

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

Direktor: Prof. Dr. med. Berend Isermann

Bereich Pathobiochemie

Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Gardemann

**Untersuchung des Zusammenhangs zwischen strukturellen Veränderungen von  
Cardiolipin und der Proliferation humaner T-Zellen unter Substitution freier  
Fettsäuren.**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae

(Dr. med.)

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

vorgelegt von: Eik Mürke

aus: Magdeburg

Magdeburg 2018

# **Dokumentationsblatt**

## **Bibliographische Beschreibung**

Mürke, Eik:

Untersuchung des Zusammenhangs zwischen strukturellen Veränderungen von Cardiolipin und der Proliferation humaner T-Zellen unter Substitution freier Fettsäuren.

Dissertation, 72 Bl.; 15 Abb.; 5 Tab.; 1 Anl.; 104 Literaturquellen

Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2018

## **Kurzreferat**

Entzündungsreaktionen sind an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen des menschlichen Körpers beteiligt. Neben der Entstehung von Autoimmunerkrankungen gehören auch häufige Leiden wie Diabetes mellitus und Arteriosklerose dazu. Gleichzeitig ist bekannt, dass die Aufnahme freier Fettsäuren über die Nahrung immunologische Prozesse beeinflussen kann. In dem hier gewählten experimentellen Ansatz wird der These nachgegangen, dass die strukturellen Veränderungen des intrazellulären Moleküls Cardiolipin (CL) in Folge einer diätetischen Fettsäureaufnahme zu den Mechanismen gehören, die diesen Effekt vermitteln. Dazu wurden Pan-T-Zellen gesunder Spender untersucht. Diese wurden einer von drei Fettsäuren (Linolsäure, Palmitinsäure oder Docosahexaensäure) in physiologischen Konzentrationen für 24 bis 72 Stunden ausgesetzt. Gleichzeitig wurde das Lektin Phytohämagglutinin (PHA) benutzt, um die Proliferation der T-Zellen zu stimulieren. Die freien Fettsäuren führten zu einer Abnahme des Proteingehalts der Proben. Die DNA-Synthese und die MTT-Reduktion nahmen ebenfalls ab. Parallel dazu sank der Gesamtgehalt des CL. Die massenspektrometrische Analyse von CL ergab Änderungen der CL-Struktur durch die Fettsäure-Substitution. Die hinzugefügten Fettsäuren wurden vermehrt eingebaut. Die Zugabe von Linolsäure und Docosahexaensäure führte zu erhöhtem Gehalt von C(18:2)<sub>4</sub>-CL. Die CL-Oxidation nahm, wenn auch nicht signifikant, ab.

## **Schlüsselwörter**

Cardiolipin, T-Lymphozyten, freie Fettsäuren, Autoimmunerkrankungen, molekulare Cardiolipin-Spezies

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 T-Lymphozyten.....	7
1.2 Beeinflussbarkeit immunologischer Reaktionen.....	8
1.2.1 Entzündungsreaktionen als Teil pathophysiologischer Prozesse.....	8
1.2.2 Wirkung von Fettsäuren auf immunologische Prozesse.....	9
1.2.3 Fettsäuresubstitution als Gegenstand klinischer Forschung.....	10
1.3 Cardiolipin.....	10
1.3.1 Struktur und Vorkommen.....	10
1.3.2 Physiologische Bedeutung von Cardiolipin.....	11
1.3.3 Funktionelle Bedeutung der Komposition der Fettsäurereste des Cardiolipins.....	12
1.3.4 Pathophysiologische Bedeutung der Cardiolipinstruktur.....	12
1.3.5 Diätetischer Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung der Cardiolipinmoleküle.....	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Material.....	16
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Zellgewinnung.....	16
2.2.2 Separierung von Pan-T-Zellen mittels MACS.....	17
2.2.3 Zellkultivierung.....	18
2.2.4 DNA-Bestimmung durch <sup>3</sup> H-Thymidin-Inkorporation.....	22
2.2.5 Proteinbestimmung.....	23
2.2.6 MTT-Reduktion.....	23
2.2.7 Cardiolipinanalyse.....	24
2.3 Statistik.....	26
3 Ergebnisse.....	27

3.1	Einfluss von DHA, PS und LS auf die Proliferation und die Stoffwechselaktivität von T-Zellen unter Kulturbedingungen .....	27
3.1.1	DNA-Gehalt .....	27
3.1.2	Proteingehalt .....	28
3.1.3	MTT-Reduktion.....	30
3.2	Einfluss von Fettsäuren auf die Cardiolipinstruktur .....	32
3.2.1	Verteilung molekularer Cardiolipinspezies .....	35
3.2.2	Einfluss von FS auf die Menge des Gesamtcardiolipins.....	38
3.2.3	Einfluss von FS auf den Gehalt von Fettsäureresten bestimmter Kettenlänge	39
3.2.4	Einfluss von FS-Substitutionen auf die CL-Oxidation .....	41
3.2.5	Sättigungsgrad.....	43
4	Diskussion .....	44
4.1	Klinische Einordnung .....	44
4.2	Physiologische Einordnung .....	45
4.3	Einfluss freier Fettsäuren auf Proliferation von T-Zellen und Stoffwechselaktivität .....	46
4.3.1	Gesamtcardiolipin-Gehalt und Zellaktivität.....	49
4.3.2	Oxidation und Sättigungsgrad der CL-Moleküle und Zusammenhang zur Zellaktivität.....	50
4.4	Mögliche klinische Bedeutung und Ausblicke .....	51
5	Zusammenfassung .....	53
6	Literaturverzeichnis .....	54
	Anhang: Material .....	66
	Abbildungsverzeichnis.....	68
	Tabellenverzeichnis.....	69
	Danksagung.....	70
	Ehrenerklärung.....	71
	Darstellung des Bildungsweges .....	72

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>3</sup> H	Tritium
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	B-Zell-Lymphom
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Rinderserumalbumin
C18:2	Zweifach ungesättigte Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen (Linolsäure)
CD	Cluster of Differentiation
CL	Cardiolipin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cpm	Counts per Minute
CRD	Copper Response Defect
DHA	Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPA	Eicosapentaensäure
FS	Fettsäure
HCL	Salzsäure
HPLC-MS	High-performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
L <sub>4</sub> /L <sub>3</sub> O	Verhältnis von Cardiolipingehalt mit vier Linolsäureresten zu Cardiolipingehalt mit drei Linolsäure- und einem Ölsäurerest
LS	Linolsäure
LT	Leukotriene
<sup>m</sup> / <sub>z</sub> -Quotient	Quotient aus Masse zur Ladung
MACS	Magnetic Cell Sorting
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MNZ	Mononukleäre Blutzellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PG	Prostaglandin
PHA	Phytohämagglutinin
PS	Palmitinsäure
PTFE	Polytetrafluorethylen
Rag	Recombination-activating Gene
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per Minute)
RPMI	Kulturmedium, entwickelt im Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SEM	Standardfehler (Standard Error of the Mean)
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor

# 1 Einleitung

Eine mediterrane Ernährung geht mit positiven gesundheitlichen Effekten einher [1]. Neben einer geringeren Gesamtsterblichkeit [2] konnten verringerte Inzidenzen für kardiovaskuläre [3], karzinomatöse [4] und neurodegenerative [5] Erkrankungen nachgewiesen werden. Ein wichtiger Aspekt scheint dabei die vermehrte Aufnahme von Omega-3-Fettsäuren, vornehmlich über Fisch, zu sein [6]. Für Docosahexaensäure (DHA) konnte bereits ein modulierender Einfluss auf das Immunsystem gezeigt werden. Eine DHA-reiche Ernährung vermindert *ex vivo* die Chemokin-gesteuerte Migration von regulatorischen T-Zellen sowie ihre inhibitorische Wirkung auf Effektorzellen [7]. Die Mechanismen, die diesen Beobachtungen zu Grunde liegen, sind Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten der letzten Jahre. Dabei scheint dem Phospholipid Cardiolipin (CL) eine besondere Rolle zuzukommen. Dieses findet sich (vornehmlich) in der inneren mitochondrialen Membran. Es nimmt Einfluss auf die Proteine der Atmungskette und trägt somit essentiell zur Energiegewinnung eukaryoter Zellen bei. Zudem ist es am Ablauf des programmierten Zelltodes, der Apoptose, beteiligt. Die Funktion dieses Moleküls hängt von seinem Aufbau ab, der durch das Vorhandensein von vier Fettsäureresten einer hohen Variabilität unterliegt [8].

In der vorliegenden Arbeit sollen die Fragen beantwortet werden, ob eine Modifikation der CL-Struktur über Veränderungen des Zellmilieus erreicht werden kann und welche Wirkung erzielte Veränderungen auf die Zellaktivität und -proliferation besitzen. T-Lymphozyten wurden dabei auf Grund ihrer hohen klinischen Bedeutung für die Versuchsanordnung gewählt. Sie sind an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Zudem spielen sie eine Rolle bei chronischen Entzündungsreaktionen, die wiederum die Entstehung kardiovaskulärer und neurodegenerativer Erkrankungen begünstigen [9–11]. Entsprechend groß ist das Interesse an einer möglichen diätetischen Regulierung.

## 1.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten oder T-Zellen gehören zu den mononukleären Zellen des Immunsystems. Während ihre Bildung im Knochenmark stattfindet, ist der Thymus der Ort der Zellent-

wicklung. Dabei durchlaufen sie vier Stadien, die durch die Wechsel ihrer Cluster of Differentiation (CD) gekennzeichnet sind und während derer durch positive und negative Selektion eine Aussortierung nicht funktionsfähiger bzw. hyperreaktiver Immunzellen stattfindet [12]. Die entstehenden Immunzellen lassen sich in CD4-positive T-Helferzellen, CD8-positive zytotoxische Zellen und CD4- und CD25-positive regulatorische T-Zellen unterteilen. Neben der physiologischen Einordnung können erwähnte Cluster of Differentiation (zumeist membrangebundene Glykoproteine) auch technisch zur Separation einzelner Zelltypen verwendet werden [13].

T-Helferzellen werden durch antigenpräsentierende dendritische Zellen aktiviert und differenzieren sich in Abhängigkeit des sie umgebenden Zytokinmilieus zu Th1- oder Th2-Zellen. Th1-Zellen beeinflussen über die Produktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  die zelluläre Immunität, während Th2-Zellen über Interleukin (IL)-4, -5, -6 und -10 auf die humorale Immunantwort wirken. So aktiviert IFN $\gamma$  T- und B-Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen, während IL-4 und IL-6 zum Klassenwechsel von B-Zellen führen, wodurch diese vermehrt IgG1- statt IgM- oder IgD-Antikörper bilden [14]. CD-8-positive zytotoxische T-Lymphozyten werden ebenfalls durch dendritische Zellen aktiviert und sind in der Lage, Peptid-MHCI-Komplexe auf Körperzellen zu erkennen. Über die Bildung von Granzymen und Perforin sowie durch Initiation einer FasFas-Liganden-Interaktion induzieren sie die Apoptose körpereigener, virusinfizierter Zellen [15]. Zudem erfüllen T-Zellen Aufgaben in der Bildung eines so genannten „immunologischen Gedächtnisses“. So differenzieren sich nach einer durchgemachten Infektion T-Gedächtniszellen aus, die bei erneutem Kontakt mit entsprechenden Antigenen eine effektivere Immunantwort einleiten können [16].

## **1.2 Beeinflussbarkeit immunologischer Reaktionen**

### **1.2.1 Entzündungsreaktionen als Teil pathophysiologischer Prozesse**

Zytokine steuern die Reaktion des Organismus auf Verletzungen und Infektionen. Neben den physiologischen Abwehrprozessen kann es dabei auch zu überschießenden und unkontrollierten Entzündungsantworten kommen. Derartige autoimmunologische Prozesse sind u. a. für Pathologien wie die rheumatoide Arthritis oder die chronisch-entzündlichen

Darmerkrankungen verantwortlich. Chronische Entzündungsprozesse sind aber auch an der Entstehung neurodegenerativer und kardiovaskulärer Leiden beteiligt [10,17]. Sie stimulieren das Wachstum glatter Muskulatur, führen zu vaskulären Umbauprozessen und erhöhen die Sensitivität der Niere gegenüber Veränderungen des Elektrolythaushalts. In der Folge kommt es zu Blutdruckerhöhungen und kardiovaskulären Folgeerscheinungen [9,11]. Entsprechend relevant ist die Frage nach der Beeinflussbarkeit von Entzündungsprozessen.

### **1.2.2 Wirkung von Fettsäuren auf immunologische Prozesse**

Es konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass die Nahrung direkten Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung in den Immunzellen besitzt [18]. Nach entsprechender Substitution von Omega-3-Fettsäuren wie Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) sind diese intrazellulär vermehrt nachweisbar. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme von Arachidonsäuren [19–21]. Letzteres führt zu einer Reduktion der Produktion von auf Arachidonsäure basierenden Eicosanoid-Mediatoren wie PGE<sub>2</sub> [22] und zu einer Zunahme von EPA-abhängigen Eicosanoiden wie PGE<sub>3</sub> [23]. Fischölsreiche Ernährung bei Mäusen beeinflusst zudem die Leukotriensynthese ihrer Makrophagen (signifikante Erhöhung des LTC<sub>5</sub>-/LTC<sub>4</sub>-Verhältnisses) und somit die Mediatoren von Allergien und Entzündungen [20]. Diese Effekte werden sowohl durch das verminderte Vorliegen der Arachidonsäure als Substrat, als auch durch eine Inhibition des Arachidonsäuremetabolismus durch Omega-3-Fettsäuren erklärt [24].

EPA- und DHA-reiche Ernährung hat auch auf zellulärer Ebene Einfluss auf das Immunsystem. So sind sowohl im Tiermodell [25,26], als auch bei menschlichen Probanden [27] verminderte Proliferationsraten und verringerte Ausschüttung von Zytokinen der T-Lymphozyten nach entsprechender Fettsäureaufnahme nachweisbar. Dies beruht auf mehreren Mechanismen. Dazu gehören Veränderungen der Plasmamembranen der Immunzellen, speziell ihrer Fluidität [28], geänderte Zusammensetzung der Eicosanoidmediatoren [29], veränderte Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren [30] und Einflüsse auf so genannte Lipid Rafts. Lipid Rafts sind Teile der Zellmembran, die durch ihre Lipid-Zusammensetzung Signaltransduktionen vermitteln können. In T-Zell-Membranen befinden sich dort für die Zellaktivierung nötige Proteine [31,32].

### **1.2.3 Fettsäuresubstitution als Gegenstand klinischer Forschung**

Es wird bereits versucht, die oben genannten Erkenntnisse in der Klinik umzusetzen. So ist bekannt, dass Arachidonsäure-abhängige Mediatoren wie PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> nicht nur proinflammatorisch, sondern auch bronchokonstriktiv wirken [33]. Im Tierversuch war es möglich, durch ein DHA-haltiges Aerosol die bronchiale Hyperreagibilität im Methacholintest zu verringern. Bronchoalveoläre Lavagen wiesen zudem verminderte Zellinfiltrationen nach Aerosol-Gabe nach [34]. Eine klinische Studie mit 29 unter Asthma leidenden Kindern dokumentierte signifikante Verbesserungen des Asthma-Scores und des Methacholintests nach einer Behandlung mit EPA- und DHA-haltigen Ölkapseln [35]. Auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnten klinische Verbesserungen erzielt werden. So zeigt eine Metaanalyse Verbesserungen bezüglich der Morgensteifigkeit und eine verringerte Anzahl betroffener Gelenke durch den Einsatz von Fischöl als Nahrungsergänzung [36]. Zudem existieren zahlreiche Studien, die die Wirkung von Omega-3-Fettsäuren auf die Aktivität von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersuchen [37–39]. In einem Model mit Rag2-defizienten Mäusen gelang es, einen Anstieg von antiinflammatorischen Eicosanoidmediatoren wie Protektin D1, Resolvin E1 und Resolvin D3 durch fischölsreiche Fütterung nachzuweisen [40]. Es war jedoch weder möglich, die Konzentrationen der Omega-6-Fettsäure-abhängigen proinflammatorischen Lipidmetabolite wie PGE<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> zu verringern, noch signifikante Besserungen der Entzündungsaktivität der Darmschleimhaut zu erzielen [40]. Klinische Studien zeigten bei Fischöleinnahme durch Patienten mit Colitis ulcerosa vermehrte Eicosanoide in den rektalen Mukosazellen, was mit Veränderungen der Leukotrien-Synthese einherging. Klinisch resultierte eine signifikante Reduktion des Corticosteroidbedarfs und eine Tendenz zum schnelleren Erreichen von Remissionen, die Rezidivraten wurden nicht signifikant beeinflusst [41].

## **1.3 Cardiolipin**

### **1.3.1 Struktur und Vorkommen**

Cardiolipin (CL), erstmals 1942 durch Pangborn et al. beschrieben [42], verdankt seinen Namen dem Muskelgewebe des Rinderherzens, in dem es entdeckt wurde. Es handelt



in mutierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp zu einer schnelleren Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Synthese [50].

Neben Einflüssen auf die mitochondrialen Proteine, könnte eine direkte Wirkung des CL auf die Membrandurchlässigkeit für Protonen für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials entscheidend sein [43,51].

Des Weiteren ist CL an dem programmierten Zelltod beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass die von Bcl-2-Proteinen vermittelte Bildung von Membranöffnungen während der Apoptose von dem Vorhandensein des CL abhängig ist [52].

### **1.3.3 Funktionelle Bedeutung der Komposition der Fettsäurereste des Cardiolipins**

Die Mehrzahl der CL-Moleküle besitzt vier Linolsäurereste ( $L_4$ ). Die  $(C18:2)_3/(C18:1)_1$ -Spezies ( $L_3O$ ), also Moleküle mit drei Linolsäureresten und einem Ölsäurerest, sind ebenfalls verhältnismäßig häufig [44]. Das sich daraus ergebene  $L_4/L_3O$ -Verhältnis variiert in verschiedenen Säugetiergeweben. Hohe  $L_4/L_3O$ -Verhältnisse finden sich in Herz- und Skelettmuskelzellmitochondrien, niedrige in Mitochondrien glatter Muskulatur. Dies legt die Vermutung nahe, dass Gewebe mit hohem oxidativem Metabolismus einen höheren Gehalt an  $L_4$ -CL benötigen [53].

