

Aus dem
Institut für Biochemie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Zur Bedeutung von Cardiolipin bei der Differenzierung von Motoneuronen
des Rückenmarks *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von

aus

Magdeburg

Ricardo Pirex Takamgoum Mbou
Douala - Kamerun
2020

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Takamgoum Mbou, Ricardo Pirex:

Zur Bedeutung von Cardiolipin bei der Differenzierung von Motoneuronen des Rückenmarks in vitro. - 2020, Bl.: 70 Abb.: 24 Tab.: 12, Zitate: 121

Kurzreferat:

Die Motoneurone des Rückenmarks sind zentraler Bestandteil unseres motorischen Systems. Ihre Degeneration führt zu Paresen und Paralysen der Target-Muskulatur mit anschließender Muskelatrophie. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Cardiolipin (CL) - das mitochondriale Signatur-Phospholipid - auf die Differenzierung von Motoneuronen untersucht. Als Studienmodell diente die Motoneuron-ähnliche Zelllinie NSC34 - eine Hybridzelllinie aus Motoneuron-angereicherten primären Rückenmarkszellen und Neuroblastomzellen. Als Differenzierungsmarker wurden verschiedene Parameter des Neuritenwachstums und der Rezeptorbesatz untersucht. Dazu kamen Aussagen zum Gehalt freier zellulärer Fettsäuren und zur Mitochondrienverteilung.

Es wurde gezeigt, dass die Differenzierung von NSC34-Zellen per se stattfindet und durch den Einsatz eines Differenzierungsmediums verstärkt wird. Dabei kommt es zur Reduktion der Proliferation ohne, dass die Vitalität beeinflusst wird. Mit fortschreitender Differenzierung war eine verstärkte Abwanderung der Mitochondrien in die Filopodia zu verzeichnen. Der Gehalt der meisten CL-Spezies nahm ab; dabei gab es 2 Ausnahmen: (C18:1)₂/(C16:0)₂-CL und (C18:1)₃/C16:0-CL. Eine lineare Regressionsanalyse zeigte eine positive Korrelation von Zelldifferenzierung (Neuritenwachstum) und den molekularen CL-Spezies, konkret den Gehalten von (C18:1)₂/(C16:0)₂-CL und (C18:1)₃/C16:0-CL.

Das daraus abgeleitete „Proof of Principle“-Experiment - Medienanreicherung mit Öl- und/oder Palmitinsäure - zeigte eine positive Beeinflussung der Differenzierungsparameter ohne die Proliferation, die Vitalität und den Cardiolipin-Haushalt wesentlich zu verändern. Somit könnte Cardiolipin ein weiteres Target für zielgerichtete Therapieansätze bei Schädigung der spinalen Motoneurone darstellen.

Schlüsselwörter:

BrdU, Cardiolipin, Differenzierung, Mitochondrien, Motoneuron, Neuriten, NSC34, Ölsäure, Palmitinsäure, Proliferation, Regeneration, Rezeptoren, Rückenmark

Inhaltsverzeichnis

Publikationsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
1. Einführung	1
1.1 . Das motorische System: Physiologie und Pathophysiologie	1
1.2 . Mitochondrien und ihre Rolle bei neuronaler Degeneration und Regeneration ..	4
1.3 Cardiolipin, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren.....	5
1.4 NSC34-Zellen als Modell spinaler Motoneurone	7
2. Fragestellung	8
3. Material und Methoden.....	9
3.1 . Verwendete Chemikalien, Antikörper, Materialien und Geräte.....	9
3.2 . Kulturmedien	9
3.3 . Zellkultur	9
3.4 . Anfertigen eines Aliquotes.....	10
3.5 . Kulturregimen für die Experimente.....	10
3.6 . Zellproliferationsanalyse.....	11
3.7 . Zellvitalitätsanalyse.....	12
3.8 . Charakterisierung der Zelldifferenzierung	12
3.8.1 Neuritenanalyse.....	12
3.8.2 Rezeptoren-Besatz	13
3.9 Visualisierung der Mitochondrien	14
3.10 Cardiolipin- und Fettsäure-Bestimmung	15
3.10.1 Cardiolipin-Bestimmung	15
3.10.2 Bestimmung der freien zellulären Fettsäuren.....	16
3.11 Intervention mit Ölsäure (OA) und Palmitinsäure (PA)	17
3.12 Statistik.....	18
3.13 Verwendete Software.....	18
4. Ergebnisse	19
4.1 Zellproliferationsanalyse	19
4.2 Zellvitalitätsanalyse.....	20
4.3 Charakterisierung der Zelldifferenzierung	21
4.3.1 Neuritenanalyse.....	21
4.3.2 Rezeptorbesatz - Immunhistochemische Visualisierung.....	24
4.4 Visualisierung der Mitochondrien	25
4.5 Cardiolipin-Bestimmung.....	26

4.6 Bestimmung der freien zellulären Fettsäuren	29
4.7 Intervention mit Fettsäuren	30
4.7.1 Zellproliferationsanalyse.....	30
4.7.2 Zellvitalität	31
4.7.3 Neuritenanalyse.....	31
4.7.4 Rezeptorbesatz.....	33
4.7.5 Cardiolipin-Bestimmung	35
4.7.6 Bestimmung der freien zellulären Fettsäuren.....	36
5. Diskussion	37
5.1 Diskussion der eingesetzten Methoden	37
5.1.1 Zellkultivation.....	37
5.1.2 Zellproliferationsanalyse.....	38
5.1.3 Zellvitalitätsanalyse	38
5.1.4 Charakterisierung der Zelldifferenzierung.....	39
5.1.5 Cardiolipin-/Fettsäure-Bestimmung	40
5.2 Diskussion der Ergebnisse	40
5.2.1 Zellproliferation und Zellvitalität.....	40
5.2.2 Charakterisierung der Zelldifferenzierung.....	40
5.2.3 Der Einfluss von Cardiolipin auf die Differenzierung.....	41
5.2.4 Korrelation zwischen Fettsäuregehalt und Zelldifferenzierung	41
5.2.5 Intervention mit Fettsäuren	42
5.3 Ausblick.....	44
6. Zusammenfassung.....	45
7. Literaturverzeichnis	47
8. Danksagung	57
9. Erklärung.....	58
10. Bildungsweg.....	59
11. Anhang.....	60
11.1 Chemikalien und Antikörper.....	60
11.2 Plastik-, Glas- und Zellkulturmaterial	61
11.3 Geräte	62

Publikationsverzeichnis

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. rer. nat. G. Keilhoff, vorab veröffentlicht.

Keilhoff, G.; **Mbou, R. P.**; Lucas, B.; Schild, L. (2019): *The Differentiation of Spinal Cord Motor Neurons is Associated with Changes of the Mitochondrial Phospholipid Cardiolipin*. In: *Neuroscience* 400, S. 169–183.

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ANOVA	Analysis of Variances (Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Bromodesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CL	Cardiolipin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	Diamidinophenylindol
DIV	days in vitro (Tage in vitro)
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKS	fetales Kälberserum
FD	Fluoreszein-Diacetat
G	Gauge (Kanülengrößenangabe)
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung bei der Zentripetalbeschleunigung bei Zentrifugen
g	Gramm, SI-Einheit der Masse
GAP-43	Growth associated protein 43kD (Kilo-Dalton)
GC	Gaschromatographie
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGFR	Insulin-like growth factor-1 receptor

l	Liter
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
mA	Milliampere
MEM-NEAA	im „Minimum Essential“ Medium vorhandene Nicht-essentielle Aminosäuren
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mTorr	Millitorr, Einheit des Drucks
MTT	Metazolyltretrazoliumbromid
N	Normal; Äquivalenzkonzentration, Produkt aus Stoffmengenkonzentration und stöchiometrischer Wertigkeit
nAChR	Nicotinerge Acetylcholin-Rezeptor
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
NM	Normmedium
ng	Nanogramm
NGFR p75	Nerve growth factor receptor
NaOH	Natriumhydroxid
NSC34	Neuroblastoma x spinal cord hybrid cell line (Neuroblastom x Rückenmark Hybrid-Zelllinie)
OA	Ölsäure (oleic acid)
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PA	Palmitinsäure (palmitic acid)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
s	Sekunde
SEM	Standard errors of mean (Standardfehler)
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
USA	United States of America
v/v	volume per volume
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1.1-1 Das pyramidal-motorische System	1
Abb. 1.1-2 Degeneration und Regeneration nach peripherer Nervenverletzung	3
Abb. 1.2-1 Darstellung eines Neurons	5
Abb. 1.3-1 Strukturformel Cardiolipin	5
Abb. 1.3-2 Darstellung der Mitochondrienmembran	6
Abb. 3.6-1 Thymidin (links) und Bromodesoxyuridin (rechts)	11
Abb. 4.1-1 Zellproliferationsanalyse	19
Abb. 4.1-2 Repräsentative Bilder der BrdU-Zellproliferationsanalyse	20
Abb. 4.2-1 Zellvitalitätsanalyse	20
Abb. 4.2-2 Repräsentative Bilder der Zellvitalitätsanalyse	21
Abb. 4.3-1 Anzahl an Neuriten-tragenden Zellen	22
Abb. 4.3-2 Mittlere Neuritenanzahl	22
Abb. 4.3-3 Länge des längsten Neuriten	23
Abb. 4.3-4 Zellfortsätze NSC34-Zellen	23
Abb. 4.3-5 Repräsentative Mikrofotografie zur Rezeptorexpression	24
Abb. 4.4-1 Repräsentative Mikrofotografie zur Mitochondriendarstellung	25
Abb. 4.5-1 Molekulare CL-Spezies in % des Gesamt-CL in NSC34-Zellen	27
Abb. 4.5-2 Korrelationsanalyse von Zelldifferenzierung und CL-Spezies	28
Abb. 4.6-1 Relativer Gehalt an freien Fettsäuren	29
Abb. 4.7-1 Neuritenanalyse unter Behandlung mit Fettsäure	32
Abb. 4.7-2 Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahme unter Fettsäurebehandlung	33
Abb. 4.7-3 Repräsentative Mikrofotografie zu Rezeptoren unter Fettsäurebehandlung	34
Abb. 4.7-4 Cardiolipin-Parameter nach Behandlung mit Fettsäuren	35
Abb. 4.7-5 Verteilung der freien zellulären Fettsäuren nach Fettsäurezugabe	36

Tabellen

Tab. 3.2-1 Kulturmedien	9
Tab. 3.5-2 Behandlungsgruppen für die NSC34-Zellexperimente	10
Tab. 3.8-1 Behandlungsschema für die Neuritenanalyse	13
Tab. 3.11-1 Behandlungsschema für die Fettsäure-Intervention	17
Tab. 3.13-1 Verwendete Software	18
Tab. 4.5-1 Medium-/Kulturzeit-abhängige Profile von CL-Spezies	26
Tab. 4.7-1 Zellproliferationsanalyse unter Fettsäurezusatz	30
Tab. 4.7-2 Zellvitalitätsanalyse unter Fettsäurezusatz	31
Tab. 11.1-1 Verwendete Chemikalien, Materialien und fertige Lösungen	60
Tab. 11.1-2 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	61
Tab. 11.2-1 Verwendete Plastik-, Glas- und Zellkulturmaterialien	61
Tab. 11.3-1 Verwendete Geräte	62

1. Einführung

1.1. Das motorische System: Physiologie und Pathophysiologie

Eine wichtige und zentrale Funktion des menschlichen Körpers ist die Motorik, also die Fähigkeit der Bewegung. Die Grundlage bildet ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Ebenen (Großhirnrinde, Kleinhirn, Basalganglien, Hirnstamm, Rückenmark) in einem System der Vorwärts- und Rückkopplungsinformationsverarbeitung. Zu Beginn eines Bewegungsablaufs steht ein Handlungsantrieb, welcher im limbischen System entsteht [78, 79]. Die Signale werden dann an den Assoziationskortex weitergeleitet, der den Handlungsantrieb zu einem Handlungsplan umschreibt und diesen noch in einen geeigneten Bewegungsentwurf umsetzt [22, 32]. Dieser erste Bewegungsentwurf wird einerseits zum Motokortex im Gyrus praecentralis und andererseits an den Hirnstamm und an das Kleinhirn weitergeleitet, um komplexe und präzise Bewegungen zu ermöglichen [22, 80]. Von der motorischen Großhirnrinde laufen die nun fertigen Bewegungsimpulse über die Pyramidenbahn (Tractus corticospinalis) und die Interneurone zu den α -Motoneuronen des Rückenmarks [112]. Den Motoneuronen vorgeschaltete Interneurone können ihre Aktivität dann so modulieren, dass die geplante Bewegung ausgeführt wird.

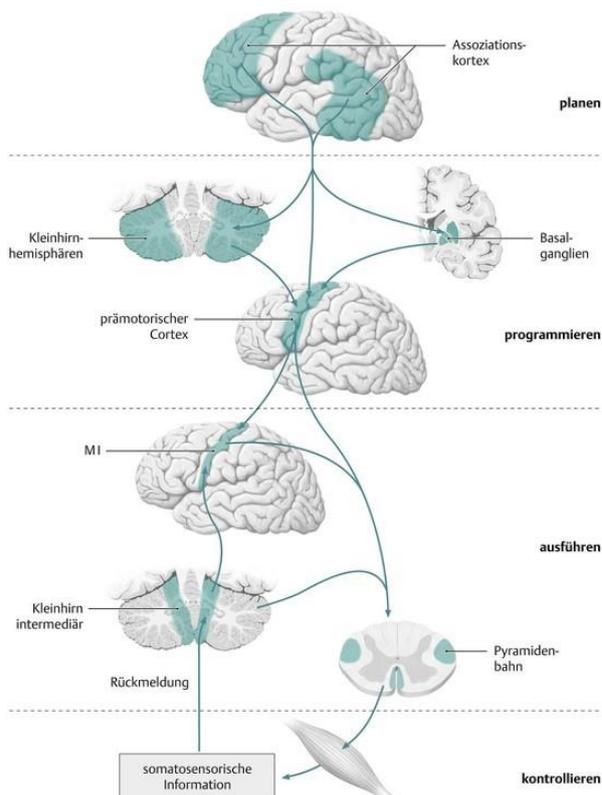


Abb. 1.1-1 Das pyramidal-motorische System

Dargestellt sind die Hauptkomponenten unseres pyramidal-motorischen Systems, die an einer Bewegungsentstehung beteiligt sind.

Zielgerichtete Bewegungen werden zuerst im Assoziationskortex geplant. Der entstandene Bewegungsentwurf wird zum einen zum Motokortex und zum anderen an die Kleinhirnhemisphären und die Basalkerne weitergeleitet. Diese programmieren zusammen die Bewegung. Die nun fertigen Bewegungsimpulse laufen über die Pyramidenbahn zu den α -Motoneuronen des Rückenmarks.

Quelle: Prometheus LemAtlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. 2009.

Spinale Motoneurone sind also ein zentraler Bestandteil des motorischen Nervensystems des Menschen. Jeder Teil des Nervensystems, der an der Bewegungssteuerung beteiligt ist, muss entweder direkt oder indirekt auf spinale Motoneuronen einwirken [112]. So führt eine Funktionsstörung von spinalen Motoneuronen zum Verlust der Willkürmotorik, da die Signalübermittlung an die Muskeln dadurch gestört wird, bis sie irgendwann ganz zum Erliegen kommt. Es kommt zu einer Parese, die im Verlauf mit Atrophie der Zielmuskulatur resultieren kann. Darüber hinaus kann eine Schädigung der α -Motoneuronen zu verringerter Muskeleigenreflexen führen. Funktionsstörungen im spinalmotorischen System können durch Motoneuron-Erkrankungen entstehen. Bei diesen seltenen Erkrankungen handelt es sich um neurodegenerative Erkrankungen (spinale Muskelatrophie, amyotrophe Lateralsklerose, Poliomyelitis), die mit Schädigung des ersten oder zweiten Motoneurons einhergehen, und in deren Folge sich Muskelparesen und -atrophien ausbilden [54, 57, 102]. Auch Verletzungen des Rückenmarks (z.B. Querschnittslähmung) oder der peripheren Nerven sind Ursachen für Funktionsstörungen im spinalmotorischen System [23].

Spinale Nervenfasern treten aus den bestimmten Segmenten des Rückenmarks aus und verlaufen zu den entsprechenden Körperteilen. Aus den Segmenten der zervikalen Region austretende Nerven steuern Signale zu Hals, Armen und Händen. Jene der thorakalen Region leiten Signale an den Brustkorb und an Teile der Arme weiter. Die aus den Segmenten der Lumbalregion austretenden Nerven leiten Signale zu den Hüften und Beinen. Die aus sakralen Segmenten austretenden Nervenfasern steuern Signale an die Zehen und einige Teile der Beine. Eine Rückenmarksverletzung resultiert in der Regel aus einer Verletzung der Wirbelsäule. Ein abgesprengter Knochen oder eine verschobene Bandscheibe komprimiert als Folge der Dislokation das Rückenmark (Kontusion). Eine Rückenmarksverletzung kann jedoch auch ohne offensichtliche Wirbelfrakturen auftreten und es ist ebenso möglich, Wirbelfrakturen ohne eine Rückenmarksverletzung zu erleiden. Eine Rückenmarksverletzung kann beispielsweise auch durch die fehlende Blutversorgung des Rückenmarks („Rückenmarksschlaganfall“) oder durch Infektionen entstehen [115]. Bei den meisten Verletzungen jedoch wird das Rückenmark gequetscht. Das Ausmaß der Schädigung hängt im Wesentlichen von der Stärke der Kompression und in bestimmtem Umfang von deren Dauer ab.

Distal einer Nervenläsion degenerieren die abgetrennten Axone, sie werden von Makrophagen aus dem Blut abgeräumt. Gleichzeitig entsteht in den Hüllstrukturen des distalen Nervenstumpfs ein regenerationsförderndes Milieu, das von den Myelin-bildenden Schwann-Zellen sowie aktivierten Makrophagen und Fibroblasten unter Mitwirkung der extrazellulären Matrix und zahlreicher anderer Moleküle generiert wird und den aussprossenden Axonen als Leitschiene dient [25]. Das neuronale Regenerationsprogramm wird in den Zellkörpern der Nervenzellen gesteuert. Dabei kommt es zur Expression von

verschiedenen regenerationsassoziierten Molekülen, die über den axonalen Transport zu den Wachstumsfortsätzen der durchtrennten Nerven befördert und in den Aussprossungsprozess integriert werden. In enger Interaktion mit dem regenerationsfördernden Milieu distal der Verletzung kommt es so zu einer axonalen Aussprossung und schließlich zu einer Reinnervation des diskonnektierten Zielmuskels mit Wiederherstellung der Funktion [10]; dadurch wird eine anterograde neuronale Verletzung verhindert.

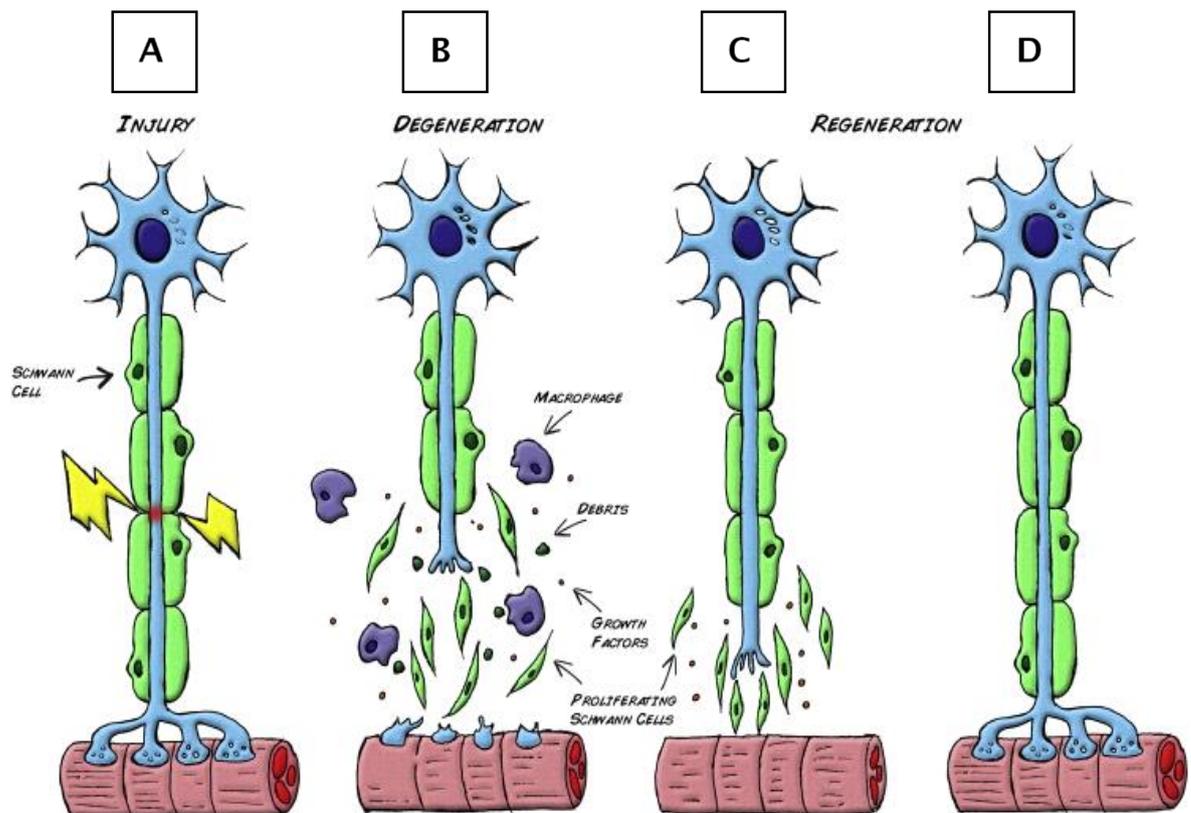


Abb. 1.1-2 Degeneration und Regeneration nach peripherer Nervenverletzung

(A) Normales Motoneuron, das verletzt wird. **(B)** Wallersche Degeneration: Die Schädigung des Motoneurons führt zur Auflösung des distalen Axons und Myelinscheiden. Schwann-Zellen vermehren sich, Makrophagen dringen in das distale Nervensegment ein und bilden zusammen mit Fibroblasten, extrazellulärer Matrix und zahlreicher anderer Moleküle ein regenerationsförderndes Milieu. **(C)** Schwann-Zellen reihen sich im distalen Segment als sogenannte Büngner-Bänder aneinander. Dabei dient das aussprossende Axon als Leitschiene. **(D)** Das Motoneuron wurde erfolgreich regeneriert und es kommt zur Reinnervation des diskonnektierten Zielmuskels mit Wiederherstellung der Funktion.

Quelle: Faroni, A.; Mobasseri, S. A.; Kingham, P. J.; Reid, A. J. (2015): *Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives*. In: *Adv Drug Deliv Rev* 82-83, S. 160-167.

In der Klinik verlaufen die Regenerationsprozesse jedoch nicht mit der bestmöglichen Effizienz, was zu einer unzureichenden funktionellen Wiederherstellung und neuropathischen Schmerzen führt. Aufgrund der schlechten intrinsischen Regenerationskapazität reifer Neuronen kamen Dell'Anno und Strittmatter (2017) zum Schluss, dass Verletzungen von Rückenmarksneuronen nicht heilbar sind. Die medizinische Grundlagenforschung konzentriert sich heutzutage daher auf ein besseres Verständnis von entwicklungs- und regenerationsbedingten zellulären Prozessen als Grundlage für therapeutische Strategien, die die Nervenregeneration verbessern könnten.

1.2. Mitochondrien und ihre Rolle bei neuronaler Degeneration und Regeneration

Die Zellen des Nervensystems brauchen sehr viel Energie. Diese Energie wird von den Mitochondrien bereitgestellt; sie sind das Kraftwerk der Zellen. In den Mitochondrien werden Kohlenhydrate, Fette, Alkohole und Aminosäuren abgebaut. Als Zwischenprodukt entsteht dabei Acetyl-CoA, das in den Citrat-zyklus eingespeist wird. Die hier entstehenden Protonen, gebunden an ihre Überträgermoleküle NADH und FADH₂, speisen die Atmungskette, in der das ATP per oxidativer Phosphorylierung generiert wird.

Aufgrund der langen Nervenfortsätze im menschlichen Körper ist die Distanz zwischen Zellkörper und dem Ziel im Rückenmark sehr groß, z.B. bei den motorischen Nervenzellen bis zu 80 cm, und die Energie wird weit weg vom Zellkörper benötigt. Deshalb ist der Transport der Mitochondrien ein entscheidender Faktor für den ungestörten Energiehaushalt der Nervenzellen und so auch für die neuronale Entwicklung, Differenzierung und Regeneration [95, 103, 106, 119, 120]. Anatomisch und funktionell unterliegen Neurone somit einem Asymmetrie-Prinzip. Dazu gehört auch die flexible spatio-temporale Heterogenität der Mitochondrien [97]. Entsprechend den Anforderungen vermehren sich Mitochondrien durch Wachstum und Sprossung, wobei ihre Anzahl dem jeweiligen Energiebedarf der Zelle angepasst wird. Dabei kann die Anzahl der Mitochondrien pro Nervenzelle zwischen 1000 und 6000 variieren. So ist der Wachstumskegel von sich entwickelnden oder regenerierenden Nervenfortsätzen besonders reich an Mitochondrien.

