

*Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) und  
die Kontrolle der Produktion von reaktiven  
Sauerstoffspezies in Astrozyten und  
Hirnmitochondrien*

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

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

von Dipl.-Ing. (FH) Biotechnologin Caroline Nordmann  
geb. am 12.09.1983 in Bernburg

Gutachter:

Prof. Dr. Georg Reiser  
Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

eingereicht am: 12.12.2014

verteidigt am: 28.10.2015

*„Was wir wissen, ist ein Tropfen, was wir nicht wissen, ist ein Ozean“  
(Sir Isaac Newton)*

*Gewidmet Annette Nordmann,  
sowie in ewiger Erinnerung an meine Großeltern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>i</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>v</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>viii</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Phospholipide und Phospholipasen .....	1
1.2 Phospholipasen A <sub>2</sub> – Enzyme (PLA <sub>2</sub> ) .....	2
1.2.1 Ca <sup>2+</sup> -unabhängige PLA <sub>2</sub> – Enzyme (iPLA <sub>2</sub> ) .....	4
1.2.1.1 Struktur der Gruppe VI iPLA <sub>2</sub> -Enzyme .....	4
1.2.1.2 Hemmung der Gruppe VI iPLA <sub>2</sub> durch ein Halogen-substituiertes Enollacton ..	6
1.2.1.3 Allgemeine biochemische Funktionen der Gruppe VI iPLA <sub>2</sub> .....	7
1.2.1.4 Funktionen der Gruppe VI iPLA <sub>2</sub> in Astrozyten.....	8
1.2.1.5 Wirkung der Gruppe VI iPLA <sub>2</sub> in Mitochondrien.....	9
1.3 Mitochondrien .....	10
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und ihre zelluläre Bildung .....	12
1.5 Antioxidative Schutzmechanismen .....	13
1.5.1 Milde Entkopplung als antioxidativer Schutzmechanismus .....	13
1.5.2 Milde Entkopplung durch Fettsäuren .....	14
1.6 Neurodegenerative Erkrankungen als Folge von oxidativem Stress .....	15
1.7 Ziele der Arbeit.....	16
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Versuchstiere .....	19
2.1.2 Geräte und Versuchsmaterialien .....	19
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.3.1 Chemikalien .....	20
2.1.3.2 Kits .....	22
2.1.3.3 Antikörper .....	22
2.1.4 Medien und Lösungen .....	22
2.1.4.1 Zellkultur.....	22
2.1.4.2 Proteinbiochemie.....	22

2.1.4.3	Puffer für Mitochondrienanalysen.....	24
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	24
2.2.1.1	Astrozyten Präparation.....	24
2.2.1.2	Extraktion des Cytosols aus Astrozyten.....	25
2.2.1.3	Präparation der Membranfraktion aus Astrozyten.....	25
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	26
2.2.2.1	Herstellung von Zelllysaten.....	26
2.2.2.2	Proteinfällung.....	26
2.2.2.2.1	Methanol/Aceton Fällung.....	26
2.2.2.2.2	TCA-Fällung.....	26
2.2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	26
2.2.2.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.2.2.5	Western-Blot.....	27
2.2.2.6	Elution gebundener Proteine von der Nitrocellulosemembran (Strippen).....	28
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.3.1	Genotypisierung der <i>Pla2g6</i> inaktiven Mäuse.....	28
2.2.3.1.1	Gewinnung genomischer DNA.....	28
2.2.3.1.2	Analyse der Mutation mittels RT-PCR.....	29
2.2.3.1.3	Agarosegelelektrophorese.....	29
2.2.4	iPLA <sub>2</sub> -Aktivitätsbestimmung mittels <sup>14</sup> C-Radionuklid.....	29
2.2.5	Bestimmung der LDH-Freisetzung.....	30
2.2.6	Bestimmung von Lipidperoxidationsprodukten (TBARS).....	31
2.2.7	Bestimmung der ROS-Produktion mit der DCF-DA Methode.....	31
2.2.8	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) in Astrozyten.....	32
2.2.9	Isolation von Mitochondrien.....	32
2.2.9.1	Isolation von Mitochondrien aus Lebergewebe.....	32
2.2.9.2	Isolation von Mitochondrien aus Hirngewebe.....	33
2.2.9.3	Isolation von Mitochondrien aus Hirngewebe mit Percoll-Gradient.....	33
2.2.10	Messung des mitochondrialen Membranpotentials in Rattenhirnmitochondrien.....	34
2.2.11	Messung der mitochondrialen Ca <sup>2+</sup> -Retentionskapazität.....	34
2.2.12	Photometrische Bestimmung der Mitochondrienschwellung.....	35
2.2.13	Polarographische Respirationsmessung.....	35

2.2.14	Beurteilung der reduktiven Atmungskettenkapazität mittels des MTT-Assays.	36
2.2.15	Messung der NADH-Cytochrom c-Reduktase Aktivität (Komplex I/III).....	36
2.2.16	Messung der Cytochrom c-Oxidase (COX) .....	37
2.2.17	Bestimmung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Freisetzung durch isolierte Hirnmitochondrien .....	37
2.2.18	Bestimmung von Glutathion .....	37
2.2.19	Statistische Auswertung der Daten.....	38
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
3.1	iPLA <sub>2</sub> in Astrozyten und deren physiologische Bedeutung bei ROS-Bildung und Zelltod.....	39
3.1.1	Aktivität von iPLA <sub>2</sub> in Astrozyten .....	39
3.1.2	Einfluss der iPLA <sub>2</sub> auf die zelluläre ROS-Produktion .....	41
3.1.3	Wirkung der iPLA <sub>2</sub> auf die Lipidperoxidation.....	42
3.1.4	Wirkung der iPLA <sub>2</sub> auf das mitochondriale Membranpotential in Astrozyten..	45
3.1.5	Zelltod .....	46
3.1.5.1	Laktatdehydrogenase – Freisetzung .....	46
3.1.5.2	Cytochrom c-Freisetzung .....	47
3.2	Einfluss der iPLA <sub>2</sub> auf die mitochondrialen Funktionen in isolierten Hirnmitochondrien.....	49
3.2.1	iPLA <sub>2</sub> -Aktivität in isolierten Hirnmitochondrien.....	49
3.2.2	Untersuchungen zum Einfluss der iPLA <sub>2</sub> -induzierten Fettsäure-Freisetzung auf die ROS-Bildung durch isolierte Hirnmitochondrien .....	51
3.2.2.1	Charakterisierung der Entkopplerwirkung von DHA auf isolierte Hirnmitochondrien .....	52
3.2.2.2	Einfluss von DHA auf die RET-assozierte ROS-Produktion.....	55
3.2.2.3	Einfluss von DHA auf die FET-abhängige ROS-Produktion .....	56
3.2.2.4	Wirkung des iPLA <sub>2</sub> -Inhibitors BEL auf die mitochondriale ROS-Bildung.....	58
3.2.2.5	Einfluss von BEL auf den Elektronentransport in der Atmungskette .....	59
3.2.3	BEL reduziert die antioxidative Wirkung des Glutathion/Glutathionperoxidase-Systems.....	61
3.2.4	Depolarisation der RBM durch BEL.....	62
3.2.5	BEL erniedrigt die Ca <sup>2+</sup> -Retentionskapazität (CRC) der RBM .....	64
3.2.6	Die Wirkung von BEL auf die Atmung von RBM .....	66
3.2.7	Das mitochondriale Schwellverhalten nach der BEL-Behandlung.....	68
3.2.8	Einfluss von BEL auf die Aktivitäten der Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette .....	70

3.2.8.1	NADH-Cytochrom c-Reduktase Aktivität .....	70
3.2.8.2	Cytochrom c-Oxidase (COX) Aktivität .....	71
3.3	Mausmodell – <i>Pla2g6</i> inaktive Maus .....	72
3.3.1	Genotypisierung.....	72
3.3.2	PLA <sub>2</sub> -Aktivität in energetisierten Hirnmitochondrien der Maus .....	74
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>76</b>
4.1	Physiologische Bedeutung der iPLA <sub>2</sub> in Astrozyten bei ROS-Bildung und Zelltod	76
4.1.1	iPLA <sub>2</sub> -Aktivität in Astrozytenkulturen .....	77
4.1.2	Einfluss der iPLA <sub>2</sub> -Aktivität auf die ROS-Produktion der Astrozyten.....	77
4.1.3	Depolarisation und Freisetzung von Cytochrom c .....	78
4.2	Mögliche physiologische Funktionen der iPLA <sub>2</sub> -Aktivität in energetisierten Rattenhirnmitochondrien .....	80
4.2.1	iPLA <sub>2</sub> -Aktivität in nativen, gekoppelten Hirnmitochondrien .....	80
4.2.2	Physiologische Untersuchungen der iPLA <sub>2</sub> auf die mitochondriale ROS-Bildung .....	80
4.2.2.1	Adeninnucleotid-Translocator (ANT), DHA-Entkopplung, ROS-Bildung .....	81
4.2.2.2	Wirkung von DHA auf die ROS-Bildung beim Vorwärtselektronentransport (FET) .....	82
4.2.3	Einfluss der iPLA <sub>2</sub> auf die mitochondriale Permeabilitätspore (mPTP).....	83
4.2.4	Einfluss der iPLA <sub>2</sub> auf die Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette . .....	83
4.2.5	Wirkung der BEL-Behandlung isolierter Rattenhirnmitochondrien auf den Glutathiongehalt .....	84
4.3	Das <i>Pla2g6</i> inaktive Mausmodell.....	86
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	87
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>91</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>102</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>103</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>104</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur von Phospholipiden und hydrolytische Spaltstellen der verschiedenen Phospholipasen.....	1
Abbildung 2: Enzymatische Spaltung von Glycerophospholipiden durch Phospholipase A <sub>2</sub> ...	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung der iPLA <sub>2</sub> Isoformen nach Dennis et al., 2011 .....	5
Abbildung 4: Struktur von Bromoenollacton (BEL).....	6
Abbildung 5: Reacylierung-Deacylierungs-Zyklus nach Lands, 1965 .....	7
Abbildung 6: ROS-Produktion in der mitochondrialen Atmungskette .....	12
Abbildung 7: Darstellung des rückwärtsgerichteten bzw. vorwärtsgerichteten Elektronentransports innerhalb der Atmungskette.....	14
Abbildung 8: Möglicher Einfluss der freien Fettsäuren auf die mitochondriale Atmungskette. ....	15
Abbildung 9: Standardprotokoll für die Behandlung der Astrozyten .....	39
Abbildung 10: PLA <sub>2</sub> -Aktivität in der Membranfraktion von Astrozyten .....	40
Abbildung 11: ROS-Bildung nach der Behandlung mit R- und S-BEL .....	41
Abbildung 12: Einfluss von R-BEL und S-BEL auf die Lipidperoxidation .....	43
Abbildung 13: Auswirkung der R-/S-BEL-Behandlung auf die Bildung von 4-HNE.....	44
Abbildung 14: Einfluss von R-/S-BEL auf das mitochondriale Membranpotential in Astrozyten .....	46
Abbildung 15: Zelltod nach Inkubation mit BEL und Rotenon in Astrozyten .....	47
Abbildung 16: Cytochrom c-Freisetzung aus Astrozyten .....	48
Abbildung 17: Beeinflussung der totalen PLA <sub>2</sub> -Aktivität und der BEL-sensitiven iPLA <sub>2</sub> -Aktivität in isolierten RBM unter verschiedenen Bedingungen .....	50
Abbildung 18: DHA-induzierte Atmungsstimulation von Hirn- und Lebermitochondrien in Abwesenheit und Anwesenheit des ANT-Hemmstoffes Carboxyatractylosid (CAT). ....	52
Abbildung 19: Vergleich ANT-Gehalt in Hirn- und Lebermitochondrien .....	54
Abbildung 20: RET-assoziierte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Freisetzung in isolierten Hirnmitochondrien.....	55
Abbildung 21: DHA-abhängige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Freisetzung induziert durch Komplex I-Substrate (FET) .....	56
Abbildung 22 Die RET-assoziierte H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Abgabe durch BEL-behandelte RBM.....	58
Abbildung 23: CAT-Einfluss auf die FET-assoziierte ROS-Produktion in BEL-behandelten RBM.....	59
Abbildung 24: Einfluss von BEL bzw. DHA auf die MTT-Reduktion durch RBM. ....	60

Abbildung 25: Wirkung von CDNB und BEL auf den GSH-Gehalt der RBM.....	62
Abbildung 26: Schrittweise Erniedrigung des Polarisationszustandes isolierter RBM mit FCCP .....	63
Abbildung 27: Einfluss von BEL auf die Ca <sup>2+</sup> -Retentionskapazität (CRC) von RBM.....	65
Abbildung 28: Wirkung von R-/S-BEL auf die State 4- und State 3-Atmung der RBM .....	67
Abbildung 29: Schwellverhalten der BEL-behandelten RBM im Vergleich der synaptischen vs. nicht synaptischen RBM .....	69
Abbildung 30: Enzymaktivität von Komplex I/III in BEL-behandelten RBM.....	70
Abbildung 31: Einfluss von BEL auf die Enzymaktivität von Komplex IV.....	71
Abbildung 32: Klassische Regeln der Mendel'schen Gesetze .....	73
Abbildung 33: RT-PCR-Produkte der <i>Pla2g6</i> inaktiven Maus .....	74
Abbildung 34: Vergleich der PLA <sub>2</sub> -Aktivität in Hirnmitochondrien von 1,5 Monate und 3,5 Monate alten Wildtyp- und <i>Pla2g6</i> inaktiven Mäusen .....	75
Abbildung 35: Möglicher Mechanismus der iPLA <sub>2</sub> -Inaktivierung durch BEL modifiziert nach Jenkins et al., 2013.....	85
Abbildung 36: Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse in Hirnmitochondrien .....	88



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der verschiedenen Funktionszustände in isolierten Mitochondrien nach Chance and Williams, 1956 .....	11
Tabelle 2: Rezeptur zur Herstellung der Polyacrylamidgele .....	27
Tabelle 3: Primer für Genotypisierung .....	29
Tabelle 4: Ansatz der Verdünnungen der Percoll-Gradienten .....	34

## Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>arachidonic acid</i> , Arachidonsäure
AdPLA <sub>2</sub>	<i>adipose-specific phospholipase A<sub>2</sub></i> , fettgewebsspezifische Phospholipase A <sub>2</sub>
ANT	Adenin Nukleotid Translokator
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i> , Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
Bax	Bcl-2 assoziiertes X-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BEL	Bromoenollacton (Racemat)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CDNB	Chloro-2,4-dinitrobenzen
CsA	Cyclosporin A
COX	Cytochrom c-Oxidase
cPLA <sub>2</sub>	<i>cytosolic PLA<sub>2</sub></i> , cytosolische PLA <sub>2</sub>
DCF	2,7-Dichlorfluorescein
DCF-DA	2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat
DHA	<i>docosahexaenoic acid</i> , Docohexaensäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTNB	2,2'-dinitro-5,5' dithiobenzoessäure
ETK	Elektronentransportkette
EtOH	Ethanol
FFA	<i>free fatty acids</i> , freie Fettsäuren
FCCP	Carbonyl-Cyanid-4-trifluoromethylphenylhydrazon
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FET	<i>forward electron transport</i> , vorwärtsgerichteter Elektronentransport
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
HNE	4-Hydroxy-2-Nonenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IAP	<i>Intracisternal A Particle</i> , intrazisternaler A Partikel
INAD	Infantile neuroaxonale Dystrophie
iPLA <sub>2</sub>	<i>calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub></i> , Ca <sup>2+</sup> -unabhängige Phospholipase A <sub>2</sub>
IMM	innere Mitochondrienmembran
IMS	<i>intermembrane space</i> , Intermembranraum
INS-1	Insulinomazellen
LDH	Laktatdehydrogenase
LPLA <sub>2</sub>	<i>lysosomal phospholipase A<sub>2</sub></i> , lysosomale Phospholipase A <sub>2</sub>
LysoPC	Lysophosphatidylcholin

MAPF	Methylarachidonylfluorophosphonat
MDA	Malondialdehyd
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i> , mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore
MTT	3-(4,5 -Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid
$O_2^{\cdot -}$	Superoxidanion
$\cdot OH$	Hydroxyradikal
RET	<i>reverse electron transport</i> , rückwärtsgerichteter Elektronentransport
PAF	<i>platelet-activating factor</i> , Plättchen-aktivierender Faktor
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RBM	<i>rat brain mitochondria</i> , Rattenhirnmitochondrien
RCI	<i>respiratory control index</i> , Atmungskontrollindex
RLM	<i>rat liver mitochondria</i> , Rattenlebermitochondrien
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> , reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TNB	Thionitrobenzoatanion
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
sPLA <sub>2</sub>	<i>secreted PLA<sub>2</sub></i> , sekretorische PLA <sub>2</sub>
UCP	<i>uncoupling protein</i> , Entkopplungsprotein
ZNS	zentrales Nervensystem
$\Delta p$	elektrischer Protonengradient
$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotential

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Phospholipide und Phospholipasen

Phospholipide sind nicht nur wichtige strukturelle Bestandteile von zellulären Membranen, sondern spielen funktionell bei vielen zellulären Prozessen, wie z.B. beim Membrantransport, der Signaltransduktion, der Zellproliferation und der Apoptose eine Schlüsselrolle.

Strukturell bestehen Phospholipide (oder auch Glycerophospholipide) aus einem Glycerin-3-Phosphat Molekül, welches jeweils am C1-Atom (*sn*-1) und C2-Atom (*sn*-2) mit einer Fettsäure verestert ist. Am C3-Atom ist eine Phosphatgruppe gebunden, die wiederum mit unterschiedlichen Alkoholen (X) wie z.B. Cholin, Serin oder Ethanolamin verestert sind (Abb. 1). Typischerweise befinden sich an der *sn*-1 Position gesättigte Fettsäuren und an der *sn*-2 Position ungesättigte Fettsäuren. Phospholipide werden enzymatisch durch Phospholipasen in Fettsäuren und Lysophospholipide gespalten. Je nach Angriffsort der Phospholipasen unterscheidet man vier Hauptgruppen, die mit A, B, C und D klassifiziert werden. Die Phospholipase A (PLA) spaltet die Acylesterbindung an der *sn*-1 (PLA<sub>1</sub>) oder *sn*-2 (PLA<sub>2</sub>) Position (Abb. 1) und wird deshalb zur Gruppe der Acylhydrolasen zugeordnet. Die Phospholipase B (PLB) hydrolysiert die Acylesterbindungen sowohl an der *sn*-1 als auch an der *sn*-2 Position. Dagegen spaltet die Phospholipase C (PLC) die Glycerophosphatbindung, während die Phospholipase D (PLD) die polare Kopfgruppe (X) entfernt (Abb. 1). Somit gehören die PLC und PLD zur Gruppe der Phosphodiesterasen.

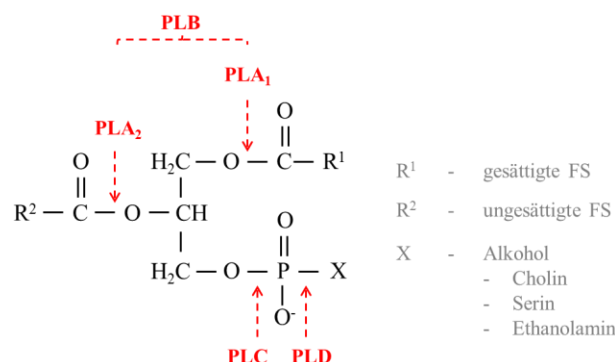


Abbildung 1: Grundstruktur von Phospholipiden und hydrolytische Spaltstellen der verschiedenen Phospholipasen

Glycerin-3-Phosphat ist jeweils an der *sn*-1 und *sn*-2 Position mit einer Fettsäure verestert. Die Phosphatgruppe am C3-Atom des Glycerin-3-Phosphates ist mit einer polaren Kopfgruppe (X) verestert. Die Phospholipasen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> (PLA<sub>1/2</sub>) spalten die Acylesterbindungen an der *sn*-1 Position (PLA<sub>1</sub>) bzw. an der *sn*-2 Position (PLA<sub>2</sub>). Die Phospholipase B (PLB) ist in der Lage, an beiden Positionen die Acylesterbindung zu spalten. Phospholipase C (PLC) katalysieren die hydrolytische Spaltung der Glycerophosphatbindung, während die Phospholipase D (PLD) die polare Kopfgruppe (X) hydrolytisch entfernt.

## 1.2 Phospholipasen A<sub>2</sub> – Enzyme (PLA<sub>2</sub>)

Die Enzymfamilie der PLA<sub>2</sub> umfasst eine Vielzahl von Enzymen, die spezifisch die Acylesterbindung an der Position *sn*-2 von Glycerophospholipiden hydrolysieren (Burke and Dennis, 2009), wodurch freie Fettsäuren (FFA – *free fatty acid*) und Lysophospholipide gebildet werden (Abb. 2). Im Hirngewebe werden vor allem die Fettsäuren Arachidonsäure (AA – *arachidonic acid*, 20:4n-6), Docosahexaensäure (DHA - *docosahexaenoic acid*, 22:6n-3) und Ölsäure (18:1) freigesetzt (Farooqui and Horrocks, 2006 und Strokin et al., 2003, 2007).

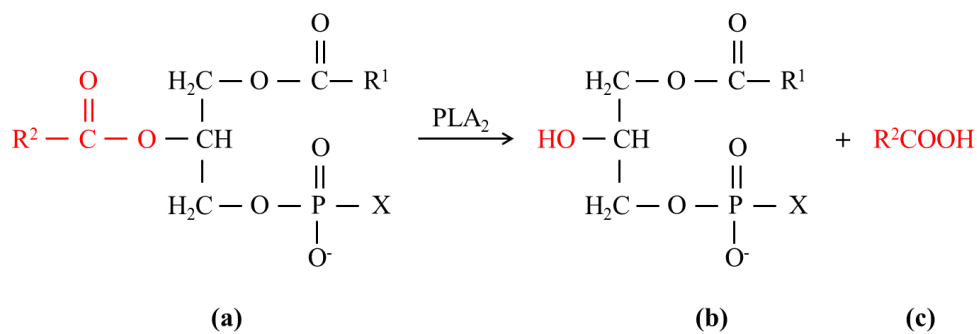


Abbildung 2: Enzymatische Spaltung von Glycerophospholipiden (a) durch Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) an Position *sn*-2. Die Hydrolyseprodukte sind Lysophospholipide (b) und freie Fettsäuren (c)

Bis heute konnten, basierend auf ihrer Struktur, ihrem katalytischen Mechanismus, ihrer Lokalisation und evolutionären Herkunft, sechs verschiedene PLA<sub>2</sub>-Enzymfamilien klar identifiziert werden. Dazu gehören die sekretorische (sPLA<sub>2</sub>), die cytosolische Ca<sup>2+</sup>-abhängige (cPLA<sub>2</sub>), die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige (iPLA<sub>2</sub>), die Plättchen-aktivierende Faktor Acylhydrolase (PAF-AH - *platelet-activating factor*), die lysosomale PLA<sub>2</sub> sowie die fettgewebsspezifische Phospholipase A<sub>2</sub> (AdPLA<sub>2</sub> – *adipose-specific*) (Dennis et al., 2011, Murakami et al., 2011). Insgesamt wurden bisher 25 verschiedene PLA<sub>2</sub>-Enzyme in humanen Geweben identifiziert.

Sekretorische PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>): Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde erstmals eine lytische Wirkung des Schlangengiftes beschrieben, die auf eine mögliche Aktivität der PLA<sub>2</sub> zurückzuführen ist (Stephens et al., 1898 und Six and Dennis, 2000). Die sPLA<sub>2</sub> sind kleine sezernierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 14 – 18 kDa, die gewöhnlich 5 – 8 konservierte Disulfidbindungen enthalten (Schaloske and Dennis, 2006 und Dennis et al., 2011). Bisher konnten in Säugern 11 Untergruppen (B, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA und XIIB) gefunden werden, wovon in Menschen 9 vorkommen (Murakami et al., 2011). Für diese Gruppe von Enzymen ist ein aktives Zentrum mit den Aminosäuren Histidin und Aspartat charakteristisch (die sogenannte „katalytische Diade“). Außerdem sind für die

katalytische Aktivität millimolare  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen notwendig (Schaloske and Dennis, 2006). Die sPLA<sub>2</sub> sind an der Freisetzung von AA aus zellulären Membranen beteiligt, welche anschließend zu Eikosanoiden metabolisiert werden (Schaloske and Dennis, 2006). Eine Schlüsselrolle in der Pathobiochemie der Eikosanoide ist das Auslösen von Entzündungsprozessen im Körper. Dies erklärt die Expression der sPLA<sub>2</sub> in verschiedenen inflammatorischen Zellen, wie z.B. Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, Mastzellen und Thrombozyten (Triggiani et al., 2006).

Cytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>): Vor ungefähr 30 Jahren wurde eine weitere PLA<sub>2</sub> (GIVA PLA<sub>2</sub> oder cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ ) im Cytosol von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten entdeckt, die sich von den sPLA<sub>2</sub>s strukturell und in ihrer katalytischen Aktivität sehr unterscheidet (Alonso et al., 1986 und Kramer et al., 1986, Dennis et al., 2011). Später wurden weitere Vertreter der cytosolischen PLA<sub>2</sub> gefunden, so dass die cPLA<sub>2</sub>-Enzyme heute in 6 Gruppen (IVA, IVB, IVC, IVD, IVE und IVF) eingeteilt werden können (Schaloske and Dennis, 2006). Die Regulation der cPLA<sub>2</sub> erfolgt ebenfalls durch  $\text{Ca}^{2+}$  und die Translokation des Enzyms an intrazellulären Membranen (Schaloske and Dennis, 2006). Die primäre Funktion von cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  ist die Freisetzung von AA und somit ist die cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  an Entzündungsprozessen beteiligt (Balsinde et al., 2002). Außerdem wird die Aktivität des Enzyms durch Phosphorylierung reguliert. Dabei werden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Serin-Seitenketten (Ser<sup>505</sup> und Ser<sup>727</sup>) durch mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) phosphoryliert (Schaloske and Dennis, 2006). Die Inaktivierung der cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  erfolgt durch Caspase 3 im Verlauf der Apoptose (Taketo and Sonoshita, 2002).

Plättchen-aktivierende Faktor Acetylhydrolase (PAF-AH): Die PAF-AH wurde nach ihrem Substrat, dem Plättchen-aktivierenden Faktor benannt. Die Inaktivierung von PAF erfolgt durch das Enzym PAF-AH durch die Abspaltung der Acetylgruppe an der sn-2 Position des PAF, wobei Lyso-PAF und Acetat entstehen. Die PAF-AH gehören zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Enzymen und bilden die Gruppen VII und VIII der PLA<sub>2</sub>-Familie (Dennis et al., 2011). Die Gruppe VII besteht zusätzlich aus zwei Untergruppen (VIIA und VIIB). Die Untergruppe der VIIA gehört zu den sekretorischen Enzymen, während die VIIB und VIII intrazellulär vorkommen (Dennis et al., 2011, Derewenda et al., 1999 und Tjoelker et al., 1995). Die Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei diversen inflammatorischen Erkrankungen, wie Atherosklerose, Asthma und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Dennis et al., 2011, Madjid et al., 2010, Tselepis et al., 2002 und Tjoelker et al., 2002).

Lysosomale PLA<sub>2</sub> (LPLA<sub>2</sub>): Die LPLA<sub>2</sub> wurde erstmalig in der lysosomalen Fraktion von Madin-Darby-Hundenieren Zellen (MDCK) identifiziert und konnte später aus

Rinderhirn isoliert werden (Abe et al., 1996, 1998). Die LPLA<sub>2</sub> ist ein Ca<sup>2+</sup>-unabhängiges Enzym, welches vorzugsweise an der inneren Acylgruppe der beiden Phospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) spaltet (Abe et al., 2006). Die LPLA<sub>2</sub> wird vor allem in der Lunge in alveolären Makrophagen exprimiert. In LPLA<sub>2</sub>-defizienten (-/-LPLA<sub>2</sub>) Mäusen konnte eine Akkumulation der Phospholipide PC und PE in alveolären Makrophagen nachgewiesen werden, so dass die LPLA<sub>2</sub> in Zusammenhang mit inflammatorischen Atemwegserkrankungen gebracht werden kann (Hiraoka et al., 2006).

Fettgewebsspezifische PLA<sub>2</sub> (AdPLA<sub>2</sub>): Die AdPLA<sub>2</sub> wurde ursprünglich als ein Tumorsuppressor charakterisiert. Vor kurzem wurde entdeckt, dass dieses Enzym eine PLA<sub>2</sub>-Aktivität besitzt. Deshalb ordnete man es in die Gruppe XVI der PLA<sub>2</sub>-Familie ein (Dennis et al., 2011). Obwohl die humane AdPLA<sub>2</sub> in verschiedenen Geweben exprimiert wird, ist ihre Expression im Fettgewebe erhöht, worauf auch der Name „*adipose-specific*“ PLA<sub>2</sub> zurückzuführen ist.

### 1.2.1 Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub> – Enzyme (iPLA<sub>2</sub>)

#### 1.2.1.1 Struktur der Gruppe VI iPLA<sub>2</sub>-Enzyme

Im Unterschied zu den sekretorischen und cytosolischen PLA<sub>2</sub>-Enzymen sind die iPLA<sub>2</sub>-Enzyme Ca<sup>2+</sup>-unabhängig und werden in der Gruppe VI der Phospholipasen A<sub>2</sub> eingeordnet. Obwohl auch die Enzyme der Gruppen IVC, VII, VIII und lysosomalen PLA<sub>2</sub>-Enzyme kein Ca<sup>2+</sup> für ihre Aktivität benötigen, werden nur die iPLA<sub>2</sub>-Enzyme als „Ca<sup>2+</sup>-unabhängige“ PLA<sub>2</sub> bezeichnet. Bisher sind von den iPLA<sub>2</sub>-Enzymen sechs verschiedene Gruppen identifiziert wurden (Schaloske et al., 2006). Alle Enzyme besitzen innerhalb der katalytischen Domäne die Aminosäure Serin. Diese Domäne wird auch als *patatin-like* benannt, da ihre Proteinsequenz eine 40%ige Identität mit der Patatin-Hydrolase der Kartoffelknolle aufweist. Deshalb wird das Enzym zur Familie der *patatin-like* Proteine (PNPLA) zugeordnet (Kienesberger et al., 2009, Dennis et al., 2011). Die *patatin-like* Lipasedomäne verwendet eine katalytische Serin-Aspartat-Diade anstelle der sonst klassischen Serin-Histidin-Aspartat-Triade (Murakami et al., 2011, Rydel et al., 2003). Die iPLA<sub>2</sub>-Enzyme (VIA und VIB) besitzen ein Molekulargewicht von 85 – 90 kDa, werden in verschiedenen Geweben exprimiert, benötigen für die Aktivität kein Ca<sup>2+</sup> und besitzen keine Fettsäurespezifität (Ackermann et al., 1994, Tang et al., 1997, Dennis et al., 2011).

VIA iPLA<sub>2</sub>: VIA iPLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>β) wurde aus Makrophagen-ähnlichen p388D<sub>1</sub> Zellen isoliert (Ackermann et al., 1994). Das humane Enzym (806 AS, Molekulargewicht von

88 kDa) wird im Gen *Pla2g6* auf Chromosom 22q13.1 kodiert und es existieren insgesamt 5 verschiedene Spleißvarianten (VIA-1 bis VIA-5). Jedoch sind nur die Gruppen VIA-1 und VIA-2 aktiv, da sie die vollständige katalytische Domäne beinhalten. Die VIA-1 ist die kürzere Spleißvariante (85 kDa) und besteht aus den 8 Ankyrin-Wiederholungen einer Linker-Region und der katalytischen Domäne mit dem Lipasemotiv **GXS<sup>465</sup>XG**, welches das katalytische Serin<sup>465</sup> beinhaltet (Abb. 3). Die Gruppe VIA-2 iPLA<sub>2</sub> ist ein 88 kDa großes Protein mit einer hohen Homologie zur VIA-1, mit der Ausnahme, dass sie nur 7 Ankyrin-Wiederholungen besitzt, da die achte Ankyrin-Wiederholung durch eine Insertion von 54 zusätzlichen Aminosäuren unterbrochen wird (Larsson et al., 1998). Die Gruppe VIA-3 besitzt eine verkürzte katalytische Domäne, die auch das Lipasemotiv **GXS<sup>519</sup>XG** beinhaltet. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob diese Gruppe eine vollständige PLA<sub>2</sub>-Aktivität besitzt. Bei den Gruppen VIA-4 und VIA-5 fehlt die katalytische Domäne komplett und sie sind somit inaktiv (Winstead et al., 2000, Kudo und Murakami 2002, Dennis et al., 2011). Trotz allem zeigen diese Spleißvarianten sowohl Lysophospholipase-, Transacylase- als auch Acyl-CoA Transacylase-Aktivität (Winstead et al., 2000, Jenkins et al., 2006, Carper et al., 2008). Die Gruppe VIA ist die einzige PLA<sub>2</sub>, die ein ATP-Bindungsmotiv beinhaltet und durch ATP reguliert werden kann. Durch die Bindung von ATP wird das Enzym durch Änderung der Konformation stabilisiert und die Enzymaktivität wird erhöht. Jedoch agiert ATP nicht als Substrat bzw. Kofaktor (Dennis et al., 2011).

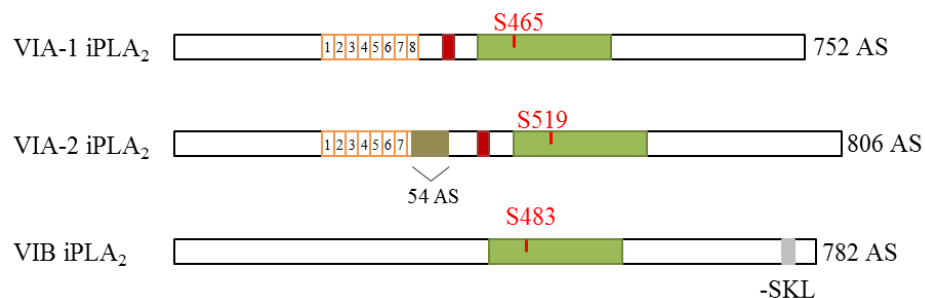


Abbildung 3: Schematische Darstellung der iPLA<sub>2</sub> Isoformen nach Dennis et al., 2011

Ankyrinwiederholungen werden orange dargestellt, das dunkelrote Kästchen zeigt das ATP-Bindungsmotiv, die *patatin-like* Domäne wird grün mit der katalytischen Aminosäure Serin (rot) abgebildet. Das Peroxisomentranslokationssignal der VIB iPLA<sub>2</sub> ist als graues Kästchen dargestellt.

**VIB iPLA<sub>2</sub>**: Das Gen der VIB iPLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>γ) auf Chromosom 7q31 wurde erstmals im Jahr 2000 aus der cDNA von Herz, Skelettmuskel und Lymphozyten kloniert und das Transkript konnte in den Geweben von Herz, Plazenta, Niere, Leber, Hirn und Skelettmuskel detektiert werden (Mancuso et al., 2000 und Tanaka et al., 2000). Die katalytische Region dieses Enzyms ist homolog zu der Gruppe VIA, wohingegen die N-terminalen Domänen der



beiden Isoformen keine Übereinstimmungen zeigen (Mancuso et al., 2000, Murakami et al., 2011 und Tanaka et al., 2000), so dass sie lediglich zu 25% identisch in der Proteinsequenz sind (Six and Dennis, 2000). Die Gruppe VIB hat insgesamt vier mögliche Translationsinitiationsstellen, welche Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten (88-, 77-, 74- und 63-kDa) produzieren (Mancuso et al., 2004). Das Gesamtprotein mit einem Molekulargewicht von 88 kDa besitzt insgesamt 782 Aminosäuren (Wilson et al., 2006, Dennis et al., 2011). Die Region der Aminosäuren 445 – 640 umfasst die *patatin-like* Domäne mit dem Lipasebindungsmotiv **GXS<sup>483</sup>XG**, welches das katalytische Serin<sup>483</sup> beinhaltet (Abb. 3). Im Unterschied zu der Gruppe der VIA enthält die VIB keine Ankyrinwiederholungen. In der Membranfraktion von Mitochondrien und Peroxisomen konnte eine Enzymaktivität der Gruppe VIB nachgewiesen werden. Die Proteinsequenz des Enzyms zeigt im N-Terminus ein mitochondriales Lokalisationssignal und im C-Terminus ein Peroxisomentranslokationssignal, wovon das Gesamtprotein (88 kDa) und das 63 kDa Translationsprodukt bevorzugt in Mitochondrien zu finden ist (Kinsey et al., 2007a, Mancuso et al., 2000, 2007 und Murakami et al., 2011). Aus diesem Grund wird vermutet, dass das Gesamtprotein (88 kDa) eine wichtige funktionelle Rolle in Mitochondrien spielt (Murakami et al., 2011).

### 1.2.1.2 Hemmung der Gruppe VI iPLA<sub>2</sub> durch ein Halogen-substituiertes Enollacton

Um die Rolle des Enzyms in zellulären Prozessen zu verstehen, wurden in einer Vielzahl von Studien (*in vitro*, *ex vivo* und *in vivo*) verschiedene Hydrolase-Hemmstoffe, wie z.B. Methylarachidonylfluorophosphonat (MAFP) oder Bromoenollacton (BEL) verwendet (Balboa et al., 1997, Dennis et al., 2011). Von besonderem Interesse war die Beobachtung, dass der Serinprotease-Inhibitor BEL (Abb. 4) die Aktivität der Enzyme der iPLA<sub>2</sub>-Familie hemmt, wogegen BEL wenig bis keine Wirkung auf die sekretorische und die cytosolische PLA<sub>2</sub> besitzt. Als ein Vertreter der Haloenollactone verestert BEL die Hydroxylgruppe eines katalytisch wirksamen Serins im aktiven Zentrum der iPLA<sub>2</sub>. Dadurch wird dieses selektiv und irreversibel durch niedrige, mikromolare BEL-Konzentrationen (2 – 5 µM) gehemmt (Balsinde et al., 2005, Dennis et al., 2011 und Hooks and Cummings, 2008; Mitchell et al., 1998).

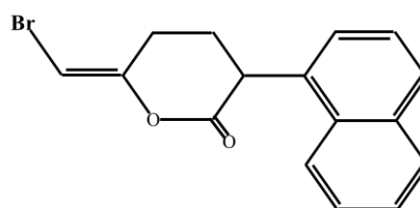


Abbildung 4: Struktur von Bromoenollacton (BEL)

Vom BEL gibt es zwei Enantiomere, S-BEL und R-BEL, die interessanterweise die  $iPLA_2$ -Isoformen unterschiedlich stark hemmen. So hemmt das S-Isomer vom BEL ( $IC_{50}$ : 0,5 – 5  $\mu M$ , abhängig vom Zelltyp) die VIA  $iPLA_2$  stärker als die VIB  $iPLA_2$ . Im Gegensatz dazu inhibiert R-BEL ( $IC_{50}$ : 2 – 2,5  $\mu M$ , abhängig vom Zelltyp) die VIB wirksamer als die VIA (Hooks and Cummings, 2008, Jenkins et al., 2002).

### 1.2.1.3 Allgemeine biochemische Funktionen der Gruppe VI $iPLA_2$

Die Stabilität von biologischen Membranen wird durch verschiedene Schädigungen beeinträchtigt. Oxidativer Stress verursacht an den ungesättigten Fettsäuren der membranalen Phospholipide die Bildung von Lipidperoxiden, wodurch die Membranstabilität erniedrigt wird. Die Abnahme der Stabilität der mitochondrialen Innenmembran hat fatale Folgen für die Zelle, weil dadurch die oxidative ATP-Bereitstellung beeinträchtigt wird. Deshalb wird angenommen, dass eine Hauptaufgabe der  $iPLA_2$  in der Remodellierung von Membranen besteht (van Kuijk et al., 1987). Das VI  $iPLA_2$ -Enzym entfernt die oxidativ-geschädigten Fettsäuren der membranalen Phospholipide. Im Anschluss werden intakte Fettsäuren ATP-abhängig zum Acyl-CoA-Derivat aktiviert und dieses mit dem Lysophospholipid-Rest in der Membran wiederverestert. Der gesamte Prozess (Deacylierung und Reacylierung) wird als „Lands-Zyklus“ (Abb. 5) bezeichnet (Kudo and Murakami, 2002 und Lands, 1965).

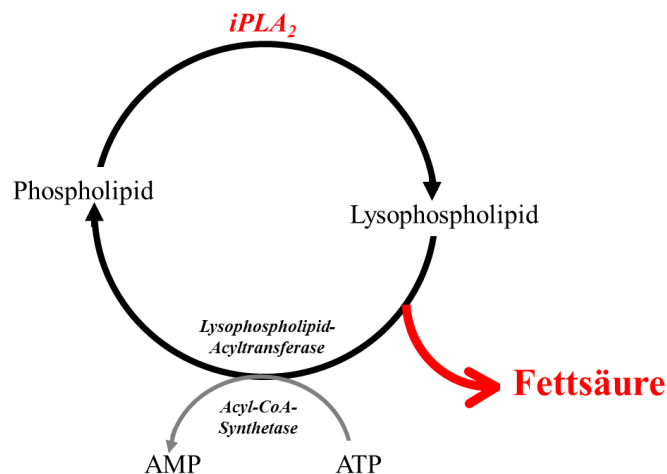


Abbildung 5: Reacylierungs-Deacylierungs-Zyklus nach Lands, 1965

Es gibt auch zahlreiche Ergebnisse der Beteiligung der VI  $iPLA_2$  an der intrazellulären Signalübertragung. Durch die Spaltung von Membranphospholipiden werden Fettsäuren freigesetzt, die innerhalb von Signalkaskaden agieren (Balsinde and Balboa, 2005, Eaddy et al., 2012). Durch Signalkaskaden kommt es zur Stimulation von verschiedenen Prozessen wie

Inflammation, Apoptose, Proliferation oder auch Sekretion von Insulin (Balsinde and Balboa, 2005). Ein Beispiel dafür ist die Freisetzung der AA bei inflammatorischen Prozessen. AA ist das Ausgangssubstrat der Bildung von verschiedenen Eikosanoiden (Prostaglandine, Prostazykline, Thromboxane und Leukotriene), die an Entzündungsprozessen und Zellsignalübertragungen beteiligt sind (Balsinde and Balboa, 2005 und Eaddy et al., 2012).

