalyse mittels zweifaktoriellem ANOVA-Test in

Kombination mit dem Sidak-Test angefertigt. Abbildung 11 stellt die Ergebnisse 72 Stunden nach der Beeinflussung mittels Taz siRNA übersichtlich zusammen.

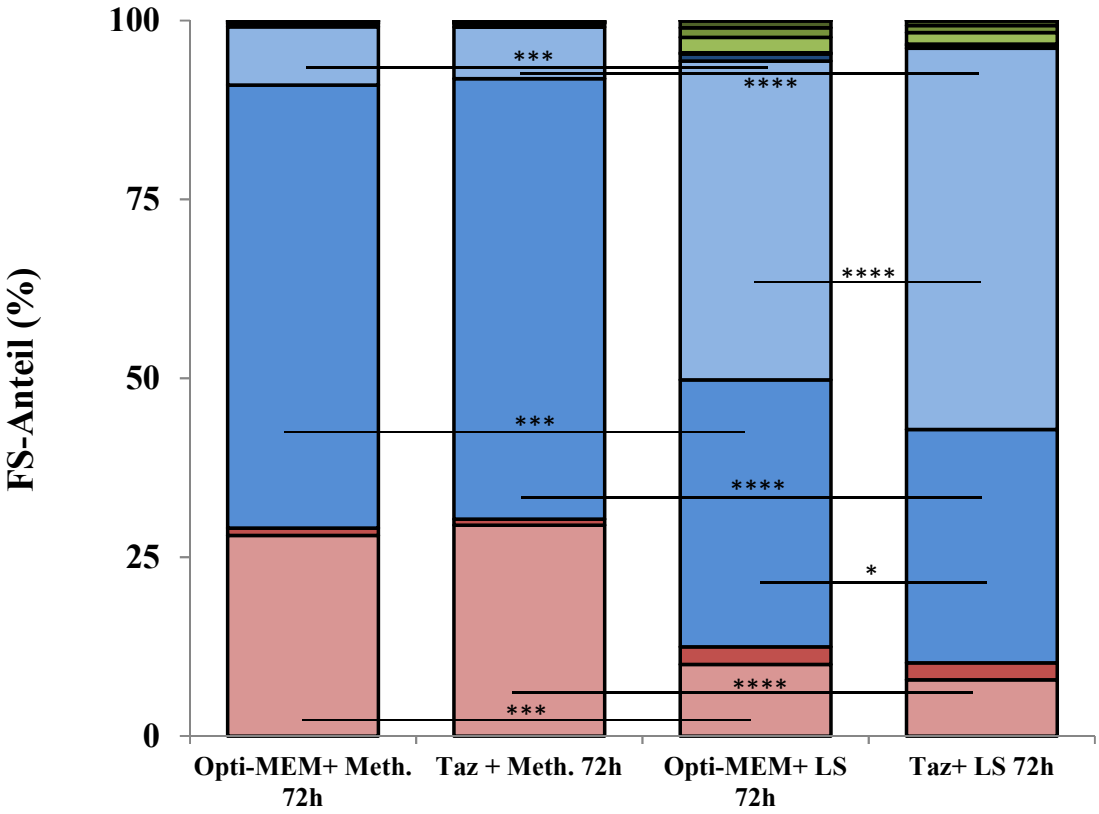

Abbildung 11: Anteil aller im CL gebundenen FS in Prozent
Aufgeführt sind vier Versuchsansätze, die sich in den Zugaben Taz oder Opti-MEM und der zusätzlichen Zugabe von Methanol oder LS unterscheiden und 72 Stunden nach der ersten Zugabe ausgewertet wurden. In jedem Versuchsansatz wurde die Art und Menge der im CL gebundenen FS ermittelt. Die verschiedenen FS wurden ins Verhältnis zur Gesamt-FS-Menge im CL gestellt und prozentual angegeben. Alle FS der gleichen Kettenlänge sind in einem Farbton dargestellt (C18: blau, C16: rot, C20: grün und C22: gelb). Mittels zweifaktoriellem ANOVA-Test kombiniert mit dem Sidak-Test wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Methanol-Ansätzen, zwischen den beiden Opti-MEM-Ansätzen, zwischen den beiden Taz-Ansätzen und zwischen den beiden LS-Ansätzen erhoben. Signifikante Werte sind mit Stern (*) gekennzeichnet: * - $p<0.05$; *** - $p<0.001$, **** - $p<0.0001$.

Die Abbildung 11 verdeutlicht, dass die Werte der beiden Versuchsansätze der Zugabe Methanol und der beiden Ansätze der Zugabe LS in ihrem Aufbau ähnlich sind. Dadurch wird deutlich, dass vorrangig LS zu den Veränderungen in der Menge der gebundenen FS führt. Hierfür ist eine nähere Betrachtung von Nöten:

Über alle Versuche hinweg sind die C18 FS die am häufigsten vorkommenden. Beide Versuchsansätze über 2 Stunden zeigen dabei in der C18:1 FS ihren höchsten Anteil. Der 2-Stunden-Versuchsansatz Opti-MEM besitzt eine Menge von 1,501 ± 0,023 nmol/µg CL und der Ansatz Taz 2 h eine nahezu identische Menge von 1,510 ± 0,022 nmol/µg CL. Dahingegen zeigen die Ansätze Opti-MEM + Meth. und Taz + Meth. mit einer Menge von 1,684 ± 0,016 nmol/µg CL und 1,675 ± 0,026 nmol/µg CL etwas höhere C18:1 Anteile. Die

Ansätze der Zugabe LS zeigen ein vermindertes Vorkommen an C18:1 FS. Die Mengen betragen 1,001 ± 0,067 nmol/µg CL für Taz + LS und 0,875 ± 0,042 nmol/µg CL für Opti-MEM + LS.

Auch die Menge des C18:2 unterscheidet sich in den verschiedenen Versuchsansätzen voneinander. Die 2-Stunden-Werte haben mit 0,350 ± 0,034 nmol/µg CL für Taz und 0,363 ± 0,036 nmol/µg CL für Opti-MEM einen mittelstarken Einbau. Die mit Methanol behandelten Zellen zeigen nach 72 Stunden mit 0,196 ± 0,020 nmol/µg CL für Taz + Meth. und mit 0,2206 ± 0,012 nmol/mg CL für Opti-MEM + Meth. eine niedrigere Anzahl an gebundenen C18:2 FS. In den mit LS behandelten Versuchen sind sie viel häufiger gebunden. Der Ansatz Taz + LS besitzt eine Menge von 1,431 ± 0,044 nmol/µg CL und Opti-MEM + LS eine Menge von 1,1967 ± 0,077 nmol/µg CL.

C18:3 FS sind über alle Versuchsansätze nur sehr selten eingebaut. Die 2-Stunden-Werte liegen für Opti-MEM bei 0,023 ± 0,004 nmol/µg CL, für Taz bei 0,023 ± 0,003 nmol/µg. Die 72-Stunden-Mengen liegen bei 0,013 ± 0,002 nmol/µg CL für Opti-MEM + Meth. und für Taz + Meth., bei 0,025 ± 0,002 nmol/µg CL für Opti-MEM + LS und 0,011 ± 0,001 nmol/µg CL für Taz + LS.

Mit einem Gesamtanteil zwischen 0,275 ± 0,014 nmol/µg CL und 0,8246 ± 0,018 nmol/µg CL sind die C16 FS die am zweithäufigsten vorkommenden FS.

Dabei sind die C16:0 FS die Häufigsten der gebundenen C16 FS und kommen in den 2-Stunden-Werten mit einer Menge von 0,763 ± 0,027 nmol/µg CL für Opti-MEM und 0,772 ± 0,024 nmol/µg CL für Taz vor. Ähnlich präsentieren sich die C16:0 FS in den Methanol-Ansätzen bei Taz + Meth. mit 0,801 ± 0,019 nmol/µg CL und bei Opti-MEM + Meth. mit 0,762 ± 0,018 nmol/µg CL. In den mit LS manipulierten Ansätzen sind die C16:0 FS seltener aufzufinden bei Taz + LS mit 0,212 ± 0,009 nmol/µg, bei Opti-MEM + LS mit 0,269 ± 0,024 nmol/µg CL.

Die FS C16:1 kommen selten vor (Opti-MEM 2h: 0,025 ±0,002 nmol/µg CL, Taz 2h: 0,025 ± 0,002 nmol/µg CL, Opti-MEM + Meth.: 0,028 ± 0,002 nmol/µg CL, Taz + Meth.: 0,02 ± 0,001 nmol/µg CL, Opti-MEM + LS: 0,066 ± 0,004 nmol/µg CL und Taz + LS: 0,063 ± 0,005 nmol/µg CL).

Gebundene C20 FS finden sich überall nur in sehr geringen Mengen. Auch hier kommen sie in den zwei LS-Ansätzen mit 0,125 ± 0,016 nmol/µg CL und 0,092 ± 0,010 nmol/µg CL etwas häufiger als in den anderen Ansätzen vor.

Gebundene C22 FS kommen praktisch nicht vor, nur in den 2-Stunden-Ansätzen Taz und Opti-MEM sind sie mit 0,017 ± 0,002 nmol/µg CL und 0,016 ± 0,002 nmol/µg CL überhaupt in nennenswerter Menge vertreten.

Bei Untersuchungen bezüglich signifikanter Unterschiede fällt auf, dass alleiniger TAZ-Knock-down keinerlei Veränderungen der im Cardiolipin gebundenen FS bedingt. Die Werte unter Opti-MEM + Meth. und Taz + Meth. sind für alle FS nahezu identisch, signifikante Unterschiede bestehen nicht. Untersuchungen zwischen den Opti-MEM-Ansätzen mit und ohne LS-Zufuhr zeigen deutliche Unterschiede in der Menge des Einbaus der FS C18:1, C18:2 und C16:0 mit jeweils $p<0,001$. Die alleinige Zufuhr von LS führt ohne Manipulation der Aktivität des Enzyms Tafazzin zu einer vermehrten Bindung der Fettsäure C18:2 und zu einer verminderten Bindung der Fettsäuren C18:1 und C16:0. Auch unter der Manipulation des TAZ mit oder ohne LS gibt es einige signifikante Veränderungen, welche ebenfalls die FS C18:1, C18:2 und C16:0 betreffen. Dabei ist p für alle Werte $p<0,0001$. Die Zunahme der C18:2 FS und die Abnahmen der FS C18:1 und FS C16:0 ist also besonders deutlich, wenn nicht nur LS zugegeben wird, sondern auch noch zusätzlich eine Manipulation des TAZ-Gens vorliegt. Die LS-Ansätze mit oder ohne TAZ-Knock-down zeigen signifikante Differenzen bezüglich des Einbaus der FS C18:1 ($p<0,05$) und C18:2 ($p<0,001$). Dieses Ergebnis bestätigt, dass sich die Bindungseigenschaften durch LS für die FS C18:1 und C18:2 besonders stark verändern, wenn eine TAZ-Inhibition vorliegt.

Zusammenfassend kann das TAZ-Knock-down alleine keine Veränderungen der im CL gebundenen Fettsäuren bedingen. Die Zugabe von LS führt dagegen alleine zu Veränderungen der FS, welche in das CL eingebaut werden. Dabei entsteht bevorzugt Linolsäure-CL. Ebenfalls erhöht, jedoch nicht signifikant, sind Palmitoleinsäure-CL und Eicosandiensäure-CL. Dagegen sinkt der Anteil an Ölsäure-CL und Palmitinsäure-CL signifikant ab. Die Zugabe von Taz zusammen mit LS verändert den Einbau erneut deutlich. Die doppelte Manipulation führt im Vergleich zur alleinigen LS-Gabe nochmals zu einem Anstieg von LS-CL, andere FS werden dafür signifikant weniger im CL gebunden. Tafazzin reguliert den Fettsäureeinbau in das CL spezifisch mit.

Weiterhin können aus den Ergebnissen Rückschlüsse über die Menge aller FS mit gleicher Kettenlänge entnommen werden. Die Ergebnisse wurden nochmals aufbereitet, sodass alle FS mit gleicher Kettenlänge, unabhängig welchen Sättigungsgrades, summiert wurden. Daraus kann ein direkter Vergleich der 72-Stunden-Werte mittels Kombination von ANOVA und Post-hoc-Test zwischen der Menge der C16, C18 und C20 FS gezogen werden. Die Ergebnisse

der 72-Stunden-Werte sind der Abbildung 12 zu entnehmen. Die Menge der gebundenen FS ist in nmol/µg CL angegeben.

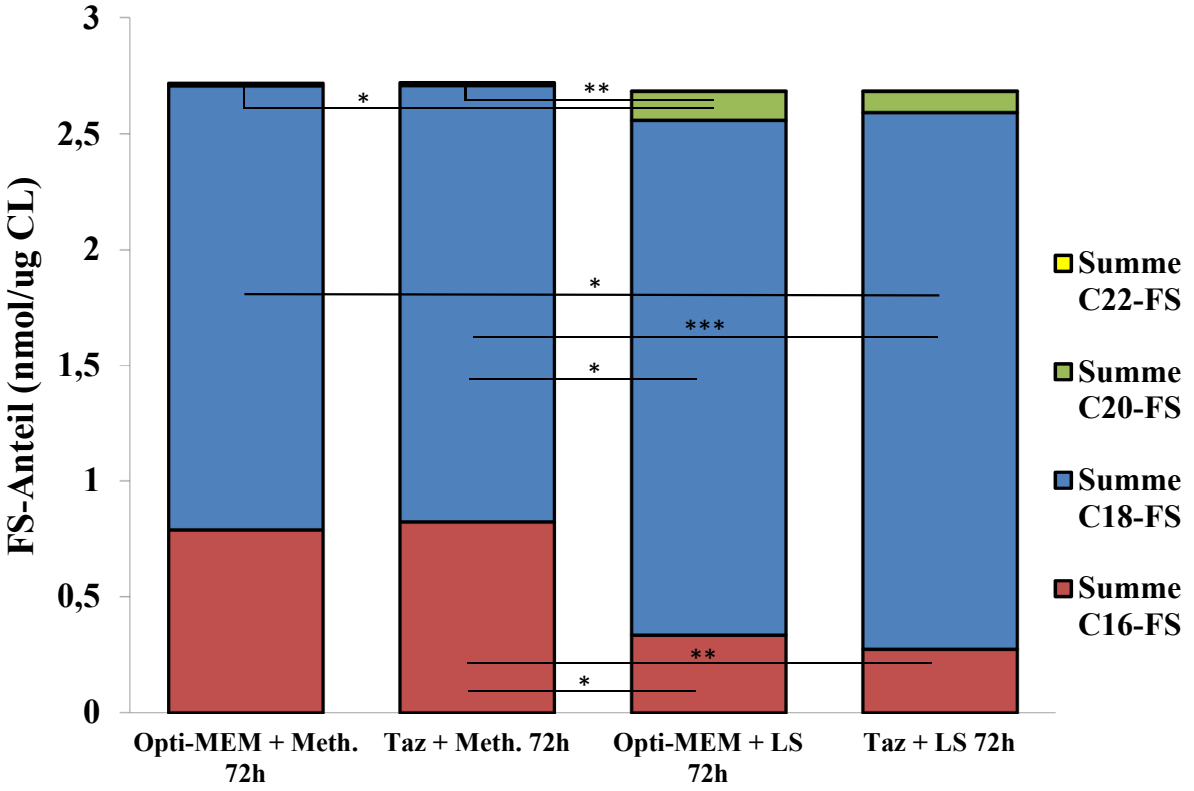

Abbildung 12: FS-Anteil der FS einer Kettenlänge in nmol/µg CL
Es sind vier Versuchsansätze aufgeführt, die sich in den Zusätzen Taz oder Opti-MEM und einem weiteren Zusatz mit Methanol oder LS unterscheiden und 72 Stunden nach der ersten Zugabe ausgewertet wurden. Für jedes Experiment wurden die einzelnen im CL eingebauten FS gemessen und ihr Mittelwert und SEM pro Versuchsansatz in nmol/µg CL bestimmt. Anschließend wurden alle FS einer Kettenlänge zusammengefasst, sodass nur zwischen C16 FS, C18 FS, C20 FS und C22 FS differenziert wird. Mittels einfaktoriellem ANOVA in Kombination mit dem Dunn Post-hoc-Test wurden die Werte auf signifikante Unterschiede getestet. Je nach Größe des p-Werts sind unterschiedliche Sterne (*) zur Kennzeichnung verwendet worden: * - $p<0.05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0.001$.