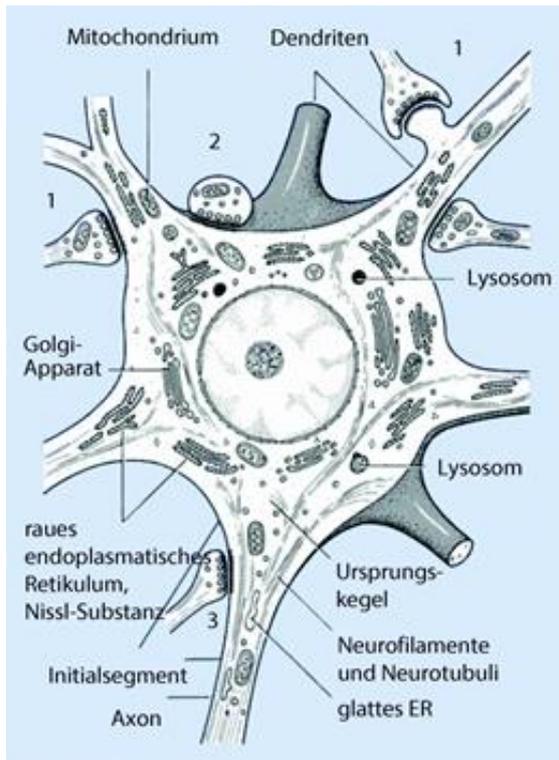


Abb. 1.2-1 Darstellung eines Neurons

Schematische Darstellung von Mitochondrien, die in die Nervenfortsätze einwandern, wo sie gebraucht werden.

Quelle: Tauchmedizin – Nervensystem. Springer, Rusoke-Dierich O. (2017).

1.3 Cardiolipin, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren

Das mitochondriale Signatur-Phospholipid Cardiolipin (CL) ist ein Di-Phospholipid, das in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist.

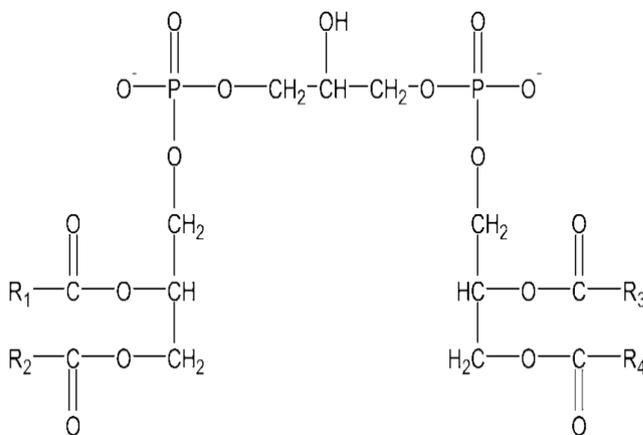


Abb. 1.3-1 Strukturformel Cardiolipin

Cardiolipin ist ein dimeres Phospholipid mit einer charakteristischen Struktur und besteht aus zwei Phosphatidsäuremolekülen, die über ein zentrales Glycerinmolekül verbunden sind.

Quelle: Vaz, F. M.; Houtkooper, R. H.; Valianpour, F.; Barth, P. G.; Wanders, R. J. (2003): Only One Splice Variant of the Human TAZ Gene Encodes a Functional Protein with a Role in Cardiolipin Metabolism. In: Journal of Biological Chemistry 278 (44), S. 43089–43094.

Für ihre Funktion als Energielieferanten der Zelle benötigen Mitochondrien eine stark gefaltete Membranstruktur, die mit Hilfe dieser speziellen Lipidmoleküle gebildet wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass CL zytosolische Precursor-Proteine für den Import in die Mitochondrien verankert [61] Außerdem beeinflusst CL die Anordnung der Proteinkomplexe in der Membran [100] und sorgen somit dafür, dass die Mitochondrien richtig arbeiten, um die Zelle mit Energie beliefern zu können. [77, 88, 89, 101]. Defekte in der CL-Synthese führen dazu, dass die ATP-Produktion nicht mehr effektiv abläuft: Es

entsteht weniger Energie. CLs interagieren außerdem mit zahlreichen Proteinen und sind an der Funktion und Stabilisierung mehrerer integraler Membranproteine beteiligt [82]. Darüber hinaus sind CLs essenziell für die Mitochondriendynamik [30, 46, 70]. CLs sind außerdem bei der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien beteiligt, was ein Signal für die Apoptose ist [66]. Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen von CLs beeinflusst Ihre Modifikation die Funktion von Mitochondrien im zentralen Nervensystem mit einer Vielzahl von neurophysiologischen und neuropathologischen Wirkungen [11, 68, 91]. CLs besitzen vier Fettsäurereste; im zentralen Nervensystem kommen hauptsächlich die Fettsäuren C16:0, C16:1, C18:1, C18:2, C20:4 und C22:6 vor [34, 53]. Michael-Titus und Priestley (2014) berichteten, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren spezifisch neuroentwickelnde und neuroprotektive Wirkungen ausüben [21]. Auf der anderen Seite sind diese vielfach ungesättigten Fettsäuren ein potentes Target für die Oxygenierung/Peroxidation und damit ein Hochrisikofaktor für die Generierung neuronaler Todessignale [2, 38].

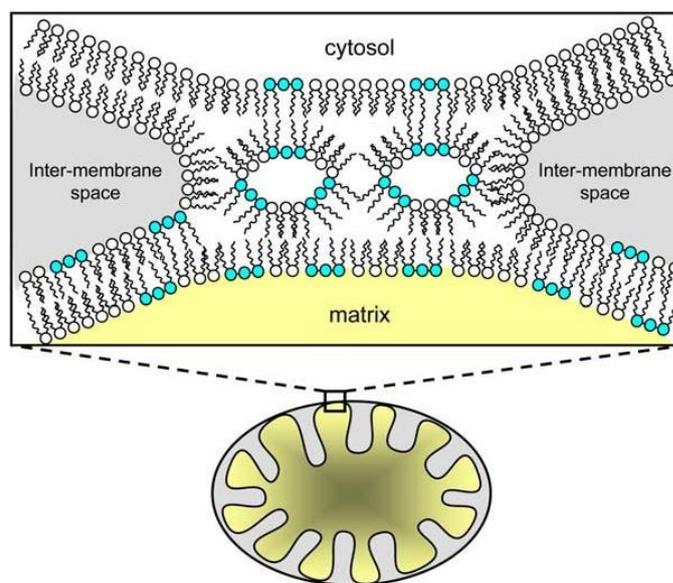


Abb. 1.3-2 Darstellung der Mitochondrienmembran

Cardiolipin (türkis) ist ein Phospholipid, das in der inneren Membran von Mitochondrien vorkommt. Sie beeinflussen ihre Organisation und nehmen dadurch verschiedene Funktionen auf; unter anderem Apoptose, Stabilisierung mehrerer integraler Membranproteine.

Quelle: Gonzalez, F. The role of cardiolipin in the regulation of mitochondria-dependent apoptosis. Diss. University of Glasgow, 2008

Ungesättigte Fettsäuren sind Bestandteil unserer Nahrung und werden aus dieser aufgenommen und in CL inkorporiert. Damit haben sie Einfluss auf die Funktionen der Mitochondrien und so auch der Zelle [13, 52, 75]. Die meisten Diät-Empfehlungen bescheinigen den ungesättigten Fettsäuren einen positiven Einfluss auf unsere Gesundheit,

wohingegen die gesättigten Fettsäuren mit einem negativen Image zu kämpfen haben [96]. Es gibt jedoch eine Reihe von Studien, die diese proklamierten negativen Einflüsse auf Herz- und Kreislauf nicht bestätigen konnten [16, 104]. Auch sind die gesättigten Fettsäuren für einen regulären Membranaufbau unabdingbar und das ganz besonders bei Neuronen, deren Membranzusammensetzung für die Nervenreizleitung bedeutsam ist [99].

1.4 NSC34-Zellen als Modell spinaler Motoneurone

Motoneurone sind Nervenzellen, die eine Muskelfasergruppe über die motorischen Endplatten innervieren und so mit den innervierten Muskeln eine motorische Einheit bildet. Über die Dendriten erhalten sie Impulse von Interneuronen oder direkt von Neuronen des primären motorischen Kortex aus dem Gyrus praecentralis [112]. Ein in vitro-Modell für die Untersuchungen von Motoneuronen stellt die Zelllinie NSC34 dar. Sie ist ein Fusionsprodukt aus embryonalen Maus-Motoneuronen-angereicherten primären Rückenmarkszellen und Maus-Neuroblastom-NG18TG2-Zellen [9]. Diese Zellen werden häufig in Studien zur Physiologie von Motoneuronen verwendet, da sie typische morphologische und physiologische Eigenschaften mit reifen primären Motoneuronen teilen [9, 67, 73, 83]. Dazu gehören unter anderem das Neuritenwachstum, die Acetylcholinsynthese, das Generieren von Aktionspotentialen und die Expression von Neurofilamenten [9]. Diese Eigenschaften ermöglichen es, an dieser Zelllinie Neurotoxizitätstestungen sowie Studien zur Degeneration und Regeneration von Motoneuronen durchzuführen.

Bei entsprechender Kultivierung zeigen die NSC34-Zellen zwei unterschiedliche Phänotypen: kleine, proliferierende, undifferenzierte Zellen und größere, vielkernige, nichtproliferierende Zellen [24]. Die neuronale Differenzierung der Zellen kann durch den Einsatz eines speziellen Mediums befördert werden. So wird das Verhältnis der kleinkalibrigen zur großkalibrigen Subpopulation positiv beeinflusst und ein Motoneuron-ähnlicher Phänotyp gewährleistet. Allerdings ist die Beschränkung der Subkultivationsdauer auf maximal 10 Tage ein großer Nachteil der Zelllinie, besonders für Entwicklungs- und Regenerationsstudien. Bei Überschreitung dieser Zeit lösen sich die Zellen vom Untergrund und werden somit unbrauchbar [20].

2. Fragestellung

Eine Regeneration nach Schäden im peripheren Nervensystem ist grundsätzlich möglich. In der Klinik ist dieser Regenerationsprozess bei Rückenmarksverletzungen jedoch oft unvollständig. Unsere Arbeitshypothese basierte auf der oben ausgeführten Rolle von Mitochondrien und ihrem Signatur-Phospholipid Cardiolipin bei der Neurodifferenzierung und -regeneration. Daraus leiteten wir ab, dass nach einer Beeinflussung des zellulären Cardiolipin-/Fettsäurehaushaltes eine adäquate Auswirkung auf die komplexen Vorgänge während der Regeneration der peripheren Nerven erwartet werden darf.

Ziel dieser Arbeit war somit die Charakterisierung von NSC34-Zellen während ihrer spontanen und Medium-induzierten Differenzierung. Als Differenzierungsmarker dienten Parameter des Neuritenwachstums und die Expression von Rezeptoren (NGFR p75, nAChR α , IGFR 1α , PPAR α).

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Gibt es quantitative und qualitative Veränderungen im zellulären Cardiolipinhaushalt?
- Erfolgt eine Umverteilung der freien zellulären Fettsäuren als Ausdruck eines veränderten Lipid-Metabolismus?
- Besteht eine Korrelation zwischen Differenzierung und bestimmten Cardiolipin-Spezies?
- Beeinflussen Fettsäurezusätze zum Medium Zellvitalität, Proliferation und Differenzierung?
- Über welchen Signalweg könnte ein möglicher Einfluss der Fettsäuren laufen?

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Chemikalien, Antikörper, Materialien und Geräte

Alle Chemikalien, Antikörper, Geräte, Plastik-, Glas- und Einwegmaterialien sind von den im Anhang (► Kapitel 11, ab Seite 58) angegebenen Herstellern und Lieferanten bezogen, soweit im Text nicht anders angegeben.

3.2. Kulturmedien

Alle Zellmedien wurden nach Standardprotokollen hergestellt.

Tab. 3.2-1 Kulturmedien

Bezeichnung	Mediumgrundlage	Zusätze	
Differenzierungsmedium (DM) nach [43].	DMEM / Ham's F12	FKS	1 %
		Ciprobay	1 %
		MEM-NEAA	1 %
Kryomedium		Normmedium	82 %
		steriles DMSO	18 %
Normmedium (NM)	DMEM no Glucose Pyruvat-frei	D-Glucose	4,5 g/l
		FKS	10 %
		Ciprobay	0,2 %

3.3. Zellkultur

Zu Beginn eines jeden Experiments wurden die NSC34-Zellen aus einem eigenständigen Aliquot für 7-10 Tage vorkultiviert. Die bis zu diesem Zeitpunkt bei -80 °C tiefgefrorenen Zellen wurden zügig erwärmt, mit dem Normmedium (NM) verdünnt und bei 360 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Zellen in 25 ml NM resuspendiert, in eine Kulturflasche (75 cm²) übertragen und bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre, die 5 % CO₂ enthält, inkubiert. Das Zellmedium wurde während der Anzucht aller 2 Tage gewechselt und die Zellen je nach Wachstumsstand jeden zweiten oder dritten Tag gesplittet. Hierzu wurden 20 ml Zellmedium entfernt, und die Zellen mit den restlichen 5 ml mithilfe eines Zellschabers vom Untergrund gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem NM auf 50 ml ergänzt, und auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt.

Waren die Kulturen für die Experimente ansatzbereit, wurden aus den Flaschen wieder jeweils 20 ml Zellmedium entfernt, die Zellen mit den restlichen 5 ml mithilfe eines Zellschabers vom Untergrund gelöst und die Zellsuspensionen in ein Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend wurde die Zellkonzentration mithilfe einer Neubauer-Zählkammer

3.6. Zellproliferationsanalyse

Die Zellproliferation wurde durch den Einsatz von Bromodesoxyuridin (► Abb. 3.6-1; BrdU) analysiert, welches während der Replikation der DNA in der S-Phase des Zellzyklus als Thymidin-Derivat eingebaut wird. Anschließend kann das eingebaute BrdU immunhistochemisch im Zellkern nachgewiesen werden, die während der BrdU-Exposition die S-Phase ganz oder teilweise durchgelaufen haben.

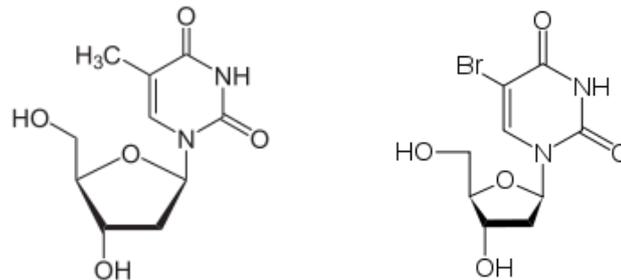


Abb. 3.6-1 Thymidin (links) und Bromodesoxyuridin (rechts)

Quellen: <http://de.wikipedia.org/wiki/Thymidin>
<http://de.wikipedia.org/wiki/Bromdesoxyuridin>

Dazu wurden 20.000 NSC34-Zellen in 2 ml NM/Schale ausgestreut und wie oben beschrieben kultiviert. An DIV 3 bzw. DIV 8 wurde den Kulturschalen 1 µl BrdU/ml Medium (1:1000; insgesamt 2 µl) zugeführt, die Schalen vorsichtig geschwenkt und für 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Zellmedium vollständig entfernt und die Kulturen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) gespült und 1 h in 2 N Salzsäure (HCl) bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Boratpuffer (pH = 8,5) und dreimaligem PBS-Spülen wurden die unspezifischen Bindungen in den Kulturen mit FKS für 30 min blockiert und anschließend mit dem primären monoklonalen anti-BrdU-Antikörper (Ratte; 1:100) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Detektion des Erstantikörpers wurden die Kulturen am nächsten Tag mit PBS + Triton X-100 (0.3 %) dreimal gespült, danach mit dem Alexa Fluor 540-konjugierten sekundären anti-Ratten-Antikörper (rot-fluoreszierenden; 1:500) für 3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt mit PBS erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit dem blau-fluoreszierenden Diamidinophenylindol (DAPI; 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln). Danach wurde mit PBS gespült und die Kultur mit einem Deckglas versiegelt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops AxioImager.M1 unter 20-facher Vergrößerung mit einem Objektiv des Typs Plan-Neofluar Fluoreszein/Rhodamine/DAPI. Es wurden Aufnahmen von 5 Sichtfeldern je Schale gespeichert. Pro Sichtfeld wurde

die Anzahl BrdU-positiver NSC34-Zellen im Verhältnis zu den DAPI-positiven NSC34-Zellen gestellt. Dieses Experiment wurde in 4 unabhängigen Ansätzen jeweils mit 2 Kulturschalen/Regime durchgeführt.

3.7. Zellvitalitätsanalyse

Mithilfe der Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung ist es ermöglicht, zwischen lebenden, aktiven und toten, inaktiven NSC34-Zellen zu unterscheiden. Hierzu werden der Zellkultur zwei Substanzen hinzugegeben, die von lebenden und toten Zellen unterschiedlich aufgenommen bzw. verstoffwechselt werden und bei denen eine Fluoreszenz angeregt werden kann. Fluoreszein-Diacetat (FD) wird in die lebenden Zellen aufgenommen, verstoffwechselt, zurückgehalten und fluoresziert grün. Propidiumjodid (PI) penetriert nur Zellen mit zerstörter Zellmembran (tote Zellen), interkaliert mit DNA/RNA und fluoresziert rot.

Für die Experimente wurden 20.000 NSC34-Zellen in 2 ml NM/Schale ausgestreut und wie oben beschrieben kultiviert. An DIV 3 bzw. DIV 8 wurden die Kulturen mit jeweils 10 µl FD und PI für 10 min bei 37 °C inkubiert und nach einmaligem Spülen (PBS) zügig mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (20-fache Vergrößerung, Objektiv Plan-Neofluar Fluoreszein/Rhodamine, Aufnahmen von 5 Sichtfeldern/Schale). Von jedem Sichtfeld wurde die Anzahl PI-gefärbter Zellen ins Verhältnis zu der gesamten Zellzahl (PI+FD) gesetzt.

Dieses Experiment wurde in 4 unabhängigen Ansätzen mit je 2 Kulturschalen/Regime durchgeführt.

3.8. Charakterisierung der Zelldifferenzierung

Die Motoneuron-ähnlichen NSC34-Zellen exprimieren im Laufe ihres Differenzierungsprozesses speziellen Rezeptoren und haben die Fähigkeit, Fortsätze auszubilden. Diese Differenzierungsmarker wurden analysiert.

3.8.1 Neuritenanalyse

Die Fähigkeit der Neuritenbildung wurde bei den NSC34-Zellen bei unterschiedlichen Kulturregimen untersucht. Dazu wurden die NSC34-Zellen nach dem Behandlungsschema aus Tab 3.1-1 behandelt. Am DIV 0 wurden die Zellen in einer Dichte von 50.000 Zellen/5 ml in 25 cm²-Kulturflasche angezüchtet. Durch Zugabe von DM am DIV 1 wurde das Differenzierungsprozess bzw. der Neuritenwachstum unterstützt. Die Kontrollgruppe verblieb unter NM.

Zur Datengewinnung wurde am DIV 3 mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop DMI 3000 in 20-facher Vergrößerung eine Fotodokumentation von den Kulturen vorgenommen.

Danach wurden die Zellen weiter inkubiert. Am DIV 5 erfolgte eine Mediauaufrischung und am DIV 8 eine erneute Fotodokumentation. Wieder wurden Bilder von 5 Sichtfeldern pro Kulturflasche aufgenommen und 50 Zellen pro Sichtfeld unter Verwendung von ImageJ (Version 1,46; <http://rsb.web.nih.gov/ij/>) analysiert. Folgende Neuritenparameter wurden erfasst:

- 1) der Prozentsatz von Neuriten-tragenden Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl;
- 2) die mittlere Neuritenanzahl pro Neuriten-tragender Zelle;
- 3) die mittlere Neuritenlänge;
- 4) die durchschnittliche Länge des längsten Neurites.

Die Neuritenlängen wurden mit dem Werkzeug „segmentierte Linie“ manuell ausgemessen. Dieses Experiment wurde in 3 unabhängigen Ansätzen mit je 2 Flaschen/Regime durchgeführt.

Tab. 3.8-1 Behandlungsschema für die Neuritenanalyse

DIV	Normmedium (NM)	Differenzierungsmedium (DM)
0	Ausstreuen der Zellen in das Normmedium Zelldichte = 50.000/5 ml NM (25 cm ² -Flasche)	
1	Vollständiges Entfernen des Zellmediums und Zugabe von:	
	Normmedium	Differenzierungsmedium
3	Fotodokumentation und Weiterinkubation	
5	Mediumwechsel	
8	Fotodokumentation	

3.8.2 Rezeptoren-Besatz

Als weiterer (unabhängiger) Differenzierungsmarker wurde das Expressionsmuster spezieller Rezeptoren der Motoneuron-ähnlichen NSC34-Zellen qualitativ mittels Immunhistochemie evaluiert. Analysiert wurde die Expression der Rezeptoren für NGF (nerve growth factor) ACh (Acetyl-Cholin) und IGF1 (insulin like growth factor) sowie den α -Subtyp des PPA-Rezeptors (peroxisome proliferator-activated receptors).

Hierfür wurden die NSC34-Zellen mit einer Dichte von 20.000 Zellen/Schale kultiviert. Wie dem Behandlungsschema aus Tab 3.1-1 zu entnehmen ist, führten wir am DIV 3 und DIV 8 die immunhistochemischen Färbungen durch.

Dafür wurden die Kulturen in 4 % PFA für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einmaligem PBS-Spülen wurden die unspezifischen Bindungen mit FKS für 30 min blockiert.

Daran schloss sich die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper (anti-NGF-R p75 (1:1000); anti-nACh-R α (nikotinergerg; 1:500); anti-IGF1-R α (1:100) und PPAR α (1:250) über Nacht bei -4 °C an. Zur Zellmarkierung erfolgte eine Ko-Färbung mit dem monoklonalen anti-pan-NF (Neurofilament) Antikörper SMI 311 (1:1000). Am nächsten Tag wurden die Kulturen nach dreimaligen Spülen mit PBS/Triton X-100 (0.3 %) mit den entsprechenden sekundären Antikörpern für 3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert: Alexa Fluor 540-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (rot-fluoreszierenden; 1:500); Alexa Fluor 488-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (grün-fluoreszierend; 1:500). Nach einem weiteren Spülschritt mit PBS erfolgte wiederum eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau-fluoreszierend). Nach Spülung mit PBS wurden die Kulturen mit einem Deckglas versiegelt.

Die Auswertung erfolgte wiederum am Axiomager.M1. Diesmal wurde die Fotodokumentation mit 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Es wurden Bilder von 3 Sichtfeldern/Schale aufgenommen. Für jeden Rezeptor-Typ wurde dieser Versuch 3 Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Pro Versuch züchteten wir pro Behandlungsgruppe jeweils 2 Kulturschalen an.

3.9 Visualisierung der Mitochondrien

Wir untersuchten die zytoplasmatische Verteilung der Mitochondrien in den NSC34-Zellen. Hierzu nutzten wir eine Kombinationsfärbung aus Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und Phalloidin. Die PDH ist ein Enzym, welches in den Mitochondrien zu finden ist und Phalloidin eine Substanz, die eine hohe Affinität zum filamentösen (F-)Aktin hat und fluoreszenz-histochemisch nachgewiesen werden kann.

Auch diese Versuche wurden mit einem Ansatz von 20.000 Zellen/Schale durchgeführt. Die Kulturen wurden wie in Tab 3.1-1 beschrieben behandelt. Am DIV 3 bzw. DIV 8 wurden sie in 4 % PFA für 30 min bei Raumtemperatur fixiert, danach einmal mit PBS gespült und anschließend mit FKS für 30 min blockiert. Es schloss sich die Inkubation mit dem primären Kaninchen-anti-PDH E1 α -Antikörper (polyklonal, 1:1000) über Nacht bei -4 °C an. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem Alexa Fluor 540-konjugierten sekundären anti-Ratten-Antikörper (rot-fluoreszierenden; 1:500). Nach einem weiteren Spülschritt (PBS) wurden die Kulturen zur Zytoskelett-Markierung mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Phalloidin (5 μ l einer Methanol-Lösung in 200 μ l PBS + 1 % FKS; 20 min, Raumtemperatur; grün-fluoreszierend) inkubiert. Wieder schlossen sich eine DAPI-Gegenfärbung und die Versiegelung mit einem Deckglas an. Die Färbungen wurden mit dem Axiomager.M1 bei 40-facher Vergrößerung qualitativ analysiert. Dieses Experiment wurde in 3 unabhängigen Ansätzen mit je 2 Kulturschalen pro Behandlungsgruppe durchgeführt.