Eine weitere Korrelation scheint zwischen der Proliferationsrate von Immunzellen und der Fettsäure-Komposition der CL-Moleküle zu bestehen. So konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der Proliferation von T-Lymphozyten (sowohl bei Proben von gesunden Spendern als auch in Stämmen von Leukämie- und Lymphompatienten) zu einer Abnahme des  $(C18:2)_4$ -CL-Gehalts und der in den Molekülen vorkommenden Doppelbindungen führte. Zudem nahm der Anteil 16-kettiger Fettsäurereste zu. Die stimulierten Zellen gesunder Spender und die schnell proliferierenden, leukämischen Zellen wiesen mit der Zunahme ihrer Anzahl einen erhöhten Oxidationsgrad auf [8].

### **1.3.4 Pathophysiologische Bedeutung der Cardiolipinstruktur**

Die pathophysiologische Bedeutung des molekularen Aufbaus von CL wird deutlich, wenn man Patienten mit dem Barth-Syndrom betrachtet. Diese leiden unter multiplen Pa-

thologien wie Herzfehlern, Myopathien, Neutropenien und Wachstumsstörungen. Ursächlich ist ein Defekt des Tafazzin-Gens. In der Folge kommt es zu einer Fehlfunktion der Phospholipid-Acyltransferase Tafazzin. Diese ist am Auf- und Umbau von CL beteiligt. Die Patienten weisen erhöhte Werte von Monolyso-CL (ein Zwischenprodukt des CL-Remodelings) und vermindertes Gesamt-CL auf [54]. Zudem finden sich Veränderungen der Fettsäurekomposition in CL-Molekülen betroffener Patienten [55]. Dabei fällt vor allem ein Verlust der sonst nachweisbaren strukturellen Uniformität auf. Diese führt im Gesunden zu einer begrenzten Anzahl von CL-Spezies, bei denen in der Regel ein oder zwei Fettsäurereste quantitativ dominieren, woraus ein hoher Grad molekularer Symmetrie resultiert. Das defekte Tafazzin-Enzym hingegen führt zu einem großen Spektrum von Kompositionsmöglichkeiten innerhalb der CL-Moleküle. Es entstehen zahlreiche Kombinationen, die über ein Stereozentrum verfügen und asymmetrisch aufgebaut sind. Dies könnte mit den physiologischen Aufgaben des CL interferieren. So sind daraus resultierende Veränderungen der physikalischen Eigenschaften mitochondrialer Membranen denkbar. Zudem könnte die Interaktion von CL mit Proteinen beeinträchtigt werden [56]. In Kombination mit dem Defizit an Gesamt-CL scheint der Gendefekt zu mitochondrialen Dysfunktionen zu führen. Der gestörte Energieumsatz hat Schädigungen von Herz- und Skelettmuskelgeweben zur Folge.

Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung des strukturellen CL-Aufbaus liefern Modelle der Diabeteserkrankung. Die Myokardzellen eines von Diabetes mellitus betroffenen Organismus weisen tiefgreifende Veränderungen ihres Stoffwechsels auf. So werden zur Verfügung stehende Fettsäuren vermehrt als Substrat der Zellatmung verwendet. Bei diesem Vorgang entstehen reaktive Sauerstoffspezies [57,58]. Diese oxidieren hoch-ungesättigte Fettsäuren, wie sie auch im CL vorkommen. Bei Mäusen, deren  $\beta$ -Zellen mit Streptozotocin zur Diabetesinduktion zerstört worden sind, fand man nach sechs Wochen eine Abnahme des CL-Gehalts in den Myozyten. Gleichzeitig waren strukturelle Veränderungen nachweisbar. So fand sich ein vermehrter Umbau von C18:2-CL- zu C22:6-CL-Spezies. Es ist davon auszugehen, dass diese Veränderungen auch Auswirkungen auf die oben beschriebene Rolle des Phospholipids innerhalb der oxidativen Phosphorylierung haben und an der Entstehung mitochondrialer Defekte und damit diabetischer Kardiomyopathien beteiligt sind [58].

### **1.3.5 Diätetischer Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung der Cardiolipinmoleküle**

Über die Ernährung ist es möglich, die Fettsäurezusammensetzung von CL-Molekülen zu beeinflussen. Ratten, die 66 Tage lang fettfrei ernährt worden sind, wiesen in Leber-, Herz- und Nierenmitochondrien einen deutlichen Abfall von LS-haltigen CL-Spezies auf. Im Gegensatz dazu stieg der Gehalt von Palmitoleinsäure, Ölsäure und Vaccensäure im CL an [59]. Über die Substitution von mehrfach ungesättigten Fettsäuren konnten im Tiermodell kardioprotektive Effekte gezeigt werden. Speziell DHA führte dabei zu einer Erhöhung des Gesamt-CL und der (C18:2)<sub>4</sub>- und C22:2(C18:2)<sub>3</sub>-CL-Spezies in den Mitochondrien von Herzzellen. Ein Zusammenhang zwischen der veränderten Phospholipid-Komposition und einer erhöhten mitochondrialen Resistenz gegenüber Stress wurde als Mechanismus der Kardioprotektion angenommen [60,61].

Molekulare Veränderungen des CL könnte zusätzlich zu der Verminderung peripherer Triglyceride zu den Mechanismen gehören, die die protektive Wirkung auf kardiales Gewebe nach DHA-Substitution vermitteln. In einer weiteren Untersuchung mit Ratten, denen DHA-reiches, aber LS-freies Sardinenöl als einzige Fettsäurequelle gefüttert wurde, kam es zu einem Abfall des Gesamt- und des (C18:2)<sub>4</sub>-CL und zu einer Verringerung der Zellatmung, was auf die Funktion von (C18:2)<sub>4</sub>-CL hindeutet [62].

## **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Fettsäurereste von CL mit dem Proliferationsgrad von T-Zellen korreliert [8]. Darauf aufbauend ist das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkung von hinzugeführten freien Fettsäuren auf die Proliferation von T-Lymphozyten und auf den Aufbau ihrer CL-Moleküle zu untersuchen. Dabei stehen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Kann man über freie Fettsäuren im Kulturmedium die Proliferation und/oder die MTT-Reduktion (als Parameter der Redoxkapazität) von T-Lymphozyten beeinflussen?
2. Verändert das umgebende Fettsäuremilieu den Aufbau des CL?

3. Existiert ein Zusammenhang zwischen den Aktivitäts- und Proliferationsveränderungen von T-Zellen und der molekularen Struktur des CL?

Für den experimentellen Ansatz wurden Pan-T-Zellen gesunder Spender drei verschiedenen Fettsäuren ausgesetzt. Untersucht wurden die Effekte von Palmitinsäure (PS) als in der Nahrung häufig vorkommende, gesättigte Fettsäure, Linolsäure (LS), als häufigster Fettsäurerest von CL in gesunden Säugetierzellen und Docosahexaensäure (DHA), einer bereits gut untersuchten Omega-3-Fettsäure, der, neben ihren physiologischen Funktionen, positive Wirkungen auf pathophysiologische Prozesse zugeschrieben werden (siehe 1.2.2 und 1.3.5).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien befindet sich im Anhang: Material.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellgewinnung

Die in dieser Arbeit verwendeten Pan-T-Zellen stammten aus dem Blut einer homogenen Gruppe (männlich, gesund, unter 30 Jahre) von sechs Probanden (**Tabelle 1**).

**Tabelle 1: Relevante Probandendaten der T-Zellspender**

<b>Proband</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>relevante Vorerkrankungen</b>	<b>Allergien</b>	<b>Pack Years</b>
1	25	m	keine	keine	0
2	25	m	keine	Pollenallergie	4
3	25	m	keine	Penicillin-Allergie	0
4	25	m	keine	Pollenallergie	0
5	23	m	keine	keine	0
6	29	m	keine	keine	4

Mononukleäre Zellen (MNZ) des peripheren Blutes und T-Zellen stammten von freiwilligen gesunden Blutspendern. Für die Blutentnahme lag ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg vor (107/09). Die Spender willigten schriftlich zur Entnahme und wissenschaftlichen Verwendung ihres Blutes ein.

Zur Isolation von mononukleären Blutzellen (MNZ) diente eine isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierbei wird mit einem Medium ein Dichtegradient erzeugt. Treffen Partikel während der Sedimentation auf ein Medium gleicher Dichte, so verharren

sie einige Zeit in einem Schwebestadium. Sie reichern sich ringartig zwischen den Phasen an. Da Zellen ähnliche Größen und Massen, aber unterschiedliche Dichten besitzen, ist diese Methode zur ihrer Isolation geeignet [63].

Die kommerzielle Trennlösung Biocoll® kam hierbei zum Einsatz, ein Polysaccharid mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Zur Gewinnung der MNZ wurden gesunden Probanden nach ordnungsgemäßer Desinfektion der Punktionsstelle ca. 200 ml venöses Blut entnommen. 200 ml Vollblut eines Probanden wurden zu 100 ml mit Heparin versetztem RPMI 1640 (5 U/ml) hinzugegeben. Es folgte die vorsichtige Überschichtung von jeweils 12,5 ml Trennlösung (befindlich in entsprechenden Zentrifugenröhrchen) mit 30 ml Blut. Das Gemisch wurde dreißig Minuten zentrifugiert (400 x g) und die entstandene Zwischenphase aus mononukleären Zellen abgenommen. Nach drei weiteren Zentrifugations- (à 10 min, 300 x g) und Resuspendierungsschritten wurden die Zellen mit RPMI gewaschen, anschließend in einem vollautomatischen Zählgerät (Hämatologie-Automat Ac T diff2, Beckman-Coulter) gezählt und letztlich in 20 ml phosphatgepufferter Salzsäure (PBS) und 0,5 % bovinem Serumalbumin (BSA) der Magnetzellsortierung (MACS) überführt.

### **2.2.2 Separierung von Pan-T-Zellen mittels MACS**

Aus den durch die MNZ-Isolation gewonnenen Zellen wurden in einem nächsten Schritt mit Hilfe einer magnetischen Zellsortierung (Magnetic Cell Sorting, MACS) Pan-T-Zellen isoliert. Dabei kam das kommerzielle Pan T Cell Isolation Kit II® zum Einsatz. Das Prinzip dieses Vorgehens beruht auf einer negativen Selektion von mononukleären Zellen, bei denen es sich nicht um T-Zellen handelt. Dies geschieht über direkte Markierung mit Hilfe von biotinylierten Antikörpern gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und Glycophorin A, sowie über eine indirekte Markierung mit anti-Biotin-Antikörpern, die eine magnetische Komponente besitzen. Markierte Zellen werden innerhalb eines MACS-Separators durch ein magnetisches Feld zurückgehalten, während T-Zellen die Matrixsäule des Systems davon unbeeinflusst passieren können [13].

Das Vorgehen erfolgte auf Grundlage des Protokolls des MACS-Herstellers. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation (400 x g) der in 20 ml PBS und 0,5 % BSA vorliegenden Zellen und dem anschließenden Entfernen des Überstandes wurden diese in MACS-Puf-

fer ( $400\mu\text{l}/10^8$  Zellen) überführt. In den nächsten Schritten kamen die, die Antikörper beinhaltenden, Suspensionen nacheinander hinzu: Zuerst das Biotin-Antikörper-Gemisch (wobei die Menge mit  $50\mu\text{l}/10^8$  Zellen abhängig von der zuvor bestimmten Zellzahl war), danach  $100\mu\text{l}/10^8$  Zellen der anti-Biotin-Antikörpersuspension. Unterbrochen wurden diese Zusätze erst durch eine zehn-, dann durch eine fünfzehnminütige Inkubation auf Eis sowie durch die Hinzugabe von  $300\mu\text{l}/10^8$  Zellen MACS-Puffer. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt ( $336 \times g$ , 5 min) und erneuter Resuspendierung ( $10^8$  Zellen mit  $500\mu\text{l}$  MACS-Puffer) wurden die Zellen in die Matrixsäule des Separators überführt. Dabei erfolgte die Befreiung von der markierten Zellfraktion wie oben beschrieben. Die unterhalb der Säule aufgefangenen Zellen entsprachen den isolierten Pan-T-Zellen. Mit Hilfe des vollautomatischen Zählgeräts wurden die Proben bis zu der definierten Zellkonzentration von  $10^6/\text{ml}$  mit AIM V-Kulturmedium verdünnt.

Somit konnten naive, unstimulierte T-Zellen gesunder Spender für die weitere Untersuchung gewonnen werden.

### **2.2.3 Zellkultivierung**

Die gewonnenen Zellen wurden in dem für humane T-Zellen geeigneten Medium AIM V zur weiteren experimentellen Bearbeitung kultiviert. Dieses enthält laut Hersteller L-Glutamin, Streptomycinsulfat ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Gentamicinsulfat ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Zellkonzentration betrug  $10^6/\text{ml}$ . Für jeden Probanden wurden zwei 24-well Platten bestückt und jede Kavität mit je  $1\text{ ml}$  der in AIM V-kultivierten T-Zellen versehen. Auf jeder Platte wurden die Fettsäuren Linolsäure, Palmitinsäure und Docosahexaensäure (jeweils  $5\mu\text{l}$  einer  $10\text{ mM}$  Stammlösung), sowie die Lösungsmittel Ethanol und Methanol (jeweils  $5\mu\text{l}$ ) hinzugefügt. Diese Substitutionen erfolgten auf der ersten Platte direkt mit dem Beginn der Kultivierung und auf der zweiten Platte um 48 Stunden versetzt. Unabhängig davon wurden nach vier Stunden der Inkubation zu jedem Ansatz  $10\mu\text{l}$  einer Phytohämagglutinstammlösung (PHA) einer Konzentration von  $0,1\text{ mg}/\text{ml}$  hinzugegeben. Die weiteren Testungen erfolgten 72 Stunden nach Kulturbeginn. Bis dahin, sowie zwischen den Substitutionen, befanden sich die Platten in einem Inkubationsschrank bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , unter einer  $\text{CO}_2$ -Konzentration von  $5\%$ .

Pro Proband wurde eine weitere Platte (96-Well, Flachboden) mit 100  $\mu\text{l}$  der Zellen im Kulturmedium ( $10^6/\text{ml}$ ) versehen. Die Zugaben von PHA und den Fettsäuren erfolgten auf dieser Platte entsprechend den Ausführungen für die 24-Well-Platten. Um die gleichen Substratkonzentrationen zu erhalten, wurde sich entsprechend angepassten Stammlösungen bedient. So wurden nach vier Stunden jeweils 10  $\mu\text{l}$  PHA mit einer Konzentration von 0,01 mg/ml zu allen Ansätzen gegeben. Durch die Verdünnung der 10 mM Fettsäurestammlösungen der 24-Well-Platten entstanden weitere Fettsäurestammlösungen mit Konzentrationen von 0,5 mmol/l. Von diesen wurden je 10  $\mu\text{l}$  zu den entsprechenden Zellen (auch hier entweder mit dem Kulturbeginn oder 48 Stunden später) gegeben. Somit lagen freie Fettsäuren auf allen Platten mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$  vor. Um auch hier den Einfluss der Lösungsmittel darstellen zu können, wurden zwei Kontrollstammlösungen hergestellt, indem jeweils 500  $\mu\text{l}$  Ethanol bzw. Methanol mit 9,5 ml AIM V-Medium verdünnt worden sind. Von diesen wurden äquivalent zu den Fettsäureansätzen 10  $\mu\text{l}$  mit Kulturbeginn oder nach 48 Stunden zu jeweils vier T-Zell-Ansätzen pro Proband gegeben. Jeder Ansatz lag auf den 96-Well-Platten vierfach vor. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Zellen zur quantitativen Bestimmung der DNA-Synthese verwendet (siehe **Tabelle 2** zur Übersicht der Stammlösungen und **Abbildung 2** als schematische Darstellung der Zellkultivierung).

Für eine Zugabe der Fettsäuren zu zwei Zeitpunkten (mit Beginn der Kultur und nach 48 Stunden) wurde sich entschieden, um die Frage des Einflusses von Fettsäuren auf bereits begonnene Immunreaktionen untersuchen zu können.

**Tabelle 2: Übersicht zur Erstellung der verwendeten Stammlösungen**

<b>Palmitinsäure</b> (Sigma P0500); 256,43 g/mol; $\geq$ 99 %	Stammlösung 1: 10 mM	25,643 mg PS + 10 ml Ethanol
	Stammlösung 2: 0,5 mM	500 $\mu$ l Stammlösung 1 + 950 $\mu$ l AIM V
<b>DHA</b> (Sigma D2534/D3785); 328,488 g/mol; $\geq$ 98 %	Stammlösung 1: 10 mM	1. 25 mg DHA in 25 ml Methanol: 76 mmol DHA 2. 132 $\mu$ l DHA (76 mmol) + 868 $\mu$ l Methanol
	Stammlösung 2: 0,5 mM	100 $\mu$ l Stammlösung 1 + 1900 $\mu$ l Methanol
<b>Linolsäure</b> (Sigma L1268); 280,45 g/mol; $\geq$ 95 %	Stammlösung 1: 10 mM	1 l LS mit 5 % H <sub>2</sub> O – 853 g LS = 3,04 mol; davon 32,9 $\mu$ l + 10 ml Ethanol
	Stammlösung 2: 0,5 mM	Stammlösung 1 + 9,5 ml AIM V-Medium
<b>Ethanol</b> (Merck); 99,9 %	Kontrolllösung 1	keine Verdünnung
	Kontrolllösung 2	500 $\mu$ l Ethanol + 9,5 ml AIM V-Medium
<b>Methanol</b> (VWR); 99,9 %	Kontrolllösung 1	keine Verdünnung
	Kontrolllösung 2	500 $\mu$ l Methanol + 9,5 ml AIM V-Medium



#### 2.2.4 DNA-Bestimmung durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation

Die Quantifizierung der DNA-Synthese erfolgte durch eine Thymidin-Inkorporation. Dabei werden die Pan-T-Zellen radioaktiv markiertem <sup>3</sup>H-Thymidin ausgesetzt. Bei Proliferation und entsprechender Neusynthese von DNA erfolgt der Einbau dieser Basen in das Erbmateriale. Die Auswertung fand mit Hilfe eines automatischen Harvester-Systems statt. Dabei wird das Zellmaterial samt DNA auf einem Filterpapier aufgefangen, destilliertes Wasser dient den Waschschriffen sowie als Puffer. Nach dem Trocknen des Filters wird dieser auf einen gitterförmigen Szintillator (MeltiLex<sup>®</sup>) gelegt und bei 60 °C mit diesem verschmolzen. Ein MicroBeta-Plate Counter stand zur Quantifizierung der Szintillationen in Counts per Minute (cpm) zur Verfügung.