Es wird erneut deutlich, dass die C18 FS am stärksten in das CL eingebaut werden, ihre Menge liegt zwischen 1,883 nmol/µg CL und 2,317 nmol/µg CL. Sehr viel seltener, aber dennoch häufig, kommen die C16 FS im CL vor. Sie besitzen eine maximale Menge von 0,825 nmol/µg CL. C20 FS und C22 FS sind in kaum messbaren Mengen im CL vertreten, die Zugabe von LS kann die Menge der C20 FS aber deutlich erhöhen. Dabei liegen die Mengen der C20 FS zwischen 0,008 nmol/µg CL und 0,125 nmol/µg CL und die Werte der C22 FS zwischen 0,001 nmol/µg CL und 0,017 nmol/µg CL.
Bei Vergleich der Werte mit dem Kontrollwert Opti-MEM + Meth. steigt bei alleiniger LS-Zugabe die C20 FS an und bei LS-Zugabe und TAZ-Knock-down steigen die C18 FS an.

Wie schon für die einzelnen FS beschrieben, kann das Herunterregulieren des TAZ alleine keine Veränderungen der FS-Menge erzeugen.
Bei Vergleich der restlichen Versuchsansätze untereinander fallen einige Differenzen auf. Der Ansatz Taz + Meth. unterscheidet sich in allen FS einer Kettenlänge signifikant von dem Ansatz Opti-MEM + LS, die FS C16 liegt häufiger vor, die FS C18 und C20 seltener. Auch die beiden Taz-Ansätze unterscheiden sich in den FS C16 und C18 voneinander, ohne LS-Zufuhr kommt die FS C16 vermehrt und die FS C18 seltener vor. Die Kombination von LS-Überschuss und TAZ-Knock-down ist damit Ursache für Veränderungen der beiden am häufigsten im Cardiolipin vorkommenden FS. Zwischen den beiden Ansätzen mit Zugabe von LS lassen sich keine signifikanten Unterschiede ausmachen.

Neben der Form und Menge der gebundenen FS wurde die Menge der Doppelbindungen über allen molekularen CL-Spezies jeder Zellkultur bestimmt und der Wert pro Versuchsansatz gemittelt. Eine große Menge an Doppelbindungen spricht für eine geringe Sättigung der Fettsäurereste des CL. Für jeden Mittelwert wurde der zugehörige SEM bestimmt und in Abbildung 13 für die Werte nach 72 Stunden dargestellt. Anschließend erlaubte die ANOVA- und Post-hoc-Testung eine Beurteilung von signifikanten Unterschieden.

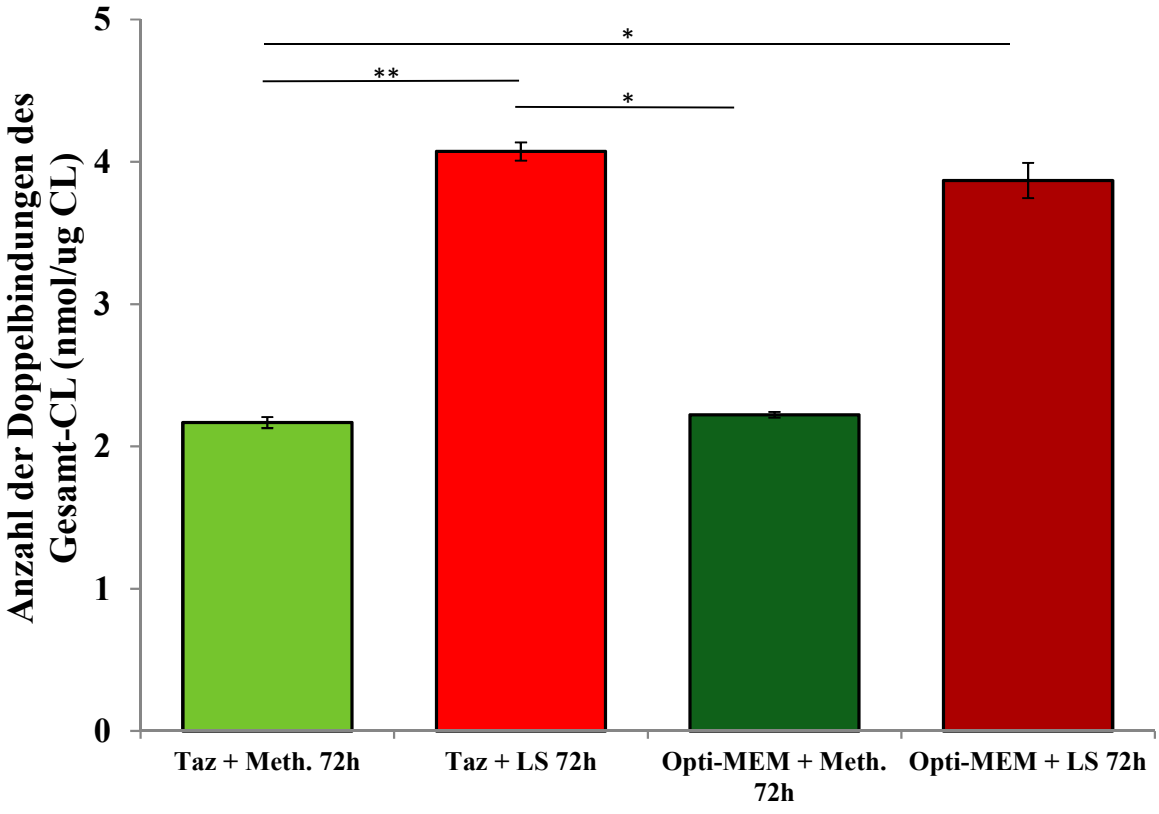

Abbildung 13: Anzahl der Doppelbindungen des Gesamt-CL (nmol/ug CL) in Abhängigkeit zum Versuchsansatz

Es sind vier Versuchsansätze dargestellt, die sich in den Zugaben Taz oder Opti-MEM, beziehungsweise zusätzlich Methanol oder LS unterscheiden und 72 Stunden nach der ersten Zugabe ausgewertet wurden.
Zu jedem Versuchsansatz ist die gemittelte Menge der Doppelbindungen des Gesamt-CL angegeben. Hierdurch wird der Grad der Sättigung bestimmt. Zu jedem Wert ist der SEM dargestellt. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Werte unterscheiden sich nach dem nichtparametrigen ANOVA-Test in Kombination mit dem Dunn-Test signifikant voneinander: * - $p<0.05$; ** - $p<0,01$

Die Menge der Doppelbindungen der 2-Stunden-Werte liegt für Taz bei 2,444 ± 0,065 nmol/ug CL und für Opti-MEM bei 2,480 ± 0,072 nmol/ug CL. Die 72-Stundenwerte mit der Zugabe Methanol liegen für Taz + Meth. bei 2,167 ± 0,038 nmol/ug CL und für Opti-MEM + Meth. bei 2,222 ± 0,020 nmol/ug CL. Der Grad der Sättigung ist nahezu identisch, folglich zeigen die Werte keine durch Taz-Manipulation bedingte Veränderung. Jedoch unterscheiden sich diese beiden Ansätze signifikant von dem Versuchsansatz Taz + LS, das Fehlen von LS ist entscheidend für die geringe Anzahl an Doppelbindungen der Methanolansätze. Ohne übermäßige LS-Zugabe sind die im CL-gebundenen FS stark gesättigt. Auffällig ist eine Erniedrigung der Menge an Doppelbindungen beider Methanol-Ansätze auch im Bezug zu den Werten nach 2 Stunden. Da Methanol keine Veränderung bedingt, zeigt dies, dass sich im zeitlichen Verlauf die Anzahl an Doppelbindungen leicht vermindert. Die 72-Stundenwerte Taz + LS und Opti-MEM + LS zeigen eine deutlich höhere Anzahl an Doppelbindungen von 4,072 ± 0,064 nmol/ug CL und 3,869 ± 0,124 nmol/ug CL und zeigen im Vergleich keine Differenz des Sättigungsgrades. Der Ansatz Opti-MEM + LS zeigt einzig im Vergleich zu dem Ansatz Taz + Meth. eine signifikante Steigerung der Menge an Doppelbindungen und somit einen Abfall der Sättigung. Schlussfolgernd führt weder LS noch Taz alleine zu einer Veränderung der Sättigung des Gesamt-CL. Da unter der Bedingung des TAZ-Knock-downs jedoch die Anzahl der Doppelbindungen durch LS steigt, führt die Zugabe von LS unter dieser Bedingung zum Abfall der Sättigung Die alleinige Applikation von LS führt nur im Vergleich zum Ansatz mit alleiniger TAZ-Inhibition zu einem leichten Absinken der Sättigung.

3.3 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf zellulären Lipidstoffwechsel

Weiterhin wurde das Vorkommen von freien, nicht gebundenen FS in den Zellen untersucht. Dabei wurden die Menge der FS C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 und C20:4 bestimmt und in µg/mg Protein sowie ihr prozentualer Anteil an der FS-Gesamtmenge angegeben. Die Gesamtmenge der freien FS ist dabei die Summe aus den benannten FS. Nach 72 Stunden konnte keine Veränderung der Gesamtmenge bedingt durch die Manipulation des TAZ-Enzyms oder bedingt durch LS-Zufuhr festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen treten Differenzen bei Bestimmung der einzelnen FS-Mengen auf. Für jeden Versuchsansatz wurden

der Mittelwert sowie der SEM bestimmt. Anschließend wurden die 72-Stunden-Werte mittels ANOVA kombiniert mit dem Tukey Post-hoc-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 graphisch festgehalten.

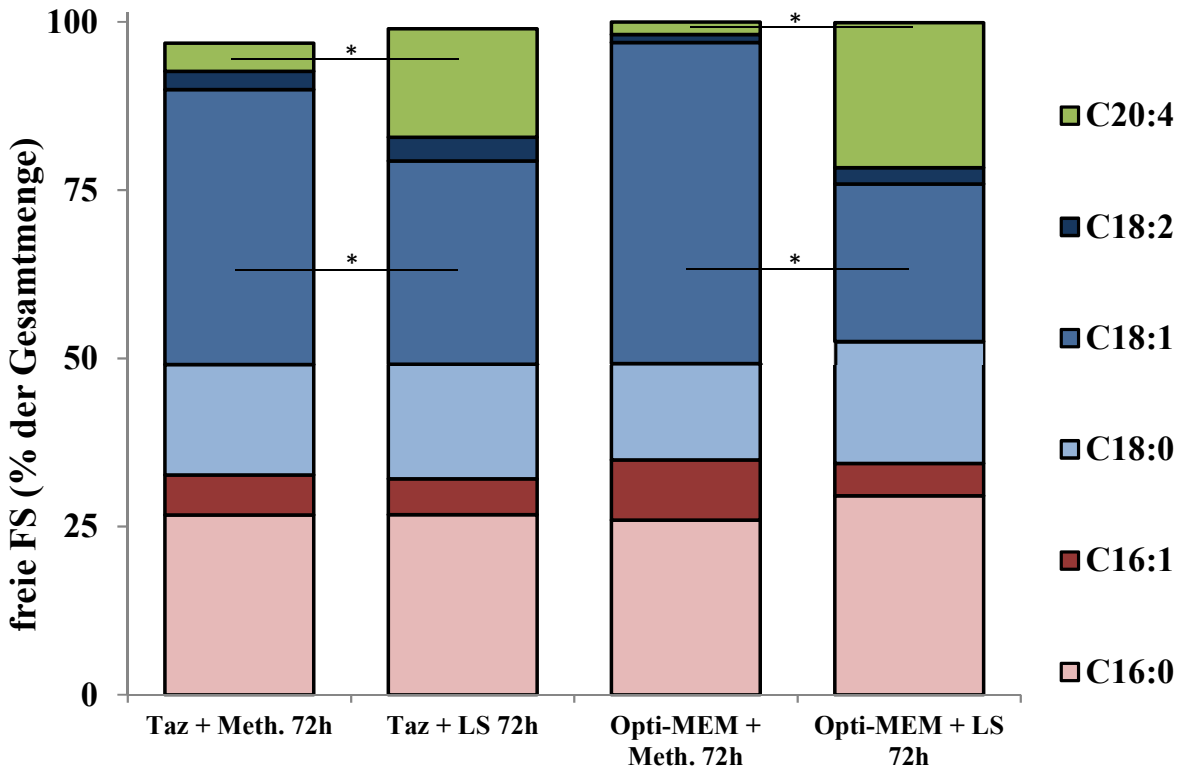

Abbildung 14: Menge der freien FS (% der Gesamtmenge) in Abhängigkeit des Versuchsansatzes
Pro Versuchsansatz, welche sich in der Zugabe der Chemikalien unterscheiden (Taz + Meth., Taz + LS, Opti-MEM + Meth. und Opti-MEM + LS) ist der mittlere prozentuale Anteil der freien FS C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 und C20:4 angegeben. Die Auswertung erfolgte 72 Stunden nach der ersten Zugabe. Summiert ergeben die Anteile pro Versuchsansatz 100 %. Alle FS einer Kettenlänge sind in einem ähnlichen Farbton dargestellt (C16: rot, C18: blau und C20: grün). Statistische Signifikanz wurde zwischen den Kulturen mit und ohne LS-Zufuhr durch die Verwendung von ANOVA kombiniert mit dem Tukey Post-hoc-Test analysiert: * $p<0.0001$.

Die Abbildung 14 verdeutlicht, dass der alleinige Knock-down des TAZ keinen Einfluss auf die Verteilung der freien FS hat. Unterschiede scheinen nur durch den Zusatz von LS aufzutreten.

Die Anzahl der C16:0 FS liegt bei den 2-Stundenwerten für Taz bei 35,71 % ± 3,80 % und für Opti-MEM bei 34,22 % ± 2,66 %. Dagegen sind die C16:0 Anteile nach 72 Stunden sowohl bei der Zugabe von Methanol (25,95 % ± 4,36 % für Opti-MEM + Meth. und 26,69 % ± 5,83 % für Taz + Meth.), als auch bei der Zugabe von LS (29,55 % ± 4,81 % für Opti-MEM + LS und 26,76 % ± 3,16 % für Taz + LS) vermindert.

Die Anzahl der freien C16:1 FS ist insgesamt gering. Im Ansatz Opti-MEM kommt die C16:1 FS zu 6,13 % ± 0,95 % vor, Taz zeigt mit 5,25 % ± 0,90 % eine ähnliche Anzahl. Die Ansätze

Opti-MEM + Meth. und Taz + Meth. besitzen mit 8,95 % ± 1,60 % und 5,98 % ± 2,32 % ebenfalls ähnliche Mengen an C16:1 FS. Der Anteil von C16:1 liegt mit 4,81 % ± 1,28 % für Opti-MEM + LS und 5,33 % ± 2,47 % für Taz + LS minimal niedriger.

Der Anteil der FS C18:0 liegt beim Versuchsansatz Opti-MEM bei 22,67 % ± 2,38 %, für Taz bei 23,51 % ± 2,31 %, für Opti-MEM + Meth. bei 14,31 % ± 2,69 % und für Taz + Meth. bei 16,40 % ±3,05 %. Die Häufigkeit der freien FS liegt für Opti-MEM + LS und Taz + LS mit Werten von 18,12 % ± 3,59 % und 17,03 % ± 3,32 % geringfügig höher.

Ein nahezu gleicher Anteil an C18:1 tritt bei den Zugaben Opti-MEM und Taz mit 29,18 % ± 2,27 % und 29,00 % ± 3,01 % auf. Bei den Zugaben Opti-MEM + Meth. und Taz + Meth. ist die Menge auf 47,76 % ± 2,81 % und 40,87 % ± 7,20 % erhöht, was wahrscheinlich der längeren Inkubation geschuldet ist. Opti-MEM + LS und Taz + LS zeigen mit 23,45 % ± 4,35 % und 30,21 % ± 5,14 % eine signifikant geringere Menge der C18:1 FS im Vergleich zu den zugehörigen Ansätzen ohne LS.

Die FS C18:2 tritt insgesamt selten auf. Die Anteile liegen bei 2,13% ± 0,25% für Taz 2h, bei 1,88 % ± 0,32 % für Opti-MEM 2h, bei 1,17 % ± 0,34 % und 2,74 % ± 1,05 % für Opti-MEM + Meth. und Taz + Meth., bei 2,39 % ± 0,70 % und 3,5 5 % ± 2,76 % für Opti-MEM + LS und Taz + LS. Ohne Zusatz von LS liegt sie folglich sehr selten vor, bei LS-Gabe steigt die FS minimal an. Hier ist eine Angabe zur Signifikanz kaum möglich, da durch einen Auswertungsfehler nicht alle Mengenangaben der FS C18:2 vorliegen. Jedoch kann mittels der vorliegenden Werte davon ausgegangen werden, dass LS die freien C18:2 FS leicht erhöht. Durch die Zufuhr von LS liegt diese selbst häufiger frei vor.