3.10 Cardioliipin- und Fettsäure-Bestimmung

3.10.1 Cardioliipin-Bestimmung

Die Bestimmungen des CL- und Fettsäure-Haushaltes der NSC34-Zellen erfolgte im Labor von Professor Lorenz Schild (Abteilung Pathobiochemie, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie).

Dazu wurden am DIV 0 200 000 NSC34-Zellen in 25 ml Medium (NM und DM) je 75 cm²-Kulturflasche ausgestreut. Am DIV 3 bzw. DIV 8 wurde aus den ansatzbereiten Kulturflaschen das Zellmedium vollständig entfernt, und jeweils 1 ml PBS hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und die Zellsuspension in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Die Proben wurden nun für 3 min bei 360 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Um gleiche experimentelle Bedingungen für die jeweiligen Zellansätze zu gewährleisten, musste zuerst der Proteingehalt jeder Probe ermittelt werden. Dazu wurden die aufgetauten Zellpellets in 1 % Dodecylsulfat (mit 0,1M NaOH) resuspendiert und der Proteingehalt nach der Methode von Lowry [64] bestimmt, wobei Kälberserum-Albumin als Standard verwendet wurde.

Für die Charakterisierung des CL-Haushaltes kam die Massenspektrometrie zum Einsatz. Dazu wurden die aufgetauten Proben in 360 µl PBS resuspendiert. 100 µl dieser Zellsuspension wurden mit 25 ng Tetra-Myristoyl-CL ((C14:0)₄, interner Standard) und 4,2 ml Chloroform/Methanol (2/1, v/v, 0.05 % Butyl-Hydroxy-Toluol enthaltend) vermischt. Lipid- und wässrige Phase konnten durch Zugabe von 800 µl 0.01 M HCl, gefolgt von rigorosem Schütteln und Zentrifugation separiert werden. Die untere Phase enthielt die Lipide. Sie wurde getrocknet und durch Zugabe von 2 ml Methanol, 1 ml Chloroform und 1 ml 0,1 M HCl weiter aufgearbeitet. Die Chloroform/Methanol-Phase enthielt das CL. Es schloss sich eine weitere Trocknung und Resuspendierung in 0,8 ml Chloroform/Methanol/Wasser (50/45/5, v/v/v) an. Danach wurden die Proben durch 0,2 µm PTFE-Membranen gefiltert und standen nun für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Massenspektrometrie zur Verfügung. Dazu wurde ein TSQ Quantum Discovery Max Instrument im ESI-Modus verwendet. Das HPLC-System bestand aus einer "Surveyor MS quaternary narrow bore"-Pumpe mit einem integrierten Vakuum-Entgaser und einem Autosampler. Es wurden 10 µl der jeweiligen Probe injiziert. CL wurde mit einer LiChroCart-Säule (125 mm × 2 mm; 5 µm Partikel-Durchmesser) und einem linearen Gradienten zwischen Chloroform (Lösung A) und Methanol/Wasser (9:1, v/v; Lösung B) getrennt.

Alle Lösungen enthielten 25 % wässrige Ammoniak-Lösung (0,1 ml/l). Es gab folgende Gradienten: 0 – 0,2 min 92 % Lösung A, 8 % Lösung B; 0,2 – 4,5 min 92–30 % Lösung A, 8 – 70 % Lösung B; 4.5 – 6 min 30 % Lösung A, 70 % Lösung B; 6 – 6,5 min 30 – 92 %

Lösung A, 70 – 8 % Lösung B; 6,5 – 11 min 92 % Lösung A, 8 % Lösung B. Die Durchflussrate betrug 200 µl/min. Das Eluat 0,3 - 6 min wurde ins Spektrometer eingegeben. Nitrogen kam als Verneblungsgas und Argon als Kollisionsgas bei einem Druck von 1,5 mTorr zum Einsatz. Die Kollisionsenergie betrug 36 eV. Die molekularen CL-Spezies und der interne Standard (m/z 619,6) wurden durch entsprechende Massentransfer-Reaktionen bestimmt. Die Menge der molekularen CL-Spezies wurde in Relation zum Gehalt an (C18:2)₄-CL des CL-Standards gesetzt. So konnte der Gesamt-CL-Gehalt rechnerisch ermittelt werden. Weiterhin wurde die Menge des oxidierten CL ((C18:2)₃/Monohydroxylinoleyl-CL) als Übergang von m/z 731,6 zu m/z 279,2 (Linolsäure) erfasst und in Relation zu (C18:2)₄-CL + (C18:2)₃/Monohydroxylinoleyl-CL prozentual angegeben.

Basierend auf dem erwarteten Gehalt und der Komposition der molekularen CL-Spezies wurde der Gehalt der inkorporierten Fettsäuren kalkuliert, indem der Gehalt der einzelnen Fettsäure aller CL-Spezies summiert wurde. Alle methodischen Schritte sind ausführlich beschrieben in (Martens et al. 2015).

3.10.2 Bestimmung der freien zellulären Fettsäuren

Der Gehalt freier Fettsäuren in den NSC34-Zellen wurde durch Analyse ihrer Methylester mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) bestimmt [86]. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension mit 20 µl Heptadecensäure (20 µg in Ethylacetat; interner Standard) vermischt. Zu diesem Homogenat wurden nun 900 µl Wasser und 1980 µl Ethylacetat dazugegeben, gut vermischt und für 5 min bei 2500 g zentrifugiert. Die so separierte obere Schicht wurde in ein Reagenzglas übergehoben. Zur verbleibenden wässrigen Phase wurde 1 ml Ethylacetat dazugegeben. Wieder wurde alles gut vermischt und danach bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde die organische Schicht unter Stickstoffzufuhr verdampft. Nach Entfernung aller wasserlöslichen Bestandteile aus dem Zellpellet konnte das Lipidextrakt aufgearbeitet werden. Es wurden 500 µl Boron Trifluorid-Methanol-Lösung (14 %) zu den getrockneten Lipiden addiert und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach einer Abkühlphase kamen noch 500 µl Wasser und 1ml n-Hexan dazu, alles wurde wieder gut vermischt, zentrifugiert und die n-Hexan-Schicht für die Weiterverarbeitung abgenommen, getrocknet und erneut in 100 µl n-Hexan resuspendiert. Von der so gewonnenen Suspension wurde 1 µl auf eine CP-WAX 58 (Lowry) Säule (innerer Durchmesser 25 m x 0,32 mm) aufgetragen und bei einem Temperaturgradienten von 120 - 250 °C/min vermessen, wobei ein Ionisationsdetektor GC 3800 das Signal generierte. Die Bestimmung der Fettsäure-Gehalte in µg/mg Protein erfolgte anhand von Eichkurven mit entsprechenden Standardlösungen. Abschließend wurden die jeweiligen prozentualen Anteile an der Gesamtmenge der freien Fettsäuren bestimmt.

Alle Messung wurde insgesamt in 3 unabhängigen Ansätzen jeweils mit 6 Kulturflaschen pro Regime durchgeführt. Die Ergebnisse eines jeden Ansatzes wurden gemittelt.

3.11 Intervention mit Ölsäure (OA) und Palmitinsäure (PA)

Nachdem eine lineare Regressionsanalyse eine gute Korrelation zwischen den CL-Spezies $(C18:1)_3/C16:0$ und $(C18:1)_2/(C16:0)_2$ und den Neuritenparametern zeigte, wurde eine Proof-of-Principle-Studie durchgeführt. Dazu wurden die beiden Fettsäuren Palmitin- (PA, C16:0) und Ölsäure (OA, C18:1) als freie Fettsäuren allein und in Kombination zum Kulturmedium addiert.

Unbehandelte und Methanol-behandelte Kulturen wurden als Kontrolle mitgeführt. Methanol fungierte als Lösungsmittel für die Fettsäuren, um eine 1, 10 und 100 μM Stammlösung bzw. je 10 μM für die Kombination OA/PA zu erhalten. Wir streuten für jede Behandlungsgruppe 50.000 NSC34-Zellen in 5 ml NM oder DM/25 cm^2 -Flasche aus. Am DIV 1 und DIV 5 erfolgte ein Mediumwechsel unter Zugabe der jeweiligen Fettsäuren in der gewünschten Konzentration bzw. Methanol.

Es schlossen sich alle bereits beschriebenen Parameteranalysen (Zellproliferationsanalyse, Vitalitätsanalyse, Neuritenanalyse, immunhistochemische Visualisierung der Rezeptoren) an. Auch diese Experimente wurden in 3 unabhängigen Versuchen jeweils mit 2 Flaschen bzw. Schalen durchgeführt.

Tab. 3.11-1 Behandlungsschema für die Fettsäure-Intervention

DIV	OA					PA					OA/PA
0	Ausstreuen der Zellen in das Normmedium Zelldichte = 50.000 je 5 ml NM (25 cm^2 -Flasche)										
1	Vollständiges Entfernen des Zellmediums und Zugabe von:										
	NM	+ Met	+ 1 μM	+ 10 μM	+ 100 μM	NM	+ Met	+ 1 μM	+ 10 μM	+ 100 μM	+ 10 $\mu\text{M}/$ 10 μM
	DM	+ Met	+ 1 μM	+ 10 μM	+ 100 μM	DM	+ Met	+ 1 μM	+ 10 μM	+ 100 μM	+ 10 $\mu\text{M}/$ 10 μM
3	Fotodokumentation										
5	Mediumwechsel und Behandlung wie am DIV 1										
8	Fotodokumentation										

3.12 Statistik

Für die statistische Auswertung kam die Graph Pad Prism 6 Software zum Einsatz. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD/SEM ausgegeben und mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test oder der ANOVA-Varianzanalyse, gefolgt vom Dunn's-Post-hoc-Test, analysiert.

3.13 Verwendete Software

Tab. 3.13-1 Verwendete Software

Beschreibung	Programm und Hersteller
Mikroskopsoftware	Leica LAS AF 2.6.0.7266, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim AxioVision Rel. 4.8, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Bildverarbeitung	ImageJ, NIH (Wayne Rasband), USA
Statistische Analyse	GraphPad Prism 6, Graphpad Software Inc, USA
Textverarbeitung	Microsoft Word 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA

4. Ergebnisse

4.1 Zellproliferationsanalyse

Bei NSC34-Zellen handelt es sich um eine murine Hybridzelllinie aus Motoneuron-angereicherten primären Rückenmarkszellen und Neuroblastomzellen, die sich im Gegensatz zu postmitotischen Motoneuronen vermehren können. Die BrdU-Färbung wurde verwendet, um die Zellproliferation zu analysieren. Die quantitativen Ergebnisse sind in Abb. 4.1-1 dargestellt. Abb. 4.1-2 zeigt exemplarisch die dazu passenden Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

An DIV 3 betrug die mittlere Proliferationsrate in der NM-Gruppe 45 %. Nach 8 Tagen Kultivierung (DIV 8) war eine signifikante Reduktion der Proliferation zu verzeichnen. Die DM-induzierte Zelldifferenzierung geht mit einer signifikanten Verringerung der Proliferationsraten an DIV 3 einher, während an DIV 8 kein signifikanter Unterschied zum NM nachweisbar war. Die mikroskopische Beurteilung der BrdU-positiven NSC34-Zellen zeigte einen undifferenzierten Phänotyp.

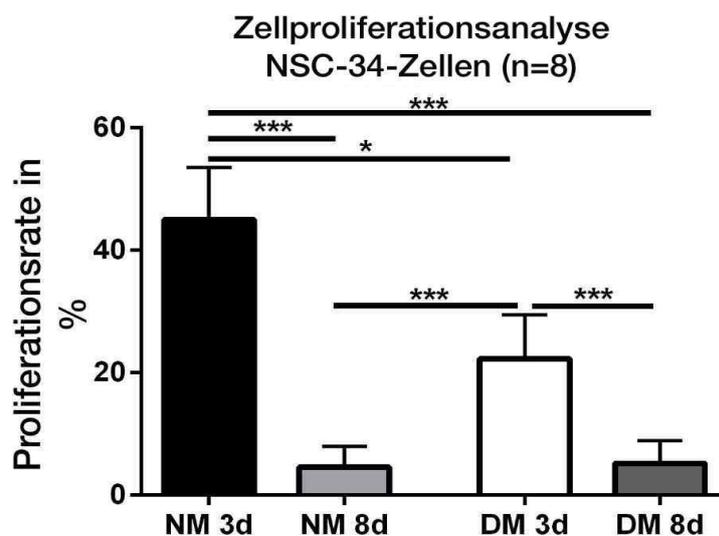


Abb. 4.1-1 Zellproliferationsanalyse

Darstellung des Verhältnisses BrdU-positiver NSC34-Zellen zur Gesamtzahl NSC34-Zellen in % (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=8). Post-Hoc-Vergleichsteste zeigten signifikante Unterschiede zwischen NM DIV 3 und NM DIV 8: $***p < 0,001$; zwischen DM DIV 3 und DM DIV 8: $***p < 0,001$; zwischen NM und DM am selben DIV: $*p < 0,05$.

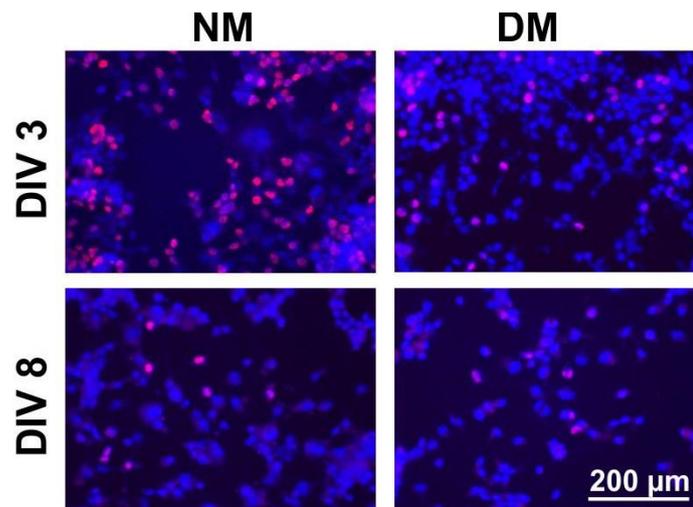


Abb. 4.1-2 Repräsentative Bilder der BrdU-Zellproliferationsanalyse

Die BrdU-Immunfärbung (rot) der Zellkerne zeigt mitotisch aktive NSC34-Zellen. Diese wurden gezählt und zu der durch DAPI-Färbung (blau) ermittelten Gesamtzellzahl in Beziehung gesetzt. Die Verwendung von DM reduzierte die Proliferationsrate signifikant. Darüber hinaus nimmt in beiden Medien die Proliferationsrate mit zunehmender Kultivierungszeit signifikant ab.

4.2 Zellvitalitätsanalyse

Die Zellvitalität wurde mittels Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung ermittelt. Die Quantifizierung ist in Abb. 4.2-1 dargestellt. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen zeigt Abb. 4.2-2.

Die Vitalfärbung ergab für NM-Kulturen an DIV 3 verstreute tote Zellen. An DIV 8 war eine signifikante Reduzierung der Anzahl an toten Zellen zu vermerken. Bei Verwendung von DM waren keine signifikanten Unterschiede zu NM-Kulturen nachweisbar, aber die Tendenz zur Abnahme der Anzahl an toten Zellen über die Zeit war stärker als bei NM.

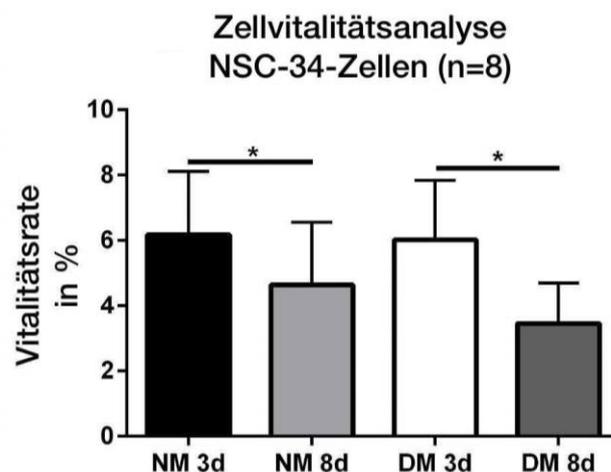


Abb. 4.2-1 Zellvitalitätsanalyse

Vitalitätsrate Propidiumjodid-positiver NSC34-Zellen zur Gesamtzahl NSC34-Zellen in % (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=8). Post-Hoc-Vergleichstests zeigen signifikante Unterschiede zwischen NM DIV 3 und NM DIV 8: *p < 0,05; zwischen DM DIV 3 und DM DIV 8: *p < 0,05.

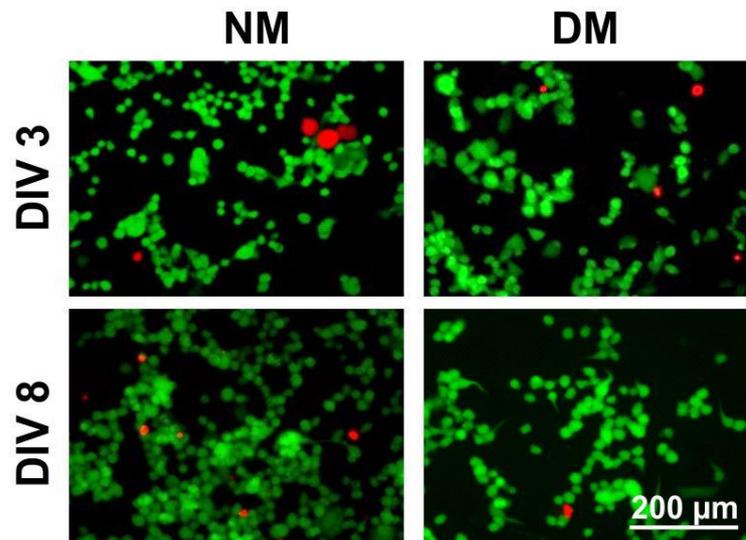


Abb. 4.2-2 Repräsentative Bilder der Zellvitalitätsanalyse

Die Vitalfärbung mit Fluoresceindiacetat (grün) und Propidiumjodid (rot) zeigt in beiden verwendeten Medien und zu beiden Kulturzeiten nur wenige tote Zellen. Die Verwendung von DM zeigt keine signifikanten Unterschiede zu den NM-Kulturen.

4.3 Charakterisierung der Zelldifferenzierung

Wichtige Differenzierungsmarker von Motoneuronen sind die Bildung von Neuriten und die Expression von speziellen Rezeptoren. Diese wurden bei den Motoneuron-ähnlichen NSC34-Zellen analysiert.

4.3.1 Neuritenanalyse

Die Ausbildung von Neuriten ist im Regenerationsprozess von Motoneuronen unabdingbar. Um dieses Verhalten zu analysieren, untersuchten wir bei den Motoneuron-ähnlichen NSC34-Zellen die Fähigkeit zur Ausbildung von Fortsätzen. Der Prozentsatz von Neuriten-tragenden Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl, die mittlere Neuritenanzahl pro Neuriten-tragender Zelle und die durchschnittliche Länge des längsten Neuriten charakterisierten die Ausbildung und das Wachstum der Neurite.

Als erster Neuritenparameter ermittelte ich die Konzentration an Neuriten-tragenden Zellen (► Abb. 4.3-1). An DIV 3 hatten ca. 25% der NSC34-Zellen in NM mindestens einen Neurit. Diese Zahl nahm mit der Kulturzeit zu. Die Verwendung von DM führte ebenfalls zu einer höheren Konzentration an Neuriten-tragenden NSC34-Zellen. Im Vergleich zum NM hatten an DIV 3 deutlich mehr NSC34-Zellen mindestens einen Neurit. Auch hier war eine Zunahme dieser Zahl mit der der Zeit zu verzeichnen. An DIV 8 gab es einen signifikanten Unterschied zu der Gruppe NM DIV 3 ($p < 0,05$).

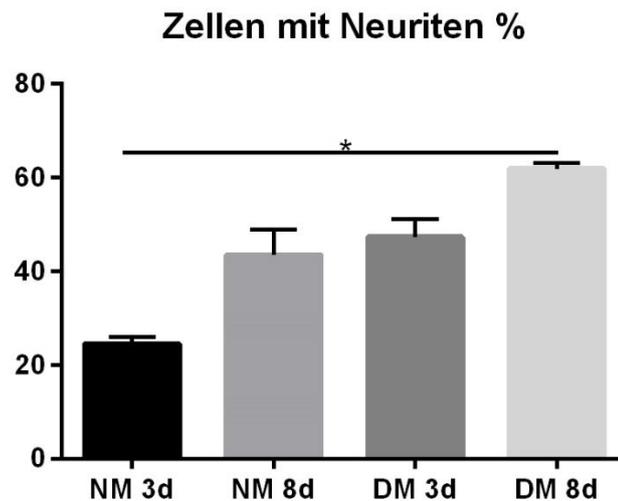


Abb. 4.3-1 Anzahl an Neuriten-tragenden Zellen

Neuriten-tragende Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl in % (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=6$). Post-Hoc-Vergleichsteste zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen NM DIV 3 und DM DIV 8: * $p < 0,05$

Auch die durchschnittliche Neuritenzahl pro Neuriten-tragende Zellen (\blacktriangleright Abb. 4.3-2) wurde von der Art des Kulturmediums und der Kulturzeit beeinflusst. Unabhängig vom Medium war an DIV 3 schon ein Neuritenwachstum bei jeder Zelle sichtbar. In NM nahm die Anzahl der Neurite pro Zelle mit der Kulturzeit leicht zu. DM verbesserte dieses Verhalten signifikant ($p < 0,05$).

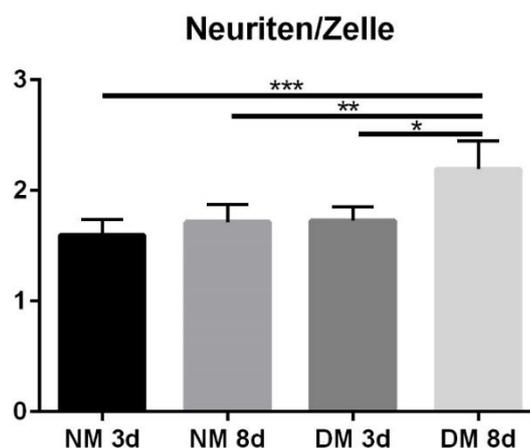


Abb. 4.3-2 Mittlere Neuritenanzahl

Anzahl an Neuriten pro Neuriten-tragende Zelle (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=6$). Post-Hoc-Vergleichsteste zeigten signifikante Unterschiede zwischen NM DIV 8 und DM DIV 8: ** $p < 0,01$; zwischen DM DIV 3 und DM DIV 8: * $p < 0,05$.

Die durchschnittliche Länge des längsten Neuriten pro Zelle (► Abb. 4.3-3) blieben im NM relativ konstant über die Kulturzeit. Die Applikation von DM zeigte längeren Neuriten. Im DM nahm die Länge des längsten Neuriten auch noch mit zunehmender Kulturzeit signifikant zu ($p < 0,05$).

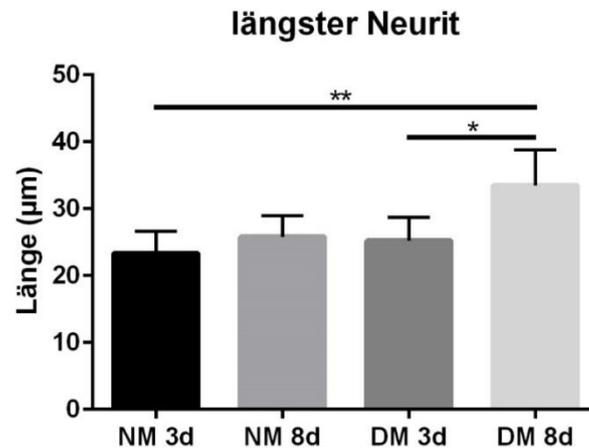


Abb. 4.3-3 Länge des längsten Neuriten

Durchschnittliche Länge des längsten Neuriten/Zelle (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=6$). Post-Hoc-Vergleichsteste zeigten signifikante Unterschiede zwischen DM/DIV 3 und DM/DIV 8: * $p < 0,05$; zwischen NM DIV 3 und DM DIV 8: ** $p < 0,01$.