Wie unter 2.2.3 beschrieben wurde für jeden Probanden eine 96-well-Flachbodenplatte mit je 100 µl der im AIM V-Medium vorliegenden T-Zellen (10<sup>6</sup>/ml) angelegt, die der DNA-Synthesebestimmung diente. Auch hier wurden der Hälfte der Zellen direkt Fettsäuren, Ethanol und Methanol hinzugefügt, die andere Hälfte wurde den Zusätzen nach 48 Stunden ausgesetzt. Die Substratmengen wurden angepasst, um die gleichen Konzentrationen wie in den Proben für die Proteinbestimmung, MTT-Testung und Massenspektrometrie zu erhalten. Daraus ergaben sich für die Fettsäuren jeweils 10 µl aus einer 0,5 mM Stammlösung und 10 µl einer Kontrolllösung aus 500 µl Ethanol bzw. Methanol und 9,5 ml AIM V-Medium (siehe auch **Tabelle 2**: Stammlösungen 2 der Fettsäuren und Kontrolllösungen 2 von Ethanol und Methanol). Jedem Ansatz wurde nach vier Stunden PHA substituiert (jeweils 10 µl einer Verdünnung von 0,001 mg/ml). Die genannten Ansätze lagen jeweils vierfach vor, hinzu kamen Kontrollansätze, die lediglich PHA ausgesetzt waren.

Die Zellen wurden nach einer Inkubation von 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit jeweils 20 µl einer <sup>3</sup>H-Thymidinlösung (0,33 µCi/well) markiert und weitere sechs Stunden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Danach erfolgte die DNA-Synthesebestimmung mit Hilfe eines Inotech Cell-Harvesters (PerkinElmer LAS GmbH) und eines kommerziellen Szintillators (MeltiLex). Die Auswertung der <sup>3</sup>H-Thymidininkorporation erfolgte durch einen Microbeta Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer LAS GmbH).

### **2.2.5 Proteinbestimmung**

Die Analyse des Proteingehalts der T-Zellkulturen erfolgte mit Hilfe der Methode nach Bradford [64]. Diese Methode beruht auf der Bindung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau an Proteine. Durch diese Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Substrats von 465 nm in einen Bereich von 595 nm.

In die Reaktionsgefäße der vom Medium befreiten T-Zellen wurden 250 µl eines Gemischs aus PBS und Butylhydroxytoluol als Puffer bzw. Antioxidans hinzugegeben. Nach Homogenisierung erfolgte die Entnahme von jeweils 20 µl aus den so entstandenen Proben. Diese wurden mit je 80 µl destillierten Wassers und 1 ml einer kommerziellen Reagenzlösung (BioRad-Assay-Kit II) versetzt. Der proteinabhängige Farbumschlag konnte bei 595 nm photometrisch bestimmt werden. Ein Leerwert in Form der Extinktion einer 1 ml-Reagenzlösung mit 1 ml destillierten Wasser wurde von jeder Messung subtrahiert. Alle Bestimmungen erfolgten für jeden kultivierten Ansatz doppelt, aus den gewonnen Extinktionen wurden die Mittelwerte errechnet. In gleicher Weise folgte die Aufarbeitung und Extinktionsbestimmung von Proben mit Rinderserumalbumin mit bekannter Proteinkonzentration. Aus den daraus gewonnen Ergebnissen ließ sich eine Standardkurve erstellen, die für die Bestimmung des Eiweißgehalts verwendet wurde.

### **2.2.6 MTT-Reduktion**

Die zelluläre Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) nach Mosmann [65] ist von der Anzahl stoffwechselaktiver und membranintakter Zellen abhängig. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass eine Spaltung des Tetrazoliumrings der hinzugefügten MTT-Lösungen nur durch metabolisch aktive Zellen mit Hilfe mitochondrialer, cytosolischer und mikrosomaler Dehydrogenasen [66] möglich ist. Besagte Spaltung führt zu einem Farbumschlag, der bei 570 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Die gemessene Extinktion korreliert somit mit dem Aktivitätszustand der vorhandenen Zellen. Diese Methode bietet den Vorteil des Verzichts auf radioaktive Isotope und wurde zur Untersuchung der Einflussnahme von Substanzen auf T-Zelllinien angewendet [67,68].

Die Messungen erfolgten 72 Stunden nach der T-Zellgewinnung. Die verschiedenen Zellkulturansätze wurden mit 25 µl einer MTT-Stammlösung versetzt. Es folgte eine dreißigminütige Inkubation unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (5 % bei 37 °C). Durch Zentrifugation konnten die zellulären Bestandteile vom Medium getrennt werden, um anschließend für die Messung mit 1 ml eines Dimethylsulfoxid-Gemisches (DMSO) versetzt zu werden. Als Leerwert diente 1 ml DMSO ohne Zellmaterial, dessen Extinktion von den Messungen der anderen Proben subtrahiert wurde. Alle Extinktionsbestimmungen erfolgen bei 570 nm und in Doppelbestimmungen. Der sich daraus ergebende Mittelwert wurde ins Verhältnis zu dem Proteingehalt der entsprechenden Kulturen gesetzt.

### 2.2.7 Cardiolipinanalyse

*Lipidextraktion* Der Separierung von CL aus den kultivierten Zellen diente eine Modifizierung der Methode nach Folch [69]. Dabei wird das zu untersuchende Material mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol homogenisiert. Danach erfolgen mehrere Zentrifugations- und Waschschriffe. Nach dem Trocknen der Probe mit flüssigem Stickstoff lassen sich durch das Filtern des Gemisches über eine Membran die zu analysierenden Lipidstrukturen gewinnen.

10 µl der 72 Stunden inkubierten und in AIM V-Medium vorliegenden T-Zellen wurden mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (2:1, v/v) sowie 0,05 % Butylhydroxytoluol (BHT) homogenisiert und danach mit jeweils 50 ng Tetra-Myristoyl-CL ((C14:0)<sub>4</sub>-CL) als internen Standard versehen. Es folgte die Trennung der hydrophilen von der lipophilen Phase durch die Hinzugabe von 0,01 M HCL und Zentrifugation sowie intensives Schütteln. Die untere lipophile Phase wurde mit Hilfe von Stickstoff getrocknet. Gekühltes Methanol (2 ml), Chloroform (1 ml) und 0,1 M HCL (1 ml) wurden hinzugegeben. Es folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Danach konnte über Zugabe von weiteren 1 ml Chloroform und 1 ml 0,1 M HCL eine Phasentrennung erreicht werden. Nach einer weiteren Trocknung durch Stickstoff wurden die Proben in 0,8 ml eines Gemisches aus Chloroform, Methanol und Wasser (50/45/5, v/v/v) gelöst und über einer 0,2 µm starken PTFE-Membran gefiltert [8,53].

*High-performance liquid chromatography mass spectrometry* Die so präparierte Probe wurde nun der Analyse durch eine High-performance liquid chromatography mass

spectrometry (HPLC-MS) hinzugeführt. Für jede Bestimmung wurden dem System 10 µl des, wie oben beschrieben präparierten, Gemisches bereitgestellt. Die Proben im Autosampler wurden auf einer Temperatur von 8 °C gehalten. Es kam eine LiChrospher SI 60-Säule mit einem Durchmesser von 5 µm zum Einsatz. Zwischen den Lösungen A (Chloroform) und B (Methanol) herrschte ein linearer Gradient. Beide Lösungen enthielten zusätzlich 0,1 ml/l einer 25-prozentigen Ammoniumhydroxidlösung. Die entstandenen Lösungsmittelgradienten in der HPLC setzten sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 3: Lösungsmittelgradienten in der HPLC**

<b>Zeit</b>	<b>Zusammensetzung Lösungsmittelgradient</b>
0 - 0,2 min	92 % A, 8 % B
0,2 - 4,5 min	92 % A bis 30 % A und 8 % B bis 70 %
4,5 - 6 min	30 % A, 70 % B
6 - 6,5 min	30 % A bis 90 % A, 70 % B bis 10 % B
6,5 - 9,5 min	90 % A, 10 % B
9,5 - 9,7 min	90 % A bis 95 % A, 10 % B bis 5 % B
9,7 - 11 min	95 % A, 5 % B

Die Gesamtzeit der Analyse betrug 11 Minuten, das Eluat zwischen 0,3 und 6 Minuten wurde der massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Stickstoff kam dabei als Vernebelungsgas, Argon als Kollisionsgas bei einem Druck von 1,5 mTorr zur Anwendung. Die Spannung der ESI-Einheit betrug 3,5 kV, die Temperatur der Ionenquelle 375 °C und die Konusspannung 30 V. Die Tochterfragmente von (C18:2)<sub>4</sub>-CL (m/z von 723,6) konnten mit einer Kollisionsenergie von 36 eV gewonnen werden. Diese CL-Spezies sowie der interne Standard (m/z von 619,6) wurden über ihre geladenen Ionen und ihre zugehörigen Fettsäuren (LS, m/z von 279,2, Myristinsäure, m/z von 227,2) im Selected Reaction Monitoring Mode (SRM) analysiert. Entsprechende Bestimmungen fanden für die anderen CL-Formen statt. Ihre Quantität wurde schließlich auf (C18:2)<sub>4</sub>-CL bezogen. Oxidiertes

CL konnte als (C18:2)<sub>3</sub>monohydroxylinol-CL im SRM-Modus als Übergang des m/z von 731,6 zu 279,2 (LS) bestimmt werden.

### **2.3 Statistik**

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 7.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse (Repeated-measures one-way ANOVA) und einem Post-hoc-Test für multiple Messungen auf Signifikanz überprüft. Die Ergebnisse wurden bei einem p-Wert < 0,05 als signifikant angegeben (in den Abbildungen durch ein \* markiert, bezogen auf die Differenz der Messungen zu den jeweiligen Kontrollansätzen).

### **3 Ergebnisse**

Die T-Lymphozyten wurden 72 Stunden lang kultiviert. Über die daraufhin erfolgten Bestimmungen des DNA- und Proteingehalts sowie mit Hilfe der MTT-Testungen konnte der Einfluss verschiedener Fettsäuren im Inkubationsmedium auf die Aktivität und die Proliferation der Zellen objektiviert werden. Den Fragen nach strukturellen Veränderungen des CL in Abhängigkeit von der Fettsäuresubstitution und des Proliferationsgrades wurde durch massenspektrometrische Analysen nachgegangen.

#### **3.1 Einfluss von DHA, PS und LS auf die Proliferation und die Stoffwechselaktivität von T-Zellen unter Kulturbedingungen**

##### **3.1.1 DNA-Gehalt**

Mit Hilfe der Bestimmung des  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaus konnte die DNA-Synthese der kultivierten T-Zellen als Proliferationsparameter genutzt werden. Damit wurde der Einfluss substituierter Fettsäuren auf die Proliferation analysiert.

Jeder Ansatz erfolgte vierfach. Aus den Daten wurden die jeweiligen Mittelwerte gebildet. Zellkulturen, denen lediglich nach vier Stunden 10  $\mu\text{l}$  PHA (aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml), nicht aber Fettsäuren bzw. Ethanol oder Methanol hinzugefügt worden waren, dienten als Kontrollen. Für Ansätze mit sofortiger Fettsäurezugabe und mit Fettsäurezugabe nach 48 Stunden erstellten wir separate Kontrollansätze. Dies sollte Einflüsse durch das Prozedere (z. B. Unterbrechung der Inkubation während Substitution) ausschließen.

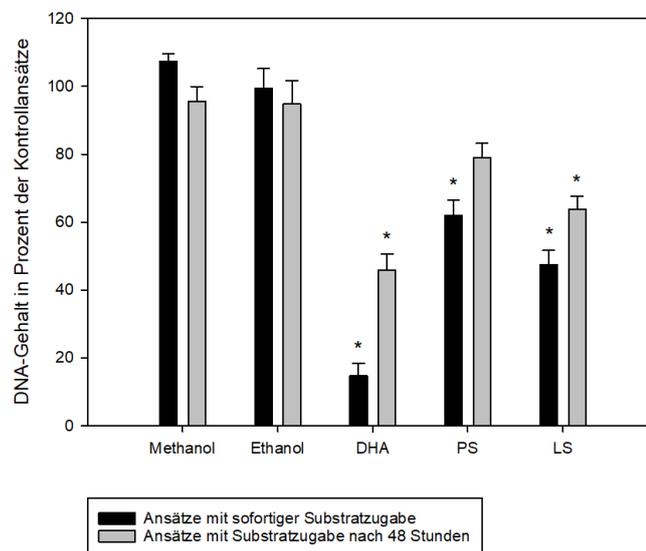
Für die Kontrollen ergaben sich im Mittel  $51181 \pm 14071$  cpm (Kontrollen der Kulturen mit sofortiger Fettsäuresubstitution) bzw.  $47969 \pm 13636$  cpm (Kontrollen der Kulturen mit Fettsäuresubstitutionen nach 48 Stunden). Diese Werte wurden, auf die weiteren Messungen bezogen, als 100 % gesetzt.

Die Zugabe von Fettsäuren (jeweils 5  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Stammlösung) mit Beginn der Zellkultivierung führte zu einer signifikanten Abnahme des DNA-Gehalts, bestimmt nach

72 Stunden. So lag der  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau, bezogen auf die Kontrollen, nach Substitution von LS im Mittel bei  $47,42 \pm 5,82 \%$ . Für PS ergab sich ein Wert von  $62,01 \pm 14,18 \%$ , DHA führte sogar zu einer Abnahme auf  $14,87 \pm 8,54 \%$ .

Die FS-Zugabe nach 48 Stunden zeigte signifikante Veränderungen für LS ( $63,89 \pm 10,54 \%$ ) und für DAH ( $45,89 \pm 11,58 \%$ ).

Um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen, in dem die Fettsäuren vorlagen, wurden zudem T-Zellansätze mit jeweils  $10 \mu\text{l}$  Ethanol bzw. Methanol erstellt. Diese zeigten weder nach sofortiger, noch nach um 48 Stunden versetzter Substratzugabe signifikante Einflüsse auf die Messungen des DNA-Gehalts der Kulturen.



**Abbildung 3: DNA-Gehalt nach FS-Zugabe.** Es wurden 100.000 Zellen/well für 72 Stunden kultiviert. Danach erfolgte die Bestimmung des DNA-Gehalts. Die auf der X-Achse benannten Substrate bzw. Fettsäuren wurden den Zellen mit Beginn der Kultur bzw. nach 48 Stunden hinzugegeben. Die prozentuale Darstellung (Y-Achse) bezieht sich auf den DNA-Gehalt der Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der T-Zellen von sechs Probanden.

\* - Differenz zum DNA-Gehalt der Kontrollen signifikant ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA, Holm-Sidak Post-hoc-Test).

### 3.1.2 Proteingehalt

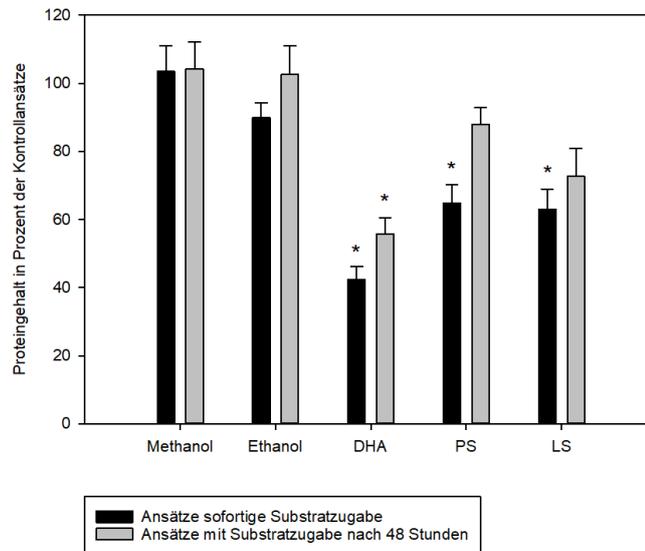
Zur weiteren Charakterisierung der Zellproliferation und der Zellaktivität kam eine Proteinbestimmung nach Bradford [64] für alle T-Zellkulturen zum Einsatz. Es erfolgten Dreifachbestimmungen, aus denen Mittelwerte gebildet wurden. Auch hier dienten Zellen

als Kontrollansätze, die neben dem Medium lediglich den nach vier Stunden hinzugefügten 10 µl PHA ausgesetzt waren. Daraus ergab sich ein Proteingehalt von  $0,39 \pm 0,065$  mg/ml (Kontrolle der Kulturen mit sofortiger Substratzugabe), bzw. von  $0,39 \pm 0,05$  mg/ml (Kontrolle der Kulturen mit Substratzugabe nach 48 Stunden). Diese Werte wurden als 100 % festgelegt. Die Proteinwerte der Kulturen mit zusätzlicher FS-Substitution wurden darauf bezogen.

Nach sofortiger Zugabe von Fettsäuren zeigten sich nach 72 Stunden signifikant verringerte Proteingehalte der T-Lymphozyten-Kulturen. Besonders deutlich war dieser Effekt mit  $42,32 \pm 9,34$  % nach Substitution von 50 µM DHA. Mit  $64,84 \pm 10,51$  % bzw.  $63,05 \pm 18,26$  % konnten aber auch eindeutige Hemmungen der Proliferation durch das Hinzufügen von PS und LS gezeigt werden.

T-Zellkulturen, die erst nach 48-stündiger Kultivierung den Fettsäuren ausgesetzt wurden, reagierten ebenfalls mit einer Abnahme ihres Proteingehalts. Auch hier war die auf die Gabe von DHA resultierende Reduktion mit  $55,76 \pm 11,66$  % am größten. Unter Hinzugabe von LS nahm der Eiweißgehalt im Vergleich zu den Kontrollen auf  $72,65 \pm 19,04$  % ab, die Verringerung nach PS-Gabe war in diesen Ansätzen gering ( $87,95 \pm 20,72$  %).

Ethanol- und Methanolsubstitutionen, die den Einfluss der Lösungsmittel auf den Proteinumsatz aufzeigten sollten, führten zu keinen signifikanten Veränderungen (**Abbildung 4**).