Die freie FS C20:4 zeigt durch eine längere Anzucht, beziehungsweise durch die LS-Gabe Veränderungen in ihrer Häufigkeit. Die Zugabe von Opti-MEM, beziehungsweise Taz führen nach 2 Stunden zu einem FS-Anteil von 6,86 % ± 1,38 %, beziehungsweise 5,82 % ± 0,88 %. Dagegen ist die freie Menge beim Zusatz Opti-MEM + Meth. auf 1,84 % ± 0,27 % und beim Zusatz Taz + Meth. auf 4,16 % ± 3,12 % verringert. Eine imposante Erhöhung erfolgte durch den Zusatz Opti-MEM + LS und Taz + LS auf 21,59 % ± 4,01 %, beziehungsweise 16,12 % ± 6,11 %. Im Vergleich zu den zugehörigen Ansätzen ohne LS steigt die FS C20:4 durch die LS-Zufuhr signifikant an. Die LS stellt ein Substrat in der Arachidonsäure-Synthese dar, wodurch der enorme Anstieg verständlich wird.

Zusammenfassend kann der Knock-down des TAZ weder die Verteilung der zellulären FS noch deren Gesamtgehalt verändern. Damit ist ein Einfluss der Taz siRNA Manipulation auf die zellulären FS unwahrscheinlich.

LS bedingt ebenfalls keine Veränderung der Gesamtmenge der freien FS, sie sorgt jedoch für eine Veränderung der Verteilung einiger FS. Sie erhöht die Menge an C20:4 und vermindert die FS-Menge von C18:1.

3.4 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Mitochondrien

3.4.1 Citratsynthaseaktivität

Als Maß für die Mitochondrienmenge wurde die Citratsynthaseaktivität im Verhältnis zum Proteingehalt bestimmt. Der Mittelwert, der SEM sowie mögliche Signifikanzen der Werte 72 Stunden nach der ersten Zugabe wurden mittels ANOVA in Kombination mit dem Tukey-Test bestimmt. Die Ergebnisse der 72-Stunden-Werte sind in Abbildung 15 zusammenfassend dargestellt.

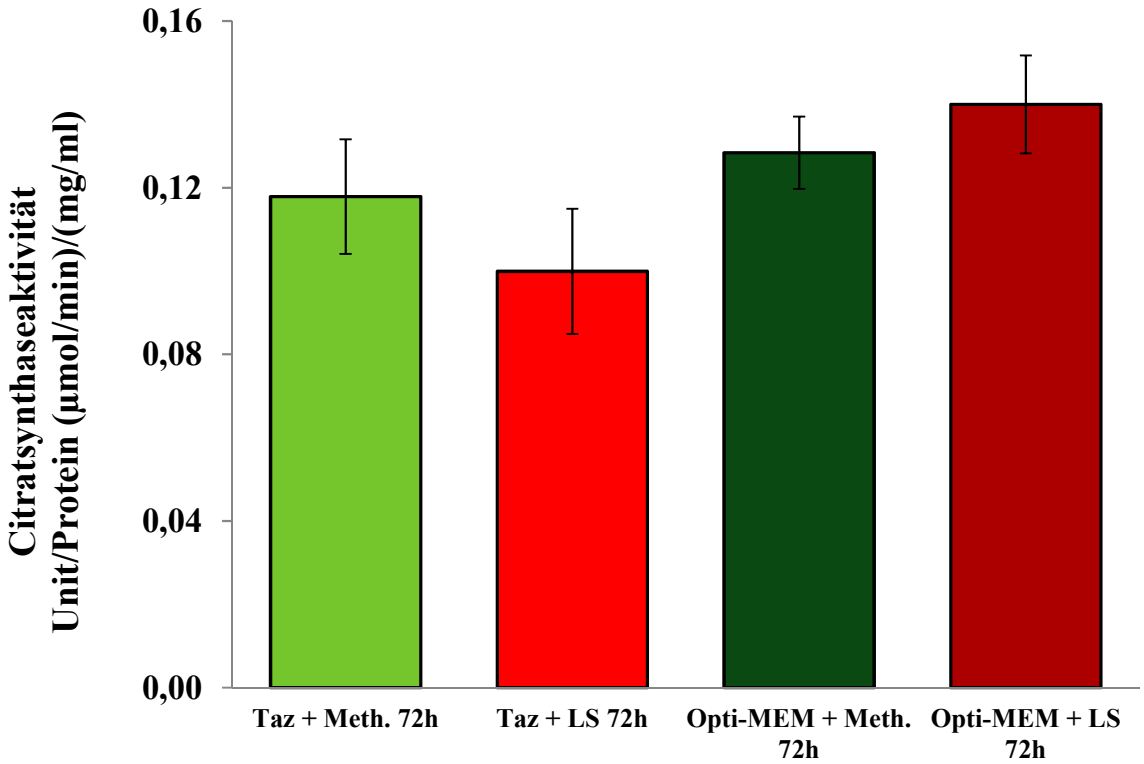

Abbildung 15: Citratsynthaseaktivität (µmol/min)/(mg/ml)
72 Stunden nach dem ersten Zusatz von Taz oder Opti-MEM wurde der Slopewert errechnet und mittels Lambert-Beer-Gesetz in Unit angegeben. Dieser Wert wurde zum zugehörigen Proteinwert ins Verhältnis gestellt, um die spezifische katalytische Aktivität als Maß für die Mitochondrienmenge anzugeben. Jede Säule zeigt den Mittelwert der Ergebnisse eines Versuchsansatzes. Die Versuchsansätze unterscheiden sich durch die Zugaben des Lipofektamins Taz siRNA oder der Zugabe von Opti-MEM und der weiteren Zufuhr von Methanol oder LS. Der SEM ist grafisch festgehalten. Die Werte wurden anhand einfaktoriellem ANOVA in Kombination mit dem Tukey Post-hoc-Test miteinander verglichen. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Abweichungen zwischen den Versuchsansätzen.

Es kann festgestellt werden, dass die Manipulation der Zellen zu keinem signifikanten Unterschied in der Mitochondrienmenge führt (alle $p > 0,05$).

Der Versuchsansatz Taz nach 2 Stunden zeigt im Mittel eine spez. katalytische Aktivität von 0,0879 ± 0,0246 (µmol/min)/(mg/ml). Bei dem 2-Stunden-Opti-MEM-Ansatz liegt die Citratsynthaseaktivität bei 0,1152 ± 0,0346 (µmol/min)/(mg/ml).

Der Versuchsansatz Taz + Meth. zeigt mit einem Wert von 0,1179 ± 0,0138 (µmol/min)/(mg/ml) keine Verringerung des Mitochondriengehalts. Der Mittelwert der Versuche Taz + LS liegt bei 0,0999 ± 0,0150 (µmol/min)/(mg/ml). Eine kombinierte Zugabe der Taz siRNA mit LS kann die Menge daher nicht beeinflussen.

Im Ansatz Opti-MEM + Meth. liegt die spezielle katalytische Aktivität nach 72 Stunden bei 0,1284 ± 0,0087 (µmol/min)/(mg/ml), der Ansatz Opti-MEM + LS besitzt eine speifische Aktivität von 0,1400 ± 0,0118 (µmol/min)/(mg/ml). Die Anzahl der Mitochondrien verändert sich nicht signifikant.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Mitochondrien in ihrer Anzahl weder durch die Manipulation des TAZ-Gens noch durch den Zusatz von Linolsäure beeinflusst werden.

3.4.2 Zellatmung

Mittels der Zellatmung können die Mitochondrien auf ihre Funktionalität untersucht werden. Eine Verringerung der O_2 Konzentration spricht für eine Verstärkung der oxidativen Phosphorylierung und damit für eine Erhöhung der Mitochondrienaktivität. Es wurde die maximale ADP-abhängige Zellatmung gemessen und in %/mg/s angegeben. Jeder Wert wurde ins Verhältnis zum Proteinwert der Probe gesetzt, um die tatsächliche Aktivität pro Einheit unabhängig von der Zellmenge zu erfassen. Die sechs gemessenen Werte einer Zugabe wurden jeweils zu einem Mittelwert zusammengefasst und der dazugehörige SEM bestimmt. Der mittlere Maximalwert wurde als Absolutwert in der Maßeinheit ng Atom O/min/mg dargestellt wofür der Mittelwert mit dem Faktor 161 multipliziert wurde. Es erfolgte zu jedem Wert eine Errechnung des SEM. Die Ergebnisse der 72-Stunden-Werte wurden übersichtlich in der Abbildung 16 zusammengefasst.

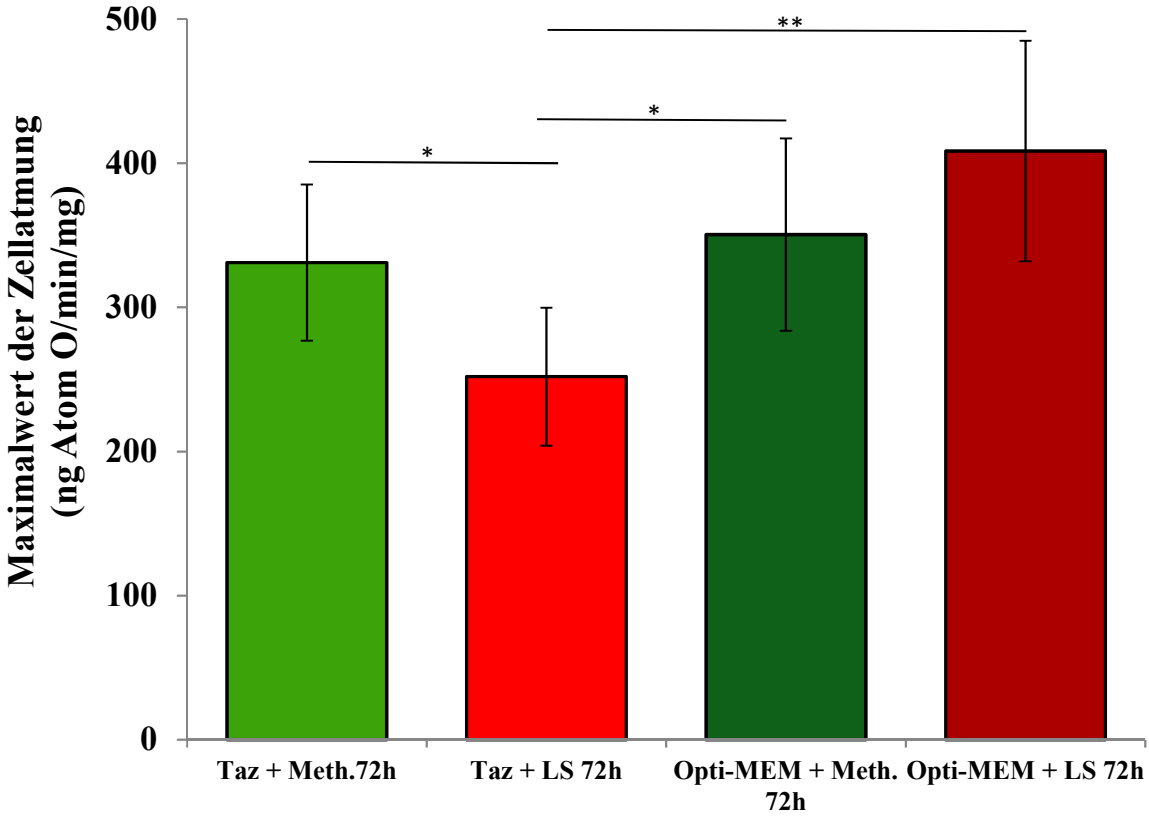

Abbildung 16: absolute Maximalwerte der Zellatmung in ng Atom O/min/mg
Die Werte der maximalen Zellatmung wurden in %/mg/s gemessen und auf die vorhandenen Proteinmengen bezogen. Für jede Zugabe wurde ein Mittelwert erfasst. Der zugehörige Absolutwert in ng Atom O/min/mg wurde durch Multiplikation mit dem Faktor 161 errechnet. Der SEM ist in der Abbildung angegeben. Eine Analyse bezüglich signifikanter Veränderungen wurde mittels einfaktoriellem ANOVA-Test kombiniert mit dem Tukey-Test durchgeführt. * - $p<0.05$; ** - $p<0.01$.

Der Versuchsansatz Taz 2 h besitzt einen mittleren Wert von 343,096 ± 61,795 ng Atom O/min/mg und Opti-MEM 2 h einen Wert von 327,292 ± 63,252 ng Atom O/min/mg. Der Absolutwert für Taz + Meth. 72 h liegt bei 331,072 ± 54,160 ng Atom O/min/mg und für Taz + LS bei 251,909 ± 47,866 ng Atom O/min/mg. Der mittlere Absolutwert von Opti-MEM + Meth. 72 h liegt bei 350,446 ± 66,722 ng Atom O/min/mg und der von Opti-MEM + LS bei 408,392 ± 76,524 ng Atom O/min/mg.

Die 72-Stunden-Werte der Versuchsansätze wurden mittels einfaktoriellem ANOVA kombiniert mit dem Tukey Post-hoc-Test auf signifikante Veränderungen der Maximalatmung analysiert. Dabei konnte eine signifikante Senkung des O_2-Verbrauchs bei dem Ansatz Taz + LS im Vergleich zu allen anderen 72-Stunden-Ansätzen ermittelt werden. Die Verringerung des Sauerstoffverbrauchs spricht für eine Verminderung der Zellatmung. Besonders deutliche Signifikanz besteht zwischen den beiden Ansätzen mit der Zugabe LS, hier ist $p<0.01$.

Es lässt sich schlussfolgern, dass Taz siRNA und LS im Zusammenspiel den O_2-Verbrauch bei Maximalatmung senken, folglich die Zellatmung mindern. Taz siRNA alleine zeigt keinen

Effekt auf die maximale Zellatmung, wie im Ansatz Taz + Meth. deutlich wird. LS alleine bedingt ebenfalls keine erhebliche Veränderung der Zellatmung.

3.5 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Zellwachstum und Zellaktivität

3.5.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt korreliert mit der Zahl aller gebildeten Zellen. Zur Auswertung wurde der Mittelwert aller sechs Experimente einer Zugabe bestimmt. Um die Versuche besser miteinander vergleichen zu können, wurde der gemittelte Proteingehalt in Prozent, bezogen auf den Mittelwert des Versuchsansatzes Opti-MEM + Meth., errechnet. Diese Kontrolle besitzt im Mittel einen Proteinwert von 1,70 ± 0,24 mg/ml. Zudem wurden zugehörige SEM Werte bestimmt. Die 72-Stunden-Werte sind in Abbildung 17 veranschaulicht.