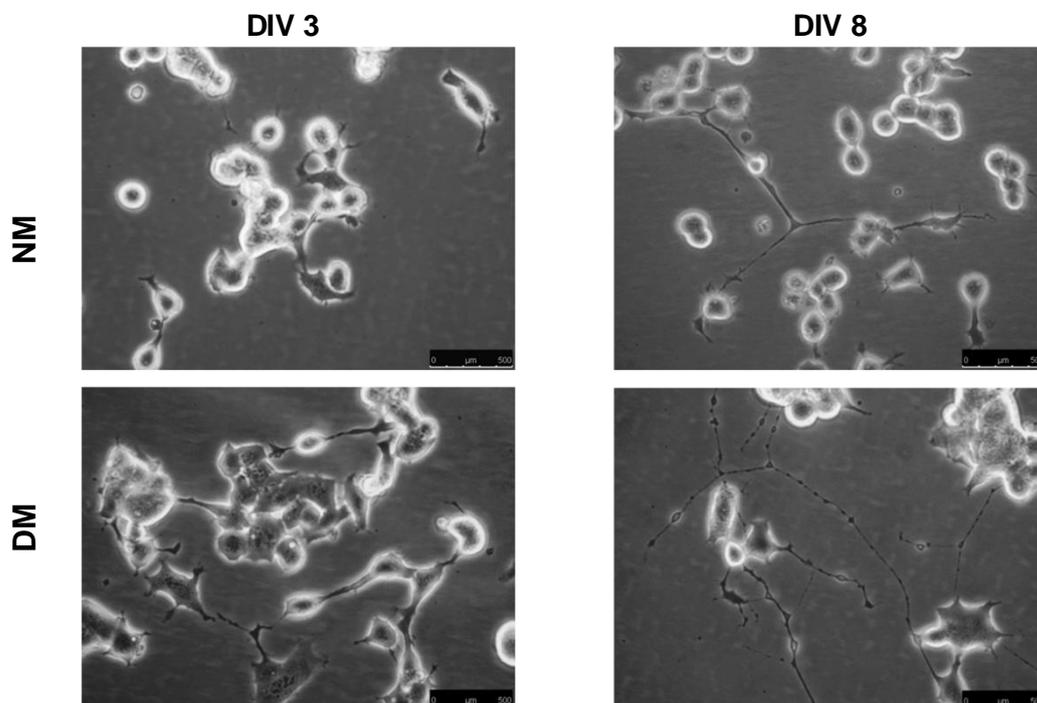


Abb. 4.3-4 Zellfortsätze NSC34-Zellen

Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen. Im Vergleich zur NM-Gruppe führte der Einsatz von DM zu verbesserter Neuritenausbildung (Steigerung der Neuritenlänge, Bildung neuer Neurite). Skalierung = 100 µm.

Aus der Kombination der drei Parameter der Neuritenanalyse ergibt sich, dass NSC34-Zellen im NM und damit per se differenzieren und dass die Differenzierung (Neuritenwachstum) durch DM stark unterstützt wurde (► Abb. 4.3-4).

4.3.2 Rezeptorbesatz - Immunhistochemische Visualisierung

Die Analyse der Zelldifferenzierung wurde durch die immunhistochemische Visualisierung von speziellen Rezeptoren als unabhängiges Kriterium ergänzt. Wir analysierten die Expression des nicotinenen Acetylcholin-Rezeptors (nAChR) α , des NGF p75-Rezeptors, des IGF1 α -Rezeptors und des PPA-Rezeptors α .

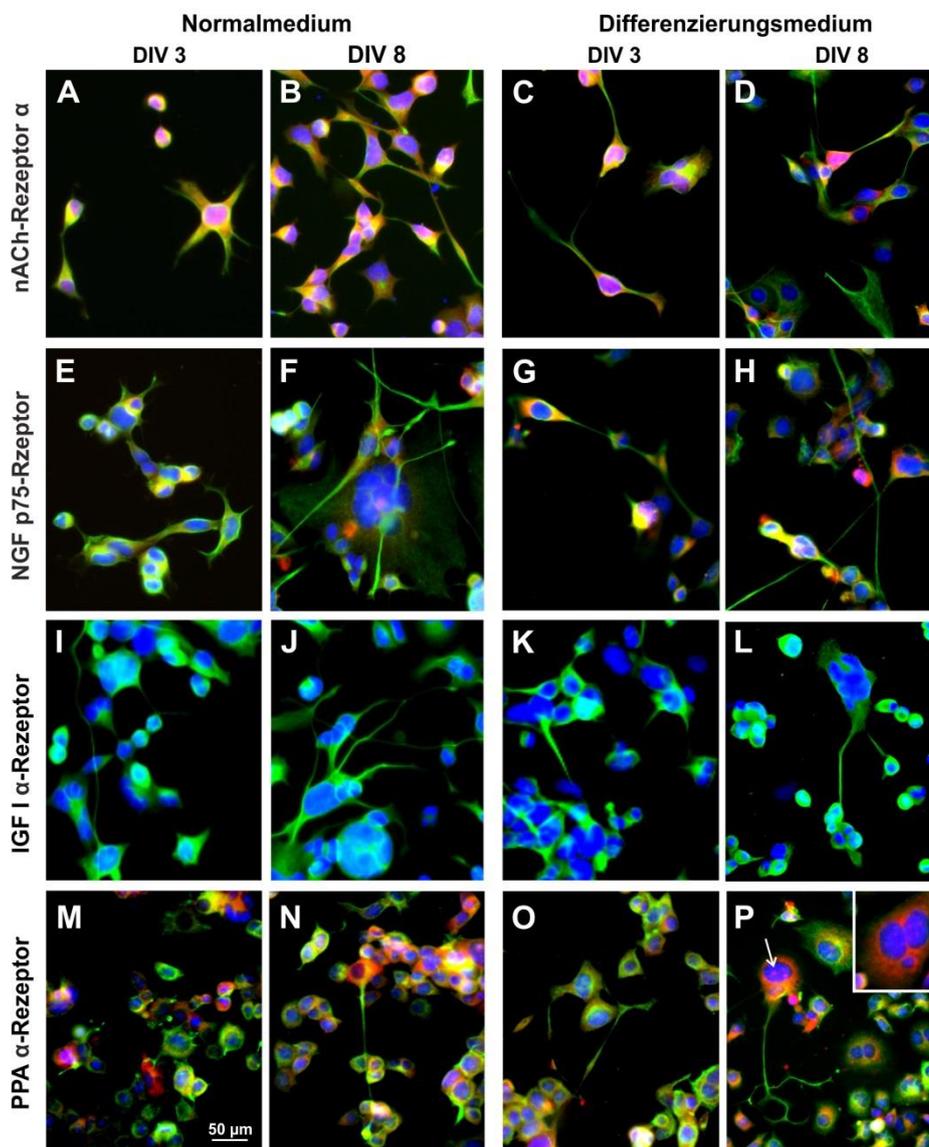


Abb. 4.3-5 Repräsentative Mikrofotografie zur Rezeptorexpression

Die Zellen wurden mit SMI 311 (grün) gegengefärbt, die Kerne mit DAPI (blau) markiert; die jeweiligen Rezeptoren fluoreszieren rot. Die Skalierung = 50 μm gilt für alle Bilder. Der Pfeil in P zeigt die Translokation des fluoreszenz-Signals in den Zellkern.

NSC34-Zellen exprimierten nAChR α , NGFR p75, und PPAR α unter Normbedingungen (NM) nachweislich, aber in unterschiedlicher Stärke. Die nAChR waren im NM von Kulturbeginn an ausgebildet ohne das eine Veränderung über die Kultivierungszeit zu verzeichnen war (► Abb. 4.3-5 A, B). Im DM nahm die Expression mit der Differenzierung eher ab (► Abb. 4.3-5 C, D). Der NGFR p75 war im NM nur spärlich exprimiert (► Abb. 4.3-5 E, F). Im Gegensatz dazu war er im DM auf solidem Niveau stabil nachweisbar (► Abb. 4.3-5 G, H). Der IGFR I- α war in beiden Medien nicht nachweisbar (► Abb. 4.3-5 I-L). PPAR α konnten immer nachgewiesen werden, allerdings immer nur in einem Teil von NSC34-Zellen (► Abb. 4.3-5 M-P). Während der Differenzierung wanderte die intensive Rezeptor-Fluoreszenz aus dem Zytoplasma zur Zellkern-Außenmembran und wurde teilweise auch in den Zellkern transloziert (► Einsatz in Abb. 4.3-5 P).

4.4 Visualisierung der Mitochondrien

Zur Visualisierung der Mitochondrien und ihrer Verteilung in NSC34-Zellen wurde das Mitochondrien-Markerprotein Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) in Kombination mit einer Phalloidin-Färbung verwendet, die auf das zelluläre Zytoskelettelement F-Actin in neuronalen Dendriten einschließlich des Wachstumskegels hinwies. Eine große Menge Mitochondrien wurde im Zytoplasma nahe dem Kern lokalisiert (► Pfeile in Abb. 4.4-1 A, B, C).

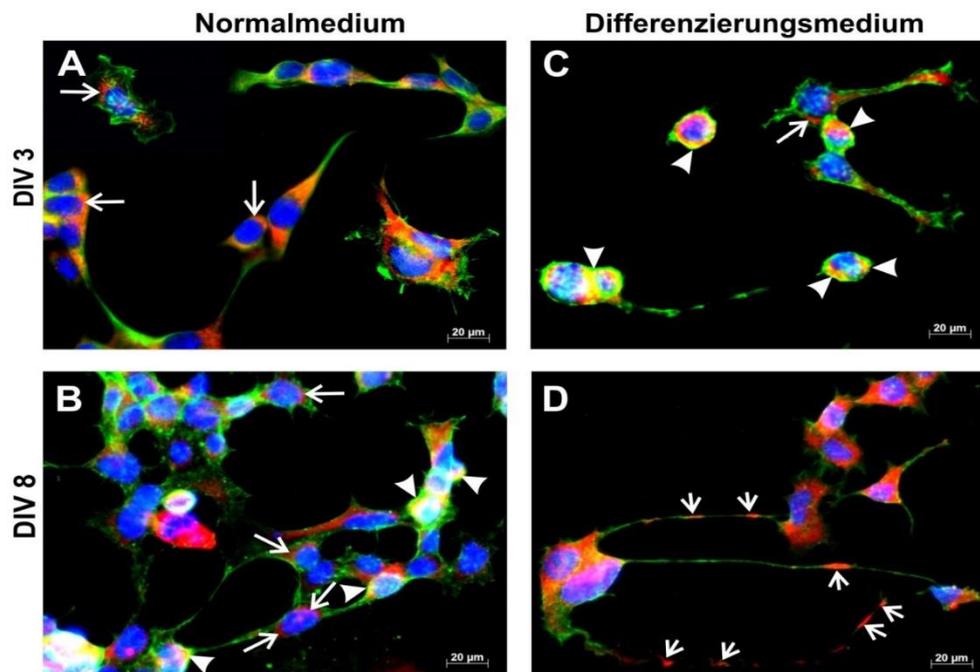


Abb. 4.4-1 Repräsentative Mikrofotografie zur Mitochondriendarstellung

Die Ko-Färbung mit PDH (rot) und Phalloidin (grün) zeigt eine kernnahe zytoplasmatische Lokalisation der Mitochondrien (Pfeile). Die endogene Zelldifferenzierung (B, NM DIV 8 und C, DM DIV 3) führt zur Lokalisierung von Mitochondrien in den Phalloidin-positiven Lamellipodia (Pfeilspitzen). In höher differenzierten Zellen (DM DIV 8) finden sich Mitochondrien in den Filopodia (kurze Pfeile in D). Nukleare Gegenfärbung mit DAPI (blau).

In Stadien der partiellen Zelldifferenzierung (NM, DIV 8 und DM, DIV 3) wurden Mitochondrien zusätzlich im Phalloidin-exprimierenden Lamellipodia lokalisiert (► Pfeilspitzen in Abb. 4.4-1 B, C). Mit fortschreitender Differenzierung war ihre beträchtliche Zunahme sowie ihre Abwanderung in die Filopodia bemerkenswert (► kurze Pfeile in Abb. 4.4-1 D).

4.5 Cardioliipin-Bestimmung

Die Medium- und Kulturzeit-abhängigen Beziehung zwischen Zelldifferenzierung und molekularer CL-Spezies in NSC34-Zellen sind in ► Tab. 4.5-1 dargestellt. Mit fortschreitender Zelldifferenzierung nahmen die Konzentrationen der meisten CL-Spezies ab. Lediglich die Konzentrationen von (C18:1)₃/C16:0 und (C18:1)₂/(C16:0)₂ waren signifikant erhöht (► Abb. 4.5-1).

CL-Spezies	NM; DIV 3	NM; DIV 8	DM; DIV 3	DM; DIV 8
(C18:2) ₄	01.99 ± 0.32 ^{###/+++}	01.54 ± 0.13 ^{###}	02.12 ± 0.26 ^{**}	00.61 ± 0.10
(C18:2) ₃ /C18:1	05.56 ± 0.66 ^{**/##/+++}	03.49 ± 0.47 [#]	03.62 ± 0.45 ^{**}	01.94 ± 0.22
(C18:2) ₂ /(C18:1) ₂	09.58 ± 0.74 ^{***/##/+++}	06.25 ± 0.53	06.79 ± 0.38 [*]	05.71 ± 0.63
C18:2/C18:1/(C16:0) ₂	00.67 ± 0.08 ⁺⁺⁺	00.80 ± 0.07 ^{###}	00.66 ± 0.09 ^{**}	00.44 ± 0.04
(C18:1) ₂ /(C16:0) ₂	14.61 ± 3.54 ⁺⁺⁺	17.52 ± 1.48 ^{##}	18.07 ± 1.34 [*]	22.61 ± 4.53
(C18:2) ₃ /C16:1	02.92 ± 0.47 ⁺⁺⁺	02.14 ± 0.23 ^{##}	02.89 ± 0.31 ^{***}	01.04 ± 0.16
(C18:2) ₂ /C18:1/C16:1 o. (C18:2) ₃ /C16:0	09.74 ± 0.95 ^{###/+++}	07.71 ± 0.94 ^{##}	07.20 ± 0.79 [*]	05.61 ± 0.69
(C18:1) ₂ /C18:2/C16:1 o. (C18:2) ₂ /C18:1/C16:0	11.95 ± 0.73 ^{###/+++}	10.48 ± 0.62 ^{##}	11.01 ± 0.87 ^{**}	07.89 ± 0.71
(C18:1) ₂ /C18:2/C16:0	03.62 ± 0.21 ⁺⁺⁺	03.32 ± 0.12 ^{##}	03.20 ± 0.43 ^{**}	02.05 ± 0.09
(C18:1) ₃ /C16:0	21.96 ± 1.36 ^{**/##/+++}	31.60 ± 2.63 [#]	30.12 ± 1.57 ^{**}	41.33 ± 2.53
(C18:1) ₂ /(C18:3) ₂	03.53 ± 0.15 ⁺⁺⁺	03.23 ± 0.14 ^{####}	03.32 ± 0.24 ^{***}	01.57 ± 0.22
(C18:1) ₃ /C18:2	07.41 ± 0.38 ^{***/##/++}	06.07 ± 0.26	06.29 ± 0.25	05.68 ± 0.64
(C18:2) ₃ /C20:4	00.68 ± 0.09 ^{###/+++}	00.50 ± 0.04 ^{##}	00.44 ± 0.07	00.29 ± 0.08
(C18:2) ₃ /C20:3 o. (C18:2) ₂ /C18:1/C20:4	01.09 ± 0.16 ^{####/+++}	00.78 ± 0.07 ^{##}	00.69 ± 0.15	00.45 ± 0.14
(C18:2) ₃ /C20:2 o. (C18:2) ₂ /C18:1/C20:3	01.71 ± 0.19 ^{*/####/+++}	01.21 ± 0.09 ^{##}	01.04 ± 0.19	00.76 ± 0.11
(C18:2) ₂ /C18:1/C20:2	01.79 ± 0.09 ^{####/+++}	01.49 ± 0.11 ^{##}	01.23 ± 0.13	01.07 ± 0.16
(C18:2) ₃ /C20:0 o. (C18:1) ₂ /C18:2/C20:2	01.07 ± 0.08 ^{##}	01.10 ± 0.08	00.86 ± 0.09 [*]	01.57 ± 0.21
C22:6/(C18:2) ₃	00.07 ± 0.01	00.08 ± 0.03 ^{##}	00.09 ± 0.02 ^{***}	00.05 ± 0.02
C22:6/(C18:2) ₂ /C18:1	00.09 ± 0.01	00.05 ± 0.01	00.14 ± 0.08	00.08 ± 0.03

Tab. 4.5-1 Medium-/Kulturzeit-abhängige Profile von CL-Spezies

Angaben in % des Gesamt-CL. Post-Hoc-Tests zeigten signifikante Unterschiede zwischen DIV 3 und DIV 8 innerhalb desselben Mediums: ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; zwischen NM und DM am selben DIV: ###p < 0,001; ##p < 0,01; #p < 0,05 und zwischen NM DIV 3 und DM DIV 8: +++p < 0,001; ++p < 0,01. Daten in Mittelwerte ± Standardabweichung.

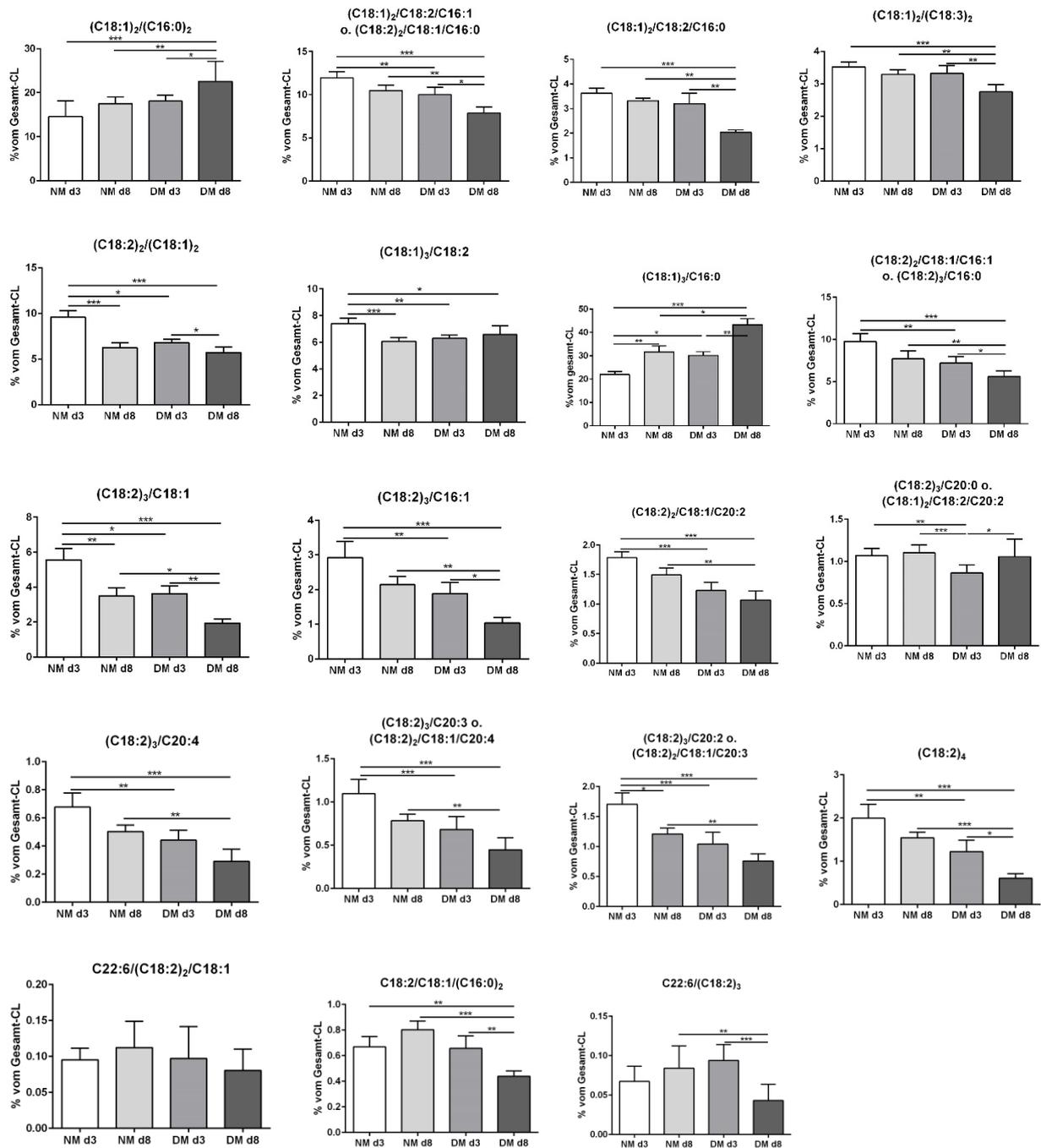


Abb. 4.5-1 Molekulare CL-Spezies in % des Gesamt-CL in NSC34-Zellen

Mit fortschreitender Zelldifferenzierung nahmen die Konzentrationen der meisten CL-Spezies ab. Lediglich die Konzentrationen von (C18:1)₃/C16:0 und (C18:1)₂/(C16:0)₂ waren signifikant erhöht. Statistisch signifikante Unterschiede: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,00; Daten in Mittelwerte ± Standardabweichung.

Mit der linearen Regressionsanalyse von Zelldifferenzierung (Neuritenwachstum) und den molekularen CL-Spezies sollte die Hypothese getestet werden, dass die Zelldifferenzierung ursächlich mit der CL-Zusammensetzung zusammenhängt. Die Regressionsanalyse ergab positive Korrelationen zwischen dem Differenzierungszustand und den Gehalten von

(C18:1)₃/C16:0 (► 4.5-2, linke Kolumne) und (C18:1)₂/ (C16:0)₂ (► 4.5-2, rechte Kolumne). Alle anderen molekularen CL-Profile korrelierten nicht mit den Differenzierungsparametern. Ganz offensichtlich benötigen die NSC34-Zellen für das Neuritenwachstum eine spezifische CL-Zusammensetzung. Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass die Differenzierung und damit auch die Regeneration von Motorneuronen des Rückenmarks mit Veränderungen der CL-Komposition einhergehen.

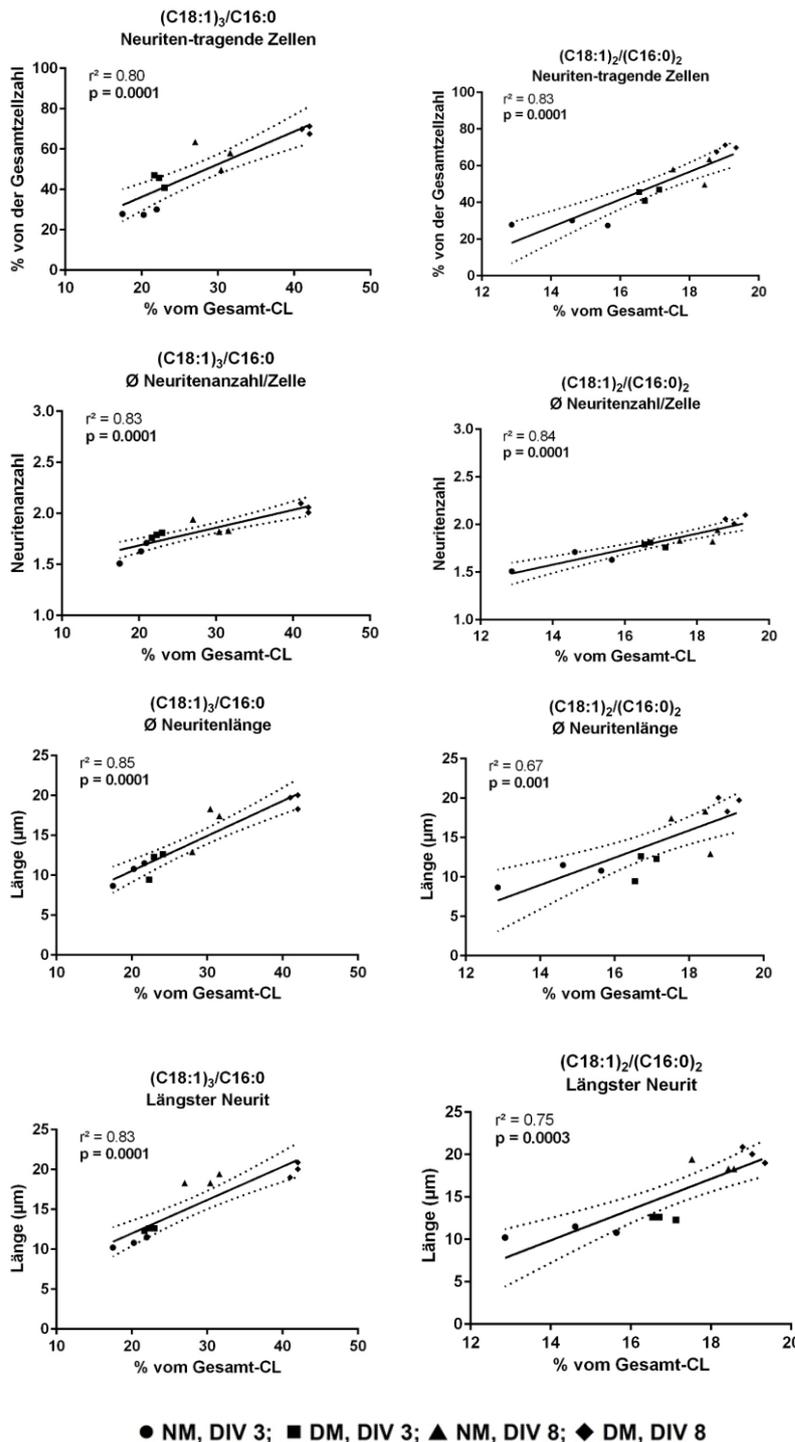


Abb. 4.5-2
Korrelationsanalyse von
Zelldifferenzierung und
CL-Spezies

Darstellung der Regression von Neuritenparametern und CL-Spezies bei der Differenzierung von NSC34-Zellen in beiden Kulturregimen. Die Ergebnisse sind für (C18:1)₃/C16:0 und (C18:1)₂/ (C16:0)₂ dargestellt.