**Abbildung 4: Proteingehalt nach FS-Zugabe.**  $10^6$  Zellen/ml wurden in 1 ml Kulturmedium und mit den auf der X-Achse benannten Substraten mit dem Beginn der Kultur bzw. nach 48 Stunden versehen und für drei Tage kultiviert. Vier Stunden nach der T-Zellisolation wurden alle Zellen mit 1  $\mu$ l einer PHA-Stammlösung (von 0,1 mg/ml) versetzt. Nach 72 Stunden erfolgte die Proteinbestimmung. Die Ergebnisse sind hier im prozentualen Verhältnis zu den Resultaten der Kontrollansätze (Y-Achse) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der T-Zellen von sechs Probanden. \* - Differenz zum Protein-Gehalt der Kontrollen signifikant ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA, Dunn's Post-hoc-Test).

### 3.1.3 MTT-Reduktion

Mit der Bestimmung der MTT-Reduktion nach Mosmann [65] wurde ein Parameter generiert, der zusätzlich zum DNA- und Proteingehalt die Zellaktivität der Lymphozyten reflektiert. Auch hier erfolgte eine Dreifachbestimmung, die Ergebnisse resultieren aus den Mittelwerten. Die gemessenen Extinktionen wurden in das Verhältnis zu den Proteingehalten der jeweiligen Kulturen gesetzt. Die auf den Proteingehalt bezogene MTT-Reduktion spiegelt speziell die Stoffwechselaktivität der T-Zellen wieder. Als Kontrollen dienten T-Zellkulturen, die lediglich dem Medium sowie dem PHA ausgesetzt waren. Proben mit Zusätzen von Ethanol und Methanol sollten auch hier mögliche Einflüsse der Lösungsmittel darstellen, in denen die Fettsäuren vorlagen.

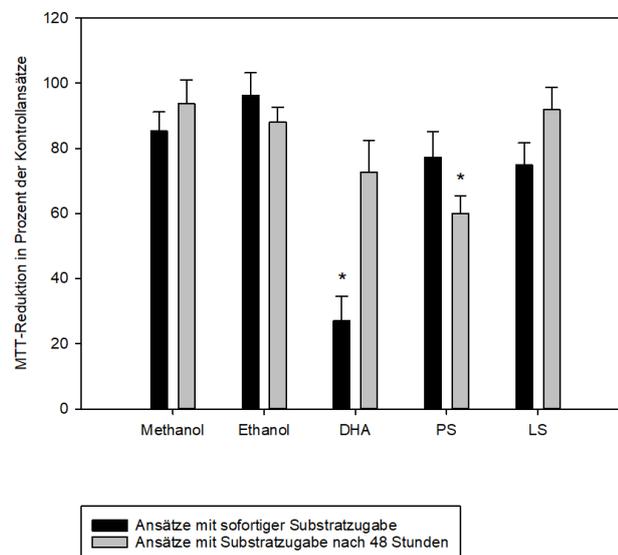
Die Kontrollansätze für die Kulturen mit sofortiger Substratzugabe zeigten im MTT-Test, der für alle Ansätze 72 Stunden nach dem Kulturbeginn erfolgte, ein durchschnittliches Ergebnis von  $2,78 \pm 0,19$  EE/mg (Extinktionseinheiten/mg), die Kontrollen für die Substitutionen nach 48 Stunden lieferten einen durchschnittlichen Wert von  $3,22 \pm 0,74$

EE/mg. Diese Messungen wurden als 100 % festgelegt und die Resultate der weiteren MTT-Bestimmungen prozentual auf die beschriebenen Kontrollen bezogen.

Es ergab sich eine geringere Stoffwechselaktivität bei T-Zellen, deren Medium sofort nach ihrer Gewinnung mit 10 µl einer Fettsäure versetzt wurde. Dabei waren die Veränderungen nach einem Zusatz von DHA mit  $26,97 \pm 18,82$  % signifikant im Vergleich zu den Resultaten der Kontrollen. Die sofortigen Zusätze von PS mit  $77,18 \pm 19,36$  % und von LS mit  $74,85 \pm 16,79$  % führten ebenfalls zu einer Aktivitätsabnahme.

Ähnliche Resultate ergaben sich nach einem Substratzusatz, der nach 48-stündiger Zellkultivierung erfolgte. Hierbei zeigten sich signifikant verringerte MTT-Werte von  $59,92 \pm 13,52$  % nach Zugabe von PS. Die Substrate DHA und LS zeigten mit  $72,73 \pm 23,74$  % bzw.  $91,99 \pm 16,47$  % nur geringe Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Effekte scheinen nicht von den Lösungsmitteln der Fettsäuren beeinflusst zu werden. In keiner der erfolgten MTT-Testungen ergaben sich signifikante Abweichungen von den Kontrollen, nachdem die Zellen 10 µl Ethanol bzw. Methanol ausgesetzt wurden.



**Abbildung 5: MTT-Reduktion.**  $10^6$  Zellen/ml wurden in 1 ml Kulturmedium sowie den auf der X-Achse benannten Zusätzen für drei Tage kultiviert. Die Substitutionen erfolgten mit dem Beginn der Kultur bzw. nach 48 Stunden. Vier Stunden nach der T-Zellisolation wurden zudem alle Zellen mit 1 µl einer PHA-Stammlösung (von 0,1 mg/ml) versetzt. Die nach 72 Stunden in der MTT-Messung bestimmten Extinktionen wurden durch den zuvor gemessenen Proteingehalt der Kulturen geteilt und sind hier in Prozent zu den Ergebnissen der Kontrollansätze dargestellt (Y-Achse). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der T-Zellen von sechs Probanden.

\* - Differenz zur MTT-Reduktion der Kontrollen signifikant ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA, Holm-Sidak Post-hoc-Test).

### 3.2 Einfluss von Fettsäuren auf die Cardiolipinstruktur

Die Daten der massenspektrometrischen Bestimmungen sind in **Tabelle 4** und **Tabelle 5** zusammengefasst. Die erste Spalte führt die gefundenen Konstellationen der Fettsäurereste innerhalb der CL-Moleküle auf. Sie wurden auf der Basis von der für molekulare CL-Spezies bekannten  $m/z$ -Verhältnissen (Masse zu Ladung) qualifiziert und quantifiziert. Die Menge der einzelnen molekularen CL-Spezies ist in Prozent des Gesamt-CL angegeben. Das Gesamt-CL ist in Mikrogramm, bezogen auf Milligramm zellulären Proteins, angegeben. Da sich in fünf Fällen identische  $m/z$ -Verhältnisse von jeweils zwei CL-Spezies fanden, wurden diese in den Tabellen zusammengefasst. Es handelt es sich um die Moleküle (C18:2)<sub>2</sub>/C18:1/C16:1 und (C18:2)<sub>3</sub>/C16:0, (C18:1)<sub>2</sub>/C18:2/C16:1 und (C18:2)<sub>2</sub>/C18:1/C16:0, (C18:2)<sub>3</sub>/C20:3 und (C18:2)<sub>2</sub>/C18:1/C20:4, (C18:2)<sub>3</sub>/C20:2 und (C18:2)<sub>2</sub>/C18:1/C20:3, sowie (C18:2)<sub>3</sub>/C20:0 und (C18:1)<sub>2</sub>/C18:2/C20:2. Trotz dieser Unschärfe in der Analyse war es möglich, zahlreiche Informationen aus den vorliegenden Daten zu gewinnen.

Die T-Zellkultivierung für die CL-Analytik entsprach der Beschreibung unter 2.2.3. Jeder kulturelle Ansatz wurde nach 72 Stunden Inkubation massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

Allen Kulturen wurde nach vier Stunden 1  $\mu$ l einer PHA Stammlösung (von 0,1 mg/ml) hinzugefügt. Als Kontrollen dienten Ansätze, deren Zusatz sich auf PHA beschränkte.

Die Fettsäure- bzw. Ethanol- und Methanolsubstitutionen erfolgten entweder mit dem Beginn der Kultur oder 48 Stunden später. Wie bereits beschrieben, sollten auch hier die Ethanol- und Methanolzugaben den Einfluss der Lösungsmittel aufzeigen. Da sich hierdurch in keiner Messung signifikante Veränderungen fanden, wurde auf die grafische Darstellung teilweise verzichtet.

**Tabelle 4: Verteilung molekularer CL-Spezies nach sofortiger FS-Zugabe.**

\* - Differenz gegenüber Kontrollen ist signifikant ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA, Dunn's Post-hoc-Test)

↓/↑ - Gehalt signifikant geringer bzw. höher im Vergleich zu den Kontrollansätzen

Substratzusätze	Kontrollen	DHA	PS	LS
<b>Gesamt-CL (µg/mg Protein)</b>	1,38 ± 0,66	0,46 ± 0,40*	0,97 ± 0,41	0,93 ± 0,50
<b>Fettsäurereste</b>	<b>Anteil des Gesamtcardiolipins (in %)</b>			
(C18:2) <sub>4</sub>	12,45 ± 1,72	18,47 ± 2,60	13,64 ± 1,78	25,31 ± 2,84
(C18:2) <sub>3</sub> /C18:1	14,55 ± 0,88	15,37 ± 2,25	16,62 ± 1,08	14,45 ± 0,56
(C18:2) <sub>2</sub> /(C18:1) <sub>2</sub>	13,95 ± 0,28	10,68 ± 2,34	15,20 ± 1,06	7,34 ± 0,33
C18:2/C18:1/(C16:0) <sub>2</sub>	0,70 ± 0,26	0,76 ± 0,70	1,27 ± 0,58	0,75 ± 0,61
(C18:1) <sub>2</sub> /(C16:0) <sub>2</sub>	5,42 ± 2,68	7,57 ± 4,97	7,66 ± 1,91	1,60 ± 0,89
(C18:2) <sub>3</sub> /C16:1	3,65 ± 0,65	1,75 ± 0,27	4,26 ± 0,54	1,41 ± 0,24
(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C16:1 o. (C18:2) <sub>3</sub> /C16:0	6,14 ± 1,08	4,14 ± 0,84	6,45 ± 0,96	2,81 ± 0,40
(C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C16:1 o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C16:0	5,39 ± 0,68	3,70 ± 0,49	5,11 ± 0,61	<b>1,62 ± 0,27*</b> ↓
(C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C16:0	2,27 ± 0,29	2,38 ± 0,96	3,27 ± 0,45	0,90 ± 0,14
(C18:1) <sub>3</sub> /C16:0	4,00 ± 0,58	4,78 ± 0,95	4,38 ± 1,21	0,84 ± 0,33
(C18:1) <sub>2</sub> /(C18:3) <sub>2</sub>	0,81 ± 0,18	0,51 ± 0,23	0,39 ± 0,05	<b>0,19 ± 0,07*</b> ↓
(C18:1) <sub>3</sub> /C18:2	5,16 ± 0,41	3,98 ± 0,65	4,48 ± 0,67	<b>2,01 ± 0,18*</b> ↓
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:4	2,32 ± 0,27	2,54 ± 0,82	2,31 ± 0,60	3,14 ± 0,41
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:3 o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:4	6,68 ± 0,75	8,27 ± 1,65	5,82 ± 1,15	7,20 ± 0,87
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:2 o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:3	7,83 ± 0,61	6,97 ± 1,63	4,73 ± 0,74	17,82 ± 2,11
(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:2	6,17 ± 0,56	4,39 ± 0,93	2,93 ± 0,56	9,56 ± 1,11
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:0 o. (C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C20:2	2,44 ± 0,15	2,66 ± 1,76	1,30 ± 0,55	2,98 ± 0,29
C22:6/(C18:2) <sub>3</sub>	0,07 ± 0,03	0,84 ± 0,78	0,12 ± 0,02	0,05 ± 0,02
C22:6/(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1	0,03 ± 0,01	<b>0,22 ± 0,14*</b> ↑	0,06 ± 0,02	0,01 ± 0,00

**Tabelle 5: Verteilung molekularer CL-Spezies nach FS-Zugabe nach 48 Stunden.**

\* - Differenz gegenüber Kontrollen ist signifikant ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA, Dunn's Post-hoc-Test)

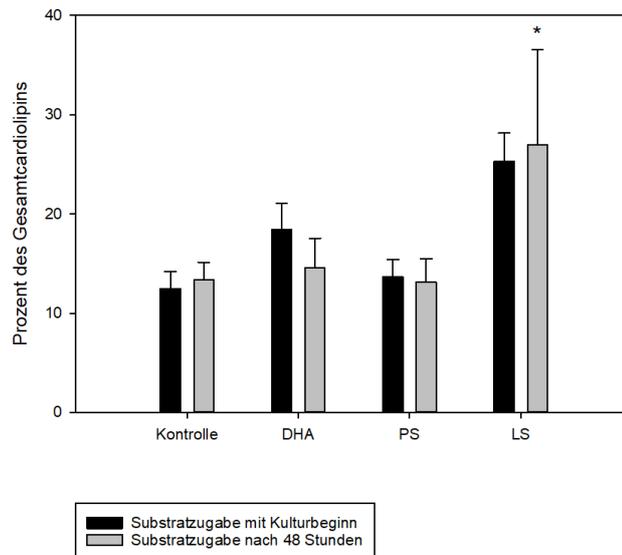
↓/↑ - Gehalt signifikant geringer bzw. höher im Vergleich zu den Kontrollansätzen

Substratzusätze	Kontrollen	DHA	PS	LS
<b>Gesamt-CL (µg/mg Protein)</b>	1,35 ± 0,53	0,81 ± 0,68	0,81 ± 0,54	1,47 ± 1,50
<b>Fettsäurereste</b>	<b>Anteil des Gesamtcardiolipins (in %)</b>			
(C18:2) <sub>4</sub>	13,36 ± 1,76	14,60 ± 2,95	13,14 ± 2,35	26,98 ± 9,58
(C18:2) <sub>3</sub> /C18:1	14,71 ± 1,04	13,72 ± 0,58	14,15 ± 0,57	16,51 ± 0,93
(C18:2) <sub>2</sub> /(C18:1) <sub>2</sub>	13,91 ± 0,46	11,95 ± 1,44	13,24 ± 2,26	<b>8,82 ± 2,39*</b> ↓
C18:2/C18:1/(C16:0) <sub>2</sub>	0,54 ± 0,14	0,63 ± 0,14	<b>1,55 ± 0,38*</b> ↑	0,72 ± 0,44
(C18:1) <sub>2</sub> /(C16:0) <sub>2</sub>	4,14 ± 1,27	4,08 ± 0,75	9,09 ± 1,30	1,33 ± 0,36
(C18:2) <sub>3</sub> /C16:1	3,40 ± 0,66	2,06 ± 0,30	3,19 ± 0,28	<b>1,44 ± 0,25*</b> ↓
(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C16:1 o. (C18:2) <sub>3</sub> /C16:0	5,80 ± 1,21	3,48 ± 0,54	5,04 ± 0,95	<b>2,63 ± 0,79*</b> ↓
(C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C16:1 o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C16:0	4,63 ± 0,74	3,28 ± 0,63	5,06 ± 0,68	<b>1,56 ± 0,64*</b> ↓
(C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C16:0	2,15 ± 0,13	2,36 ± 0,30	3,87 ± 0,17	0,80 ± 0,26
(C18:1) <sub>3</sub> /C16:0	3,89 ± 0,47	4,48 ± 0,59	4,85 ± 0,65	0,88 ± 0,49
(C18:1) <sub>2</sub> /(C18:3) <sub>2</sub>	0,74 ± 0,13	0,59 ± 0,19	0,37 ± 0,04	<b>0,25 ± 0,13*</b> ↓
(C18:1) <sub>3</sub> /C18:2	5,15 ± 0,32	5,26 ± 0,63	4,43 ± 0,70	<b>2,60 ± 0,83*</b> ↓
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:4	2,61 ± 0,43	3,05 ± 0,73	2,19 ± 0,50	3,09 ± 0,53
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:3 o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:4	7,56 ± 0,76	8,55 ± 1,67	6,05 ± 1,48	8,56 ± 1,80
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:2 o. (C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:3	8,16 ± 0,65	8,34 ± 0,51	6,19 ± 0,42	13,05 ± 2,71
(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1/C20:2	6,66 ± 0,32	7,79 ± 1,02	5,10 ± 0,62	7,96 ± 2,41
(C18:2) <sub>3</sub> /C20:0 o. (C18:1) <sub>2</sub> /C18:2/C20:2	2,54 ± 0,12	3,51 ± 0,50	2,38 ± 0,88	2,75 ± 0,94
C22:6/(C18:2) <sub>3</sub>	0,05 ± 0,01	<b>1,85 ± 0,57*</b> ↑	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,03
C22:6/(C18:2) <sub>2</sub> /C18:1	0,02 ± 0,01	<b>0,42 ± 0,18*</b> ↑	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01

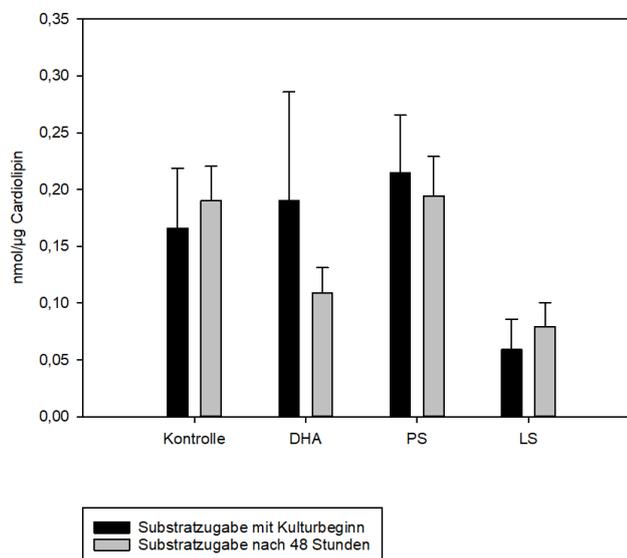
### 3.2.1 Verteilung molekularer Cardiolipinspezies

In einer experimentellen Arbeit über CL-Veränderungen in proliferierenden T-Zellen konnte eine Abnahme des häufigsten CL-Vertreters in Säugetierzellen, des (C18:2)<sub>4</sub>-CL (CL mit vier Linolsäure-Resten), mit steigender Proliferationsrate gezeigt werden [8]. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen eine Zunahme von (C18:2)<sub>4</sub>-CL in den in ihrer Proliferation gehemmten T-Lymphozyten. 12,45 ± 1,72 % des Gesamt-CL in den Kontrollansätzen waren dieser CL-Unterform zuzuordnen. Nach Zugabe von PS mit dem Beginn der Kultur waren es 13,64 ± 1,78 %, DHA-Zugabe führte zu 18,47 ± 2,60 % und die LS-Substitution resultierte sogar in einen Anstieg auf 25,32 ± 2,85 %. Die gemessenen Werte bei FS-Zugabe nach 48 Stunden lagen im Fall von LS mit 26,98 ± 9,58 % ebenfalls deutlich über denen der Kontrollen (13,36 ± 1,76 %), während PS und DHA zu nur gering höheren (C18:2)<sub>4</sub>-CL-Anteilen führten (**Abbildung 6**).