### 1.2.1.4 Funktionen der Gruppe VI iPLA<sub>2</sub> in Astrozyten

Astrozyten bilden die Mehrheit an Gliazellen im zentralen Nervensystem (ZNS). Zu ihren funktionellen Aufgaben zählen die Versorgung der Neuronen mit Metaboliten (Laktat), die Beteiligung an Kommunikationsprozessen zwischen Neuronen durch Akkumulation von Neurotransmittern (z.B. Glutamat) und die Aufrechterhaltung des zellulären Ca<sup>2+</sup>-K<sup>+</sup>-Haushaltes. Damit sind Astrozyten für die Protektion und Funktion des ZNS unerlässlich (Sun et al., 2005).

Mehr als andere Gewebe ist das Gehirn reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA – *polyunsaturated fatty acid*), wobei der DHA-Gehalt mit mehr als 50% am höchsten ist (Garcia et al., 1998). Astrozyten versorgen Neuronen mit DHA und AA, da diese keine PUFA synthetisieren können (Moore, 2001). DHA ist essentiell für eine normale Funktion des ZNS. So wurde in Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen eine signifikante Reduktion der DHA und anderen PUFA nachgewiesen (Pettegrew et al., 1995).

Die iPLA<sub>2</sub> ist verantwortlich für mehr als 70% der gesamten PLA<sub>2</sub>-Aktivität im Gesamthirn von Säugern, mit der höchsten gemessenen Aktivität im Hippocampus und Striatum (Yang et al., 1999). Verschiedene Arbeiten zeigen, dass in Astrozyten DHA durch iPLA<sub>2</sub> freigesetzt wird (Strokin et al., 2003, 2007, Sun et al., 2004 und Zanassi et al., 1998).

Es muss auch erwähnt werden, dass die Entstehung von einigen neurodegenerativen Erkrankungen mit der Reduzierung der VIA iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Zusammenhang steht. Bei Patienten mit Infantiler Neuroaxonaler Dystrophie (INAD), einer seltenen hereditären neurodegenerativen Erkrankung, konnten Mutationen im humanen *Pla2g6*-Gen, das die Gruppe der VIA kodiert, gefunden werden (Gregory et al., 2008 und Morgan et al., 2006). Bisher konnten insgesamt mehr als 40 verschiedene Mutationen bei Patienten mit INAD gefunden werden. Bei fast allen Patienten treten die Mutationen in beiden Allelen auf (Morgan et al., 2006 und Dennis et al., 2011). Diese Mutationen führen zu Störungen des Phospholipid-Stoffwechsels und bedingen in den Zellen eine abnormale Eisenspeicherung. Die Arten der Mutationen sind vielfältig, so kam es z.B. zu einer Verschiebung des Leserasters (*frameshift*) oder auch zu Punktmutationen, welche auf dem gesamten Gen und im katalytischen Zentrum lokalisiert sein können. Daraus ergeben sich drastische funktionelle

Einschränkungen des Enzyms bis hin zum kompletten Aktivitätsverlust. Warum diese Vielfältigkeit der Mutationen im *Pla2g6*-Gen phänotypisch mit den gleichen Symptomen in Erscheinung treten, ist momentan ungeklärt. Für die weitere Aufklärung der Funktionsweise des VIA iPLA<sub>2</sub> Enzyms bedient man sich in den letzten Jahren verschiedener Tiermodelle. In einem Mausmodell konnte eine Mutation durch eine retrovirale Insertion (IAP - *Intracisternal A Particle*) im 1. Intron, verursacht werden. Diese hatte eine 40-fache Reduktion der Enzymexpression zur Folge. In Astrozytenkulturen dieser mutierten Mäuse konnte ein deutlich verringerter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom im Vergleich zu den Zellen der Wildtyp-Mäuse beobachtet werden (Strokin et al., 2012). Die Verknüpfung zwischen den verschiedenen pathologischen Zuständen im Gehirn und den damit verbundenen Veränderungen der Aktivität und der Expression der iPLA<sub>2</sub>-Isoformen sind richtungsweisend für die zukünftige Behandlung von neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. INAD.

### 1.2.1.5 Wirkung der Gruppe VI iPLA<sub>2</sub> in Mitochondrien

Im Unterschied zu der Gruppe VIA der iPLA<sub>2</sub>, die vorwiegend im Cytosol von ruhenden Zellen lokalisiert sind, ist die VIB überwiegend an der Außenseite der inneren mitochondrialen Membran (IMM) lokalisiert (Kinsey et al., 2007a). Jedoch konnte auch die Gruppe VIA in Mitochondrien detektiert werden (Ma et al., 2011, Mancuso et al., 2000, Moon et al., 2012, Seleznev et al., 2006 und Williams and Gottlieb, 2002).

Aktuelle Studien weisen auf eine funktionelle Bedeutung der iPLA<sub>2</sub>-Isoformen bei der Zellprotektion gegenüber oxidativem Stress hin. So verursacht die Hemmung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in neuronalen PC-12 Zelllinien eine durch oxidativen Stress ausgelöste, erhöhte Exozytose, die letztendlich zu mitochondrialen Schädigungen führt (Ma et al., 2011). Es wurde auch gezeigt, dass die VIA iPLA<sub>2</sub> in Ratten-Insulinomazellen (INS-1) die Mitochondrien gegenüber der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose schützt (Seleznev et al., 2006). Mit renalen proximalen Tubuluszellen wurde außerdem gezeigt, dass eine Reduktion der VIB iPLA<sub>2</sub>-Expression eine erhöhte Lipidperoxidation der mitochondrialen Membranen verursacht. Die damit verbundenen funktionellen Störungen der Mitochondrien führten letztendlich zum apoptotischen Zelltod (Kinsey et al., 2008).

Wie schon mehrfach erwähnt werden vor allem im Hirngewebe durch die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität PUFA (z.B. DHA und AA) freigesetzt (Strokin et al., 2003). PUFA sind unter anderem an verschiedenen mitochondrialen Prozessen beteiligt, einschließlich bei der Atmung, der Apoptose sowie bei der Reduzierung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS - *reactive oxygen species*). Diese reduzierte ROS Produktion wird durch eine leichte Depolarisation der IMM, bekannt als "Milde Entkopplung" (nähere

Erklärung siehe Kapitel 1.5.1), verursacht (Rohrbach, 2009). Hierbei stellt sich die Frage, inwieweit die iPLA<sub>2</sub>-induzierte Fettsäure-Freisetzung einen Einfluss auf die mitochondrialen Prozesse nimmt.

### 1.3 Mitochondrien

Mitochondrien sind Organellen mit einer Größe von etwa 1 -2  $\mu\text{m}$ , die in fast allen eukaryotischen Zellen lokalisiert sind. Im Laufe der frühen Evolution sind Mitochondrien wahrscheinlich aus aeroben Proteobakterien entstanden, die mit anaeroben Eukaryonten eine Symbiose eingegangen sind. Die sogenannte Endosymbiontentheorie wird durch viele Befunde gestützt (Margulis, 1996). So besitzen Mitochondrien ihre eigene ringförmige DNA und Ribosomen. Ebenso wird die Theorie untermauert durch den Aufbau der Doppelmembran, wobei die innere Membran von den Symbionten abstammen dürfte, während die äußere bei der Aufnahme in die Zelle von der Zellmembran abgeschnürt wurde. Beide Membranen sind sehr proteinreich. In der äußeren Membran findet man das Protein Porin, welches auch den Austausch von Ionen und kleineren Molekülen (<10 kDa) zwischen dem Mitochondrium und dem Cytosol ermöglicht (Granville et al., 2003, Shoshan-Barmatz et al., 2008). Die IMM ist charakterisiert durch sogenannte Cristae. Durch die Cristae wird die Oberfläche, an der diverse chemische Reaktionen ablaufen, erheblich vergrößert (Frey and Mannella, 2000). Die IMM enthält die für die oxidative ATP-Synthese benötigten Enzymkomplexe der Atmungskette und der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase. Im Gegensatz zur äußeren Membran ist die IMM undurchlässig für Ionen und hydrophile Moleküle. Zahlreiche Transportmechanismen ermöglichen einen kontrollierten Transport von wichtigen Metaboliten zwischen Matrixraum und Cytosol. Die IMM umschließt den Matrixraum, in dem viele Enzyme, wie z.B. die des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, des Citratzyklus, sowie der  $\beta$ -Oxidation lokalisiert sind.

Der mitochondriale Elektronentransport und die daran gekoppelte Phosphorylierung sind für die Lebensfähigkeit von höheren Lebewesen unverzichtbar. Die Proteine der Elektronentransportkette (ETK) und die der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase sind in 5 Komplexen innerhalb der IMM organisiert. Die Komplexe I, II, III und IV bilden die ETK, während der Komplex V die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase repräsentiert. Die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase verknüpft das Phosphat-Anion mit dem ADP zu einer energiereichen Anhydrid-Bindung. Der von der Atmungskette oxidierte Wasserstoff wird in Form der Reduktionsäquivalente NADH und FADH<sub>2</sub> bereitgestellt. Die bei der Oxidation von NADH und FADH<sub>2</sub> freigesetzten Elektronen werden mittels einer Reihe von Redoxreaktionen auf den Sauerstoff übertragen, wodurch Redoxenergie freigesetzt wird. Mittels dieser Redoxenergie wird der Transport von Protonen

aus der Matrix in die IMS ermöglicht, wodurch der elektrochemische Protongradient ( $\Delta p$ ) gebildet wird. Die in diesem Gradienten gespeicherte Energie ermöglicht den Ablauf von energieabhängigen Reaktionen, wie die Verknüpfung von ADP mit Phosphat oder die Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$  im mitochondrialen Matrixraum (Lehninger Biochemie, 3. Auflage, 2001). Die in intakten Mitochondrien bestehende enge Verbindung zwischen dem Elektronentransport der Atmungskette und der  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP-Synthase wird durch sogenannte Entkoppler reduziert bis aufgehoben. Zu diesen Entkopplern gehören unter anderem auch die langkettigen Fettsäuren.

In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Substraten, ADP (plus Phosphat) und Sauerstoff wurden fünf Funktionszustände der isolierten Mitochondrien definiert (Chance and Williams, 1956). In der Tabelle 1 sind diese Funktionszustände der isolierten Mitochondrien zusammengefasst. Ergänzend sei noch der Begriff der Atmungskontrolle benannt, der den Kopplungsgrad von Elektronentransport und Phosphorylierung charakterisiert. Generell gilt, dass durch die Wirkung von Entkopplern die Atmungskontrolle verringert wird.

	Im Überschuss vorhanden	Limitierende Faktoren für die Atmungsgeschwindigkeit
State 1	$\text{O}_2$	ADP, Substrat
State 2	$\text{O}_2$ , ADP	Substrat
State 3	$\text{O}_2$ , ADP, Substrat	Maximale Geschwindigkeit der Atmungsenzyme
State 4	$\text{O}_2$ , Substrat	ADP
State 5	ADP, Substrat	$\text{O}_2$

Tabelle 1: Darstellung der verschiedenen Funktionszustände in isolierten Mitochondrien nach Chance and Williams, 1956

Die Mitochondrien spielen aber auch eine entscheidende Rolle beim programmierten Zelltod, der Apoptose. Bei der Apoptose werden über eine Signalkaskade Caspase-Proteasen im Zellinneren aktiviert. Bei der induzierten Apoptose ist die Auslösung der Permeabilitätstransition über die Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP - *mitochondrial permeability transition pore*) das Initialereignis. Bei der mPTP handelt es sich um eine Pore in der IMM, welche kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 1,5 kDa hindurch lässt. Diese Pore öffnet bei einem pathologischen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Matrixraum. Die Sensitivität der mPTP für  $\text{Ca}^{2+}$  wird zusätzlich durch die Depolarisation der IMM und oxidativen Stress reguliert (Bernardi, 1999, Petronelli et al., 2001). Durch das Öffnen der

mPTP in der IMM kommt es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) und der Freisetzung von Cytochrom c. Das freigesetzte Cytochrom c bindet an den Faktor Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) und bildet einen Komplex, das sogenannte Apoptosom. Das Apoptosom führt dann letztendlich zur Caspase-Aktivierung und löst somit Apoptose aus (Bernardi, 1999, Green and Reed, 1998 und Turrens et al., 2003).

#### 1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und ihre zelluläre Bildung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind kleine, kurzlebige und äußerst reaktive Sauerstoffverbindungen, zu denen das Superoxidanion-Radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), das Hydroxyl-Radikal ( $\cdot OH$ ), Peroxynitrit ( $ONO_2^-$ ) und das Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) gezählt werden. Diese können ungesättigte Fettsäuren, Pyrin- und Pyrimin-Basen und die Seitenketten von Aminosäuren irreversibel schädigen (Scherz-Shouval und Elazar, 2007, Shackelford et al., 2000).

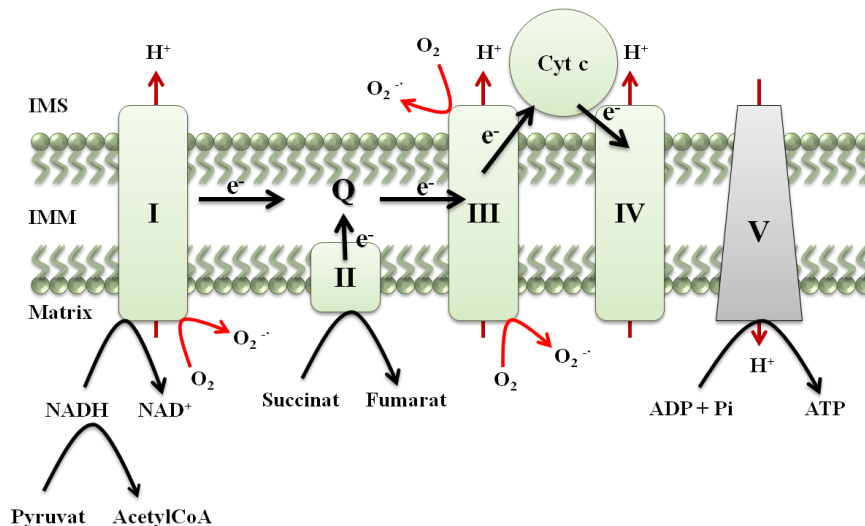


Abbildung 6: ROS-Produktion in der mitochondrialen Atmungskette

Bei der Elektronenübertragung in der mitochondrialen Atmungskette können Elektronen zwischen Komplex I und III entweichen, werden auf molekularen Sauerstoff übertragen und Superoxidanionen können entstehen.

Innerhalb der Säugerzellen gibt es verschiedene Bildungsorte für die ROS-Produktion, wie isolierte enzym-katalysierte Reaktionen (z.B. Xanthin-Oxidase), die Plasmamembran-assoziierte NADPH-Oxidase, Peroxisomen und Mitochondrien. Allerdings werden die Mitochondrien als die Hauptquelle der zellulären ROS-Produktion angesehen. Es wird angenommen, dass ca. 1 – 2 % des aufgenommenen Sauerstoffes durch die Atmungskette in

das  $O_2^{\cdot-}$  umgewandelt werden (Brookes et al., 2004). Die Bildung des  $O_2^{\cdot-}$  erfolgt hauptsächlich durch die Komplexe I und III (Abb. 6).

Das gebildete  $O_2^{\cdot-}$  wird durch die Superoxiddismutase in das reaktivere  $H_2O_2$  umgewandelt (Turrens, 2003). Durch die Aufnahme eines weiteren Elektrons wird aus dem  $H_2O_2$  das äußerst reaktive Hydroxyl-Radikal gebildet.

### 1.5 Antioxidative Schutzmechanismen

Oxidativer Stress tritt immer dann auf, wenn die ROS-Bildung größer ist als die ROS-Entfernung. Zur Vermeidung der mit dem oxidativen Stress verbundenen Schädigung, gibt es in der Zelle verschiedene Strategien zur Inaktivierung von ROS. Zu diesen antioxidativen Schutzmechanismen zählen enzym-katalysierte Reaktionen, aber auch die direkte Reaktion der ROS mit Antioxidantien. Zu den wichtigsten Enzymen gehören die Katalase und Glutathionperoxidase. Physiologische Antioxidantien sind Glutathion, Vitamin C oder auch Vitamin E. Bei oxidativem Stress ist die antioxidative Kapazität nicht ausreichend (Andreyev et al., 2005).

$H_2O_2$  kann somit durch Katalase zu Wasser und Sauerstoff zersetzt werden oder durch die katalytische Wirkung der Glutathionperoxidase mit dem Antioxidans Glutathion zu Wasser reduziert werden. Das Enzym Katalase wurde vor allem in Peroxisomen von Herzmitochondrien gefunden (Radi et al., 1991 und Turrens, 2003). Das Glutathion-Redoxsystem gilt als eines der wichtigsten Entgiftungssysteme in Säugetierorganismen.

Oxidativer Stress kann durch unterschiedliche Parameter ausgelöst werden, wie z.B. als Nebenprodukt während der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung oder auch während verschiedenen pathologischen Stoffwechselprozessen z.B. bei Entzündungsprozessen (Brookes et al. 2004, Shackelford et al., 2000 und Venditti et al., 2013). Im physiologischen Stoffwechsel spielt ROS in niedrigen Konzentrationen eine bedeutende Rolle bei der Signaltransduktion von Regulationsprozessen. Dabei fungiert ROS als *second messenger* und stellt chemotaktische Faktoren bei Entzündungsprozessen, wie z.B. bei der Aktivierung von Lymphozyten durch  $H_2O_2$ , dar (Reth, 2002). Eine pathologisch erhöhte ROS-Produktion führt langfristig zum programmierten Zelltod.

#### 1.5.1 Milde Entkopplung als antioxidativer Schutzmechanismus

Nach einer noch umstrittenen Hypothese, führt eine geringfügige Depolarisation der IMM (Erniedrigung des  $\Delta\psi_m$ ), die besser bekannt ist als „Milde Entkopplung“, zu einer verminderten Bildung von  $O_2^{\cdot-}$ . In Experimenten mit isolierten Mitochondrien wurde gezeigt, dass eine Erniedrigung der  $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch „Milde Entkopplung“ nur dann auftritt, wenn



Mitochondrien im Ruhezustand (State 4) Succinat oxidieren. In diesem Fall kommt es zu einem rückwärtsgerichteten Elektronentransport (RET – *reverse electron transport*), d.h. Elektronen werden vom Komplex II zum Komplex I transportiert. Dabei wird das  $O_2^{\cdot-}$  durch den Komplex I gebildet. Dieser rückwärtsgerichtete Elektronentransport wird bereits durch eine geringfügige Erniedrigung des  $\Delta\psi_m$  blockiert, was gleichzeitig die  $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch den Komplex I verhindert (Abb. 7).

Unter den physiologischen Bedingungen dominiert der vorwärtsgerichtete Elektronentransport (FET – *forward electron transport*). Dabei werden die Elektronen unter Beteiligung des mobilen Elektronencarriers Ubichinon zum Komplex III der Atmungskette transportiert (Abb. 7). In der Folge wird  $O_2^{\cdot-}$  durch den Komplex I und den Komplex III gebildet. In Inkubationsexperimenten mit isolierten Mitochondrien wird der vorwärtsgerichtete Elektronentransport mit den NADH-liefernden Substraten Malat/Glutamat bzw. Malat/Pyruvat simuliert.

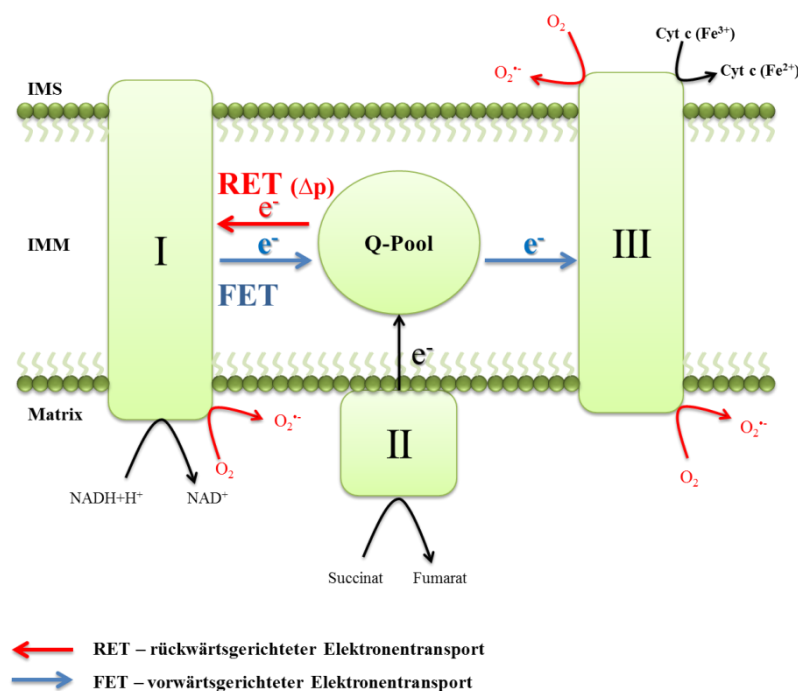


Abbildung 7: Darstellung des rückwärtsgerichteten bzw. vorwärtsgerichteten Elektronentransports innerhalb der Atmungskette

### 1.5.2 Milde Entkopplung durch Fettsäuren

Unveresterte Fettsäuren können die  $H^+$ -Leitfähigkeit der IMM erhöhen und somit eine „Milde Entkopplung“ energetisierter Mitochondrien bewirken (Abb. 8). Beim vorwärtsgerichteten Elektronentransport stimulieren Fettsäuren die ROS-Produktion durch eine Deregulation der Atmungskette (Schönfeld and Wojtczak, 2007). Somit kann die

iPLA<sub>2</sub>-induzierte Fettsäure-Freisetzung sowohl zu einer Verringerung der RET-abhängigen ROS-Bildung als auch zu einer Stimulation der FET-abhängigen ROS-Bildung führen.

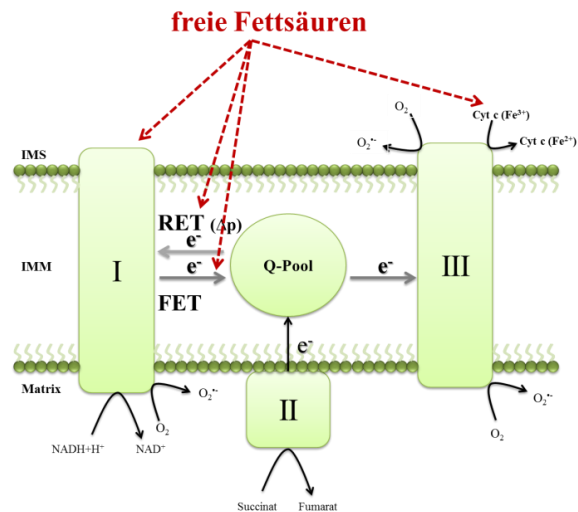


Abbildung 8: Möglicher Einfluss der freien Fettsäuren auf die mitochondriale Atmungskette.

Zudem sind an der Erhöhung der H<sup>+</sup>-Leitfähigkeit zwei Proteine der IMM beteiligt, der Adeninnukleotid-Translokator (ANT) und die Entkopplungsproteine (UCP – *uncoupling proteins*). Eine Wirkung des ANT als „Verstärker“ der Fettsäure-induzierten Entkopplung ist seit 2 Jahrzehnten bekannt (Andreyev et al., 1989, Brustovetsky and Klingenberg, 1994 und Schönfeld, 1990). Noch länger ist bekannt, dass die kälteinduzierte Thermogenese im braunen Fettgewebe durch die Fettsäure-induzierte Aktivierung des Thermogenin (UCP1) vermittelt wird (Nicholls and Locke, 1984). Im Unterschied dazu werden die Entkopplungsproteine UCP2-UCP4 noch heute kontrovers diskutiert (Mailloux and Harper, 2011 und Shabalina and Nedergaard, 2011). Die Fettsäure-induzierte H<sup>+</sup>-Leitfähigkeit wird häufig mit einem Modell erklärt, wonach die Fettsäure in der undissoziierten Form die IMM von außen permeiert. Im Matrixraum dissoziiert die Fettsäure in das Fettsäureanion und ein H<sup>+</sup>. Demnach transportieren der ANT und die ubiquitär vorkommenden UCP das Fettsäureanion durch die IMM zurück. Durch dieses Fettsäureanion-Cycling durch die IMM wird ein H<sup>+</sup>-Einstrom in die Mitochondrien verursacht, auch bekannt als Protonenleck (Skulachev, 1991).

## 1.6 Neurodegenerative Erkrankungen als Folge von oxidativem Stress

Die Ursachen für neurodegenerative Erkrankungen sind vielfältig und können sowohl endogener als auch exogener Natur sein, wobei oxidativer Stress eine wichtige pathophysiologische Rolle spielt (Skulachev et al., 2012). Auf Grund einer vermehrten ROS-Produktion bei gleichzeitig verminderter antioxidativer Inaktivierung reagiert das Gehirn im Vergleich zu anderen Körpergeweben sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress. Da es sich bei Neuronen um postmitotische Zellen handelt und diese sich demzufolge

nicht mehr regenerieren können, ist das Nervengewebe sehr anfällig für kumulierende Schäden, die auf lange Sicht zu pathologischen Veränderungen führen können (Emerit et al., 2004).

Die Membranen des Nervengewebes enthalten einen sehr hohen Anteil an PUFA, welche sehr anfällig gegenüber prooxidativen Prozessen sind. Diese begünstigen die Freisetzung cytotoxischer Lipidperoxidationsprodukte, was wiederum zu Veränderungen der Membranintegrität führen kann. Die Akkumulation von oxidierten Proteinen in den Membranen kann inflammatorische Veränderungen hervorrufen und den neuronalen Zelltod auslösen. Ein weiteres Merkmal von neurodegenerativen Erkrankungen sind Beeinträchtigungen mitochondrialer Funktionen. Die damit verbundenen Störungen der Energiegewinnung innerhalb der Neuronen behindern den Transport von Signalmolekülen und beeinträchtigen die Erregungsleitung (Barnham et al., 2004, Emerit et al., 2004, Jomova et al., 2010).

Das Auftreten von Proteinakkumulationen ist charakteristisch für viele neurodegenerative Erkrankungen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Parkinson-Erkrankung. Diese Krankheit ist pathophysiologisch durch einen progressiven Verlust von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* gekennzeichnet. Die Ursache der Parkinson-Erkrankung ist bisher weitestgehend unbekannt. Dennoch zeigen viele Studien, dass das Absterben der dopaminergen Neuronen in Verbindung mit mitochondrialen Fehlfunktionen sowie einem erhöhten oxidativen Stress gebracht werden kann. So konnte an Parkinson-Patienten festgestellt werden, dass in der *Substantia nigra* die Komplex I-Aktivität der mitochondrialen Atmungskette stark reduziert ist. Die daraus resultierende Erhöhung des oxidativen Stresses führt letztendlich zum programmierten Zelltod (Dauer and Przedborski, 2003 und Hwang, 2013). Des Weiteren kann selbst der Neurotransmitter Dopamin eine Quelle für oxidativen Stress sein. Während der Biosynthese von Dopamin kommt es zur Produktion von toxischen Quinonen. Diese Quinone sind in der Lage, kovalent an Proteine mit Cystein-Resten zu binden und diese zu schädigen. Zudem zeigen Untersuchungen *postmortem* eine verstärkte oxidative Modifizierung von Lipiden und Proteinen bei Parkinson-Patienten, was ebenfalls auf erhöhten oxidativen Stress schließen lässt (Hald and Lotharius, 2005, Hwang, 2013, Sherer et al., 2002).

### 1.7 Ziele der Arbeit

Der Wirkmechanismus der von verschiedenen Forschungsarbeiten postulierten antioxidativen Wirkung der iPLA<sub>2</sub>-Isoformen ist bisher nicht geklärt. Nach einer aktuellen Hypothese ist die antioxidative Wirkung der iPLA<sub>2</sub> auf eine "Milde Entkopplung"

zurückzuführen. Anhand dieser Hypothese erhöht die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> den zellulären Gehalt der freien Fettsäuren. Diese Fettsäuren erhöhen die H<sup>+</sup>-Leitfähigkeit der mitochondrialen Innenmembran, wodurch die Innenmembran geringfügig depolarisiert wird. Es wird angenommen, dass diese Depolarisation die Superoxid-Bildung durch die mitochondriale Atmungskette erniedrigt. Des Weiteren wird diskutiert, dass im Hirngewebe die Entkopplerwirkung der Fettsäuren durch den Adeninnukleotid-Translokator und durch das Entkopplungsprotein UCP2 verstärkt wird.

Das wesentliche Ziel der vorliegenden Promotionsschrift besteht darin, den Einfluss der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität auf die ROS-Bildung in Astrozyten und isolierten Hirnmitochondrien zu analysieren. Zur Charakterisierung der iPLA<sub>2</sub>-Wirkung dient der iPLA<sub>2</sub>-Inhibitor BEL. Durch die iPLA<sub>2</sub>-induzierte Freisetzung von Fettsäuren stellt sich die Frage, ob das Enzym möglicherweise den Fettsäure-Pool unter pathophysiologischen Bedingungen in der Zelle bzw. in Mitochondrien beeinflusst. Hierzu wurden im Einzelnen die folgenden Fragestellungen experimentell bearbeitet:

1. Zu Beginn der Arbeit sollte der Einfluss der iPLA<sub>2</sub> bei der Bildung von Sauerstoffradikalen in Astrozyten untersucht werden. Dabei wird der mitochondriale Komplex I-Hemmstoff Rotenon zur Stimulation der ROS-Bildung verwendet. Nach anschließender Behandlung der Astrozyten mit BEL sollten indirekt die Folgen der ROS-Produktion im Zusammenhang mit der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität analysiert werden.
2. Des Weiteren sollte die Wirkung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen in isolierten Hirnmitochondrien untersucht werden. Hierzu musste die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> in funktionell intakten Rattenhirnmitochondrien unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert werden. Den Mitochondrien wurde Wasserstoff-bereitstellende Substrate (Succinat bzw. Glutamat/Malat) zur Verfügung gestellt und anschließend die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> bestimmt.
3. Anschließend wurde in einer weiteren Fragestellung geprüft, ob die verstärkte iPLA<sub>2</sub>-induzierte Fettsäure-Freisetzung die ROS-Produktion entweder über den rückwärtsgerichteten oder über den vorwärtsgerichteten Elektronentransport beeinflusst wird. Unter den Bedingungen des rückwärtsgerichteten und vorwärtsgerichteten Elektronentransports sollte der Effekt der Docosahexaensäure, ein Hauptprodukt der iPLA<sub>2</sub> im Gehirn, auf die ROS-Produktion in isolierten Rattenhirnmitochondrien untersucht werden.

4. Außerdem sollte die Beteiligung des Adeninnukleotid-Translokators bzw. des Entkopplungsproteins UCP2 an der DHA-induzierten  $H^+$ -Leitfähigkeit der Innenmembran in Hirnmitochondrien untersucht werden.
5. Im Anschluss sollte in einer weiteren Aufgabenstellung die Wirkung von BEL auf die funktionellen Eigenschaften der Hirnmitochondrien analysiert werden, wie  $Ca^{2+}$ -Retentionskapazität, mitochondrialen Membranpotentials und die Aktivitäten der Enzymkomplexe innerhalb der mitochondrialen Atmungskette.

Die erhaltenen Ergebnisse sollen zu einem besseren Verständnis des möglichen Wirkmechanismus der  $iPLA_2$  bei der Modulation von reaktiven Sauerstoffspezies dienen und somit dazu beitragen die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der Infantilen Neuroaxonalen Dystrophy (INAD), aufzuklären.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Versuchstiere

<b>Charles River</b> (Sulzfeld, Deutschland)	Ratte Wistar - Unilever
<b>Jackson Laboratorium</b> (Bar Harbor, USA)	Maus <i>Pla2g6</i> inaktiv Stamm: C57BL/6

#### 2.1.2 Geräte und Versuchsmaterialien

<b>GE-Healthcare</b> (Freiburg, Deutschland)	Hofer Mighty Small II SE 250 (Gelelektrophorese-Kammer) Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer
<b>Bandelin Electronic GmbH &amp; Co. KG</b> (Berlin, Deutschland)	Bandelin Sonoplus Homogenisator UW 2070 (Ultraschall-Gerät)
<b>Bio-Rad Laboratories, Inc.</b> (München, Deutschland)	ChemiDoc XRS <sup>+</sup> (Gel-Dokumentationssystem) C1000™ Thermal Cycler Model 200/2.0 Power Supply (Spannungsgerät) Semidry Trans-Blot SD (Western-Blot) Quantity One 4.2 (Analyse-Software)
<b>Bachofner</b> (Reutlingen, Deutschland)	Wasserbad
<b>Eppendorf</b> (Hamburg, Deutschland)	Thermomixer comfort 2 ml Pipetten
<b>Heraeus</b> (Hanau, Deutschland)	Zellkulturinkubator Kühlschrank (-80°C) Biofuge 13 R (Tischzentrifuge) Megafuge 1.0 R (Tischzentrifuge)
<b>Hettich Zentrifugen</b> (Tuttlingen, Deutschland)	AHT 35 (Kühlzentrifuge)
<b>Greiner Bio-One GmbH</b> (Frickenhäuser, Deutschland)	Mikrotiterplatten
<b>Integra Bioscience</b> (Fernwald, Deutschland)	Tecnoflow bench
<b>IKA</b> (Staufen, Deutschland)	Ultra Turrax T8 VF 2 (Vortex)
<b>Macherey-Nagel GmbH &amp; Co. KG</b> (Düren, Deutschland)	DC-Fertigfolien Alugram® SIL G/UV254 Schicht: 0,2 mm Kieselgel 60
<b>Molecular Devices GmbH</b> (München, Deutschland)	Spectramax M5 (ELISA-Photometer) Softmax Pro 4.0 (zur Proteinbestimmung) Softmax Pro 5.2 (Kinetikmessungen)

<b>Neolab</b> (Heidelberg, Deutschland)	Zählkammer nach Neubauer
<b>Oroboros Instruments Oxygraph®</b> (Innsbruck, Österreich)	Clark O <sub>2</sub> -Elektrode
<b>PerkinElmer</b> (Waltham, USA)	Luminescence Spectrophotometer LS50B
<b>Satorius</b> (Göttingen, Deutschland)	Waage
<b>Schleicher &amp; Schuell</b> (Dassel, Deutschland)	Nitrocellulosemembran Protran BA83 (Transfermembran 0,2 µm) Whatman Papier
<b>Sorvall Instruments</b> (Langenselbold, Deutschland)	RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge SS34-Rotor Discovery 90 (Ultrazentrifuge) AH-629-Rotor
<b>WTW</b> (Weilheim, Deutschland)	pH-Meter (pH526)

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

#### 2.1.3.1 Chemikalien

<b>Biochrom AG</b> (Berlin, Deutschland)	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Fetal Calf Serum (FCS) Penicillin/Streptomycin, 100X
<b>Biotrend</b> (Köln, Deutschland)	1-Palmitoyl-2-[1- <sup>14</sup> C]-Oleoyl-Phosphatidylcholin (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol)
<b>Bio-Rad Laboratories, Inc.</b> (München, Deutschland)	Bradford-Reagenz Precision Plus Protein All Blue Standards
<b>Carl Roth</b> (Hamburg, Deutschland)	Ampicillin ATP, Dinatriumsalz Butanol Roti-Block DMSO 1,4-Dithiothreitol (DTT) D(+)-Saccharose FCCP HEPES KCl K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KOH MgCl <sub>2</sub> NaCl NaOH Proteinase K Rotiphorese® Gel 30 (37,5 : 1)

	SDS ultra pure
	TEMED
	TRIS Ultra Qualität
	Triton-X 100
	Essigsäure
	$\alpha$ -D(+)-Glucose-Monohydrat
<b>Cayman Chemicals</b>	<i>R</i> -Bromoenollacton
(Ann Arbor, USA)	<i>S</i> -Bromoenollacton
	Bromoenollacton (Racemat)
	Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder
<b>Fermentas</b>	
(München, Deutschland)	
<b>Invitrogen</b>	Amplex Red
(Karlsruhe, Deutschland)	CaGreen-5N
<b>MBI Fermentas</b>	1 kb DNA Ladder Plus
(St. Leon-Rot, Deutschland)	
<b>PerkinElmer</b>	Ultima Gold™ Cocktails (Szintillationscocktail)
(Waltham, USA)	
<b>Roche Diagnostic</b>	Proteaseinhibitor Cocktail complete EDTA-free
(Mannheim, Deutschland)	
<b>Sigma</b>	Albumin bovine serum $\geq 96\%$ ;
(Taufkirchen, Deutschland)	(essentially <i>fatty acid free</i> )
	Antimycin A
	$\beta$ -Mercaptoethanol
	Bromphenolblau
	Carboxyattractylosid Kaliumsalz
	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB)
	Chloro-2,4-dinitrobenzen (DTNB)
	Cyclosporin A
	Docosahexaensäure
	Glutathion
	Maleinsäure Dinatriumsalz
	D-Mannitol
	Safranin O
	Tween 20
	Percoll-Lösung
	Ponceau S
	Pyruvat
	Rotenon
<b>Thermo Fisher Scientifics</b>	Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer
(München, Deutschland)	Supersignal West Pico Kit



### 2.1.3.2 Kits

**Cayman Chemical**  
(Arbor, USA)

JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

TBARS Assay Kit

**Roche Diagnostic GmbH**  
(Mannheim, Deutschland)

LDH Cytotoxicity Detection Kit

**Qiagen**

*Taq* PCR Master Mix Kit

(Hilden, Deutschland)

### 2.1.3.3 Antikörper

**Biozol**

Mouse monoclonal anti- Cyt c (cytochrome c, clone 7H8.2C12)

(Eching, Deutschland)

**Calbiochem**

Rabbit anti-VDAC (voltage-dependent anion channel, Ab-5)

(Schwalbach, Deutschland)

**Dianova**

Peroxidase-conjugated goat anti-mouse und anti-rabbit IgG

(Hamburg, Deutschland)

**R&D Systems**

Mouse monoclonal anti-HNE

(Minneapolis, USA)

(clone 198960, mouse IgG2B)

**Santa Cruz Biotechnology**

Rabbit polyclonal anti-ANT 1/2/3/4 (H-188)

(Heidelberg, Deutschland)

**Sigma**

Mouse monoclonal anti- $\beta$ -tubulin I

(Taufkirchen, Deutschland)

(clone SAP.4G5)

### 2.1.4 Medien und Lösungen

#### 2.1.4.1 Zellkultur

DMEM

3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>

4,5 g/l D-Glucose

stabiles Glutamin

w/o Na-Pyruvat

Zusätze: 100 U/ml Penicillin

100  $\mu$ g/ml Streptomycin

10% ( $\frac{v}{v}$ ) FCS

Präparationsmedium (Puck's D1-Lsg.)

137 mM NaCl

5,4 mM KCl

0,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

5 mM Glucose

58,4 mM Saccharose pH 7,4

#### 2.1.4.2 Proteinbiochemie

Ethidiumbromid-Lösung

10 mg/ml

Homogenisationspuffer

340 mM Saccharose

50 mM TRIS/HCl pH 7,5

	1 mM EGTA	
	1 mM DTT	
Hypotoner Puffer A	10 mM HEPES	pH 7,9
	1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	
	10 mM KCl	
	0,5 mM DTT	
	2% ( <sup>w</sup> /v) Proteaseinhibitor Cocktail	
4x Laemmli-Probenpuffer	500 mM TRIS/HCl	pH 6,8
	8% SDS	
	40% Glycerin	
	0,005% Bromophenolblau	
	20% Mercaptoethanol	
1x NaHBS	145 mM NaCl	
	5,4 mM KCl	
	1 mM MgCl <sub>2</sub>	
	1,8 mM CaCl <sub>2</sub>	
	25 mM Glucose	
	20 mM HEPES	pH 7,4
1x PBS	137 mM NaCl	
	2,6 mM KCl	
	8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7,4
PER-Lösung	10% ( <sup>w</sup> /v) Ammoniumperoxodisulfat	
4x Ripa-Puffer	200 mM TRIS	
	4% Igepal	
	1% Natriumdeoxycholat	
	600 mM NaCl	
	4 mM NaF	pH 7,5
Sammelgel-Puffer	250 mM TRIS/HCl	pH 6,8
1x TAE	40 mM TRIS	
	5 mM NaOAc	
	1 mM EDTA	pH 7,4
<i>Tail</i> -Puffer	100 mM TRIS	
	5 mM EDTA	
	200 mM NaCl	pH 8,5
	0,05% NaN <sub>3</sub>	
10x TBS	1,37 M NaCl	
	200 mM TRIS/HCl	pH 7,6
100% TCA-Lösung	100 g Trichloressigsäure	
	45,4 ml dest. H <sub>2</sub> O	
Transfer-Puffer	25 mM TRIS	

	192 mM Glycin	
	20% (v/v) Methanol	
2xTrenngel-Puffer	750 mM TRIS/HCl	pH 8,8
Ponceau-Lösung	0,2% Ponceau S	
	3% Essigsäure	
Proteinpuffer	340 mM Saccharose	
	50 mM TRIS/HCl	pH 7,5
	1 mM EGTA	
	1 mM DTT	
	0,1 mM ATP	
Reaktionspuffer	100 mM TRIS/HCl	pH 7,5
	0,1 mM ATP	

### 2.1.4.3 Puffer für Mitochondrienanalysen

Standardmedium	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	0,5 mM EGTA	
	60 mM TRIS	
	60 mM KCl	
	110 mM Mannitol	pH 7,4
Waschpuffer	320 mM Saccharose	
	10 mM TRIS/HCl	pH 7,4
Isolationspuffer	320 mM Saccharose	
	10 mM TRIS/HCl	pH 7,4
	0,5 mM EDTA	
	0,5 mM EGTA	
	50 mg BSA (0,1% (w/v))	
Saccharose-Lösung	250 mM Saccharose	
	5 mM TRIS	pH 7,4

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Astrozyten Präparation

Für die Herstellung von Astrozyten dienten neugeborene (P0) Ratten (Wistar). Die Präparation erfolgte gemäß dem Protokoll von Hamprecht und Löffler von 1985 (Hamprecht and Löffler, 1985). Alle Experimente wurden nach den Richtlinien des Bundeslandes Sachsen-Anhalt für die ethische Nutzung von Versuchstieren angepasst und dabei wurden alle Anstrengungen unternommen, die Anzahl der Tiere zu minimieren.