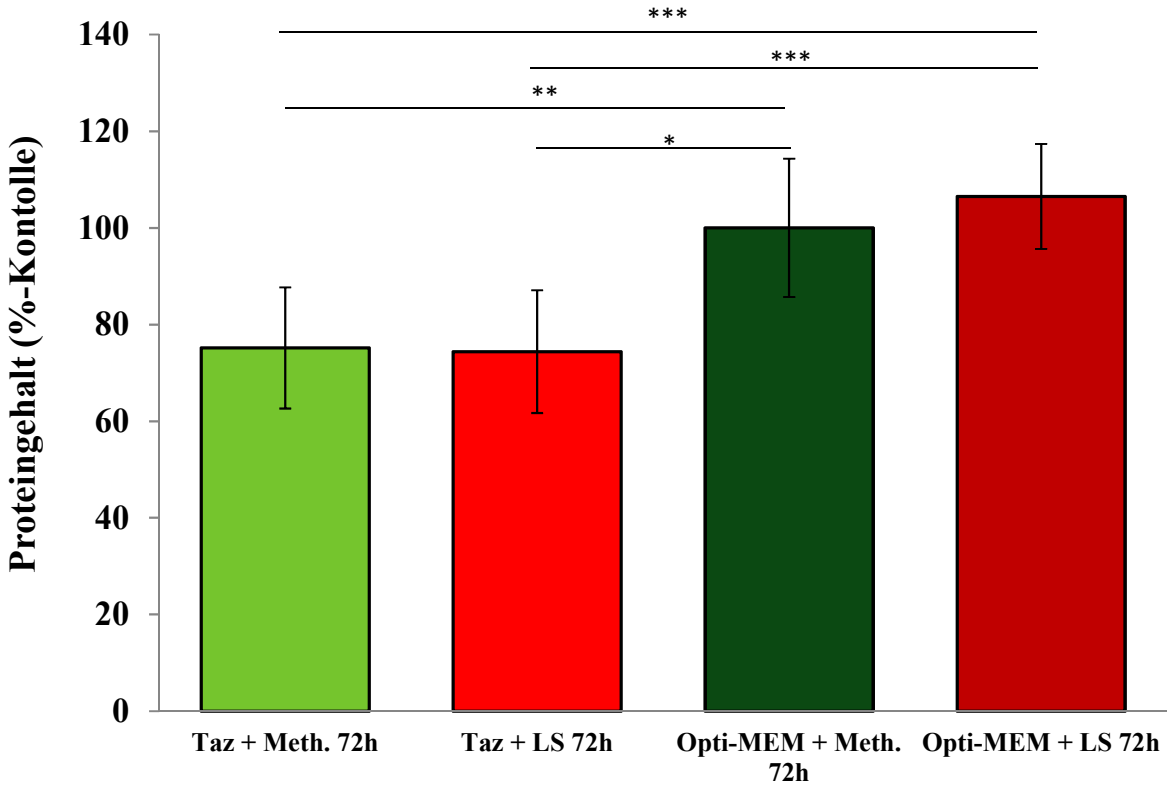

Abbildung 17: Proteingehalt in % zum Kontrollwert Opti-MEM + Meth.
Den Kulturen wurden Zugaben, zunächst Taz oder Opti-MEM, später Methanol oder Linolsäure, verabreicht. Der Proteingehalt wurde 72 Stunden nach dem ersten Zusatz gemessen. Jede Säule zeigt den gemittelten Wert einer Zugabe aller sechs Experimente. Dieser Wert ist in Prozent, bezogen auf den Proteingehalt der Zugabe Opti-MEM + Meth., dargestellt. Der SEM ist ebenfalls für jede Säule aufgeführt. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Säulen zeigen eine konzentrationsabhängige Signifikanz, welche mittels einfaktoriellem ANOVA in Kombination mit dem Tukey-Test ermittelt wurde. Es gilt * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$.

Die 2-Stundenwerte besitzen mit einem Proteingehalt von 16,33 % ± 2,59 % der Kontrolle, beziehungsweise 15,12 % ± 2,47 % der Kontrolle einen deutlich niedrigeren Proteingehalt als die 72-Stundenwerte besitzen. Es besteht eine zeitabhängige Differenz des Proteingehalts. Bei der Auswertung nach 72 Stunden fällt auf, dass beide Proben mit dem Zusatz Taz siRNA mit Werten von 75,16 % ± 12,54 % für den Ansatz Taz + Meth. und 74,38 % ± 12,69 % für den Ansatz Taz + LS im Vergleich zum Kontrollwert einen signifikant geringeren Proteingehalt besitzen. Beide Ansätze zeigen eine Minderung des Proteingehalts von etwa 25 % im Vergleich zur Kontrolle. Die zusätzliche Zufuhr von LS beeinflusst den Proteingehalt dabei nicht. Auch unterscheidet sich der Ansatz Opti-MEM + LS in seinem Proteingehalt mit 106,52 % ± 10,87 % der Kontrolle nicht wesentlich von Opti-MEM + Meth. Weiterhin bestehen deutliche Signifikanzen zwischen dem Versuchsansatz Opti-MEM + LS und den Ansätzen mit heruntergefahrenem TAZ. Dies führt zu der Vermutung, dass der genetische Knock-down des TAZ-Gens das Zellwachstum negativ beeinflusst. Die LS-Zugabe spielt in diesem Zellexperiment für das Wachstumsverhalten der Zellen keine Rolle.

3.5.2 MTT-Bestimmung

Um die Stoffwechselaktivität der Zellen zu ermitteln wurde der MTT-Test durchgeführt und die Menge des reduzierten MTT ins Verhältnis zum Proteinwert, gemessen nach Lowry, gebracht. Dadurch kann eine Aussage darüber getroffen werden, in wie fern eine genetische Manipulation des TAZ-Gens im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer veränderten Stoffwechselaktivität der Zellen führt und welche Bedeutung der zugegebenen Fettsäure LS dabei zukommt. Die MTT-Reduktion wurde in allen sechs Experimenten sowohl 2 Stunden als auch 72 Stunden nach der genetischen Manipulation gemessen. Die Messwerte aller sechs Experimente einer Zugabe wurden gemittelt und jeweils zu den zugehörigen Proteinwerten ins Verhältnis gesetzt. Zudem wurde für diesen Wert der SEM bestimmt. Als Kontrollansatz wurde der Mittelwert des Ansatzes Opti-MEM + Meth. festgelegt. Diese zeigten im Mittel nach 72-stündiger Inkubation eine Extinktion pro Proteinmenge von 7,3125 ± 0,7769 EE/mg (Extinktionseinheit/mg). Dieser Wert wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte prozentual mit diesem verglichen. Für den Taz-Ansatz nach 2 Stunden ergab sich daraus ein Mittelwert von 90,53 % ± 6,06 % und für den Opti-MEM Ansatz ein Wert von 83,32 % ± 6,99 % der Kontrolle Opti-MEM + Meth. Der 72-Stunden Taz + Methanol Ansatz erreichte eine Stoffwechselaktivität von 98,92 % ± 5,99 %, der Taz + LS Ansatz besitzt einen prozentualen Anteil von 122,15 % ± 7,16 % der Kontrolle. Die Aktivität des Opti-MEM + LS Ansatzes liegt bei 104,72 % ± 6,60 % des Kontrollansatzes.

Zur besseren Übersicht sind die 72-Stundenwerte in Abbildung 18 graphisch festgehalten.

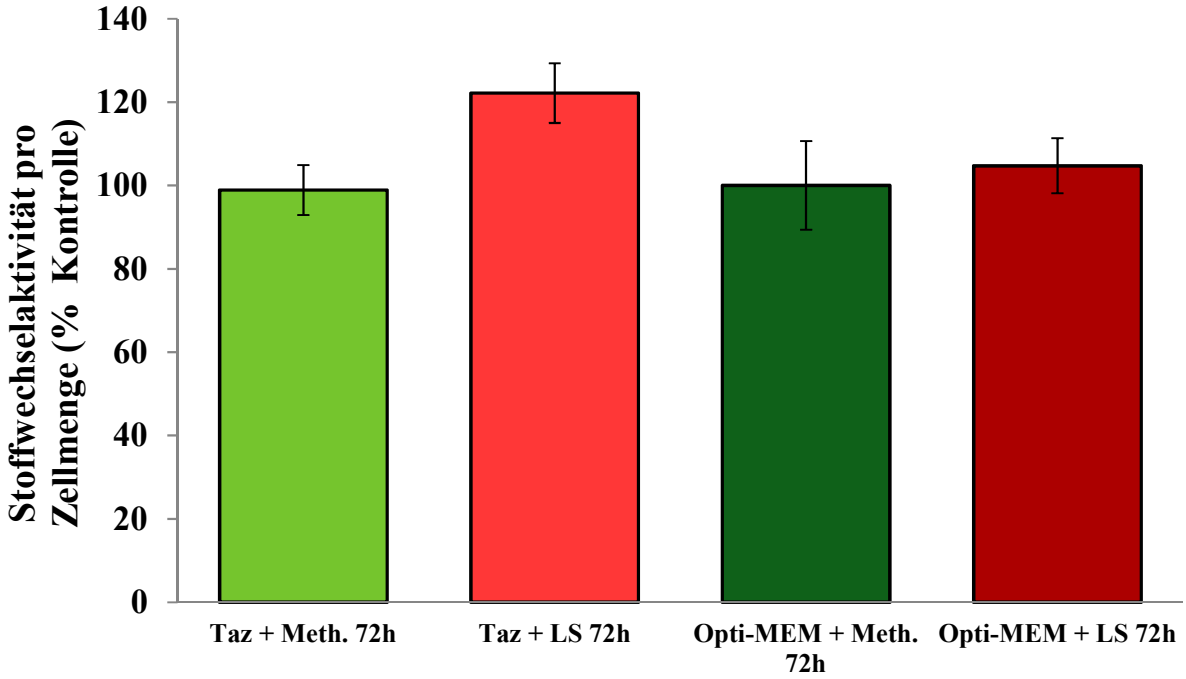

Abbildung 18: MTT-Reduktion
Die Chemikalien Taz oder Opti-MEM, beziehungsweise später Methanol oder Linolsäure wurden den Zellkulturen hinzuführt. Der Proteingehalt wurde 72 Stunden nach der ersten Zugabe gemessen.
Die durchschnittliche gemessene Extinktion wurde durch den zugehörigen Proteinwert geteilt, um die Stoffwechselaktivität pro Zellmenge anzugeben. Dieser Wert wurde prozentual zu dem Kontrollwert Opti-MEM + Meth. angegeben. Jede Säule steht für den gemittelten Wert aller Messergebnisse einer Zugabe. Der SEM ist für jede Säule dargestellt. Nach der Analyse mittels einfaktoriellem ANOVA kombiniert mit dem Tukey Post-hoc-Test gibt es keine signifikanten Veränderungen der Stoffwechselaktivität.

Die Messungen nach 72 Stunden zeigen eine ähnlich hohe Stoffwechselaktivität wie die 2-Stundenwerte. Mittels dem einfaktoriellen ANOVA-Test in Kombination mit dem Tukey-Test lassen sich keinerlei signifikante Veränderung detektieren, auch wenn die Zugabe von Taz + LS die Stoffwechselaktivität pro Zellmenge leicht zu steigern scheint. Taz allein bedingt keine signifikante Veränderung der MTT-Reduktion, da die Aktivität im Ansatz Taz + Meth. unverändert bleibt. LS alleine verändert die Aktivität ebenfalls nicht, da der Zusatz Opti-MEM + LS keine Stoffwechselsteigerung erwirkt. Die Ansätze mit der Zugabe LS zeigen im Vergleich zu den Methanol-Ansätzen eine tendenziell höhere, jedoch nicht signifikant erhöhte Stoffwechselaktivität von 122,15 % und 104,71 % der Kontrolle. Zusammenfassend kann das Enzym TAZ nicht die spezifische MTT-Reduktion beeinflussen, auch nicht bei gleichzeitiger LS-Zufuhr. Insgesamt wird deutlich, dass innerhalb von 72 Stunden in allen Ansätzen C6-Zellen mit aktivem Stoffwechsel herangewachsen sind.

4 Diskussion

Das Heilen von Tumorleiden setzt voraus, die Mechanismen des Tumorwachstums und die dabei stattfindenden Stoffwechselprozesse aufzuklären. Eine Erforschung der Einflussgrößen auf den Zellzyklus kann ein Eingreifen in die Zellprozesse und eine Behinderung des Tumorwachstums ermöglichen. Zu diesen Einflussgrößen könnte der Remodeling-Enzymkomplex Tafazzin, beziehungsweise dessen Umbauprodukt Cardiolipin gehören. Denkbar wäre eine Beeinflussung des Lipidumfelds, um die Synthese dieser proliferationsrelevanten Größen einzuschränken. Hierdurch könnte das Wachstum des Glioblastoms kontrolliert gesenkt werden, worin ein möglicher Therapieansatz bestünde.

In der Forschung gibt es Hinweise darauf, dass die Entstehung von Krebs durch eine Stoffwechselerkrankung der Mitochondrien begünstigt wird [48,49]. Es gibt einige Publikationen mit Hinweisen auf einen Zusammenhang zwischen Tumorwachstums und dem Phospholipid Cardiolipin. Dabei konnten allerdings die detaillierten Prozesse noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Zwar gelang es, die Zellproliferation durch Zugabe von freien FS in das Kulturmedium zu beeinflussen, jedoch konnte diese nicht eindeutig dem Einfluss der CL-Komposition zugeordnet werden [10,37]. So ließ sich über eine Beeinflussung der Proliferation durch Veränderungen des Lipidumfelds in der Zelle nur spekulieren. Demzufolge könnten frei vorliegende FS die Fettsäurereste des CL beeinflussen und dadurch die CL-Spezies verändern [35,37]. Damit könnte wiederum die Funktion der Mitochondrien beeinflusst werden, wodurch sich direkte Auswirkungen auf die Zellproliferation ergeben könnten. Da die zellulären FS aber auch auf jedes andere Phospholipid in Form und Funktion einwirken könnten, blieb bisher die Wirkung des veränderten CL unklar.

Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit den Auswirkungen der Cardiolipinzusammensetzung und des CL-Gehalts auf die Zellproliferation und Bioenergetik der Zelle. Ziel ist eine Differenzierung von Effekten bedingt durch Veränderungen des CL von Effekten bedingt durch Modifikationen des zellulären Lipidmetabolismus.

Grundvoraussetzung für das Gelingen des experimentellen Ansatzes dieser Arbeit ist eine genetische Manipulation der Zellen. Mittels Behandlung mit einem Lipofektamin RNAiMAX Reagenz und Taz siRNA kommt es zur Herunterregulierung des TAZ-Gens, sodass die veränderten Tumorzellen durch eine Verringerung des Genprodukts Tafazzin weniger Cardiolipinremodeling durchführen können [17,13]. Die Manipulation erwies sich als erfolgreich, die relative TAZ-mRNA-Menge ging über 72 Stunden durchschnittlich auf etwa 10 % des Ausgangswertes zurück. Die gelungene Manipulation konnte mittels

PCR-Messungen, wie in Abbildung 7 dargestellt, bewiesen werden. Die Ergebnisse nach 2 Stunden fungieren als Bezugsgröße und sind zu vernachlässigen, da dort noch keine erhebliche Auswirkung des Gen-Knock-downs ersichtlich wird. Es kann zu Verzögerungen zwischen der Inhibition des Gens und der Synthese des Endprodukts kommen. Eine Inkubationszeit von 2 Stunden zwischen genetischer Manipulation und der Auswertung möglicher Veränderungen stellt somit eine Herausforderung dar und lässt keine sichere Aussage zu. Die Versuchsansätze nach 2 Stunden sind daher als Kulturkontrollen anzusehen. Von besonderer Bedeutung sind folglich die Auswertungen nach 72 Stunden. Die Ausprägung der durch TAZ-Knock-down bedingten Veränderungen der 72-Stunden-Auswertungen ist eingeschränkt, da das TAZ-Gen nicht vollständig ausgeschaltet werden konnte. Weiterhin bedeutet die Reduzierung der mRNA auf 15 % des Ausgangswertes nicht eine ebenso deutliche Reduzierung der Proteinexprimierung. Für eine Verstärkung des Effekts ist ein komplettes Knock-out des TAZ-Gens erstrebenswert. Für eine zuverlässige Aussage wurde jeweils nur die Hälfte aller Zellkulturen genetisch manipuliert, die anderen Zellkulturen dienten der Kontrolle. Zur weiteren Untersuchung der auf das Cardiolipin wirksamen Einflussgrößen wurde ein Teil der Zellen einem großen Angebot an Linolsäure ausgesetzt, welches eine häufige FS im CL darstellt [50,51].

4.1 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf den zellulären Lipidstoffwechsel

Bedingt durch das längere Wachstum der Zellkulturen verändert sich geringfügig der Gehalt der frei in der Zelle vorkommenden FS. Dies stellt vermutlich einen natürlichen Prozess der Zellalterung dar [52]. Durch die Zugabe von LS erhöht sich die Menge der frei vorliegenden LS kaum, ein der Erwartung nach imposanter Anstieg liegt nicht vor. Die geringe Erhöhung der FS C18:2 spricht dafür, dass ein Teil der zugegebene LS schnell an Zellbestandteile gebunden und verstoffwechselt wird. Die LS stellt ein Substrat in der Arachidonsäure-Synthese dar, wodurch der schnelle Verbrauch verständlich wird. Ein Einfluss der LS auf andere FS ist wahrscheinlich [35].