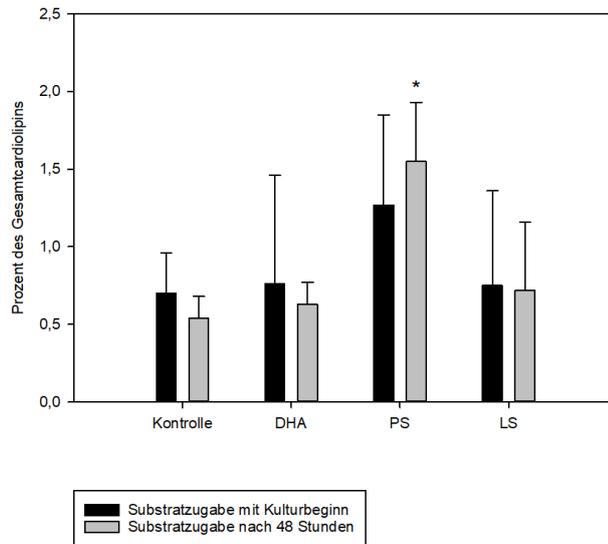
Auch der Einbau der anderen FS konnte über ihr Vorhandensein im umgebenden Milieu angeregt werden. Gesättigte Fettsäurereste mit 16 C-Atomen (PS) kamen in den Ansätzen vermehrt vor, denen PS substituiert wurde (0,21 ± 0,05 mmol/μg nach sofortiger Substitution, 0,24 ± 0,02 mmol/μg nach Substitution nach 48 Stunden, im Gegenzug zu den Kontrollansätzen mit 0,17 ± 0,05 mmol/μg bzw. 0,14 ± 0,03 mmol/μg). LS verminderte den C(16:0)-Gehalt (0,06 ± 0,03 nach sofortiger Substitution, 0,05 ± 0,02 mmol/μl nach Substitution nach 48 Stunden). DHA wies keinen signifikanten Einfluss auf (0,19 ± 0,1 mmol/μl bzw. 0,13 ± 0,02 mmol/μl) (**Abbildung 7**). Auch C18:2/C18:1/(C16:0)<sub>2</sub>-CL war mit 1,27 ± 0,58 % bzw. 1,55 ± 0,38 % in den von PS umgebenen Zellen im Vergleich zur Kontrolle (0,70 ± 0,26 bzw. 0,54 ± 0,14) vermehrt zu finden (**Abbildung 8**). Die Anteile anderer Spezies mit einem C16:0-Rest ((C18:1)<sub>2</sub>/(C16:0)<sub>2</sub>, (C18:1)<sub>2</sub>/C18:2/C16:0, (C18:1)<sub>3</sub>/C16:0) nahmen ebenfalls zu (**Tabelle 4**, **Tabelle 5**). Eine noch deutlichere Ausprägung dieses Effekts zeigte sich für den Einbau von DHA (C22:6). So lag beispielsweise C22:6/(C18:2)<sub>3</sub>-CL nach DHA-Zugabe nach 48 Stunden der Kultivierung bei 1,85 ± 0,57 % des Gesamt-CL (0,05 ± 0,01 % in den Kontrollansätzen) (**Abbildung 9**), C22:6/(C18:2)<sub>2</sub>/C18:1 lag bei 0,42 ± 0,18 % (0,02 ± 0,01 % in den Kontrollen).



**Abbildung 6: Einfluss von FS auf (C18:2)<sub>4</sub>-CL-Gehalt.** Dargestellt ist der massenspektrometrisch bestimmte, prozentuale Anteil von CL-Molekülen mit vier LS-Resten ((C18:2)<sub>4</sub>-CL) am Gesamt-CL. Während die Kontrollansätze lediglich 1 µl einer PHA-Stammlösung (von 0,1 mg/ml) ausgesetzt waren, wurden die Kulturmedien der anderen Zellen zusätzlich mit den angegebenen FS versehen. Die Messungen fanden nach 72 Stunden statt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der T-Zellen von sechs Probanden. \* - Differenz zum Gehalt der Kontrollen signifikant (p < 0,05; one-way ANOVA, Dunn's Post-hoc-Test).

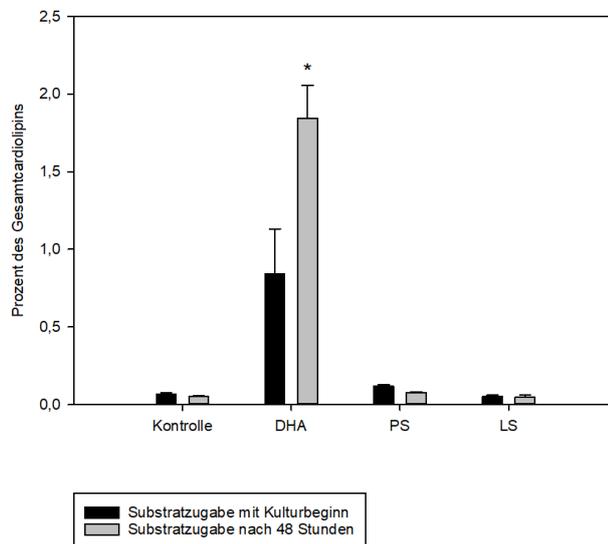


**Abbildung 7: Einfluss von FS auf Gehalt von gesättigten Fettsäureresten mit 16 C-Atomen in CL.** Dargestellt ist der Gehalt von gesättigten Fettsäureresten mit 16 C-Atomen in nmol/µg Gesamt-CL (Y-Achse). Auf der X-Achse sind die dem Kulturmedium zugeführten Substrate benannt. Die Substitution erfolgte entweder mit dem Beginn der Kultur (dunkle Balken) oder 48 Stunden später (helle Balken). Die massenspektrometrischen Bestimmungen fanden nach 72 Stunden statt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der T-Zellen von sechs Probanden.



**Abbildung 8: Einfluss von FS auf C18:2/C18:1/(C16:0)<sub>2</sub>-CL-Gehalt.** Dargestellt ist der massenspektrometrisch bestimmte, prozentuale Anteil von C18:2/C18:1/(C16:0)<sub>2</sub>-CL am Gesamt-CL untersuchter T-Lymphozyten (Y-Achse). Die Medien wurden mit den auf der X-Achse benannten Substraten versehen. Die Substitution erfolgte mit Kulturbeginn (dunkle Balken) bzw. 48 Stunden danach (helle Balken). Die Messungen erfolgten 72 Stunden nach Kulturbeginn. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der T-Zellen von sechs Probanden.

\* - Differenz zum Gehalt der Kontrollen signifikant ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA, Dunn's Post-hoc-Test).

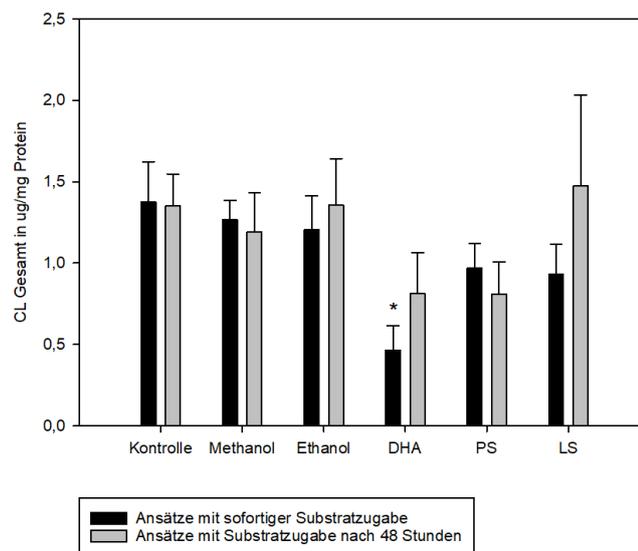


**Abbildung 9: Einfluss von FS auf C22:6/(C18:2)<sub>3</sub>-CL-Gehalt.** Dargestellt ist der massenspektrometrisch bestimmte, prozentuale Anteil von C22:6/(C18:2)<sub>3</sub>-CL am Gesamt-CL untersuchter T-Lymphozyten (Y-Achse). Die Medien wurden mit den auf der X-Achse benannten Substraten versehen. Die Substitution erfolgte mit Kulturbeginn (dunkle Balken) bzw. 48 Stunden danach (helle Balken). Die Messungen erfolgten 72 Stunden nach Kulturbeginn. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der T-Zellen von sechs Probanden.

\* - Differenz zum Gehalt der Kontrollen signifikant ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA, Dunn's Post-hoc-Test).

### 3.2.2 Einfluss von FS auf die Menge des Gesamtcardioliopins

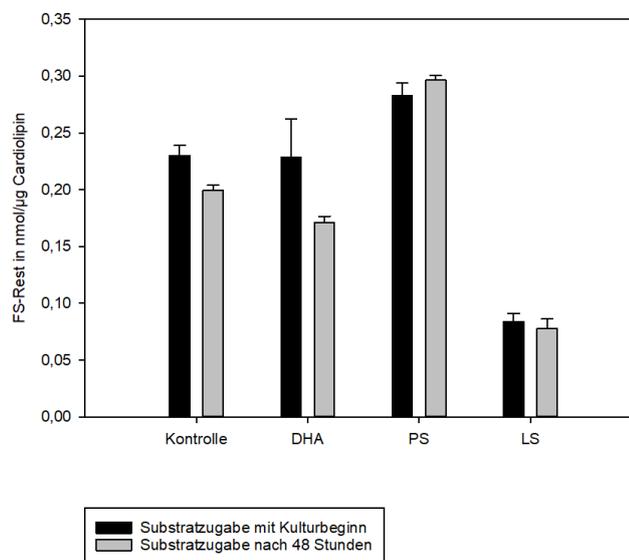
Wie die Daten unter 3.1 zeigen, führte der Zusatz von Fettsäuren in den Kulturmedien zu messbaren Reduktionen der Zellproliferation. Die massenspektrometrische Analyse wies in diesen Zellkulturen auch auf einen Abfall des intrazellulären Gesamt-CL hin. Dieser wurde nach DHA-Substitution am deutlichsten. Während der Gehalt in den Kontrollen bei  $1,38 \pm 0,66 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein bzw.  $1,35 \pm 0,53 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein lag, sank er nach sofortiger DHA-Zugabe auf  $0,46 \pm 0,41 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein. Nach Zugabe nach 48 Stunden sank der Gehalt auf  $0,81 \pm 0,68 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein, was einer nicht signifikanten Änderung entspricht. Die Tendenz der Abnahme war ebenfalls bei den anderen Fettsäuren nachweisbar. Sofortiger LS-Zusatz resultierte nach 72 Stunden in einem CL-Gehalt von  $0,93 \pm 0,50 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein, PS-Zusatz in  $0,97 \pm 0,41 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein.



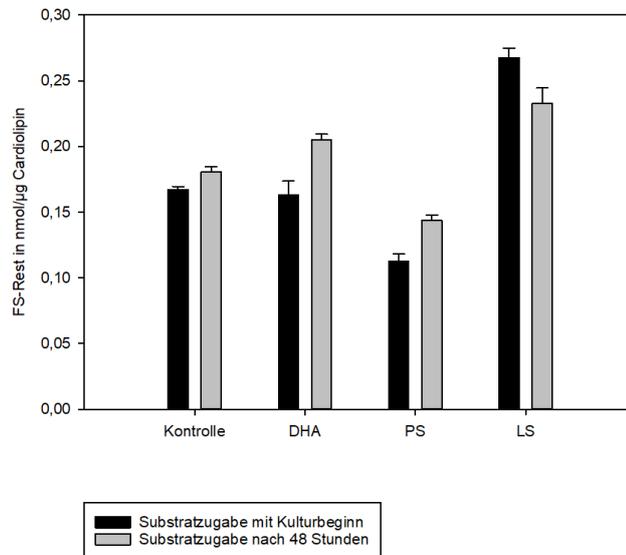
**Abbildung 10: Einfluss von FS auf Gesamtgehalt CL.** Dargestellt ist der massenspektrometrisch bestimmte CL-Gehalt von 72 Stunden kultivierten T-Lymphozyten. Während die Kontrollansätze lediglich  $1 \mu\text{l}$  einer PHA-Stammlösung (von  $0,1 \text{ mg}/\text{ml}$ ) ausgesetzt waren, wurden die Kulturmedien der anderen Zellen sofort bzw. 48 Stunden nach Kulturbeginn zusätzlich mit den auf der X-Achse benannten Substraten versehen. Der CL-Gehalt in  $\mu\text{g}$  bezieht sich auf den Proteingehalt in  $\text{mg}$  in den entsprechenden Ansätzen (Y-Achse). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der T-Zellen von sechs Probanden. \* - Differenz zum Gehalt der Kontrollen signifikant ( $p < 0,05$ ; one-way ANOVA, Dunn's Post-hoc-Test).

### 3.2.3 Einfluss von FS auf den Gehalt von Fettsäureresten bestimmter Kettenlänge

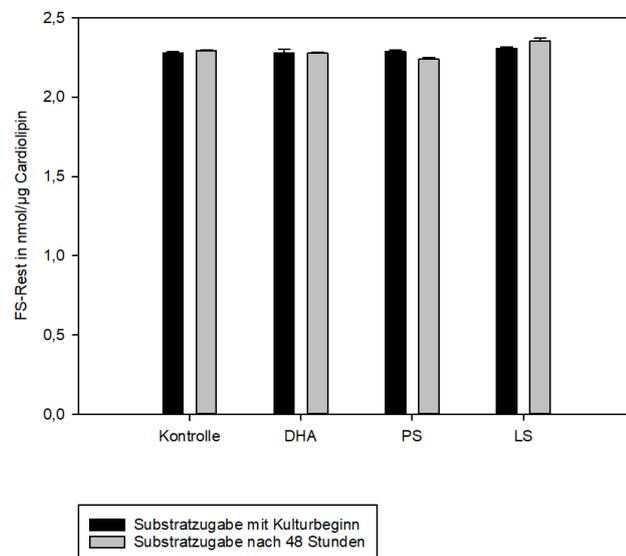
Aus [8] ist eine Zunahme des Gehalts von C16-Acylketten im Rahmen der Proliferation von T-Zellen bekannt. Die hier untersuchten FS-Substitutionen gingen mit einer Zunahme von C16-Resten nach PS-Zugabe einher ( $0,283 \pm 0,06$  nmol/ $\mu$ g CL bei sofortiger Zugabe,  $0,296 \pm 0,04$  nmol/ $\mu$ g CL bei Zugabe nach 48 Stunden, verglichen mit  $0,23 \pm 0,063$  nmol/ $\mu$ g CL bzw.  $0,2 \pm 0,04$  nmol/ $\mu$ g CL der Kontrollen), LS führte hingegen mit  $0,084 \pm 0,03$  nmol/ $\mu$ g bzw.  $0,078 \pm 0,03$  nmol/ $\mu$ g CL zu einem selteneren Einbau von C16-FS-Resten (**Abbildung 11**). Umgekehrt verhielt es sich für den Gehalt von C20-Fettsäuren. Hier führte PS zu einer Abnahme ( $0,112 \pm 0,045$  nmol/ $\mu$ g CL bzw.  $0,14 \pm 0,03$  nmol/ $\mu$ g), LS zu einer Zunahme ( $0,267 \pm 0,032$  nmol/ $\mu$ g bzw.  $0,233 \pm 0,055$  nmol/ $\mu$ g) des Einbaus, verglichen mit der Kontrolle ( $0,167 \pm 0,015$  nmol/ $\mu$ g CL,  $0,181 \pm 0,015$  nmol/ $\mu$ g CL) (**Abbildung 12**). Veränderungen des Gesamtgehalts von 18-kettigen Fettsäureresten, wie sie im CL am häufigsten vorkommen, konnten nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 13**).



**Abbildung 11: Einfluss von FS auf den Gehalt von C16-kettigen FS-Resten in CL.** Dargestellt ist der Gehalt von C16-kettigen Fettsäureresten in nmol/ $\mu$ g Gesamt-CL (Y-Achse). Auf der X-Achse sind die dem Kulturmedium zugeführten Substrate benannt. Die Substitution erfolgte entweder mit dem Beginn der Kultur (dunkle Balken) oder 48 Stunden später (helle Balken). Die massenspektrometrischen Bestimmungen fanden nach 72 Stunden statt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der T-Zellen von sechs Probanden.



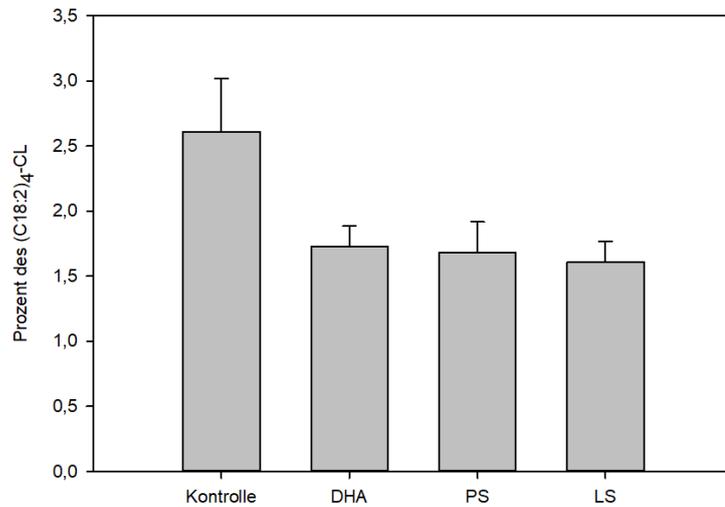
**Abbildung 12: Einfluss von FS auf Gehalt von C20-kettigen FS-Resten in CL.** Dargestellt ist der Gehalt von C20-kettigen Fettsäureresten in nmol/μg Gesamt-CL (Y-Achse). Auf der X-Achse sind die dem Kulturmedium zugeführten Substrate benannt. Die Substitution erfolgte entweder mit dem Beginn der Kultur (dunkle Balken) oder 48 Stunden später (helle Balken). Die massenspektrometrischen Bestimmungen fand nach 72 Stunden statt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der T-Zellen von sechs Probanden.