Zuerst wurden zwei neugeborene Ratten dekapitiert, die Gesamthirne wurden entnommen und in eiskalter Puck's D1 Lösung gesammelt. Die Hirne wurden vorsichtig

durch zwei verschieden große Nylonsiebe (250  $\mu\text{m}$  und 156  $\mu\text{m}$  Porenweite) gepresst und anschließend bei 4°C für 5 min bei 500 xg zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 10 ml DMEM (mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin) resuspendiert und die Zelldichte durch eine Vitalfärbung mit Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden auf sterile 60 mm Kulturschalen (2 - 8 x 10<sup>5</sup> Zellen/Schale) für nachfolgende Experimente ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Der Wechsel des Mediums erfolgte erstmalig am 5. Tag in Kultur und im Folgenden alle 2 – 3 Tage. Am 10. bis 13. Tag *in vitro* wurden die Kulturen für Experimente verwendet.

### **2.2.1.2 Extraktion des Cytosols aus Astrozyten**

Für die Freisetzung von Cytochrom c wurde aus den Astrozyten, nach der Stimulation mit Rotenon, R-BEL und S-BEL, Cytosol extrahiert. Dazu wurden die Zellen drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch 30 Hübe mit dem Dounce-Homogenisator in 400  $\mu\text{l}$  hypotonen Puffer A homogenisiert. Nach der Ultraschall-Behandlung (3x10 sec, 40%) wurden die Proben für 30 min bei 50000 xg (4°C) zentrifugiert. Somit erfolgte die Entfernung von Membran- und Mitochondrienfraktionen. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode.

### **2.2.1.3 Präparation der Membranfraktion aus Astrozyten**

Für die radioaktive Messung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität wurde aus den Astrozyten, nach der Stimulation mit Rotenon, R- und S-BEL, die Membranfraktion präpariert. Nach der 6-stündigen Behandlung der Zellen im serumfreien Medium (DMEM) wurden diese mit einem Zellschaber abgeerntet und zentrifugiert (500 xg, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 2 ml Homogenisationspuffer aufgenommen und anschließend 3x10 s bei 40% sonifiziert. Nach dem Aufbrechen der Zellen erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 60 min (100000 xg, 4°C). Das Pellet wurde in 2 ml Proteinpuffer aufgenommen, sonifiziert (3x10 s, 40%) und ein weiteres Mal zentrifugiert (60 min, 100000 xg, 4°C). Das erhaltene Pellet (Membranfraktion) wurde in 50  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer aufgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte ebenfalls durch die Bradford-Methode.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten**

In Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturschalen wurde 1 ml 1x Ripa Puffer, bei Verwendung der 10 cm Zellkulturschale, zu dem Zellpellet dazugegeben (500 µl zu der 6 cm Schale und 250 µl zu der 3 cm Schale) und die Zellen in Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden 15 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert und anschließend zentrifugiert (14000 xg, 15 min, 4°C). Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration des resultierenden Überstandes erfolgte ebenso durch die Bradford-Methode.

### **2.2.2.2 Proteinfällung**

#### **2.2.2.2.1 Methanol/Aceton Fällung**

Zur Konzentrierung einer Proteinlösung wurde diese mit einem 4-fachen Volumen der Methanol/Aceton-Lösung (1:1 (v/v) gemischt und für 15 min bei 37°C unter Schütteln gefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (25000 xg, 15 min, RT) sedimentiert und bei 37°C getrocknet. Nach Lösen in 20 µl 1x Probenpuffer erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE.

#### **2.2.2.2.2 TCA-Fällung**

Alternativ erfolgte die Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure. Dazu wurden 1 ml Probe mit 110 µl 100% TCA-Lösung gemischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 min Zentrifugieren (25000 xg, RT) wurde zu dem Zellpellet 200 µl 10% TCA-Lösung zugegeben und zentrifugiert (25000 xg, RT). Nach Wiederholung des vorhergehenden Arbeitsschrittes wurde das Zellpellet zwei Mal mit 200 µl Aceton gewaschen. Nach der Trocknung des Pellets bei 37°C wurde das Protein in 20 µl 1x Probenpuffer gelöst und mittels SDS-PAGE analysiert.

#### **2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Zur Proteinquantifizierung wurde der BioRad Protein Assay verwendet. Dieser Assay beruht auf dem Verfahren nach Bradford. Dabei bildet der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine einen Komplex. Die ungebundene (kationische) rote Form des Farbstoffs hat im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu 595 nm.

In jedem zu messenden Well wurden 50 µl BioRad Reagent pipettiert und je 200 µl der zu bestimmenden Proteinlösung dazu gegeben. Die Proben wurden gut durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Absorption erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde mittels dem SOFTmax<sup>®</sup>PRO Programm analysiert und mit einer BSA-Eichreihe berechnet.

#### 2.2.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Methode nach Laemmli (Laemmli et al., 1970). Die Zusammensetzung der verschiedenen Polyacrylamidgele ist aus der Tabelle 2 ersichtlich. Je nach Proteinextrakt wurden zwischen 20 – 50 µg Protein in 1x Probenpuffer mit Mercaptoethanol aufgenommen und für 5 min bei 96°C erhitzt. Bei einer zu geringen Proteinkonzentration wurden die Proteine zuvor gefällt (siehe Kapitel 2.2.2.2). Die denaturierten Proteinextrakte wurden auf das Gel aufgetragen und die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel bei Raumtemperatur durchgeführt.

	<b>10% Trenngel</b>	<b>12,5% Trenngel</b>	<b>4% Sammelgel</b>
<b>30% Acrylamid/BIS</b>	2000 µl	2500 µl	335 µl
<b>Trenngelpuffer</b>	3000 µl	3000 µl	-
<b>Sammelgelpuffer</b>	-	-	1250 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	900 µl	400 µl	845 µl
<b>10% SDS-Lösung</b>	60 µl	60 µl	25 µl
<b>PER-Lösung</b>	30 µl	30 µl	20 µl
<b>TEMED</b>	12 µl	12 µl	5 µl

Tabelle 2: Rezeptur zur Herstellung der Polyacrylamidgele

#### 2.2.2.5 Western-Blot

Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA83, 0,2 µm) aufgelegt und im Transferpuffer bei einer konstanten Spannung von 15 V mit einer Stromstärke von 200 mA/Gel für 60 min übertragen. Zur Transferkontrolle wurden die Proteine auf der Membran mit 0,2% Ponceau S-Lösung angefärbt und anschließend mit 1 x TBS/0,1% Tween20<sup>®</sup> für 10 min entfärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 60 min mit Rotiblock<sup>®</sup> behandelt. Zur Identifizierung der auf der Membran übertragenen Proteine wurden diese mit einem für das gesuchte Protein spezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden ungebundene Antikörper drei Mal je 10 min mit 1 x TBS/0,1% Tween20<sup>®</sup> abgewaschen. Ein gegen den Primärantikörper gerichteter spezifischer Sekundärantikörper mit gekoppelter Peroxidase wurde anschließend für 60 min bei RT auf die

Membran gegeben. Danach wurden ungebundene Sekundärantikörper drei Mal je 10 min mit 1x TBS/0,1% Tween20<sup>®</sup> entfernt. Der Blot wurde mit ECL-Reagenz (Supersignal West Pico Kit) für 5 min inkubiert und anschließend am ChemiDoc XRS<sup>+</sup> mit Hilfe des Programms *Quantity One* 4.6.9 ausgewertet.

### **2.2.2.6 Elution gebundener Proteine von der Nitrocellulosemembran (Strippen)**

Die Elution gebundener Proteine von den Membranen wurde durchgeführt, wenn eine weitere Detektion von Proteinen mit einem spezifischen Antikörper erfolgen sollte. Dazu wurde die Membran für 30 min mit *Stripping*-Puffer (Restore<sup>™</sup> PLUS Western Blot Stripping Buffer) inkubiert. Danach wurde die Membran sorgfältig mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen und für 60 min bei RT mit Rotiblock<sup>®</sup> abgesättigt. Anschließend erfolgte die Behandlung der Membran mit einem weiteren Primärantikörper über Nacht bei 4°C (siehe Kapitel 2.2.2.5).

## **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.3.1 Genotypisierung der *Pla2g6*inaktiven Mäuse**

Bei dem verwendeten Mausmodell C57BL/6 handelt es sich um eine spontane Punktmutation im *Pla2g6*-Gen auf Chromosom 22q12-q13. Dieses Gen kodiert für die VIA iPLA<sub>2</sub>. Für die Versuche kamen ausschließlich homozygote Mutanten bzw. homozygote Wildtypen (Kontrollmaus) zum Einsatz. Zur genauen Identifizierung musste die Nachkommenschaft genotypisiert werden.

#### **2.2.3.1.1 Gewinnung genomischer DNA**

Für die Genotypisierung wurden Schwanzspitzenbiopsien verwendet. Zur Probengewinnung wurden den Mäusen 2 – 3 mm der Schwanzspitze abgeschnitten. Die Biopsien wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Präparation der genomischen DNA wurden jeweils zu den Schwanzspitzen 100 µl *Tail*-Puffer, der zusätzlich 1,25 mg/ml Protease K enthielt, zugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 50°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben 15 min bei 95°C unter Schütteln (300 rpm) gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Verwendung der genomischen DNA wurden die Proben kurz gevortext und anschließend anzentrifugiert, so dass sich die restlichen Schwanzspitzen auf dem Boden des Reaktionsgefäßes befanden. Die Proben wurden dann mit 800 µl dest. H<sub>2</sub>O verdünnt. Die genomische DNA wurde mittels RT-PCR auf die Punktmutation im *Pla2g6*-Gen analysiert. Die dazu verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Primer	Sequenz	Genotyp
Pla2g6-fv	5'-CCTGTGGAAGAGCAGAGGG-3'	Wildtyp
WT-Pla2g6-rv	5'-GGTGTCCACTTCTGCCCCA-3'	
Pla2g6-fv	5'-CCTGTGGAAGAGCAGAGGG-3'	Mutante
MT-Pla2g6-rv	5'-GGTGTCCACTTCTGCCCTA-3'	

Tabelle 3: Primer für Genotypisierung

### 2.2.3.1.2 Analyse der Mutation mittels RT-PCR

Die Amplifikation der genomischen DNA wurde mit dem *Taq* PCR Master Mix Kit durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurde jeweils 2 µl DNA, 10 µl *Taq*-Polymerase Mastermix, 4 µl *Forward*-Primer (200 nM) und 4 µl *Reverse*-Primer (200 nM) eingesetzt, so dass man auf ein Endvolumen von 20 µl kam. Die PCR wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Lid temperature	110°C		
Preheating	on		
Initial temperature	94°C	2 min	
Denaturation	94°C	25 sec	} 34 Zyklen Wiederholungen
Annealing	62.5°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	2 min	
Pause	4°C		

### 2.2.3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Für analytische Zwecke wurde die amplifizierte DNA in 2% Agarosegel (versetzt mit 2 - 3 µl Ethidiumbromid-Lösung) aufgetrennt. Nach Versetzen der Probe mit 6x Ladepuffer erfolgte die Trennung der DNA in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 100 V für 30 min. Als Längenstandard diente der GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Die Fragmentlänge betrug bei beiden Genotypen (Wildtyp bzw. Mutante) ~200 bp.

### 2.2.4 iPLA<sub>2</sub>-Aktivitätsbestimmung mittels <sup>14</sup>C-Radionuklid

Für die Ermittlung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität wurde ein synthetisches Phospholipidsubstrat (1-Palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]-Oleoyl-Phosphatidylcholin) verwendet, welches mit einem <sup>14</sup>C-Radionuklid (spezifische Aktivität 2035 MBq/mmol) markiert ist. Zur Entfernung des Lösungsmittels (Toluol/Ethanol (1:1)) wurde das Substrat vor der Verwendung mit Stickstoff begast und in 400 µl DMSO gelöst. Nach der Behandlung mit verschiedenen Substanzen wurde die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Membranfraktion von Astrozyten bzw. in



Hirnmitochondrien (RBM - *rat brain mitochondria*) radioaktiv gemessen. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mittels der Hydrolyse von 1  $\mu\text{l}$  synthetischem Phospholipidsubstrat (2,3  $\mu\text{M}$ ) in 20  $\mu\text{l}$  Membranfraktion bzw. 50  $\mu\text{l}$  RBM bei 37°C im Reaktionspuffer, bei einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$ . Die Reaktion wurde nach 60 min mit 200  $\mu\text{l}$  n-Butanol abgestoppt. Die Butanolphase wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf einer Kieselgelplatte aufgetrennt. Dazu diente ein Gemisch aus Petrolether/Ethylether/Eisessig (70/30/1 (v/v)) als mobile Phase. Da unter den Spaltprodukten der iPLA<sub>2</sub> unter anderem Ölsäure ist, wurde diese demzufolge als Standard parallel aufgetragen. In einem Exsikkator wurde die Ölsäure durch Iod Dampf sichtbar gemacht. Die farblich hervorgetretenen Flecken wurden mit einem Skalpell abgekratzt und anschließend wurde die Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszählgerät gemessen.

### 2.2.5 Bestimmung der LDH-Freisetzung

Beim Zelltod kommt es zur Auflösung der Zellmembran. Dies führt u.a. zur Freisetzung des cytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) aus den Zellen ins Medium. Die LDH setzt Laktat zu Pyruvat um, wobei NADH gebildet wird. DMEM-Medium enthält Pyruvat, was die Aktivität der LDH inhibieren würde. Astrozyten wurden in 48er Wellplatten mit einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/Well ausgesät. Nach 3 Tagen in Kultur im DMEM (mit 10% hitzeinaktiviertem FCS) wurde auf physiologischen Puffer NaHBS gewechselt und die entsprechenden Substanzen hinzugegeben. Zur Bestimmung des freigesetzten LDH wurden nach Inkubation mit BEL bzw. Rotenon 100  $\mu\text{l}$  des Puffers abgenommen und in eine 96er Wellplatte überführt (LDH<sub>Medium</sub>). Der restliche Puffer wurde entfernt und den Zellen 100  $\mu\text{l}$  einer 2%igen Tween-Lösung (in PBS) zugesetzt, um die in den Zellen vorhandene LDH frei zusetzen (LDH<sub>Zellen</sub>). Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Beiden Proben (je 100  $\mu\text{l}$  Volumen) wurden je 100  $\mu\text{l}$  des Reaktionsgemisches (Cytotoxicity Detection Kit, Roche) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch enthält ein Tetrazoliumsalz, welches durch in der LDH-Reaktion (Laktat  $\rightarrow$  Pyruvat) entstandenes NADH zu Formazan reduziert. Folglich kommt es zu einer Farbreaktion. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Bestimmung der Proben bei einer Wellenlänge von 490 nm im Mircoplate Reader. Die LDH-Freisetzung ergab sich durch folgende Formel:

$$\% \text{ LDH}_{\text{frei}} = (\text{LDH}_{\text{Medium}} / \text{LDH}_{\text{Gesamt}}) * 100\%$$

$$(\text{wobei } \text{LDH}_{\text{Gesamt}} = \text{LDH}_{\text{Medium}} + \text{LDH}_{\text{Zellen}})$$

### 2.2.6 Bestimmung von Lipidperoxidationsprodukten (TBARS)

Bei der Lipidperoxidation kommt es zur oxidativen Degradation von Lipiden, wodurch reaktive Carbonylverbindungen, wie z.B. Malondialdehyd (MDA), gebildet werden. Diese werden durch Reaktion mit Thiobarbitursäure in farbige Verbindungen (Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen = TBARS) umgewandelt und lassen sich dadurch kolorimetrisch bestimmen (TBARS Assay Kit, Cayman Chemicals) (Ohkawa et al., 1979). Das Protokoll für die Bestimmung der Lipidperoxidation erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Die Astrozyten wurden mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro 60 mm Schale in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FCS ausgesät und nach 3 Tagen in Kultur auf serumfreies Medium gewechselt. Nach der Behandlung mit Rotenon (6 h) bzw. R-/S-BEL (30 min) wurden aus den Astrozyten Zelllysate (siehe Kapitel 2.2.2.1) hergestellt. Jeweils 100  $\mu$ l der Lysate wurden mit 100  $\mu$ l SDS *Lysis Solution* versetzt, vorsichtig geschüttelt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Proben wurden jeweils 250  $\mu$ l TBA-Reagent (pH 3,5) dazugegeben. Nach der Inkubation für 60 min bei 95°C wurden die Proben auf Eis gestellt und anschließend für 15 min bei 1100 xg zentrifugiert. Im Anschluss wurden 200  $\mu$ l Überstand (Doppelbestimmung) photometrisch bei einer Wellenlänge von 532 nm gemessen. Zur Berechnung der Lipidperoxidation diente eine MDA-Standardkurve, wobei der lineare Bereich zwischen 0,98 und 3,91  $\mu$ M MDA lag. Der Gehalt an TBARS wurde in Prozent zur Kontrolle angegeben.

### 2.2.7 Bestimmung der ROS-Produktion mit der DCF-DA Methode

Die Messung der ROS-Produktion in Astrozyten erfolgte mit dem membran-permeablen Reagens 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat (DCF-DA). Nach Aufnahme durch die Zellen wird der DCF-DA-Ester durch cytosolische Hydrolasen gespalten. Das so gebildete 2',7'-Dichlorfluorescein (DCFH<sub>2</sub>) wird durch ROS zu dem fluoreszierenden Farbstoff 2,7-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert (Rosenkranz et al., 1992). Die Astrozyten wurden mit einer Dichte von  $6 \times 10^4$ /Well auf schwarze 96er Wellplatten in DMEM mit 10% FCS ausgesät und nach 3 Tagen in Kultur auf NaHBS (physiologischer Puffer) gewechselt. Nach 30-minütiger Behandlung mit R- bzw. S-BEL (5  $\mu$ M) bei 37°C wurden die Zellen mit NaHBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25  $\mu$ M DCF-DA in 200  $\mu$ l NaHBS/Well. Die Fluoreszenzintensität von DCF wurde alle 20 min in einem Zeitraum von 6 h gemessen. Die Messung erfolgte in einem ELISA-Reader bei 504 nm Anregungswellenlänge und einer Emission von 524 nm.

### 2.2.8 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) in Astrozyten

Für die *in situ*-Messung des mitochondrialen Potentials in Astrozyten wurde JC-1, ein lipophiler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt (Cossarizza et al., 1993). In intakten Zellen reichert sich JC-1 nach Permeation der Plasmamembran, Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ) - abhängig im mitochondrialen Matrixraum an und bildet dort rot fluoreszierende Aggregate (Anregungswellenlänge 560 nm, Emissionswellenlänge 595 nm). Da bei deenergetisierten, z.B. apoptotischen Zellen, JC-1 von Mitochondrien nicht akkumuliert wird, bleibt JC-1 als grün fluoreszierendes Monomer (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 535 nm) im Cytoplasma liegen. Für die Analyse wurden Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  in 60 mm Schalen ausgesät. Nach 3 Tagen in Kultur im serumhaltigen Medium (DMEM mit 10% FCS) wurde auf serumfreies Medium (DMEM, ohne FCS) gewechselt und die entsprechenden Substanzen wurden hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen für 5 min mit Trypsin/EDTA behandelt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend zentrifugiert (400 xg, 5 min, RT). Das Pellet wurde für 15 min mit 10  $\mu$ l der JC-1 *Staining Solution* (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit, Cayman) behandelt und anschließend die Fluoreszenz im ELISA-Reader gemessen. Für die Analyse des Membranpotentials wurde der Quotient R (485/535) berechnet. Die Reduktion des Quotienten zeigt eine Depolarisierung der inneren mitochondrialen Membran (IMM) der Mitochondrien an.

### 2.2.9 Isolation von Mitochondrien

#### 2.2.9.1 Isolation von Mitochondrien aus Lebergewebe

Die Ratten wurden dekapitiert, der Bauchraum geöffnet, die Leber entnommen und in 250 mM Saccharose-Lösung (pH 7,4) überführt. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Leber wurde in kleine Stücke geschnitten und diese in der Saccharose-Lösung gewaschen, um Blutrückstände zu entfernen. Die gewaschenen Gewebestücke wurden in EDTA-haltiger (1 mM) Saccharose-Lösung (plus 0,1% BSA) überführt und mit einem Potter-Elvhjem homogenisiert. Die so erhaltene Suspension wurde bei 600 xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte (4 min bei 5100 xg, 2 min bei 12300 xg), nach denen das Pellet jeweils in EDTA-freier Saccharose-Lösung resuspendiert und per Hand in einem Dounce-Homogenisator (*loose-fitting*) homogenisiert wurde. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 12300 xg (10 min) erfolgte die Resuspension des Pellets in 4 ml 250 mM Saccharose-Lösung (pH 7,4). Die Mitochondrien wurden auf Eis aufbewahrt und innerhalb

von 8 Stunden für Experimente verwendet. Die durchschnittliche Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension lag bei 25 – 30 mg/ml.

### **2.2.9.2 Isolation von Mitochondrien aus Hirngewebe**

Nach der Dekapitation der Ratten wurde das Gehirn zügig entnommen und in eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Blutgefäße wurden entfernt, das Gehirn in kleine Stücke geschnitten und mittels Potter-Elvehjem (8 Hübe bei 500 bis 700 rpm) in Isolationsmedium (10 ml/g Gewebe) homogenisiert. Die Suspension wurde bei 2000 xg für 4 min zentrifugiert und der Überstand bis zur Weiterverwendung auf Eis gestellt. Das erhaltene Pellet wurde in Isolationsmedium (5 ml/g Gewebe) resuspendiert und nochmals mit dem Potter homogenisiert (8 Hübe bei 500 bis 700 rpm). Die erhaltene Suspension wurde für 4 min bei 2000 xg zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit dem Überstand der 1. Zentrifugation zusammengeführt und zentrifugiert (12500 xg, 12 min, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation des Überstandes bei 12500 xg (12 min) wurde das Pellet in 15 ml Waschpuffer aufgenommen und im Dounce-Homogenisator (*loose-fitting*) homogenisiert und anschließend zentrifugiert (12500 xg, 12 min, 4°C). Dieser Waschschrift wurde noch zwei Mal durchgeführt. Die gewaschenen Hirnmitochondrien (Roh-Mitochondrien) wurden in Waschpuffer (0,2 ml/g Gewebe) resuspendiert. Die Hirnmitochondrien wurden innerhalb von 4 Stunden für Experimente verwendet. Die Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension lag bei 20-25 mg/ml. Die Mitochondrienpräparation aus Maushirn erfolgte analog der Präparation aus Rattenhirn.

### **2.2.9.3 Isolation von Mitochondrien aus Hirngewebe mit Percoll-Gradient**

Die Roh-Mitochondrien (Ratte) wurden in synaptische und nicht-synaptische Mitochondrien durch einen Percoll-Gradienten aufgetrennt (Azarashvili et al., 2009). Die Hirnmitochondrien wurden nach der ersten Zentrifugation bei 12500 xg (siehe Kapitel 2.2.9.2) in 3% Percoll-Lösung aufgenommen und auf einen Gradienten von 24%, 15% und 10% aufgelegt und zentrifugiert (36600 xg, 10 min, 4°C). Im Pellet befanden sich die nicht-synaptischen Mitochondrien und zwischen 15% und 24% Percoll befanden sich die Bande der Synaptosomen. Die nicht-synaptischen Mitochondrien wurden gewaschen (9800 xg, 10 min, 4°C) und in 200 µl Waschpuffer aufgenommen. Zur Gewinnung der synaptosomalen Mitochondrien wurden die Synaptosomen in einem hypotonen Puffer (6 mM TRIS/HCl; pH 8,1) homogenisiert und die synaptosomale Membran aufgebrochen. Das Homogenat wurde zentrifugiert (11800 xg, 10 min, 4°C), das gewonnene Pellet in

3% Percoll resuspendiert und auf einen Percoll-Gradient von 14% und 7% aufgelegt (113000 xg, 30 min, 4°C). Das entstandene Pellet (synaptische Mitochondrien) wurde gewaschen (9800 xg, 10 min, 4°C) und anschließend in ca. 200 µl Waschlösung aufgenommen. Die Proteinkonzentrationen beider gewonnenen Mitochondrienfraktionen lagen etwa bei einem Viertel der eingesetzten Roh-Mitochondrien. Tabelle 4 zeigt die Verdünnungsansätze der Percoll-Gradienten.

Percoll-Gradient	Percoll [µl]	Isolationspuffer [µl]
3%	90	2910
7%	210	2790
10%	300	2700
14%	420	2580
15%	450	2550
24%	960	2040

Tabelle 4: Ansatz der Verdünnungen der Percoll-Gradienten

### 2.2.10 Messung des mitochondrialen Membranpotentials in Rattenhirnmitochondrien

Zur Bestimmung des  $\Delta\psi_m$  wurde der Fluoreszenzfarbstoff Safranin O, ein lipophiles, ebenes, einfach-positiv geladenes organisches Kation eingesetzt, das sich  $\Delta\psi_m$ -abhängig im mitochondrialen Matrixraum anreichert (Akerman and Wikström, 1976). Durch die Konzentrierung von Safranin O im Matrixraum von energetisierten Mitochondrien kommt es zur Aggregation des Fluoreszenzfarbstoffs und damit zur Fluoreszenzniedrigung (*Quenching*). Bei einer Depolarisierung der mitochondrialen Innenmembran wird Safranin O wieder aus dem Matrixraum freigesetzt, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Safranin O wurde in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt. Die Anregung erfolgte bei 485 nm, die Intensität des emittierten Lichtes wurde bei 590 nm gemessen. Gestartet wurde das Experiment in Abwesenheit von Mitochondrien, um die Basislinie zu bestimmen. 30 s nach Beginn des Versuchs wurden Mitochondrien (0,5 mg/ml) dazugegeben. Der Polarisationszustand wurde durch die mehrmalige Zugabe von 50 nM FCCP bis zum kompletten Zusammenbruch der Mitochondrien ermittelt. Eine Beispielkurve wird in Kapitel 3.2.4 (Abb. 26) gezeigt.

### 2.2.11 Messung der mitochondrialen $Ca^{2+}$ -Retentionskapazität

Energetisierte Mitochondrien haben die Eigenschaft extrazelluläres  $Ca^{2+}$  im Matrixraum zu akkumulieren. Diese sogenannte  $Ca^{2+}$ -Retentionskapazität (CRC -  $Ca^{2+}$ -Retention Capacity) ist ein quantitatives Maß, das die Neigung der Mitochondrien zur mPTP beschreibt. Bei der mPTP bricht das  $\Delta\psi_m$  zusammen, wodurch  $Ca^{2+}$  in den extramitochondrialen Raum abgegeben wird. Die Bestimmung des CRC erfolgte anhand der

extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit dem nicht-membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff CaGreen-5N (100  $\mu\text{M}$ ). Dieser Farbstoff (Anregungswellenlänge 506 nm, Emissionswellenlänge 532 nm) komplexiert  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, wobei sich die Intensität des emittierten Lichtes erhöht. Bei der Bestimmung des CRC wurden den Hirnmitochondrien schrittweise jeweils 20 nmol  $\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$  zugegeben. Solange das zugesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  von den Mitochondrien aufgenommen wird, bleibt die Fluoreszenz des CaGreen-5N praktisch gleich. Nach Überschreitung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Retentionskapazität wird ein plötzlicher Fluoreszenzanstieg beobachtet. Eine Beispielkurve wird in Kapitel 3.2.5 (Abb. 27) gezeigt.

### 2.2.12 Photometrische Bestimmung der Mitochondrienschwellung

Beim Eintritt der mPTP bricht das  $\Delta\psi_m$  zusammen und das  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Matrix wird freigesetzt. Die mPTP verursacht aber auch eine Schwellung der Mitochondrien. Durch die Porenöffnung in der Innenmembran und den vorhandenen kolloidosmotischen Druck der Matrixproteine kommt es zum Einstrom von Wasser in die mitochondriale Matrix, wodurch die Mitochondrien schwellen (Gunter and Pfeiffer, 1990). Durch diese Volumenvergrößerung verringert sich die Streuung des sichtbaren Lichtes an den Mitochondrien, was photometrisch als Abnahme der scheinbaren Extinction gemessen wird. Die mitochondriale Schwellung wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm mit einem ELISA-Reader bestimmt. Die Öffnung der mPTP wurde durch die akute Zugabe von 800 nmol  $\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$  Hirnmitochondrien initiiert. Zwischen den Messungen erfolgte ein Schütteln der Wellplatte, um ein Absinken der Mitochondrien und die damit verbundene Verfälschung der Messergebnisse zu minimieren. Die verwendete Proteinkonzentration betrug 0,5 mg/ml bei einem Volumen von 250  $\mu\text{l}$ /Well in 96er Wellplatten. Für die Auswertung wurde der erste ermittelte Extinktionswert nach Zugabe der Mitochondrien auf 1 normiert ( $A_0$ ) und alle weiteren Werte als Veränderungen relativ zu diesem Basalwert ausgedrückt. Die Kurven werden in Kapitel 3.2.7 (Abb. 29) aufgeführt.

### 2.2.13 Polarographische Respirationsmessung

Bei der polarographischen Atmungsmessung wird die Sauerstoffkonzentration im Inkubationsmedium von isolierten Mitochondrien elektrochemisch mit einer Sauerstoffelektrode (CLARK-Elektrode) gemessen (Clark et al., 1953). Das Prinzip der Sauerstoffkonzentrationsmessung besteht in der Messung des elektrischen Stroms, der bei der Reduktion des Sauerstoffs an der Kathode entsteht. Die Elektrode besteht aus einer Referenzelektrode und einer Platinkathode, die mit einer Sauerstoff-permeablen Teflonmembran überzogen ist. Zwischen dem Platindraht und der Referenzelektrode ist eine

Spannung von 700 mV angelegt. Bei der Abgabe von Elektronen wird der Sauerstoff durch die Platinelektrode zu Wasser reduziert und dadurch kommt es zu einem Stromfluss (Stromstärke), der mit einem sogenannten Polarographen gemessen wird. Die Stromstärke ist zur Sauerstoffkonzentration direkt proportional. Der zeitliche Verlauf der Stromstärke wird digital aufgezeichnet.

Die Messkammer wurde mit einem Volumen von 1,5 ml Hirnkubationsmedium gefüllt. Diese Kammer wurde zunächst auf 25°C vorgewärmt und belüftet. Die Sauerstoffkonzentration im Inkubationsmedium betrug 230  $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ . Die Mitochondrien wurden mit den entsprechenden Substanzen 20 min bei 25°C behandelt. Nach der Zugabe von 1 mg/ml Mitochondrien und den Substraten (5 mM Malat und 5 mM Glutamat) wurde die Messzelle luftblasenfrei verschlossen, die Messung gestartet und die Ruheatmung (State 4) aufgezeichnet. Nach der Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  ADP (2 mmol/l) wurde die phosphorylierende Atmung (State 3) bestimmt, die nach vollständiger Phosphorylierung von ADP zu ATP wieder in die State 4-Atmung überging (siehe Kapitel 1.3, Tabelle 1).

### **2.2.14 Beurteilung der reduktiven Atmungskettenkapazität mittels des MTT-Assays**

Zur Beurteilung der mitochondrialen Atmungskette wurde die Reduktion des synthetischen Elektronenakzeptors MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) bestimmt (Liu et al., 1997). Dabei wird MTT zu einem blauen Farbstoff reduziert. Diese Reduktion erfolgt durch eine nicht-enzymatische Reaktion durch die Ein-Elektronenübertragung innerhalb der Atmungskette.

Im Versuch wurden die RBM (0,1 mg/ml) in 1 ml eiskaltem Inkubationsmedium (versetzt mit 5 mM/5 mM Glutamat/Malat) suspendiert und in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von verschiedenen DHA-Konzentrationen (10, 20 und 100 nmol/mg Protein) für 5 min vorinkubiert. Danach wurde den Ansätzen MTT (0,1 mg/ml) zugesetzt und für 10 min bei 25°C unter Schütteln erwärmt. In separaten Inkubationsansätzen wurde der Einfluss von BEL auf die mitochondriale MTT-Reduktion bestimmt. Dazu wurden die suspendierten RBM mit BEL für 20 min bei 25°C inkubiert. Zur Extraktion des reduzierten MTT aus dem Pellet wurde dieses in 1 ml reinem EtOH aufgenommen, zentrifugiert und im Anschluss der mitochondrienfreie Überstand photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen (ELISA-Readers).

### **2.2.15 Messung der NADH-Cytochrom c-Reduktase Aktivität (Komplex I/III)**

Der NADH-Cytochrom c-Reduktase-Komplex katalysiert innerhalb der Atmungskette den Elektronenfluss vom NADH (Komplex I) zum oxidierten Cytochrom c (Komplex III).

Zur Bestimmung der Aktivität der NADH-Cytochrom c-Reduktase wurden die Mitochondrien durch 3-maliges Schockfrieren/Auftauen permeabilisiert. 0,05 mg/ml Mitochondrien wurden in 1 ml Inkubationsmedium (20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2, 10  $\mu\text{M}$  EDTA, 2 mM KCN, 0,06% ( $^w/v$ ) Ferricytochrom c) in einer Küvette suspendiert. Die Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  wurde durch die Zugabe von 10 mM NADH initiiert. Mit Hilfe eines ELISA-Readers (Microplate Reader) wurde die Absorption von Cytochrom c ( $\text{Fe}^{2+}$ ) bei 550 nm bei 25°C für 5 min erfasst.

### **2.2.16 Messung der Cytochrom c-Oxidase (COX)**

Für die Cytochrom c-Oxidase (COX)-Aktivitätsmessung wurden die RBM durch 3-maliges Schockfrieren/Auftauen permeabilisiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RBM zu 950  $\mu\text{l}$  Assay Puffer (10 mM TRIS/HCl pH 7,0; 120 mM KCl) zugegeben. Die COX-Aktivität wurde unter Verwendung eines ELISA-Readers (Microplate Reader) als Absorptionsänderung bei 550 nm (25°C) gemessen. Die Initiierung erfolgte durch die Applikation von 50  $\mu\text{l}$  reduziertem 220  $\mu\text{M}$  Cytochrom c (Ferrocytochrom c). Durch die Zugabe von Dithiothreitol wurde das Cytochrom c reduziert.

### **2.2.17 Bestimmung der $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung durch isolierte Hirnmitochondrien**

Für die Bestimmung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung isolierter Hirnmitochondrien wurde das Indikatorsystem Amplex Red/Peroxidase eingesetzt (Votyakova and Reynolds, 2004). Die Freisetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verursacht die Peroxidase-katalysierte Oxidation von Amplex Red zu Resorufin, welches bei einer Wellenlänge von 560 nm angeregt wird. Die Fluoreszenz wurde bei 590 nm gemessen. Für die Messung wurden 0,2 mg/ml bzw. 0,4 mg/ml RBM in eine Küvette gegeben, die 1 ml Hirninkubationsmedium, als Zusätze Amplex Red (5  $\mu\text{M}$ ), Peroxidase (2 U/ml) und Succinat (5 mM) bzw. Malat/Glutamat (5 mM/5 mM) enthielt. Die Messung erfolgte mit dem PerkinElmer Luminescence Spectrophotometer LS50B. Das Fluoreszenzsignal des Resorufins wurde mit einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Verdünnung bekannter Konzentrationen (bis zu 750 pmol) kalibriert.

### **2.2.18 Bestimmung von Glutathion**

Die Messung von mitochondrialem Glutathion (GSH) erfolgte mittels eines gekoppelten enzymatisch-optischen Tests (Jocelyn and Cronshaw, 1985). Dabei wird Glutathion mit Ellmans Reagenz (DTNB - 2,2'-dinitro-5,5'-dithiobenzoessäure) zu einem gemischten Disulfid (GS-TNB) umgesetzt. Bei dieser Reaktion entsteht das gelb-farbige Thionitrobenzoatanion (TNB), welches ein Absorptionsmaximum bei 412 nm aufweist. Der katalytische Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch GSH zu  $\text{H}_2\text{O}$  wird durch die Enzyme



Glutathion S-Transferase (GST) und Glutathionperoxidase katalysiert (Townsend et al., 2003). Für die Bestimmung des GSH wurden 5 mg/ml RBM mit verschiedenen Konzentrationen Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) für 2 min bzw. verschiedene Konzentrationen BEL bei 25°C behandelt. Zur Entfernung von störenden Proteinen wurden die behandelten Mitochondrien mit 20%iger 5-Sulfosalicylsäure versetzt und zentrifugiert (8000 xg, 5 min, RT). 80 µl wurden sofort für die Bestimmung des Gesamt-Glutathions verwendet. Die GSH-Standardreihe wurde über den ganzen Versuch ebenso behandelt wie die Proben. Die Reaktionslösung bestand aus 860 µl Reaktionspuffer (200 mM TRIS, 0,1 mM EDTA pH 7,3), 80 µl Probe bzw. GSH und 60 µl DTNB (5 mM). Die Bestimmung des Gesamt-Glutathion erfolgte in einer 1 ml Küvette im PerkinElmer Luminescence Spectrophotometer LS50B bei einer Wellenlänge von 412 nm. Die quantitative Analyse des GSH erfolgte anhand einer GSH-Standardkurve und wurde auf den Proteingehalt der Proben normiert.

### **2.2.19 Statistische Auswertung der Daten**

Die Analyse und Darstellung der Daten erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel und SigmaPlot. Alle Experimente wurden aus mindestens 3 unabhängigen Präparationen zusammengefasst und stellen die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) dar. Die Signifikanz zwischen zwei Behandlungsgruppen wurde mittels *students t*-Test bestimmt. Wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% betrug ( $p < 0,05$ ) galten die Unterschiede als statistisch signifikant.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 iPLA<sub>2</sub> in Astrozyten und deren physiologische Bedeutung bei ROS-Bildung und Zelltod

Mehrere Studien weisen auf eine antioxidative Funktion der Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen Phospholipasen A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) im ZNS hin, wie z.B. Kinsey et al., 2008. Aus diesem Grund wurden zuerst die Folgen der iPLA<sub>2</sub>-Hemmung auf die ROS-Bildung und eine mögliche Lipidperoxidation in primären Zellkulturen von Astrozyten untersucht.

In den nachfolgenden Experimenten wurden die Astrozyten, wenn nicht anders beschrieben, mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon im physiologischen Puffer (NaHBS) für 6 Stunden inkubiert. Rotenon blockiert die mitochondriale Atmungskette am Komplex I und verhindert somit die Elektronenweiterleitung zum Komplex III. In der Folge werden die Redoxcarrier im Komplex I stärker reduziert, wodurch der Ein-Elektronenübergang auf molekularen O<sub>2</sub> begünstigt wird, was zur verstärkten ROS-Bildung führt. 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit mit Rotenon wurde R-BEL bzw. S-BEL zugesetzt (Abb. 9).

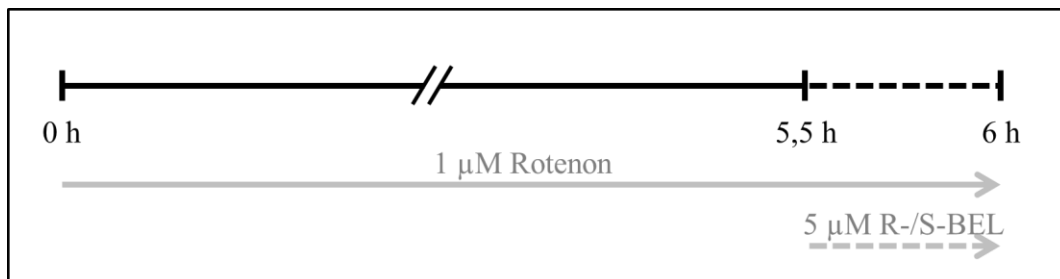


Abbildung 9: Standardprotokoll für die Behandlung der Astrozyten

Die Astrozyten wurden 6 h mit Rotenon (1 µM) behandelt. Nach 5,5 h erfolgte die zusätzliche Applikation von R-BEL bzw. S-BEL für weitere 30 min. Nach der Behandlung wurden die Zellen für analytische Zwecke verwendet.

##### 3.1.1 Aktivität von iPLA<sub>2</sub> in Astrozyten

Zur Bestimmung der BEL-sensitiven iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Membranfraktion der Astrozyten wurden die Isoformen der iPLA<sub>2</sub>, VIA und VIB, pharmakologisch mit Bromoenollacton (BEL), einem selektiven iPLA<sub>2</sub>-Inhibitor, gehemmt. Die VIA iPLA<sub>2</sub> wird von S-BEL (S-Enantiomer von BEL) und die VIB iPLA<sub>2</sub> von R-BEL (R-Enantiomer von BEL) inhibiert (Jenkins et al., 2002). Der IC<sub>50</sub>-Wert für S-BEL liegt bei 0,5 – 5 µM und für R-BEL bei 2 – 2,5 µM in Abhängigkeit von Zellen und Gewebe (Hooks and Cumming, 2008). Die Zellen wurden für 30 min mit R-BEL oder S-BEL behandelt. Nach der

Behandlung wurde die Membranfraktion aus den Zellen präpariert und die Aktivität des Enzyms wurde durch die Hydrolyse eines synthetischen, radioaktiv markierten Phospholipidsubstrates (1-Palmitoyl-2-[1-<sup>14</sup>C]-Oleoyl-Phosphatidylcholin) bestimmt. Im Vergleich zum Kontrollwert (Abbildung 10 Applikation von 0,1% EtOH: 53,5 ± 5,1 pmol/[min\*mg Protein]) verursachte die pharmakologische Hemmung eine 50%ige Reduzierung der BEL-sensitiven iPLA<sub>2</sub>-Aktivität beider Isoformen mit den jeweiligen BEL-Enantiomeren (Abb. 10 VIB iPLA<sub>2</sub> und VIA iPLA<sub>2</sub>-Aktivität nach Applikation von 5 µM: R-BEL 22,8 pmol/[min\*mg Protein] ± 1,9 bzw. S-BEL 21 pmol/[min\*mg Protein] ± 1,7). Die Kontrolle signalisiert die Gesamt-PLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Membranfraktion der Astrozyten (Abb. 10, erster Balken). Um den Zusammenhang zwischen der PLA<sub>2</sub>- bzw. BEL-sensitiven iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und oxidativem Stress zu untersuchen, wurde den Zellen zusätzlich Rotenon appliziert. In Abweichung von dem in Abbildung 9 beschriebenen Schema wurden die Astrozyten wie folgt behandelt: Nach einem Behandlungszeitraum von lediglich 30 min mit Rotenon erfolgte anschließend die zusätzliche Applikation der spezifischen iPLA<sub>2</sub>-Inhibitoren (R-/S-BEL) für weitere 30 min Inkubation.