Die in der Arbeit beobachteten Effekte durch Herunterregulierung des Remodeling-Enzymkomplexes TAZ sind nicht von Änderungen der zellulären FS-Verteilung oder einer Beeinflussung der Gesamtmenge der freien FS begleitet. Da die Veränderungen nicht durch eine Manipulation der zellulären FS bedingt sind, müssen sie allein durch die CL-Modifikation zustande gekommen sein. Diese Erkenntnis ist der entscheidende Unterschied zu den oben genannten Arbeiten [37,35,10], welche nicht zwischen CL-Metabolismus oder

zellulärem Lipidmetabolismus als Ursache für die Zellstoffwechsel- und Zellproliferationsveränderungen differenzieren konnten. Die Diskussion anderer Arbeiten darüber, ob die Beeinflussung der Bioenergetik und Zellproliferation von den TAZ-bedingten Veränderungen des CL oder von einer TAZ-bedingten Veränderung eines anderen Lipids abhängig ist, muss somit relativiert werden. Sicherlich haben andere Phospholipide ebenfalls Einfluss auf den Zellstoffwechsel, ihre Beteiligung an Änderungen in Bioenergetik und Proliferation nach LS-Applikation und/oder TAZ-Knock-down sollte sich in Änderungen der Verteilung freier zellulärer FS widerspiegeln. Unter den experimentellen Bedingungen wurde dies hier nach TAZ-Inhibition nicht beobachtet.

Diese Arbeit zeigt, dass die zellulären FS an einem komplexen Lipidstoffwechsel beteilig sind. Bei Zugabe der LS zum Kulturmedium konnten Veränderungen der Konzentration anderer FS wahrgenommen werden.

Es wurden einige Publikationen veröffentlicht, welche sich mit dem Lipidstoffwechsel im Tumorgewebe beschäftigten. Dabei konnte gezeigt werden, dass in Karzinomen der Lipidmetabolismus gesteigert wird [53]. Grund sei die Überexprimierung der Fettsäure-Synthase, die dadurch verstärkt vorkommenden FS sollen nach Hopperton et al. allerdings keine bestimme Funktion in den Tumorzellen ausüben [54]. Hardy et al. dagegen beschreiben typische Eigenschaften freier FS im Brusttumorzellen. Danach stimulieren ungesättigte FS, unter anderem Ölsäure, die Proliferation, währenddessen gesättigte FS wie Palmitinsäure die Apoptose aktivieren. Die FS wirken dabei auch auf das Profil der CL-Spezies ein [55]. Auch Buratte et al. beschäftigten sich mit den Eigenschaften der Palmitinsäure. Sie untersuchten diese in GL15 Glioblastomen und entdeckten, dass die Zugabe von Palmitat Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran löst, was zur Induktion der Apoptose führt. Palmitinsäure wirkt folglich in Glioblastomzellen wachstumshemmend [56]. Es ist möglich, dass zelluläre Palmitinsäure auch bei den hier verwendeten Glioblastomkulturen das Zellwachstum hemmt. Eine Überprüfung der Wirkung der FS Palmitinsäure auf die Proliferation ist anzustreben, da hieraus Konsequenzen für die Tumortherapie gezogen werden könnten.

4.2 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Cardiolipin

4.2.1 Cardiolipinmenge

Direkte Auswirkungen der Manipulation mittels TAZ-Knock-down, beziehungsweise LS-Zufuhr lassen sich anhand der Cardiolipin-Gesamtmenge untersuchen. Eine alleinige

Aktivitätsminderung des TAZ in dem gewählten Zeitraum von 72 Stunden kann weder die Synthese von CL verhindern, noch zu dessen Anstieg führen. Es zeigte sich jedoch, dass eine simultane Zugabe von Taz siRNA und LS zu einem signifikanten Anstieg der CL-Menge im Vergleich zur Gabe von LS bei intaktem TAZ führt. Weiterhin konnte eine deutliche Verminderung der CL-Gesamtmenge unter TAZ-Inhibition im Vergleich zur LS-Zufuhr bei intaktem Enzym herbeigeführt werden.

Die alleinige Zufuhr von LS kann nur eine geringe Erhöhung des CL bewirken. Dies zeigt sich durch den Vergleich der Zugaben Opti-MEM + LS und Opti-MEM + Methanol. Entscheidend ist dabei, dass die Erhöhung der CL-Gesamtmenge durch alleinige LS-Gabe viel geringer ist als jene unter TAZ-Knock-down und LS-Gabe.

Erwartungsgemäß sollte der Kock-down des TAZ-Enzyms das Remodeling des CL behindern und so den CL-Gesamtgehalt negativ beeinflussen. Jedoch ist eine entsprechende Veränderung im Vergleich zur Kontrolle nicht aufgetreten. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Limitierung der Syntheserate aufgrund Substratmangel im Kontrollansatz und die Stimulation der CL-Synthese bei heruntergefahrenem TAZ durch das akkumulierende Substrat LS. Bei inaktivem TAZ verringert sich die CL-Syntheserate, wodurch das Substrat LS akkumuliert und somit wiederrum die Synthese beschleunigt. Hierdurch wird die Reduzierung der CL-Synthese bei Ausfall des TAZ-Enzyms kompensiert. Außerdem gilt es zu bedenken, dass die TAZ-mRNA durch entsprechende Manipulation stark reduziert ist, jedoch durch inkomplette Transmission der mRNA die Auswirkungen auf Proteinebene weniger stark vorhanden sind.

Die Erhöhung des CL durch LS-Zufuhr ist nachvollziehbar, da die zugegebene LS einen wichtigen Bestandteil darstellt. Es stellt sich jedoch die Frage, warum es auch zu einem Anstieg des CL-Gehalts bei zusätzlich heruntergefahrenem TAZ-Enzymkomplex kommt. Aufgrund bisheriger Untersuchungen des TAZ-Enzyms und Untersuchungen zum Pathomechanismus beim Barth-Syndrom würde man gegensätzlich zu diesem Ergebnis einen Abfall des CL-Gehalts bei einem Ausfall des TAZ-Enzyms erwarten.

Aktuelle Arbeiten beschreiben, dass TAZ das Remodeling von unreifem gesättigten CL in ungesättigte und LS-reiche Spezies ermöglicht [57,58]. Der Erwartung nach müsste also der Knock-down des Tafazzin das Remodeling verhindern und dadurch zu einer Erniedrigung des Einbaus von LS in das CL führen. Die Menge des Gesamt-CL würde somit sinken. Ebenso sollte funktionstüchtiges TAZ, so wie es in den Opti-MEM Ansätzen vorkommt, zu einer Zunahme von reifem CL $(18:2)_4$ führen [59,60]. Allerdings werden diese Erwartungen nicht bestätigt, die oben geschilderte Auswertung zeigt ein gegenteiliges Ergebnis.

Diese Differenzen könnten einerseits durch die verschiedenen Gewebe zustande kommen. Zumeist wurde die Wirkung des TAZ auf Tetralinolsäure-CL an Herz- und Skelettmuskelgewebe untersucht, da hier sehr viel CL $(18:2)_4$ vorhanden ist [61,60,59]. Diese Untersuchungen dienten der Aufklärung des Barth-Syndroms, bei welchem das TAZ-Gen mutierte. Allerdings konnte bisher noch nicht vollständig aufgedeckt werden, weshalb und unter welchen Bedingungen das Remodeling von CL unter der Einwirkung von TAZ abläuft [20,51].

Andererseits zeigen die Untersuchungen zum Barth-Syndrom, dass hier Tetralinolsäure-CL in unzureichenden Mengen hergestellt wird [17,62,60]. Dagegen existiert in diesem Zellexperiment ein Überschuss an LS, von dem die Erhöhung des CL-Gehalts unmittelbar abhängig ist. Durch die Zufuhr der LS kann selbst bei Inhibition des TAZ die Synthese des CL stark induziert werden. Es wird deutlich, dass LS für einen aktiven CL-Metabolismus unabdingbar ist und die Funktionseinschränkung des Remodelingenzyms ausgleichen kann. Daher wird auch die Applikation von LS als Therapieansatz des Barth-Syndrom diskutiert [63]. Dies kann den hohen CL-Gehalt trotz Aktivitätslimitierung des TAZ unter LS-Substitution erklären.

Weiterhin fraglich bleibt, warum der CL-Gehalt bei LS-Zufuhr und TAZ-Knock-down größer ist als bei LS-Zufuhr und funktionstüchtigem Remodelingenzym. Auf den ersten Blick scheint ein intaktes TAZ und die Zufuhr von LS eine optimale Bedingung für die Synthese von CL darzustellen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass bei starker CL-Synthese und unter der Bedingung der LS-Zufuhr die Transacylase-Aktivität des TAZ beeinträchtigt wird und dadurch wiederrum der Remodeling-Enzymkomplex ineffizient wird. Gerade in Tumorzellen, bei welchen eine hohe Anzahl an freien Sauerstoffradikalen existiert, ist dies möglich. TAZ reagiert auch mit anderen Phospholipiden und tauscht dabei FS aus. So kann es passieren, dass TAZ eine FS auf ein anderes Phospholipid überträgt, aber keine andere FS dafür erhält. Während des Remodelingprozesses könnte so CL seine FS abgeben, jedoch dafür keine andere FS erhalten. Durch das unvollständige Remodeling entstände Monolysocardiolipin (MLCL), der hier ermittelte CL-Gesamtgehalt aus der Summe der in 3.2.2 benannten Spezies würde abnehmen. Das ineffiziente TAZ könnte zudem den Abbau von neu synthetisiertem CL fördern. Entsprechende Untersuchungen des MLCL-Gehalts wurden in der zugehörigen Publikation angefertigt [43]. Diese zeigten, dass es bei eigentlich funktionstüchtigem TAZ und Applikation von LS zur Akkumulation großer Mengen von MLCL kommt. Dies ist mit der aufgestellten Hypothese gut vereinbar. Unter Aktivitätslimitierung des TAZ und LS-Zufuhr stieg die Zahl des MLCL noch deutlicher an.

Dies spricht dafür, dass Tafazzin zur Regeneration von CL benötigt wird. So sollte auch bei Patienten mit Barth-Syndrom aufgrund der Aktivitätseinschränkung des TAZ vermehrt MLCL entstehen.

Weiterhin wurde der prozentuale Gehalt an oxidiertem CL untersucht und auf signifikante Unterschiede analysiert, um einen Eindruck der oxidativen Prozesse zu gewinnen. $(C18:2)_3$-Monohydroxylinoleyl-Cardiolipin wurde hierfür als Referenzspezies verwendet.

Der Ansatz Taz + LS zeigte eine deutliche Reduzierung der oxidierten CL-Menge im Vergleich zum Kontrollansatz Opti-MEM + Meth. Der TAZ-Kock-down unter LS-Zufuhr konnte als einziges eine signifikante Veränderung der $(C18:2)_3$Monohydroxylinolsäure-CL-Menge bedingen, alle anderen Zugaben führten zu keiner Beeinflussung des oxidierten CL. LS mindert die Oxidation alleine nicht, jedoch bei zusätzlichem Knock-down des TAZ-Gens. Es besteht die Möglichkeit, dass die erniedrigte Oxidation durch die erhöhte CL-Menge ausgelöst wird, welche, wie in Abbildung 8 dargestellt, unter diesen Bedingungen steigt. Der Knock-down des TAZ bei Zugabe von LS führt zum Anstieg des Tetralinolsäure-CL, welches die Folgen des oxidativen Stresses der Mitochondrien zu vermindern scheint, da weniger $(C18:2)_3$Monohydroxylinolsäure-CL entsteht. Tetralinolsäure-CL gilt jedoch als sehr anfällig für die radikale Oxidation [64].

Die Wirkung von CL auf die Oxidation bleibt letztendlich ungeklärt und könnte eine Aufgabe für weitere Forschungsarbeiten in der Zukunft darstellen.

4.2.2 Cardiolipinspezies

Weiterhin wurden CL-Spezies auf ihr Vorkommen unter der Manipulation des Tafazzin und der LS-Zufuhr untersucht. Hierbei musste zwischen Versuchsansätzen mit und ohne LS-Zugabe differenziert werden, da der Zusatz von LS stark zu ihrem Einbau in das CL führte.

Unter Abwesenheit von LS konnten in allen Versuchen große Mengen an Ölsäure (C18:1) und Palmitinsäure (16:0), vor allem in Form von $(C18:1)_2/(C16:0)_2$-CL und $(C18:1)_3$/C16:0-CL, gemessen werden. Dabei ist nach 72 Stunden CL $(C18:1)_3$/C16:0 am häufigsten vertreten. Linolsäure stellt unter normalen Bedingungen folglich in C6-Glioma-Zellen nicht die am meisten eingebaute FS dar. Das Tetralinolsäure-CL ist ohne Zugabe von LS in kaum messbaren Mengen vertreten, meist sogar deutlich unter 1 %. Das tumoröse Hirngewebe unterscheidet sich so diesbezüglich deutlich von anderen Geweben [19,21].

Interessanterweise zeigt sich, dass die Aktivitätslimitierung des Remodelingenzyms die Veränderung nur einer Spezies hervorrufen kann. Die einzige Spezies, welche sich in

signifikanter Menge verändert, ist CL $(C18:1)_2/(C16:0)_2$, sie tritt im Ansatz Taz + Meth. etwa 4 % häufiger auf als im Ansatz Opti-MEM + Meth.

Es liegt die Vermutung nahe, dass in den C6-Glioblastomen ein bestimmtes System zur selektiven Synthese der Öl- und Palmitinsäure CL-Spezies führt, währenddessen Linolsäure bewusst vermieden wird.

Allerdings ist nicht bekannt, welche Eigenschaften die palmitinsäurereichen Spezies CL $(C18:1)_2/(C16:0)_2$ und CL $(C18:1)_3$/C16:0 besitzen.

Einige Studien beschäftigten sich mit den spezifischen Eigenschaften der CL-Spezies, welche von den eingebauten FS abhängig sind. So beschäftigte sich auch die Forschungsgruppe unter Sapandowski mit den Eigenschaften der in das CL eingebauten FS, allerdings erfolgten die Untersuchungen anhand von Prostatakarzinomen. Sie zeigten, dass dort Ölsäure die Proliferation hemmt [35]. Diese Eigenschaft ist für das Glioblastom eher unwahrscheinlich. LS soll dagegen die Proliferation im Prostatakarzinom fördern [35]. Insgesamt gibt es einige sich widersprechende Aussagen über die Eigenschaften der im CL eingebauten FS, was an den verschiedenen Gewebeeigenschaften und an der letztendlich vorliegenden CL-Spezies liegen könnte.

Durch Applikation von LS wird diese selbst verstärkt eingebaut, wodurch sich die Menge an CL $(C18:1)_2/(C16:0)_2$ und CL $(C18:1)_3$/C16:0 deutlich reduziert. Besonders interessant daran ist der Einbau der LS unter Beeinflussung des TAZ-Enzyms. Unter dem TAZ-Knock-down kommt es zu einer Erhöhung von Tetralinolsäure-CL um mehr als Doppelte. Ebenso erhöhen sich andere LS-reiche Spezies wie CL $(C18:2)_3$/C18:1 und (C18:1)2/C18:2/C16:1-CL oder (C18:2)2/C18:1/C16:0-CL.

Tafazzin ist damit für das Auftreten spezifischer CL-Spezies mitverantwortlich. Dabei kann nach dem festgelegten Untersuchungszeitpunkt von 72 Stunden nach Zugabe von Taz siRNA und ohne LS-Zugabe zwar keine Modifikation der CL-Komposition festgestellt werden, es ist aber bekannt, dass eine Veränderung des CL unter normalen Kulturbedingungen viel Zeit benötigt [65]. Weiterhin wird nicht untersucht, ob die CL-Spezies zu einem anderen Zeitpunkt zwischen Gen-Knock-down und Messung nach 72 Stunden verändert vorliegen. Möglich wäre, dass ein anders gewähltes Untersuchungsintervall eine veränderte CL-Komposition auch ohne Zugabe von LS zeigt.

An diesen Ergebnissen wird deutlich, dass durch LS das Lipidumfeld so beeinflusst wird, dass es zu einem Effekt der TAZ-Inhibition kommt. Unter LS-Zufuhr führt das TAZ-Knock-down nach 72 Stunden zum deutlichen Wandel der CL-Spezies. Die CL-Spezies können dabei auch ohne TAZ gebildet werden, allerdings kommen sie dann in anderen Mengenverhältnissen vor.