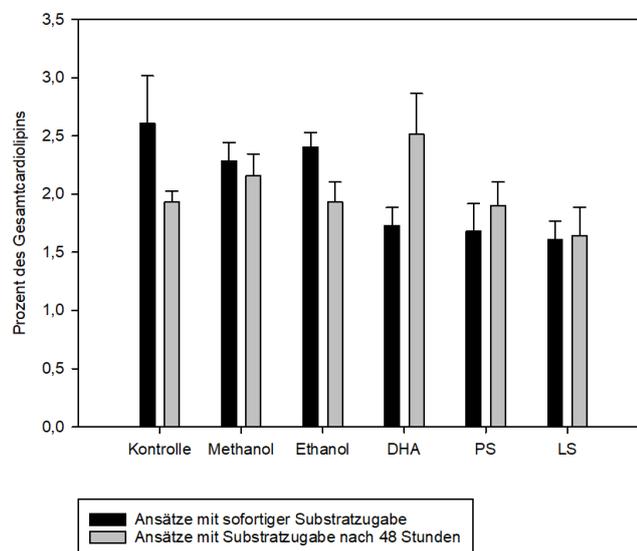
**Abbildung 13: Einfluss von FS auf den Gehalt von C18-kettigen FS-Resten in CL.** Dargestellt ist der Gehalt von C18-kettigen Fettsäureresten in nmol/μg Gesamt-CL (Y-Achse). Auf der X-Achse sind die dem Kulturmedium zugeführten Substrate benannt. Die Substitution erfolgte entweder mit dem Beginn der Kultur (dunkle Balken) oder 48 Stunden später (helle Balken). Die massenspektrometrischen Bestimmungen fand nach 72 Stunden statt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der T-Zellen von sechs Probanden.

### 3.2.4 Einfluss von FS-Substitutionen auf die CL-Oxidation

Zur Darstellung der Oxidation von CL diente die massenspektrometrische Bestimmung von (C18:2)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure und das prozentuale Verhältnis des Gehalts von (C18:2)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure zu dem summierten Gehalt von (C18:2)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure- und (C18:2)<sub>4</sub>-Resten. Da (C18:4)<sub>4</sub>-CL mit den zweifach ungesättigten Fettsäureresten in den meisten Zellen am häufigsten vorkommt und im Gegensatz zu Formen mit einfach- und ungesättigten Fettsäureresten leicht oxidiert wird, eignet sich die Messung seiner oxidierten Form als Marker der gesamten CL-Oxidation. Mit dieser Methode konnte bereits eine Zunahme der Oxidation bei T-Zellstimulation nachgewiesen werden [8]. In der vorliegenden Arbeit kam es nach Fettsäuresubstitution zu einer Proliferationsabnahme der Lymphozyten. Diese ging mit einem Rückgang der Oxidation einher. So lag der relative Gehalt von (C18:3)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure in den Kontrollansätzen bei  $2,61 \pm 1,09$  %. Nach Zusatz von DHA mit Beginn der Kultur lag er bei  $1,73 \pm 0,41$  %, von PS bei  $1,68 \pm 0,63$  % und eine Substitution von LS sorgte für einen Rückgang auf  $1,61 \pm 0,42$  %. Eine Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 14** – Ausschließliche Darstellung der Ansätze mit sofortiger FS-Substitution nach Kulturbeginn). Das Hinzufügen der Fettsäuren, 48 Stunden nach Kulturbeginn, führte zu einem uneinheitlichen Bild. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Veränderungen (**Abbildung 15**).



**Abbildung 14: Einfluss von FS auf den Oxidationsgrad des CL nach sofortiger FS-Zugabe.** Als Marker für den Oxidationsgrad wurde der prozentuale Anteil von (C18:2)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure am Gesamtgehalt von (C18:4)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure und (C18:2)<sub>4</sub>-Resten verwendet (Y-Achse). Mit Beginn der Kultur erfolgte der auf der X-Achse benannte Substratzusatz. Die Messungen fanden nach 72 Stunden statt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der T-Zellen von sechs Probanden. Es ergab sich keine Signifikanz für  $p < 0,05$ .



**Abbildung 15: Einfluss von FS auf den Oxidationsgrad des CL nach sofortiger und um 48 h versetzter FS-Zugabe.** Als Marker für den Oxidationsgrad wurde der prozentuale Anteil von (C18:2)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure am Gesamtgehalt von (C18:4)<sub>3</sub>-Monohydroxy-Linolsäure und (C18:2)<sub>4</sub>-Resten verwendet (Y-Achse). Mit Beginn der Kultur bzw. nach 48 Stunden erfolgte der auf der X-Achse benannte Substratzusatz. Die Messungen fanden nach 72 Stunden statt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der T-Zellen von sechs Probanden. Es ergab sich keine Signifikanz für  $p < 0,05$ .

### 3.2.5 Sättigungsgrad

Über die molare Masse der gefundenen CL-Moleküle und ihr Vorhandensein in den Proben, gemessen in pmol/mg Protein, konnte die Anzahl von Doppelbindungen in nmol/ $\mu$ g CL errechnet werden. Die Fettsäuresubstitution ergab hierbei leichte Veränderungen. LS führte mit  $4,85 \pm 0,53$  nmol/ $\mu$ g CL zu einem Anstieg nachweisbarer Doppelbindungen (verglichen mit  $4,31 \pm 0,46$  nmol/ $\mu$ g CL in den Kontrollansätzen). Gleiches gilt für die Ansätze, denen DHA nach 48 Stunden hinzugefügt worden ist ( $4,50 \pm 0,66$ ). PS sorgte für einen Abfall auf  $4,18 \pm 0,57$  nmol/ $\mu$ g.

## 4 Diskussion

Pathogene lösen in T-Lymphozyten Mechanismen aus, die für Anpassungen ihres Stoffwechsels sorgen. Dies ist Voraussetzung für eine effektive und adäquate Immunantwort. Mit der Untersuchung des intrazellulären Phospholipids Cardiolipin und der Varianz seines strukturellen Aufbaus in Beziehung zu dem Proliferations- und Aktivitätszustand von Immunzellen wird in der vorliegenden Arbeit ein möglicher Mechanismus untersucht, der ebendiese Anpassungen des Stoffwechsels erlaubt. Dazu diente ein *In-vitro*-Modell, in dem die T-Lymphozyten gesunder Spender verschiedenen Fettsäuren in physiologisch vorkommenden Konzentrationen ausgesetzt wurden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Einflüsse der Substitutionen auf die Proliferation und die Redoxaktivität sowie auf die Struktur des Cardiolipins.

### 4.1 Klinische Einordnung

T-Lymphozyten sind an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Sie spielen u. a. eine Rolle in der Aufrechterhaltung chronischer Entzündungsreaktionen, die neben der Adipositas, dem Bluthochdruck, der Dyslipidämie und dem Diabetes mellitus zu den Risikofaktoren für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit (KHK) gezählt werden [10,70]. So weisen an einer KHK leidende Diabetiker vermehrte Werte von Th1-Zytokinen auf, während die Spiegel der von Th2-Zellen gebildeten Mediatoren reduziert vorliegen [71]. Bei Hypertonikern lassen sich erhöhte Zahlen CD-8-positiver Zellen feststellen. Zudem werden bei ihnen erhöhte T-Zell-Chemokinwerte gemessen [72].

Entsprechend hoch ist das Interesse an physiologischen Abläufen von Immunantworten und Möglichkeiten zur Beeinflussung der Aktivität von T-Lymphozyten, beispielsweise über diätetische Ansätze. Speziell über die Substitution von Omega-3-Fettsäure konnten bereits zahlreiche Veränderungen zellulärer Immunantworten aufgezeigt werden [24,27], wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben, auch mit positiven klinischen Auswirkungen.

## 4.2 Physiologische Einordnung

Die Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten unterliegt komplexen metabolischen Anpassungen. Dabei spielen Prozesse innerhalb der Mitochondrien eine wichtige Rolle.

Während T-Effektor-Zellen ihre Energie hauptsächlich aus der Glykolyse gewinnen, basiert die Energiegewinnung in regulatorischen T-Zellen vornehmlich auf der Oxidation von Lipiden. Über die Veränderung des mitochondrialen Metabolismus konnte eine Einflussnahme auf die T-Zell-Differenzierung gezeigt werden [73]. Auch wirken mitochondriale reaktive Sauerstoff-Spezies immunmodulatorisch. Über die Stabilisierung eines Transkriptionsfaktors (HIF-1- $\alpha$ ) erhöhen sie die TNF- $\alpha$ -Sekretion [74].

Neben der Rolle der Mitochondrien in der Anpassungsreaktion der T-Lymphozyten ist die Notwendigkeit der Anwesenheit von Fettsäuren im umgebenen Medium eine bekannte Voraussetzung für die Immunantwort [75,76]. Als ein möglicher, zugrundeliegender Mechanismus wurde die Signaltransduktion, sowohl über cAMP als auch über die Proteinkinase C beschrieben [77,78]. Zudem wirkt sich das Vorhandensein von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf die Membranorganisation aus, sowohl auf Lipid Rifts, als auch auf die Kontaktstellen zwischen Immunzellen, den sogenannten immunologischen Synapsen [79–81].

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle des CL bei Stoffwechselveränderungen von T-Lymphozyten betrachtet. CL, ein Phospholipid der mitochondrialen Membran, ist eng mit der Funktion mitochondrialer Proteine verknüpft. Es konnte gezeigt werden, dass Form und Stabilität der, aus den Proteinen der Atmungskette gebildeten, Superkomplexe von dem Vorhandensein von CL abhängig sind [82]. CL hat zudem Einfluss auf die Membranstabilität, interagiert mit Carrier-Proteinen und spielt eine Rolle in der mitochondrial vermittelten Apoptose [83]. Die Dimerisation der in ihrer inaktiven Form monomer vorliegenden, mitochondrialen Opa1-Proteine, ist ebenfalls abhängig vom Vorhandensein des CL. Opa1-Proteine sind über ihre GTPase-Aktivität wiederum an Fusionsprozessen der inneren Mitochondrienmembran beteiligt [84].

Bei Schild et al. [8] wurden die T-Zellen gesunder Spender mit den Zellen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie, akuter T-Zelleukämie (T-ALL) sowie einer IL-

2-abhängigen T-Zelllinie verglichen. Die massenspektrometrischen Analysen führten zu mehreren Feststellungen. So ging ein erhöhter Proliferationsgrad mit einer verringerten Anzahl an Doppelbindungen einher. Zudem fanden sich mehr Moleküle mit 16-kettigen Resten. Die Zahl von C18-CL nahm hingegen ab. Ebenso die physiologisch am häufigsten vorkommende CL-Spezies (C18:2)<sub>4</sub>. Der Zusammenhang zwischen der metabolischen Aktivität von T-Zellen und dem Aufbau ihrer CL-Moleküle wurde somit hergestellt.

In einem Vorexperiment der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich auch durch die Stimulation der T-Zellproliferation mit PHA Veränderungen im Aufbau des CL erreichen lassen [85]. Gleiches galt für die Proliferationshemmung mit Hilfe von Cyclosporin A (CsA), dass über die Bindung und Inhibition der Phosphatase Calcineurin mit der Zytokinausschüttung interferiert [86]. Es wurden zwei Korrelationen gezeigt. Zum einen stieg mit der Proliferationsrate der Gehalt der im CL inkorporierten PS-Reste an. Gleichzeitig ergab sich eine negative Korrelation zwischen Proliferation und (C18:2)<sub>4</sub>-CL-Gehalt, also CL mit vier LS-Resten. Die Ergebnisse legen eine Korrelation zwischen der CL-Komposition und der Stimulation und Proliferation von T-Zellen nahe. Diese Erkenntnisse dienen als Grundlage der vorliegenden Arbeit. Die Korrelation zwischen dem Proliferationszustand von Lymphozyten und der Struktur ihres intrazellulären CL lässt vermuten, dass die CL-Struktur einen Einfluss auf die metabolischen Anpassungsprozesse der Immunzellen besitzt. Daraus ergibt sich die Überlegung, externe Einflüsse auf die CL-Struktur zu untersuchen und die Konsequenzen dieser Einflüsse auf das Proliferationsverhalten der Immunzellen zu beschreiben.

### **4.3 Einfluss freier Fettsäuren auf Proliferation von T-Zellen und Stoffwechselaktivität**

Über die Bestimmung des Proteingehalts kann die Zellmasse ermittelt und damit Rückschluss auf den Proliferationszustand verschiedener kultureller Ansätze getroffen werden. Zu diesem Zweck kam hier die Methode nach Bradford zum Einsatz. Ergänzend betrachteten wir den Einbau von radioaktiv markiertem <sup>3</sup>H-Thymidin, der Aussagen zum DNA-Gehalt und damit ebenfalls zum Proliferationsverhalten der T-Zellen liefert.

Da der Zusammenhang zwischen den metabolischen Veränderungen der Immunzellen und der Struktur des CL betrachtet werden sollte, bedienten wir uns zudem der MTT-Testung, bei der bei der Spaltung eines Tetrazoliumrings photometrisch bestimmbare Farbumschlag genutzt wird, um eine Aussage über die Aktivität der zu untersuchenden Zellen zu treffen [65]. Es handelt sich also um eine Quantifizierung metabolischer Aktivität innerhalb der T-Zellen und nicht ausschließlich um eine Betrachtung der Zellproliferation.

Die Fettsäuresubstitutionen führten zu verminderten Proliferationsraten und zur Abnahme der metabolischen Zellaktivität. Dieser Effekt ließ sich sowohl in den Ansätzen beobachten, die mit Kulturbeginn mit den freien Fettsäuren versehen wurden, als auch in den Ansätzen mit einer um 48 Stunden verzögerten Substitution. Damit lässt sich eine direkte Interaktion des Lektins PHA mit den Fettsäuren und eine daraus resultierende Proliferationsbeeinflussung weitestgehend ausschließen. Zudem konnte somit gezeigt werden, dass eine Beeinflussung der immunologischen Zellantwort über extern hinzugeführte Fettsäuren auch nach Beginn der Zellstimulation möglich ist.

Dass die Hinzugabe freier Fettsäuren (Ölsäure, Linolsäure und Palmitinsäure) in verschiedenen Konzentrationen zu mononukleären Blutzellen gesunder Spender zu einer Abnahme der zuvor durch PHA stimulierten Zellproliferation führte, konnte bereits bei Tiahones et al. [87] gezeigt werden. Dies wurde als Hinweis für einen immunmodulatorischen Effekt und damit für einen möglichen klinischen Nutzen der Fettsäuresubstitution interpretiert. Bei Jenki et al. [88] wurde der Einfluss von DHA genauer betrachtet. Auch hier dienten Lektine der Anregung zur Zellteilung. Während DHA den <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau signifikant verminderte, schien es keine Wirkung auf frühe Schritte der Zellaktivierung zu besitzen. Der gemessene Anstieg von freiem Kalzium im Zytosol, sowie die Expression des Interleukin-2-Rezeptors blieben im Vergleich zu den Kontrollzellen unverändert. Es wurde ebenfalls die Schlussfolgerung gezogen, dass DHA eine günstige Wirkung auf ungewollte autoimmunologische Prozesse haben könnte.

Für die Erklärung dieser immunmodulatorischen Effekte freier Fettsäuren gibt es weitere theoretische Ansätze. So können mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu Veränderungen des Prostaglandinmilieus führen. Die Zunahme von Mediatoren wie PGE<sub>3</sub>, deren Synthese

auf ungesättigten Fettsäuren beruht, wäre eine mögliche Erklärung für den proliferationshemmenden Effekt der DHA-Substitution [89]. Rotondo et al. [90] gehen hingegen von einem direkteren Einfluss aus, nachdem sie mit radioaktiv markiertem EPA zwar vergleichbare inhibitorische Effekte aufzeigen konnten, über eine RP-HPLC jedoch keinen Hinweis auf eine Konvertierung der substituierten Fettsäure zu einem aktiven Metaboliten fanden. In eine ähnliche Richtung zielt die Interpretation der Ergebnisse eines Experiments mit fat-1-transgenen Mäusen. Diese reichern in ihren Zellen vermehrt Omega-3-Fettsäuren an. Als Folge fand man einerseits bestimmte Proteine (F-Aktin, Phospholipase C $\gamma$ -1) der immunologischen Synapsen seltener als in den Zellen der Kontrollmäuse. Andererseits wurde bei den transgenen Tieren eine verminderte  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporation festgestellt. Es wurde der Schluss gezogen, dass die vermehrten Omega-3-Fettsäuren ihren Einfluss auf das Immunsystem über Veränderungen der so genannten Lipid Rafts nehmen [80]. Dabei handelt es sich um cholesterinreiche Bezirke der Plasmamembran, deren Phospholipid- und Glykoproteinstruktur einer stabilen Ordnung unterliegen und, von denen ausgehend, Proteinrezeptoren an die Zelloberfläche gelangen, die frühe T-Zellsignale, Reorganisationen des T-Zellskeletts und Membrantransportvorgänge koordinieren. Zudem sind Lipid Rafts an der interzellulären Kommunikation beteiligt [91].

In der vorliegenden Arbeit wird nun der Einfluss freier Fettsäurereste auf die Struktur des CL als weiterer möglicher Mechanismus, der den beschriebenen Effekt auf die T-Zellproliferation und -aktivität erklären könnte, betrachtet.

Wie im Ergebnisteil ausführlich dargestellt, war der (C18:2) $_4$ -CL-Anteil, also der Anteil von CL-Molekülen mit vier LS-Resten, in den Zellen am größten, die der LS im umgebenen Medium ausgesetzt wurden. PS im Medium führte zu einer Erhöhung des Anteils von C18:2/C18:1/(C16:0) $_2$ -CL, also von CL mit zwei PS-Resten. DHA im Medium ließ den Gehalt von C22:6/(C18:2) $_3$ -CL im Vergleich zu den Kontrollansätzen signifikant steigern. Damit konnte gezeigt werden, dass alle substituierten Fettsäuren in die CL-Moleküle eingebaut wurden. Gleichzeitig ergaben sich weitere, komplexe Veränderungen der CL-Struktur mit signifikant reduzierten oder erhöhten Anteilen einzelner Fettsäurereste, die nicht den substituierten entsprachen. Diese Beobachtungen, in Kombination mit den festgestellten Einflüssen auf die Zellaktivität, liefern einen Hinweis auf eine mögliche Rolle des CL in den Anpassungsprozessen von T-Lymphozyten bei der Immunstimulation.