Im Gegensatz zur Reaktion von molekularen CL-Spezies hatte der Wechsel von NM zu DM keinen Einfluss auf den allgemeinen Gehalt der in CL-Molekülen enthaltenen einzelnen Fettsäuren. Die beobachtete Veränderung der CL-Zusammensetzung deutet daher ausschließlich auf eine Umverteilung der freien Fettsäuren innerhalb der CL-Moleküle während der Differenzierung hin.

4.6 Bestimmung der freien zellulären Fettsäuren

Der Prozess der Zelldifferenzierung erfordert Änderungen des Lipidstoffwechsels, einschließlich des mitochondrialen Phospholipids CL, um die Synthese spezifischer Lipide wie Membranphospholipide für das Wachstum und Funktion von Neuriten sicherzustellen.

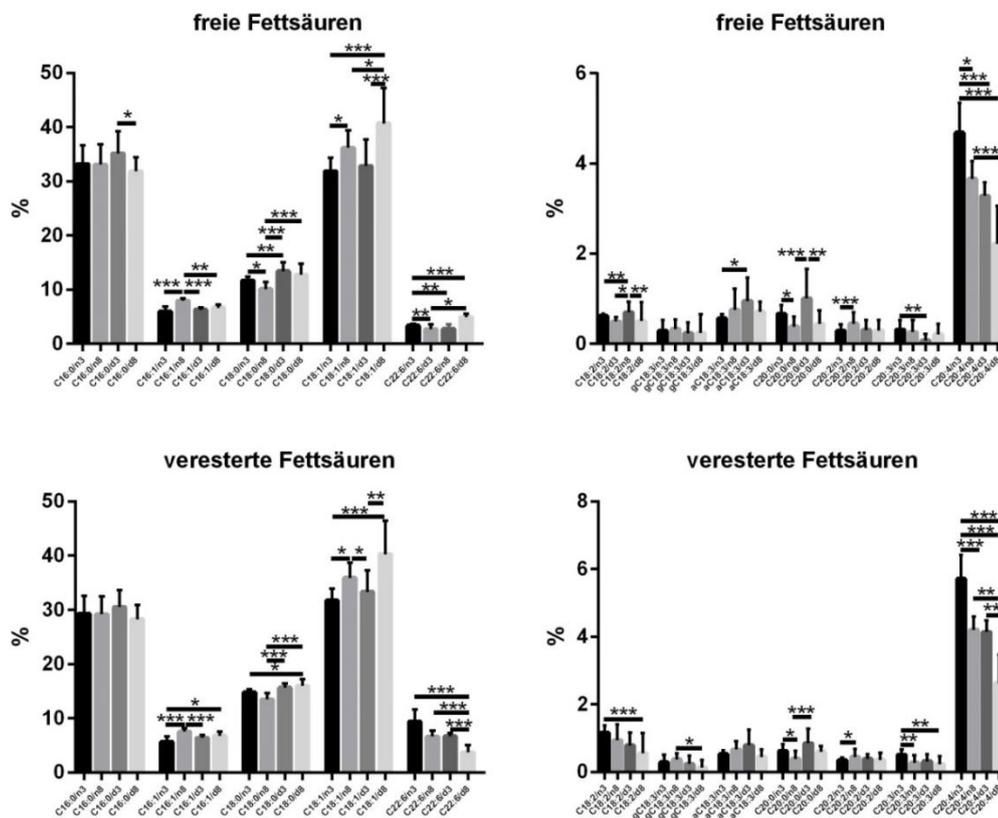


Abb. 4.6-1 Relativer Gehalt an freien Fettsäuren

Medium- und Kulturzeit-abhängige Profile der zellulären Fettsäuregehalte (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=18). Längere Kultivierungszeiten und der Wechsel von NM zu DM bewirken signifikante Änderungen des relativen Fettsäuregehalts, die starke und bidirektionale Variationen zeigen. Statistisch signifikante Unterschiede: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Solche Differenzierungs-abhängigen Stoffwechseleränderungen sollten sich in Veränderungen der Verteilung der zellulären freien Fettsäuren widerspiegeln. Daher wurde der Gehalt an freien zellulären Fettsäuren in unseren Kulturregimen analysiert. Der Vergleich

der Verteilung der zellulären Fettsäuren bei Züchtung nach DIV 3 und 8 ergab, dass die Initiierung der Differenzierung durch Umstellung von NM auf DM signifikante Änderungen der relativen Gehalte von C16:1, C18:0, C18:1, C22:6, C18:2 und C20:4 verursachte (► Abb. 4.6-1). Diese Reaktion spiegelt eine hohe Aktivität spezifischer Lipidstoffwechselwege während der Differenzierung wider.

4.7 Intervention mit Fettsäuren

Ausgehend von der Hypothese aus den CL-Experimenten, dass Lipide einen signifikanten Einfluss auf die neuronale Differenzierung haben, wurde ein „Proof of Principle“-Experiment angeschlossen. Dabei kamen PA (C16:0) und OA (C18:1; jeweils 1, 10, 100 mM, separat oder kombiniert) zur Anwendung. Konzentrationen von 100 mM waren toxisch. Die Zellen lösten sich 2 bis 6 h nach der Zugabe ab. Somit wurde diese Dosierung ausgeschlossen.

4.7.1 Zellproliferationsanalyse

Die durch BrdU-Inkorporation ermittelte Proliferationsrate wurde durch die Fettsäurezugabe nicht signifikant beeinflusst. An DIV 3 zeigte die NM-Gruppe nur eine Tendenz zu einer erhöhten Zellproliferation als Reaktion auf die Fettsäurebehandlungen. Das Lösungsmittel Methanol war völlig unwirksam; Die Daten sind in ► Tab. 4.7-1 gezeigt.

NM	DIV 3	DIV 8
Kontrolle	46.67 ± 3.07**/##/+++	35.31 ± 1.31###
+ Methanol	45.89 ± 4.08	38.02 ± 4.88
+ PA 1 µM	51.34 ± 4.39	39.24 ± 6.91
+ PA 10 µM	52.76 ± 3.14	39.71 ± 6.01
+ OA 1 µM	50.49 ± 1.91	39.92 ± 3.93
+ OA 10 µM	50.99 ± 2.53	39.42 ± 2.05
+ PA/OA 10 je µM	53.67 ± 3.41	38.57 ± 3.32
DM	DIV 3	DIV 8
Kontrolle	36.87 ± 5.80***	08.15 ± 2.36
+ Methanol	38.57 ± 4.19	08.71 ± 1.21
+ PA 1 µM	42.89 ± 4.78	09.98 ± 0.99
+ PA 10 µM	41.39 ± 4.22	10.50 ± 0.92
+ OA 1 µM	43.90 ± 1.03	10.02 ± 0.97
+ OA 10 µM	42.15 ± 1.60	10.52 ± 1.67
+ PA/OA je 10 µM	43.66 ± 1.76	11.01 ± 2.04

Tab. 4.7-1 Zellproliferationsanalyse unter Fettsäurezusatz

Darstellung BrdU-positiver NSC34-Zellen in % der Gesamt-Zellzahl. Post-Hoc-Tests zeigten signifikante Unterschiede zwischen DIV 3 und DIV 8 innerhalb desselben Mediums: ***p < 0,001; **p < 0,01; zwischen NM und DM beim selben DIV: ###p < 0,001; ##p > 0,01 und zwischen NM DIV 3 und DM DIV 8: +++p < 0,001. Daten in Mittelwerte ± Standardabweichung.

4.7.2 Zellvitalität

Bei der niedrigen Konzentration von 1 mM hatten beide Fettsäuren keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von NSC34-Zellen. Bei einer Konzentration von 10 mM erhöhten beide Fettsäuren die Anzahl der PI-positiven Zellen nur unwesentlich. Das Lösungsmittel Methanol war unwirksam (► Tab. 4.7-2).

NM	DIV 3	DIV 8
Kontrolle	1.92 ± 0.37 [#]	1.52 ± 0.24 ^{#/+++}
+ Methanol	1.83 ± 0.33	1.61 ± 0.25
+ PA 1 µM	2.14 ± 0.27	1.68 ± 0.52
+ PA 10 µM	2.19 ± 0.31	1.80 ± 0.46
+ OA 1 µM	2.23 ± 0.36	1.71 ± 0.51
+ OA 10 µM	2.41 ± 0.47	1.84 ± 0.49
+ PA/OA 10 je µM	2.41 ± 0.39	1.63 ± 0.54
NM	DIV 3	DIV 8
Kontrolle	2.61 ± 0.31	2.06 ± 0.29
+ Methanol	2.58 ± 0.48	1.94 ± 0.19
+ PA 1 µM	2.79 ± 0.51	2.37 ± 0.22
+ PA 10 µM	2.66 ± 0.53	2.48 ± 0.38
+ OA 1 µM	2.87 ± 0.48	2.68 ± 0.45
+ OA 10 µM	3.01 ± 0.47	2.59 ± 0.41
+ PA/OA je 10 µM	3.19 ± 0.28	2.64 ± 0.49

Tab. 4.7-2 Zellvitalitätsanalyse unter Fettsäurezusatz

Darstellung der Vitalitätsrate: Verhältnis PI-positiver NSC34-Zellen zur Gesamtzellzahl in %. Post-Hoc-Tests zeigten signifikante Unterschiede zwischen NM und DM beim selben DIV: [#]p > 0.05 und zwischen NM DIV 3 und DM DIV 8: ⁺⁺⁺p < 0,001. Daten in Mittelwerte ± Standardabweichung.

4.7.3 Neuritenanalyse

PA-Supplementierung unterstützt das Wachstum von Neuriten. Unabhängig vom verwendeten Medium erhöhte PA die Anzahl der Neuriten-tragenden Zellen und die Anzahl der Neurite pro Zelle bei DIV 3. Ähnliche Effekte auf diese Parameter wurden auch mit OA beobachtet, aber nur bei der hohen Dosis. In Bezug auf die Neuritenlänge war OA zumindest bei DIV 3 in NM-kultivierten NSC34-Zellen wirksamer als PA. Bei DM war die Wirksamkeit beider Substanzen nahezu ausgeglichen. Die Kombination beider Fettsäuren verstärkte die Fähigkeit zur Ausbildung von Neuriten; diese Effekte wurden jedoch nur in NM bei DIV 8 beobachtet. Das Lösungsmittel Methanol war unwirksam (► Abb. 4.7-1).

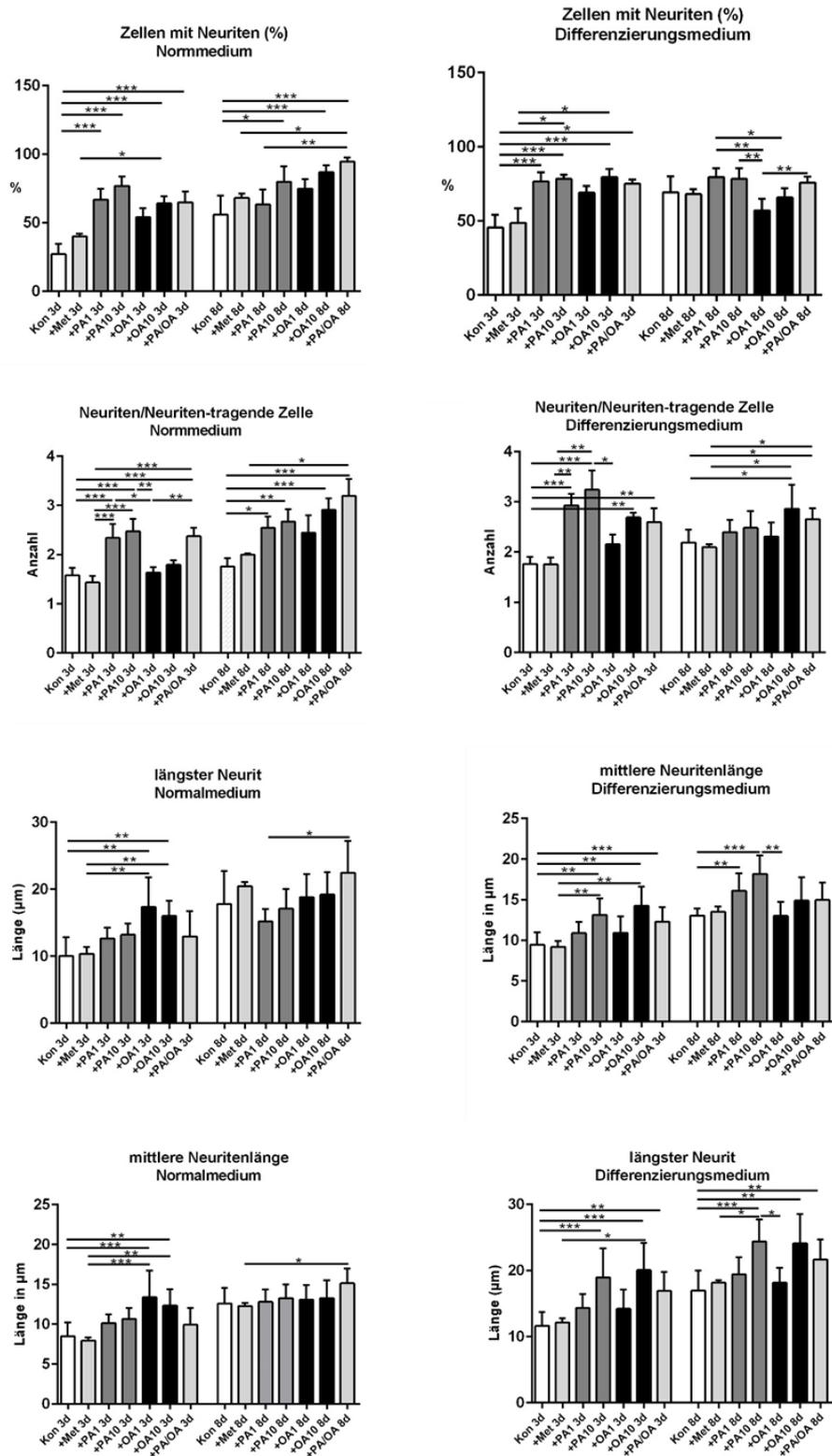


Abb. 4.7-1 Neuritenanalyse unter Behandlung mit Fettsäure

Bei Konzentrationen von 1 und 10 mM bewirkten PA und OA unabhängig vom Medium wachstumsfördernde Wirkungen auf Neuriten aus. Die Fettsäuren erhöhten die Anzahl der Neuriten-tragenden Zellen, die Anzahl der Neurite pro Zelle und die Neuritenlänge. Das Lösungsmittel Methanol hatte keine Wirkung. Daten in Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=6; Nichtparametrischer Kruskal-Wallis-Test, Post-Hoc-Test: signifikante Unterschiede: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

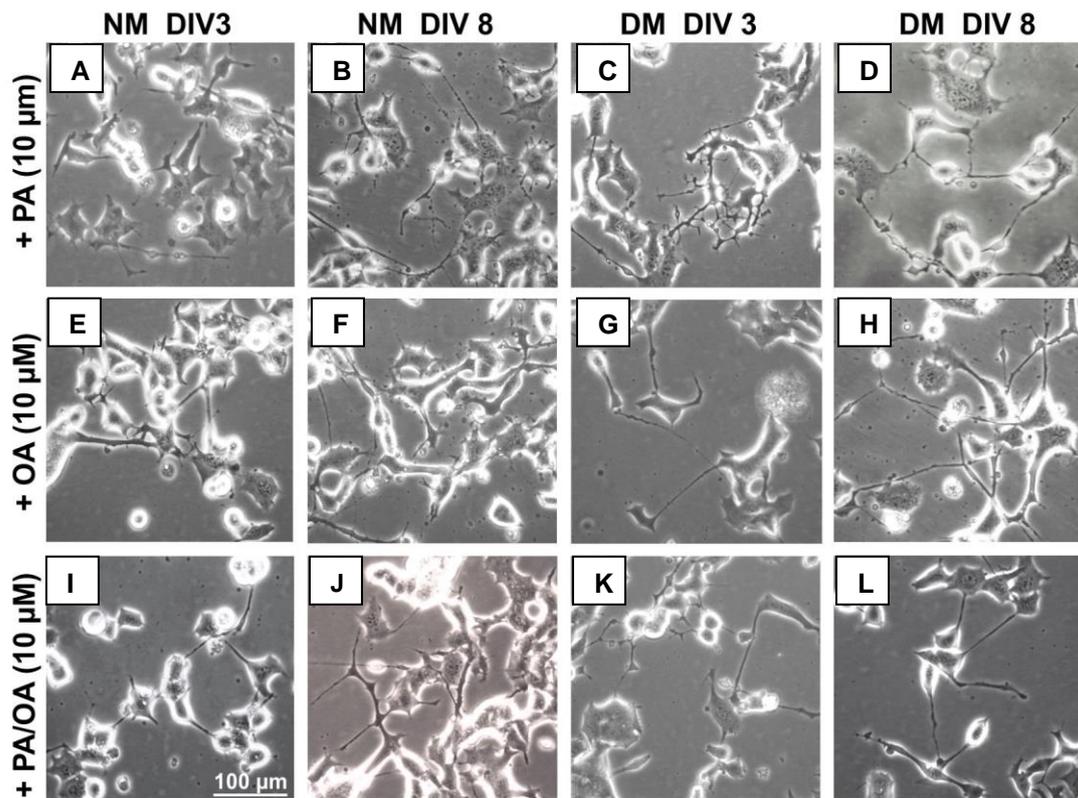


Abb. 4.7-2 Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahme unter Fettsäurebehandlung

In der Konzentration von 10 μM fördert die Applikation von Fettsäuren unabhängig vom verwendeten Medium und von der Kultivierungszeit das Auswachsen von Fortsätzen. Insbesondere PA (A-D) hat auf NSC34-Zellen eine Neuritenwachstums-fördernde Wirkung. Eine Kombination von PA und OA (I-L) führt zu einer signifikanten Steigerung der Neuritenausbildung. Skalierung = 100 μm gilt für alle Bilder.

4.7.4 Rezeptorbesatz

Der Einsatz von PA und OA, allein oder in Kombination, führte unabhängig von der eingesetzten Konzentration von 1 oder 10 μM zu einer Stabilisierung der Expression des nAChR α . Jetzt war dieser auch in Neuriten stabilisiert, wenn die Zellen für 8 Tage in DM kultiviert wurden (► Abb. 4.7-3 A-D). Die Expression des NGF p75-Rezeptors wurde grundsätzlich reduziert (► Abb. 4.7-3 E-H). In Bezug auf den IGF I α -Rezeptor waren alle Interventionen ohne Effekt. Dieser Rezeptor-Typ wird zumindest unter den bei uns verwendeten Kulturbedingungen von NSC34-Zellen nicht exprimiert (► Abb. 4.7-3 I-L). In Bezug auf den PPAR α zeigten die Fettsäurezusätze kaum Effekte (► Abb. 4.7-3 M-P). Allerdings hatte es den Anschein, dass die Translokation des Rezeptors in den Zellkern befördert wurde (► Einsatz in Abb. 4.7-3 N). Methanol allein hatte keine Effekte auf die Expression der Rezeptoren.

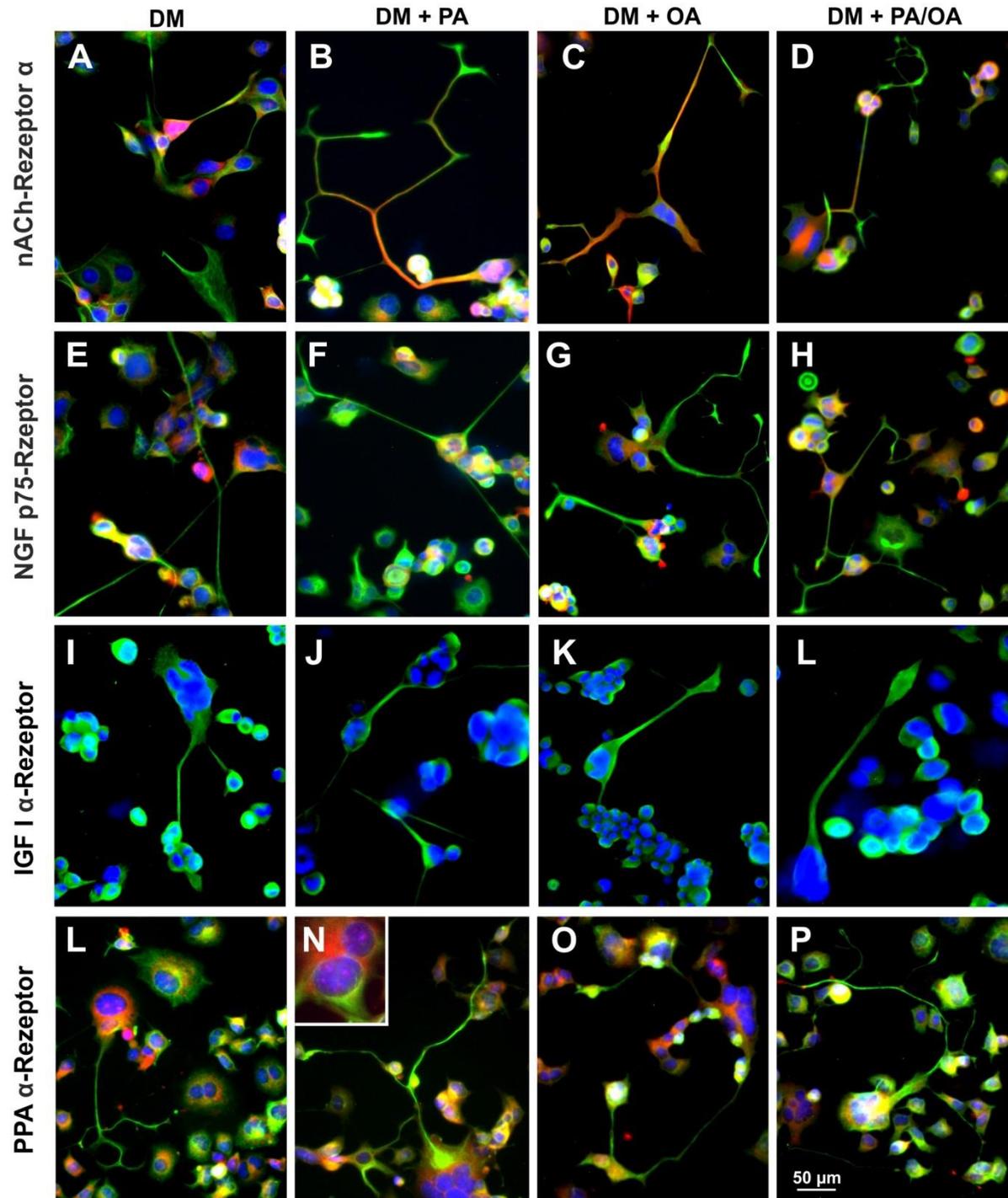


Abb. 4.7-3 Repräsentative Mikrofotografie zu Rezeptoren unter Fettsäurebehandlung

Die Zellen wurden mit SMI 311 (grün) gegengefärbt, die Kerne mit DAPI (blau) markiert; die jeweiligen Rezeptoren fluoreszieren rot. Alle Aufnahmen beziehen sich auf den Einsatz der Fettsäuren in DM mit einer Fettsäurekonzentration von 10 μ M an DIV 8. Die Skalierung = 50 μ m gilt für alle Bilder.

4.7.5 Cardioliipin-Bestimmung

In der nächsten Reihe von Experimenten wurde CL in Abhängigkeit von der Fettsäuresupplementierung an DIV 8 analysiert. Sowohl im NM als auch im DM hatte die Anwendung von PA und/oder OA keinen signifikanten Einfluss auf den zellulären CL-Gehalt (► Abb. 4.7-4 A). Im Allgemeinen war der zelluläre CL-Gehalt in Zellen, die in DM kultiviert wurden, jedoch höher.