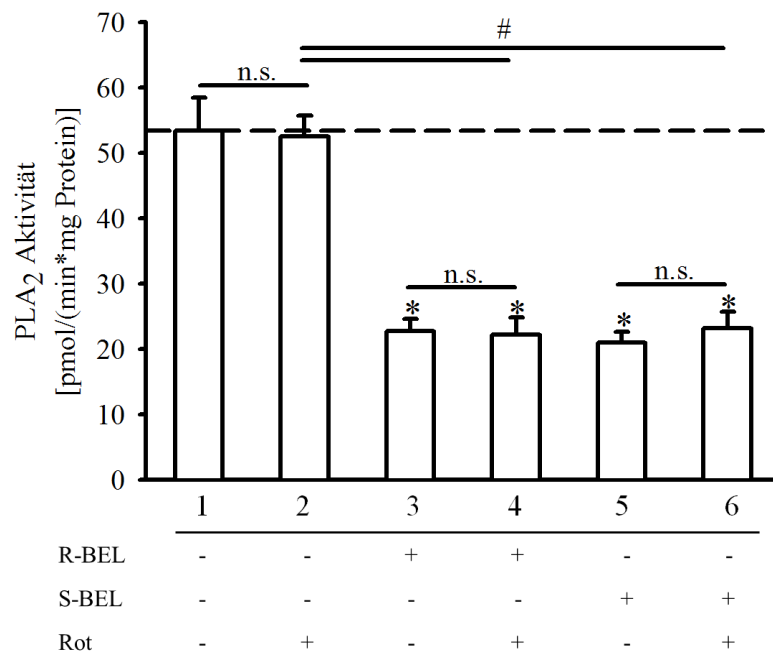


Abbildung 10: PLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Membranfraktion von Astrozyten

Vor der Isolierung der Membranfraktion aus Astrozyten wurden die Zellen für 60 min mit 1 µM Rotenon bei 37°C unter serumfreien Bedingungen (DMEM) inkubiert. Die Zugabe von 5 µM R-/S-BEL erfolgte nach 30 min Behandlungszeit mit Rotenon für weitere 30 min. Die gestrichelte Linie beschreibt die PLA<sub>2</sub>-Aktivität unter Kontrollbedingungen (0,1 % EtOH (v/v)). Die Messung der BEL-sensitiven iPLA<sub>2</sub>-Aktivität wurde in Materialien und Methoden beschrieben. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Astrozytenpräparationen ± SEM. (\*P < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle, #P < 0,05 Rot vs. R-/S-BEL + Rot, n.s. nicht signifikant).

Es stellte sich heraus, dass die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität durch Rotenon-induzierten oxidativen Stress nicht beeinflusst wird (Abb. 10 VIB iPLA<sub>2</sub> und VIA iPLA<sub>2</sub> Aktivität nach Applikation von 1 µM Rotenon und 5 µM: R-BEL 22,2 pmol/[min\*mg Protein] ± 2,6 bzw. S-BEL 23,2 pmol/[min\*mg Protein] ± 2,5). Die Behandlung mit Rotenon allein hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die PLA<sub>2</sub>-Aktivität (Abb. 10 PLA<sub>2</sub> Aktivität nach Applikation von 1 µM Rotenon 52,6 pmol/[min\*mg Protein] ± 3,2). Bei der radioaktiven Aktivitätsmessung der BEL-sensitiven iPLA<sub>2</sub> in der Astrozyten-Membranfraktion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden iPLA<sub>2</sub>-Isoformen festgestellt werden.

### 3.1.2 Einfluss der iPLA<sub>2</sub> auf die zelluläre ROS-Produktion

Zur Bestimmung der Wirkung von iPLA<sub>2</sub> auf die ROS-Produktion der Astrozyten wurde das ROS-sensitive, zellmembrangängige DCF-DA eingesetzt.

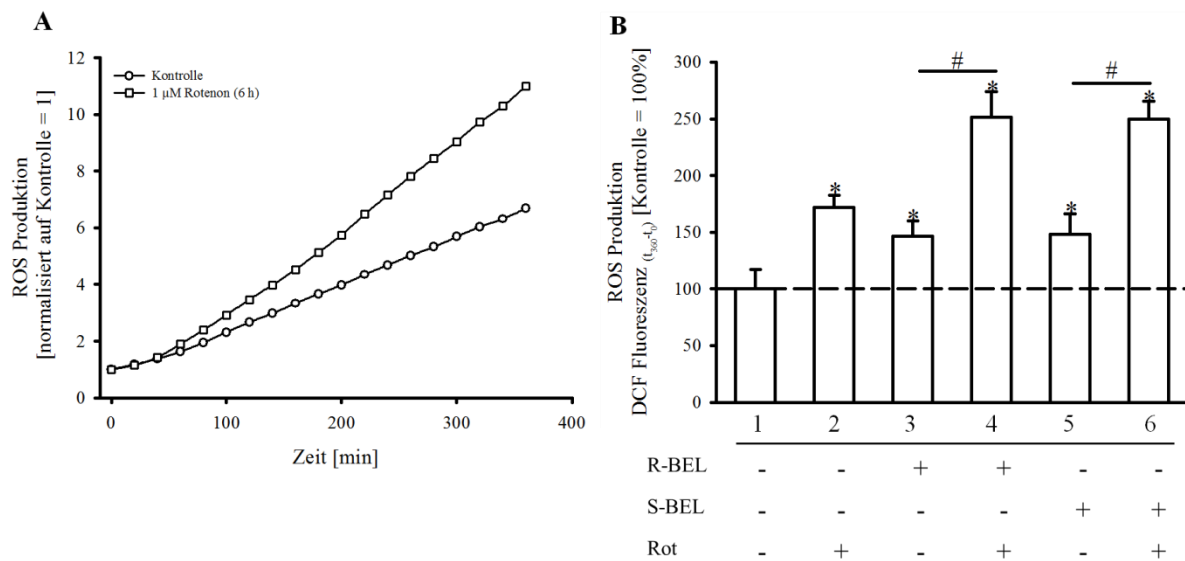


Abbildung 11: ROS-Bildung nach der Behandlung mit R- und S-BEL

Die Bildung von ROS wurde durch die DCF Fluoreszenz ermittelt. Die Astrozyten wurden für 30 min mit R- bzw. S-BEL (5 µM) behandelt und anschließend mit NaHBS gewaschen. Nach der Inkubation wurde DCF-DA (25 µM) entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit von Rotenon (1 µM) zu den Zellen appliziert. Die Fluoreszenzintensität von DCF wurde alle 20 min über 6 h gemessen. **A** Repräsentative Beispielkurven der ROS-Produktion in einem kinetischen Zeitverlauf über 6 h mit Rotenon (Vierecke) im Vergleich zur Kontrolle (Kreise). **B** Die ROS-Produktion berechnet durch die DCF Fluoreszenzintensitätsdifferenz (t<sub>360 sec</sub> - t<sub>0 sec</sub>). Die gestrichelte Linie zeigt die ROS-Produktion (in %) unter Kontrollbedingungen (0,1% EtOH (v/v)). Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Astrozytenpräparationen ± SEM. (\*P < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle, #P < 0,05 R-/S-BEL vs. R-/S-BEL + Rot).

Die Inkubation der Astrozyten mit den beiden BEL-Enantiomeren verursachte jeweils eine ca. 50%ige Erhöhung der ROS-Produktion im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 11B zeigt die Zugabe von 5 µM R-BEL: Zunahme von 46 % ± 13,7 und 5 µM S – BEL: Zunahme von

48 %  $\pm$  18,2). Bei alleiniger Rotenon-Anwendung erhöhte sich der ROS-Anstieg um 71%  $\pm$  10,9 (Abb. 11B, zweiter Balken). Unter der pharmakologischen Inhibierung der iPLA<sub>2</sub>-Isoformen mit den BEL-Enantiomeren verursachte Rotenon einen noch stärkeren Anstieg (Abb. 11B Applikation von 1  $\mu$ M Rotenon plus 5  $\mu$ M: R-BEL Zunahme von 151%  $\pm$  22,4 bzw. plus S-BEL Zunahme von 149%  $\pm$  15,8).

Die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität scheint eine wichtige Rolle bei der Bildung von ROS zu spielen. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isoformen des Enzyms festgestellt werden.

### 3.1.3 Wirkung der iPLA<sub>2</sub> auf die Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation ist ein Indikator der Zellschädigung durch oxidativen Stress. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt die Wirkung der iPLA<sub>2</sub> auf die Lipidperoxidation untersucht werden. Dazu wurde zuerst der Gehalt der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) kolorimetrisch bestimmt. Als Reaktionsprodukte der Lipidperoxidation zeigen die TBARS die Konzentration von reaktiven Carbonylverbindungen an.

Zur Bestimmung des TBARS-Gehaltes in Astrozyten wurden diese für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen R-BEL und S-BEL inkubiert. Dabei ergab sich, dass die Hemmung von VIB iPLA<sub>2</sub> bei den Konzentrationen von 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M R-BEL die TBARS-Konzentration signifikant erhöht war (Abb. 12 Applikation von R-BEL: 2,5  $\mu$ M: Zunahme von 20%  $\pm$  13; 5  $\mu$ M: Zunahme von 28%  $\pm$  10,5 und 10  $\mu$ M: Zunahme von 33%  $\pm$  8,7). Unter diesen Bedingungen verstärkt Rotenon (6 h) die Lipidperoxidation (Abb. 12 1  $\mu$ M Rotenon: 2,5  $\mu$ M R-BEL Zunahme von 164%  $\pm$  9,2; 5  $\mu$ M R-BEL Zunahme von 176%  $\pm$  7,2 und 10  $\mu$ M R-BEL Zunahme von 184%  $\pm$  10,7). Dagegen verursachte die Zugabe von Rotenon bei einer Inkubation von nur 30 min keinen weiteren Anstieg der TBARS Konzentration im Vergleich zu R-BEL ohne Rotenon-Applikation (Abb. 12 Applikation von 1  $\mu$ M Rotenon (30 min): 2,5  $\mu$ M R-BEL: Zunahme von 21%  $\pm$  11,3; 5  $\mu$ M R-BEL: Zunahme von 29%  $\pm$  7,6 und 10  $\mu$ M R-BEL: Zunahme von 35%  $\pm$  13). Im Vergleich dazu konnte bei der VIA iPLA<sub>2</sub> ausschließlich ein signifikanter Anstieg der TBARS Konzentration bei 10  $\mu$ M S-BEL festgestellt werden (Zunahme von 18%  $\pm$  9,5). Auch in diesen Experimenten verursachte Rotenon keine erhöhte Lipidperoxidation im Vergleich zu S-BEL ohne Rotenon (Abb. 12 Applikation von 1  $\mu$ M Rotenon (30 min): 2,5  $\mu$ M S-BEL: Zunahme von 10%  $\pm$  9,3; 5  $\mu$ M S-BEL: Zunahme von 18%  $\pm$  12,8 und 10  $\mu$ M S-BEL: Zunahme von 20%  $\pm$  11). Hingegen bewirkte die Langzeitinkubation (6 h) wiederum einen signifikanten Anstieg der TBARS Konzentration (Abb. 12 Applikation von 1  $\mu$ M Rotenon (6 h): 2,5  $\mu$ M S-BEL

Zunahme von  $119\% \pm 15,9$ ;  $5 \mu\text{M}$  S-BEL Zunahme von  $148\% \pm 15,2$  und  $10 \mu\text{M}$  S-BEL: Zunahme von  $171\% \pm 12,4$ ). Die pharmakologische Hemmung der VIB iPLA<sub>2</sub> mit R-BEL verursachte einen verstärkten signifikanten Lipidperoxidationsprozess im Vergleich zur Hemmung der VIA iPLA<sub>2</sub> mit S-BEL. Die alleinige Rotenon-Applikation bei einer Zeitdauer von 6 h ohne anschließende Hemmung der iPLA<sub>2</sub>-Isoformen verursachte im Vergleich einen geringeren Anstieg der TBARS Konzentration in Astrozyten (Zunahme von  $80\% \pm 10,1$ ). Allerdings konnte bei einer Kurzzeitinkubation von 30 min mit Rotenon lediglich ein ROS-Anstieg um  $13\% \pm 10$  im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 12 Kontrolle, hellgraue Balken).

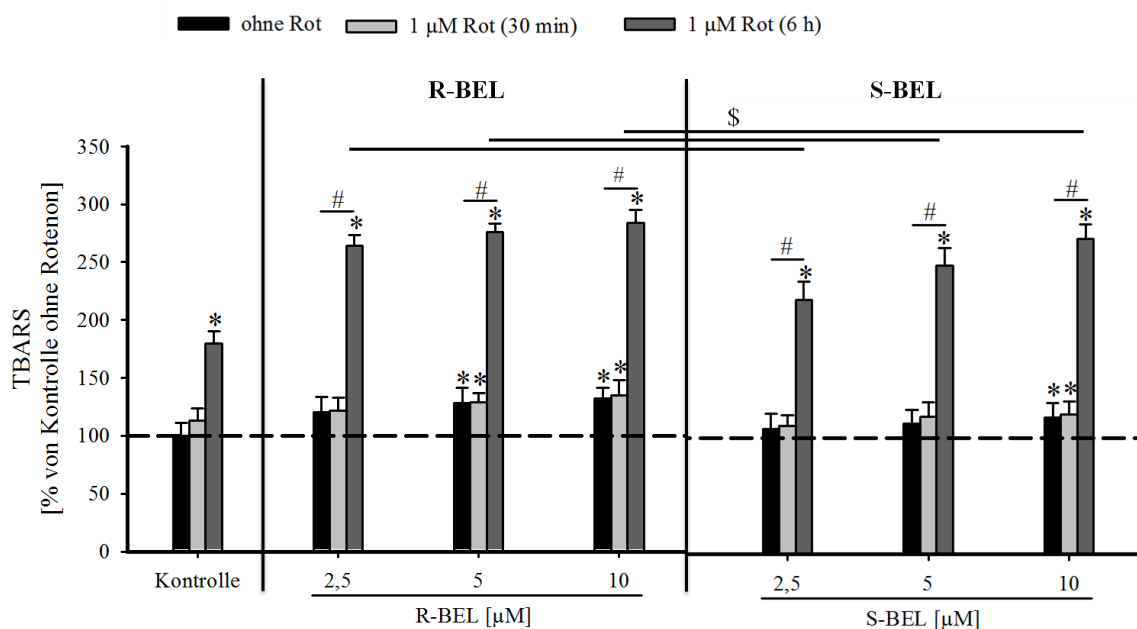


Abbildung 12: Einfluss von R-BEL und S-BEL auf die Lipidperoxidation

Messung der Konzentration von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) nach Behandlung mit Rotenon und R- bzw. S-BEL in primären Astrozyten. Die Astrozyten wurden 30 min mit  $1 \mu\text{M}$  Rotenon in Abwesenheit (hellgraue Balken) und in Kombination mit R-BEL bzw. mit S-BEL (je  $5 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Zur weiteren Untersuchung einer Langzeitwirkung von Rotenon wurden die Zellen für 6 h mit Rotenon ( $1 \mu\text{M}$ ) (dunkelgraue Balken) behandelt. Zusätzlich wurden die Astrozyten 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit mit R-BEL bzw. mit S-BEL (je  $5 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Die gestrichelte Linie zeigt die Konzentration (in %) von TBARS unter Kontrollbedingungen ( $0,1\% \text{ EtOH } (\%v/v)$ ) ohne Rotenon und BEL Applikation an. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Astrozytenpräparationen  $\pm \text{SEM}$ . (\* $P < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle ohne Rotenon, # $P < 0,05$  R-/S-BEL vs. R-/S-BEL + Rot, \$ $P < 0,05$  R-BEL + Rot vs. S-BEL + Rot).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse (Abb. 11 und Abb. 12), dass die Langzeitinkubation über 6 Stunden mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon zu einem starken Anstieg der ROS-Produktion in Astrozyten führt. Die verstärkte ROS-Bildung führt zu einer Erhöhung der TBARS-Konzentration, welche einen Indikator der Lipidperoxidation darstellt. Diese genannten Zellschädigungen (ROS und Lipidperoxidation) werden durch die Hemmung

der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität mit den BEL-Enantiomeren noch verstärkt. Demnach scheint die iPLA<sub>2</sub> ein wichtiger antioxidativer Mediator in Astrozyten zu sein.

Ein weiterer Marker der Lipidperoxidation ist 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE), welches bei der peroxidativen Zersetzung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildet wird (Uchida, 2003). Zur Ermittlung der 4-HNE-Bildung wurden die 4-HNE Proteinaddukte in der Cytosolfraction von Astrozyten nach der pharmakologischen Hemmung der beiden iPLA<sub>2</sub>-Isoformen mit den BEL-Enantiomeren mit Hilfe der Western-Blot Methode bestimmt. Sowohl unter Kontrollbedingungen (0,1% EtOH (v/v)), als auch nach der Behandlung mit R-BEL bzw. S-BEL oder mit Rotenon war die Proteinbande des HNE-Addukts relativ schwach ausgeprägt.

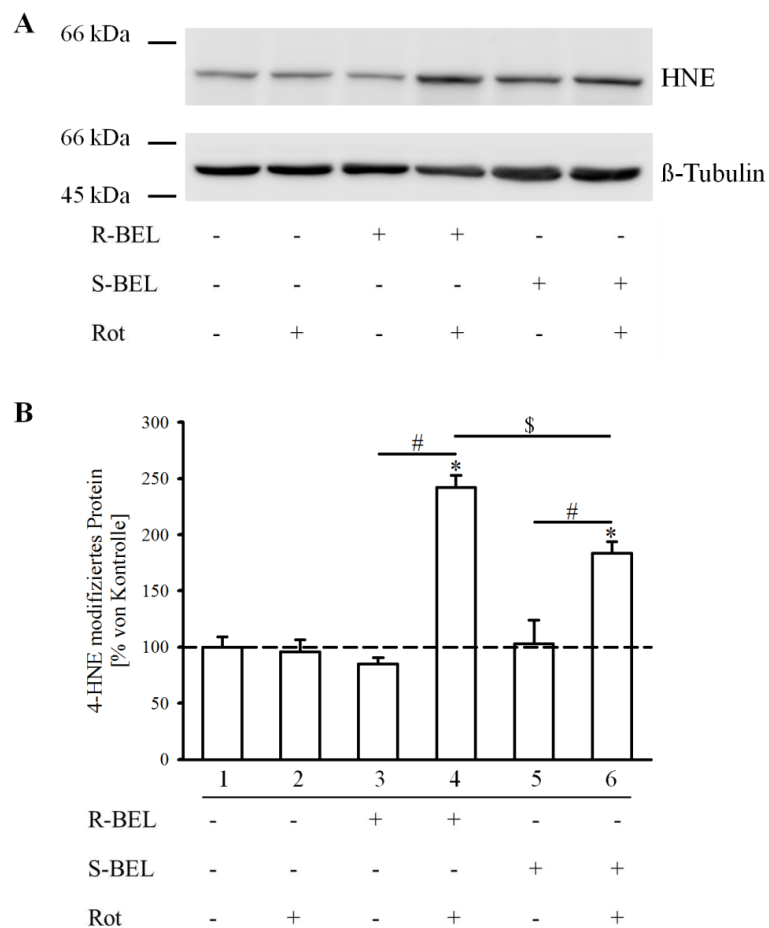


Abbildung 13: Auswirkung der R-/S-BEL-Behandlung auf die Bildung von 4-HNE

Astrozyten wurden nach dem Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.2) behandelt. Nach der Stimulation der Zellen wurde das Cytosol gewonnen und mittels 10% SDS-PAGE (20 µg Protein pro Spur) aufgetrennt. Mit Hilfe der Western-Blot Methode wurden die Proben auf 4-HNE Anlagerungsproteine mit einem monoklonalen Antikörper gegen HNE untersucht. **A** Repräsentatives Beispiel für eine entwickelte Western-Blot Membran. **B** Quantitative Analyse des 4-HNE modifizierten Proteins anhand der Normierung auf die β-Tubulin-Proteinbande. Die gestrichelte Linie zeigt die Signalstärke (in %) der 4-HNE Anlagerungsproteine unter Kontrollbedingungen (0,1% EtOH (v/v)). Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Cytosolpräparationen ± SEM. (\*P < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle, #P < 0,05 R-/S-BEL vs. R-/S-BEL + Rot, \$P < 0,05 R-BEL + Rot vs. S-BEL + Rot)

Dagegen verursachte die 6-stündige Vorinkubation mit Rotenon und die anschließende Hemmung der iPLA<sub>2</sub>-Isoformen mit den BEL-Enantiomeren einen starken Anstieg der 4-HNE Anlagerungsproteine (Abb. 13 Applikation von 1 µM Rotenon: 5 µM R-BEL Zunahme um 142% ±10,7 bzw. 5 µM S-BEL 84% ± 10,2). Wie schon bei der ROS-Produktion (Abb. 11) beobachtet, war auch hier der Effekt bei der Behandlung mit R-BEL während des Rotenon-induzierten oxidativen Stresses stärker als im Vergleich zu S-BEL.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Inaktivierung der iPLA<sub>2</sub> durch BEL die Produktion von oxidativem Stress in Astrozyten erhöht. Dieser Effekt wird durch die Applikation von Rotenon noch verstärkt. Zusätzlich führt dieser BEL-assoziierte oxidative Stress folglich zur Peroxidation von Lipiden in der Zellmembran der Astrozyten.

### **3.1.4 Wirkung der iPLA<sub>2</sub> auf das mitochondriale Membranpotential in Astrozyten**

Die durch den oxidativen Stress ausgelöste Lipidperoxidation und die ausgelöste Destabilisierung der mitochondrialen Innenmembran führen letztendlich zur Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ). Infolgedessen wurde im nächsten Schritt der Einfluss der iPLA<sub>2</sub> auf das  $\Delta\psi_m$  der Astrozyten untersucht.

Die Astrozyten wurden mit Rotenon, R-BEL, S-BEL oder deren Kombination inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit dem Farbstoff JC-1 behandelt. Die unter Kontrollbedingungen (0,1% EtOH (v/v)) durch Depolarisation verursachte Fluoreszenzänderung des JC-1 wurde gleich 100% gesetzt und charakterisiert energetisierte (polarisierte) Mitochondrien. Die 6-stündige Inkubation mit Rotenon erniedrigt das  $\Delta\psi_m$  um 30% (± 6,6). Die Inhibierung der iPLA<sub>2</sub>-Isoformen mit den BEL-Enantiomeren ergab eine ähnliche Verminderung des  $\Delta\psi_m$  (Abb. 14 Applikation von 5 µM R-BEL 24% ± 8,2 bzw. 5 µM S-BEL 29% ± 9,1). Bei einer Vorbehandlung mit Rotenon und der anschließenden Applikation von R-BEL bzw. S-BEL hingegen verminderte sich das  $\Delta\psi_m$  deutlich um ungefähr 77% (Abb. 14 Applikation von 1 µM Rotenon (6 h): 5 µM R-BEL 75% ± 4,9 bzw. 5 µM S-BEL 79% ± 9,1). Demnach bewirkte eine Inaktivierung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität durch BEL eine verstärkte Depolarisierung der Mitochondrien. Dieser Effekt wurde zusätzlich durch die Rotenon-Behandlung erhöht. Jedoch konnte zwischen den BEL-Enantiomeren kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das mitochondriale Potential nachgewiesen werden.



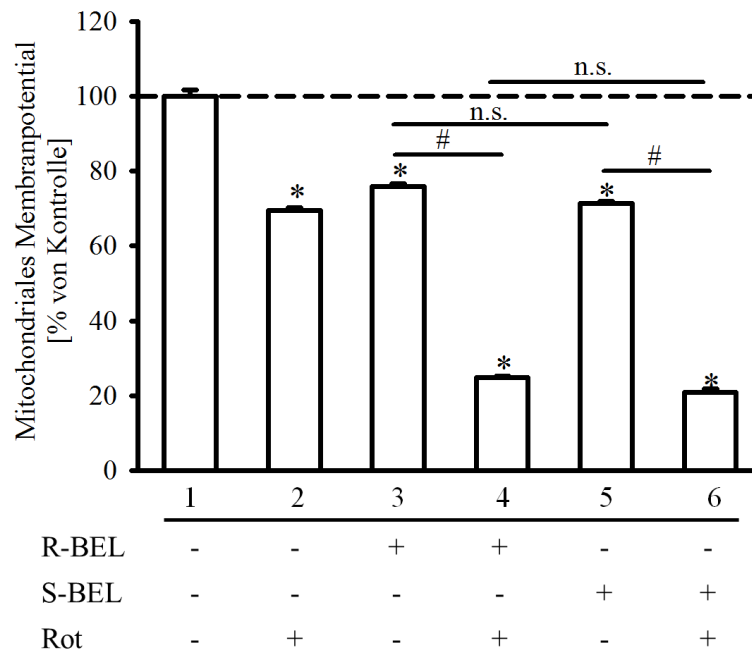


Abbildung 14: Einfluss von R-/S-BEL auf das mitochondriale Membranpotential in Astrozyten

Astrozyten wurden mit Rotenon und R-BEL bzw. S-BEL behandelt (siehe Kapitel 3.1). Die anschließende Bestimmung des Potentials erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1. Der Abstand 0 – 100 (gestrichelte Linie) entspricht dem  $\Delta\psi_m$  unter Kontrollbedingungen nach 6 h (0,1% EtOH (v/v)). Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Astrozytenpräparationen  $\pm$  SEM. (\* $P < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle, # $P < 0,05$  R-/S-BEL vs. R-/S-BEL + Rot, n.s. nicht signifikant).

### 3.1.5 Zelltod

#### 3.1.5.1 Laktatdehydrogenase – Freisetzung

Oxidativer Stress in Form von ROS-Bildung führt in Zellen langfristig zum Zelltod. Das zuvor beschriebene Experiment zeigte, dass die pharmakologische iPLA<sub>2</sub>-Inaktivierung durch BEL eine Reduktion des  $\Delta\psi_m$  hervorruft, was ein wichtiges Merkmal der Apoptose darstellt. Zur Charakterisierung der protektiven Wirkung der iPLA<sub>2</sub> während des Rotenon-induzierten oxidativen Stresses wurden in den Astrozyten mögliche zellphysiologische Veränderungen gemessen, wie z.B. das Ausmaß des Zelltodes in Form von Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung. Die Inkubation mit Rotenon zeigte keinen signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung. Hingegen verursachte die Inkubation mit den BEL-Enantiomeren eine deutlich erhöhte Zelltodrate der Astrozyten (Abb. 15 Kontrolle 23,2%  $\pm$  1,5; 5  $\mu$ M R-BEL 58,5%  $\pm$  5,3 bzw. 5  $\mu$ M S-BEL 62,9%  $\pm$  5,9 Zelltodrate). Dieser Effekt wurde nochmals durch die Vorinkubation mit Rotenon verstärkt (Abb. 15 Applikation von Rotenon (6 h): 28,9%  $\pm$  3,9; plus 5  $\mu$ M R-BEL 83,7%  $\pm$  6,4 bzw. plus 5  $\mu$ M S-BEL

90,2% ± 1,6 Zelltodrate). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den BEL-Enantiomeren festgestellt werden.

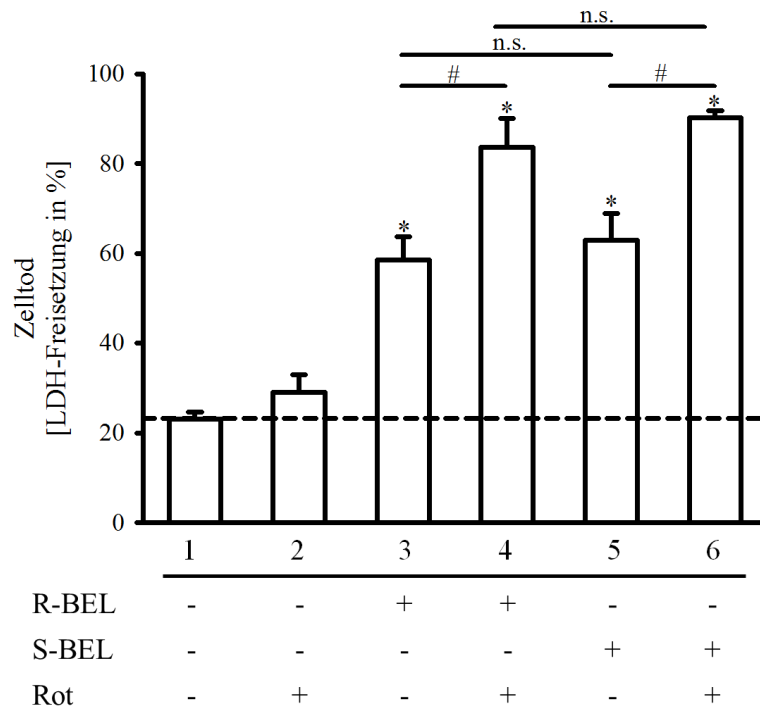


Abbildung 15: Zelltod nach Inkubation mit BEL und Rotenon in Astrozyten

Vor der Bestimmung der LDH-Freisetzung wurden die Astrozyten nach dem Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.1) behandelt. Nach der Behandlung wurde im Überstand der Zellen die LDH-Aktivität bestimmt und als Prozent der gesamten LDH-Aktivität berechnet. Die gestrichelte Linie beschreibt die LDH-Freisetzung unter Kontrollbedingungen (6 h Inkubation, 0,1% EtOH (v/v)). Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Astrozytenpräparationen ± SEM. (\*P < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle, #P < 0,05 R-/S-BEL vs. R-/S-BEL + Rot, n.s. nicht signifikant).

### 3.1.5.2 Cytochrom c-Freisetzung

Cytochrom c ist ein wichtiger Mediator des apoptotischen Zelltodes. Während des intrinsischen Weges kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren. Bei der Freisetzung werden Poren in der äußeren mitochondrialen Membran gebildet. Durch dieses „löchrig werden“ der Membran kann Cytochrom c in das Cytoplasma austreten. Im folgenden Versuch wurde mit Hilfe der Western-Blot Methode die Cytochrom c-Freisetzung quantitativ in Cytosolextrakten aus Astrozyten analysiert. Die Abbildung 16 zeigt die signifikant erhöhte Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol nach der Rotenon-Applikation in Kombination mit den jeweiligen BEL-Enantiomeren. Jedoch bewirkte erstaunlicherweise weder die alleinige Inkubation mit R-BEL bzw. S-BEL, noch die alleinige Inkubation mit Rotenon einen signifikanten Anstieg der Cytochrom c-Freisetzung ins Cytosol (Abb. 16).

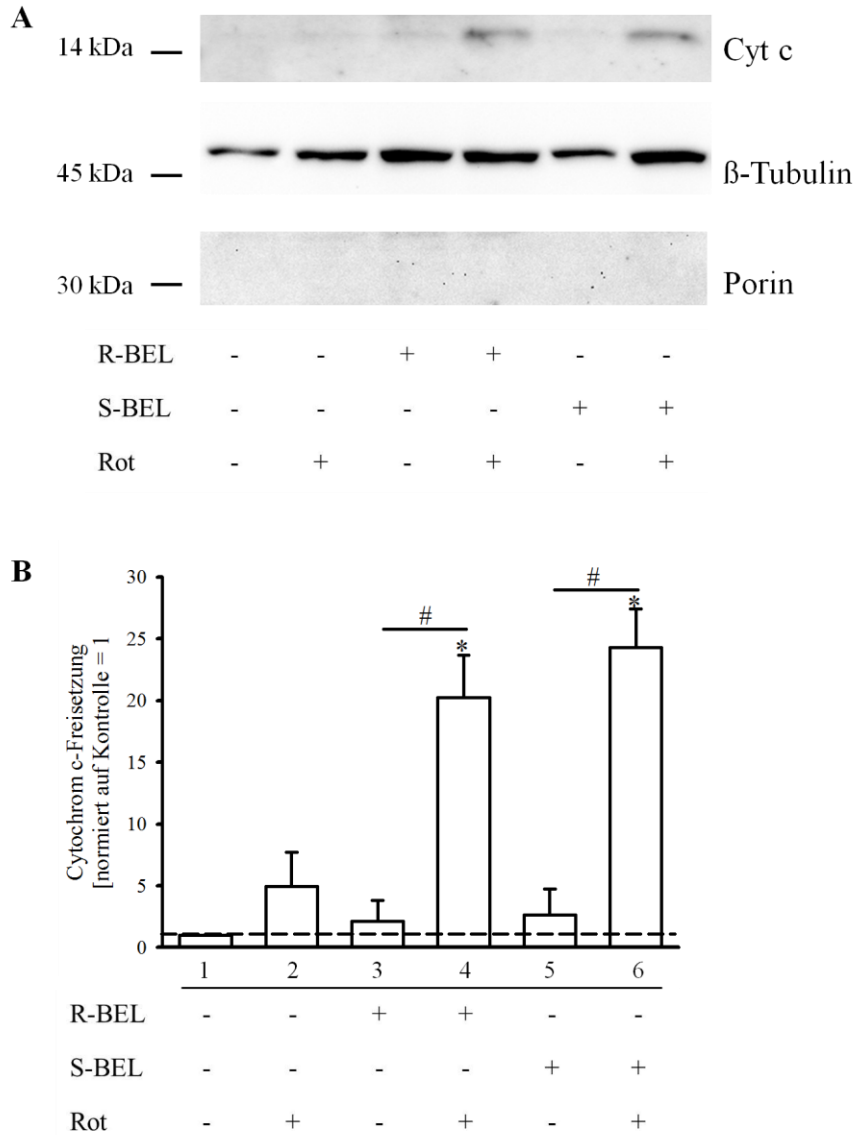


Abbildung 16: Cytochrom c-Freisetzung aus Astrozyten

Astrozyten wurden für 6 h mit Rotenon (1  $\mu$ M) in Abwesenheit bzw. in Kombination mit R-/S-BEL behandelt. Die Zugabe von 5  $\mu$ M R- oder S-BEL erfolgte 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit mit Rotenon. Das Cytosol der stimulierten Zellen wurde extrahiert und mittels 12,5% SDS-PAGE (20  $\mu$ g Protein pro Spur) aufgetrennt. Die Analyse der Cytochrom c-Freisetzung erfolgte nach der Western-Blot Methode mit einem monoklonalen Antikörper gegen Cytochrom c. Die gleiche Membran wurde mit weiteren Primärantikörpern angefärbt:  $\beta$ -Tubulin (Beladungskontrolle) und Anti-Porin. Mit Anti-Porin konnte nachgewiesen werden, dass sich in der Cytosolfraktion keine Mitochondrien befanden. **A** Repräsentatives Beispiel für eine entwickelte Western-Blot Membran. **B** Die quantitative Analyse der Cytochrom c-Freisetzung (normiert auf die  $\beta$ -Tubulin-Signalbande) aus 4 unabhängigen Cytosolpräparationen  $\pm$  SEM. Die gestrichelte Linie zeigt die relativen Werte der Cytochrom c-Freisetzung unter Kontrollbedingungen (0,1 % EtOH (v/v)) an. (\*P < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle, #P < 0,05 R-/S-BEL vs. R-/S-BEL + Rot).

### 3.2 Einfluss der iPLA<sub>2</sub> auf die mitochondrialen Funktionen in isolierten Hirnmitochondrien

Die mitochondriale iPLA<sub>2</sub> (VI) ist mit der Innenmembran der Mitochondrien assoziiert. Eine Veränderung ihrer Enzymaktivität sollte deshalb einen direkten Einfluss auf mitochondriale Parameter haben. Eine Hemmung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität blockiert einerseits die Remodellierung und verursacht damit die Anreicherung von Lipidperoxiden, wodurch die Innenmembran destabilisiert wird. Andererseits wird durch die iPLA<sub>2</sub>-Hemmung der Gehalt an unveresterten Fettsäuren in den Mitochondrien verringert, was zur Abschwächung der „Milden Entkopplung“ führt.

Im Folgenden werden die Auswirkungen der Hemmung der iPLA<sub>2</sub> durch BEL mit isolierten Hirnmitochondrien aus Ratte (RBM – *rat brain mitochondria*) beschrieben. Da in den oben beschriebenen Experimenten keine Unterschiede zwischen den iPLA<sub>2</sub>-Isoformen, VIA und VIB iPLA<sub>2</sub>, nachgewiesen werden konnten, wurde in den folgenden Versuchen BEL als Racemat eingesetzt.

#### 3.2.1 iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in isolierten Hirnmitochondrien

In Abbildung 17A sind die Ergebnisse zur PLA<sub>2</sub>-Aktivität der RBM zusammengestellt. Die Ergebnisse spiegeln die Gesamt-PLA<sub>2</sub>-Aktivitäten wieder, die unter ausgewählten Inkubationsbedingungen der RBM bestimmt wurden. Hierzu wurden die im Inkubationsmedium suspendierten RBM durch Zugabe von Glutamat und Malat (Komplex I-Substrate) energetisiert. Die in Abwesenheit der Effektoren gemessene Gesamt-PLA<sub>2</sub>-Aktivität entspricht der Kontrolle (Abb. 17A). Danach wurden in separaten Ansätzen den Inkubationsgemischen verschiedene Effektoren (BEL, Ca<sup>2+</sup>, CsA, Rot, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugesetzt. In Abbildung 17B wurde die BEL-sensitive iPLA<sub>2</sub>-Aktivität nach Abzug der jeweiligen Restaktivität der BEL-behandelten RBM von der totalen PLA<sub>2</sub>-Aktivität errechnet.

In Abwesenheit von Effektoren wurde für die Gesamt-PLA<sub>2</sub>-Aktivität in energetisierten RBM ein Wert von etwa 77 pmol/[min\*mg Protein] ± 9,2 bestimmt (Abb. 17A, erster Balken). Durch BEL-Behandlung der RBM wird dieser Wert um ca. 70% erniedrigt (Abb. 17A, zweiter Balken). Nach Abzug der BEL-sensitiven Restaktivität ergibt sich ein Wert von 57,7 pmol/[min\*mg Protein] ± 9,2 (Abb. 17B, erster Balken). Demnach ist die iPLA<sub>2</sub> in energetisierten Hirnmitochondrien auch in Abwesenheit von Effektoren aktiv.

Durch einen Ca<sup>2+</sup>-Zusatz wurde die Gesamt-PLA<sub>2</sub>-Aktivität um 80% erhöht (Abb. 17A, dritter Balken). Diese Erhöhung wird durch die Ca<sup>2+</sup>-induzierte *Permeability transition* der Mitochondrien (mPT) verursacht. Die Ca<sup>2+</sup>-induzierte Erhöhung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität wird unterbunden, wenn man vorher die RBM mit BEL behandelt (Abbildung

17A, vierter Balken). Die Abbildung 17B zeigt auch, dass die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität durch den Ca<sup>2+</sup>-Zusatz ebenfalls erhöht wird (Abb. 17B, zweiter Balken). In Anwesenheit von Cyclosporin A (CsA), einem potenten Hemmstoff der mPT (Hansson et al., 2003), verursacht der Ca<sup>2+</sup>-Zusatz erwartungsgemäß keinen Anstieg der PLA<sub>2</sub>- und iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Abb. 17A, fünfter Balken und Abb. 17B, dritter Balken). Die Zugabe von CsA allein hatte keinen Einfluss auf die PLA<sub>2</sub>- bzw. BEL-sensitive iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Daten werden nicht gezeigt).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Rotenon (Abb. 17A, siebter Balken) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 17A, neunter Balken) einen Anstieg der Gesamt-PLA<sub>2</sub>-Aktivität (1 µM Rotenon 176 pmol/[min\*mg Protein] ± 9,9) und 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 164,3 pmol/[min\*mg Protein] ± 9,7) verursacht. Ebenso wurde die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität mit Rotenon (90,6 pmol/[min\*mg Protein] ± 2,7) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (81,3 pmol/[min\*mg Protein] ± 5,9) stimuliert (Abb. 17B, vierter und fünfter Balken).