Ohne die Aktivität des TAZ, aber unter Gabe von LS, werden diejenigen Spezies hergestellt, welche viel LS enthalten. Solange aber TAZ funktionsfähig ist, sorgt es für eine Abnahme dieser Formen und stellt auch CL-Spezies her, welche weniger LS aufweisen. Vermutlich hemmt TAZ den Einbau von LS in das CL. Möglich ist, dass LS und TAZ in gegenseitiger Wechselwirkung stehen. So könnte auch LS, beziehungsweise Tetralinolsäure-CL eine Signalkaskade in Gang setzen, welche zur Regulierung von TAZ führt. Diese These wird von Baile et al. unterstützt. Er betont, dass die CL-Synthese neben vielen unabhängigen Mechanismen von CL selbst gesteuert wird, indem CL die Crd1p Aktivität hemmt [66]. Crd1p ist ein Enzym der inneren Mitochondrienmembran, welches am Remodeling beteiligt ist.
Unter bestimmten Zellbedingungen bestimmt der Einbau von freien FS die Synthese der CL-Spezies und damit deren Eigenschaft und Funktion. Umgekehrt sind durch die in dieser Arbeit angewandte Manipulation CL-Spezies entstandenen, welche wie in 4.1 dargestellt keine Veränderung der zellulären FS-Verteilung bewirken.
Es werden komplexe Beziehungen zwischen dem TAZ-Enzymkomplex und der CL-Komposition deutlich, sicherlich spielt auch hier die Gewebsspezifität eine übergeordnete Rolle.

4.2.3 Im CL gebundene Fettsäuren

In 3.2.3 wird deutlich, dass der TAZ-Knock-down ohne LS-Zugabe keinen Einfluss auf den FS-Einbau in das CL besitzt. Unter gleichen Bedingungen sind nicht nur die Werte des Opti-MEM- und Taz-Ansatzes nach 2 Stunden, sondern auch die Werte nach 72 Stunden ohne LS nahezu identisch. Eine Kultivierung über 72 Stunden führt zu einem leicht vermehrten Einbau von C18:1 und vermindertem Einbau von C18:2 gegenüber den 2-Stundenwerten. Da Methanol als Kontrollsubstanz fungiert, welche in der verabreichten Dosis keinerlei Einfluss auf den Versuch ausübt, ist diese Veränderung nicht der Gabe von Methanol zuzuschreiben. Die 2014 veröffentlichte Studie unter Custer JE konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Zellkulturalter und Fettsäurezusammensetzung in Lipiden darstellen [67].
Beachtlich ist die Veränderung des Fettsäureeinbaus unter alleinigem LS-Einfluss. Es zeigt sich, dass verfügbare Linolsäure auf Kosten anderer FS in das CL eingebaut wird, wodurch sich die Säulen der beiden LS-Versuchsansätze in Abbildung 11 auf den ersten Blick ähnlich präsentieren. LS scheint also auch ohne die Manipulation des TAZ-Gens Einfluss auf den Einbau der FS zu haben. Nicht nur der Anteil der im CL gebundenen C18:2 FS steigt, sondern es erhöht sich auch die Menge der gebundenen FS C16:1 und C20:2. Ein anderes Zellkulturexperiment konnte zeigen, dass die Gabe einer FS einerseits zum Einbau dieser in das

Cardiolipin führt. Andererseits zeigte sich, dass die Verabreichung einer FS zudem zur Veränderung der CL-Menge mit anderen gebundenen FS führt. Eine komplexe Beziehung zwischen Lipidstoffwechsel und CL-Spezies zeichnet sich ab [35]. Vermutlich ändert LS die Bedingungen in der Zelle so, dass bestimmte FS bevorzugt in das CL eingebaut werden. Die Art und Verteilung der Fettsäurereste haben dabei signifikante Auswirkungen auf die physiologische Funktion des CL [53].
Weitere Anhaltspunkte ergeben sich beim Vergleich der Taz-Ansätze, welche sich durch die Zufuhr von LS unterscheiden sowie beim Vergleich beider LS-Ansätze, welche in der Aktivität des TAZ voneinander abweichen.
Während ein heruntergefahrenes Tafazzin-Enzym das Bindungsverhalten der Fettsäuren im Cardiolipin nicht beeinflussen kann, kommt es bei einem zusätzlichen Überschuss an Linolsäure zu einer deutlichen Erhöhung der eingebauten C18:2 Fettsäure und starker Erniedrigung der Fettsäuren C18:1 und C16:0.
Dabei ist die Veränderung der C18:2 und der C18:1 Fettsäuren nochmals stärker als bei alleiniger Linolsäure-Gabe.
Hierdurch wird deutlich, dass der Einfluss des TAZ von Veränderungen des Lipidumfelds abhängig ist. Das Enzym reguliert den FS-Einbau in das CL und verändert dadurch dessen Komposition. Dabei wirkt das Umfeld aber stetig auf seine Funktion ein. Unter bestimmten Zellbedingungen verhindert TAZ den LS-Einbau und fördert den Einbau von Öl- und Palmitinsäure. Der Einfluss des TAZ auf die vorhandenen FS könnte wiederum von dem Zusammenspiel zwischen CL und dessen Umgebung abhängig sein. Schlame et al. konnten zeigen, dass die Funktion eines Enzymkomplexes nur in seiner natürlichen Umgebung gesichert ist. Laut ihm verliert ein isolierter Enzymkomplex seine Spezifität, sodass weitere Strukturen an seiner Funktion beteiligt sein müssen [68]. Weitere Untersuchungen von Schlame et al. sprechen dafür, dass nicht das Tafazzin die Enzymspezifität trägt, sondern dessen Spezifität von den Eigenschaften der Lipide abhängig ist [16]. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Zellumgebung stark auf das TAZ-bedingte Remodeling einwirkt.

Im Vergleich der FS einer Kettenlänge zeigen sich komplexe Veränderungen bedingt durch die Manipulation des TAZ-Gens und durch die Applikation von LS. Jedoch zeichnet sich ab, dass jede signifikante Veränderung der FS-Menge einer Kettenlänge die Zufuhr von LS benötigt. Für die Summe der FS einer Kettenlänge gelten damit ähnliche Gesetzmäßigkeiten wie für die spezifischen im CL gebundenen FS. Auffällig ist die große Menge an C18 FS, die nochmals bei Applikation von LS zunimmt. Es ist bekannt, dass die Kettenlänge einer FS Einfluss auf die

Funktion des CL besitzt, besonders auf die Zellproliferation. Dabei korrelieren lange Fettsäurereste mit dem Auftreten von gesundem Gewebe und kurze Reste mit krankhaft verändere Zellen [25,24].
Insgesamt finden sich mit einer großen Menge an C18 und C16 FS-Resten kurze CL-Spezies, so wie es für schnell wachsendes Tumorgewebe typisch zu sein scheint. Allerdings überwiegen FS mit 18 C-Atomen und nicht jene mit 16 C-Atomen, wie es in anderen Publikationen dargestellt wird.

Die Untersuchungen zum Sättigungsgrad des Gesamt-CL zeigen, dass dieser weder durch die Aktivitätseinschränkung des TAZ alleine noch durch alleinige Applikation von LS im festgelegten Zeitintervall geändert wird. Zwar scheint LS auch unabhängig von TAZ die Menge an Doppelbindungen zu erhöhen und somit die Sättigung abzusenken, jedoch reicht dies nicht für eine signifikante Veränderung aus. Spannend sind die Veränderungen, welche durch Wechselwirkung des herunterregulierten TAZ-Enzyms und LS entstehen. Vorliegende LS und einige C20 FS werden in die CL-Spezies eingebaut und verursachen durch die zweifach ungesättigten Kohlenstoffketten der LS eine Senkung der durchschnittlichen Sättigung. Die CL-Spezies des C6-Glioms müssen folglich ohne Manipulation geringe Mengen an Doppelbindungen besitzen. Dies steht im Gegensatz zu anderen Untersuchungen des Sättigungsgrads schnell proliferierender Gewebe [24,25].
Möglich ist, dass durch die Herunterregulierung des TAZ die Hemmung des LS-Einbaus in das CL aufgehoben wird, sodass sich vermehrt CL $(18:2)_4$ anreichert. Andere, stärker gesättigte Spezies nehmen dadurch ab. Grund der verminderten Sättigung könnte dabei auch eine geringere Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress sein. Es zeigte sich in 3.2.1, dass die Zellen mit heruntergefahrenem TAZ und zugesetzter LS robuster gegen eine Oxidation sind.

4.3 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Mitochondrien

Die Messung der Citratsynthaseaktivität spiegelt den Gehalt des Markerenzyms und damit der Mitochondrien wider und lässt so eine Aussage über die Mitochondrienmenge zu. Funktionsfähige Mitochondrien sind Voraussetzung für die Zellproliferation. Die Auswertungen zeigen, dass weder die Zugabe von Taz siRNA noch eine zusätzliche Zufuhr von LS zu einer Veränderung der Citratsynthaseaktivität führen. Die Mitochondrienmenge konnte folglich nicht beeinflusst werden. Die durch TAZ-Knock-down bedingten Veränderungen der CL-Spezies wirken sich somit nicht auf den Mitochondriengehalt aus.

Daher muss der Biomechanismus ein anderer als beim Barth-Syndrom sein. Das Barth-Syndrom ist durch eine Mutation des TAZ-Gens gekennzeichnet, welches zu einem auffälligen FS-Muster des CL führt. Es kommt zur pathologischen Veränderung der Mitochondrien wodurch letztlich die Zellintegrität zusammenbricht [17].

Auch wenn im Zellexperiment keine Verringerung der Mitochondrienanzahl festgestellt werden konnte, ist eine CL-Spezies bedingte Mitochondriopathie möglich, indem die Spezies die oxidative Phosphorylierung direkt negativ beeinflussen. Die maximale oxidative Phosphorylierung konnte durch den kombinierten Einfluss von Tafazzin siRNA und der Zugabe von LS gesenkt werden. Da sich der Mitochondriengehalt nicht ändert, muss die Verminderung der Zellatmung direkten Veränderungen des Energiemetabolismus geschuldet sein. Ursprung der Veränderungen müssen die durch TAZ-Inhibition und LS-Zugabe beeinflussten CL-Spezies sein.

Funktionstüchtiges Cardiolipin ist für die Stabilität der Atmungskomplexe II, III, IV, der ATP-Synthase und dem Cytochrom c unerlässlich [11,26,28]. Vergeade et al. zeigten, dass Tetralinolsäure-CL maßgeblich an der Aktivität der Atmungskomplexe beteiligt ist [69].

Es gilt jedoch zu beachteten, dass es sich bei dem untersuchten Gewebe um hoch maligne Zellen handelt. Mit dem Warburg-Effekt wird postuliert, dass Tumorzellen ihre Energie bevorzugt aus anaeroben Prozessen beziehen, da sie nicht auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen sind [41]. Untersuchungen konnten sogar belegen, dass die Zellatmung zur Behinderung von Tumorwachstum führt [40]. Dies legt den Verdacht nahe, dass die C6-Gliom-Zelllinie ebenfalls unabhängig von der Zellatmung ihre Energie beziehen kann. Im Tumorgewebe könnten folglich Prozesse ablaufen, welche die Zellatmung unabhängig von Art und Menge des CL herunterfahren. Auch Kiebish et al. stellten fest, dass Tumorzellen ihre Mitochondrienfunktion verringern, da sie nicht auf die Zellatmung angewiesen seien. Diese Verringerung zeigte jedoch über mehrere Versuche hinweg einen Zusammenhang mit der Art der vorhandenen CL-Spezies [12].

Um diese Überlegung zu vertiefen, müsste die Zellatmung der gezüchteten Gliome mit der Zellatmung von gesundem Hirngewebe verglichen werden. Eine insgesamt deutlich niedrigere Zellatmung im Tumorgewebe würde die These des Warburg-Effekts unterstützen.

Entgegen den Ergebnissen in dieser Arbeit sprechen Untersuchungen von Baile et al. für eine Unabhängigkeit der Zellatmung von der Funktion des Tafazzin. In Hefe konnte ein TAZ-Mangel und die damit verbundenen Einschränkungen des CL-Remodelings nicht zum Ausfall der oxidativen Phosphorylierung führen. Jedoch zeigt der Autor die Möglichkeit auf, dass dieses Ergebnis durch die Untersuchung von Hefe zustande kommt. In Säugetierzellen

könnte der Einfluss der Acylkettenzusammensetzung auf die Zellatmung ein anderer als in Hefezellen sein. Weiterhin zeigt der Autor die Möglichkeit auf, dass andere mitochondriale Prozesse, welche in seiner Untersuchung nicht eingeschlossen wurden, die Abhängigkeit der Zellatmung von Tafazzin bedingt [70].

4.4 Effekt der TAZ-Aktivitätslimitierung und/oder LS-Applikation auf Zellaktivität und Zellwachstum

4.4.1 Zellwachstum

Zunächst stellt das Zellwachstum die Kontrolle einer ordnungsgemäßen Proliferation unter guten Nährbedingungen dar. Im zeitlichen Verlauf wachsen die Kulturen regelrecht, schon 2 Stunden nach der Manipulation ist ein Zellwachstum erkennbar, 70 Stunden später ist der Proteingehalt auf ein Vielfaches gestiegen. Zudem verdeutlichen die Untersuchungen zum Proteingehalt der Zellen, dass, bedingt durch den Ausfall des TAZ, das Zellwachstum um etwa 25 % gesenkt wird. Die Proliferation zeigt sich dabei unbeeinflusst vom Angebot an LS.

Aufgrund des Effekts des Remodeling-Enzymkomplexes auf die Proliferation liegt ein direkter Einfluss des Tafazzin auf den Zellzyklus nahe. Hier könnte in Zukunft ein Angriffspunkt der Tumorproliferation liegen. Durch das komplette Abschalten des Remodeling-Enzyms könnte der Zellzyklus direkt so beeinflusst werden, dass das Tumorwachstum behindert wird.

Ikon et al. unterstützen die Vermutung, dass es eine kausale Beziehung zwischen abgeschaltetem TAZ-Enzymkomplex und der negativen Beeinflussung des Zellwachstums gibt. Sie untersuchten an einer HL60 Myeloid-Progenitor-Zellkultur unter anderem den Einfluss des TAZ-Knock-downs. Die Forschungsgruppe fand heraus, dass die TAZ-Inhibition zur Indizierung der Apoptose führe. Die Apoptose auslösende Veränderung sei eine zunehmende Annexin V-Bindung. Annexin V wird in der Zelle an Phosphatidylserin gebunden, welches nur bei apoptotischen Zellen von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite transloziert wird. Interessanterweise konnte in der gleichen Arbeit gezeigt werden, dass durch exogene CL-Zufuhr die Annexin V-Bindung abnimmt und sich dadurch die Apoptose vermindert. Daher stellten sie die Hypothese auf, dass zugeführtes CL das ausgeschaltete TAZ ausgleichen könnte [71].

Weiterhin konnte in einer klinischen Studie gezeigt werden, dass die Menge der TAZ-Expression bei Patienten mit Rektumkarzinom mit der Prognose und den Erfolgen der Radiotherapie korreliert. Die Tafazzin-Expression konnte bei hoher Tumorbelastung vermehrt nachgewiesen werden [72]. Dies spricht ebenfalls für eine Korrelation zwischen funktionsfähiger TAZ-Menge und der Tumorproliferation.

Es gibt allerdings auch Publikationen, die gegensätzlich zu diesen und den eigenen Ergebnissen eine Steigerung des Zellwachstums unter heruntergefahrenem TAZ-Gen vermuteten:
He et al. untersuchten die Rolle des TAZ-Gens anhand Primärkulturen neonataler ventrikulärer Fibroblasten. Sie nutzten eine Knock-down-Methode, um die Funktion des TAZ auszuschalten und dadurch auf die Funktion rückzuschließen. Der Ausfall des TAZ bewirkte weitreichende Veränderungen bezüglich der Zellprogression. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies erhöhte sich durch die TAZ-Inhibition, gefolgt von der Aktivierung der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK), welche Transkriptions- und Translationsfaktoren induzierte. Dadurch kam es zur Steigerung der Regulation des Zellzyklus und zur Zellhypertrophie [73].
Auch die DNA- und Proteinsynthese soll in Zellen des TAZ-Knock-downs induziert worden sein. Interessanterweise konnten sie dennoch kein Zellwachstum feststellen. Die im Jahr 2013 veröffentlichte Arbeit stützt sich dabei auf eine andere Publikation von He et al., die ebenfalls zu dem Schluss kommen, dass der TAZ-Knock-down zur Zellprogression führe. Dort besitzt die Forschungsgruppe nach Untersuchungen an neonatalen ventrikulären Myozyten die Überzeugung, dass das Herunterregulieren des TAZ-Gens zur Hypertrophie führe und das Barth-Syndrom auslöse [74].
Der Grund der auseinandergehenden Ergebnisse ist fraglich. Die abweichenden Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass die Effekte zellspezifisch sind. Möglich ist aber auch, dass das Ausschalten des TAZ-Enzyms eine Hypertrophie der Zellen bewirkt, da die Hyperplasie durch vermehrte Regulation des Zellzyklus gehemmt wird. Diese These schließt die Ergebnisse nicht gegenseitig aus, sondern lässt sie ergänzend wirken.