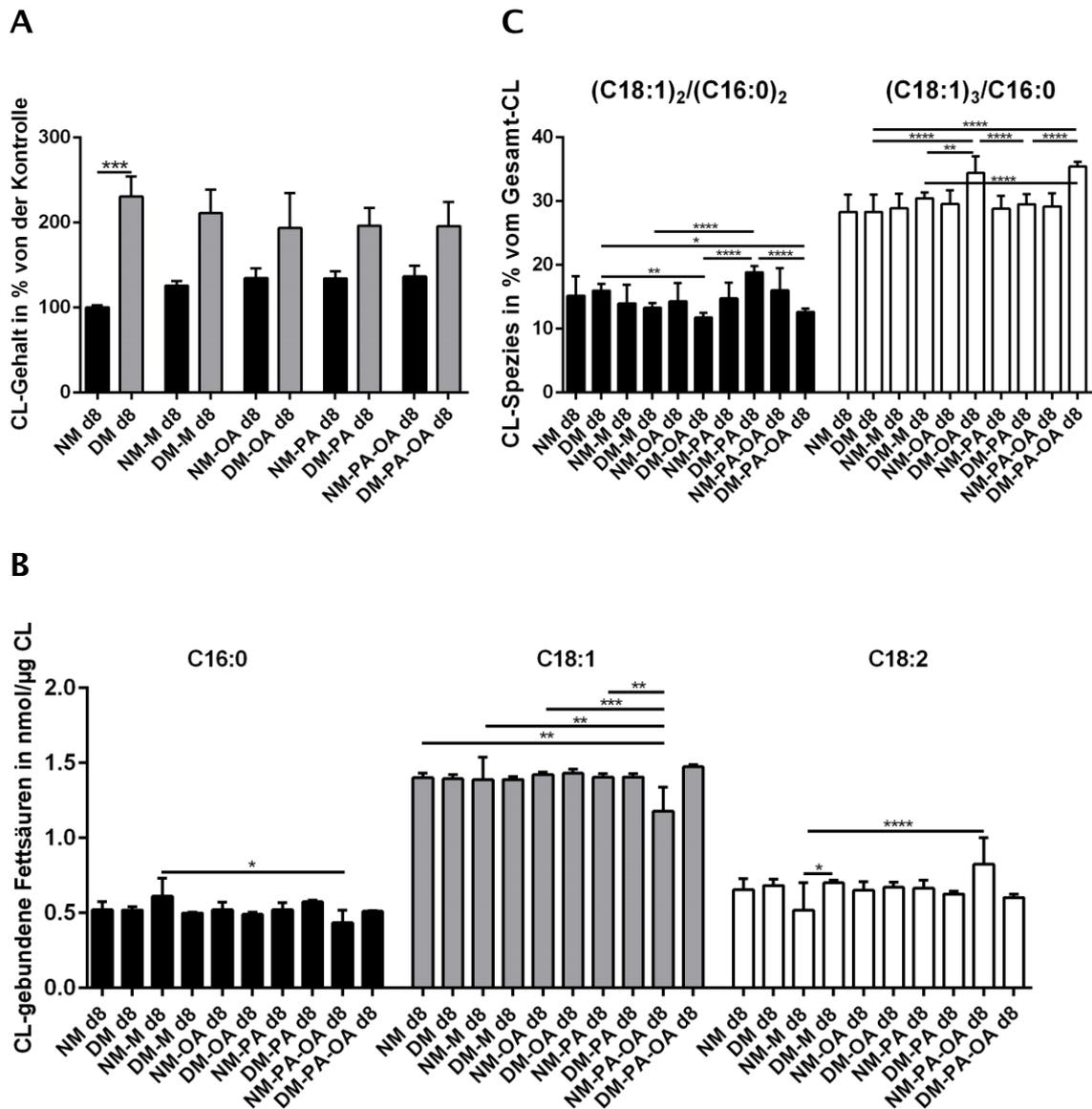


Abb. 4.7-4 Cardioliipin-Parameter nach Behandlung mit Fettsäuren

(A) CL-Gehalt, (B) CL-gebundene Fettsäuren und (C) molekulare CL-Spezies wurden in NM- und DM-kultivierten Zellen jeweils an DIV 8 analysiert. Methanol war die Vehikelkontrolle (NM-M bzw. DM-M). Die Statistik ist nur angegeben für Vergleiche zwischen Zellen, die in verschiedenen Medien kultiviert wurden, und für Zellen, die mit Fettsäuren im selben Medientyp supplementiert waren. Post-Hoc-Tests ergaben signifikante Unterschiede: **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Daten in Mittelwerten \pm Standardabweichung.

Die Applikation von Fettsäuren kann die Verteilung der CL-relevanten Fettsäuren verändern. Daher wurde ihr Gehalt nach PA- und OA-Anwendung bewertet (► Abb. 4.7-4 B). Relevante Änderungen in der Verteilung der CL-Fettsäuren wurden nur bei der PA/OA-Kombination in NM beobachtet. Insbesondere der Linolsäuregehalt (C18:2) war erhöht, wohingegen die OA- und PA-Gehalte im CL im Vergleich zur Vehikelkontrolle verringert wurden.

Um zu testen, ob PA oder/und OA die Häufigkeit der molekularen CL-Spezies ändern, wurde der Inhalt von $(C18:1)_2/(C16:0)_2$ und $(C18:1)_3/C16:0$ nach Fettsäurezusatz untersucht (► Abb. 4.7-4 C). An DIV 8 fanden sich signifikante Änderungen des Gehalts dieser molekularen CL-Spezies im Vergleich zur Vehikelkontrolle, wenn die Zellen in DM kultiviert wurden. Dabei erhöhte PA den Gehalt von $(C18:1)_2/(C16:0)_2$, OA den von $(C18:1)_3/C16:0$.

4.7.6 Bestimmung der freien zellulären Fettsäuren

Die Behandlung von NSC34-Zellen mit PA und/oder OA beeinflusste die Verteilung der zellulären Fettsäuren im Vergleich zur Vehikelkontrolle, jedoch nur im DM (► Abb. 4.7-5). Hier sind die zellulären Fettsäuren PA C16:0, C18:0 (Stearinsäure) und OA C18:1 dargestellt, da sich diese durch die Supplementierung signifikant veränderten. Grundsätzlich wurden die deutlichsten Unterschiede in der Verteilung der zellulären Fettsäuren durch den Wechsel von NM zu DM erreicht; im DM war ein deutlicher Aufwuchs aller drei Fettsäuren zu verzeichnen. Dieser Aufwuchs wird im Falle von C16:0 und C18:0 durch die Supplementierung mit OA bzw. OA/PA deutlich verringert, in Bezug auf C18:1 greift nur die Supplementierung mit OA/PA. Die Anwendung von PA hatte nur marginale Effekte.

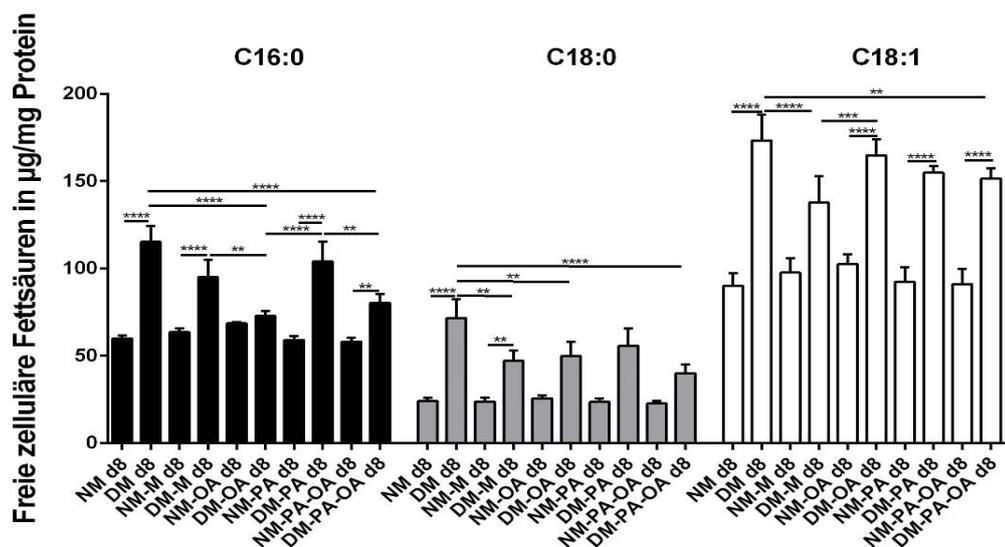


Abb. 4.7-5 Verteilung der freien zellulären Fettsäuren nach Fettsäurezugabe

Dargestellt sind C16:0, C18:0 und C18:1, da nur sie signifikante Unterschiede zeigten. Zum besseren Verständnis sind Signifikanzen zwischen NM und DM bei unterschiedlicher Supplementierung nicht dargestellt. Mittelwerte \pm Standardabweichung. Post-Hoc-Test-Signifikanzen: **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

5. Diskussion

Die vorliegende Studie befasste sich mit der Rolle des mitochondrialen Phospholipids CL bei der neuronalen Differenzierung unter Verwendung von NSC34-Zellen. Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Evaluation der Differenzierungsparameter und der Bestimmung des CL- und Fettsäuregehalts in unterschiedlichen Kulturregimen. Um diese Zellen in Ihrer Zuverlässigkeit als In-vitro-Modell für Experimente an Motoneuronen zu untersuchen, wurde zunächst eine Zellproliferationsanalyse durch BrdU-Inkorporation durchgeführt. Nach einer linearen Regressionsanalyse der Zelldifferenzierung, welche positive Korrelationen zwischen dem Differenzierungszustand (Neuritenwachstum) und den Gehalten von bestimmten CL-Spezies aufzeigte, wurde im zweiten Teil eine „Proof of Principle“-Analyse angeschlossen, welche die Differenzierungsparameter (Neuritenwachstum und CL-Gehalt) der NSC34-Zellen unter Fettsäuresupplementierung untersuchte.

5.1 Diskussion der eingesetzten Methoden

5.1.1 Zellkultivation

Für Experimenten an Motoneuronen eignen sich entweder primäre Motoneuron-Kulturen [19, 41, 55, 113] oder Zelllinien [5, 93]. Der Vorteil von Primärkulturen ist die größere Nähe zum In-vivo-Zustand. Aufgrund einer Vielzahl von methodischen Schwierigkeiten bei der Kultivierung dieser Primärzellkulturen (geringe Kapazität, schwankende Reproduzierbarkeit) werden aber oft Zelllinien verwendet. Dabei wird seit den 90er Jahren die NSC34-Zelllinie als die stabilste Motoneuron-Zelllinie für Experimente an Motoneuronen angesehen. Viele Studien haben gezeigt, dass NSC34-Zellen bestimmte Motoneuron-Eigenschaften im Laufe Ihrer Differenzierung exprimieren [5, 24, 67]. So ist die Differenzierung und Reifung von NSC34-Zellen u.a. auch durch eine Neuriten-Entwicklung und die Expression bestimmter Motoneuronen-spezifischer Rezeptoren gekennzeichnet. Kulturen enthalten zwei Zellpopulationen: kleine, undifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit haben, sich zu teilen, und größere, mehrkernige Zellen [9, 20].

Die Zählung der Zellen aus Zellsuspensionen mittels einer Neubauerzählkammer ist im Allgemeinen bekannt und etabliert [118]. Die Auszählung der Zellen erfolgte hier unkompliziert unter einem Phasenkontrastmikroskop. Störende Verunreinigungen konnten durch gründliches Waschen der Kulturen, ausreichendes Zentrifugieren der Zellsuspensionen und vorsichtiges Pipettieren des Zellüberstandes weitgehend reduziert werden. Anhand der mit der Neubauerzählkammer ermittelten Zelldichte in den Zellsuspensionen konnte man die gewünschte Zellzahl pro Experiment individuell regeln.

5.1.2 Zellproliferationsanalyse

Die BrdU-Analyse ist eine anerkannte und etablierte Methode [11, 60, 72, 81]. Sie wurde in unserer Arbeitsgruppe schon mehrfach angewendet [45, 47, 48, 49, 65]. Mithilfe der Inkorporation des Thymidinanalogons BrdU in neusynthetisierte DNA werden Zellen nachgewiesen, die die S-Phase des Zellzyklus durchlaufen haben. Diese Zellen können immunhistochemisch fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Da die S-Phase im Zellzyklus zeitlich gesehen vor der eigentlichen Zellteilung liegt, muss vermerkt werden, dass mit der Markierung der S-Phase keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die markierten Zellen die eigentliche Mitose auch durchlaufen haben. Außerdem stellt die NSC34-Zelllinie in Bezug auf die Proliferation kein besonders gutes Modell dar, da sie auf Grund ihrer Hybridisierung mit Maus-Neuroblastom-NG18TG2-Zellen eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen.

Für die Auswertung erfolgte die Zählung der Zellen manuell. Somit hing die Qualität der Auswertung im großen Maß von einer gleichmäßigen Verteilung der BrdU-positiven Zellen ab. Außerdem waren falsch-positiv gefärbte Zellen nicht ganz ausgeschlossen. Die Zählung oblag ausschließlich einer Person, um die individuelle/subjektive Fehlerquote zu minimieren.

5.1.3 Zellvitalitätsanalyse

Zur Bestimmung der Vitalität der NSC34-Zellen kam eine Doppelfärbung mit PI und FD zum Einsatz. Diese Methodik ist weltweit anerkannt und verbreitet [7, 39, 40, 94, 117]. Sie wurde in unserer Arbeitsgruppe mehrfach angewendet [46, 50]. In anderen Arbeitsgruppen wurden andere Farbstoffe eingesetzt (MTT [59], SYTO13 [107] und SYBR14 [108]) um die Vitalität von Zellen zu messen. Hierbei handelt es sich um einen Membrantest. PI gilt für Zellmembranen als undurchlässig und wird daher üblicherweise zum Nachweis von Zellen mit beeinträchtigter Integrität der Plasmamembran verwendet. Nach seinem Eintritt in die Zelle interkaliert PI mit der DNA und fluoresziert rot [63]. Die Exposition von Zellpopulationen gegenüber in Kulturmedien gelöstem PI identifiziert avitale Zellen, die entweder durch Nekrose absterben oder sich in einem späten Stadium der Apoptose befinden, sowie Zellen mit mechanisch oder chemisch beschädigter Plasmamembran [14, 15]. FD ist ein acetyliertes Derivat des grün fluoreszierenden Farbstoffs Fluorescein [8, 29]. Die Acetylgruppe verhindert eine Fluoreszenz, verleiht aber auch die Fähigkeit, passiv durch eine Phospholipiddoppelschicht der Zellmembranen zu diffundieren. Sobald sich FD im Zytoplasma befindet, desacetylieren unspezifische Esterasen das Molekül, um es in Fluorescein und die Nebenprodukte Essigsäure/Acetaldehyd umzuwandeln. Die geladenen Gruppen von Fluorescein fördern die Retention in der Zelle. Die Verwendung von FD als Marker zur Beurteilung der Vitalität führt zu einer Reihe von Einschränkungen. Das

Vorhandensein extrazellulärer Esterasen oder die Verwendung hoher Konzentrationen von FD kann eine hohe Fluoreszenz liefern und so das Ergebnis verfälschen. Dies kann minimiert werden, indem nur eine für den Nachweis erforderliche, endgültige Arbeitskonzentration von FD verwendet wird. FD kann spontan während der Inkubation zu Fluoreszein hydrolysieren. Dies ist möglich durch das Vorhandensein von Spuren von Wasser in den Stammlösungen oder durch die Feuchtigkeit während der Inkubation. Vitalitätsanalysen mit PI/FD werden unter der Annahme durchgeführt, dass vitale Zellen eine hohe Esterasenaktivität im Zytoplasma aufweisen und tote oder sterbende Zellen eine geringe oder keine Esterasenaktivität besitzen. Außerdem sterben Zellen ab, wenn sie aus der „Wohlfühl-Atmosphäre“ des Brutschranks entnommen werden. Es muss deshalb dafür gesorgt werden, die Mikroskop-Fotos so bald wie möglich nach dem Hinzufügen der Farbstoffe aufgenommen werden.

Bei der Auswertung galten hier die gleichen Einschränkungen aufgrund der manuellen Zählung wie bei der Auswertung der Proliferationsanalyse.

5.1.4 Charakterisierung der Zelldifferenzierung

Die NSC34-Zelllinie bildet nach Kultivierung zwei unterschiedliche Zellpopulationen aus: kleine, undifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit haben, sich zu teilen, und größere Polykernzellen, die viele Eigenschaften von Motoneuronen ausdrücken [9, 20, 24]. Unter Verwendung eines speziellen Differenzierungsmediums konnte eine Verschiebung zum größeren, mehrkernigen Motoneuron-ähnlichen Phänotyp erzielt werden. Pro Versuchsreihe wurden in jedem Kulturregime ca. 400 Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und auf die Neuritenparameter untersucht [62]. Wie bei den vorherigen Experimenten erfolgte die Beurteilung der Zellen „manuell“. Das Übersehen sehr kleiner Fortsätze muss angenommen werden. Eine weitere Fehlerquelle ist der Mediumwechsel. Er stellt einen mechanischen Stress für Zellen dar, in dessen Ergebnis die Zellen ihre Fortsätze einziehen. So erklären wir die etwas unerwarteten, relativ „schlechten“ Neuritenparameter an DIV 8.

Die immunhistochemische Darstellung und mikroskopische Visualisierung Motoneuronenspezifischer Rezeptoren gestaltete sich relativ unkompliziert. Ebenso gelang die Visualisierung der Mitochondrienverteilung in NSC34-Zellen mithilfe des Mitochondrien-Markerproteins Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) in Kombination mit einer Phalloidin-Färbung ohne Einschränkungen. Wie immer bei immunhistochemischer Ergebniserhebung musste aber Wert auf eine solide Spezifität der verwendeten Antikörper gelegt werden.

5.1.5 Cardiolipin-/Fettsäure-Bestimmung

Die Massenspektrometrie erlaubt die Analyse von unterschiedlichstem Probenmaterial auf molekularer Ebene. Damit ist sie Messsystemen, die auf der Photometrie oder auf immunometrischen Techniken beruhen, überlegen, da sie deutlich spezifischer ist. Um allerdings Lipide aus biologischem Material analysieren zu können, müssen sie zunächst extrahiert werden. Dieser Schritt ist eine wesentliche Fehlerquelle, so dass er sehr sorgfältig validiert werden muss. Der Gehalt freier Fettsäuren in den NSC34-Zellen wurde durch Analyse ihrer Methylester mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) bestimmt. Vorteile dieser Standard-Methode sind die scharfen Peaks, die hohe Peak-Kapazität und die Möglichkeit, komplexe Proben zu untersuchen. Allerdings sind die GC-Detektoren sehr empfindlich. Es muss akribisch darauf geachtet werden, die Kapillarsäulen nicht zu überladen, um asymmetrische Peaks zu vermeiden. Unsere Proben waren jedoch relativ gering konzentriert, so dass das Problem kaum auftrat.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Zellproliferation und Zellvitalität

Durch die Hybridisierung mit Neuroblastomzellen besitzt die Motoneuron-ähnliche Zelllinie NSC34 die Möglichkeit zur Proliferation [9]. Zur Förderung des Differenzierungsprozesses wird routinemäßig ein spezielles Differenzierungsmedium eingesetzt. Der Befund (Abb 4.1 2) bestätigte die von Eggett et al. (2000) beschriebene Aufteilung von NSC34-Zellen in zwei morphologisch unterschiedliche Populationen: proliferierende undifferenzierte Zellen und differenzierte Zellen mit phänotypischer Charakterisierung von Motoneuronen. Letztere folgen dem Prinzip von [98], dass die Differenzierung neuronaler Zellen mit einer Abnahme der Proliferationsrate einhergeht. Außerdem sterben mit der Zeit und unabhängig vom Kulturmedium immer auch NSC34-Zellen ab. Dieses Verhalten von NSC34-Zellen wurde auch in der Arbeitsgruppe von Jung et al. (2015) beobachtet. Grundsätzlich kann aber festgehalten werden, dass die Basis-Vitalparameter des Zellsystems stabil, reproduzierbar und aussagekräftig erhoben werden konnten, so dass die Effekte der Fettsäure-Intervention als echte Effekte gewertet werden konnten.

5.2.2 Charakterisierung der Zelldifferenzierung

Im ersten Teil dieses Experimentes konnte beobachtet werden, dass die Differenzierung der NSC34-Zellen – im Sinne des Neuritenwachstums - durch das DM stark unterstützt werden konnte. Wie die Arbeitsgruppen Eggett et al., 2000 und Maier et al., 2013 schon berichteten, fanden auch wir, dass der Differenzierungsprozess NSC34-Zellen dazu veranlasst, sich zu

phänotypischen Motoneuronen mit vielen und langen Fortsätzen zu entwickeln. Die Neuritenbezogene Differenzierung erfolgte auch ohne den Einsatz von DM, also per se, verlief aber unter DM deutlich stringenter.

Bezüglich der Expression der Motoneuronen-spezifischen Rezeptoren war zu verzeichnen, dass eine Differenzierung mit einer stärkeren Expression von NGF p75-Rezeptoren einhergeht (Abb. 4.3-5). Diese wurde auch schon von der Arbeitsgruppe Matusica et al., 2008 beschrieben. Im Gegensatz dazu nahm die Expression der nAChR α im Laufe des Differenzierungsprozesses eher ab. Das war unerwartet, da bereits beschrieben wurde, dass nAChRs eine Rolle bei der neuronalen Differenzierung einschließlich der Neuritogenese spielen [4, 35, 85]. Bemerkenswert war, die Tatsache, dass PPAR α im Laufe der Zelldifferenzierung aus dem Zytoplasma in den Zellkern wandert, wo er seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausführen kann.

5.2.3 Der Einfluss von Cardiolipin auf die Differenzierung

Das Wachstum von Neuriten erfordert eine hohe Stoffwechselaktivität für die Synthese von Membranbestandteilen wie Lipiden und Phospholipiden [110]. CL ist für eine effektive mitochondriale Energieproduktion erforderlich, da es den Elektronenfluss durch die mitochondriale Elektronentransportkette unterstützt und somit die ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung befördert [77, 88, 89, 101]. Zelldifferenzierung ist ein energieaufwendiger anaboler Prozess, der von einer ausreichenden Energieproduktion abhängt [95, 103, 118, 119]. Unsere Beobachtung, dass der Wechsel von NM zu DM mit einem erhöhten zellulären CL-Gehalt einherging, passt zur Hypothese eines höheren Energiebedarfs bei Differenzierung, der möglicherweise mit einer erhöhten Anzahl von Mitochondrien und der Aktivierung von Stoffwechselwegen wie Lipidsynthese und Proteinsynthese gekoppelt ist.

CL ist Bestandteil des mitochondrialen Membransystems [36]. Es beeinflusst die Form und Funktion der mitochondrialen Innenmembran signifikant [100]. Die CL-Zusammensetzung hängt von der Art des Gewebes ab und korreliert mit Funktionen wie der Zellproliferation [55, 118, 119]. Der Differenzierungsprozess von NSC34-Zellen war von wesentlichen Änderungen in der Zusammensetzung und Verteilung der molekularen CL-Spezies begleitet.

5.2.4 Korrelation zwischen Fettsäuregehalt und Zelldifferenzierung

Unsere Daten zu freien zellulären Fettsäuren zeigten Veränderungen des relativen Fettsäuregehalts einer Vielzahl unterschiedlicher Fettsäurespezies in Abhängigkeit von Kulturmedium und Kultivierungsdauer (Abb. 4.6-1). Die während der Zellkultivierung beobachteten Veränderungen sind Anzeichen für einen aktiven Lipidstoffwechsel,

einschließlich der De-novo-Lipogenese, die für eine ordnungsgemäße Neurodifferenzierung von entscheidender Bedeutung [56], da die Fortsatzbildung mit Membran-Zuwachs und – Umstrukturierungen einhergeht.

5.2.5 Intervention mit Fettsäuren

Die positive Korrelation zwischen dem Differenzierungsstatus und dem Gehalt an verschiedenen CL-Spezies ist mit der Annahme vereinbar, dass diese CL-Spezies den Differenzierungsprozess fördern. Konsequenterweise wurde in den nächsten Versuchsreihen die Möglichkeit getestet, die Zelldifferenzierung durch Manipulation der CL-Zusammensetzung mithilfe einer Fettsäuresupplementation zu manipulieren. Tatsächlich stimulierte die Applikation von PA und/oder OA die Zelldifferenzierung der NSC34-Zellen, was durch eine erhöhte durchschnittliche Anzahl von Neuriten pro Zelle und durch das Auswachsen von Neuriten angezeigt wurde (Abb. 4.7-1). Unter DM führte die Applikation von PA und/oder OA an DIV 8 auch zu einem beschleunigten Differenzierungsprozess. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Beobachtung, dass die Differenzierungsparameter in DM früher ein Plateau erreichten als in NM.