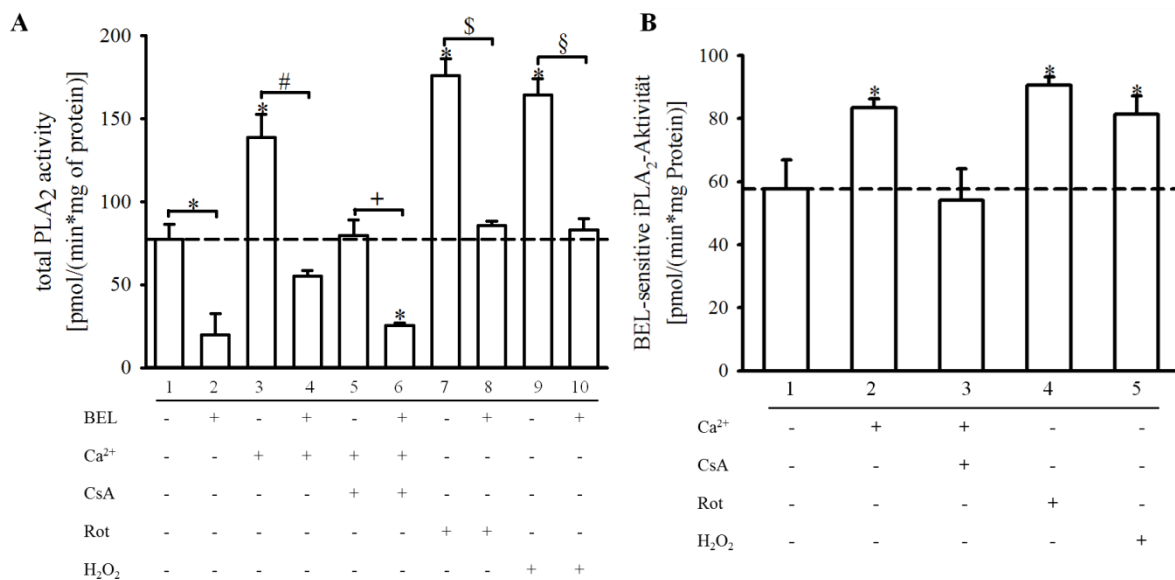


Abbildung 17: Beeinflussung der totalen PLA<sub>2</sub>-Aktivität und der BEL-sensitiven iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in isolierten Rattenhirnmitochondrien (RBM) unter verschiedenen Bedingungen

Isolierte RBM (1 mg/ml Protein) wurden in Hirnkubationsmedium (enthält zusätzlich 5 mM Glutamat und 5 mM Malat) suspendiert. Die Aktivität der PLA<sub>2</sub> wurde wie in Materialien und Methoden beschrieben, gemessen. **A** Die totale PLA<sub>2</sub>-Aktivität wurde gemessen. Applikation der Substanzen: 1 µM Rotenon, 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 800 nmol Ca<sup>2+</sup>/mg Protein, 1 µM CsA. Für die pharmakologische Inaktivierung der BEL-sensitiven iPLA<sub>2</sub> Aktivität wurden die Mitochondrien für 20 min mit 5 µM BEL vorinkubiert. **B** Die BEL-sensitive iPLA<sub>2</sub>-Aktivität ist die Differenz aus der totalen PLA<sub>2</sub>-Aktivität und der BEL-behandelten RBM. Die Kontrolle (gestrichelte Linie) beinhaltet die Zugabe von 0,01% EtOH (v/v). Die Messung der Aktivität ist in Materialien und Methoden (Kapitel 2.2.4) beschrieben. Werte sind Mittelwerte aus 6 unabhängigen Mitochondrienpräparationen ± SEM. (\*P < 0,01 vs. Kontrolle, #P < 0,01 vs. Ca<sup>2+</sup>-behandelten RBM, +P < 0,01 vs Ca<sup>2+</sup>- und CsA-behandelten RBM, \$P < 0,01 vs. Rot-behandelte RBM, §P < 0,01 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelte RBM, \*\*P < 0,01 vs. BEL-sensitive iPLA<sub>2</sub> Aktivität (Kontrolle, gestrichelte Linie).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die iPLA<sub>2</sub> in energetisierten RBM aktiv ist. Außerdem wird mit Hirnmitochondrien bestätigt, dass die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität durch oxidativen Stress bzw. durch die Ca<sup>2+</sup>-induzierte mPT weiter erhöht wird. Ähnliche Ergebnisse konnten auch schon in Mitochondrien, isoliert aus Leber und Herz, gezeigt werden (Gadd et al., 2006, Jezek et al., 2010).

### **3.2.2 Untersuchungen zum Einfluss der iPLA<sub>2</sub>-induzierten Fettsäure-Freisetzung auf die ROS-Bildung durch isolierte Hirnmitochondrien**

Unveresterte Fettsäuren können die ROS-Bildung durch Mitochondrien auf zweierlei Art und Weise beeinflussen (Schönfeld and Wojtczak, 2007). Durch ihre milde Entkopplerwirkung vermindern Fettsäuren die ROS-Bildung, wenn diese durch den  $\Delta\psi_m$ -abhängigen rückwärtsgerichteten Elektronentransport (RET) verursacht wird. RET findet immer dann statt, wenn intakte Mitochondrien das Substrat Succinat oxidieren und dabei Elektronen von Komplex II zu Komplex I transportieren. Die Erniedrigung der RET-induzierten ROS-Bildung wird durch die Depolarisation der Innenmembran verursacht. Im Unterschied dazu stimulieren unveresterte Fettsäuren die ROS-Bildung der Mitochondrien bei dem vorwärtsgerichteten Elektronentransport (FET). Der FET findet immer dann statt, wenn die Substratoxidation NADH erzeugt, dass durch den Komplex I oxidiert wird. Die Stimulation wird durch eine Hemmung des Elektronentransportes von Komplex I zu Komplex IV verursacht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Versuchsansätzen beschrieben, bei denen DHA zu den energetisierten RBM zugesetzt wurde. Mit diesen Versuchsansätzen wurde der Einfluss der aktiven iPLA<sub>2</sub> über den Einfluss eines erhöhten mitochondrialen Fettsäuregehaltes auf die mitochondriale ROS-Bildung simuliert. DHA wurde als Fettsäure ausgewählt, da diese eines der bedeutendsten Spaltprodukte der iPLA<sub>2</sub>-induzierten Hydrolyse von cerebralen Phospholipiden im Gehirn ist (Green et al., 2008 und Strokin et al., 2003).

Die mitochondriale ROS-Produktion wurde über die Freisetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus RBM bestimmt. Dazu wurde den Inkubationsansätzen nicht-fluoreszierendes Amplex Red zugesetzt, welches durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu dem fluoreszierenden Resorufin oxidiert.

### 3.2.2.1 Charakterisierung der Entkopplerwirkung von DHA auf isolierte Hirnmitochondrien

In Abbildung 18 ist die Entkopplerwirkung von steigenden DHA-Konzentrationen auf RBM dargestellt. Zur Unterdrückung einer möglicherweise geringfügigen Atmungsstimulation durch die Fettsäure-Aktivierung im Matrixraum wurde dem Inkubationsansatz zusätzlich Oligomycin, ein spezifischer Inhibitor der ATP-Synthase, zugesetzt. Die Entkopplungswirkung der DHA wurde anhand des Anstiegs der Ruheatmung (State 4-Atmung) ermittelt. Die Ruheatmung wird bereits durch einen Zusatz von nur 5  $\mu\text{M}$  DHA um mehr als das Doppelte erhöht (Abb. 18A, dritter schwarzer Balken von links).

Es ist bekannt, dass an der Entkopplerwirkung der Fettsäuren Proteine der Innenmembran und im besonderen Maße der Adeninnukleotid-Translokator (ANT) beteiligt sind (Andreyev et al. 1989, Schönfeld 1990, Brustovetsky and Klingenberg 1994). Deshalb wurde der Anteil des ANT an der DHA-Entkopplung bestimmt. Es ist außerdem bekannt, dass die ANT-vermittelte Fettsäure-Entkopplung durch einen Hemmstoff des ANT, dem Carboxyatractylosid (CAT), „ausgeschaltet“ werden kann (Andreyev et al. 1989, Schönfeld 1990, Brustovetsky and Klingenberg 1994). Zur Quantifizierung der ANT-vermittelten DHA-Entkopplerwirkung wurde dem Inkubationsmedium CAT zugesetzt und die durch DHA induzierte Stimulation der Ruheatmung erneut gemessen (Abb. 18, weiße Balken).

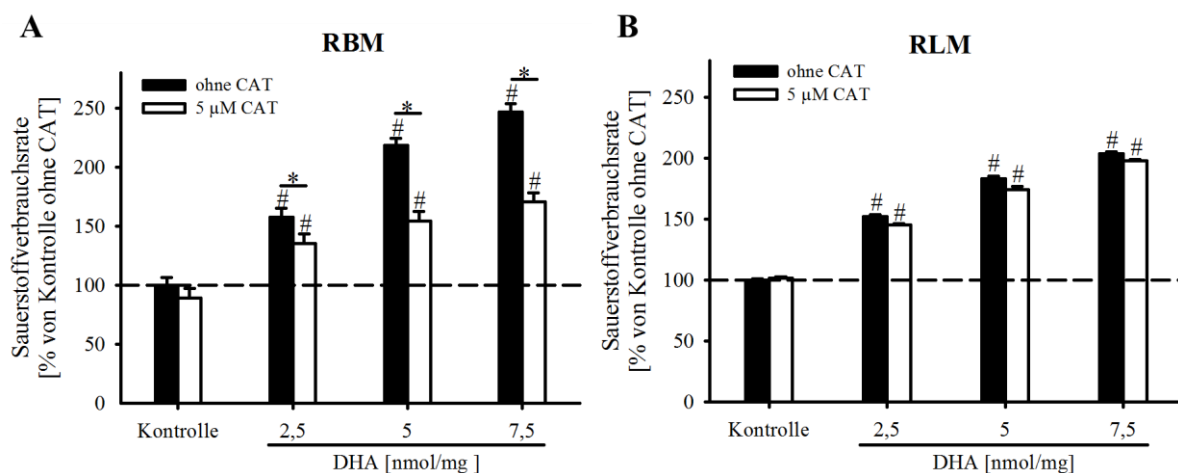


Abbildung 18: DHA-induzierte Atmungsstimulation von Hirn- und Lebermitochondrien in Abwesenheit und Anwesenheit des ANT-Hemmstoffes Carboxyatractylosid (CAT).

Isolierte RBM (A) und RLM (B) (jeweils 1 mg/ml Protein) wurden in 1,5 ml Hirninkubationsmedium (5 mM Glutamat/5 mM Malat, 5  $\mu\text{M}$  Oligomycin) suspendiert. Die Ruheatmung (RBM: 11,62  $\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mg}$  Protein; RLM: 13,04  $\text{nmolO}_2/\text{min}/\text{mg}$  Protein) wird durch gestrichelte Linien verdeutlicht. Die Zugabe verschiedener Konzentrationen Docosahexaensäure (DHA) induzierte einen Anstieg der Ruheatmung (schwarze Balken). Im Vergleich wurde die DHA-induzierbare Atmung in Anwesenheit von CAT (5  $\mu\text{M}$ ) bestimmt (weiße Balken). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus jeweils 3-4 Messungen, die mit separaten Mitochondrienpräparationen erhalten wurden. (\* $P < 0,05$  CAT-behandelt vs. CAT-unbehandelt, # $P < 0,05$  Kontrolle der jeweiligen Mitochondrienart).

Bei den Hirnmitochondrien verringerte CAT die DHA-induzierte Atmungssteigerung um ca. 50% (Abb. 18A, Vergleich schwarze mit weiße Balken). Zu Vergleichszwecken wurde ebenfalls die DHA-induzierte Entkopplerwirkung in Rattenlebermitochondrien (RLM) untersucht (Abb. 18B). Dabei stellte sich heraus, dass bei den Lebermitochondrien die DHA-induzierte Erhöhung der Atmung geringer und der Anteil der CAT-sensitiven Atmungsstimulation deutlich kleiner war (Abb. 18B, Vergleich schwarze mit weiße Balken).

Es lag die Vermutung nahe, dass die stärkere DHA-induzierte Entkopplung der Hirnmitochondrien sowie deren ausgeprägtere Sensitivität gegenüber dem CAT mit einem unterschiedlichen Gehalt des ANT-Proteins in den Hirnmitochondrien im Zusammenhang stehen (Schönfeld 1990). Deshalb wurde der ANT-Gehalt mittels einer Titration der phosphorylierenden Atmung (State 3) mit dem ANT-Hemmstoff CAT bestimmt (Abb. 19A und 19B).

Das ANT-Protein reagiert mit CAT, wobei sich ein Komplex mit einer 1:1-Stöchiometrie bildet. Die Abbildung 19A und B zeigen den Verlauf der Titration der phosphorylierenden Atmung mit CAT. Im Vergleich zu den Lebermitochondrien musste zu den phosphorylierenden Hirnmitochondrien eine fast 3-fach höhere Menge an CAT zugegeben werden, damit die Ruheatmung erreicht wurde (CAT-Zusatz: RBM  $774 \pm 10,4$  pmol/mg Protein; RLM  $287 \pm 20,4$  pmol/mg Protein). Demnach ist die Menge an ANT in den Hirnmitochondrien deutlich höher (3-fach) als in den Lebermitochondrien (Abb. 19C).



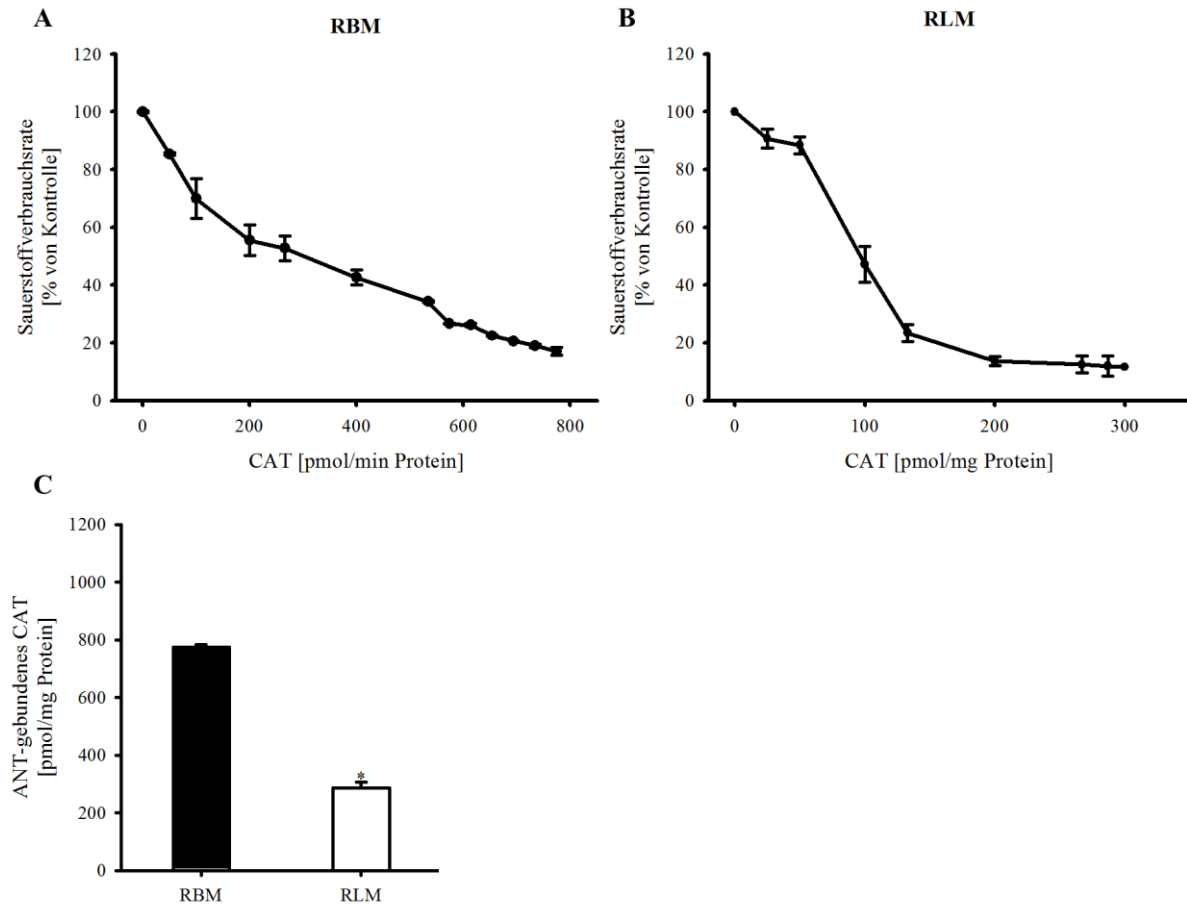


Abbildung 19: Vergleich ANT-Gehalt in Hirn- und Lebermitochondrien

Isolierte RBM (A) bzw. RLM (B) (jeweils 0,5 mg/ml Protein) wurden in Hirnkubationsmedium (5 mM Glutamat/5 mM Malat) suspendiert. Die phosphorylierende Atmung wurde durch einen Zusatz von 1,33 mM ADP induziert. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM der ermittelten ANT-Gehalte sind im Bildteil C angegeben. Werte wurden mit jeweils 4 separaten Mitochondrienpräparationen bestimmt (\*P < 0,05 vs. RBM).

### 3.2.2.2 Einfluss von DHA auf die RET-assoziierte ROS-Produktion

In Abbildung 20 ist die RET-assoziierte ROS-Entwicklung durch Succinat-oxidierende RBM dargestellt. Danach reduziert der Zusatz von DHA die  $H_2O_2$ -Freisetzung. Wird anschließend CAT zugesetzt, erhöht sich die  $H_2O_2$ -Freisetzung wieder (Abb. 20A Kurve a und B zweiter und dritter Balken). Im Unterschied zu CAT hat der Zusatz von GTP keinen Einfluss auf die DHA-induzierte RET-abhängige  $H_2O_2$ -Freisetzung (Abb. 20A Kurve b und B vierter Balken). Guaninnukleotide sind als spezifisch wirkende Hemmstoffe der Entkopplungsproteine bekannt (UCP – *uncoupling protein*) (Wojtczak et al. 2011 und Jaburek et al. 2013). Somit sind keine UCP an der DHA-induzierten  $H_2O_2$ -Freisetzung beteiligt.

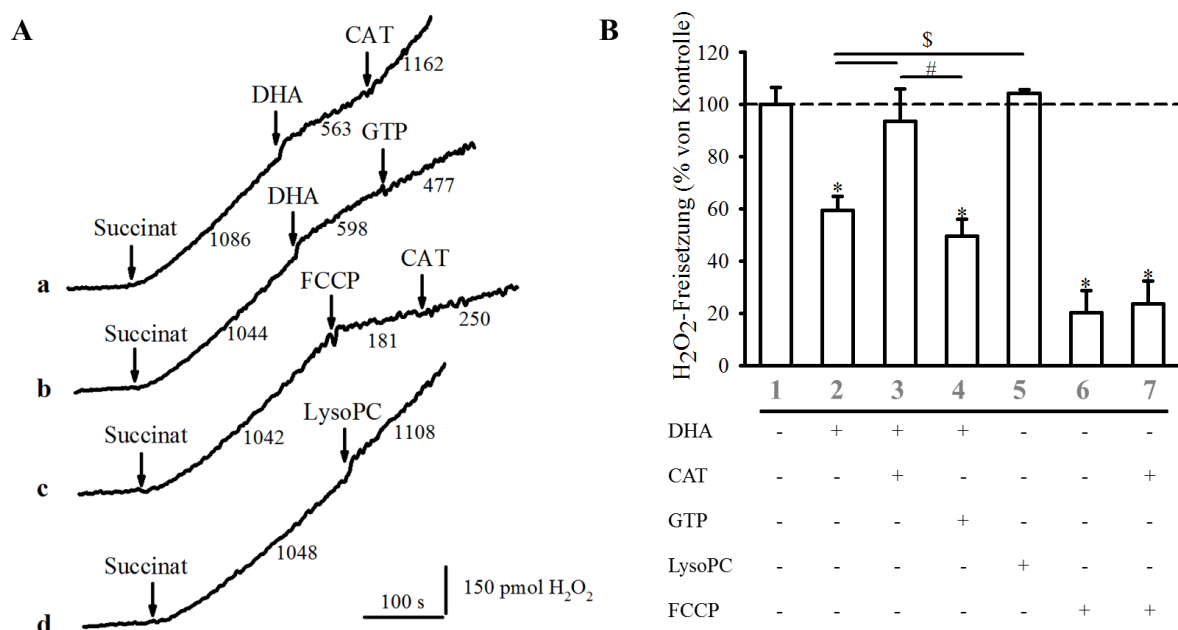


Abbildung 20: RET-assoziierte  $H_2O_2$ -Freisetzung in isolierten Hirnmitochondrien

RBM (0,2 mg/ml) wurden in Hirnkubationsmedium suspendiert. Der rückwärtsgerichtete Elektronentransport wurde durch die Applikation von 5 mM Succinat gestartet. Die Messung der  $H_2O_2$ -Freisetzung ist in Materialien und Methoden (Kapitel 2.2.17) beschrieben. **A** Repräsentative Beispielkurven der Resorufin Fluoreszenzänderung. Die Zugaben waren: DHA (10 nmol/mg Protein), LysoPC (10 nmol/mg Protein), CAT (5  $\mu$ M), GTP (1 mM) und FCCP (0,25  $\mu$ M). An den Kurven stehen die Einzelwerte der  $H_2O_2$ -Freisetzung in pmol/[min\*mg Protein]. **B** Zusammenfassung der Daten aus 3 unabhängigen Mitochondrienisolierungen (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Die gestrichelte Linie zeigt die  $H_2O_2$ -Freisetzung unter Kontrollbedingungen (0,01% EtOH (v/v)). (\* $P < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle, # $P < 0,05$  DHA + CAT vs. DHA + GTP, \$ $P < 0,05$  DHA vs. DHA + CAT und LysoPC).

Bei der  $iPLA_2$ -katalysierten hydrolytischen Spaltung der Glycerophospholipide werden unter anderem auch Lysophospholipide gebildet. Deshalb wurde auch eine mögliche Wirkung von Lysophosphatidylcholin (LysoPC) als Modelllysophospholipid geprüft. Im

Gegensatz zu DHA hatte das LysoPC keinen Einfluss auf die RET-assoziierte ROS-Bildung (Abb. 20A Kurve d und B fünfter Balken). Mit dem Entkoppler FCCP (Carbonyl-Cyanid-4-trifluoromethoxyphenyl-hydrazon) wird die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung nahezu vollständig unterdrückt, aber im Unterschied zu DHA durch einen CAT-Zusatz nicht reaktiviert (Abb. 20A Kurve c und B sechster und siebter Balken). Entkoppler haben eine protonophore Wirkung. Durch den Abbau des Protonengradienten unterbrechen sie die Verknüpfung von Oxidation und Phosphorylierung. Damit kann keine ATP-Synthese mehr erfolgen.

### 3.2.2.3 Einfluss von DHA auf die FET-abhängige ROS-Produktion

In Abbildung 21 sind repräsentative Verläufe der FET-abhängigen Freisetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Rattenhirnmitochondrien gezeigt. In diesen Experimenten wurden die RBM mit den Komplex I-Substraten Glutamat plus Malat bzw. Pyruvat plus Malat inkubiert. Im Vergleich zu der vom Succinat-stimulierten RET-assoziierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung (siehe Kapitel 3.2.2.2, Abb. 20) ist die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung unter der Bedingung des FET ca. 5-fach geringer.

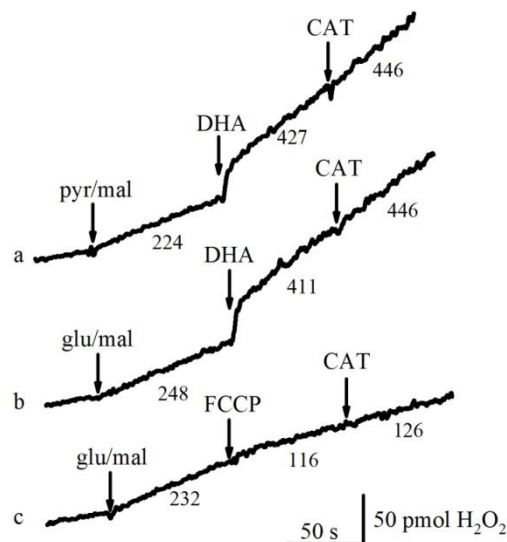


Abbildung 21: DHA-abhängige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung induziert durch Komplex I-Substrate (FET)

RBM (0,4 mg/ml) wurden im Inkubationsmedium suspendiert. Die Bildung von ROS ausgelöst durch den vorwärtsgerichteten Elektronentransport (FET) wurde mit den Substraten 5 mM Pyruvat/ 5 mM Malat (Kurve a) oder 5 mM Glutamat/ 5 mM Malat (Kurven b und c) induziert. Die Abbildung zeigt repräsentative Beispielkurven. Zugaben waren: DHA (10 nmol/mg Protein), 0,25  $\mu\text{M}$  FCCP und 5  $\mu\text{M}$  CAT. Werte für die Geschwindigkeit der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung (in pmol/min\*mg Protein) sind an den Kurven angegeben.

Andererseits wird durch einen DHA-Zusatz die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung erhöht (Abb. 21 Kurve a zeigt die Zugabe von 10 nmol DHA/mg Protein 412 pmol  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min\*Protein  $\pm$  4,7 und Kurve b 10 nmol DHA/mg Protein 398 pmol  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min\*Protein  $\pm$  6,8). Diese Erhöhung

lässt sich mit einer Deregulation des Elektronentransports in der ETK erklären (Abb. 21 Kurven a und b). Da an dieser Deregulation der ANT nicht beteiligt ist, hat die CAT-Zugabe keinen Einfluss auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung. Wird an Stelle von DHA der Entkoppler FCCP zugesetzt, erniedrigt sich im Unterschied zu DHA die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung um ca. 50% (Abb. 21 Kurve c). Die anschließende CAT-Zugabe hat keinen Einfluss auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse (Abb. 20 und Abb. 21), dass die DHA-induzierte „Milde Entkopplung“ der Hirnmitochondrien durch den ANT vermittelt wird. Es gibt keinen Hinweis dafür, dass die UCP an der Entkopplerwirkung der DHA beteiligt sind. In Bezug zum Einfluss der  $\text{iPLA}_2$  auf die mitochondriale ROS-Bildung legen die durchgeführten Untersuchungen folgenden Sachverhalt nahe: Hirnmitochondrien oxidieren unter den zellulären Bedingungen vorwiegend NADH-Wasserstoff, der durch den Glucoseabbau bereitgestellt wird. Dadurch dominiert die FET-abhängige ROS-Bildung. Deshalb können die durch die  $\text{iPLA}_2$ -freigesetzten Fettsäuren die mitochondriale ROS-Bildung nur stimulieren.

### 3.2.2.4 Wirkung des iPLA<sub>2</sub>-Inhibitors BEL auf die mitochondriale ROS-Bildung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie eine Hemmung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität durch BEL die durch Succinat-stimulierte entkopplungs-sensitive Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RET-assoziierte mitochondriale ROS-Produktion) beeinflusst. Dabei zeigte sich, dass die Vorinkubation der RBM (20 min) mit BEL einen deutlichen Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung im Vergleich zu den unbehandelten RBM verursacht (Abb. 22A). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung steigt mit der Erhöhung der eingesetzten BEL-Konzentration (Abb. 22B). Eine solche Stimulation ist dann zu erwarten, wenn infolge der Inaktivierung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität die Konzentration an endogenen Fettsäuren verringert wird und demzufolge die „Milde Entkopplung“ abgeschwächt wird.

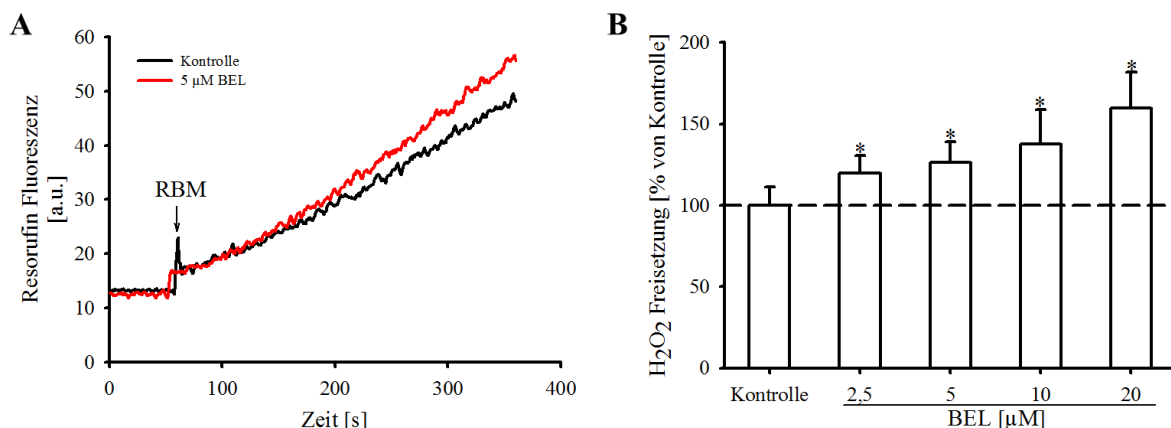


Abbildung 22 Die RET-assoziierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Abgabe durch BEL-behandelte RBM

**A** Repräsentative Beispielkurven für die Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung der RBM mit dem Indikatorsystem - Amplex Red/Peroxidase. RBM (0,2 mg/ml) suspendiert im Hirnkubationsmedium wurden mit 5 µM BEL (A rote Kurve) oder mit dem Lösungsmittel (0,01% EtOH (v/v)) (A schwarze Kurve) für 20 min bei 25°C vorinkubiert. Die RET-abhängige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung wurde durch Zusatz von Succinat (5 mM) initiiert. **B** Die BEL-abhängige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung wurde so quantifiziert, indem der Anstieg der Resorufin-Fluoreszenz der BEL-behandelten RBM auf den Anstieg der Kontrolle bezogen wurde. Die gestrichelte Linie zeigt die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung unter Kontrollbedingungen (0,01% EtOH (v/v)). Die dargestellten Balken entsprechen den Mittelwerten aus jeweils 4 unabhängigen Mitochondrienpräparationen ± SEM. (\*P < 0,05 in Bezug auf Kontrolle).

Außerdem wurde untersucht, ob die BEL-Behandlung der RBM auch die FET-assoziierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung beeinflusst. Hierzu wurden Glutamat/Malat sowie Pyruvat/Malat als Komplex I-Substrate eingesetzt. Im Unterschied zum Einfluss von BEL auf die RET-abhängige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung wurde unter der Bedingung des FET keine Stimulation der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung gefunden (Abb. 23A und B). Außerdem wird durch CAT die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung nicht verändert.

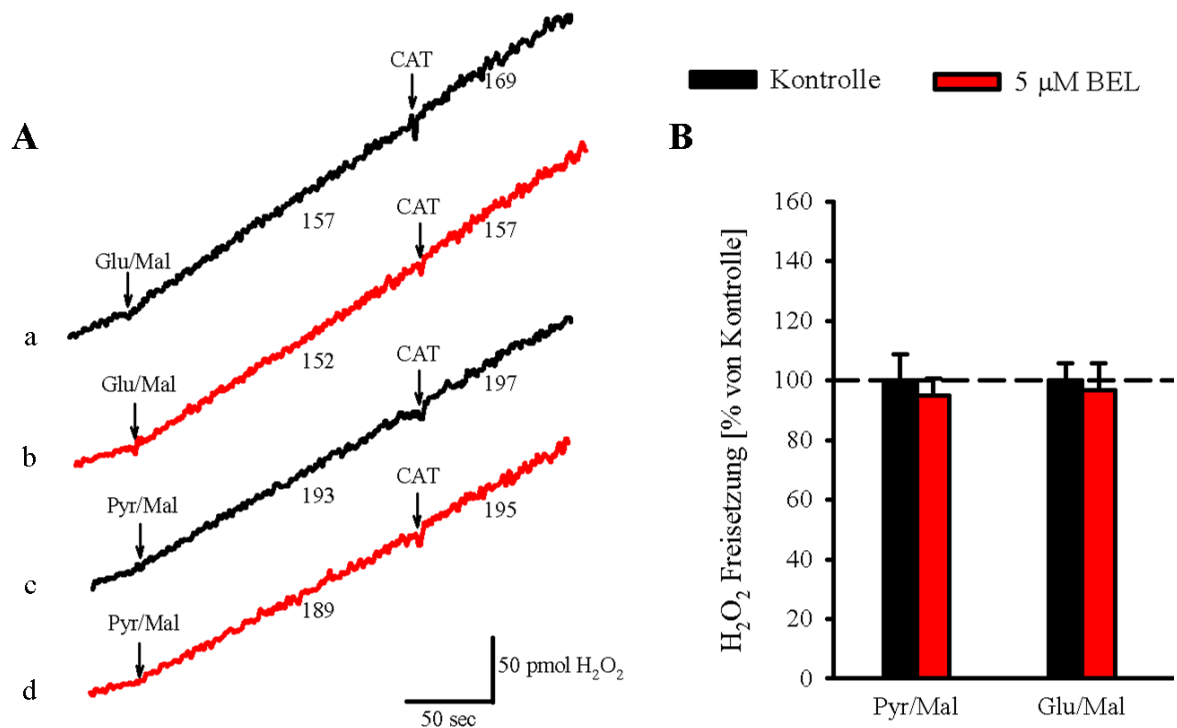


Abbildung 23: CAT-Einfluss auf die FET-assoziierte ROS-Produktion in BEL-behandelten RBM

**A** Repräsentative Beispielkurven der Amplex Red/Peroxidase gemessenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung durch RBM.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Messung mit 0,01% Lösungsmittel (EtOH (v/v)) (Kurve a und c) oder 5  $\mu\text{M}$  BEL (Kurve b und d) für 20 min bei 25°C behandelt. Nach der Inkubation wurden die RBM in Hirninkubationsmedium suspendiert (0,4 mg/ml). Die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde durch Zusatz von 5 mM Glutamat/5 mM Malat (Kurve a und b) oder 5 mM Pyruvat/5 mM Malat (Kurven c und d) stimuliert. Die Geschwindigkeiten der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung in pmol/[min\*mg Protein] sind an den Kurven angetragen. Die Konzentration des zugesetzten CAT war 5  $\mu\text{M}$ . **B** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, der mit 3 unabhängigen Mitochondrienpräparationen erhaltenen Einzelwerten. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung wurde auf die der Kontrollinkubation bezogen. Die gestrichelte Linie zeigt die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung unter Kontrollbedingungen (0,01% EtOH (v/v)) an.

### 3.2.2.5 Einfluss von BEL auf den Elektronentransport in der Atmungskette

Die in Abbildung 22B dargestellten Experimente zeigen, dass der iPLA<sub>2</sub>-Inhibitor BEL konzentrationsabhängig die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung stimuliert. Eine mögliche Erklärung dafür ist die verminderte Bildung von freien Fettsäuren, wodurch die "Milde Entkopplung" reduziert wird. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass BEL den Elektronentransport in der Atmungskette verlangsamt, womit die ROS-Bildung stimuliert wird. Zur experimentellen Prüfung dieser Möglichkeit wurde der Einfluss von BEL auf die Reduktion des synthetischen Elektronenakzeptors MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) bestimmt (Abb. 24). Die MTT-Reduktion kann an unterschiedlichen Stellen entlang der ETK erfolgen.

Die RBM wurden mit den Komplex I-Substraten Glutamat/Malat energetisiert. Um den Einfluss von BEL auf den Elektronentransport in der Atmungskette zu untersuchen, wurden die Mitochondrien für 20 min bei 25°C mit BEL vorbehandelt. Die BEL-behandelten RBM zeigten eine geringe Abnahme der MTT-Reduktion um 7% (Abb. 24 Applikation von 5 µM BEL: 7,1% ± 1,4), was sich jedoch als signifikant herausstellte (Abb. 24, zweiter Balken). Im Vergleich wurden den RBM verschiedene Konzentrationen an DHA (10, 20 und 100 nmol/mg Protein) appliziert. DHA verminderte konzentrationsabhängig die MTT-Reduktion (Abb. 24 Applikation von DHA: 10 nmol/mg: 8% ± 1,96; 20 nmol/mg: 17,5% ± 3,8 und 100 nmol/mg: 72,3% ± 1,5). Die Auswirkung auf die MTT-Reduktion bei der niedrigsten Konzentration an DHA (10 nmol/mg Protein) ist mit den BEL-behandelten RBM vergleichbar. Zusätzlich wurde der spezifische Komplex I-Inhibitor Rotenon zu den RBM hinzugegeben. Die Rotenon-assoziierte Inhibierung des Elektronentransportes vom Eisenschwefelzentrum N2 zu Ubichinon verursachte eine Reduzierung der MTT-Reduktion um ca. 70% (Abb. 24, erster Balken). Die höchste DHA-Konzentration (100 nmol/mg Protein) reduzierte die MTT-Reduktion in einem Ausmaß ähnlich wie Rotenon. Die Hemmung der MTT-Reduktion zeigt, dass die Behandlung mit BEL einen hemmenden Einfluss auf den Elektronentransport innerhalb der ETK hat.

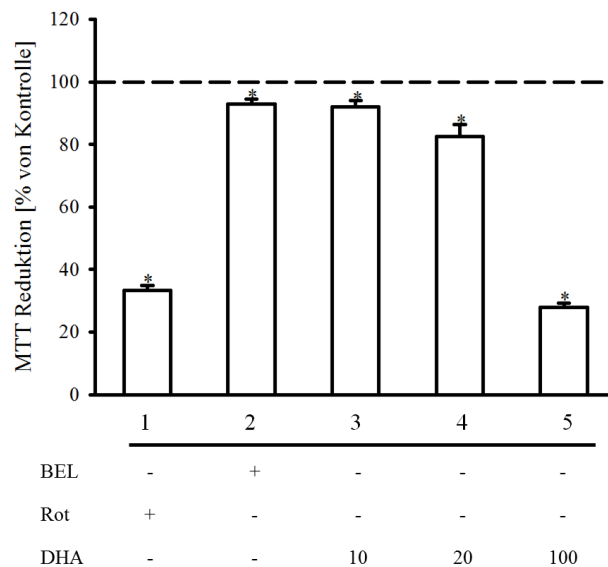


Abbildung 24: Einfluss von BEL bzw. DHA auf die MTT-Reduktion durch RBM.

RBM wurden vor der Messung mit 5 µM BEL für 20 min bei 25°C behandelt. Die behandelten und unbehandelten RBM (0,1 mg/ml) wurden in 1 ml Hirnkubationsmedium, das zusätzlich 5 mM Glutamat/5 mM Malat enthielt, suspendiert. In separaten Ansätzen wurde Rotenon (1 µM) oder verschiedene Konzentrationen an DHA (10, 20 und 100 nmol/mg Protein) zugesetzt. Die MTT-Reduktion wurde wie in Materialien und Methoden beschrieben gemessen. Die gestrichelte Linie zeigt die MTT-Reduktion unter Kontrollbedingungen. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Mitochondrienpräparationen ± SEM. (\*P < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle)

### **3.2.3 BEL reduziert die antioxidative Wirkung des Glutathion/Glutathionperoxidase-Systems**

Als Nächstes wurde ein möglicher Einfluss von BEL auf das Glutathion/Glutathionperoxidase-System untersucht. Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist das wichtigste Antioxidationsmittel im Gehirn (DeLeve et al., 1991) und spielt bei der Entgiftung von  $H_2O_2$  in der Matrix eine wichtige Rolle (Chance et al., 1979). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass BEL und Glutathion in einem gewissen Ausmaß miteinander reagieren, wodurch der mitochondriale Matrixgehalt von Glutathion vermindert wird. Im Ergebnis sollte sich die Freisetzung von  $H_2O_2$  aus den Mitochondrien erhöhen. Im nachfolgenden Experiment wurde in BEL-behandelten RBM der Gehalt an GSH untersucht. Die Kontrolle zeigte die Gesamtmenge an endogenem GSH in den RBM (Abb. 25A, erster schwarzer Balken). Als Positivkontrolle diente das GST-Substrat Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB). CDNB wird von dem Enzym GST (Glutathion S-Transferase) in der Matrix mit dem GSH zu einem GSH-CDNB Komplex konjugiert (Jocelyn und Cronshaw, 1985). Durch die Bildung des Komplexes kommt es zu einer Verarmung des GSH-Gehaltes in den Mitochondrien, und demzufolge steigt die Freisetzung des  $H_2O_2$  an. Die Abb. 25B zeigt, dass eine steigende CDNB-Konzentration die RET-assoziierte Freisetzung an  $H_2O_2$  in den RBM verstärkt. Um die Beziehung von BEL auf das antioxidative Abwehrsystem aufzuklären, wurde eine mögliche Korrelation des endogenen GSH-Gehaltes von RBM nach der BEL-Behandlung analysiert. Als Positivkontrolle wurden die RBM mit  $60 \mu M$  CDNB behandelt und anschließend der GSH-Gehalt gemessen. CDNB bewirkte eine Reduzierung der GSH-Menge um 40% (Abb. 25) und gleichzeitig führte dies zu einem Anstieg der ROS-Produktion in den Mitochondrien (Abb. 25B). Nach der Behandlung mit  $20 \mu M$  BEL wurde eine Verminderung des GSH-Gehaltes der Matrix um 30% im Vergleich zu den unbehandelten RBM (Abb. 25A) beobachtet. In Kapitel 3.2.2.4 (Abb. 22) wurde eine erhöhte RET-assoziierte ROS-Produktion in BEL-behandelten RBM beschrieben. Damit kann die erhöhte  $H_2O_2$ -Freisetzung mit der verminderten Aktivität des Glutathion/Glutathionperoxidase Systems möglicherweise erklärt werden. Zusätzlich wurde überprüft, ob das CDNB komplett mit GSH in den Mitochondrien reagieren kann. Um den Austritt von GSH aus den Mitochondrien zu gewährleisten, wurden diese mit Alamethicin permeabilisiert, welches als membranaler Porenbildner bekannt ist (He et al., 1996). Es ergab sich, dass Alamethicin keinen Einfluss auf den mitochondrialen GSH-Gehalt hat (Abb. 25A, Vergleich der schwarzen Balken mit den weißen Balken). Somit reagiert CDNB vollständig mit dem Glutathion aus der Matrix.



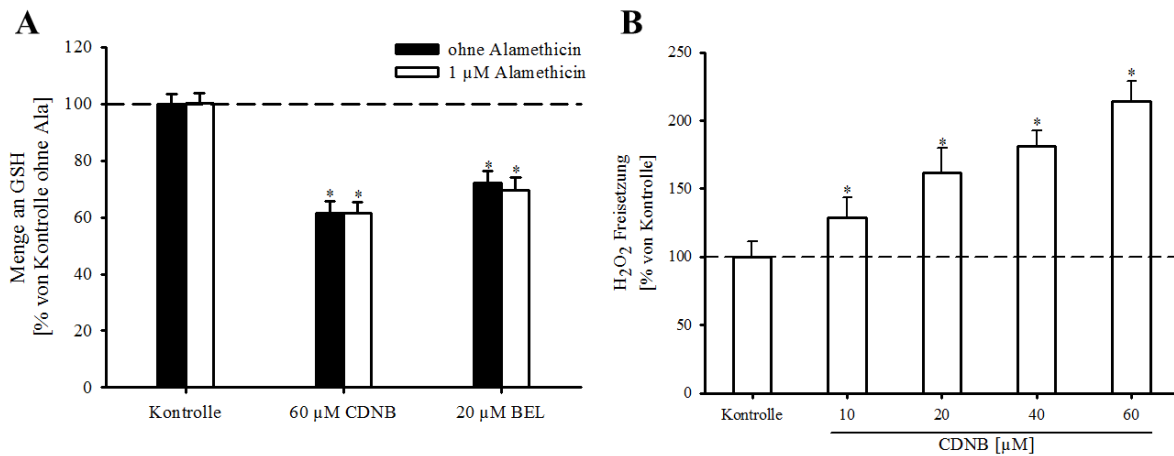


Abbildung 25: Wirkung von CDNB und BEL auf den GSH-Gehalt der RBM

RBM (5 mg/ml) wurden für 2 min mit verschiedenen CDNB-Konzentrationen (Positivkontrolle) bzw. mit BEL (20 µM) für 20 min bei 25°C inkubiert. **A** Spektrophotometrische Bestimmung GSH mit einem ELISA-Reader. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels einer GSH-Eichkurve. Die ermittelten GSH-Gehalte wurden auf den mitochondrialen Proteingehalt normiert. Die Balken zeigen den GSH-Gehalt von CDNB-behandelten (60 µM) bzw. BEL-behandelten (20 µM) RBM an. Zusätzlich wurde die RBM mit Alamethicin (1 µM) permeabilisiert (weiße Balken). Alamethicin hatte keinen Einfluss auf den GSH-Gehalt in den BEL- bzw. CDNB-behandelten RBM (Vergleich schwarze und weiße Balken). **B** Erhöhung der mitochondrialen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung durch CDNB. CDNB-behandelten RBM (0,2 mg/ml) wurden in Hirnkubationsmedium (5 mM Succinat) suspendiert und die Resorufin Fluoreszenz gemessen. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Mitochondrienpräparationen ± SEM (\*P < 0,05 in Bezug auf Kontrolle ohne Alamethicin).