4.4.2 Zellaktivität

Die Stoffwechselaktivität, welche mittels MTT-Versuch im Verhältnis zum Proteingehalt gemessen wurde, kann weder durch das alleinige Herunterfahren des Enzyms TAZ noch bei zusätzlicher LS-Gabe manipuliert werden. Auch durch die alleinige Gabe von LS wird keine signifikante Veränderung der Stoffwechselaktivität bedingt. Hierbei wird die Aktivität nur zu einem Zeitpunkt gemessen, der Messwert stellt nicht wie beim Zellwachstum die Summe eines zeitlichen Verlaufs dar.
Wie in 4.4.1 erläutert, führt das Downknocken des Enzymkomplexes Tafazzin zur deutlichen Verminderung der Zellproliferation. Die Zellaktivität dagegen ist von der Funktionseinschränkung des TAZ und von der Veränderung des FS-Milieus unbeeinflusst. Bemerkenswert ist dieser Umstand unter der Erkenntnis, dass der TAZ-Knock-down bei

LS-Zufuhr die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung reduzierte. Daher ist anzunehmen, dass unter den bestehenden Bedingungen die MTT-Reduktion nicht ausschließlich die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase widerspiegelt. Obwohl die vorliegenden Ergebnisse keine Verminderung der Zellaktivität durch die Aktivitätslimitierung des TAZ-Enzyms beweisen können, sprechen zahlreiche Forschungsarbeiten für diesen Umstand. Der veränderte Stoffwechsel beim Barth-Syndrom gab Anlass zur intensiven Untersuchung des Zusammenhangs. Es wurde aufgedeckt, dass eine Mutation des TAZ-Gens zur Stoffwechselveränderung führt, eine typische Folge ist die dilatative Kardiomyopathie [75], [76,9]. Diese Arbeiten zeigen, dass funktionstüchtiges Tafazzin für einen regelrechten Stoffwechsel unerlässlich ist. Auch die in 4.4.1 bereits erläuterten Publikationen von He et al. verdeutlichen, dass das TAZ-Enzym die Zellaktivität beeinflusst, ein Ausfall des Enzyms führt zur Zellhypertrophie.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Zusammenhang zwischen Menge und Zusammensetzung des Phospholipids Cardiolipin und der Zellproliferation. Durch ein Herunterfahren des Remodeling-Enzymkomplex Tafazzin und dem Zusatz von Linolsäure sollten die Cardiolipinspezies in Menge und Art bewusst so beeinflusst werden, dass sich dadurch Veränderungen in mitochondrialer Biogenese, Zellproliferation und metabolischer Aktivität ergeben. Dafür wurde neben den aufgezählten Parametern auch der Einfluss der Manipulation auf den Lipidstoffwechsel untersucht. So konnte zwischen Veränderungen bedingt durch den CL-Metabolismus und Veränderungen bedingt durch Manipulation anderer Lipide differenziert werden.
Alle Untersuchungen erfolgten am Beispiel der C6-Glioma-Zelllinie, welches ein sehr schnell proliferierendes Karzinom darstellt und eine nebenwirkungsarme Hemmung ermöglicht.

In die Hälfte aller Kulturen erfolgte die Zugabe kommerziell erhältlicher Tafazzin siRNA sodass die Expression des Tafazzin-Gens unterdrückt wurde, eine Kontrollgruppe erhielt stattdessen die Substanz Opti-MEM. Später wurden sowohl der Hälfte der genmanipulierten Kulturen als auch der Hälfte der Kontrollgruppe Linolsäure zugegeben. Alle anderen Kulturen wurden mit der gleichen Menge Methanol beimpft. Nach festgelegten Intervallen erfolgten die Auswertungen. Das Experiment wurde sechsmalig wiederholt.

Die experimentelle Arbeit zeigt, dass das Remodelingenzym Tafazzin unter Anwesenheit von LS starke Auswirkungen auf den CL-Gehalt und auf die Art der CL-Spezies besitzt. Außerdem kann es die oxidative Phosphorylierung herabsetzten. Die Zellproliferation wird durch das heruntergefahrene Enzym vermindert, auch wenn keine Applikation von LS erfolgte. Die zellulären FS bleiben durch die Manipulation des TAZ-Gens unbeeinflusst, sodass die Veränderungen nicht dem Einfluss des zellulären Fettsäuremetabolismus geschuldet sein können, sondern auf das CL selbst zurückgeführt werden müssen. Die CL-Menge als auch die Komposition sind dagegen durch ein entsprechendes Lipidumfeld beeinflussbar.
Es wird weiterhin deutlich, dass das TAZ-Enzym unter dem Einfluss seiner Umgebung steht. TAZ reguliert den Lipideinbau in das CL, ist in dieser Funktion aber von seiner Umgebung abhängig. Dieser Einfluss wird anhand der Zufuhr von LS deutlich. Wahrscheinlich kann das Zusammenspiel zwischen CL und dessen Umgebung für die Spezifität des TAZ verantwortlich gemacht werden.

Das Downknocken des CL-Remodeling-Enzyms Tafazzin führt zu keiner Veränderung der Mitochondrien und der Zellaktivität, jedoch bei Zugabe von LS zu einer deutlichen Reduzierung der oxidativen Phosphorylierung. Dies spricht für einen Einfluss der CL-Spezies auf die Bioenergetik der C6-Gliomzelle. Weiterhin vermindert das heruntergefahrene Tafazzin direkt die Zellproliferation, was für einen unmittelbaren Einfluss auf den Zellzyklus spricht.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich ableiten, dass die CL-Menge und Komposition mit der Bioenergetik der Zelle verknüpft sind. Zudem besitzt das Enzym Tafazzin selbst direkten Einfluss auf den Zellzyklus und kann die Proliferation verändern. Durch das Ausschalten des TAZ-Gens und der Veränderung des Lipidumfelds kann das Cardiolipin in Menge und Art deutlich beeinflusst werden.
Daraus ergibt sich die Möglichkeit bösartige Tumore wie das Glioblastom durch ein entsprechendes Lipidumfeld so zu beeinflussen, dass proliferationsrelevantes CL nicht mehr gebildet werden kann.

Es sollte an dieser Stelle mit einer weiteren experimentellen Arbeit angeknüpft werden, welche neben der Linolsäure weitere Modifikationen des Lipidumfelds vornimmt. Zudem ist ein komplettes Knock-out des Tafazzin-Gens wünschenswert um deutlichere Effekte erzielen zu können.

6 Literaturverzeichnis

[1] Sepehrnia, A.: Gliom und Gliomnetzwerk. Luzern 2016.

[2] Böcker, W.; Denk, H.; Heitz, P.U.; Moch, H.: Pathologie: Mit über 200 Tabellen. Kpt. 8.10. S. 317-322. Elsevier Urban & Fischer. München, Jena 2008.

[3] Machein, M.; Gumpp, V.; Facchin, E.: Tumor des Nervensystems. Universitätsklinikum Freiburg. Klinisches Krebsregister. 2014.

[4] Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B.W.; Kleihues, P.: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta neuropathologica. 114(2):97–109 (2007)

[5] Koch, G.: Bildmorphologische Parameter präoperativer MR-Tomogramme und Überlebenszeit von Patienten mit malignen Gliomen. Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Dissertation. 2007.

[6] Birol Sarica, F.; Tufan, K.; Cekinmez, M.; Sen, O.; Cem Onal, H.; Mertsoylu, H.; Topkan, E.; Pehlivan, B.; Erdogan, B.; Nur Altinors, M.: Effectiveness of temozolomide treatment used at the same time with radiotherapy and adjuvant temozolomide; concomitant therapy of glioblastoma multiforme: multivariate analysis and other prognostic factors. Journal of neurosurgical sciences. 54(1):7–19 (2010)

[7] Hsu, Y.-H.; Dumlao, D.S.; Cao, J.; Dennis, E.A.: Assessing phospholipase A2 activity toward cardiolipin by mass spectrometry. PloS one. 8(3):e59267 (2013)

[8] Schlame, M.; Hostetler, K.Y.: Cardiolipin synthase from mammalian mitochondria. Biochimica et biophysica acta. 1348(1-2):207–213 (1997)

[9] Gaspard, G.J.; McMaster, C.R.: Cardiolipin metabolism and its causal role in the etiology of the inherited cardiomyopathy Barth syndrome. Chemistry and Physics of Lipids. 193:1–10 (2015)

[10] Ye, C.; Shen, Z.; Greenberg, M.L.: Cardiolipin remodeling: a regulatory hub for modulating cardiolipin metabolism and function. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 48(2):113–123 (2016)

[11] Claypool, S.M.: Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. Biochimica et biophysica acta. 1788(10):2059–2068 (2009)

[12] Kiebish, M.A.; Han, X.; Cheng, H.; Chuang, J.H.; Seyfried, T.N.: Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic

evidence supporting the Warburg theory of cancer. Journal of lipid research. 49(12):2545–2556 (2008)

[13] Sparagna, G.C.; Lesnefsky, E.J.: Cardiolipin remodeling in the heart. Journal of cardiovascular pharmacology. 53(4):290–301 (2009)

[14] Hostetler, K.Y.; van den Bosch, H.; van Deenen, L.L.: Biosynthesis of cardiolipin in liver mitochondria. Biochimica et biophysica acta. 239(1):113–119 (1971)

[15] Gawrisch, K.: Lipids. Nature Chemical Biology. 8(10):811–812 (2012)

[16] Schlame, M.; Xu, Y.; Ren, M.: The Basis for Acyl Specificity in the Tafazzin Reaction. The Journal of biological chemistry. 292(13):5499–5506 (2017)

[17] Schlame, M.; Ren, M.: Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. FEBS letters. 580(23):5450–5455 (2006)

[18] Amoscato, A.A.; Sparvero, L.J.; He, R.R.; Watkins, S.; Bayir, H.; Kagan, V.E.: Imaging Mass Spectrometry of Diversified Cardiolipin Molecular Species in the Brain. Analytical chemistry. 86(13):6587–6595 (2014)

[19] Kimura, T.; Jennings, W.; Epand, R.M.: Roles of specific lipid species in the cell and their molecular mechanism. Progress in lipid research. 62:75–92 (2016)

[20] Corcelli, A.; Schlame, M.: Cardiolipin as key lipid of mitochondria in health and disease. 2nd Edition, Florence, Italy, September 30-October 1, 2015. Chemistry and Physics of Lipids. 198:10–12 (2016)

[21] Chao, Y.-J.; Chang, W.-H.; Ting, H.-C.; Chao, W.-T.; Hsu, Y.-H.H.: Cell cycle arrest and cell survival induce reverse trends of cardiolipin remodeling. PloS one. 9(11):e113680 (2014)

[22] Houtkooper, R.H.; Turkenburg, M.; Poll-The, B.T.; Karall, D.; Pérez-Cerdá, C.; Morrone, A.; Malvagia, S.; Wanders, R.J.; Kulik, W.; Vaz, F.M.: The enigmatic role of tafazzin in cardiolipin metabolism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 1788(10):2003–2014 (2009)

[23] Feillet-Coudray, C.; Fouret, G.; Casas, F.; Coudray, C.: Impact of high dietary lipid intake and related metabolic disorders on the abundance and acyl composition of the unique mitochondrial phospholipid, cardiolipin. Journal of bioenergetics and biomembranes. 46(5):447–457 (2014)

[24] Schild, L.; Lendeckel, U.; Gardemann, A.; Wiswedel, I.; Schmidt, C.A.; Wolke, C.; Walther, R.; Grabarczyk, P.; Busemann, C.: Composition of molecular cardiolipin species correlates with proliferation of lymphocytes. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.). 237(4):372–379 (2012)

[25] Kiebish, M.A.; Han, X.; Cheng, H.; Seyfried, T.N.: In vitro growth environment produces lipidomic and electron transport chain abnormalities in mitochondria from non-tumorigenic astrocytes and brain tumours. ASN neuro. 1(3) (2009)

[26] Eble, K.S.; Coleman, W.B.; Hantgan, R.R.; Cunningham, C.C.: Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy. The Journal of biological chemistry. 265(32):19434–19440 (1990)

[27] Murray, M.; Hraiki, A.; Bebawy, M.; Pazderka, C.; Rawling, T.: Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. Pharmacology & therapeutics. 150:109–128 (2015)

[28] Gomez, B.; Robinson, N.C.: Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1. Biochemistry. 38(28):9031–9038 (1999)

[29] Martens, J.-C.; Keilhoff, G.; Gardemann, A.; Schild, L.: Oxidation of cardiolipin is involved in functional impairment and disintegration of liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation in the presence of increased Ca^{2+} concentrations. Molecular and cellular biochemistry. 394(1-2):119–127 (2014)

[30] Paradies, G.; Petrosillo, G.; Pistolese, M.; Di Venosa, N.; Federici, A.; Ruggiero, F.M.: Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. Circulation research. 94(1):53–59 (2004)

[31] Ascenzi, P.; Polticelli, F.; Marino, M.; Santucci, R.; Coletta, M.: Cardiolipin drives cytochrome c proapoptotic and antiapoptotic actions. IUBMB Life. 63(3):160–165 (2011)

[32] McMillin, J.B.; Dowhan, W.: Cardiolipin and apoptosis. Biochimica et biophysica acta. 1585(2-3):97–107 (2002)

[33] Buselmaier, W.: Biologie für Mediziner. Kpt. 4.1. S. 56-58. Springer. Berlin, Heidelberg 2012.

[34] Rassow, J.: Biochemie: 67 Tabellen. Kpt. 9. S. 506-510. Thieme. Stuttgart 2012.

[35] Sapandowski, A.; Stope, M.; Evert, K.; Evert, M.; Zimmermann, U.; Peter, D.; Päge, I.; Burchardt, M.; Schild, L.: Cardiolipin composition correlates with prostate cancer cell proliferation. Molecular and Cellular Biochemistry. 410(1-2):175–185 (2015)

[36] Tyurina, Y.Y.; Polimova, A.M.; Maciel, E.; Tyurin, V.A.; Kapralova, V.I.; Winnica, D.E.; Vikulina, A.S.; Domingues, M.R.M.; McCoy, J.; Sanders, L.H.; Bayır, H.; Greenamyre, J.T.; Kagan, V.E.: LC/MS analysis of cardiolipins in substantia nigra and plasma of rotenone-treated rats: Implication for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Free radical research. 49(5):681–691 (2015)

[37] Murke, E.; Stoll, S.; Lendeckel, U.; Reinhold, D.; Schild, L.: The mitochondrial phospholipid cardiolipin is involved in the regulation of T-cell proliferation. Biochimica et biophysica acta. 1861(8 Pt A):748–754 (2016)

[38] Lu, J.; Tan, M.; Cai, Q.: The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. Cancer letters. 356(2 Pt A):156–164 (2015)

[39] Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E.: The metabolism of tumors in the body. Berlin-Dahlem 1927.