In Bezug auf die CL-Zusammensetzung führte die Fettsäureapplikation zu Veränderungen des Gehalts an (C18: 1)³/C16:0-CL und (C18:1)²/(C16:0)²-CL, wenn die Zellen in DM kultiviert wurden (Abb. 4.7- 4). Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass die Stimulierung der Differenzierung durch Fettsäuresupplementierung die Modifikation derjenigen molekularen CL-Spezies umfasst, die mit der Differenzierung korrelieren. Die induzierten Veränderungen des CL-Metabolismus als Teil des zellulären Lipidmetabolismus spiegelten sich auch in der veränderten Verteilung der zellulären freien Fettsäuren nach der Behandlung wider (Abb. 4.7-5).

Obwohl die Fettsäure-Supplementierung Änderungen des CL-Gehalts, der CL-Struktur und der Differenzierungsparameter von NSC34-Zellen induzierte, bewirkte der Wechsel von NM zu DM stärkere Auswirkungen auf diese Parameter. Beide Medien unterschieden sich in ihrer Zusammensetzung. DM enthielt zusätzlich Linolsäure (0,042 mg/ml) und Liponsäure (0,105 mg/ml). Weiterhin könnten auch andere Bestandteile des DMs wie Vitamine, Wachstumsfaktoren und Aminosäuren für die Stimulierung der Differenzierung verantwortlich sein. Ein weiterer Unterschied ist der FKS-Gehalt der Medien (NM: 10 % vs. DM: 1 %). Der FKS-Gehalt kann den Fettsäuretransport beeinflussen und die Verfügbarkeit bestimmter Fettsäuren verändern. In separaten Experimenten wurde der Fettsäure- und CL-Gehalt in den Medien analysiert. Da keine signifikanten Mengen an Fettsäuren und CL gefunden wurden, kann dieser Einflussfaktor aber eher ausgeschlossen werden.

Der Befund der Differenzierungsstimulation durch OA-Supplementierung stimmt mit veröffentlichten Daten überein, die zeigen, dass die neuronale Differenzierung durch OA aus Astrozyten stimuliert wird [95, 109]. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass OA ein wichtiger Faktor für die Vermittlung des Crosstalk zwischen Astrozyten und Neuronen während des Aufbaus eines neuronalen Netzwerks ist [3]. Es wurde gezeigt, dass OA bevorzugt in Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin eingebaut wurde [109]. Dies scheint ein zusätzlicher Mechanismus zur Stimulierung der Differenzierung durch OA zu sein. Phosphatidylcholin ist ein Hauptbestandteil der Biomembranen von Säugetieren. Die Biosynthese/Re-Modellierung dieser Membranen ist für die Neubildung von Neuriten und das Neuritenwachstum essenziell [87]. Darüber hinaus kann OA die Proteinkinase C aktivieren, von der bekannt ist, dass sie die GAP-43-mRNA stabilisiert, wodurch die Expression dieses wachstumskegelbezogenen Proteins verstärkt wird [109].

Weiterhin wurde gezeigt, dass exogen appliziertes PA aktiv in GAP-43 eingebaut wird [105], und außerdem ist eine Palmitoylierung von GAP-43 für dessen wachstumsfördernde Membranaktivität erforderlich [27]. Darüber hinaus ist die dynamische Palmitoylierung der Mechanismus, mit dem Mikrotubuli-Proteine auf das axonale Kompartiment abzielen [111]. Dies und das Zusammenspiel von Palmitoylierung/Depalmitoylierung steuert die Proteinlokalisierung sowie die Aktivität palmitoylierter Proteine [26, 33]. Das Neuritenwachstum hängt im Wesentlichen von der dynamischen Membransynthese/-Reorganisation ab [74, 90]. Dieser Prozess hängt auch von der Palmitoylierung/Depalmitoylierung von Membranproteinen [26, 28] wie Signalproteinen, Ionenkanälen, Zelladhäsionsmolekülen und Neurotransmitterrezeptoren ab [37].

Das PPAR-System wurde als weiteres Ziel von Fettsäuren als neuronaler Differenzierungsaktivator diskutiert [6]. PPAR α , β/δ und γ gehören zur Kernrezeptor-Überfamilie. Die Aktivierung von PPARs durch Fettsäuren und deren Derivate führt zur Heterodimerisierung mit Retinoid-X-Rezeptoren, um eine Transkriptionseinheit zu bilden, die die Expression verschiedener Gene moduliert. PPARs werden im gesamten Gehirn exprimiert [1]. Sie beteiligen sich an der Signalübertragung reaktiver Sauerstoffspezies [1] an neuroprotektiven Mechanismen [121] am Fett- und Glukosestoffwechsel (Stump et al., 2016) und an der Proliferation neuronaler Stammzellen sowie an der Differenzierung [12, 18]. Bei der Aktivierung verlagern sich PPARs in den Kern, wo sie sich mit dem Transkriptionsapparat verbinden. In unseren Experimenten war die Differenzierung von NSC34 per se mit dem PPAR-Shuttling vom Zytoplasma in den Kern verbunden (Abb. 4.3-5). Daher sind PPARs an der NSC34-Differenzierung beteiligt und können die OA- und PA-abhängige Förderung der neuronalen Differenzierung vermitteln.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch unsere Beobachtung, dass der NGFR p75 nach Fettsäureapplikation stärker exprimiert wird. Es ist bekannt, dass er an der

Neuritogenese beteiligt ist, allerdings inhibitorisch [44, 116]. So erklärt sich, dass der reduzierende Effekt von OA/PA auf seine Expression das Neuritenwachstum befördern kann.

5.3 Ausblick

Die in meiner Arbeit erhobenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass das CL-System ein potentielles Target für neuartige Therapieansätze bei der Behandlung von motoneuronalen Ausfällen nach direkter Schädigung des Rückenmarks und/oder seiner peripheren Nerven sein könnte. Bei der weiteren labor-experimentellen Suche nach solchen Therapieansätzen sollte den Fettsäuren und damit einer gesunden Ernährung durchaus mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden. Auch wenn nicht davon ausgegangen werden kann, dass es eine „Neuroregenerations-fördernde“ Diät geben wird, belegt die Arbeit, dass bestimmte Fettsäuren durchaus in der Lage sind, die Synthese und Komposition des CLs positiv zu beeinflussen.

6. Zusammenfassung

Die Motorneurone des Rückenmarks sind zentraler Bestandteil unseres motorischen Systems. Ihre Degeneration kann eine Vielzahl von Ursachen haben. Sie gehen unter nach direkter Schädigung des Rückenmarks durch neurodegenerative Erkrankungen wie spinale Muskelatrophie, amyotrophe Lateralsklerose oder Poliomyelitis, aber auch nach ausbleibender Regeneration verletzter peripherer Nerven. Die Funktionsstörung von spinalen Motoneuronen führt dann zum Verlust der Willkürmotorik. Eine Regeneration ist kaum möglich. Da die Schädigungen aber meist über einen längeren Zeitraum entstehen, können entsprechende Therapien durchaus verzögernd, in einigen Fällen sogar verhindernd wirken. Um solche Therapien zu etablieren, müssen die Regenerations-/Degenerationsprozesse aber erst einmal vollständig verstanden werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Rolle des mitochondrialen Signatur-Phospholipids Cardiolipin (CL) bei der Neurodifferenzierung zu untersuchen. Als Studienmodell diente die Motoneuron-ähnliche Zelllinie NSC34 - eine Hybridzelllinie aus Motoneuron-angereicherten primären Rückenmarkszellen und Neuroblastomzellen. Als Differenzierungs-marker wurden verschiedene Parameter des Neuritenwachstums und der Rezeptorbesatz herangezogen. Weiterhin wurden Aussagen zum Gehalt freier zellulärer Fettsäuren und zur Mitochondrienverteilung generiert.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (i) Die Differenzierung von NSC34-Zellen findet per se statt und wird durch den Einsatz eines Differenzierungsmediums.
- (ii) Diese Differenzierung ist durch eine Reduktion der Proliferation bei gleichbleibend guter Vitalität gekennzeichnet.
- (iii) Mit fortschreitender Differenzierung war eine verstärkte Abwanderung der Mitochondrien in die Filopodia zu verzeichnen.
- (iv) Der Gehalt der meisten CL-Spezies nahm ab; dabei gab es jedoch 2 Ausnahmen: $(C18:1)_2/(C16:0)_2$ -CL und $(C18:1)_3/C16:0$ -CL.
- (v) Eine lineare Regressionsanalyse zeigte eine positive Korrelation von Zelldifferenzierung (Neuritenwachstum) und dem molekularen Gehalten von $(C18:1)_2/(C16:0)_2$ -CL und $(C18:1)_3/C16:0$ -CL.
- (vi) Die Differenzierung der NSC34-Zellen ging einher mit einer stärkeren Expression von NGF p75-Rezeptoren. Im Gegensatz dazu nahm die Expression der nAChR α im Laufe des Differenzierungsprozesses ab.
- (vii) Der IGF I α -Rezeptor wurde zumindest unter unseren Kulturbedingungen von NSC34-Zellen nicht exprimiert.

- (viii) Der PPAR α wurde grundsätzlich exprimiert, im Laufe der Zelldifferenzierung aber verstärkt aus dem Zytoplasma in den Zellkern transloziert, wo er als Transkriptionsfaktor fungiert.
- (ix) Die Anreicherung der Kulturmedien mit Ölsäure (C18:1) und/oder Palmitinsäure (C16:0) beförderte die neuronale Differenzierung der NSC34-Zellen ohne die Proliferation, die Vitalität und den Cardiolipin-Haushalt wesentlich zu verändern.
- (x) Die Fettsäureintervention stabilisierte die Expression des nAChR α , reduzierte die Expression des NGF p75-Rezeptors weiter und war in Bezug auf den IGF I α – Rezeptor ohne Effekt.
- (xi) Die Expression des PPAR α wurde durch die Fettsäure nicht beeinflusst, allerdings wurde die Translokation des Rezeptors in den Zellkern befördert.

Die Ergebnisse zeigen, dass das CL-System eine wichtige Rolle bei der motoneuronalen Differenzierung spielt. Diese Rolle leitet sich ab aus der Tatsache, dass die neuronale Differenzierung ein ATP- und damit Mitochondrien-abhängiger Prozess ist. Für das regelgerechte Funktionieren der Mitochondrien sind die CL aber unabdingbar. Sie verankern zytosolische Precursor-Proteine für den Import in die Mitochondrien an deren Membran und beeinflussen die Anordnung und die Stabilität mehrerer integraler Membranproteine. Außerdem sind sie essenziell für die Mitochondriendynamik, die wiederum eine Voraussetzung für die Neuritogenese darstellt.

Somit könnten die CL ein potenzielles Target für neuartige Therapieansätze bei der Behandlung von motoneuronalen Ausfällen nach direkter Schädigung des Rückenmarks und/oder seiner peripheren Nerven sein. Und auch den Fettsäuren und damit einer gesunden Ernährung sollte bei der weiteren labor-experimentellen Suche nach alternativen Therapieansätzen zukünftig durchaus mehr Aufmerksamkeit entgegengebracht werden. Sicherlich wird es keine „Neuroregenerations-fördernde“ Diät geben, aber als hilfreiche Begleitung können bestimmte Fettsäuren durchaus in der Lage sein, die Synthese und Komposition des CLs und damit auch der neuronalen Differenzierungs-/Regenerationsprozesse positiv zu beeinflussen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Aleshin, S.; Reiser, G. (2013): Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)-alpha, beta/delta and gamma triad in regulation of reactive oxygen species signaling in brain. In: *Biol Chem* 394 (12), S. 1553–1570.
- [2] Anthonymuthu, T. S.; Kenny, E. M.; Bayır, H. (2016): Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. In: *Brain Res* 1640 (Pt A), S. 57–76.
- [3] Avila-Martin, G.; Galan-Arriero, I.; Gomez-Soriano, J.; Taylor, J. (2011): Treatment of rat spinal cord injury with the neurotrophic factor albumin-oleic acid: translational application for paralysis, spasticity and pain. In: *PLoS One* 6 (10), e26107.
- [4] Baier, C. J.; Franco, D. L.; Gallegos, C. E.; Mongiat, L. A.; Dionisio, L.; Bouzat, C.; Caviedes P.; Barrantes, F. J. (2014): Corticosterone affects the differentiation of a neuronal cerebral cortex-derived cell line through modulation of the nicotinic acetylcholine receptor. In: *Neuroscience* 274, S. 369–382.
- [5] Benkler, C.; Ben-Zur, T.; Barhum, Y.; Offen, D. (2013): Altered astrocytic response to activation in SOD1(G93A) mice and its implications on amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. In: *Glia* 61 (3), S. 312–326.
- [6] Bento-Abreu, A.; Taberner, A.; Medina, J. M. (2007): Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha is required for the neurotrophic effect of oleic acid in neurons. In: *J Neurochem* 103 (3), S. 871–881.
- [7] Boyd, V.; Cholewa, O. M.; Papas, K. K. (2008): Limitations in the Use of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) and Cell Permeable Nucleic Acid Stains for Viability Measurements of Isolated Islets of Langerhans. In: *Curr Trends Biotechnol Pharm* 2 (2), S. 66–84.
- [8] Breeuwer, P.; Drocourt, J. L.; Bunschoten, N.; Zwietering, M. H.; Rombouts, F. M.; Abee, T. (1995): Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. In: *Appl Environ Microbiol.* 61 (4), S. 1614–1619.
- [9] Cashman, N. R.; Durham, H. D.; Blusztajn, J. K.; Oda, K.; Tabira, T.; Shaw, I. T.; Dahroug, S.; Antel, J. P. (1992): Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. In: *Dev Dyn* 194 (3), S. 209–221.
- [10] Cattin, A. L.; Lloyd, A. C. (2016): The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. In: *Curr Opin Neurobiol* 39, S. 38–46.
- [11] Cheng, H.; Mancuso, D. J.; Jiang, X.; Guan, S.; Yang, J.; Yang, K.; Sun, G.; Gross, R. W.; Han, X. (2008): Shotgun lipidomics reveals the temporally dependent, highly diversified cardiolipin profile in the mammalian brain: temporally coordinated postnatal diversification of cardiolipin molecular species with neuronal remodeling. In: *Biochemistry* 47 (21), S. 5869–5880.

- [11] Cho, G. W.; Kim, G. Y.; Baek, S.; Kim, H.; Kim, T.; Kim, H. J.; Kim, S. H. (2011): Recombinant human erythropoietin reduces aggregation of mutant Cu/Zn-binding superoxide dismutase (SOD1) in NSC-34 cells. In: *Neurosci Lett* 504 (2), S. 107–111.
- [12] Cimini, A.; Ceru, M. P. (2008): Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the regulation of neural stem cells proliferation and differentiation. In: *Stem Cell Rev* 4 (4), S. 293–303.
- [13] Cortie, C. H.; Else, P. L. (2012): Dietary docosahexaenoic Acid (22:6) incorporates into cardiolipin at the expense of linoleic Acid (18:2): analysis and potential implications. In: *Int J Mol Sci.* 13 (11), S. 15447–15463.
- [14] Darzynkiewicz, Z.; Juan, G.; Li, X.; Gorczyca, W.; Murakami, T.; Traganos, F. (1997): Cytometry in cell necrobiology. Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). In: *Cytometry* 27, 1–20.
- [15] Darzynkiewicz, Z, Li, X; Gong, J. (1994): Assays of cell viability: Discrimination of cells dying by apoptosis. In: *Methods Cell Biol* 41, S. 15–38.
- [16] de Souza, R. J. de; Mente, A.; Maroleanu, A.; Cozma, A. I.; Ha, V.; Kishibe, T.; Uleryk, E.; Budyłowski, P.; Schönemann, H.; Beyene, J.; Anand, S. S. (2015): Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. In: *BMJ* 351, h3978.
- [17] Dell'Anno, M. T.; Strittmatter, S. M. (2017): Rewiring the spinal cord: Direct and indirect strategies. In: *Neurosci Lett* 652, S. 25–34.
- [18] Di Giacomo, E.; Benedetti, E.; Cristiano, L.; Antonosante, A.; d'Angelo, M.; Fidoamore, A.; Barone, D.; Moreno, S.; Ippoliti, R.; Cerù, M. P.; Giordano, A.; Cimini, A. (2017): Roles of PPAR transcription factors in the energetic metabolic switch occurring during adult neurogenesis. In: *Cell Cycle* 16 (1), S. 59–72.
- [19] Dolga, A. M.; Terpolilli, N.; Kepura, F.; Nijholt, I. M.; Knaus, H. G.; D'Orsi, B.; Prehn, J. H.; Eisel, U. L.; Plant, T.; Plesnila, N.; Culmsee, C. (2011): KCa2 channels activation prevents [Ca²⁺]_i deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia. In: *Cell Death Dis* 2, e147.
- [20] Durham, H. D.; Dahrouge, S.; Cashman, N. R. (1993): Evaluation of the spinal cord neuron X neuroblastoma hybrid cell line NSC-34 as a model for neurotoxicity testing. In: *Neurotoxicology* 14 (4), S. 387–395.
- [21] Dyllal, S. C. (2015): Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. In: *Front Aging Neurosci* 7, S. 52.
- [22] Eccles, J. C. (1981): Physiology of motor control in man. In: *Applied Neurophysiology* 44 (1-3), S. 5–15.
- [23] Eckert, M. J.; Martin, M. J. (2017): Trauma: Spinal Cord Injury. In: *Surg Clin North Am* 97 (5), S. 1031–1045.

- [24] Eggett, C. J.; Crosier, S.; Manning, P.; Cookson; Menzies, F. M.; McNeil, C. J.; Shaw, P. J. (2000): Development and characterisation of a glutamate-sensitive motor neurone cell line. In: *J Neurochem* 74 (5), S. 1895–1902.
- [25] Faroni, A.; Mobasser, S. A.; Kingham, P. J.; Reid, A. J. (2015): Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. In: *Adv Drug Deliv Rev* 82-83, S. 160–167.
- [26] Fukata, Y.; Fukata, M. (2010): Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. In: *Nat Rev Neurosci* 11 (3), S. 161–175.
- [27] Gauthier-Kemper, A.; Igaev, M.; Sundermann, F.; Janning, D.; Bruhmann, J.; Moschner, K.; Reyher, H. J.; Junge, W.; Glebov, K.; Walter, J.; Bakota, L.; Brandt, R. (2014): Interplay between phosphorylation and palmitoylation mediates plasma membrane targeting and sorting of GAP43. In: *Mol Biol Cell* 25 (21), S. 3284–3299.
- [28] Guan, X.; Fierke, C. A. (2011): Understanding protein palmitoylation: biological significance and enzymology. In: *Sci China Chem* 54 (12), S. 1888–1897.
- [29] Guilbault, G. G.; Kramer, D. N. (1963): A Substrate for the Fluorometric Determination of Lipase Activity. In: *Anal. Chem.*, S. 588–589.
- [30] Ha, E. E.; Frohman, M. A. (2014): Regulation of mitochondrial morphology by lipids. In: *BioFactors* 40 (4), S. 419–424.
- [31] Harris, L.; Zalucki, O.; Piper, M. (2018): BrdU/EdU dual labeling to determine the cell-cycle dynamics of defined cellular subpopulations. In: *J Mol Histol* 49 (3), S. 229–234.
- [32] Henneman, E.; Clamann, H. P.; Gillies, J. D.; Skinner, R. D. (1974): Rank order of motoneurons within a pool: law of combination. In: *Journal of Neurophysiology* 37 (6), S. 1338–1349.
- [33] Holland, S. M.; Thomas, G. M. (2017): Roles of palmitoylation in axon growth, degeneration and regeneration. In: *J Neurosci Res* 95 (8), S. 1528–1539.
- [34] Houtkooper, R. H.; Rodenburg, R. J.; Thiels, C.; van Lenthe, H.; Stet, F.; Poll-The, B. T.; Stone, J. E.; Steward, C. G.; Wanders, R. J.; Smeitink, J.; Kulik, W.; Vaz, F. M. (2009): Cardiolipin and monolysocardiolipin analysis in fibroblasts, lymphocytes, and tissues using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a diagnostic test for Barth syndrome. In: *Anal Biochem* 387 (2), 230-7.
- [35] Hu, S. Q.; Cui, W.; Mak, S. H.; Choi, C. L.; Hu, Y. J.; Li, G.; Tsim, K. W.; Pang, Y. P.; Han, Y. F. (2015): Robust Neuritogenesis-Promoting Activity by Bis(heptyl)-Cognitin Through the Activation of alpha7-Nicotinic Acetylcholine Receptor/ERK Pathway. In: *CNS Neurosci Ther* 21 (6), S. 520–529.
- [36] Ikon, N.; Ryan, R. O. (2017): Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. In: *BBA* 1859 (6), S. 1156–1163.
- [37] Iwanaga, T.; Tsutsumi, R.; Noritake, J.; Fukata, Y.; Fukata, M. (2009): Dynamic protein palmitoylation in cellular signaling. In: *Prog Lipid Res* 48 (34), S. 117–127.

- [38] Ji, J.; Kline, A. E.; Amoscato, A.; Samhan-Arias, A. K.; Sparvero, L. J.; Tyurin, V. A.; Tyurina, Y. Y.; Fink, B.; Manole, M. D.; Am Puccio; Okonkwo, D. O.; Cheng, J. P.; Alexander, H.; Clark, R. S.; Kochanek, P. M.; Wipf, P.; Kagan, V. E.; Bayır, H. (2012): Lipidomics identifies cardiolipin oxidation as a mitochondrial target for redox therapy of brain injury. In: *Nat Neurosci* 15 (10), S. 1407–1413.
- [39] Jiajia, L.; Shinghung, M.; Jiacheng, Z.; Jialing, W.; Dilin, X.; Shengquan, H.; Zajun, Z.; Qinwen, W.; Yifan, H.; Wei, C. (2017): Assessment of Neuronal Viability Using Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide Double Staining in Cerebellar Granule Neuron Culture. In: *J Vis Exp* (123), e55442.
- [40] Jones, K. H.; Senft, J. A. (1985): An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. In: *J Histochem Cytochem* 33 (1), S. 77–79.
- [41] Joshi, D. C.; Singh, M.; Krishnamurthy, K.; Joshi, P. G.; Joshi, N. B. (2011): AMPA induced Ca²⁺ influx in motor neurons occurs through voltage gated Ca²⁺ channel and Ca²⁺ permeable AMPA receptor. In: *Neurochem Int* 59 (6), S. 913–921.
- [42] Jung, S. Y.; Lee, K. W.; Choi, S. M.; Yang, E. J. (2015): Bee Venom Protects against Rotenone-Induced Cell Death in NSC34 Motor Neuron Cells. In: *Toxins (Basel)* 7 (9), S. 3715–3726.
- [43] Kaiser, M.; Maletzki, I.; Hülsmann, S.; Holtmann, B.; Schulz-Schaeffer, W.; Kirchhoff, F.; Bähr, M.; Neusch, C. (2006): Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. In: *J Neurochem* 99 (3), S. 900–912.
- [44] Kaplan, D. R.; Miller F. D. (2003): Axon growth inhibition: signals from the p75 neurotrophin receptor. In: *Nat Neurosci* 6, S. 435–436.
- [45] Keilhoff, G.; Becker, A.; Grecksch, G.; Bernstein, H. G.; Wolf, G. (2006): Cell proliferation is influenced by bulbectomy and normalized by imipramine treatment in a region-specific manner. In: *Neuropsychopharmacology* 31 (6), S. 1165–1176.
- [46] Keilhoff, G.; Becker, A.; Kropf, S.; Schild, L. (2016): Sciatic nerve ligation causes impairment of mitochondria associated with changes in distribution, respiration, and cardiolipin composition in related spinal cord neurons in rats. In: *Mol Cell Biochem* 421 (1-2), S. 41–54.
- [47] Keilhoff, G.; Bernstein, H. G.; Becker, A.; Grecksch, G.; Wolf, G. (2004): Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. In: *Biol Psychiatry* 56 (5), S. 317–322.
- [48] Keilhoff, G.; John, R.; Langnaese, K.; Schweizer, H.; Ebmeyer, U. (2010): Triggered by asphyxia neurogenesis seems not to be an endogenous repair mechanism, gliogenesis more like it. In: *Neuroscience* 171 (3), S. 869–884.
- [49] Keilhoff, G.; Lucas, B.; Pinkernelle, J.; Steiner, M.; Fansa, H. (2014): Effects of cerebrolysin on motor-neuron-like NSC-34 cells. In: *Exp Cell Res* 327 (2), S. 234–255.