### 3.2.4 Depolarisation der RBM durch BEL

Wenn infolge der BEL-Inkubation der RBM eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung durch eine verminderte "Milde Entkopplung" verursacht wird, ist anzunehmen, dass BEL den Polarisationszustand der IMM beeinflusst. Deshalb wurde ein möglicher Einfluss von BEL auf das  $\Delta\psi_m$  bestimmt. Abbildung 26 zeigt die  $\Delta\psi_m$ -abhängige Akkumulation des membranpermeablen kationischen Farbstoffs Safranin O durch die RBM. Der Zusatz der RBM zum Safranin O-enthaltenen Hirnkubationsmedium verursacht eine drastische Erniedrigung der Safranin O-Fluoreszenz. Diese Erniedrigung wird durch die Aufnahme des Safranin O in das Matrix-Kompartiment der RBM verursacht. Um eine mögliche Wirkung von BEL auf das  $\Delta\psi_m$  zu untersuchen, wurden die RBM zuerst 20 min mit BEL (Abb. 26B) inkubiert und danach die Akkumulation von Safranin O gemessen. Nach Erreichen einer konstanten Fluoreszenz wurden die unbehandelten RBM bzw. die BEL-behandelten RBM durch Zusätze des potenten Entkopplers FCCP schrittweise depolarisiert. Durch die FCCP-induzierte Entkopplung der RBM wird das akkumulierte Safranin O freigesetzt (Abb. 26A und B). Um die unbehandelten RBM komplett zu depolarisieren, musste eine Konzentration von 200 nM FCCP zugesetzt werden (Abb. 26A). Im Vergleich dazu war bei den BEL-behandelten RBM die Hälfte der FCCP-Konzentration (100 nM) ausreichend, um einen kompletten

Zusammenbruch des Potentials hervorzurufen (Abb. 26B). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass BEL eine partielle depolarisierende Wirkung auf die IMM der RBM hat. Um die Frage zu klären, ob BEL eine direkte akute Wirkung auf das  $\Delta\psi_m$  ausübt, wurde BEL zu den RBM direkt in das Hirnkubationsmedium gegeben (Abb. 26C). Dabei ergab sich keine Veränderung der Safranin O-Fluoreszenz. Somit wird die depolarisierende Wirkung des BEL durch die Vorbehandlung verursacht.

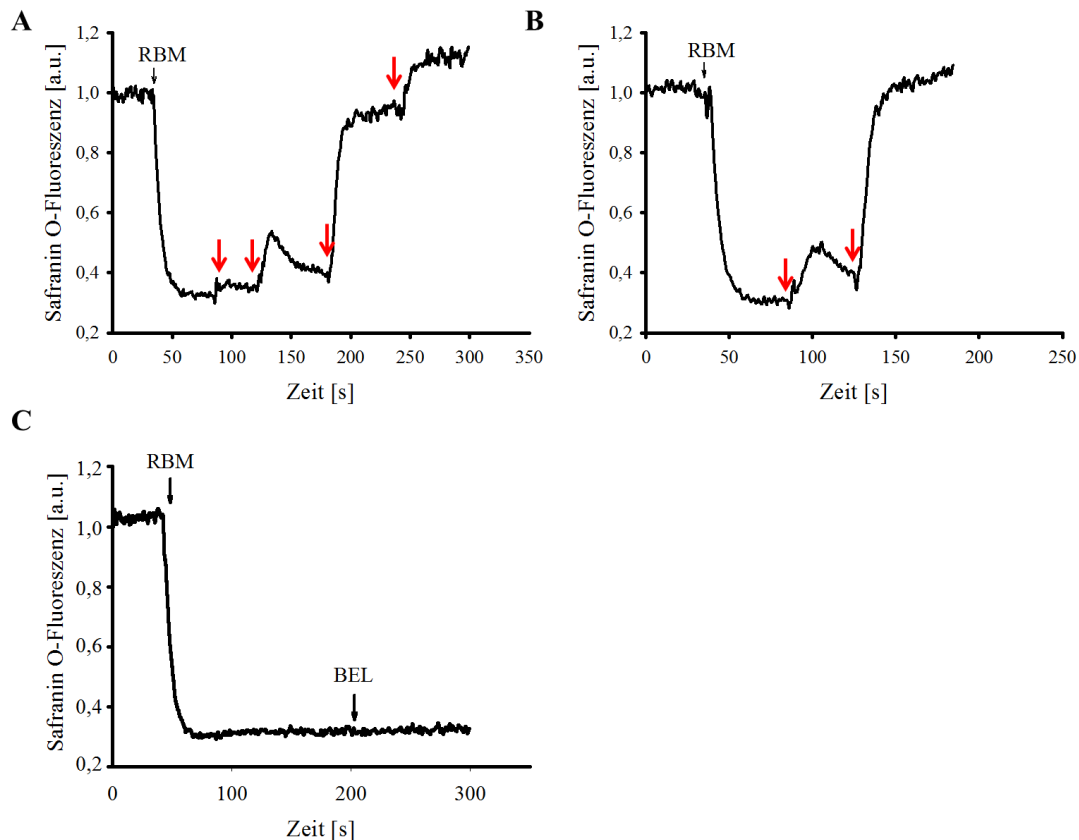


Abbildung 26: Schrittweise Erniedrigung des Polarisationszustandes isolierter RBM mit FCCP (rote Pfeile)

Die RBM-Suspension (5 mM Glutamat/5 mM Malat) wurde mit 0,05 % EtOH ( $v/v$ ) (Lösungsmittel für BEL; A) bzw. 5  $\mu$ M BEL (B) für 20 min bei 25°C vorbehandelt. Das  $\Delta\psi_m$  der IMM wurde über die Akkumulation von Safranin O (5  $\mu$ M) bestimmt. **A** Die Reduzierung der Safranin O-Fluoreszenz nach der Zugabe der unbehandelten RBM (0,5 mg/ml) zeigt den Polarisationszustand der IMM an. Die 4-malige FCCP-Zugabe (je 50 nM FCCP) führte zu einem kompletten Zusammenbruch des  $\Delta\psi_m$ , wodurch die Fluoreszenz ansteigt. **B** In den BEL-behandelten RBM führten schon 100 nM FCCP (2-malige Zugabe von 50 nM FCCP) zu einem kompletten Zusammenbruch. **C** Die akute Zugabe von BEL (5  $\mu$ M) zu den unbehandelten RBM verursachte keine Erhöhung der Fluoreszenz.

### 3.2.5 BEL erniedrigt die $\text{Ca}^{2+}$ -Retentionskapazität (CRC) der RBM

Die Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$  durch Mitochondrien wird maßgeblich von ihrem Polarisationszustand bestimmt. Deshalb wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Retentionskapazität (CRC – *calcium retention capacity*) von BEL-behandelten und unbehandelten RBM bestimmt. Für die Bestimmung der CRC wurde der Fluoreszenzfarbstoff CaGreen-5N verwendet, der membran-impermeabel ist und somit die extramitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium anzeigt. Die Bestimmung der CRC erfolgte durch wiederholte Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Aliquots (entsprechend 20 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg Protein) zu den energetisierten RBM. Nach dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Zusatz erhöht sich zunächst die CaGreen-5N Fluoreszenz. Die vollständige  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch die RBM erniedrigt die Fluoreszenz bis auf den Ausgangswert. Mit dem Erreichen der CRC wird die mPTP geöffnet, was die vollständige Freisetzung des akkumulierten  $\text{Ca}^{2+}$  verursacht. Die unbehandelten RBM (Abb. 27A, Kurve a) waren in der Lage, mehr als 140 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg Protein zu akkumulieren. In Anwesenheit des mPTP-Inhibitors Cyclosporin A wurde eine deutlich erhöhte CRC (340 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg Protein) gemessen (Abb. 27A, Kurve b). Die Vorinkubation mit R-BEL (Abb. 27A, Kurve c) oder S-BEL (Abb. 27A, Kurve d) erniedrigt die CRC auf ca. 40 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg Protein. Die Behandlung mit den BEL-Enantiomeren bewirkte außerdem eine verlangsamte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme. Dies wird dadurch deutlich, dass der Ausgangswert nach der zweiten  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe nicht mehr erreicht wurde und schon nach der dritten  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe die Öffnung der mPTP erfolgte (Abb. 27A). Unter diesen Bedingungen betrug die CRC  $23\% \pm 4,1$  bzw.  $28\% \pm 7,1$  im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 27B). Außerdem bewirkte die BEL-Behandlung die Erniedrigung der CRC auch in Gegenwart von CsA (Abb. 27A, Kurve e).

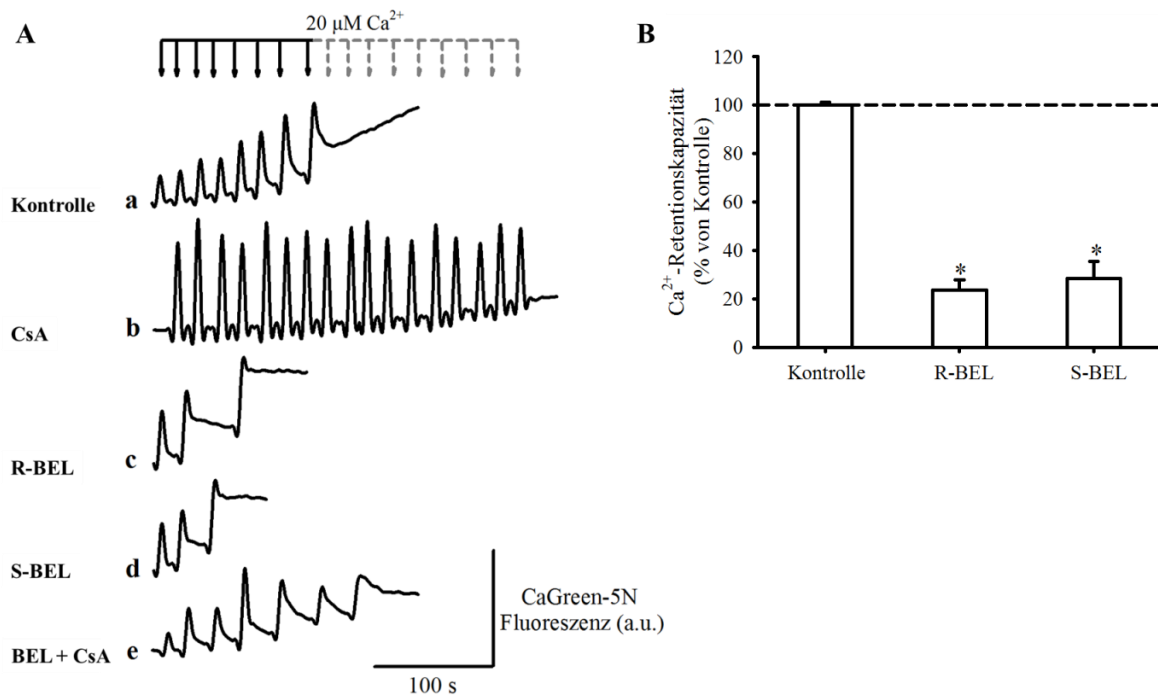


Abbildung 27: Einfluss von BEL auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Retentionskapazität (CRC) von RBM

RBM wurden mit R-BEL (5  $\mu\text{M}$ ) bzw. S-BEL (5  $\mu\text{M}$ ) für 20 min bei 25°C vorbehandelt. Nach der Inkubation wurden die RBM (1 mg/ml Protein) im Hirninkubationsmedium (5 mM Glutamat/5 mM Malat) suspendiert. Zusätzlich wurden 5  $\mu\text{M}$  CsA (Kurven b und e) in das Medium gegeben. Die CRC wurde fluorimetrisch durch die wiederholte Zugabe von 20 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg Protein bestimmt. CsA erhöhte die CRC (Kurve b). Die Inhibierung der mPTP in CsA-behandelten RBM wird BEL teilweise aufgehoben (Kurve e). **A** Repräsentative Beispielkurven (a Kontrolle, b CsA, c R-BEL, d S-BEL und e BEL (Racemat) plus CsA) der Fluoreszenzmessung mit dem Farbstoff CaGreen-5N (100 nM). Die Kurven zeigen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium. **B** Gesamtkalkulation der CRC für die in der Kurven a, c und d gezeigten Ansätze. Die gestrichelte Linie zeigt die CRC unter Kontrollbedingungen (0,01% EtOH (v/v)). Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils 3 unabhängigen Mitochondrienpräparationen  $\pm$  SEM. (\* $P < 0,05$  in Bezug auf Kontrolle)

### 3.2.6 Die Wirkung von BEL auf die Atmung von RBM

Zusätzlich zur Bestimmung des Polarisationszustandes der IMM und CRC wurde ein möglicher Einfluss von BEL auf die kontrollierte Atmung (State 4-Atmung, Ruheatmung) und die aktive Atmung (State 3-Atmung) der RBM bestimmt. Hierzu wurden die RBM mit R-BEL bzw. S-BEL für 20 min behandelt. In Abbildung 28A ist zu sehen, dass die Zugabe der RBM zum Hirnkubationsmedium (5 mM Glutamat/5 mM Malat) zu einer langsamen, stationären Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration führt. Dieser O<sub>2</sub>-Verbrauch entspricht der Ruheatmung. Durch die Zugabe von ADP wird die aktive Atmung ausgelöst, wodurch der O<sub>2</sub>-Verbrauch stark erhöht wird. Bei den mit BEL-behandelten RBM ist die kontrollierte Atmung geringfügig, aber statistisch signifikant erhöht (Kontrolle  $11,6 \pm 2,1$ ; 5  $\mu$ M R-BEL  $14,2 \pm 2,6$  und 5  $\mu$ M S-BEL  $13,5 \pm 2,9$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg Protein).

Im Gegensatz dazu wird die aktive Atmung stark erniedrigt (Kontrolle  $92,2 \pm 15,4$ ; 5  $\mu$ M R-BEL  $63,8 \pm 15,4$  und 5  $\mu$ M S-BEL  $59,3 \pm 11,9$  nmol O<sub>2</sub>/min/mg Protein). Mit diesen Werten wurde der RCI-Wert (RCI - *respiratory control index*) berechnet. Der RCI ist der Indikator für die funktionelle Intaktheit und entspricht dem Verhältnis der aktiven Atmung zur kontrollierten Atmung. Dieser RCI-Wert wird im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte RBM) sowohl durch die Behandlung mit R-BEL als auch S-BEL um mehr als 40% reduziert (Kontrolle  $7,9 \pm 1,4$ ; 5  $\mu$ M R-BEL  $4,4 \pm 1,9$  und 5  $\mu$ M S-BEL  $4,1 \pm 1,6$ ) (Abb. 28B).

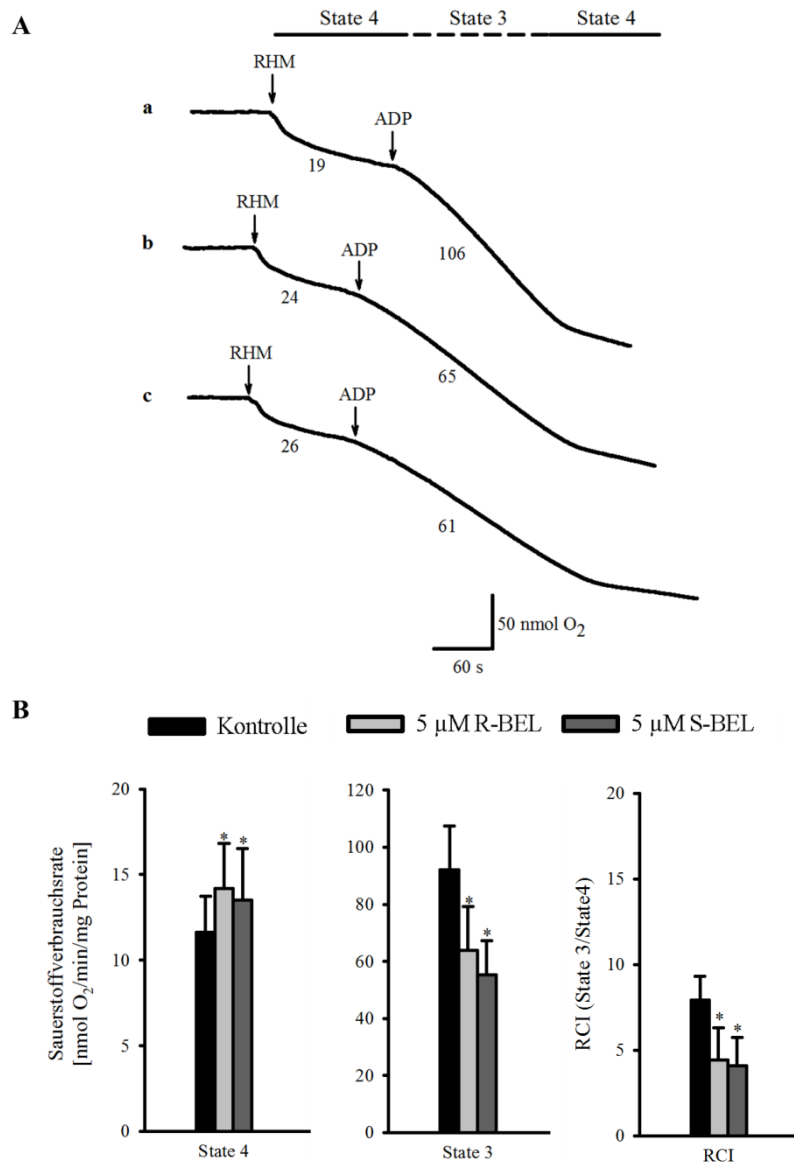


Abbildung 28: Wirkung von R-/S-BEL auf die State 4- und State 3-Atmung der RBM

**A** Repräsentative Beispielkurven der polarographischen Sauerstoffkonzentrationsmessungen. RBM wurden mit 5 μM R-BEL (Kurve b) bzw. 5 μM S-BEL (Kurve c) für 20 min bei 25°C vorinkubiert. Aliquote der RBM wurden im Hirnkubationsmedium (5 mM Glutamat/5 mM Malat) suspendiert (0,5 mg/ml). Die Kurve a zeigt ein Beispiel unter Kontrollbedingungen (0,01% EtOH (v/v)) an. Die Zugabe der RBM bewirkt eine langsame Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium (State 4-Atmung). Durch die Zugabe von ADP (2 mM) wird die State 3-Atmung (oxidative Phosphorylierung) stimuliert. Die Werte der Sauerstoffverbrauchsrate (nmol/[min\*mg Protein]) sind an den Kurven angetragen. **B** Zusammenfassung der Daten aus 3 unabhängigen Mitochondrienpräparationen ± SEM. (\*P < 0,05 in Bezug auf die jeweilige Kontrolle)

Grundsätzlich zeigen die gemessenen Veränderungen der Membranpolarisation, der Erhöhung der basalen Atmung sowie der Ca<sup>2+</sup>-Retentionskapazität, dass der iPLA<sub>2</sub>-Inhibitor BEL eine depolarisierende Wirkung auf die RBM besitzt.

### 3.2.7 Das mitochondriale Schwellverhalten nach der BEL-Behandlung

Infolge einer Depolarisierung der IMM kommt es zur Öffnung der mPTP (Bernardi and Forte, 2007). Im Allgemeinen ist die mPTP für die Einleitung von irreversiblen mitochondrialen Schädigungsmechanismen bekannt. Diese Schädigungen sind vor allem begleitet von funktionellen Störungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, Erhöhung des mitochondrialen Schwellverhaltens sowie die Produktion und Freisetzung von ROS (Bernardi et al., 1999, Andreyev et al., 2005 und Rizzuto et al., 2012). In den vorhergehenden Experimenten (Kapitel 3.2.1) konnte gezeigt werden, dass die  $\text{iPLA}_2$ -Aktivität nach der Applikation von  $\text{Ca}^{2+}$  deutlich ansteigt und dieser Effekt durch die BEL-Behandlung unterdrückt wird. In diesem Zusammenhang sollte ein möglicher Einfluss der  $\text{iPLA}_2$ -Aktivität auf das Schwellverhalten von Hirnmitochondrien untersucht werden. Da das Schwellverhalten in isolierten Mitochondrien aus Gesamthirn sehr gering war (Daten werden nicht gezeigt), wurden die RBM über einen Percoll-Gradienten in nicht-synaptische und synaptische Mitochondrien aufgetrennt. Die verschiedenen Mitochondrienfraktionen wurden für 20 min mit BEL bei  $25^\circ\text{C}$  behandelt und anschließend das mitochondriale Schwellverhalten gemessen. Bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 800 nmol/mg Protein wurde die maximale Schwellung der Hirnmitochondrien initiiert. Die Abbildung 29 zeigt eine Reduzierung der Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 540 nm. Bei der mPTP-Öffnung kommt es zu einem Anschwellen der Mitochondrien, was sich in der Abnahme der Absorption bemerkbar macht. Das Schwellverhalten der nicht-synaptischen Mitochondrien war deutlich geringer im Vergleich zu den synaptischen Mitochondrien (Abb. 29A und B). Die BEL-Behandlung bewirkte ein langsames Anschwellen bei beiden Mitochondrienfraktionen. Zur besseren Verdeutlichung des Schwellverhaltens in den Hirnmitochondrien wurde der Zeitraum bis zum Erreichen von 50% der maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung berechnet (Abb. 29C). Dabei wurde deutlich, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte mPTP sich in den nicht-synaptischen Mitochondrien um das 2-fache schneller öffnet als in den synaptischen Mitochondrien. In beiden Mitochondrienfraktionen hemmte die BEL-Behandlung die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte mPTP ( $t_{50\%}$  mPT: nicht-synaptisch RBM unbehandelt 38 s, BEL-behandelt 55 s, synaptische RBM unbehandelt 75 s, BEL-behandelt 90 s). Jedoch war der BEL-Effekt bei den nicht-synaptischen RBM um 32% stärker als bei den synaptischen RBM. Da lag der BEL-Effekt lediglich bei 21% (spiegelt das Verhältnis der unbehandelten zu den BEL-behandelten der jeweiligen RBM wider).

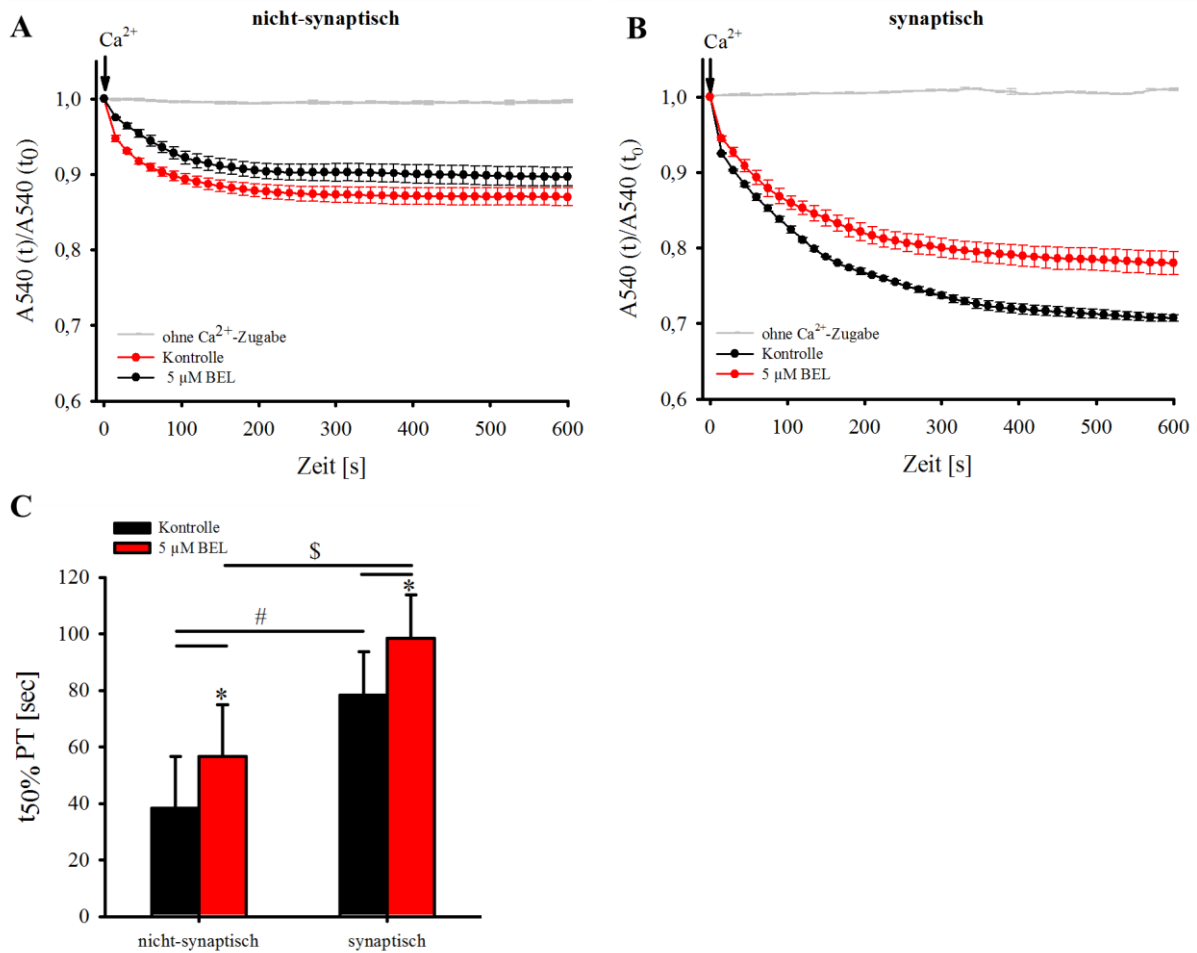


Abbildung 29: Schwellverhalten der BEL-behandelten RBM im Vergleich der synaptischen vs. nicht synaptischen RBM

Die RBM wurden über einen Percoll-Gradienten in synaptische und nicht-synaptische Mitochondrien aufgetrennt. Die verschiedenen isolierten RBM wurden mit R-BEL (5  $\mu$ M) oder S-BEL (5  $\mu$ M) für 20 min bei 25°C behandelt. Nach der Inkubation wurden die verschiedenen Mitochondrien (0,5 mg/ml Protein) in Hirnkubationsmedium (5mM Glutamat/5 mM Malat) suspendiert. Das Öffnen der mPTP wurde durch die Zugabe von 800 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg Protein (A und B, Pfeil) initiiert resultierend in der Schwellung der Mitochondrien. Die Schwellung der Mitochondrien wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. **A** Schwellverhalten der nicht-synaptischen RBM. Vergleich der BEL-behandelten nicht-synaptischen RBM (rote Kurve) vs. nicht-synaptischen RBM (schwarze Kurve) unter Kontrollbedingungen (0,01% EtOH ( $v/v$ )). Die graue Linie zeigt das basale Schwellverhalten der nicht-synaptischen RBM an (keine Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ ). **B** Schwellverhalten der synaptischen RBM. Vergleich der BEL-behandelten synaptischen RBM (rote Kurve) vs. synaptischen RBM (schwarze Kurve) unter Kontrollbedingungen (0,01% EtOH ( $v/v$ )). Die graue Linie zeigt das basale Schwellverhalten der synaptischen RBM an (keine Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ ). **A + B** Darstellung der „smooth fitting“ Kurven (Microsoft Excel) aus den Mittelwerten von 3 unabhängigen Präparationen  $\pm$  SEM. **C** Analyse der Zeit bis zum Erreichen von 50% der maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung ( $t_{50\%}$  PT). (\* $P < 0,05$  in Bezug auf die jeweilige Kontrolle, # $P < 0,05$  in Bezug auf Kontrolle der nicht-synaptischen RBM, § $P < 0,05$  in Bezug auf BEL-behandelte synaptische RBM)



### 3.2.8 Einfluss von BEL auf die Aktivitäten der Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette

#### 3.2.8.1 NADH-Cytochrom c-Reduktase Aktivität

Im Abschnitt 3.2.6 wurde gezeigt, dass die State 3-Atmung der BEL-behandelten RBM deutlich reduziert ist (Abb. 28B). Deshalb wurden die Aktivitäten der Komplexe I und III (NADH-Oxidase und Cytochrom c-Reduktase) in BEL-behandelten RBM bestimmt. Durch NADH wurde die Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  initiiert und Elektronen in den Q-Zyklus eingespeist. Dadurch kommt es zur Reduktion von oxidiertem Cytochrom c durch die Cytochrom c-Reduktase. Nach der Behandlung mit R-BEL bzw. S-BEL (Abb. 30) konnte kein signifikanter Unterschied der Komplex I/III-Aktivität im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet werden (Komplex I/III-Aktivität nach R-BEL bzw. S-BEL Behandlung:  $98,4\% \pm 1,5$  und  $96,3\% \pm 1,2$ ). Zur Positivkontrolle wurden die RBM mit Rotenon, einem selektiven Komplex I-Inhibitor, behandelt (Darrouzet et al., 1998). Erstaunlicherweise verursachte Rotenon eine Reduzierung der Komplex I-Aktivität von nur 68% (Komplex I/III-Aktivität mit Rotenon:  $31,6\% \pm 1,4$ ). Die Restaktivität von 32% lässt vermuten, dass es sich um die Enzymaktivität der Rotenon-insensitiven NADH-Q Oxidoreduktase handelt.

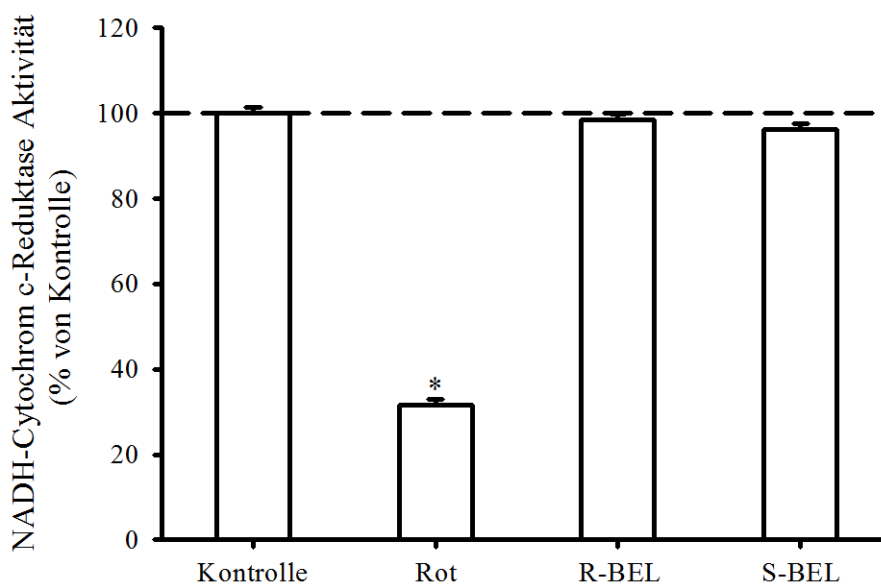


Abbildung 30: Enzymaktivität von Komplex I/III in BEL-behandelten RBM

RBM wurden mit R-BEL (5  $\mu\text{M}$ ) bzw. S-BEL (5  $\mu\text{M}$ ) für 20 min bei 25°C vorbehandelt. Nach der Inkubation wurden die mit Stickstoff permeabilisierten RBM (0,05 mg/ml Protein) im Inkubationsmedium suspendiert. Als Positivkontrolle wurde Rotenon (10  $\mu\text{M}$ ) zum Medium gegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 mM NADH gestartet. Die Reduktion des Cytochrom c durch die NADH-Cytochrom c-Reduktase wurde als Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 550 nm und bei einer Temperatur von 25°C für 5 min gemessen. Die gestrichelte Linie zeigt die Komplex I/III-Aktivität unter Kontrollbedingungen (0,01% EtOH (v/v)). Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Mitochondrienpräparationen  $\pm$  SEM (\*P < 0,05 in Bezug auf Kontrolle).

### 3.2.8.2 Cytochrom c-Oxidase (COX) Aktivität

RBM wurden mit R-BEL bzw. S-BEL für 20 min bei 25°C behandelt. Zur Messung der COX-Aktivität wurde zu den im Messmedium suspendierten RBM reduziertes Cytochrom c (Ferrocytochrom c) zugesetzt und die Absorptionsänderung bei 550 nm gemessen. Die Behandlung mit den beiden BEL-Enantiomeren verursachte eine signifikante Inaktivierung der COX-Aktivität um ca. 30% (Abb. 31 Komplex IV-Aktivität nach R-BEL bzw. S-BEL Behandlung: 73,6% ± 1,2 bzw. 70,7% ± 1,1). Als Positivkontrolle wurde der COX-Inhibitor KCN dem Medium zugesetzt, wodurch sich die Enzymaktivität um 90% verminderte (Abb. 31 Komplex IV-Aktivität nach KCN Applikation: 10,1% ± 1,1). Die Zugabe des Komplex I-Inhibitor Rotenon hatte keinen Einfluss auf die COX-Aktivität (Komplex IV-Aktivität nach Rotenon Applikation: 100,5% ± 1,1).

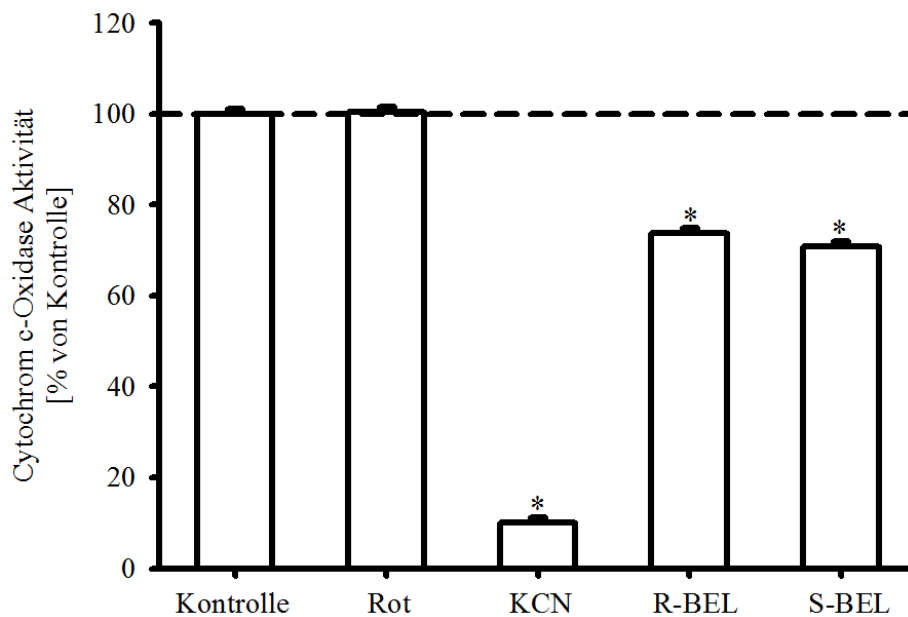


Abbildung 31: Einfluss von BEL auf die Enzymaktivität von Komplex IV

RBM wurden mit R-BEL (5 µM) bzw. S-BEL (5 µM) für 20 min bei 25°C vorbehandelt. Nach der Inkubation wurden die RBM (0,1 mg/ml Protein) im Inkubationsmedium suspendiert. Als Positivkontrolle wurde KCN (5 mM) hinzugegeben. Die Negativkontrolle wurde mit Rotenon (10 µM) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl Ferrocytochrom c gestartet. Die Cytochrom c-Oxidase (COX)-Aktivität wurde als Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 550 nm und bei einer Temperatur von 25°C gemessen. Die gestrichelte Linie zeigt die COX-Aktivität unter Kontrollbedingungen (0,01% EtOH (v/v)). Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Mitochondrienpräparationen ± SEM (\*P < 0,05 in Bezug auf Kontrolle).

### 3.3 Mausmodell – *Pla2g6*inaktive Maus

In Anlehnung an die zuvor beschriebenen Ergebnisse (siehe Kapitel 3.2.1) wurde zusätzlich die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in isolierten energetisierten Hirnmitochondrien aus Maus untersucht. Die *Pla2g6*inaktive Maus (Stamm C57BL/6) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe K.L. Seburn des Jackson Laboratoriums aus Bar Harbor zur Verfügung gestellt. Daraufhin wurde im Institut eine eigene Zuchtlinie angelegt. Der Mausstamm trägt eine einzelne Punktmutation, welche einen Aminosäureaustausch von Glycin (G) zu Arginin (R) an Position 373 (G373R) verursacht. Diese Mutation ist auf der konservierten Ankyrindomäne im *Pla2g6*-Gen auf Chromosom 22q12-q13 lokalisiert. Das *Pla2g6*-Gen kodiert für die Gruppe der Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen Phospholipase VIA. Diese Punktmutation verursacht eine Inaktivierung des VIA iPLA<sub>2</sub>-Enzyms (Wada et al., 2009). Diese Art von Mutation wurde in Patienten entdeckt, die an der Infantilen Neuroaxonalen Dystrophie (INAD) erkrankt sind (Morgan et al., 2006). Dabei handelt es sich um eine unheilbare neurologische Erkrankung, auch bekannt als Seitelberger-Erkrankung. Mit dem Beginn von leichtem Zittern setzten bei diesen Mäusen die ersten Krankheitssymptome ab dem 3. Lebensmonat ein. Eine Verstärkung der Symptome erfolgte recht zügig mit Gewichtsverlust, Einschränkung des Bewegungsapparates bis hin zum Tod.

#### 3.3.1 Genotypisierung

Bei diesem Mausmodell handelt es sich um einen dominant-rezessiven Erbgang. Die mutagene Erbanlage mit der Punktmutation wird rezessiv und die gesunde Erbanlage dominant vererbt. Für die Verpaarung wurden heterozygote Tiere verwendet, d.h. beide Elternpaare (F<sub>1</sub>-Generation) wiesen sowohl eine „kranke“ und eine „gesunde“ Erbanlage auf und waren somit phänotypisch gesund. Die Verpaarung mit homozygoten Mutanten war nicht möglich, da diese Tiere vor dem fortpflanzungsfähigen Alter starben. Die Vererbung erfolgte klassisch nach den Mendel'schen Gesetzen (Abbildung 32). Durchschnittlich waren 25% der F<sub>2</sub>-Generation reinerbig mit zwei rezessiven „kranken“ Erbanlagen und zeigten dementsprechend eine pathologische Merkmalsausprägung. Die anderen 75% zeigten im dominant-rezessiven Erbgang den Phänotyp der dominanten „gesunden“ Erbanlage (Abb. 32).

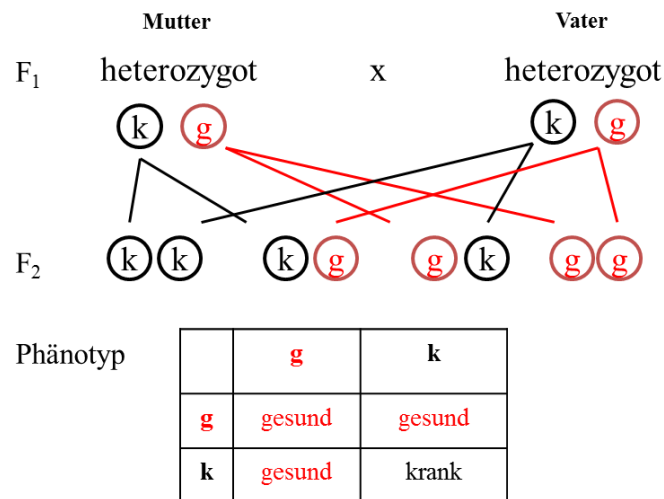


Abbildung 32: Klassische Regeln der Mendel'schen Gesetze

Elterngeneration (F<sub>1</sub>-Generation) sind beide heterozygot, d.h. beide beinhalten jeweils eine „kranke“ rezessive (schwarz) und „gesunde“ dominante (rot) Erbanlage und waren somit phänotypisch gesund. In der F<sub>2</sub>-Generation waren phänotypisch 75% der Mäuse gesund und 25% krank. Genotypisch waren 25% der Mäuse krank, 25% gesund und 50% Konduktoren.

Für weitere wissenschaftliche Untersuchungen kamen ausschließlich homozygote Wildtypen (als Kontrollmaus) bzw. homozygote Mutanten zum Einsatz. Hierzu musste die Nachkommenschaft der Elterngeneration genotypisiert werden. Für die genaue Detektion der Punktmutation wurden separate PCR-Reaktionen für das jeweilige Wildtyp-Allel bzw. Mutanten-Allel durchgeführt, da die Reaktionsprodukte jeweils bei ~200 bp lagen. Hierzu wurden gemeinsame *forward* Primer verwendet. Die Verwendung der *reverse* Primer erfolgte gesondert für jedes Allel, Wildtyp bzw. Mutante (siehe Kapitel 2.2.3.1). Der *reverse* Primer des mutagenen Allels weist einen Nukleotidaustausch (C-T) auf, welcher der Punktmutation an Position 373 entspricht. Die entstandenen PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese nach Größe getrennt und sind in der Abbildung 33 dargestellt. Auf der linken Spur wurde das PCR-Produkt der Primer (*Pla2g6-fv* + *WT-Pla2g6-rv*) aufgetragen, die für das Wildtyp-Allel kodieren und auf der rechten Spur wurde demzufolge das PCR-Produkt der Primer (*Pla2g6-fv* + *MT-Pla2g6-rv*) aufgetragen, die für das Mutanten-Allel kodieren (abb. 33). Bei der Detektion beider Allelen handelte es sich um heterozygote (ht) Mäuse. Wenn jeweils nur ein Produkt zu sehen war, handelte es sich um homozygote Mäuse, Wildtyp bzw. Mutante.

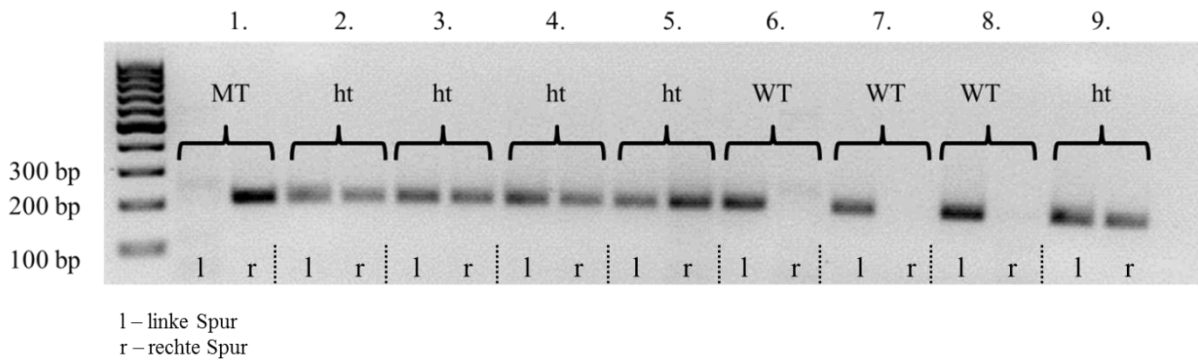


Abbildung 33: RT-PCR-Produkte der *Pla2g6*inaktiven Maus

Auftrennung der RT-PCR-Produkte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Nach der Isolierung der genomischen DNA aus Maushirn (C57BL/6) wurde diese mit verschiedenen Primerpaaren mittels PCR-Reaktion amplifiziert. Die Primerpaare detektieren entweder die Wildtyp-Allele (siehe linke Spur) oder die Mutante-Allele (siehe rechte Spur). Die Detektion beider PCR-Produkte in einer Probe (Schwanzbiopsie) signalisiert, dass es sich um heterozygote (ht) Mäuse handelt. Bei Erscheinen von nur einem Produkt handelte es sich um homozygote Mäuse, entweder den Wildtyp (linke Spur) bzw. die Mutante (rechte Spur). Die Reaktionsprodukte liefen bei  $\sim 200$  bp.

### 3.3.2 PLA<sub>2</sub>-Aktivität in energetisierten Hirnmitochondrien der Maus

Die Gesamt-PLA<sub>2</sub>-Aktivität wurde in Hirnmitochondrien von Mäusen unterschiedlichen Alters untersucht und miteinander verglichen. Hierzu wurden die Enzymaktivitäten in isolierten Hirnmitochondrien aus Mäusen im Alter von 1,5 Monaten und 3,5 Monaten, wie unter Materialien und Methoden beschrieben, gemessen. Die Enzymaktivität der jeweiligen Wildtyp-Mäuse wurde auf 100% normiert und gibt den Wert für die gesamte PLA<sub>2</sub>-Aktivität der gesunden Mäuse an. Bei den 1,5 Monate alten Mäusen war die PLA<sub>2</sub>-Aktivität der kranken Mäuse lediglich um  $10\% \pm 19,1$  verringert im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (PLA<sub>2</sub>-Aktivität auf  $100\% \pm 15,6$  normiert) (Abb. 34, weiße Balken). Hingegen wurde bei den älteren Mäusen (Abb. 34, graue Balken) eine signifikante Inaktivierung der Enzymaktivität (PLA<sub>2</sub>-Aktivität der *Pla2g6*inaktiven Maus:  $43,8\% \pm 18,9$ ) in den Mitochondrien der Mutanten festgestellt. Demnach ist zu spekulieren, dass es womöglich einen Zusammenhang zwischen der Reduzierung der VIA iPLA<sub>2</sub>-Aktivität und dem Einsetzen der Krankheitssymptome ab dem 3. Lebensmonat gibt.

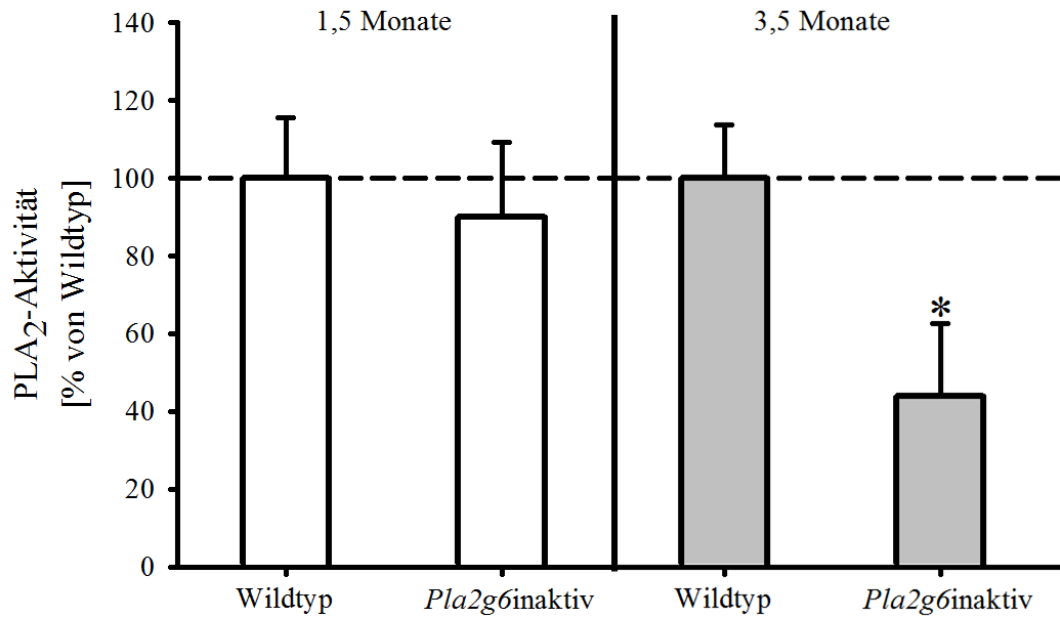


Abbildung 34: Vergleich der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Hirnmitochondrien von 1,5 Monate und 3,5 Monate alten Wildtyp- und *Pla2g6*inaktiven Mäusen

Isolierte Hirnmitochondrien (1 mg/ml Protein) wurden in Hirnkubationsmedium (enthält zusätzlich 5 mM Glutamat und 5 mM Malat) suspendiert. Anschließend wurde die PLA<sub>2</sub>-Aktivität radioaktiv gemessen. Die Messung der Aktivität ist in Materialien und Methoden (Kapitel 2.2.4) beschrieben. Die gestrichelte Linie ist die Enzymaktivität in % der jeweiligen gleichaltrigen Wildtyp-Maus. Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Mitochondrienpräparationen ± SEM. (\*P < 0,05 in Bezug auf die jeweilige gleichaltrige Wildtyp-Maus)

## 4 DISKUSSION

Für das Hirngewebe ist ein hoher Sauerstoffverbrauch mit folgender Entstehung von ROS charakteristisch. Andererseits ist die antioxidative Kapazität des Hirngewebes niedrig, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer peroxidativen Schädigung der PUFA sehr hoch ist (Cabezas et al., 2012). Der hohe Anteil an iPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Gehirn und die Tatsache, dass die iPLA<sub>2</sub> hydrolytisch ungesättigte Fettsäuren aus Membranlipiden freisetzt, wurde genutzt um die physiologische Funktion der iPLA<sub>2</sub> gegenüber oxidativem Stress in Astrozyten und isolierten Rattenhirnmitochondrien näher zu untersuchen.

### 4.1 Physiologische Bedeutung der iPLA<sub>2</sub> in Astrozyten bei ROS-Bildung und Zelltod

Für die experimentellen Untersuchungen der postulierten antioxidativen Wirkung der iPLA<sub>2</sub> wurden Astrozyten aus Rattenhirn verwendet. Neben den Glia- und Mikrogliazellen stellen die Astrozyten den häufigsten Zelltyp im Gehirn von Säugetieren dar. Dabei handelt es sich um hoch organisierte Zellen, die in einem synzytialen Netzwerk miteinander verbunden sind (Cabezas et al., 2012, Chen und Swanson, 2003). Versorgung und Schutz der Neuronen durch Astrozyten sind von grundlegender Bedeutung für die Energiebilanz des Gehirns und die Verfügbarkeit von Antioxidantien, die auch zum neuronalen Schutz vor oxidativen Schäden beitragen (Cabezas et al., 2012). Astrozyten sind im Vergleich zu den Neuronen widerstandsfähiger gegen oxidativen Stress. Neuronen besitzen eine begrenzte antioxidative Kapazität, haben einen höheren Sauerstoffumsatz und sind zudem von den Astrozyten abhängig (Cabezas et al., 2012, Hamby und Sofroniew, 2010). Von zentraler Bedeutung für eine erhöhte ROS-Bildung ist ein defekter Komplex I in der mitochondrialen Atmungskette. Es sind verschiedene spezifische neurotoxische Hemmstoffe von Komplex I bekannt, wie z.B. Rotenon, die erfolgreich als Modell für oxidativen Stress in Zell- und Tiermodellen verwendet werden (Betarbet et al., 2000). Rotenon blockiert den Elektronentransfer innerhalb von Komplex I. Durch den dadurch verursachten „Elektronenstau“ wird die Wahrscheinlichkeit für den Ein-Elektronenübergang auf O<sub>2</sub> erhöht und somit die Bildung von Superoxiden verstärkt. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Astrozyten mit Rotenon behandelt und der Einfluss einer pharmakologischen Hemmung der iPLA<sub>2</sub>-Isoformen mit den BEL-Enantiomeren auf die ROS-Produktion und deren Auswirkungen auf die Lipidperoxidation sowie die LDH- und Cytochrom c-Freisetzung in diesen Zellen untersucht.

#### 4.1.1 iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Astrozytenkulturen

Die Bestimmung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in der Membranfraktion der Astrozyten ergab, dass die Inhibierung der verschiedenen iPLA<sub>2</sub>-Isoformen mit R- bzw. S-BEL deren Aktivitäten um mehr als 50% (Abb. 10) vermindern. Da die VIA iPLA<sub>2</sub> überwiegend im Cytosol lokalisiert ist und die VIB iPLA<sub>2</sub> membran-assoziiert ist, war eine höhere Aktivität der Gruppe VIB in der Astrozyten-Membranfraktion zu erwarten (Ma et al., 2011, Mancuso et al., 2000, Moon et al., 2012 und Williams and Gottlieb, 2002). Jedoch wurde zwischen den iPLA<sub>2</sub>-Isoformen kein signifikanter Unterschied in der Aktivitätserniedrigung beobachtet (Abb. 10). Dieses Ergebnis könnte damit zu erklären sein, dass die Gruppe der VIA möglicherweise auch in den Membranen von neuronalen Zellen vorkommt. Ebenfalls konnte die Gruppe der VIA schon in Mitochondrien von Insulinoma- und CHO-Zellen detektiert werden, wobei hier der genaue Lokalisationsort in den Mitochondrien dieser iPLA<sub>2</sub>-Isoform bisher noch ungeklärt ist (Seleznjev et al., 2006).

Rotenon-induzierter oxidativer Stress hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivitäten der iPLA<sub>2</sub>-Isoformen. Die Behandlung der Astrozyten mit Rotenon und der iPLA<sub>2</sub>-Inhibitoren hatte ebenso keine Wirkung auf die basale Enzymaktivität (Abb. 10, vierter und sechster Balken). Allerdings konnte in Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum von renalen proximalen Tubuluszellen eine erhöhte Expression der VIB iPLA<sub>2</sub> nach der Zugabe des Oxidationsmittels *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) gezeigt werden (Kinsey et al., 2008).

#### 4.1.2 Einfluss der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität auf die ROS-Produktion der Astrozyten

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die iPLA<sub>2</sub>-Enzyme eine protektive Funktion gegenüber oxidativem Stress haben. Abbildung 11 zeigt, dass die Vorinkubation der Astrozyten mit den iPLA<sub>2</sub>-Inhibitoren einen Anstieg der ROS-Produktion um 40% verursacht. Eine noch höhere ROS-Bildung wurde beobachtet, wenn die Astrozyten mit den iPLA<sub>2</sub>-Inhibitoren und dem Komplex I-Inhibitor Rotenon inkubiert wurden.

Die Untersuchungen zum Einfluss von oxidativem Stress auf die Astrozyten ergaben, dass der Gehalt an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) nach der pharmakologischen iPLA<sub>2</sub>-Inaktivierung mit den BEL-Enantiomeren erhöht war (Abb. 12). Somit kommt es bei iPLA<sub>2</sub>-Inaktivierung zur Stimulation der Lipidperoxidation. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass während der 6-stündigen Inkubation mit Rotenon bei einer gleichzeitigen Reduzierung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität die Lipidperoxidation noch weiter fortgeschritten war. Hingegen hatte eine 30-minütige Inkubation mit Rotenon keine verstärkende Auswirkung auf die Peroxidation der Lipide (Abb. 12).



Bei der Lipidperoxidation werden reaktive Aldehyde, wie das Malondialdehyd (MDA), das Acrolein und das 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) gebildet (Esterbauer et al., 1991 und Uchida, 2003). Generell binden Aldehyde kovalent an freie Aminogruppen von Proteinen, wodurch deren Funktion verändert wird (Adibhatla et al., 2003). Eine quantitative Analyse der Adduktbildung in der Cytosolfraction von Astrozyten zeigte, dass die 4-HNE Bande (Anlagerungsproteine) im Western-Blot nach der iPLA<sub>2</sub>-Inaktivierung während des Rotenon-induzierten oxidativen Stresses erhöht war (Abb. 13).

Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass für 4-HNE eine Aktivierung der Protonenleitfähigkeit der UCP-Proteine und des ANT diskutiert wird (Brand et al., 2004 und Echtay et al., 2003). Die Produktion von Superoxiden in der mitochondrialen ETK führt zu einer verstärkten Peroxidation der Membranlipide und somit zur Bildung des 4-HNE. Das entstandene Aldehyd induziert eine Entkopplung der IMM über die UCP und den ANT, welches ein Auslöser für den „*Mild Uncoupling*“ Effekt ist. Infolge der "Milden Entkopplung" kommt es zu einem erhöhten Elektronenfluss, und die Protonen können durch ein Protonenleck am ANT in den Matrixraum zurückfließen. Die Doppelbindungen und die Carbonylgruppe des Aldehyds sind essentiell für die Aktivierung der UCP (Brand et al., 2004 und Echtay et al., 2003). Aufgrund der Senkung des  $\Delta\psi_m$  und des Anstiegs des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches kommt es zu einer Reduzierung der ROS-Produktion.

### 4.1.3 Depolarisation und Freisetzung von Cytochrom c

Die Behandlung der Astrozyten mit den BEL-Enantiomeren oder mit Rotenon verursachte eine partielle Reduktion des  $\Delta\psi_m$  an der IMM (Abb. 14). Somit verursacht die Hemmung der iPLA<sub>2</sub> durch BEL eine partielle Depolarisation der IMM.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Erniedrigung des  $\Delta\psi_m$ , die oxidative ATP-Bildung verringert. Deshalb wurde die Zellviabilität bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Freisetzung der LDH aus den Astrozyten gemessen (Abb. 15). Die LDH ist ein lösliches, cytosolisches Enzym. Bei Verminderung der Membranintegrität von Zellen wird das Enzym ins Zellkulturmedium freigesetzt (Wolterbeek et al., 2005). Die LDH-Freisetzung wird nach der Behandlung mit den BEL-Enantiomeren erhöht. Diese Freisetzung wird zusätzlich durch eine vorangegangene Langzeitinkubation mit Rotenon nochmals verstärkt (Abb. 15). Bei einer Inkubation der Astrozyten nur mit Rotenon war erstaunlicherweise die LDH-Freisetzung im Vergleich zu der Kontrollinkubation sehr gering (Abb. 15). Eine mögliche Erklärung ist, dass die antioxidativen Schutzmechanismen der Astrozyten die erhöhte Rotenon-induzierte ROS-Bildung inaktiviert und eine erhöhte glykolytische ATP-Bildung den Ausfall der oxidativen ATP-Bildung kompensiert.

Zelltod kann entweder als Nekrose oder Apoptose auftreten. Die Apoptose kann entweder durch die Aktivierung von sogenannten Todesrezeptoren der Plasmamembran durch extrazelluläre Signale (extrinsischer Weg) oder auch durch intrazelluläre Prozesse (intrinsischer Weg) ausgelöst werden. Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion des intrinsischen Weges der Apoptose (Jiang und Wang, 2004). Beim intrinsischen Weg wird die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran durch oxidativen Stress oder durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Mitochondrien erhöht.

Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Mitochondrien führt zur Öffnung der mPTP. Hierbei ist bekannt, dass die Bcl-2 Proteine eine Schutzfunktion gegenüber der mPTP-Öffnung besitzen (Turrens, 2003, Jiang and Wang, 2004) und somit wichtige Modulatoren des intrinsischen Apoptose-Signalweges sind. Sie regulieren bei einer erhöhten ROS-Produktion die Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol. Unter physiologischen Bedingungen werden die pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax durch die Bindung an die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie inaktiviert, wodurch die Freisetzung von Cytochrom c verhindert wird (Chi et al., 2014, Harris and Thompson, 2000). Cytochrom c ist über die Bindung an Cardiolipin an der IMM fixiert. Diese Bindung wird durch Peroxidation des Cardiolipins gelöst, wodurch es zur Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol kommt (Nakagawa, 2004). Durch das freigesetzte Cytochrom c wird die Bildung des Apoptosoms ermöglicht, wodurch letztendlich die cytosolischen Caspase-Proteasen aktiviert werden (Kagan et al., 2005).

Es ist bekannt, dass die  $\text{iPLA}_2$  bei der Deacylierung von Cardiolipin eine entscheidende Rolle spielt. Bei einer Fehlfunktion der  $\text{iPLA}_2$  kommt es zu abnormalen Modifizierungen des Cardiolipins, wodurch letztendlich die Funktion und Struktur der Mitochondrien beeinträchtigt werden (Malhotra et al., 2009 und Ott et al., 2002, 2007)

In der vorliegenden Arbeit wurde in Astrozyten eine erhöhte Cytochrom c-Freisetzung unter Rotenon-induziertem oxidativen Stress bei einer gleichzeitigen Hemmung der  $\text{iPLA}_2$  mit BEL beobachtet (Abb. 16).

Diese beschriebenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die  $\text{iPLA}_2$  ein wichtiger antioxidativer Mediator in Astrozyten ist. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktionen eine wichtige Rolle spielt. Aus diesem Grund wurden für weitere Untersuchungen isolierte Rattenhirnmitochondrien verwendet, um eine mögliche physiologische Funktion der  $\text{iPLA}_2$ -Enzyme näher zu charakterisieren.

## **4.2 Mögliche physiologische Funktionen der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in energetisierten Rattenhirnmitochondrien**

### **4.2.1 iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in nativen, gekoppelten Hirnmitochondrien**

Da die Mitochondrien die Hauptproduzenten von oxidativem Stress in der Zelle sind, wurde die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> auch in isolierten Rattenhirnmitochondrien bestimmt. In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben über die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> in isolierten Mitochondrien (Gadd et al., 2006 und Rauckhorst et al., 2014). So wird berichtet, dass in energetisierten Lebermitochondrien im State 4 keine bzw. nur geringe Aktivität der iPLA<sub>2</sub> nachweisbar war, wohingegen die iPLA<sub>2</sub> durch Depolarisation der IMM stark aktiviert wird (Gadd et al., 2006, Rauckhorst et al., 2014). Außerdem wurde gezeigt, dass die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> durch oxidativen Stress erhöht wird (Jaburek et al., 2013, Jezek et al., 2010). Deshalb konzentrierten sich die vorliegenden Untersuchungen auf die Frage: Welche Aktivität besitzt die iPLA<sub>2</sub> in energetisierten Hirnmitochondrien im State 4 (Ruhezustand)? Die erhaltenen Ergebnisse zeigen erstmalig, dass eindeutig in nativen energetisierten RBM die iPLA<sub>2</sub> zu etwa 30% von der Gesamt-PLA<sub>2</sub>-Aktivität aktiv ist (Abb. 17). Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen zur iPLA<sub>2</sub>-Aktivität in Rattennierenmitochondrien (Kinsey et al., 2007a, b).

Die Diskrepanz zwischen den hier berichteten und den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Pfeiffer (Gadd et al., 2006; Rauckhorst et al., 2014) kann mit unterschiedlichen Bestimmungsmethoden der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität erklärt werden. Mit der hier eingesetzten Bestimmungsmethode wurde die Aktivität über die hydrolytische Spaltung eines radioaktiv markierten Phospholipidsubstrates bestimmt. Im Unterschied dazu wurde in der Arbeitsgruppe Pfeiffer die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität anhand der von den mitochondrialen Phospholipiden freigesetzten Fettsäuren bestimmt (Rauckhorst et al., 2014). Da jedoch unter State 4-Bedingungen freigesetzte endogene Fettsäuren ATP-abhängig wieder in die Membran eingebaut werden können, wird im State 4 eine geringe Netto-Fettsäure-Freisetzung gemessen (Gadd et al., 2006; Rauckhorst et al., 2014). Im Unterschied dazu wird durch Depolarisation ATP-Mangel erzeugt, wodurch die Remodellierung nicht mehr stattfinden kann. Demnach wird im State 4 die Fettsäure-Freisetzung durch den Fettsäure-Wiedereinbau kompensiert.

### **4.2.2 Physiologische Untersuchungen der iPLA<sub>2</sub> auf die mitochondriale ROS-Bildung**

Durch die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität werden Fettsäuren aus den mitochondrialen Membranen freigesetzt. Es ist naheliegend anzunehmen, dass sich diese Fettsäuren bei gehemmter, ATP-abhängiger Reacylierung im Mitochondrium anreichern. Mit Modellansätzen wurde

deshalb der Einfluss unveresterter Fettsäuren am Beispiel von DHA auf die ROS-Bildung durch die ETK untersucht.

In der Einleitung wurde bereits erläutert, dass in Abhängigkeit von der Natur des oxidierten Substrates, langkettige Fettsäuren einen unterschiedlichen Einfluss auf die mitochondriale  $O_2^{\bullet-}$ -Produktion besitzen. So wird durch das  $FADH_2$ , welches bei der Succinat-Oxidation im Komplex II gebildet wird, ein rückwärtsgerichteter Elektronentransport zum Komplex I ermöglicht, wodurch Matrix- $NAD^+$  reduziert und eine erhöhte ROS-Produktion stimuliert wird (Chance and Hollunger, 1961). Dieser RET ist energieabhängig, da die Elektronen vom  $FADH_2$  zum  $NADH$  (negativeres Redoxpotential) transportiert werden. Dieser thermodynamisch ungünstige Prozess wird durch ein hohes  $\Delta\psi_m$  ermöglicht (Andreyev et al., 2005). RET und die damit assoziierte  $O_2^{\bullet-}$ -Produktion wird durch eine geringfügige Depolarisation der IMM reduziert (Korshunov et al., 1997 und Miwa et al., 2003). Das aus dieser Beobachtung hervorgegangene Konzept der „Milden Entkopplung“ hat in den letzten Jahren viele Forschungsaktivitäten über die funktionelle Bedeutung der dem UCP1 analogen Entkopplungsproteinen UCP2-UCP5 ausgelöst (Donadelli et al., 2014, Cannon et al., 2006, Shabalina and Nedergaard, 2011 und Shabalina et al., 2014).

### **4.2.2.1 Adeninnucleotid-Translocator (ANT), DHA-Entkopplung, ROS-Bildung**

Abgesehen von der noch umstrittenen Funktion der UCP (mit Ausnahme der von UCP1) ist die Beteiligung des ANT an der Entkopplungsaktivität der Fettsäuren eine allgemein akzeptierte Tatsache (Andreyev et al., 1989, Brustovetsky and Klingenberg, 1994 und Schönfeld, 1990).

Die Abbildung 18 zeigt, dass DHA die Ruheatmung von Rattenhirnmitochondrien und Rattenlebermitochondrien stimuliert, was ein klarer Beleg für die Entkopplerwirkung der DHA ist (Abb. 18, schwarze Balken). Wird unter diesen Bedingungen der ANT-spezifische Hemmstoff CAT zugesetzt, kommt es zu einer signifikanten Reduzierung der DHA-induzierten entkoppelten Atmung der RBM (Abb. 18A). Im Gegensatz dazu ist die CAT-induzierte Erniedrigung bei den RLM nur schwach ausgeprägt (Abb. 18B). Die viel stärkere CAT-induzierte Atmungserniedrigung bei den RBM kann mit deren höherem Gehalt an dem ANT-Protein erklärt werden (Abb. 19). Möglicherweise sind auch noch andere Transportproteine der IMM an der Fettsäureentkopplung beteiligt, wie z.B. der Glutamat-Aspartat-Carrier oder der Phosphat-Transporter (Samartsev et al. 1997; Zackova et al. 2000; Jezek et al. 1998).

DHA unterdrückt die RET-assoziierte ROS-Bildung (Abb. 20). Durch Zusatz von CAT wird die ROS-Bildung wieder deutlich reaktiviert. Im Unterschied zu dem

ANT-Hemmstoff CAT bewirkt ein Zusatz von GTP, ein Hemmstoff der UCP-Aktivität (Cardoso et al., 2013, Jaburek et al., 2013 und Wojtczak et al., 2011), keine Erhöhung der ROS-Bildung (Abb. 20). Somit sollten im Hirngewebe die UCP nicht an der DHA-induzierten Entkopplung beteiligt sein. Allerdings wurde berichtet, dass das im Hirngewebe exprimierte UCP2 bei neurodegenerativen Erkrankungen involviert ist (Deierborg et al., 2008; Sullivan et al., 2003).

Zusammenfassend ergibt sich, dass aus den folgenden 4 Gründen eine durch RET-verursachte ROS-Bildung im Hirngewebe von untergeordneter Bedeutung ist: (I) Hirnmitochondrien oxidieren hauptsächlich das beim Glucoseabbau gebildete NADH. FADH<sub>2</sub> wird nur in einem geringen Ausmaß gebildet, da Hirnmitochondrien nur eine geringe Kapazität für die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren besitzen (im folgenden Review diskutiert: Schönfeld und Reiser, 2013). (II) Es ist auch bekannt, dass das bei der  $\beta$ -Oxidation gebildete FADH<sub>2</sub> den RET nicht stimuliert (Schönfeld et al., 2010). (III) Die RET-verursachte ROS-Produktion reagiert sehr empfindlich auf eine Depolarisation der IMM (Brand, 2010 und Murphy et al., 2009). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass der RET bereits durch eine niedrige Aktivität der oxidativen ATP-Bildung unterdrückt wird. (IV) Die Beteiligung von UCP2 an der „Milden Entkopplung“ ist relativ unwahrscheinlich (Shabalina et al., 2014).

#### **4.2.2.2 Wirkung von DHA auf die ROS-Bildung beim Vorwärtselektronentransport (FET)**

Abgesehen von einer Entkopplerwirkung können Fettsäuren die Elektronentransportketten-abhängige ROS-Bildung durch Interaktion mit den Bestandteilen der ETK beeinflussen (Schönfeld et al., 2007, 2008). Diese Wirkung wird beim FET deutlich. Rattenhirnmitochondrien, die im Ruhezustand Glutamat/Malat bzw. Pyruvat/Malat oxidieren, verdoppeln die ROS-Bildung durch Zusatz von DHA (10 nmol/mg) (Abb. 21). Dieser Anstieg kann mit einer Deregulierung des Elektronentransportes in der ETK erklärt werden. Mögliche Ursachen für diese Deregulation sind eine Wechselwirkung der langkettigen Fettsäuren mit den Redoxpaaren der ETK, eine teilweise Ablösung von Cytochrom c von der Außenseite der IMM und Erhöhung der Fluidität der IMM durch Einbau der Fettsäuren in die Phospholipid-Doppelschicht (Schönfeld and Wojtczak, 2007). Eine erhöhte Fluidität der IMM begünstigt wahrscheinlich den Austritt von Elektronen aus der ETK und damit eine erhöhte Ein-Elektronenübertragung auf molekularen O<sub>2</sub>, wodurch es zur gesteigerten O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Produktion kommt.

Die Hemmung des Elektronentransportes entlang der ETK durch DHA wird anhand der Verringerung der Reduktion des Elektronenakzeptors MTT durch steigende

DHA-Konzentrationen deutlich (Abb. 24). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Hemmung des Komplex I durch die Zugabe von Rotenon beobachtet (Abb. 24). Diese teilweise Hemmung des Elektronentransports durch DHA unterstützt die Annahme einer Deregulierung des FET durch DHA.

Interessanterweise zeigen RBM, die mit BEL vorinkubiert wurden, eine erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung (Abb. 22). Allerdings wurde diese  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung nur mit Succinat als Substrat beobachtet. Diese Erhöhung lässt sich nicht mit einer Hemmung der  $\text{iPLA}_2$  erklären. Somit erfolgt eine Hyperpolarisation der IMM durch Verringerung der freien Fettsäuren. Im Gegensatz dazu sind BEL-behandelte RBM leicht depolarisiert (Vergleich der Abb. 26A und B) und zeigen außerdem eine erhöhte Ruheatmung (Abb. 28B, State 4-Atmung). Es ist wahrscheinlich, dass zu dieser Erhöhung eine durch BEL verursachte Schwächung des Glutation/Glutathionperoxidase-Systems beiträgt (Abb. 25).

### **4.2.3 Einfluss der $\text{iPLA}_2$ auf die mitochondriale Permeabilitätspore (mPTP)**

BEL-behandelte, isolierte RBM besitzen eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Retentionskapazität (*CRC* – *calcium retention capacity*) (Abb. 27). Somit wird bei BEL-behandelten Mitochondrien die mPTP leichter geöffnet. Dies wird besonders dadurch deutlich, dass CsA nur einen geringen Einfluss auf die Reduzierung des CRC der BEL-behandelten RBM hat (Abb. 27, Kurven b und e). Die BEL-assoziierte Sensibilisierung der mPTP zeigte sich auch anhand der stärkeren Schwellung der Mitochondrien im Vergleich zu den Kontrollmessungen (Abb. 29). Rattenlebermitochondrien zeigen ebenfalls eine erhöhte Schwellung nach BEL-Behandlung (Daten werden nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit anderen Publikationen, die das Schwellungsverhalten von Rattenlebermitochondrien sowie von Nebennierenmitochondrien zeigten (Gadd et al., 2006, Kinsey et al., 2007b). In diesen Publikationen wird auch gezeigt, dass Fettsäuren die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Öffnung der mPTP begünstigen. Aufgrund der Tatsache, dass AA, ein Hydrolyse-Spaltprodukt der  $\text{iPLA}_2$ , die Öffnung der mPTP fördert, wird angenommen, dass die  $\text{iPLA}_2$ -Aktivität eine wichtige funktionelle Rolle bei der Regulation der mPTP spielt (Kinsey et al., 2007b).

### **4.2.4 Einfluss der $\text{iPLA}_2$ auf die Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette**

In der vorliegenden Arbeit wurde auch ein möglicher Einfluss von BEL auf die Aktivität diverser Enzymkomplexe der mitochondrialen ETK von Rattenhirnmitochondrien untersucht (Abb. 30 und Abb. 31). Dabei zeigte sich, dass die BEL-Behandlung der RBM keinen Einfluss auf die Aktivität der NADH-Cytochrom c-Reduktase (Komplex I/III) hat

(Abb. 30). Aber die COX-Aktivität (Komplex IV) war nach der BEL-Behandlung signifikant reduziert (Abb. 31). Funktionelle Störungen der COX-Aktivität in Mitochondrien führen zu einer Veränderung des Elektronenflusses, was die inhibierende Wirkung von BEL auf die MTT-Reduktion nicht erklärt (Abb. 24). Ähnliche Ergebnisse wurden in VIB iPLA<sub>2</sub> knockout Mäusen entdeckt. Die isolierten Herzmuskelmitochondrien zeigten eine signifikante Reduzierung des Ascorbinsäure-induzierten Komplex IV-vermittelten Sauerstoffverbrauches. Der zugleich veränderte Cardiolipin-Gehalt resultiert möglicherweise aus der verminderten Komplex IV-Aktivität (Mancuso et al., 2007). Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Struktur des Cardiolipins eng mit der Komplex IV-Aktivität verbunden ist (Gomez et al., 1999, Mancuso et al., 2007 und Zhang et al., 2002). Die Inaktivierung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität führt schließlich zu einem Mangel an Lysocardiolipin, was wiederum die darauffolgende Synthese von Cardiolipin limitiert (Shinzawa-Itoh et al., 2007).

Darüber hinaus ist noch zu diskutieren, ob durch die iPLA<sub>2</sub> in nativen, erregbaren Mitochondrien die Menge der freigesetzten Fettsäuren nicht zu gering ist, um überhaupt einen Einfluss auf die ROS-Produktion zu haben. Aufgrund der ATP-abhängigen Wiederveresterung der Spaltprodukte ist die Akkumulation der freien Fettsäuren unter physiologischen Bedingungen in diesen Mitochondrien wahrscheinlich sehr gering. Schlussfolgernd ist die Beteiligung der mitochondrialen iPLA<sub>2</sub> bei der Modulation der ROS-Produktion unwahrscheinlich. Dennoch haben viele Arbeiten klar gezeigt, dass die iPLA<sub>2</sub> in der Lage ist, oxidative Schäden, wie z.B. Peroxidation von Lipiden, zu reduzieren (Kinsey et al., 2007a, 2008). Diese Eigenschaft der iPLA<sub>2</sub> ist darauf zurückzuführen, dass das Enzym oxidativ geschädigte Fettsäuren aus Membranphospholipiden durch Hydrolyse herauspalten kann und durch Wiederveresterung intakte Fettsäuren in die Membran wieder eingebaut werden können (van Kuijk et al, 1987). Diese Funktion der iPLA<sub>2</sub> ist eine Grundvoraussetzung für den Erhalt der mitochondrialen Membranstruktur und somit für die Funktion der Mitochondrien unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

### **4.2.5 Wirkung der BEL-Behandlung isolierter Rattenhirnmitochondrien auf den Glutathiongehalt**

Oxidativer Stress ist die Folge eines Ungleichgewichtes zwischen ROS-Produktion und ROS-Inaktivierung durch antioxidative Schutzmechanismen. Bei der Entgiftung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Lipidperoxiden kommt dem Glutathion/Glutathionperoxidase-System große Bedeutung zu. Glutathion liegt in der Zelle vorwiegend im reduzierten Zustand vor (ca. 90%) und kann somit mittels der freien Thiolgruppe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Wasser reduzieren. Pathologisch niedrige GSH-Gehalte verursachen deshalb oxidativen Stress (Sies, 1999).

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass die BEL-Behandlung in Succinat-oxidierenden RBM die ROS-Produktion verstärkt (Abb. 22). Dabei stellte sich die Frage, ob dieser ROS-Anstieg durch eine verminderte Aktivität des Glutathion/Glutathionperoxidase-Systems hervorgerufen wird. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ergab sich, dass die BEL-Behandlung den mitochondrialen GSH-Gehalt erniedrigt (Abb. 25).

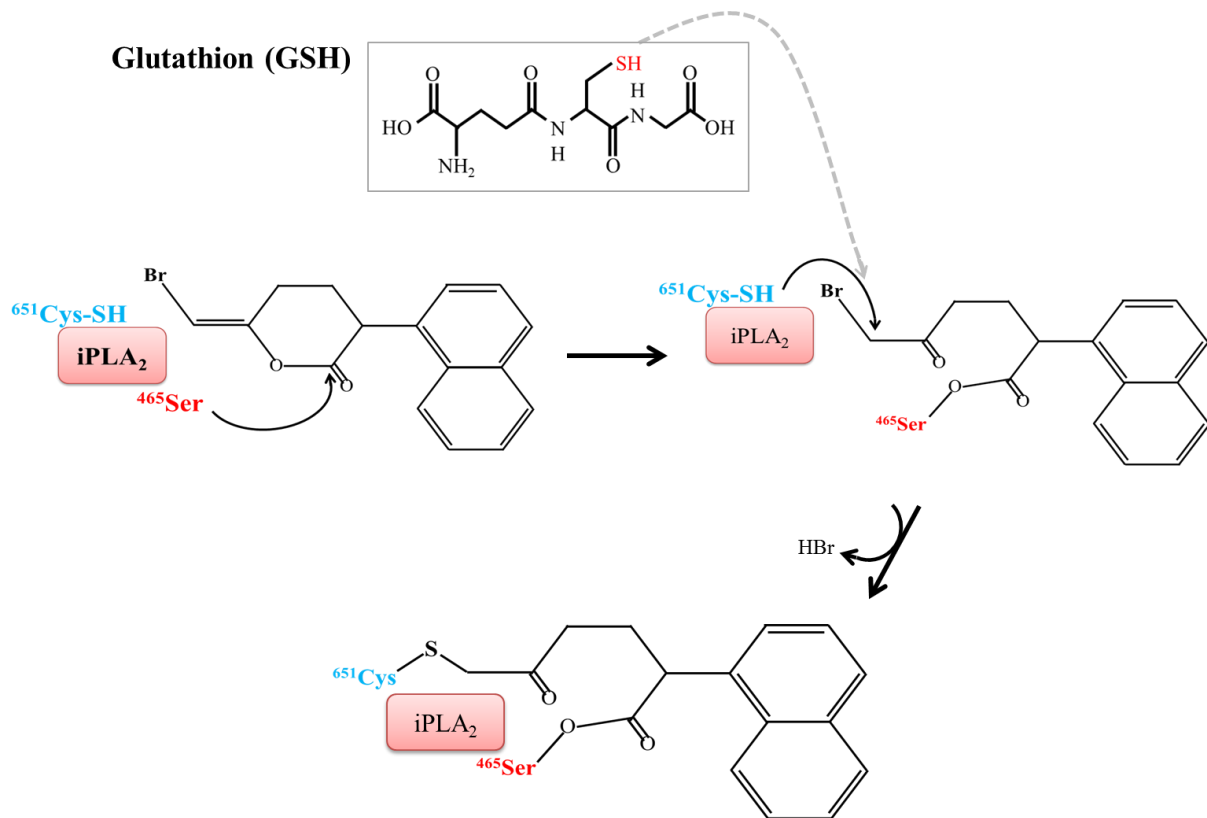


Abbildung 35: Möglicher Mechanismus der iPLA<sub>2</sub>-Inaktivierung durch BEL modifiziert nach Jenkins et al., 2013

Durch den nukleophilen Angriff des reaktiven <sup>465</sup>Ser der iPLA<sub>2</sub> entsteht das α-Brommethyl-Keton. Aufgrund des geringen Abstands des reaktiven <sup>465</sup>Ser und des reaktiven <sup>651</sup>Cys innerhalb des iPLA<sub>2</sub>-Moleküls ist es möglich, dass der Cysteinrest mit der α-Brommethyl-Keton Carbonsäure eine kovalente Bindung eingeht und HBr hydrolytisch abspaltet. Der grau gestrichelte Pfeil zeigt eine mögliche Bindung der α-Brommethyl-Keton Carbonsäure mit der SH-Gruppe des GSH.

Eine mögliche Erklärung für die Erniedrigung des Glutathion-Gehaltes durch den Serinprotease-Inhibitor BEL (Abb. 4), ein Haloenollactonen, das im aktiven Zentrum des Enzyms mit Serin eine stabile Acylverbindung eingeht und somit das Enzym inaktiviert (Mitchell et al., 1998), ergibt sich aus einer kürzlichen Veröffentlichung (Jenkins et al., 2013). Danach wird der Lactonring von BEL an den Serin-Rest (<sup>465</sup>Ser) im katalytischen Zentrum der iPLA<sub>2</sub> kovalent gebunden. Ein weiteres reaktives Strukturelement der iPLA<sub>2</sub> ist der Cystein-Rest (<sup>651</sup>Cys), welcher sich in der Nähe des <sup>465</sup>Ser befindet (Abb. 35). Das



Molekülmodell der iPLA<sub>2</sub> zeigt, dass der Abstand zwischen <sup>465</sup>Ser und <sup>651</sup>Cys nur 10 Å innerhalb des aktiven Zentrums der iPLA<sub>2</sub> beträgt. Aufgrund dieses geringen Abstands der reaktiven Strukturelemente ist es möglich, dass die α-Brommethyl-Keton Carbonsäure, die sich nach der Öffnung des Lactonringes bildet, an die SH-Gruppe des reaktiven <sup>651</sup>Cys im Enzym bindet und demzufolge die iPLA<sub>2</sub> ebenfalls inaktiviert wird (Abb. 35). Aufgrund dieser Tatsache kann vermutet werden, dass die α-Brommethyl-Keton Carbonsäure von BEL eine Bindung mit der SH-Gruppe des GSH eingeht und dadurch die Menge an GSH reduziert (Abb. 35, der grau gestrichelte Pfeil zeigt eine mögliche Bindung der SH-Gruppe des GSH mit BEL). Den daraus folgenden Glutathionmangel verursacht dementsprechend eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung aus den Mitochondrien.