Ein Zusammenhang zwischen der aufgezeigten Proliferations- und Aktivitätsverminderung der T-Lymphozyten durch freie Fettsäuren und den Einflüssen der Fettsäuren auf die Struktur des CL könnte über die physiologischen Funktionen des CL erklärt werden. Zu diesen gehört die oxidative Phosphorylierung. CL ist an der Funktion der Atmungskette und damit an der intrazellulären Energiegewinnung beteiligt [45–48]. Es nimmt Einfluss auf die Faltung der für die oxidative Phosphorylierung nötigen Proteinkomplexe. Veränderungen der CL-Struktur und des quantitativen Vorkommens dieses Moleküls gehen entsprechend mit Alterationen der bioenergetischen Effizienz einer Zelle einher [92]. Es liegt nahe, dass diese Alterationen auch zu einer Zu- oder Abnahme des zellulären Proliferationsvermögens führen. Des Weiteren erfüllt CL eine Rolle in der DNA-Transkription. Die Zusammensetzung von DNA-gebundenen Lipiden variierte mit dem Zellzyklus und damit auch mit der DNA-Konformation. Zudem kann, in ihrem Verhältnis zueinander ebenfalls von der DNA-Konformation abhängig, zwischen fest und weniger fest gebundenen Lipiden unterschieden werden. Dies wird als Mechanismus der Genregulation interpretiert. Bei den beteiligten Lipiden handelt es sich vornehmlich um Cholesterol und CL [93]. Ein Zusammenhang zwischen dem Aufbau des Lipids und dem Grad der Gebundenheit an die DNA kann vermutet werden. Dies hätte Einfluss auf die Gentranskriptionen der Zelle und somit auf ihren Aktivitätsgrad, z. B. bei der Stimulation der Zellproliferation.

#### **4.3.1 Gesamtcardiolipin-Gehalt und Zellaktivität**

Aus den Daten geht ebenfalls hervor, dass die Fettsäuresubstitution zu Alterationen des CL-Gesamtgehalts der Zellen geführt hat. Dies weist auf einen weiteren möglichen Mechanismus hin, über den CL die Proliferationsraten der T-Lymphozyten beeinflusst haben könnte. So ist der Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien Teil der einleitenden Prozesse der Apoptose. Cytochrom C wiederum ist stark mit CL assoziiert [94]. Es konnte gezeigt werden, dass die Oxidation der zumeist ungesättigten Fettsäurereste mit einer vermehrten Ausschüttung von Cytochrom C und entsprechender Erhöhung der Apoptoserate einhergeht [95]. Zudem konnte eine Korrelation zwischen der Abnahme des CL-Gehalts und dem geplanten Zelltod aufgezeigt werden [96]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein verminderter Oxidationsgrad der CL-Moleküle nach FS-Substitution gezeigt. Allerdings waren die Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant.

Zudem ist es nicht möglich, eine allgemeine Aussage über den CL-Gehalt und das Proliferationsverhalten von Zellen zu treffen. So zeigte der Vergleich von normalen Leberzellen, fetalen Leberzellen, in der Regeneration befindlichen Leberzellen und den verschiedenen Zellen des Morris-Hepatoms unterschiedlicher Wachstumsraten bei der Ratte keine Unterschiede im Gesamtgehalt von CL [97]. In den schnell wachsenden Astrozytom- und Ependymoblastomzellen der Ratte wurden beim Vergleich zu zerebralen Gewebszellen erniedrigte CL-Gehalte gefunden [98]. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich nicht allein mit der Betrachtung anderer Gewebe in diesen Arbeiten erklären. So sank der Gehalt von CL in hochproliferativen T-ALL-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls [8]. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass aktuell kein einheitlicher Zusammenhang zwischen dem Gesamtgehalt des Phospholipids und dem Proliferationsverhalten der Zellen festgestellt werden kann. Für die Benennung einer möglichen Korrelation ist weitere Forschung nötig.

#### **4.3.2 Oxidation und Sättigungsgrad der CL-Moleküle und Zusammenhang zur Zellaktivität**

Hintergrund der Betrachtung von Oxidation und Sättigungsgrad ist die Rolle von CL in der Apoptose. Da eine vermehrte Oxidation des Moleküls zu einer Einleitung des Zelltodes zu führt [95], oxidativer Stress aber auch eine Folge der Proliferation sein kann, könnte ein niedriger Anteil von Doppelbindungen in hochproliferativen Zellen, sowie eine Reduktion von (C18:2)<sub>4</sub>-CL als Hauptangriffspunkt ablaufender oxidativer Vorgänge, eine Funktion als Schutz vor Oxidation und somit vor Apoptose erfüllen. Diese Annahme ergibt sich aus dem geringen Vorkommen von Doppelbindungen in stimulierten T-Lymphozyten und T-ALL-Zellen im Vergleich zu den Zellen gesunder Spender. Zudem nimmt mit der Zellvermehrung der Anteil von (C18:2)<sub>4</sub> am Gesamt-CL deutlich ab [8].

Die Anzahl von Doppelbindungen in den T-Lymphozyten der beschriebenen Experimente zeigt ein uneinheitliches Bild. Während alle Fettsäuren die Proliferation vermindern, sorgen LS und DHA für einen leichten Anstieg von ungesättigten Fettsäureresten. Diese Beobachtung lässt sich mit den Ergebnissen von Schild et al. vereinbaren. Die gesättigte PS sorgt hingegen für eine Abnahme von Doppelbindungen.

#### 4.4 Mögliche klinische Bedeutung und Ausblicke

Es existieren zahlreiche Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen immunologischen Prozessen und der diätetischen Aufnahme bestimmter Fettsäuren. Dabei wird der Omega-3-Fettsäure DHA ein antiinflammatorisches Potential zugesprochen. Es konnten positive Wirkungen auf den klinischen Verlauf von u. a. chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [41,99], Asthma bronchiale [35] und rheumatoider Arthritis [36] durch entsprechende Nahrungsergänzung nachgewiesen werden. Für den entzündungshemmenden Effekt werden dabei mehrere mögliche Mechanismen benannt. Dazu gehören Veränderungen in der Biosynthese von Eicosanoiden [100], die Bindung an so genannte Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) [99], die Apoptose über den CD95-Signalweg [101] und Interaktionen mit G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Auch die mehrfach ungesättigte LS wirkt sich auf klinisch relevante Weise auf autoimmunologische Prozesse aus. In einer prospektiven Studie von 2009 konnte ihr ein proinflammatorisches Potential bei der Einnahme durch Colitis ulcerosa-Patienten nachgewiesen werden. Ihre Metabolisierung zu Arachidonsäure wurde dabei als pathophysiologische Erklärung betrachtet [102]. Ähnliche Effekte ließen sich *in vitro* auch für PS aufzeigen. So erhöht diese dosisabhängig die Ausschüttung proinflammatorischer Metabolite durch Fibroblasten aus der synovialen Flüssigkeit von rheumatoid veränderten Gelenken [103].

In der vorliegenden Arbeit wird der Zusammenhang zwischen freien Fettsäuren und dem menschlichen Immunsystem über die Beobachtung des Proliferationsverhaltens von T-Lymphozyten *in vitro* aufgezeigt. Dabei wird auf einen möglichen physiologischen Zusammenhang hingewiesen, der diese Wechselwirkungen vermitteln könnte. So scheint die Struktur des CL durch externe Faktoren beeinflussbar zu sein. Gleichzeitig können Zusammenhänge zwischen dem Zellverhalten und der CL-Struktur aufgezeigt werden. CL als Gegenstand weiterer Forschung in den Mittelpunkt zu stellen, erscheint nach Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse sinnvoll. So wäre eine tierexperimentelle Anordnung denkbar, die die hier vorgestellten Resultate *in vivo* nachzuvollziehen versucht. Dabei könnte speziell die Frage nach der diätetisch verabreichten Menge und Konzentration von freien Fettsäuren behandelt werden, die für eine Beeinflussung von T-Zellzahlen und CL-

Struktur nötig sind. Zudem erscheint die Suche nach eventuell wiederkehrenden CL-Mustern in den Mitochondrien von Immunzellen während der Exazerbation autoimmunologischer Erkrankungen interessant. Die dadurch gewonnenen Informationen könnten zur gezielten ernährungsgesteuerten Intervention in den Krankheitsverlauf betroffener Personen genutzt werden.

Neben der Betrachtung spezieller autoimmunologischer Prozesse können die gewonnenen Erkenntnisse aber auch der Behandlung von Volkserkrankungen dienen. Unter dem Punkt 1.3.4 wurde bereits kurz auf die klinische Bedeutung der CL-Komposition menschlicher Zellen eingegangen. Dabei fand auch der in Industriestaaten sehr häufige Diabetes mellitus Typ II Erwähnung. Im Mausmodell konnten definierte molekulare Veränderungen des myokardialen CL bei induziertem Diabetes nachgewiesen werden. Es handelte sich um den Rückgang von (C18:2)<sub>4</sub>- und (C18:1)(C18:2)<sub>3</sub>-CL, die Zunahme von DHA-haltigen CL-Spezies und die Abnahme des CL-Gehalts [58]. In den vorliegenden Analysen konnte dargestellt werden, dass substituierte freie Fettsäuren *in vitro* Veränderungen ähnlicher Art hervorrufen können. Bei den verwendeten Zellen wurde sowohl Einfluss auf den Gesamtcardiolipingehalt, als auch auf die Anzahl DHA-haltiger Moleküle und dem Vorkommen (C18:2)<sub>4</sub>- und (C18:1)(C18:2)<sub>3</sub>-Spezies genommen, wobei andere Gewebszellen als bei Hen et al. betrachtet wurden. Trotzdem wäre CL als möglicher Angriffspunkt denkbar, um pathophysiologischen Veränderungen wie Kardiomyopathien bei Diabetikern besser vorzubeugen und diese besser behandeln zu können. Dazu wären weitere experimentelle Schritte notwendig. Ein Versuchsaufbau im Tiermodell mit oraler oder parenteraler Fettsäuregabe und Betrachtung molekularer Veränderungen der Myozyten und funktioneller organischer Veränderungen wäre denkbar.

Ein weiterer hypothetischer Ansatz, den diese Ergebnisse liefern, zielt in Richtung einer forcierten Reduktion der Zellproliferation. Dabei wäre eine *in vitro*- und *in-vivo*-Untersuchung anderer, klinisch relevanter, Gewebe vorstellbar. So könnte man die Reaktion karzinomatös entarteter Zellen auf extern hinzugefügte freie Fettsäuren beobachten. Positive Einflüsse durch diätetisch substituierte Omega-3-Fettsäure konnten bereits nachgewiesen werden [104]. Gleichzeitig könnte die Betrachtung der CL-Struktur von malignen proliferierenden Zellen Aufschluss über die Rolle dieses Moleküls bei der unkontrollierten Zellvermehrung geben.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit bestand in der Untersuchung der Reaktion von T-Lymphozyten gesunder Probanden auf freie Fettsäuren in dem sie umgebenden Medium. Dabei wurde das Augenmerk auf Veränderungen des Proliferationsverhaltens gelegt. Gleichzeitig wurde das Vorkommen verschiedener Spezies des mitochondrialen Phospholipids CL betrachtet.

T-Lymphozyten spielen eine Rolle in der Entstehung und bei dem Verlauf zahlreicher Autoimmunerkrankungen. Deren Klinik konnte bereits positiv über die Substitution bestimmter Fettsäuren beeinflusst werden. Die Bestätigung des Verdachts, dass dabei eine Veränderung der intrazellulären CL-Struktur eine Rolle spielt, sollte sowohl dem Verständnis der pathophysiologischen Prozesse dienen, als auch Ansatz weiterer Forschung sein.

Die Zellen gesunder T-Zellspender wurden in verschiedene Ansätze aufgeteilt und mit Hilfe des Lektins PHA zur Proliferation angeregt. Ein Ansatz ohne Fettsäuresubstitution diente als Kontrolle, in die Medien der anderen wurden jeweils DHA, PS oder LS in physiologischen Konzentrationen gegeben. Die Zusätze erfolgten mit dem Beginn der Kultur oder nach 48 Stunden. Nach einer 72-stündigen Kultivierung wurde die Zellaktivität mit Hilfe eines MTT-Tests bestimmt, Messungen des Protein- und des DNA-Umsatzes dienten der Bestimmung des Proliferationsverhaltens. Außerdem erfolgte eine massenspektrometrische Analyse des intrazellulären CL aller Ansätze.

Es konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten freien Fettsäuren in der Lage waren, die Aktivität und Proliferation der untersuchten Immunzellen negativ zu beeinflussen. DHA zeigte in diesem Sinne einen besonders ausgeprägten Effekt. Zudem war der Nachweis signifikant veränderter CL-Muster möglich. So konnte über die Substitution im Medium ein vermehrter Einbau einer bestimmten Fettsäure als einer der vier Reste des CL-Moleküls erreicht werden. Mit der Abnahme der Proliferation ging auch der Gesamtcardiolipingehalt zurück. Gleichzeitig nahm der Anteil von (C18:2)<sub>4</sub>-CL zu. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen anderer experimenteller Untersuchungen und weisen auf definierte Veränderungen im Aufbau des intrazellulären CL in Abhängigkeit des Proliferationsgrades der Zelle hin.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Sofi F., Abbate R., Gensini G.F., Casini A.: Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: An updated systematic review and meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* 92 1189-1196 (2010)
2. Trichopoulou A., Costacou T., Bamia C., Trichopoulos D.: Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New Engl. J. Med.* 348 2599-2608 (2003)
3. Trichopoulou A., Bamia C., Trichopoulos D.: Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch. Intern. Med.* 165 929-935 (2005)
4. Buckland G., Agudo A., Luján L., Jakszyn P. et al.: Adherence to a Mediterranean diet and risk of gastric adenocarcinoma within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.* 91 381-390 (2010)
5. Gao X., Chen H., Fung T.T., Logroscino G. et al.: Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 86 1486-1494 (2007)
6. Lorgeril M. de, Salen P.: New insights into the health effects of dietary saturated and omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *BMC medicine* 10 50 (2012)
7. Yessoufou A., Ple A., Moutairou K., Hichami A., Khan N.A.: Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Journal of Lipid Research* 50 2377-2388 (2009)
8. Schild L., Lendeckel U., Gardemann A., Wiswedel I. et al.: Composition of molecular cardiolipin species correlates with proliferation of lymphocytes. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 237 372-379 (2012)
9. Virdis A., Dell'Agnello U., Taddei S.: Impact of inflammation on vascular disease in hypertension. *Maturitas* 78 179-183 (2014)

10. Ross R.: Atherosclerosis - An inflammatory disease. *New Engl. J. Med.* 340 115-126 (1999)
11. Calder P.C.: n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83 1505-1519 (2006)
12. Robey E., Fowlkes B.J.: Selective events in T cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 12 675-705 (1994)
13. Miltenyi S., Muller W., Weichel W., Radbruch A.: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11 231-238 (1990)
14. Mosmann T.R., Sad S.: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17 138-146 (1996)
15. Henkart P.A.: Lymphocyte-mediated cytotoxicity: Two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1 343-346 (1994)
16. Sprent J., Surh C.D.: T cell memory. *Annual review of immunology* 20 551-579 (2002)
17. Leonard B.E.: Inflammation, depression and dementia: Are they connected? *Neurochemical Research* 32 1749-1756 (2007)
18. Yaqoob P., Newsholme E.A., Calder P.C.: Influence of cell culture conditions on diet-induced changes in lymphocyte fatty acid composition. *Biochim Biophys Acta* 1255 333-340 (1995)
19. Endres S., Ghorbani R., Kelley V.E., Georgilis K. et al.: The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *New Engl. J. Med.* 320 265-271 (1989)
20. Chapkin R.S., Akoh C.C., Miller C.C.: Influence of dietary n-3 fatty acids on macrophage glycerophospholipid molecular species and peptidoleukotriene synthesis. *Journal of Lipid Research* 32 1205-1213 (1991)

21. Caughey G.E., Mantzioris E., Gibson R.A., Cleland L.G., James M.J.: The effect on human tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$  production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *American Journal of Clinical Nutrition* 63 116-122 (1996)
22. Peterson L.D., Jeffery N.M., Thies F., Sanderson P. et al.: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids* 33 171-180 (1998)
23. Broughton K.S., Hahn B., Ross E.: Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid affect ovarian prostaglandin levels differently in rats. *Nutrition Research* 29 510-518 (2009)
24. Calder P.C.: The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79 101-108 (2008)
25. Jolly C.A., Jiang Y.-H., Chapkin R.S., McMurray D.N.: Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *Journal of Nutrition* 127 37-43 (1997)
26. Peterson L.D., Thies F., Sanderson P., Newsholme E.A., Calder P.C.: Low levels of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids mimic the effects of fish oil upon rat lymphocytes. *Life Sciences* 62 2209-2217 (1998)
27. Terada S., Takizawa M., Yamamoto S., Ezaki O. et al.: Suppressive mechanisms of EPA on human T cell proliferation. *Microbiology and Immunology* 45 473-481 (2001)
28. Calder P.C., Yaqoob P., Harvey D.J., Watts A., Newsholme E.A.: Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochemical Journal* 300 509-518 (1994)

29. Miles E.A., Aston L., Calder P.C.: In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on T helper type 1 and T helper type 2 cytokine production in human whole-blood cultures. *Clinical and Experimental Allergy* 33 624-632 (2003)
30. Miles E.A., Calder P.C.: Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proceedings of the Nutrition Society* 57 277-292 (1998)
31. Katagiri Y.U., Kiyokawa N., Fujimoto J.: A role for lipid rafts in immune cell signaling. *Microbiology and Immunology* 45 1-8 (2001)
32. Calder P.C.: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* 75 645-662 (2013)
33. Wenzel S.E.: Arachidonic acid metabolites: Mediators of inflammation in asthma. *Pharmacotherapy* 17 3-12 (1997)
34. Yokoyama A., Hamazaki T., Ohshita A., Kohno N. et al.: Effect of aerosolized docosahexaenoic acid in a mouse model of atopic asthma. *International Archives of Allergy and Immunology* 123 327-332 (2000)
35. Nagakura T., Matsuda S., Shichijyo K., Sugimoto H., Hata K.: Dietary supplementation with fish oil rich in  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma. *European Respiratory Journal* 16 861-865 (2000)
36. Fortin P.R., Lew R.A., Liang M.H., Wright E.A. et al.: Validation of a meta-analysis: the effects of fish oil in rheumatoid arthritis. *J Clin Epidemiol* 48 1379-1390 (1995)
37. Lewis J.D., Abreu M.T.: Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 152 398-414 (2016)
38. Uranga J.A., Lopez-Miranda V., Lombo F., Abalo R.: Food, nutrients and nutraceuticals affecting the course of inflammatory bowel disease. *Pharmacological reports* : PR 68 816-826 (2016)