[40] Schulz, T.J.; Thierbach, R.; Voigt, A.; Drewes, G.; Mietzner, B.; Steinberg, P.; Pfeiffer, A.F.H.; Ristow, M.: Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. The Journal of biological chemistry. 281(2):977–981 (2006)

[41] Thierbach, R.; Schulz, T.J.; Isken, F.; Voigt, A.; Mietzner, B.; Drewes, G.; Kleist-Retzow, J.-C. von; Wiesner, R.J.; Magnuson, M.A.; Puccio, H.; Pfeiffer, A.F.H.; Steinberg, P.; Ristow, M.: Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. Human molecular genetics. 14(24):3857–3864 (2005)

[42] Matoba, S.; Kang, J.-G.; Patino, W.D.; Wragg, A.; Boehm, M.; Gavrilova, O.; Hurley, P.J.; Bunz, F.; Hwang, P.M.: p53 regulates mitochondrial respiration. Science (New York, N.Y.). 312(5780):1650–1653 (2006)

[43] Ohlig, T.; Le, D.V.; Gardemann, A.; Wolke, C.; Gürtler, S.; Peter, D.; Schild, L.; Lendeckel, U.: Effects of siRNA-dependent knock-down of cardiolipin synthase and tafazzin on mitochondria and proliferation of glioma cells. Biochimica et biophysica acta. 1863(4):379–387 (2018)

[44] Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry. 193(1):265–275 (1951)

[45] Folch, J.; Less, M.; Sloane Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of biological chemistry. 226(1):497–509 (1957)

[46] Nourooz-Zadeh, J.; Liu, E.H.; Yhlen, B.; Anggard, E.E.; Halliwell, B.: F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. Journal of neurochemistry. 72(2):734–740 (1999)

[47] Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72:248–254 (1976)

[48] Seyfried, T.N.: Cancer as a mitochondrial metabolic disease. Frontiers in cell and developmental biology. 3:43 (2015)

[49] Seyfried, T.N.; Flores, R.E.; Poff, A.M.; D'Agostino, D.P.: Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. Carcinogenesis. 35(3):515–527 (2014)

[50] Fajardo, V.A.; McMeekin, L.; Saint, C.; LeBlanc, P.J.: Cardiolipin linoleic acid content and mitochondrial cytochrome c oxidase activity are associated in rat skeletal muscle. Chemistry and Physics of Lipids. 187:50–55 (2015)

[51] Hofmanová, J.; Slavík, J.; Ovesná, P.; Tylichová, Z.; Vondráček, J.; Straková, N.; Vaculová, A.H.; Ciganek, M.; Kozubík, A.; Knopfová, L.; Šmarda, J.; Machala, M.: Dietary fatty acids specifically modulate phospholipid pattern in colon cells with distinct differentiation capacities. European journal of nutrition. 56(4):1493–1508 (2016)

[52] Liu, J.; Vanormelingen, P.; Vyverman, W.: Fatty acid profiles of four filamentous green algae under varying culture conditions. Bioresource technology. 200:1080–1084 (2016)

[53] Schug, Z.T.; Frezza, C.; Galbraith, L.C.A.; Gottlieb, E.: The music of lipids: how lipid composition orchestrates cellular behaviour. Acta oncologica (Stockholm, Sweden). 51(3):301–310 (2012)

[54] Hopperton, K.E.; Duncan, R.E.; Bazinet, R.P.; Archer, M.C.: Fatty acid synthase plays a role in cancer metabolism beyond providing fatty acids for phospholipid synthesis or sustaining elevations in glycolytic activity. Experimental Cell Research. 320(2):302–310 (2014)

[55] Hardy, S.; El-Assaad, W.; Przybytkowski, E.; Joly, E.; Prentki, M.; Langelier, Y.: Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. The Journal of biological chemistry. 278(34):31861–31870 (2003)

[56] Buratta, M.; Castigli, E.; Sciaccaluga, M.; Pellegrino, R.M.; Spinozzi, F.; Roberti, R.; Corazzi, L.: Loss of cardiolipin in palmitate-treated GL15 glioblastoma cells favors cytochrome c release from mitochondria leading to apoptosis. Journal of neurochemistry. 105(3):1019–1031 (2008)

[57] Saric, A.; Andreau, K.; Armand, A.-S.; Møller, I.M.; Petit, P.X.: Barth Syndrome. Frontiers in Genetics. 6(1263):86 (2016)

[58] Schlame, M.: Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 1831(3):582–588 (2013)

[59] Acehan, D.; Vaz, F.; Houtkooper, R.H.; James, J.; Moore, V.; Tokunaga, C.; Kulik, W.; Wansapura, J.; Toth, M.J.; Strauss, A.; Khuchua, Z.: Cardiac and skeletal muscle defects in a mouse model of human Barth syndrome. The Journal of biological chemistry. 286(2):899–908 (2011)

[60] He, Q.; Han, X.: Cardiolipin remodeling in diabetic heart. Chemistry and Physics of Lipids. 179:75–81 (2014)

[61] Sandlers, Y.; Mercier, K.; Pathmasiri, W.; Carlson, J.; McRitchie, S.; Sumner, S.; Vernon, H.J.; Motta, A.: Metabolomics Reveals New Mechanisms for Pathogenesis in Barth Syndrome and Introduces Novel Roles for Cardiolipin in Cellular Function. PLOS ONE. 11(3):e0151802 (2016)

[62] Mejia, E.M.; Cole, L.K.; Hatch, G.M.: Cardiolipin metabolism and the role it plays in heart failure and mitochondrial supercomplex formation. Cardiovascular & hematological disorders drug targets. 14(2):98–106 (2014)

[63] Malhotra, A.; Kahlon, P.; Donoho, T.; Doyle, I.C.: Pharmacogenomic considerations in the treatment of the pediatric cardiomyopathy called Barth syndrome. Recent patents on biotechnology. 8(2):136–143 (2014)

[64] Yin, H.; Zhu, M.: Free radical oxidation of cardiolipin: chemical mechanisms, detection and implication in apoptosis, mitochondrial dysfunction and human diseases. Free radical research. 46(8):959–974 (2012)

[65] Xu, Y.; Schlame, M.: The turnover of glycerol and acyl moieties of cardiolipin. Chemistry and Physics of Lipids. 179:17–24 (2014)

[66] Baile, M.G.; Lu, Y.-W.; Claypool, S.M.: The topology and regulation of cardiolipin biosynthesis and remodeling in yeast. Chemistry and Physics of Lipids. 179:25–31 (2014)

[67] Custer, J.E.; Goddard, B.D.; Matter, S.F.; Kaneshiro, E.S.: The relative proportions of different lipid classes and their fatty acid compositions change with culture age in the cariogenic dental pathogen Streptococcus mutans UA159. Lipids. 49(6):543–554 (2014)

[68] Schlame, M.; Greenberg, M.L.: Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin. Biochimica et biophysica acta. 1862(1):3–7 (2017)

[69] Vergeade, A.; Bertram, C.C.; Bikineyeva, A.T.; Zackert, W.E.; Zinkel, S.S.; May, J.M.; Dikalov, S.I.; Roberts, L.J.; Boutaud, O.: Cardiolipin fatty acid remodeling regulates mitochondrial function by modifying the electron entry point in the respiratory chain. Mitochondrion. 28:88–95 (2016)

[70] Baile, M.G.; Sathappa, M.; Lu, Y.-W.; Pryce, E.; Whited, K.; McCaffery, J.M.; Han, X.; Alder, N.N.; Claypool, S.M.: Unremodeled and remodeled cardiolipin are functionally indistinguishable in yeast. Journal of Biological Chemistry. 289(3):1768–1778 (2014)

[71] Ikon, N.; Su, B.; Hsu, F.-F.; Forte, T.M.; Ryan, R.O.: Exogenous cardiolipin localizes to mitochondria and prevents TAZ knockdown-induced apoptosis in myeloid progenitor cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 464(2):580–585 (2015)

[72] Pathak, S.; Meng, W.-J.; Zhang, H.; Gnosa, S.; Nandy, S.K.; Adell, G.; Holmlund, B.; Sun, X.-F.; Lo, A.W.I.: Tafazzin Protein Expression Is Associated with Tumorigenesis and Radiation Response in Rectal Cancer. PloS one. 9(5):e98317 (2014)

[73] He, Q.; Wang, M.; Harris, N.; Han, X.: Tafazzin knockdown interrupts cell cycle progression in cultured neonatal ventricular fibroblasts. AJP: Heart and Circulatory Physiology. 305(9):H1332-H1343 (2013)

[74] He, Q.: Tafazzin knockdown causes hypertrophy of neonatal ventricular myocytes. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 299(1):H210-6 (2010)

[75] Ferri, L.; Dionisi-Vici, C.; Taurisano, R.; Vaz, F.M.; Guerrini, R.; Morrone, A.: When silence is noise: infantile-onset Barth syndrome caused by a synonymous substitution affecting TAZ gene transcription. Clinical genetics. 90(5):461–465 (2016)

[76] Gonzalvez, F.; D'Aurelio, M.; Boutant, M.; Moustapha, A.; Puech, J.-P.; Landes, T.; Arnauné-Pelloquin, L.; Vial, G.; Taleux, N.; Slomianny, C.; Wanders, R.J.; Houtkooper, R.H.; Bellenguer, P.; Møller, I.M.; Gottlieb, E.; Vaz, F.M.; Manfredi, G.; Petit, P.X.: Barth syndrome: cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. Biochimica et biophysica acta. 1832(8):1194–1206 (2013)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. L. Schild bedanken, der mich an dieses äußerst spannende Thema heranführte und mich auf meinem Weg zur Dissertation von Anfang an begleitete.
Sie haben mich als Ansprechpartner sowohl bei der experimentellen Durchführung als auch bei der Ausarbeitung allgegenwärtig unterstützt, dies ist keine Selbstverständigkeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Gardemann für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses Themas bedanken. Vielen Dank für die Überlassung der Laborräume und Materialien des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Uwe Lendeckel des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, der die PCR-Messungen ermöglichte.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Niemann, Frau Wölfel und Frau Peter bedanken, welche mich in die experimentellen Arbeiten einwiesen und mir unterstützend zur Seite standen.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium der Humanmedizin ermöglichten, sondern mir auch unendlich viel Stärkung und Motivation zur Anfertigung und Vollendung dieser herausfordernden Arbeit gaben. Weiterhin möchte ich meiner Schwester für die umfassende Unterstützung danken. Mein besonderer Dank gilt meinem Freund, der mich in dieser Phase fortwährend begleitete und stets ein offenes Ohr für meine Gedanken hatte.

Ehrenerklärung

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

„Untersuchungen zum Einfluss von Tafazzin und des Fettsäuremilieus auf die Cardiolipinzusammensetzung und das Wachstum von Tumorzellen am Beispiel der C6-Glioma-Zelllinie “

an dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg,
mit Unterstützung durch Herrn Professor Dr. rer. nat. Lorenz Schild und Herrn Prof. Dr. Uwe Lendeckel
ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

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

Magdeburg, den 26.05.2018

Theresa Ohlig

Darstellung des Bildungsweges

Name: Ohlig

Vorname: Theresa Mirjam

Geburtsdatum: 15. April 1991

Geburtsort: Offenbach am Main

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

01.2018-heute

Assistenzärztin

in der Klinik für Gastroenterologie, Pneumologie, Hämatologie und Onkologie,

Sana Klinikum Offenbach

09.2011–11.2017

Studium der Humanmedizin

11.2016-10.2017: Praktisches Jahr**,** Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

3. Staatsexamen**:** November 2017

10/2013-10/2016: Klinik, Otto-von-Guericke-Universität,

Magdeburg

2. Staatsexamen: Oktober 2016

09/2011 – 06/2013: Vorklinik, Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn

1. Staatsexamen: Juni 2013

10.2010–07.2011

Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin,

Asklepios Klinik Langen, Langen/Dreieich

08.2001–05.2010

Abitur-Abschluss

Marienschule der Ursulinen, Offenbach, staatlich anerkannte Privatschule

Publikation

Ohlig, T., Le, D. V., Gardemann, A., Wolke, C., Gürtler, S., Peter, D., Schild, L., and Lendeckel, U. 2018. Effects of siRNA-dependent knock-down of cardiolipin synthase and tafazzin on mitochondria and proliferation of glioma cells. Biochimica et biophysica acta.

Magdeburg, den 26.05.2018

Theresa Ohlig

Anlage: Materialien

1.Chemikalien

Chemikalien	**Hersteller**
Acetyl-CoA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
ADP	Sigma-Aldrich, St. Luise, USA und Steinheim, Deutschland
Ammoniak (NH_3)	Sigma, München, Deutschland
Argon	Sigma, München, Deutschland
BioRad	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
BioRad Assay Kit 2	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Butylhydroxytoluol (BHT)	Sigma, München, Deutschland
Chloroform	Sigma, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylthiazol-diphenyltetrazolium-bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Luise, USA und Steinheim, Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
EGTA	Sigma, St. Louis, USA
Ellmans-Reagenz (DTNB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich, St. Luise, USA und Steinheim, Deutschland
Glutamat	Sigma-Aldrich, St. Luise, USA und Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma–Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roanal, Budapest, Ungarn
Kupfersulfat ($CuSO_4$) × 5 H_2O	VEB Laborchemie, Apolda, DDR
Linolsäure (LS)	Sigma-Aldrich, St. Luise, USA und Steinheim, Deutschland
Lipofectamin RNAiMAX Reagenz	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Magnesium (Mg^{2+})	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2$ ($6H_2O$))	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Malat	Sigma-Aldrich, St. Luise, USA und Steinheim, Deutschland
Mannitol	Sigma-Aldrich, St. Luise, USA und Steinheim, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma–Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich, St. Luise, USA und Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Nirogen	Sigma, München, Deutschland
Opti-MEM	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
Oxaloacetic acid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Poly-D-Lysine hydrobromide	Sigma-Aldrich, St. Luise, USA
Primer	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SensiMix TM SYBR Hi-ROX Mastermix	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Taz siRNA	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Tetra-Myristoyl-CL ($(C14:0)_4$)	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
Tris-HCL-Puffer (pH8)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05 %/0,02 % in D-PBS)	PAA, Pasching, Österreich

2.Instrumente

Instrumente	**Hersteller**
Auswertungssoftware CFX96TM/C1000 RT-qPCR-Nachweissyste	Bio-Rad, München, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Cary 100 UV-Vis-Spektrometer	Varian, Darmstadt, Deutschland
CFX96-Thermocycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Clark-type electrode (Oxygraph)	Paar Physica, Vienna, Austria
Computerprogramm Cary Win „Kinetics“	Varian Inc., USA
CP-WAX 58 (FFAP) Säule (25 m x 0,32 mm Innendurchmesser)	Agilent, Middelburg, Niederlande
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Flammenionisationsdetektor GC 3800	Varian, USA
innuPrep-RNA-Mini-Kits	Analytik Jena, Jena, Deutschland
LiChrospher Si60	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Polytetrafluorethylene (PTFE)-Membran	Merck, Darmstadt, Deutschland
Potter-Elvehjem Homogenizer	VWR International GmbH, Deutschland
Revert AidTM Erststrang-cDNA-Synthesekit	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Sterilbank Lamini HB2448	Heraeus, Hanau, Deutschland
TSQ Quantum Discovery Max	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Vortexer	Heraeus, Hanau, Deutschland
Wasserbad	Loktotherm, Dinkelberg, Deutschland
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	**Hersteller**
Eppendorf Multipipette plus (500-5000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette (0,5 µl-10l; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl; 2500 µl; 500-5000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorfgefäße (1,5 ml; 2 ml, mit Schraubdeckel)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Küvetten, Polysterol	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen (35x10 mm)	Greiner, Frinkenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. Standard	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflasche ($25cm^2$/50ml)	Greiner, Frinkenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland

Anlage: Darstellungsverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Gliome, nach [55] 1
Tabelle 2: prozentuale Verteilung der 19 analysierten CL-Spezies 31

Abbildung 1: Cardiolipinstruktur, [34] 3
Abbildung 2: Cardiolipinsynthese, [32] 3
Abbildung 3: Cardiolipin-Remodeling mittels Tafazzin, [64] 4
Abbildung 4: Zeitstrahl zum Ablauf der Untersuchungen 12
Abbildung 5: Übersicht der Organisation der Messungen 13
Abbildung 6: Beispiel einer Protein-Standardkurve nach Lowry 18
Abbildung 7: Relative TAZ-mRNA-Menge in % (normiert durch RPLP13a, Kontrolle (co) = 100 %), Prof. Dr. Uwe Lendeckel, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 27
Abbildung 8: Messung der CL-Gesamtmenge 28
Abbildung 9: prozentualer Gehalt an oxidiertem Cardiolipin 29
Abbildung 10: prozentuale Verteilung der CL-Spezies welche sich in ihrer Menge signifikant voneinander unterscheiden 32
Abbildung 11: Anteil aller im CL gebundenen FS in Prozent 35
Abbildung 12: FS-Anteil der FS einer Kettenlänge in nmol/µg CL 38
Abbildung 13: Anzahl der Doppelbindungen des Gesamt-CL (nmol/ug CL) in Abhängigkeit zum Versuchsansatz 39
Abbildung 14: Menge der freien FS (% der Gesamtmenge) in Abhängigkeit des Versuchsansatzes 41
Abbildung 15: Citratsynthaseaktivität (µmol/min)/(mg/ml) 43
Abbildung 16: absolute Maximalwerte der Zellatmung in ng Atom O/min/mg 45
Abbildung 17: Proteingehalt in % zum Kontrollwert Opti-MEM + Meth. 46
Abbildung 18: MTT-Reduktion 48