### 4.3 Das *Pla2g6*inaktive Mausmodell

Mutationen im *Pla2g6*-Gen sind mit einem kompletten bzw. teilweisen Verlust der VIA iPLA<sub>2</sub>-Aktivität assoziiert. So konnte bei Patienten, die an der seltenen neurodegenerativen Erkrankung INAD leiden, verschiedene Mutationen im *Pla2g6*-Gen identifiziert werden. Aufgrund dessen bedient man sich für weitere funktionelle Untersuchungen der iPLA<sub>2</sub> verschiedener Mausmodelle. So wurde von Strokin et al., 2012 beschrieben, dass in hypomorphen und *Pla2g6*inaktiven Mäusen die VIA iPLA<sub>2</sub>-Aktivität eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase spielt. Der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle, der einer Entleerung von Ca<sup>2+</sup>-Speichern (Endoplasmatisches Retikulum) folgt, ist in Astrozyten aus den mutierten Mäusen, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen deutlich reduziert. Dieser Effekt wurde in beiden Mausmodellen beobachtet. Bei der hypomorphen Maus handelt es sich um eine spontane Mutation im Gen, welche durch eine retrovirale Insertion (IAP) im 1. Intron verursacht wurde. Die Reduzierung des Transkriptionsspiegels führt zu einer 40-fachen Reduktion der Enzymaktivität in den hypomorphen Mäusen (Strokin et al., 2012). Das zweite bei uns vorhandene Mausmodell, die *Pla2g6*inaktive Maus, wird durch einen Aminosäureaustausch von Glycin (G) zu Arginin (R) an Position 373 (G373R) innerhalb der kodierenden Region des Gens verursacht. Diese Mutation führt zu einem kompletten Verlust der VIA iPLA<sub>2</sub>-Aktivität (Wada et al., 2009). Die homozygoten *Pla2g6*inaktiven Mäuse traten ab den 3. Lebensmonat phänotypisch negativ in Erscheinung. Aus diesem Grund wurde die iPLA<sub>2</sub>-Aktivität von isolierten Hirnmitochondrien aus Mäusen unterschiedlichen Alters analysiert und miteinander verglichen (Abb. 34). Interessanterweise gab es keinen signifikanten Unterschied der Enzymaktivität in den Hirnmitochondrien bei den 1,5 Monate alten Mäusen. Mit einem Alter von 3,5 Monaten wurde die PLA<sub>2</sub>-Aktivität nochmals von isolierten Hirnmitochondrien analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die

Enzymaktivität bei den *Pla2g6*inaktiven Mäusen um 60% reduziert war im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Der Beginn der ersten Krankheitssymptome (ab dem 3. Lebensmonat) ist höchstwahrscheinlich mit der Reduzierung der Enzymaktivität verbunden. Jedoch zeigt die Literatur, dass die Expressionsrate der mRNA und des Proteins im Hirngewebe, isoliert aus den *Pla2g6*inad homozygoten Mäusen, unabhängig vom Alter der Tiere (5, 10 und 15 Wochen alt) ist. Dennoch zeigen histologische Befunde neuropathologische Veränderungen bei den 16 Wochen alten *Pla2g6*inad Mäusen, welche wahrscheinlich auf die Fehlfunktionen des *Pla2g6*-Gens, hervorgerufen durch die Punktmutation, zurückzuführen sind (Wada et al., 2009).

Bei der Restaktivität von 40% könnte es sich um weitere PLA<sub>2</sub> handeln, insbesondere der VIB iPLA<sub>2</sub>, die hauptsächlich in der Membran von Mitochondrien lokalisiert ist (Kinsey et al., 2007a) und durch ein anderes Gen kodiert wird (Mancuso et al., 2000). Aufgrund der frühen Letalität der Tiere waren Analysen mit älteren Tieren mit diesem vorhandenen Mausmodell nicht möglich.

#### 4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die iPLA<sub>2</sub> in isolierten, nicht-aktivierten, energetisierten RBM aktiv ist. Der bisherigen Hypothese einer antioxidativen Wirkung der iPLA<sub>2</sub> in Mitochondrien widersprechen jedoch die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit. Im Gegensatz zur Hypothese legen die durchgeführten Untersuchungen mit DHA und einer physiologischen Substratversorgung durch Succinat nahe, dass eine Erhöhung des mitochondrialen freien Fettsäuregehaltes durch die Aktivität der iPLA<sub>2</sub> die ROS-Bildung durch die ETK stimuliert. Eine Verminderung der ROS-Bildung durch die iPLA<sub>2</sub>-verursachte Fettsäureanreicherung ist nur dann zu erwarten, wenn der ETK durch Succinat-Oxidation FADH<sub>2</sub> zugeführt wird. Bei der Substratwasserstoff-Versorgung durch Succinat wird die Bildung von ROS durch den entkopplungs-sensitiven umgekehrten Elektronentransport (RET) verursacht. Die DHA-induzierte Entkopplerwirkung kann durch eine Beteiligung des Adeninnukleotid-Translokators erklärt werden. Für die in der Literatur postulierte Beteiligung von UCP-Proteinen wurden in dieser Arbeit keine Hinweise gefunden.

Weitere Ergebnisse zeigen eine Beeinträchtigung der energie-abhängigen mitochondrialen Funktionen durch BEL, einen Inhibitor der iPLA<sub>2</sub>. Diese mitochondrialen Schädigungen werden besonders an der partiellen Depolarisierung der IMM und der erniedrigten CRC von BEL-behandelten RBM deutlich. Die Wirkung von BEL sowie von DHA auf die Elektronentransportkette in Hirnmitochondrien ist in der Abbildung 36 zusammengefasst.

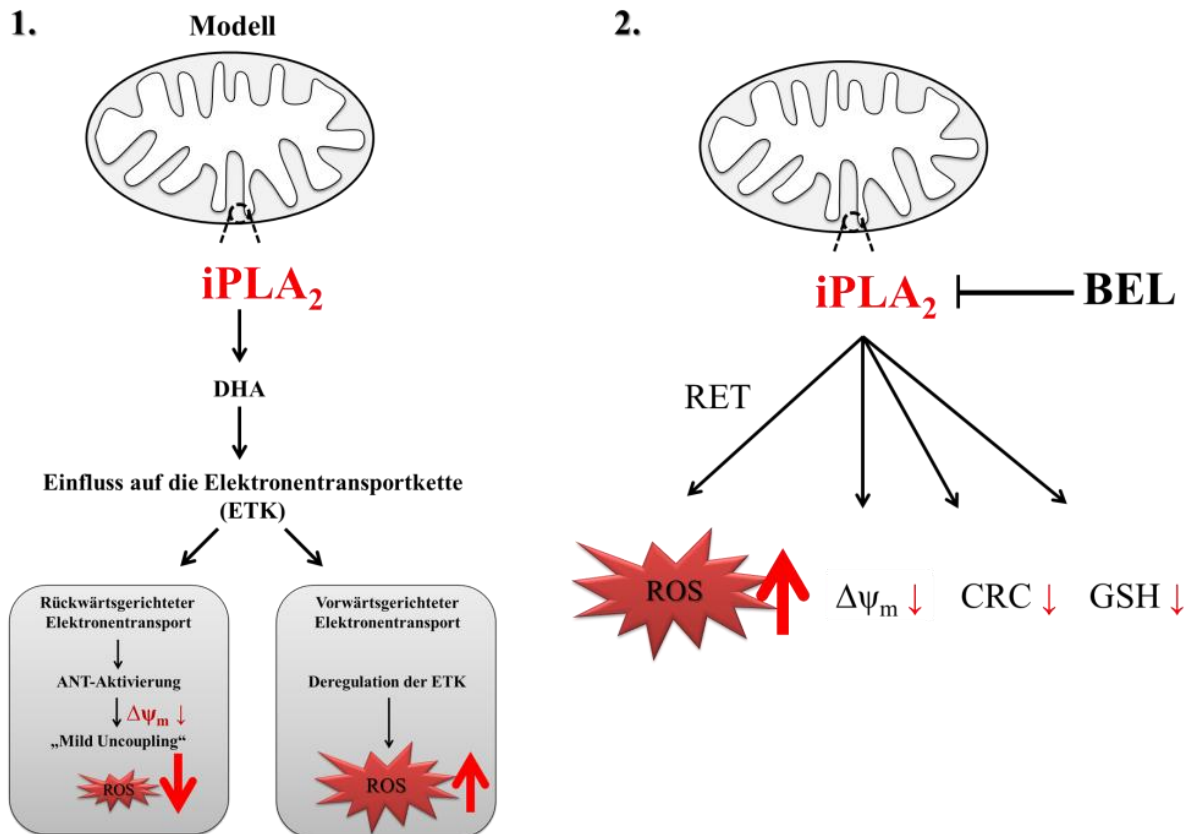


Abbildung 36: Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse in Hirnmitochondrien

(1.) Die membran-gebundene  $iPLA_2$  der Mitochondrien hydrolysiert Glycerophospholipide zu freien Fettsäuren und Lysophospholipiden. Ein Hauptprodukt ist die Docosahexaensäure (DHA). DHA erniedrigt den rückwärtsgerichteten Elektronentransport (RET) und das  $\Delta\psi_m$  bei Succinat-oxidierenden RBM durch „Milde Entkopplung“. Im Ergebnis wird die ROS-Bildung erniedrigt. Andererseits bewirkt DHA unter Bedingung des vorwärtsgerichteten Elektronentransports durch Interaktion mit der Elektronentransportkette (ETK) eine Erhöhung der ROS-Produktion. (2.) Die Behandlung der Mitochondrien mit BEL verursacht eine partielle Depolarisierung der inneren mitochondrialen Membran ( $\Delta\psi_m$ ) und erniedrigt die  $Ca^{2+}$ -Retentionskapazität (CRC) der Mitochondrien. BEL-behandelte Succinat-oxidierende RBM zeigen auch einen Anstieg der basalen ROS-Bildung, die sich mit einer GSH-Erniedrigung erklären lässt.

In Hinblick auf weitere Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der  $iPLA_2$  auf neuronaler Ebene ist es sinnvoll in Zukunft diverse (spezifische) Mausmodelle zu nutzen. Eine interessante Möglichkeit ist die Bestimmung der Fettsäure-Freisetzung, wie z.B. von DHA und AA in den *Pla2g6*-inaktiven Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Des Weiteren könnte man das antioxidative Abwehrsystem näher betrachten, indem die ROS-Produktion mit verschiedenen Substraten der ETK bestimmt wird, um somit einen möglichen schädigenden BEL-Effekt zu vermeiden. Diesbezüglich sollte man dann auch den GSH-Gehalt in diesen Mäusehirnmitochondrien messen. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse einer erniedrigten COX-Aktivität in BEL-behandelten RBM (Abb. 31) ist es wichtig, die Aktivitäten der Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette miteinander zu vergleichen. Darüberhinaus ist es interessant die Membranzusammensetzung im Hinblick auf

den Cardiolipin-Gehalt zu analysieren. Diese Resultate an Mausmodellen könnten eine mögliche Beteiligung der iPLA<sub>2</sub> bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktionen (so z.B.  $\Delta\psi_m$ , CRC, Aktivitäten der Enzymkomplexe) erklären und somit wesentlich zum Verständnis der Entstehung von verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der INAD, beitragen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Gruppe der Phospholipasen A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) spaltet in Glycerophospholipiden die *sn*-2 Acylesterbindung, wodurch Lysophospholipide und Fettsäuren freigesetzt werden. Eine Hauptfunktion der PLA<sub>2</sub> ist ihre Beteiligung an der Remodellierung von biologischen Membranen. Dadurch wird deren funktionelle Intaktheit unter physiologischen und pathologischen Bedingungen aufrechterhalten. In aktuellen Arbeiten wird beschrieben, dass die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) protektiv gegenüber oxidativem Stress wirkt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an Astrozyten und Hirnmitochondrien der Ratte (RBM) eine mögliche Beteiligung der iPLA<sub>2</sub> bei der Modulation von oxidativem Stress aufzuklären.

Im ersten Teil der Arbeit wurde an kultivierten Astrozyten der Einfluss der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) untersucht. Dazu wurde in den Zellen die mit dem mitochondrialen Komplex I-Inhibitor Rotenon stimulierte ROS-Produktion in Anwesenheit und Abwesenheit des iPLA<sub>2</sub>-Inhibitors Bromoenollacton (BEL) gemessen. Ein Anstieg der ROS-Produktion wurde sowohl in BEL-behandelten als auch in BEL-unbehandelten Zellen beobachtet. Während der Inkubation mit Rotenon bei einer gleichzeitigen Reduzierung der iPLA<sub>2</sub>-Aktivität mit den BEL-Enantiomeren kam es zusätzlich zu einer verstärkten Peroxidation der Lipide. In den BEL-behandelten Zellen konnte eine Reduzierung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) beobachtet werden. Es ist naheliegend, dass die Erniedrigung des  $\Delta\psi_m$  die mitochondrialen Funktionen behindert und somit zum Zelltod führt. Unter Einfluss von Rotenon wurde in BEL-behandelten Zellen auch eine Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol beobachtet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde in isolierten RBM der Einfluss der iPLA<sub>2</sub>-induzierten Fettsäure-Freisetzung auf die ROS-Produktion untersucht. Dabei konnte die enzymatische Aktivität der membran-assoziierten iPLA<sub>2</sub> in nativen, energetisierten RBM nachgewiesen werden. Prinzipiell kann die iPLA<sub>2</sub>-assoziierte Akkumulation von freien Fettsäuren im Mitochondrium die ROS-Bildung auf zwei unterschiedliche Arten beeinflussen. Der zugrunde liegende antioxidative Mechanismus beruht auf einer milden Entkopplung, weil  $\Delta\psi_m$  erniedrigt wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass die durch den rückwärtsgerichteten,  $\Delta\psi_m$ -getriebenen Elektronentransport (RET) verursachte ROS-Bildung durch Docosahexaensäure (ein Hauptprodukt der iPLA<sub>2</sub>) erniedrigt wird. Es stellte sich heraus, dass der Adeninnukleotid-Translokator (ANT), ein integrales Protein der Innenmembran, an der Entkopplung durch DHA maßgeblich beteiligt ist. Allerdings sollte erwähnt werden, dass die RET-assoziierte ROS-Bildung in der Zelle von untergeordneter Bedeutung ist. Nach aktuellem Kenntnisstand wird die mitochondriale ROS-Bildung hauptsächlich durch den vorwärtsgerichteten Elektronentransport (FET) innerhalb der Atmungskette verursacht. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bereits niedrige DHA-Konzentrationen die FET-assoziierte ROS-Bildung erhöhen. Somit lassen die erhaltenen Ergebnisse vermuten, dass die iPLA<sub>2</sub> keine antioxidative Wirkung in Hirnmitochondrien besitzt. Ein weiteres Ergebnis ist, dass der iPLA<sub>2</sub>-Inhibitor BEL schädigende Auswirkungen auf die RBM hat. Die Erhöhung der mitochondrialen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung in BEL-behandelten Succinat-oxidierenden RBM lässt sich vermutlich durch eine Erniedrigung der Aktivität der Glutathion/Glutathionperoxidase-Reaktion erklären. Die ebenfalls beobachtete Reduzierung der Akkumulation von cytosolischem Ca<sup>2+</sup> in BEL-behandelten RBM begünstigt möglicherweise die gezeigte partielle Depolarisierung der mitochondrialen Innenmembran und übt eine destabilisierende Wirkung auf die Permeabilitätstransitions-pore aus.

## 6 Abstract

The group of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) generates free fatty acids and lysophospholipids by cleaving the *sn*-2 ester bond of glycerophospholipids. The main function of the PLA<sub>2</sub> is the remodeling of biological membranes to maintain their functional integrity under physiological and pathological conditions. Studies report that the group of Ca<sup>2+</sup>-independent PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) has a protective role under oxidative stress condition. The present work aims to investigate the putative role of iPLA<sub>2</sub> in rat astrocytes and rat brain mitochondria (RBM) with regard to the modulation of oxidative stress.

In the first part of the study, the influence of iPLA<sub>2</sub> on the formation of reactive oxygen species (ROS) in cultured astrocytes was investigated. This ROS production was stimulated in the cells with the mitochondrial complex I inhibitor rotenone in the presence and absence of the iPLA<sub>2</sub> inhibitor bromoenol lactone (BEL). An increase in ROS production was observed in both BEL-treated and BEL-untreated cells. During rotenone incubation together with a simultaneous reduction of iPLA<sub>2</sub> activity with the BEL-enantiomers, lipid peroxidation was enhanced. A reduction of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) could be observed in the BEL-treated cells. It is obvious that the lowering of  $\Delta\psi_m$  decreases the mitochondrial functions and therefore leads to cell death. Similarly, cytochrome c release into the cytosol under the influence of rotenone was observed in BEL-treated cells.

In the second part, the influence of iPLA<sub>2</sub>-induced fatty acid liberation on ROS production has been investigated in isolated RBM. The enzymatic activity of membrane-associated iPLA<sub>2</sub> could be detected in native, energized RBM. In principle, the iPLA<sub>2</sub>-associated accumulation of free fatty acids in the mitochondria could affect the ROS formation by two mechanisms. The first mechanism is based on mild uncoupling, whereby  $\Delta\psi_m$  is decreased. It could be shown that ROS generation induced by the  $\Delta\psi_m$ -driven reverse electron transport (RET) is decreased by docosahexaenoic acid (major product of iPLA<sub>2</sub>). It turned out that the adenine nucleotide Translokator (ANT), an integral protein of the inner mitochondrial membrane, is significantly involved in the uncoupling by DHA. However, it should be mentioned that the RET-associated ROS formation is of minor importance in the cells. The second mechanism of ROS formation is associated with the forward electron transport (FET) in the respiratory chain. Low micromolar concentrations of DHA increased the FET-dependent ROS generation. Consequently, iPLA<sub>2</sub> activity has no antioxidant effect on mitochondrial ROS generation. Furthermore, the iPLA<sub>2</sub> inhibitor BEL has *per se* effects on RBM. This involves increase in mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release in BEL-treated succinate-oxidizing RBM, which can be explained by a decrease in the activity of the glutathione/glutathione peroxidase reaction. The observed reduction of cytosolic Ca<sup>2+</sup> accumulation in BEL-treated RBM is probable a result of both partial depolarization of the mitochondrial inner membrane and a destabilizing effect on the permeability transition pore.

## Literaturverzeichnis

- Abe A, Hiraoka M, Shayman JA (2006). Positional specificity of lysosomal phospholipase A<sub>2</sub>. *J Lipid Res.* 47, 2268-2279.
- Abe A, Shayman JA (1998). Purification and characterization of 1-O-acylceramide synthase, a novel phospholipase A<sub>2</sub> with transacylase activity. *J Biol Chem*, 273, 8467-8474.
- Abe A, Shayman JA, Radin NS (1996). A novel enzyme that catalyzes the esterification of N-acetyl sphingosine. Metabolism of C2-ceramides. *J Biol Chem*, 271, 14383-14389.
- Ackermann EJ, Kempner ES, Dennis EA (1994). Ca<sup>2+</sup>-independent cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. *J Biol Chem*, 269, 9227-9233.
- Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ (2003). Phospholipase A<sub>2</sub>, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal*, 5, 647-654.
- Akerman KE, Wikström MK (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68, 191-197.
- Alonso F, Henson PM, Leslie CC (1986). A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta*, 878, 273-280.
- Andreyev A, Bondareva TO, Dedukhova VI, Mokhova EN, Skulachev VP, Tsofina LM, Volkov NI, Vygodina TV (1989). The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria. *Eur J Biochem*, 182, 585-592.
- Andreyev AY, Kushnareva YE and Starkov AA (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 200-214.
- Azarashvili T, Krestinina O, Galvita A, Grachev D, Baburina Y, Stricker R, Evtodienko Y, Reiser G (2009). Ca<sup>2+</sup>-dependent permeability transition regulation in rat brain mitochondria by 2',3'-cyclic nucleotides and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296, C1428-1439.
- Balboa MA, Balsinde J, Jones SS, and Dennis EA (1997). Identity between the Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from P388D1 macrophages and Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 272, 8576-8580.
- Balsinde J, Balboa MA (2005). Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in activated cells. *Cell Signal*, 17, 1052-1062.
- Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA (2002). Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett*, 531, 2-6.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 3, 205-214.
- Bernardi P (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 79, 1127-1155.
- Bernardi P, Forte M (2007). The mitochondrial permeability transition pore. *Novartis Found Symp*, 287, 157-164, discussion 164-159.
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*, 264, 687-701.

- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3, 1301-1306.
- Brand MD (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*, 45, 466-472.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*, 37, 755-767.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C817-833.
- Brustovetsky N, Klingenberg M (1994). The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate H<sup>+</sup> transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl. *J Biol Chem*, 269, 27329-27336.
- Burke JE, Dennis EA (2009). Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*, 50 Suppl: S237-242.
- Cabezas R, El-Bachá RS, González J, Barreto GE (2012). Mitochondrial functions in astrocytes: neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neurosci Res*, 74, 80-90.
- Cannon B, Shabalina IG, Kramarova TV, Petrovic N, Nedergaard J (2006). Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not? *Biochim Biophys Acta*, 1757, 449-458.
- Cardoso S, Santos MS, Moreno A, Moreira PI (2013). UCP2 and ANT differently modulate proton-leak in brain mitochondria of long-term hyperglycemic and recurrent hypoglycemic rats. *J Bioenerg Biomembr*, 45, 397-407
- Carper MJ, Zhang S, Turk J, Ramanadham S (2008). Skeletal muscle group VIA phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>β): expression and role in fatty acid oxidation. *Biochemistry*, 47, 12241-12249.
- Chance B, Hollunger G (1961). The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. I. General properties and nature of the products of succinate-linked reduction of pyridine nucleotide. *J Biol Chem*, 236, 1534-43.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59, 527-605.
- Chance B, Williams GR (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*, 17, 65-134.
- Chen Y, Swanson RA (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 137-149.
- Chi X, Kale J, Leber B, Andrews DW (2014). Regulating cell death at, on, and in membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun 11. pii: S0167-4889(14)00205-5. doi: 10.1016 (in press).
- Clark LC Jr, Wolf R, Granger D, Taylor Z (1953). Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol*. 6, 189-193.
- Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C (1993). A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-



- tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun.* 197, 40-45.
- Darrouzet E, Issartel JP, Lunardi J, Dupuis A (1998). The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors. *FEBS Lett*, 431, 34-38.
- Dauer W, Przedborski S (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 39, 889-909.
- Deierborg T, Wieloch T, Diano S, Warden CH, Horvath TL, Mattiasson G (2008). Overexpression of UCP2 protects thalamic neurons following global ischemia in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28, 1186-1195.
- DeLeve LD, Kaplowitz N (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*, 52, 287-305.
- Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G (2011). Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev*, 111, 6130-6185.
- Derewenda ZS, Ho YS. (1999). PAF-acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta*, 1441, 229-236.
- Donadelli M, Dando I, Fiorini C, Palmieri M (2014). UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. *Cell Mol Life Sci*, 71, 1171-1190.
- Eaddy AC, Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG (2012). The role of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> $\gamma$  in oxidant-induced lipid peroxidation, Ca<sup>2+</sup> release, and renal cell death. *Toxicol Sci*, 128, 544-552.
- Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otín M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ, Brand MD (2003). A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J*, 22, 4103-4110.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 58, 39-46.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11, 81-128.
- Farooqui AA, Horrocks LA. (2006). Phospholipase A<sub>2</sub>-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist*, 12, 245-260.
- Frey TG, Mannella CA (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25, 319-324.
- Gadd ME, Broekemeier KM, Crouser ED, Kumar J, Graff G, Pfeiffer DR (2006). Mitochondrial iPLA<sub>2</sub> activity modulates the release of cytochrome c from mitochondria and influences the permeability transition. *J Biol Chem*, 281, 6931-6939.
- Garcia MC, Ward G, Ma YC, Salem N Jr, Kim HY (1998). Effect of docosahexaenoic acid on the synthesis of phosphatidylserine in rat brain in microsomes and C6 glioma cells. *J Neurochem*, 70, 24-30.
- Gomez B Jr, Robinson NC (1999). Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1. *Biochemistry*, 38, 9031-9038.

- Granville DJ, Gottlieb RA. (2003). The mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC) as a therapeutic target for initiating cell death. *Curr Med Chem*, 10, 1527-1533.
- Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
- Green JT, Orr SK, Bazinet RP (2008). The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids. *J Lipid Res*, 49, 939-44.
- Gregory A, Westaway SK, Holm IE, Kotzbauer PT, Hogarth P, Sonek S, Coryell JC, Nguyen, TM, Nardocci N, Zorzi G, Rodriguez D, Desguerre I, Bertini E, Simonati A, Levinson B, Dias C, Barbot C, Carrilho I, Santos M, Malik I, Gitschier J, Hayflick SJ (2008). Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A<sub>2</sub>. *Neurology*, 71, 1402-1409.
- Gunter TE, Pfeiffer DR (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, 258, C755-786.
- Hald A, Lotharius J (2005). Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol*. 193, 279-290.
- Hamby ME, Sofroniew MV. (2010). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics*, 7, 494-506.
- Hamprecht B, Löffler F (1985). Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol*, 109, 341-345.
- Hansson MJ, Persson T, Friberg H, Keep MF, Rees A, Wieloch T, Elmér E (2003). Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria. *Brain Res*, 960, 99-111.
- Harris MH, Thompson CB (2000). The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer membrane permeability. *Cell Death Differ*, 7, 1182-1191.
- He K, Ludtke SJ, Heller WT, Huang HW (1996). Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers. *Biophys J*, 71, 2669-2679.
- Hiraoka M, Abe A, Lu Y, Yang K, Han X, Gross RW, Shayman JA (2006). Lysosomal phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipidosis. *Mol Cell Biol*, 26, 6139-6148.
- Hooks SB, Cummings BS (2008). Role of Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> in cell growth and signaling. *Biochem Pharmacol*. 76, 1059-1067.
- Hwang O (2013). Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol*. 22, 11-17.
- Jabůrek M, Ježek J, Zelenka J, Ježek P (2013). Antioxidant activity by a synergy of redox-sensitive mitochondrial phospholipase A<sub>2</sub> and uncoupling protein-2 in lung and spleen. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 816-825.
- Jenkins CM, Han X, Mancuso DJ, Gross RW (2002). Identification of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) β, and not iPLA<sub>2</sub>γ, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth muscle cells. Enantioselective mechanism-based discrimination of mammalian iPLA<sub>2</sub>s. *J Biol Chem*, 277, 32807-32814.
- Jenkins CM, Yan W, Mancuso DJ, Gross RW (2006). Highly selective hydrolysis of fatty acyl-CoAs by calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>β. Enzyme autoacylation and acyl-CoA-mediated reversal of calmodulin inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> activity. *J Biol Chem*, 15615-15624.

- Jenkins CM, Yang J, Gross RW (2013). Mechanism-based inhibition of iPLA<sub>2</sub>β demonstrates a highly reactive cysteine residue (C651) that interacts with the active site: mass spectrometric elucidation of the mechanisms underlying inhibition. *Biochemistry*, 52, 4250-4263.
- Ježek J, Jabůrek M, Zelenka J, Ježek P (2010). Mitochondrial phospholipase A<sub>2</sub> activated by reactive oxygen species in heart mitochondria induces mild uncoupling. *Physiol Res*, 59, 737-747.
- Ježek P, Engstova H, Zackova M, Vercesi AE, Costa AD, Arruda P, Garlid KD (1998). Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1365, 319-327.
- Jiang X, Wang X (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 73, 87-106
- Jocelyn PC, Cronshaw A (1985). Properties of mitochondria treated with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. *Biochem Pharmacol*, 34, 1588-1590.
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*. 345, 91-104.
- Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, Borisenko GG (2005). Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol*, 1, 223-232.
- Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R (2009). Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res*, 50 Suppl: S63-68.
- Kinsey GR, Blum JL, Covington MD, Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG (2008). Decreased iPLA<sub>2</sub>γ expression induces lipid peroxidation and cell death and sensitizes cells to oxidant-induced apoptosis. *J Lipid Res*, 49, 1477-1487.
- Kinsey GR, McHowat J, Beckett CS, Schnellmann RG (2007a). Identification of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>γ in mitochondria and its role in mitochondrial oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F853-860.
- Kinsey GR, McHowat J, Patrick KS, Schnellmann RG. (2007b). Role of Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub>γ in Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther*, 321, 707-715.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*, 416, 15-18.
- Kramer RM, Checani GC, Deykin A, Pritzker CR, Deykin D (1986). Solubilization and properties of Ca<sup>2+</sup>-dependent human platelet phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta*, 878, 394-403.
- Kudo I, Murakami M (2002). Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69, 3-58.
- van Kuijk FJ, Sevanian A, Handelman GJ, Dratz EA (1987). A new role for phospholipase A<sub>2</sub>: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends Biochem Sci*, 12, 31-34.
- Lands WE (1965). Lipid Metabolism. *Annu Rev Biochem*, 34, 313-46.

- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- Larsson PK, Claesson HE, Kennedy BP (1998). Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> and their effect on enzyme activity. *J Biol Chem*, 273, 207-214.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*, 69, 581-593.
- Ma MT, Yeo JF, Farooqui AA, Ong WY (2011). Role of calcium independent phospholipase A<sub>2</sub> in maintaining mitochondrial membrane potential and preventing excessive exocytosis in PC12 cells. *Neurochem Res*, 36, 347-354.
- Madjid M, Ali M, Willerson JT (2010). Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> as a novel risk marker for cardiovascular disease: a systematic review of the literature. *Tex Heart Inst J*, 37, 25-39.
- Mailloux RJ, Harper, ME (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med*, 51, 1106-1115.
- Malhotra A, Edelman-Novemsky I, Xu Y, Plesken H, Ma J, Schlame M, Ren M (2009). Role of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in the pathogenesis of Barth syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2337-2341
- Mancuso DJ, Han X, Jenkins CM, Lehman JJ, Sambandam N, Sims HF, Yang J, Yan W, Yang K, Green K, Abendschein DR, Saffitz JE, Gross RW (2007). Dramatic accumulation of triglycerides and precipitation of cardiac hemodynamic dysfunction during brief caloric restriction in transgenic myocardium expressing human calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>γ. *J Biol Chem*, 282, 9216-9227.
- Mancuso DJ, Jenkins CM, Gross RW (2000). The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem*, 275, 9937-9945.
- Mancuso DJ, Jenkins CM, Sims HF, Cohen JM, Yang J, Gross RW (2004). Complex transcriptional and translational regulation of iPLA<sub>2</sub>γ resulting in multiple gene products containing dual competing sites for mitochondrial or peroxisomal localization. *Eur J Biochem*, 271, 4709-4724.
- Margulis L (1996). Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1071-1076.
- Mitchell AE, Zheng J, Hammock BD, Lo Bello M, Jones AD (1998). Structural and functional consequences of haloenol lactone inactivation of murine and human glutathione S-transferase. *Biochemistry*, 37, 6752-6759.
- Miwa S, St-Pierre J, Partridge L, Brand MD (2003). Superoxide and hydrogen peroxide production by Drosophila mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 35, 938-948.
- Moon SH, Jenkins CM, Kiebish MA, Sims HF, Mancuso DJ, Gross RW (2012). Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>γ (iPLA<sub>2</sub>γ) attenuates calcium-induced opening of the mitochondrial permeability transition pore and resultant cytochrome c release. *J Biol Chem*. 35, 29837-29850.
- Moore SA (2001). Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J Mol Neurosci*. 16, 195-200.

- Morgan NV, Westaway SK, Morton JE, Gregory A, Gissen P, Sonek S, Cangul H, Coryel J, Canham N, Nardocci N, Zorzi G, Pasha S, Rodriguez D, Desguerre I, Mubaidin A, Bertini E, Trembath RC, Simonati A, Schanen C, Johnson CA, Levinson B, Woods CG, Wilmot B, Kramer P, Gitschier J, Mahe, ER, Hayflick SJ (2006). *PLA2G6*, encoding a phospholipase A<sub>2</sub>, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nat Genet*, 38, 752-754.
- Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K (2011). Recent progress in phospholipase A<sub>2</sub> research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res*, 50, 152-192.
- Murphy MP (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417, 1-13.
- Nakagawa Y (2004). Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*, 1011, 177-184.
- Nelson D, Cox M (2001). Lehninger Biochemie (3. Auflage). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, ISBN 3-540-41813-X, 713 - 774
- Nicholls DG, Locke RM (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*, 64, 1-64.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95, 351-358.
- Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1259-1263.
- Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S (2007). Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 14, 1243-1247.
- Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F (2001). The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem*, 276, 12030-12034.
- Pettegrew JW, Klunk WE, Kanal E, Panchalingam K, McClure RJ (1995). Changes in brain membrane phospholipid and high-energy phosphate metabolism precede dementia. *Neurobiol Aging*, 16, 973-975.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*, 266, 22028-22034.
- Rauckhorst AJ, Broekemeier KM, Pfeiffer DR (2014). Regulation of the Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> in liver mitochondria by changes in the energetic state. *J Lipid Res*, 55, 826-836.
- Reth M (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol*, 3, 1129-1134.
- Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 566-578.
- Rohrbach S. (2009). Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria. *Curr Pharm Des*, 15, 4103-4116.
- Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W, Zlabinger GJ (1992). A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods*. 156, 39-45.

- Rydel TJ, Williams JM, Krieger E, Moshiri F, Stallings WC, Brown SM, Pershing JC, Purcell JP, Alibhai MF (2003). The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry*, 42, 6696-6708.
- Samartsev VN, Mokhova EN, Skulachev VP (1997). The pH-dependent reciprocal changes in contribution of ADP/ATP antiporter and aspartate/glutamate antiporter to the fatty acid-induced uncoupling. *FEBS Lett*, 412, 179-182.
- Schaloske RH, Dennis EA (2006). The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*, 1761, 1246-1259.
- Scherz-Shouval R, Elazar Z (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol*, 17, 422-427.
- Schönfeld P (1990). Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? *FEBS Lett*, 264, 246-248.
- Schönfeld P, Reiser G (2013). Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33, 1493-1499.
- Schönfeld P, Wojtczak L (2007). Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta*, 1767, 1032-1040.
- Schönfeld P, Wieckowski MR, Lebiezinska M, Wojtczak L (2010). Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: Lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1797, 829-938
- Seleznev K, Zhao C, Zhang XH, Song K, Ma ZA (2006). Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine. *J Biol Chem*, 281, 22275-22288.
- Shabalina IG, Nedergaard J (2011). Mitochondrial ('mild') uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not? *Biochem Soc Trans*, 39, 1305-1309.
- Shabalina IG, Vrbacky M, Pecinova A, Kalinovich AV, Drahota Z, Houstek J, Mracek T, Cannon B, Nedergaard J (2014). ROS production in brown adipose tissue mitochondria: The question of UCP1-dependence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 2017-2030
- Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med*, 28, 1387-1404.
- Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT (2002). An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci*. 22, 7006-7015.
- Shinzawa-Itoh K, Aoyama H, Muramoto K, Terada H, Kurauchi T, Tadehara Y, Yamasaki A, Sugimura T, Kurono S, Tsujimoto K, Mizushima T, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S (2007). Structures and physiological roles of 13 integral lipids of bovine heart cytochrome c oxidase. *EMBO J*, 26, 1713-1725.
- Shoshan-Barmatz V, Keinan N, Zaid H (2008). Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. *J Bioenerg Biomembr*, 40, 183-191.

- Sies H (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 27, 916-921
- Six DA, Dennis EA (2000). The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1488, 1-19.
- Skulachev VP (1991). Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, 294, 158-162.
- Skulachev VP (2012). Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J Alzheimers Dis*, 28, 283-289.
- Stephens WW, Walker JL, Myers W (1898). The action of cobra poison on the blood: A contribution to the study of passive immunity. *J Pathol Bacteriol*, 5, 279-301
- Strokin M, Seburn KL, Cox GA, Martens KA, Reiser G (2012). Severe disturbance in the Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes from mouse models of human infantile neuroaxonal dystrophy with mutated *Pla2g6*. *Hum Mol Genet*, 21, 2807-2814.
- Strokin M, Sergeeva M, Reiser G (2003). Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A<sub>2</sub> and is differently regulated by cyclic AMP and Ca<sup>2+</sup>. *Br J Pharmacol*. 139, 1014-1022.
- Strokin M, Sergeeva M, Reiser G (2007). Prostaglandin synthesis in rat brain astrocytes is under the control of the n-3 docosahexaenoic acid, released by group VIB calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. *J Neurochem*, 102, 1771-1782.
- Sullivan PG, Dubé C, Dorenbos K, Steward O, Baram TZ (2003). Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death. *Ann Neurol*, 53, 711-717.
- Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A (2004). Phospholipase A<sub>2</sub> in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res*, 45, 205-213.
- Sun GY, Xu J, Jensen MD, Yu S, Wood WG, González FA, Simonyi A, Sun AY, Weisman GA (2005). Phospholipase A<sub>2</sub> in astrocytes: responses to oxidative stress, inflammation, and G protein-coupled receptor agonists. *Mol Neurobiol*, 31, 27-41.
- Taketo MM, Sonoshita M (2002). Phospholipase A<sub>2</sub> and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1585, 72-76.
- Tanaka H, Takeya R, Sumimoto H (2000). A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun*, 272, 320-326.
- Tang, J, Kriz RW, Wolfman N, Shaffer M, Seehra J, Jones SS (1997). A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> contains eight ankyrin motifs. *J Biol Chem*, 272, 8567-8575.
- Tjoelker LW, Stafforini DM (2002). Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1488, 102-123
- Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Gray PW (1995). Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature*, 374, 549-553.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H, (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 57, 1451-55.
- Triggiani M, Granata F, Frattini A, Marone G (2006). Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta*, 1761, 1289-1300.

- Tselepis AD, John Chapman M (2002). Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl*, 3, 57-68.
- Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552, 335-344.
- Uchida K (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res*, 42, 318-343.
- Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, 13, 71-82.
- Votyakova TV, Reynolds IJ (2004). Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Arch Biochem Biophys*. 431, 138-144.
- Wada H, Yasuda T, Miura I, Watabe K, Sawa C, Kamijuku H, Kojo S, Taniguchi M, Nishino I, Wakana S, Yoshida H, Seino K (2009). "Establishment of an improved mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy that shows early disease onset and bears a point mutation in *Pla2g6*. *Am J Pathol*, 175, 2257-2263.
- Williams SD, Gottlieb RA (2002). Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective. *Biochem J*, 362, 23-32.
- Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ (2006). Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res*, 47, 1940-1949.
- Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA (2000). Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1488, 28-39.
- Wojtczak L, Lebedzinska M, Suski JM, Wieckowski MR, Schönfeld P (2011). Inhibition by purine nucleotides of the release of reactive oxygen species from muscle mitochondria: indication for a function of uncoupling proteins as superoxide anion transporters. *Biochem Biophys Res Commun*, 407, 772-776.
- Wolterbeek HT, van der Meer AJ (2005). Optimization, application, and interpretation of lactate dehydrogenase measurements in microwell determination of cell number and toxicity. *Assay Drug Dev Technol*, 3, 675-682.
- Yang HC, Mosior M, Johnson CA, Chen Y, Dennis EA (1999). Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A<sub>2</sub>. *Anal Biochem*, 269, 278-288.
- Zackova M, Krämer R, Jezek P (2000). Interaction of mitochondrial phosphate carrier with fatty acids and hydrophobic phosphate analogs. *Int J Biochem Cell Biol*, 32, 499-508.
- Zanassi P, Paolillo M, Schinelli S (1998). Coexpression of phospholipase A<sub>2</sub> isoforms in rat striatal astrocytes. *Neurosci Lett*, 247, 83-86.
- Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W (2002). "Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 277, 43553-43556.



## Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation mit Rat und Tat in den letzten Jahren unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Georg Reiser für die sehr gute fachliche Betreuung, für das entgegengebrachte Vertrauen (gerade am Anfang der Arbeit), den eingeräumten Freiraum für die Bearbeitung des Themas, sowie sein kontinuierliches Engagement und seine Unterstützung der letzten Jahre.

Der gleiche Dank gilt Herrn Dr. Rolf Stricker für seine unendliche Geduld alle meine Fragen zu beantworten (und es waren nicht wenige). Durch seine unermüdliche Hilfe ist es mir gelungen als Frischling, auf einem für mir vollkommenen fremden Gebiet, Fuß zu fassen.

Ebenfalls möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Mikhail Strokin bedanken, der mir mit einem netten Lächeln stets hilfreich zur Seite stand.

Herzlichst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Schönfeld bedanken, der es geschafft hat mit seiner charmanten liebenswürdigen Art, mir die geheime Welt der Mitochondrien näher zu bringen. Er trug maßgeblich dazu bei, die finalen Experimente dieser vorliegenden Arbeit erfolgreich abzuschließen. Dabei unterstützte mich mit Ihrer großen technischen Erfahrung Frau Heidelore Goldammer. Danke dafür!

Weiterhin danke ich Frau Petra Grüneberg, die gerade am Ende der Arbeit mit Ihrem umfangreichen technischen Fachwissen zu jeder Zeit da war, Ihre Zeit für mich opferte und mir nicht zuletzt durch viele Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter wurde. Der gleiche Dank gilt Frau Evelyn Busse, die ebenfalls immer ein offenes Ohrchen für meine kleinen, aber auch großen Probleme hatte. Auch danke dafür, dass Sie mich in angespannter und gestresster Laune ertrugen (ich weiß, dass war nicht immer leicht). Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Abidat Schneider für die umfangreiche Unterstützung bei technischen sowie organisatorischen Problemen bedanken sowie bei Frau Ilka Kramer, die gerade am Anfang meiner Arbeit mir eine große technische Hilfe war.

Mein Dank gilt auch an meinen Mitdoktoranden sowie allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für die sehr gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre ohne Ihre Hilfe nicht möglich gewesen.

Vielen, vielen Dank auch an Diane Zarries und Annette Nordmann, die mit Ihrem ständigen Enthusiasmus sich den ein oder anderen Abend um die Ohren geschlagen haben und dabei mit Ihren scharfsinnigen Augen Buchstabendreher gefunden haben, die mein Gehirn einfach nicht mehr wahrnehmen wollte.

Darüberhinaus bedanke ich mich bei meinem Freund, der in den letzten Jahren und vor allem in der stressigen Zeit des Zusammenschreibens mir stets Mut zugesprochen hat und alle meine Hochs und Tiefs (und das waren einige) ertragen hat.

Und nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen beruflichen Weg gelegt haben und immer für mich da waren und auch noch sind.

**VIELEN DANK!!!**

## Publikationen

1. Haase A, **Nordmann C**, Sedehizade F, Borrmann C, Reiser G (2008). RanBPM, a novel interaction partner of the brain-specific protein p42<sup>IP4</sup>/centaurin  $\alpha$ -1. *J Neurochem*, 105, 2237-2248

### **Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:**

2. **Nordmann C**, Strokin M, Schönfeld P, Reiser G (2014). Putative roles of Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) in respiratory chain-associated ROS production in brain mitochondria: Influence of docosahexaenoic acid and bromoenol lactone. *J Neurochem*, 131, 163-176

## Eidesstattliche Erklärung

Caroline Nordmann

Hauptstraße 22

06425 Plötzkau

Erklärung

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

**Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) und die Kontrolle der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Astrozyten und Hirnmitochondrien**

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

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

Magdeburg, den 12.12.2014

Caroline Nordmann