39. Barbalho S.M., Goulart R.A., Quesada K., Bechara M.D., Carvalho A.C. de: Inflammatory bowel disease: can omega-3 fatty acids really help? *Annals of gastroenterology : quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology* 29 37-43 (2016)
40. Bosco N., Brahmabhatt V., Oliveira M., Martin F.-P. et al.: Effects of increase in fish oil intake on intestinal eicosanoids and inflammation in a mouse model of colitis. *Lipids Health Dis* 12 81 (2013)
41. Hawthorne A.B., Daneshmend T.K., Hawkey C.J., Belluzzi A. et al.: Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. *Gut* 33 922-928 (1992)
42. Pangborn M.C.: Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *Journal of Biological Chemistry* 143 247-256 (1942)
43. Schlame M., Rua D., Greenberg M.L.: The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research* 39 257-288 (2000)
44. Hoch F.L.: Cardiolipins and biomembrane function. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 1113 71-133 (1992)
45. Beyer K., Nuscher B.: Specific cardiolipin binding interferes with labeling of sulfhydryl residues in the adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier protein from beef heart mitochondria. *Biochemistry* 35 15784-15790 (1996)
46. Robinson N.C., Zborowski J., Talbert L.H.: Cardiolipin-depleted bovine heart cytochrome c oxidase: Binding stoichiometry and affinity for cardiolipin derivatives. *Biochemistry* 29 8962-8969 (1990)
47. Fry M., Green D.E.: Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 256 1874-1880 (1981)
48. Eble K.S., Coleman W.B., Hantgan R.R., Cunningham C.C.: Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 265 19434-19440 (1990)

49. Jiang F., Ryan M.T., Schlame M., Zhao M. et al.: Absence of cardiolipin in the *crdl* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* 275 22387-22394 (2000)
50. Koshkin V., Greenberg M.L.: Oxidative phosphorylation in cardiolipin-lacking yeast mitochondria. *Biochem J* 347 Pt 3 687-691 (2000)
51. Shibata A., Ikawa K., Shimooka T., Terada H.: Significant stabilization of the phosphatidylcholine bilayer structure by incorporation of small amounts of cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 1192 71-78 (1994)
52. Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G., Ellisman M.H. et al.: Bid, Bax, and Lipids Cooperate to Form Supramolecular Openings in the Outer Mitochondrial Membrane. *Cell* 111 331-342 (2002)
53. Schlame M., Shanske S., Doty S., Konig T. et al.: Microanalysis of cardiolipin in small biopsies including skeletal muscle from patients with mitochondrial disease. *J Lipid Res* 40 1585-1592 (1999)
54. Schlame M., Ren M.: Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Letters* 580 5450-5455 (2006)
55. Schlame M., Towbin J.A., Heerdt P.M., Jehle R. et al.: Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth syndrome. *Annals of Neurology* 51 634-637 (2002)
56. Schlame M., Ren M., Xu Y., Greenberg M.L., Haller I.: Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chemistry and Physics of Lipids* 138 38-49 (2005)
57. Emerit J., Klein J.M., Coutellier A., Congy F.: Free radicals and lipid peroxidation in cell biology: physiopathologic prospects. *Pathologie-biologie* 39 316-327 (1991)
58. Han X., Yang J., Yang K., Zhongdan Z. et al.: Alterations in myocardial cardiolipin content and composition occur at the very earliest stages of diabetes: A shotgun lipidomics study. *Biochemistry* 46 6417-6428 (2007)

59. Wolff R.L., Entressangles B.: Compositional changes of fatty acids in the 1(1'')-and 2(2'')-positions of cardiolipin from liver, heart, and kidney mitochondria of rats fed a low-fat diet. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1082 136-142 (1991)
60. Stanley W.C., Khairallah R.J., Dabkowski E.R.: Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15 122-126 (2012)
61. O'Shea K.M., Khairallah R.J., Sparagna G.C., Xu W. et al.: Dietary  $\omega$ -3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay  $Ca^{2+}$ -induced permeability transition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47 819-827 (2009)
62. Yamaoka S., Urade R., Kito M.: Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *Journal of Nutrition* 118 290-296 (1988)
63. Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.: *Der Experimentator: Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (2009)
64. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 248-254 (1976)
65. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 55-63 (1983)
66. Gonzalez R.J., Tarloff J.B.: Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro* 15 257-259 (2001)
67. Heeg K., Reimann J., Kabelitz D., Hardt C., Wagner H.: A rapid colorimetric assay for the determination of IL-2-producing helper T cell frequencies. *J Immunol Methods* 77 237-246 (1985)

68. De Fazio, S. R., Warner C.M.: Activation of T cells by cross-linking Qa-2, the Ped gene product, requires fyn. *American Journal of Reproductive Immunology* 58 315-324 (2007)
69. FOLCH J., LEES M., SLOANE STANLEY, G H: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226 497-509 (1957)
70. Libby P.: Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition reviews* 65 S140-6 (2007)
71. Madhumitha H., Mohan V., Deepa M., Babu S., Aravindhan V.: Increased Th1 and suppressed Th2 serum cytokine levels in subjects with diabetic coronary artery disease. *Cardiovascular Diabetology* 13 (2014)
72. Youn J.-C., Yu H.T., Lim B.J., Koh M.J. et al.: Immunosenescent CD8+ T clls and C-X-C cemokine receptor type 3 chemokines are increased in human hypertension. *Hypertension* 62 126-133 (2013)
73. Michalek R.D., Gerriets V.A., Jacobs S.R., Macintyre A.N. et al.: Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 3299-3303 (2011)
74. Wang D., Malo D., Hekimi S.: Elevated mitochondrial reactive oxygen species generation affects the immune response via hypoxia-inducible factor-1alpha in long-lived Mcl1<sup>+/-</sup> mouse mutants. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 582-590 (2010)
75. Spieker-Polet H., Polet H.: Requirement of a combination of a saturated and an unsaturated free fatty acid and a fatty acid carrier protein for in vitro growth of lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 126 949-954 (1981)
76. Cuthbert J.A., Lipsky P.E.: Lipoproteins may provide fatty acids necessary for human lymphocyte proliferation by both low density lipoprotein receptor-dependent

and -independent mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 264 13468-13474 (1989)

77. Asaoka Y., Nakamura S., Yoshida K., Nishizuka Y.: Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends in biochemical sciences* 17 414-417 (1992)
78. Sumida C., Graber R., Nunez E.: Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 48 117-122 (1993)
79. Kim W., Khan N.A., McMurray D.N., Prior I.A. et al.: Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. *Progress in Lipid Research* 49 250-261 (2010)
80. Kim W., Fan Y.-Y., Barhoumi R., Smith R. et al.: n-3 polyunsaturated fatty acids suppress the localization and activation of signaling proteins at the immunological synapse in murine CD4<sup>+</sup> T cells by affecting lipid raft formation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 6236-6243 (2008)
81. Geyeregger R., Zeyda M., Zlabinger G.J., Waldhausl W., Stulnig T.M.: Polyunsaturated fatty acids interfere with formation of the immunological synapse. *Journal of leukocyte biology* 77 680-688 (2005)
82. Mileykovskaya E., Dowhan W.: Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chemistry and Physics of Lipids* 179 42-48 (2014)
83. Paradies G., Paradies V., Benedictis V. de, Ruggiero F.M., Petrosillo G.: Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta* 1837 408-417 (2014)
84. Frohman M.A.: Role of mitochondrial lipids in guiding fission and fusion. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 93 263-269 (2015)
85. Mürke E., Stoll S., Lendeckel U., Reinhold D., Schild L.: The mitochondrial phospholipid cardiolipin is involved in the regulation of T-cell proliferation. *Biochimica et biophysica acta* 1861 748-754 (2016)

86. Liu J., Farmer J.D., Lane W.S., Friedman J. et al.: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66 807-815 (1991)
87. Tinahones F.J., Vazquez F., Soriguer F.J., Gómez-Zumaquero J.M. et al.: Unsaturated fatty acids decrease in vitro proliferation and CD4+ expression in human lymphocytes. *Diabetes, Nutrition and Metabolism - Clinical and Experimental* 10 110-115 (1997)
88. Jencki L.J., Scherer J.M., Caldwell L.D., Ney V.A., Stillwell W.: The triggering signal dictates the effect of docosahexaenoic acid on lymphocyte function in vitro. *Lipids* 33 869-878 (1998)
89. Shapiro A.C., Wu D., Meydani S.N.: Eicosanoids derived from arachidonic and eicosapentaenoic acids inhibit T cell proliferative response. *Prostaglandins* 45 229-240 (1993)
90. Rotondo D., Earl, C. R. A., Laing K.J., Kaimakamis D.: Inhibition of cytokine-stimulated thymic lymphocyte proliferation by fatty acids: The role of eicosanoids. *BBA - Molecular Cell Research* 1223 185-194 (1994)
91. Thomas S., Kumar R.S., Brumeanu T.-D.: Role of lipid rafts in T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52 215-224 (2004)
92. Bogdanov M., Mileykovskaya E., Dowhan W.: Lipids in the assembly of membrane proteins and organization of protein supercomplexes: implications for lipid-linked disorders. *Subcell. Biochem.* 49 197-239 (2008)
93. Struchkov V.A., Strazhevskaya N.B., Zhdanov R.I.: DNA-bound lipids of normal and tumor cells: retrospective and outlooks for functional genomics. *Bioelectrochemistry* 58 23-30 (2002)
94. Choi S., Swanson J.M.: Interaction of cytochrome c with cardiolipin: an infrared spectroscopic study. *Biophys Chem* 54 271-278 (1995)
95. Schug Z.T., Gottlieb E.: Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1788 2022-2031 (2009)

96. Ostrander D.B., Sparagna G.C., Amoscato A.A., McMillin J.B., Dowhan W.: Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 276 38061-38067 (2001)
97. Hostetler K.Y., Zenner B.D., Morris H.P.: Phospholipid content of mitochondrial and microsomal membranes from Morris hepatomas of varying growth rates. *Cancer Res* 39 2978-2983 (1979)
98. Kiebish M.A., Han X., Cheng H., Seyfried T.N.: In vitro growth environment produces lipidomic and electron transport chain abnormalities in mitochondria from non-tumorigenic astrocytes and brain tumours. *ASN Neuro* 1 (2009)
99. de Silva, P. S., Korzenik J.R.: Inflammatory bowel disease: A focus on the involvement of dietary fats. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* 6 19-25 (2014)
100. Lee T.H., Mencia Huerta, J. M., Shih C.: Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B5 and the double lipoxygenase product. *Journal of Biological Chemistry* 259 2383-2389 (1984)
101. Gill R., Lanni L., Jen K.-L.C., McCabe M.J., Rosenspire A.: Docosahexaenoic acid counteracts attenuation of CD95-induced cell death by inorganic mercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 282 61-67 (2015)
102. Tjonneland A., Overvad K., Bergmann M.M., Nagel G. et al.: Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* 58 1606-1611 (2009)
103. Frommer K.W., Schäffler A., Rehart S., Lehr A. et al.: Free fatty acids: potential proinflammatory mediators in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 74 303-310 (2015)

104. Ma Y.-J., Yu J., Xiao J., Cao B.-W.: The consumption of omega-3 polyunsaturated Fatty acids improves clinical outcomes and prognosis in pancreatic cancer patients: a systematic evaluation. *Nutr Cancer* 67 112-118 (2015)

## Anhang: Material

Chemikalien	Hersteller
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
<sup>3</sup> H-Thymidin (1 mCi/ml)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
AIM V	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumhydroxidlösung Suprapur, 25 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Biocoll	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
BioRad-Assay-Kit II	Life Science Group, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Butylhydroxytoluol (BHT)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Cardiolipinstandard	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	
Chlorwasserstoffsäure (HCL), 37 %	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Docosahexaensäure	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (99,9 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, Deutschland
Heparin (5000 U/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Linolsäure	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Methanol (99,9 %)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Palmitinsäure	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Pan T Cell Isolation Kit II	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phytohämagglutinin (PHA)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts
Rinderserumalbumin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tetra-Myristoyl-CL	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Auto MACS-Seperator	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Brutschrank Hera Cell	Heraeus, Hannover, Deutschland
Brutschrank Steri-cult 200-Incubator	Forma Scintific, Labotec, Göttingen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Hämatologie-Automat Ac T diff2TM	Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland
Inotech Cell-Harvester	Inotec, Wohlen, Schweiz
Laborkühlschrank Herafreeze HFU 486 Basic	Heraeus, Hannover, Deutschland
LiChrospher SI 60-Säule	Merck, Darmstadt, Deutschland
MicroBeta-Plate counter	PerkinElmer, Waltham, Massachussets
Sterilbank Lamin Air HB 2448	Heraeus, Hannover, Deutschland
TSQ Quantum Discovery MAX	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
UV-Visible Spectrophotometer, Cary 100 Bio (Software: Cary Win Kinetics)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Vortexer	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Hettich Rotanta/TR	Hettich Zenrifuge, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 30F	Hettich Zenrifuge, Tuttlingen, Deutschland

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Eppendorfgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotitrierplatte (24-well)	Corning B. V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Mikrotitrierplatte (96-well, Flachboden)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (0,5-10 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl; 2500 µl; 500-5000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Küvetten, Polysterol	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Szintillator (MeltiLex)	PerkinElmer, Waltham, Massachussets

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Struktur des Cardiolipins nach [43]</b> .....	11
<b>Abbildung 2: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für die Zellen eines Spenders</b> .....	21
<b>Abbildung 3: DNA-Gehalt nach FS-Zugabe</b> .....	28
<b>Abbildung 4: Proteingehalt nach FS-Zugabe</b> .....	30
<b>Abbildung 5: MTT-Reduktion</b> .....	31
<b>Abbildung 6: Einfluss von FS auf (C18:2)<sub>4</sub>-CL-Gehalt</b> .....	36
<b>Abbildung 7: Einfluss von FS auf Gehalt von gesättigten Fettsäureresten mit 16 C-Atomen in CL</b> .....	36
<b>Abbildung 8: Einfluss von FS auf C18:2/C18:1/(C16:0)<sub>2</sub>-CL-Gehalt</b> .....	37
<b>Abbildung 9: Einfluss von FS auf C22:6/(C18:2)<sub>3</sub>-CL-Gehalt</b> .....	37
<b>Abbildung 10: Einfluss von FS auf Gesamtgehalt CL</b> .....	38
<b>Abbildung 11: Einfluss von FS auf den Gehalt von C16-kettigen FS-Resten in CL</b> .....	39
<b>Abbildung 12: Einfluss von FS auf Gehalt von C20-kettigen FS-Resten in CL</b> .....	40
<b>Abbildung 13: Einfluss von FS auf den Gehalt von C18-kettigen FS-Resten in CL</b> .....	40
<b>Abbildung 14: Einfluss von FS auf den Oxidationsgrad des CL nach sofortiger FS-Zugabe</b> .....	42
<b>Abbildung 15: Einfluss von FS auf den Oxidationsgrad des CL nach sofortiger und um 48 h versetzter FS-Zugabe</b> .....	42

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1: Relevante Probandendaten der T-Zellspender.....</b>	<b>16</b>
<b>Tabelle 2: Übersicht zur Erstellung der verwendeten Stammlösungen .....</b>	<b>20</b>
<b>Tabelle 3: Lösungsmittelgradienten in der HPLC .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 4: Verteilung molekularer CL-Spezies nach sofortiger FS-Zugabe.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 5: Verteilung molekularer CL-Spezies nach FS-Zugabe nach 48 Stunden..</b>	<b>34</b>

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. L. Schild für die Überlassung des Themas und die geduldige und stets hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der Experimente und der Erstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. B. Isermann und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Gardemann danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten in den Laborräumen des Instituts für klinische Chemie und Pathobiochemie.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Bereichs Pathobiochemie, insbesondere Frau S. Niemann, Frau E. Wölfel und Frau D. Peter für die die Einweisung und Hilfe bei den durchgeführten Untersuchungen und der massenspektrometischen Analyse sowie Herrn S. Stoll, für die gegenseitige Unterstützung und den kreativen Austausch.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. B. Schraven und Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhold vom Institut für molekulare und klinische Immunologie sowie bei ihren stets hilfsbereiten und engagierten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, für die Unterstützung bei den immunologischen Arbeitsschritten zur Zellgewinnung und -isolation.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten bedanke ich mich bei Frau D. Peter, Herrn Prof. Dr. rer. nat. L. Schild und Herrn Dr. rer. oec. Boris Kaiser.

Für die hilfreiche Durchsicht und Korrektur der Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. L. Schild, Frau J. Gehrke und Herrn K.-P. Wilke bedanken.

Der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg danke ich für den Erhalt eines Promotionsstipendiums, das die Zeit zur Durchführung der Experimente ermöglicht hat.

Außerdem bedanke ich mich bei den freiwilligen T-Zell-Spendern.

## **Ehrenerklärung**

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

„Untersuchung des Zusammenhangs zwischen strukturellen Veränderungen von Cardiolipin und der Proliferation humaner T-Zellen unter Substitution freier Fettsäuren.“

im Institut für Klinische Chemie und Pathologische Biochemie

mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Lorenz Schild

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

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

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

Ort, Datum

Unterschrift

## **Darstellung des Bildungsweges**

Name, Vorname	Mürke, Eik
Geburtsdatum	13.12.1986
Geburtsort	Magdeburg
Familienstand	ledig

### Schulbildung

1993 bis 1997	Grundschule Wiener Straße, Magdeburg
1997 bis 1999	Sekundarschule Clara Zetkin, Magdeburg
1999 bis 2006	Humboldt-Gymnasium, Magdeburg Abitur 2006

### Hochschulstudium

10/2007 bis 05/2014	Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
09/2009	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2014	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Praktisches Jahr

02/2013 bis 06/2013	Psychiatrie und Psychotherapie – Klinikum Magdeburg
06/2013 bis 09/2013	Innere Medizin, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie – Universitätsklinikum Magdeburg
09/2013 bis 12/2013	Chirurgie – Spital STS AG Thun, Schweiz

### Beruf

seit 03/2015	Assistenzarzt der Psychiatrie Baselland in Liestal und Münchenstein, Schweiz
--------------	--