- [50] Keilhoff, G.; Wolf, G. (1993): Comparison of double fluorescence staining and LDH-test for monitoring cell viability in vitro. In: *Neuroreport*. 5 (2), S. 129–132.
- [52] Khairallah, R. J.; Kim, J.; O'Shea, K. M.; O'Connell, K. A.; Brown, B. H.; Galvao, T.; Daneault, C.; Des Rosiers, C.; Polster, B. M.; Hoppel, C. L.; Stanley, W. C. (2012): Improved mitochondrial function with diet-induced increase in either docosahexaenoic acid or arachidonic acid in membrane phospholipids. In: *PLoS One* 7 (3), e34402.
- [53] Kiebish, M. A.; Bell, R.; Yang, K.; Phan, T.; Zhao, Z.; Ames, W.; Seyfried, T. N.; Gross, R. W.; Chuang, J. H.; Han, X. (2010): Dynamic simulation of cardiolipin remodeling: greasing the wheels for an interpretative approach to lipidomics. In: *J Lipid Res* 51 (8), S. 2153–2170.
- [54] Kiernan, M. C.; Vucic, S.; Cheah, B. C.; Turner; Eisen, A.; Hardiman, O.; Burrell, J. R.; Zoing, M. C. (2011): Amyotrophic lateral sclerosis. In: *Lancet* 377 (9769), S. 942–955.
- [55] Kimura, T.; Jennings, W.; Epand, R. M. (2016): Roles of specific lipid species in the cell and their molecular mechanism. In: *Prog Lipid Res* 62, S. 75–92.
- [56] Knobloch M, Braun SM, Zurkirchen L, von Schoultz C, Zamboni N, Arauzo-Bravo MJ, Kovacs WJ, Karalay O, Suter U, Machado RA, Roccio M, Lutolf MP, Semenkovich CF; Jessberger, S. (2013): Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. In: *Nature* 493 (7431), S. 226–230.
- [57] Krivickas LS (2003): Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases. In: *Phys Med Rehabil Clin N Am* 14 (2), S. 327–345.
- [58] Kruman, I. I.; Pedersen, W. A.; Springer, J. E.; Mattson, M. P. (1999): ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. In: *Exp Neurol* 160 (1), S. 28–39.
- [59] Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. (2018): Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. In: *Cold Spring Harb Protoc* 2018 (6).
- [60] Latt, S. A. (1973): Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (12), S. 3395–3399.
- [61] Leenhouts, J. M.; Török, Z.; Chupin, V.; Kruijff, B. de (1995): A molecular model for the specific cardiolipin-presequence interactions. In: *Biochemical Society transactions* 23 (4), S. 968–971.
- [62] Li, N.; Zhang, X.; Song, Q.; Su, R.; Zhang, Q.; Kong, T.; Liu, L.; Jin, G.; Tang, M.; Cheng, G. (2011): The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates. In: *Biomaterials* 32 (35), S. 9374–9382.

- [63] López-Amorós, R.; Comas, J.; Vives-Regó, J. (1995): Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. In: *Appl Environ Microbiol.* 61 (7), S. 2521–2526.
- [64] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J Biol Chem* 193 (1), S. 265–275.
- [65] Lucas, B.; Pinkernelle, J.; Fansa, H.; Keilhoff, G. (2014): Effects of cerebrolysin on rat Schwann cells in vitro. In: *Acta Histochem* 116 (5), S. 820–830.
- [66] Maguire, J. J.; Tyurina, Y. Y.; Mohammadyani, D.; Kapralov, A. A.; Anthony-muthu, T. S.; Qu, F.; Amoscato, A. A.; Sparvero, L. J.; Tyurin, V. A.; Planas-Iglesias, J.; He, R. R.; Klein-Seetharaman, J.; Bayır, H.; Kagan, V. E. (2017): Known unknowns of cardiolipin signaling: The best is yet to come. In: *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862 (1), S. 8–24.
- [67] Maier, O.; Böhm, J.; Dahm, M.; Brück, S.; Beyer, C.; Johann, S. (2013): Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. In: *Neurochem Int* 62 (8), S. 1029–1038.
- [68] Mancuso, D. J.; Kotzbauer, P.; Wozniak, D. F.; Sims, H. F.; Jenkins, C. M.; Guan, S.; Han, X.; Yang, K.; Sun, G.; Malik, I.; Conyers, S.; Green, K. G.; Schmidt, R. E.; Gross, R. W. (2009): Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2 γ leads to alterations in hippocampal cardiolipin content and molecular species distribution, mitochondrial degeneration, autophagy, and cognitive dysfunction. In: *J Biol Chem* 284 (51), S. 35632–35644.
- [69] Martens, J. C.; Keilhoff, G.; Halangk, W.; Wartmann, T.; Gardemann, A.; Päge, I.; Schild, L. (2015): Lipidomic analysis of molecular cardiolipin species in livers exposed to ischemia/reperfusion. In: *Mol Cell Biochem* 400 (1-2), S. 253–263.
- [70] Martensson, C. U.; Doan, K. N.; Becker, T. (2017): Effects of lipids on mitochondrial functions. In: *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862, S. 102–113.
- [71] Martyn, C. N.; Barker, D. J.; Osmond, C. (1988): Motoneuron disease and past poliomyelitis. In: *Lancet* 2 (8626-8627), S. 1485.
- [72] Matatall, K. A.; Kadmon, C. S.; King, K. Y. (2018): Detecting Hematopoietic Stem Cell Proliferation Using BrdU Incorporation. In: *Methods Mol Biol* 1686, S. 91–103.
- [73] Matusica, D.; Fenech, M. P.; Rogers, M. L.; Rush, R. A. (2008): Characterization and use of the NSC-34 cell line for study of neurotrophin receptor trafficking. In: *J Neurosci Res* 86 (3), S. 553–565.
- [74] Meldolesi, J. (2011): Neurite outgrowth: this process, first discovered by Santiago Ramon y Cajal, is sustained by the exocytosis of two distinct types of vesicles. In: *Brain Res Rev* 66 (1-2), S. 246–255.

- [75] Metcalf, R. G.; James, M. J.; Gibson, R. A.; Edwards, [JR]; Stubberfield, J.; Stuklis, R.; Roberts-Thomson, K.; Young, G. D.; Cleland, L. G. (2007): Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans. In: *Am J Clin Nutr* 85 (5), S. 1222–1228.
- [76] Michael-Titus, A. T.; Priestley, J. V. (2014): Omega-3 fatty acids and traumatic neurological injury: from neuroprotection to neuroplasticity? In: *Trends Neurosci* 37 (1), S. 30–38.
- [77] Mileykovskaya, E.; Dowhan, W. (2014): Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. In: *Chem Phys Lipids* 179, S. 42–48.
- [78] Mogenson, G. J.; Huang, Y. H. (1973): The neurobiology of motivated behaviour. In: *Progress in Neurobiology* 1 (1), S. 55–83.
- [79] Mogenson, G. J.; Jones, D. L.; Yim, C. Y. (1980): From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. In: *Progress in Neurobiology* 14 (2-3), S. 69–97.
- [80] Morin, F.; Green, J. D. (1953): Diffuse after-discharges following stimulation of the fimbria hippocampi. In: *American Journal of Physiology* 175 (2), S. 251–257.
- [81] Motobu, M.; El-Abasy, M.; Na, K. J.; Hirota, Y. (2002): Detection of mitogen-induced lymphocyte proliferation by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in the chicken. In: *J Vet Med Sci* 64 (4), S. 377–379.
- [82] Musatov, A.; Sedlák, E. (2017): Role of cardiolipin in stability of integral membrane proteins. In: *Biochimie* 142, S. 102–111.
- [83] Nango, H.; Kosuge, Y.; Miyagishi, H. (2017): Prostaglandin E2 facilitates neurite outgrowth in a motor neuron-like cell line, NSC-34. In: *J Pharmacol Sci* 135 (2), S. 64–71.
- [84] Nash, L. A.; Burns, J. K.; Chardon, J. W.; Kothary, R.; Parks, R. J. (2016): Spinal Muscular Atrophy: More than a Disease of Motor Neurons? In: *Current Molecular Medicine* 16 (9), S. 779–792.
- [85] Nery, A. A.; Resende, R. R.; Martins, A. H.; Trujillo, C. A.; Eterovic, V. A.; Ulrich, H. (2010): Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor expression and activity during neuronal differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. In: *J Mol Neurosci* 41 (3), S. 329–339.
- [86] Nourooz-Zadeh, J, Nourooz-Zadeh, J.; Liu, E. H.; Yhlen, B.; Anggard, E. E.; Halliwell, B. (1999): F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *72(2):734–740*. In: *Journal of neurochemistry* 72 (2), S. 734–740.
- [87] Paoletti, L.; Elena, C.; Domizi, P.; Banchio, C. (2011): Role of phosphatidylcholine during neuronal differentiation. In: *IUBMB Life* 63 (9), S. 714–720.
- [88] Paradies, G.; Paradies, V.; Benedictis, V. de; Ruggiero, F. M.; Petrosillo, G. (2014a): Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. In: *Biochim Biophys Acta* 1837 (4), S. 408–417.

- [89] Paradies, G.; Paradies V; Ruggiero, F. M.; Petrosillo, G. (2014b): Cardiolipin and mitochondrial function in health and disease. In: *Antioxid Redox Signal* 20 (12), S. 1925–1953.
- [90] Pfenninger, K. H. (2009): Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. In: *Nat Rev Neurosci* 10 (4), S. 251–261.
- [91] Pointer, C. B.; Klegeris, A. (2017): Cardiolipin in central nervous system physiology and pathology. In: *Cell Mol Neurobiol* 37 (7), S. 1161–1172.
- [92] Polo-Hernandez, E.; Tello, V.; Arroyo, A. A.; Dominguez-Prieto, M.; Castro, F. de; Tabernero, A.; Medina, J. M. (2014): Oleic acid synthesized by stearoyl-CoA desaturase (SCD-1) in the lateral periventricular zone of the developing rat brain mediates neuronal growth, migration and the arrangement of prospective synapses. In: *Brain Res* 1570, S. 13–25.
- [93] Rembach, A.; Turner, B. J.; Bruce, S.; Cheah, I. K.; Scott, R. L.; Lopes, E. C.; Zagami, C. J.; Beart, P. M.; Cheung, N. S.; Langford, S. J.; Cheema, S. S. (2004): Antisense peptide nucleic acid targeting GluR3 delays disease onset and progression in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. In: *J Neurosci Res* 77 (4), S. 573–582.
- [94] Ross, D. D.; Joneckis, C. C.; Ordóñez, J. V.; Am Sisk; Wu, R. K.; Hamburger, A. W.; Nora, R. E. (1989): Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. In: *Cancer Res* 49 (14), S. 3776–3782.
- [95] Ruthel, G.; Hollenbeck, P. J. (2003): Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth. In: *J Neurosci*. 23 (24), S. 8618–8624.
- [96] Sacks, F. M.; Lichtenstein, A. H.; Wu, J. H.Y.; Appel, L. J.; Creager, M. A.; Kris-Etherton, P. M.; Miller, M.; Rimm, E. B.; Rudel, L. L.; Robinson, J. G.; Stone, N. J.; van Horn, L. V.; American Heart Association (2017): Dietary Fats and Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association. In: *Circulation* 136 (3), e1-e23.
- [97] Safiulina, D.; Kaasik, A. (2013): Energetic and dynamic: how mitochondria meet neuronal energy demands. In: *PLoS biology* 11 (12), e1001755.
- [98] Salomoni, P.; Calegari, F. (2010): Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. In: *Trends Cell Biol* 20 (5), S. 233–243.
- [99] Sastry, P. S. (1985): Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. In: *Prog Lipid Res* 24 (2), S. 69–176.
- [100] Schlame, M.; Rua, D.; Greenberg, M. L. (2000): The biosynthesis and functional role of cardiolipin. In: *Prog Lipid Res* 39 (3), S. 257–288.
- [101] Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Ramirez, S.; Brückner, A; Kay, L.; Polge, C.; Epand, R. F.; Lee, R. M.; Lacombe, M. L.; Epand, R. M. (2009): Mitochondrial kinases and their molecular interaction with cardiolipin. In: *Biochim Biophys Acta* 1788 (10), S. 2032–2047.

- [102] Sendtner, M. (2014): Motoneuron disease. In: Handbook of Experimental Pharmacology 220, S. 411–441.
- [103] Sheng, Z. H.; Cai, Q. (2012): Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. In: Nat Rev Neurosci. 13 (2), S. 77–93.
- [104] Siri-Tarino, P. W.; Sun, Q.; Hu, F. B.; Krauss, R. M. (2010): Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients. In: Curr Atheroscler Rep 12 (6), S. 384–390.
- [105] Skene, J. H.; Virag, I. (1989): Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. In: J Cell Biol 108 (2), S. 613–624.
- [106] Smith, G. M.; Gallo, G. (2018): The role of mitochondria in axon development and regeneration. In: Dev Neurobiol 78 (3), S. 221–237.
- [107] Standaert-Vitse, A.; Aliouat-Denis, C. M.; Martinez, A.; Khalife, S.; Pottier, M.; Gantois, N.; Dei-Cas, E.; Aliouat el, M. (2015): SYTO-13, a Viability Marker as a New Tool to Monitor In Vitro Pharmacodynamic Parameters of Anti-Pneumocystis Drugs. In: PLoS One 10 (6), e0130358.
- [108] Stockwell, M. P.; Clulow, J.; Mahony, M. J. (2010): Efficacy of SYBR 14/propidium iodide viability stain for the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. In: Dis Aquat Organ 88 (2), S. 177–181.
- [109] Tabernero, A.; Lavado, E. M.; Granda, B.; Velasco, A.; Medina, J. M. (2001): Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. In: J Neurochem 79 (3), S. 606–616.
- [110] Tai, E. K., Wang, X. B., & Chen, Z. Y. (2013): An update on adding docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) to baby formula. Food & function. (2013). 4(12), 4 (12), S. 1767–1775.
- [111] Tortosa, E.; Adolfs, Y.; Fukata, M.; Pasterkamp, R. J.; Kapitein, L. C.; Hoogenraad, C. C. (2017): Dynamic Palmitoylation Targets MAP6 to the Axon to Promote Microtubule Stabilization during Neuronal Polarization. In: Neuron 94 (4), 809-825.e7.
- [112] Towe, A. L. (1973): Somatosensory Cortex: Descending Influences on Ascending Systems. In: Somatosensory System, Springer, S. 701–718.
- [113] Van Den Bosch, L.; Vandenberghe, W.; Klaassen, H.; van Houtte, E.; Robberecht, W. (2000): Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. In: J Neurol Sci 180 (1-2), S. 29–34.
- [114] Vaz, F. M.; Houtkooper, R. H.; Valianpour, F.; Barth, P. G.; Wanders, R. J. (2003): Only One Splice Variant of the Human TAZ Gene Encodes a Functional Protein with a Role in Cardiolipin Metabolism. In: Journal of Biological Chemistry 278 (44), S. 43089–43094.
- [115] Witiw, C. D.; Fehlings, M. G. (2015): Acute Spinal Cord Injury. In: J Spinal Disord Tech 28 (6), S. 202–210.

- [116] Yamashita, T.; Tohyama, M.: The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. In: *Nat Neurosci* 6, S. 461–467.
- [117] Zampolla, T.; Zhang, T.; Rawson, D. M. (2008): Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicle viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide. In: *Cryo Letters* 29 (6), S. 463–475.
- [118] Zhang, M.; Gu, L.; Zheng, P.; Chen, Z.; Dou, X.; Qin, Q.; Cai, X. (2020): Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. In: *J Clin Lab Anal* 34 (1), e23024.
- [119] Zhou, B.; Lin, M. Y.; Sun, T.; Knight, A. L.; Sheng, Z. H. (2014): Characterization of mitochondrial transport in neurons. In: *Methods Enzymol.* 547, S. 75–96.
- [120] Zhou, B.; Yu, P.; Lin, M. Y.; Sun, T.; Chen, Y.; Sheng, Z. H. (2016): Facilitation of axon regeneration by enhancing mitochondrial transport and rescuing energy deficits. In: *J Cell Biol* 214 (1), S. 103–119.
- [121] Zolezzi, J. M.; Santos, M. J.; Bastias-Candia, S.; Pinto, C.; Godoy, J. A.; Inestrosa, N. C. (2017): PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation. In: *Biol Rev Camb Philos Soc* 92 (4), S. 2046–2069.

8. Danksagung

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

Zunächst gilt mein Dank meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. rer. nat. Gerburg Keilhoff, für die Überlassung dieses äußerst spannenden Themas sowie für ihre ausgezeichnete Betreuung. Sie führte mich mit viel Engagement in die zellbiologischen Methoden und mikroskopischen Untersuchungen ein, sie gewährte mir stets sachkundige Unterstützung. Ihre Ratschläge, wertvollen Anregungen und die gemeinsamen konstruktiven Gespräche habe ich sehr geschätzt. Sie begleitete mich von Anfang an auf meinem Weg zur Dissertation.

Ein ganz persönlicher Dank gilt Frau Leona Bück, die mit ihrer vielfältigen und kompetenten labortechnischen Unterstützung bei der immunhistochemischen Aufarbeitung der Zellkulturen stets zu Seite stand. Geduldig und präzise brachte sie mir die Zellkulturtechniken sowie die Durchführung der Zellexperimente bei. Sie hatte für mich stets ein offenes Ohr und war immer bereit, mir bei Schwierigkeiten zu helfen. Vielen Dank für Dein großes Verständnis.

Auch Prof. Dr. rer. nat. Lorenz Schild (Institut für Pathobiochemie) bin ich zu großem Dank verpflichtet: Er unterstützte mich labortechnisch bei den Experimenten zur Cardiolipin- und Fettsäure-Bestimmung.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dieter Fischer für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten in den Laborräumen des Instituts für Biochemie und Zellbiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

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

Abschließend möchte ich meinem Vater und meiner Schwester, André und Peggy Mbou für ihr fortwährendes Interesse an meiner Arbeit, ihre grenzenlose Geduld, Unterstützung und Ermutigung herzlich danken.

9. Erklärung

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

**„Zur Bedeutung von Cardiolipin bei der Differenzierung von Motoneuronen
des Rückenmarks in vitro“**

im Institut für Biochemie und Zellbiologie

mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Gerburg Keilhoff und Frau Leona Bück

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.

Ricardo Pirex Takamgoum Mbou

Magdeburg, den 06.04.2020

10. Bildungsweg

Ricardo Pirex, Takamgoum Mbou
 kamerunisch
 Geboren am 05.02.1992 in Douala-Kamerun

Beruflicher Werdegang

10/2019 – heute: Assistenzarzt, Klinik für Frauenheilkunde, KRH Klinikum Siloah Hannover

Akademischer Werdegang

07.08.2019: Approbation als Arzt
 22.05.2019: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - M3 (Note:2)
 12.04.2018: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - M2 (Note:3)
 15.09.2014: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - M1 (Note: 3,5)
 10/2011 – 05/2019: Medizinstudium, Otto von Guericke Universität Magdeburg
 02/2010 – 05/2011: Intensiv-Deutschkurs (Note: DSH-3)
 10/2009 – 03/2010: Medizinstudium, Université des Montagnes, Baganté, Kamerun
 09/1996 – 06/2009: Schulbildung, Douala, Kamerun
 Abschluss: Baccalauréat D (Biologie, Mathematik)

Praktika

05/2018 – 04/2019: Praktisches Jahr: Medizinische Hochschule Hannover
 - Frauenklinik
 - Klinik für Pneumologie
 - Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen
 - Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
 - Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie
 03/2017: Famulatur Frauenheilkunde, Krankenhaus St. Marienstift, Magdeburg
 03/2017: Famulatur Hausarztpraxis Dr. Ziethen, Magdeburg
 08/2016: Famulatur Hausarztpraxis Dr. Ziethen, Magdeburg
 08/2016: Famulatur Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Medizinische Hochschule Hannover
 08/2015: Famulatur Kinderheilkunde, Pleißenental-Klinik, Werdau
 03/2015: Famulatur Kinderheilkunde, Hôpital Laquintinie, Kamerun
 03/2013: Krankenpflegepraktikum Pneumologie, Universitätsklinikum Magdeburg
 06/2011 – 07/2011: Krankenpflegepraktikum Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Medizinische Hochschule Hannover

Ricardo Pirex Takamgoum Mbou
 Magdeburg, den 06.04.2020

11. Anhang

11.1 Chemikalien und Antikörper

Tab. 11.1-1 Verwendete Chemikalien, Materialien und fertige Lösungen

Material	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Boron Trifluorid-Methanol	Merck, Darmstadt Deutschland
Bromodesoxyuridin (1000x)	Boehringer, Ingelheim Deutschland
Butylhydroxytoluen	Sigma Aldrich, München Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt Deutschland
Ciprobay	Bayer AG, Leverkusen Deutschland
D-Glucose	Merck, Darmstadt Deutschland
DMEM / F12	Gibco® Invitrogen, Darmstadt Deutschland
DMEM High Glucose	Gibco® Invitrogen, Darmstadt Deutschland
DMEM No-Glucose Pyruvat-frei	Gibco® Invitrogen, Darmstadt Deutschland
EGTA (Ethylenglycoltetraacetat)	Merck, Darmstadt Deutschland
Ethanol 96 %	Otto Fischar GmbH und Co. KG, Saarbrücken Deutschland
Ethylacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe Deutschland
HEPES	Boehringer, Ingelheim Deutschland
Heptadecansäure	Sigma Aldrich, München Deutschland
Immu-Mount	Thermo Scientific, Wilmington USA
MEM-NEAA	Gibco® Invitrogen, Darmstadt Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt Deutschland
n-Hexan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland
Ölsäure	Sigma Aldrich, München Deutschland
Palmitinsäure	Sigma Aldrich, München Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, München Deutschland
Percoll –Lösung	Sigma Aldrich, München Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung	Gibco® Invitrogen, Darmstadt Deutschland
Saccharose	Sigma Aldrich, München Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland
Streptomycin/Penicillin	Gibco® Invitrogen, Darmstadt Deutschland
Tetra-Myristoyl-CL	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Trypsin	PAA –Laboratories, Pasching, Österreich

Tab. 11.1-2 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Primäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Monoclonal rat anti-BrdU	1:100	AbD Serotec, Düsseldorf, BRD
Monoclonal mouse anti-SMI 311	1:1.000	Sternberger Monoclonals Baltimore, USA
monoclonal rabbit anti-NGFR p75	1:50	Merck-Millipore, Darmstadt, BRD
polyclonal rabbit anti-IGFR I α	1:100	Merck-Millipore, Darmstadt, BRD
polyclonal rabbit anti-PDH E1 α	1:1.000	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
polyclonal rabbit anti-nChR α	1:1.000	Abcam, Cambridge, UK
polyclonal rabbit anti-PPAR α	1:250	BioTrend GmbH, Köln, BRD
DAPI		Merck-Millipore, Darmstadt, BRD
Fluoreszeindiazetat		Merck-Millipore, Darmstadt, BRD
Phalloidin		Merck-Millipore, Darmstadt, BRD
Propidiumiodid		Merck-Millipore, Darmstadt, BRD
sekundärer Antikörper		
anti-rat Alexa 540, rot	1:500	Invitrogen, Darmstadt, BRD
Anti-rabbit Alexa 546, rot	1:500	Invitrogen, Darmstadt, BRD
anti-mouse Alexa 488, grün	1:500	Invitrogen, Darmstadt, BRD

11.2 Plastik-, Glas- und Zellkulturmaterial

Tab. 11.2-1 Verwendete Plastik-, Glas- und Zellkulturmaterialien

Plastikmaterial	Hersteller bzw. Bezugsquelle
25 cm ² Zuchtflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland
35 mm Petrischalen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold Deutschland
75 cm ² Zuchtflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland
Deckgläschen 25 mm	VWR International GmbH, Darmstadt Deutschland
Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Kanülen 18G ; 23G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig Deutschland
Pipettenspitzen 10 μ l; 200 μ l 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
Spritzen 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg Deutschland
Messpipetten cellstar 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland
Zentrifugenröhrchen Typ Falcon 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland

11.3 Geräte**Tab. 11.3-1 Verwendete Geräte**

Gerätename und Beschreibung	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Biohit 12-Kanalpipetten 50 µl, 300 µl	Sartorius Weighing Technology GmbH, Rosbach vor der Höhe Deutschland
CO ₂ Inkubator Forma Series II Water Jacket	Thermo Scientific, Wilmington USA
CO ₂ Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Holding GmbH, Hanau Deutschland
Feinpipetten Research 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Fluoreszenzmikroskop AxioImager.M1	Carl Zeiss AG, Jena Deutschland
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss Deutschland
Gefrierschränke -80 °C	Thermo Scientific, Wilmington USA
Homogenisierer Xenox MHX/E	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HPLC Säulen	Merck, Darmstadt Deutschland
Infusionspumpe PIM 303	Doltron, Uster, Schweiz
inverses Phasenkontrast-Mikroskop DMI 3000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar Deutschland
Kühlschränke	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
Laborzentrifuge UEC Force IV	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau Deutschland
Massenspektrometer (TSQ Quantum Discovery Max	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik, Blankenburg Deutschland
pH-Meter	Xylem Analysis Sales GmbH & Co. KG. Weilheim, Detschland
Photometer Cary 1E	Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, USA
Rollerpumpe	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Stereomikroskop S6E	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar Deutschland
Sterilwerkbänke Hera Guard und HeraSafe KS12	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Stromversorgung EV215	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland

Gerätename und Beschreibung	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Surveyor HPLC-System	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex	Scientific Industries Inc., New York USA
Waagen	Sartorius Weighing Technology GmbH, Rosbach vor der Höhe Deutschland
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Multifuge X3R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland