

**Aus dem Deutschen Zentrum für Herzinsuffizienz
Universitätsklinikum Würzburg**

der Universität Würzburg

Sprecher: Professor Dr. med. Christoph Maack

Effekte von Acylcarnitinen auf die Funktion kardialer Mausherzmitochondrien

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Melanie Kern

aus Frankfurt am Main

Würzburg, Juli 2023

Referent: Prof. Dr. med. Christoph Maack

Korreferentin: Prof. Dr. med. Brenda Gerull

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 6 Juli 2023

Die Promovierende ist Zahnärztin

**Effekte von Acylcarnitinen auf die Funktion kardialer
Mausherzmitochondrien**

Von Melanie Kern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ausgangspunkt des Projekts	1
1.2. Der mitochondriale Metabolismus	5
1.3. Physiologie der Acylcarnitine	7
1.3.1 Struktureller Aufbau der Acylcarnitine	7
1.3.2. Struktureller Aufbau und physiologische Funktion der Fettsäuren	7
1.3.3. Struktureller Aufbau und physiologische Funktion der Carnitine	8
1.4. Der Fettsäure-Carnitin-Zyklus in humanen Kardiomyozyten	12
1.5. Interaktionen der Fettsäuren im Zytoplasma	15
1.6. Die Bedeutung der Peroxisome und Mikrosome für den Fettsäure – Carnitin – Zyklus	16
1.6.1. Stoffwechsel des Peroxisom	16
1.6.2. Mikrosomaler Stoffwechsel	17
1.7. Die Bedeutung des Mitochondriums für den Fettsäure-Metabolismus der Kardiomyozyten	18
1.7.1. Der Transport von Fettsäuren über das Acyl-Carnitin-Shuttle ..	18
1.7.2. Der Fettsäure Metabolismus	19
1.7.3. Der Ketonkörper Metabolismus	21
1.7.4. Der Citratzyklus	21
1.8. Stoffwechsel Regulation durch den Randle Cycle	22
1.9. Der Weg der Fettsäuren als Acylcarnitine zurück ins Blutplasma	24
1.9.1. OCTN Transporter	25
1.10. Problemstellung und Zielsetzung der Doktorarbeit	26

2. Material und Methodenteil	27
2.1. Versuchstiere	27
2.1.1. Ethik- und Tierversuchsvotum.....	27
2.2. Versuche mit isolierten kardialen Mitochondrien für.....	28
Respirationsmessungen an der Clark Elektrode	28
2.2.1. Isolation kardialer Mitochondrien nach Mela & Seitz	28
2.2.2. Aufbau und Funktion der Clark Elektrode.....	29
2.2.3. Auswertung der Messdaten	31
2.2.4. Einteilung der mitochondrialen States für Respirationsmessungen	32
2.2.5. Respirationsmessungen mit isolierten kardialen Mitochondrien..	34
2.3. Übersicht über die für die Versuche verwendeten Protokolle	35
2.3.1. Messprotokoll 1.....	36
Interaktion von Acylcarnitinen mit isolierten kardialen Mitochondrien	36
2.3.2. Messprotokoll 2.....	37
Respirationsmessung kardialer Mitochondrien mit Pyruvat / Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 1.....	37
2.3.3. Messprotokoll 3.....	38
Respirationsmessung kardialer Mitochondrien mit Pyruvat / Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3.....	38
2.3.4. Messprotokoll 4.....	39
Überprüfung der Reversibilität der Acylcarnitin-Effekte.....	39
2.3.5. Messprotokoll 5.....	40
Etomoxir und sein Einfluss auf kardiale Mitochondrien	40
2.3.6. Messprotokoll 6.....	41

Respirationsmessung mit Glutamat/Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3	41
2.3.7. Messprotokoll 7.....	44
Respirationsmessungen nach Fettsäure Protokoll (el Azzouzi).....	44
2.3.8. Messprotokoll 8.....	46
Respirationsmessung mit Pyruvat/Malat als Substrat in Anwesenheit von Carnitin in State 3	46
2.3.9. Entwicklung des Fettsäure Protokolls Kern 1.....	47
2.3.10. Entwicklung des Protokolls Kern 2	55
2.4. Instrumentarium und Gerätschaften.....	58
2.4.1. Verwendete Substanzen: Clark Elektrode.....	59
2.4.2. Verwendete Acylcarnitine.....	61
3. Ergebnisse.....	62
3.1. Interaktion von Acylcarnitinen mit isolierten Mitochondrien in State 1	64
3.2. Ergebnisse der Respirationsmessungen kardialer Mitochondrien mit Pyruvat/Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 1	66
3.3. Ergebnisse der Respirationsmessungen mit Pyruvat/Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3.....	75
3.4. Sind die inhibierenden Effekte von Acylcarnitinen auf die mitochondriale Pyruvat / Malat Respiration reversibel?	78
3.5. Ergebnisse der Respirationsmessungen mit kardialen.....	80
Mitochondrien und Etomoxir.....	80
3.6. Ergebnisse der Respirationsmessung mit Glutamat/Malat	84
als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3.	84
3.7. Ergebnisse der Respirationsmessungen nach el Azzouzi	86

3.8. Ergebnisse der Respirationsmessungen mit kardialen.....	88
Mitochondrien mit Pyruvat/Malat als Substrat in Anwesenheit	88
von ungebundenem Carnitin in State 3.	88
3.9. Ergebnisse der Respirationsmessung nach Protokoll Kern 2 mit PalmitoylCoA und Acylcarnitinen als Substrate des Stoffwechsels kardialer Mitochondrien.....	89
3.10. Ergebnisse der Respirationsmessungen nach Protokoll Kern 1	92
3.11. Respirationsmessungen nach Protokoll Kern 1 im Vergleich zu Respirationsmessungen nach dem Standard-Protokoll mit Pyruvat/Malat als Substrat.....	93
3.11.1. Die Wirkung von Oleoylcarnitin auf die Respiration der	94
kardialen Mitochondrien nach Protokoll Kern 1 im	94
Vergleich zur Respiration, erzeugt durch Pyruvat/Malat als.....	94
Substrat nach dem Standard Protokoll.	94
3.11.2. Die Wirkung von Stearoylcarnitin auf die Respiration der	98
kardialen Mitochondrien nach Protokoll Kern 1 im Vergleich zur Respiration, erzeugt durch Pyruvat/Malat als Substrat nach dem Standard Protokoll.	98
4. Diskussion	101
4.1. Diskussion der Daten, erhoben mit kardialen Mitochondrien unter dem Einfluss von Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin.....	101
4.2. Regulation eines Substratswitches von Pyruvat zur Fettsäure- Respiration in kardialen Mitochondrien	102
4.3. Regulationspunkte des von Oleoylcarnitin regulierte Substratswitch von Glukose zur Fettsäure-Respiration in kardialen Mitochondrien	103
4.4. Einordnung der Resultate in das Modell des Randle Cycle	107
4.5. Ursachen und Folgen erhöhter Acylcarnitin-Konzentrationen	109
4.6. Schlussfolgerung	113

1. Einleitung

1.1. Ausgangspunkt des Projekts

Vorhofflimmern (AF) ist ein weitverbreitetes Krankheitsbild und betrifft bis zu 2 % der Allgemeinbevölkerung. Selbst bei optimaler Therapie besteht die Möglichkeit einer schwerwiegenden gesundheitlichen Belastung durch Komplikationen des Vorhofflimmerns [1-4]. Hierzu zählt vor allem die erhöhte Gefahr einer Thrombusbildung, welche unter anderem einen Schlaganfall auslösen kann [5, 6]. Die Rolle von langkettigen Acyl-Carnitinen (ACs) als arrhythmogene Metaboliten ist noch nicht vollständig geklärt. Vorarbeiten unserer Kooperationspartner zeigten, dass erhöhte Plasma Konzentrationen von Acyl-Carnitinen mit Vorhofflimmern assoziiert sind. Acylcarnitine sind Fettsäuren, welche im Rahmen der Verstoffwechslung an ein Carnitin-Molekül gebunden wurden. Im gesunden Herzen sind langkettige Fettsäuren die dominierende Energiequelle. Der Abbau langkettiger Fettsäuren zur Gewinnung des universellen Energieträgers ATP findet im Mitochondrium statt [7, 8]. Beim Transport der Fettsäuren in das Mitochondrium werden diese an Carnitin gebunden und gelangen als Acylcarnitine in das Mitochondrium [9].

Das Ziel des allgemeinen, übergeordneten Forschungsprojektes war es, zu untersuchen, ob die erhöhten Acylcarnitin-Spiegel im Blut von Patienten mit Vorhofflimmern eine kausale Rolle für das Entstehen von Vorhofflimmern spielen könnten. Um dies näher zu untersuchen, war es der Fokus der vorliegenden Dissertation, die Auswirkungen von Acylcarnitinen auf die Funktion isolierter kardialer Mitochondrien zu untersuchen.

Die Pathologie von Vorhofflimmern ist komplex und immer noch unvollständig verstanden. Es können unter anderem strukturelle, kontraktile und elektrische Funktionen gestört sein, zudem können pathologische Stoffwechseleränderungen vorliegen [10-12]. Umgekehrt kann Vorhofflimmern kardiometabolische Veränderungen hervorrufen [13-15]. Der Ursprung der zirkulierenden Acylcarnitine könnte sowohl aus zellulärer Freisetzung als auch aus der Nahrungsaufnahme stammen [16]. Die Physiologie der Acylcarnitine wird im Laufe dieser Arbeit noch genauer beleuchtet. Eine Assoziation zwischen dem Metabolismus der Acylcarnitine und der Entwicklung von Vorhofflimmern wurde in mehreren Studien identifiziert [4, 17, 18]. Eine Korrelation der

Konzentrationen zirkulierender Acylcarnitine, einschließlich kurz, mittel- und langkettiger Acylcarnitine, mit dem Risiko und der Prognose von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wird vermutet [18]. In der populationsbasierten Kohortenstudie BiomarcCaRE („Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment in Europa“) wurden Serum-Proben untersucht, dies wurde auch in einer Studie mit dem Namen New-Zealand-Kohorte durchgeführt. Die sogenannte Würzburg-Kohorte verwendete humane Gewebeproben, welche unter Verwendung etablierter Methoden während eines operativen Eingriffes aus dem linken Atrium des Patienten entnommen wurde. Die BiomarcCaRE-Studie umfasste 1.437 Probanden mit Vorhofflimmern und 7.591 Probanden ohne Vorhofflimmern. Hiervon wurden 178 Probanden über einen Zeitraum von 20 Jahren nachbeobachtet. Die New-Zealand-Kohorte bestand aus Probanden mit Sinusrhythmus (n=28), aus Probanden mit paroxysmalem Vorhofflimmern (PAF, n=13) und aus Probanden mit persistierendem Vorhofflimmern (SAF, n=11). Die Würzburg-Kohorte umfasste Patienten im Sinusrhythmus (n=29), Patienten mit persistierendem Vorhofflimmern (n=10) und mit permanentem Vorhofflimmern (n=6). Für die Analyse der Würzburg-Kohorte wurde permanent und persistierendes Vorhofflimmern als anhaltendes Vorhofflimmern zusammengefasst [18-25].

Die ersten Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Professor Zeller in Hamburg waren Ausgangspunkt des Forschungsprojektes dieser Dissertation, da diese den Zusammenhang zwischen C18:1-AC-Serumkonzentrationen und der Entwicklung von Vorhofflimmern zeigten. Die initiale populationsbasierte Kohortenstudie der Studiengruppe BiomarkerCaRE wurde von der Klinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie, Universitäres Herzzentrum Hamburg erhoben. Blutserumproben und klinische Kontrolluntersuchungen wurden ausgewertet. Die entnommenen Serum-Proben wurden mit Hilfe von Liquid „chromatography-mass spectrometry“ (LC-MS/MS) unter Verwendung von Absolute IDQ p180 kit (Biocrates) untersucht. Dadurch konnten 184 unterschiedliche Metaboliten des Blutplasmas identifiziert werden. Nach ca. 15-20 Jahren wurden die Probanden erneut untersucht. Bei der Analyse der Daten wurden Body-Mass-Index (BMI), systolischer Blutdruck, blutdrucksenkende Behandlungen, Diabetes, Cholesterin Wert, Geschlecht, Rauchen und Alter bei der Ausgangsuntersuchung berücksichtigt und die Datenlage davon bereinigt. Bei den bestimmten Metaboliten handelte es sich um: Acylcarnitine, Aminosäuren, Biogene Amine, Hexosen, Phospho- und Sphingolipide, Phosphatidylcholine, Lyso-Phosphatidylcholine und Sphingomyelin. Durch die bestimmten Metaboliten aus dem

Blutplasma konnte ein Zusammenhang zwischen den erhöhten langkettigen Acylcarnitinen und dem Entwickeln von Vorhofflimmern ermittelt werden. Da diese klinischen Studiendaten auf eine Assoziation von zirkulierenden langkettigen Acylcarnitinen mit Vorhofflimmern hingewiesen hatten, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Daten aus der Fall-Kohorte mit Vorhofflimmern des BiomarCaRE-Konsortiums genauer untersucht. Insgesamt wurden 1.437 Fälle mit Vorhofflimmern und 7.591 ohne Vorhofflimmern analysiert. Abbildung 1 zeigt eine signifikante Assoziation zwischen hohen Serumkonzentrationen von C18:1AC und dem Auftreten von Vorhofflimmern mit einer Hazard Ratio von 1,10 pro 1 Standardabweichung Anstieg ($p < 0,0004$), über einen Nachbeobachtungszeitraum von bis zu 20 Jahren, wie durch Kaplan-Meier-Kurven dargestellt [17-19].

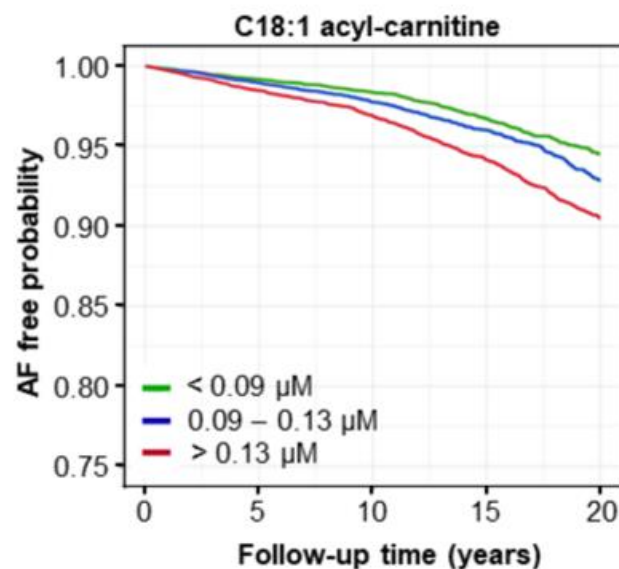


Abb.1: Resultate aus der Studie BiomarCaRE

Graphische Darstellung des Einflusses von Oleoylcarnitin (C18:1) auf die Wahrscheinlichkeit von Vorhofflimmern in Abhängigkeit zur Zeit [17] [18].

Einfach ungesättigte langkettige Acylcarnitine mit 18 C-Atomen wurden also als Metaboliten im Blutplasma identifiziert und in Zusammenhang mit Vorhofflimmern gebracht. Der Hauptvertreter im humanen Metabolismus ist hierbei Oleoylcarnitin mit 18 C-Atomen und einer Doppelbindung am 9. C-Atom [17].

In der Zukunft könnten somit die Serumkonzentrationen von C18:1 AC für die Vorhersage der Entwicklung von Vorhofflimmern und damit als zirkulierender Biomarker von Interesse sein [22].

In Vorexperimenten beobachtete unser Kooperationspartner dieses Projektes, die Arbeitsgruppe rund um Prof. Tanja Zeller, dass Oleoyl- und Stearoylcarnitine an isolierten Herzmuskelstreifen und engineered heart tissue (EHT) Präparaten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) kontraktile Dysfunktion und Arrhythmien hervorriefen [17]. Die New-Zealand-Studie bestätigte diese Datenlage. In der neuseeländischen Kohorte wurden explorative Metaboliten-Messungen durchgeführt. Dabei wurden nicht nur langkettigen Acylcarnitine (n=14) gescreent, sondern auch andere zirkulierende Metaboliten (n = 174) unter der Verwendung des AbsoluteIDQ p180-Kits. Die selektive Analyse von langkettigen Acylcarnitinen ergab eine Assoziation zwischen SAF (persistierendem Vorhofflimmern) und einer erhöhten Serumkonzentration von C18:1 Acylcarnitin sowie von C18:2 Acylcarnitin und anderen langkettigen Acylcarnitinen. Im Hinblick auf PAF (paroxysmalem Vorhofflimmern) war keiner der quantifizierten Metaboliten signifikant assoziiert [17-21].

Die Würzburg-Kohorte wurde im Gegensatz zur New-Zealand-Kohorte und zur BiomarCaRE-Studie nicht mit Serumproben, sondern mit Gewebeproben durchgeführt. Hierbei war der Fokus auf die metabolische Relevanz der Acylcarnitine für das kardiale Gewebe gelegt. Es wurde eine Veränderung der mitochondrialen Atmung bei höheren Serumkonzentrationen von langkettigen C18:1-Acylcarnitinen bei Patienten mit Vorhofflimmern untersucht. Bei den Atmungsmessungen mit den humanen Mitochondrien zeigten sich im Vergleich unterschiedliche Level an Respirationskapazität. Gewebe, welches aus Patienten im Sinusrhythmus gewonnen wurde, hatte eine stärkere Respirationsleistung als Gewebe, welches aus Patienten mit Vorhofflimmern gewonnen wurde. Hierbei wurden sowohl Fettsäuren als auch Acylcarnitine als Substrat zu den Mitochondrien gegeben. Langkettige Acylcarnitine sind Produkte der Mitochondrien des Herzens; es können Störungen des Herzstoffwechsels mit den Serumkonzentrationen von langkettigen Acylcarnitinen korrelieren [22, 24, 25]. Die genauen Mechanismen, wie langkettige Acylcarnitine sich auf den Herzstoffwechsel auswirken, und wie diese ggf. pathologische Prozesse in Gang setzen, welche zu Vorhofflimmern führen, wird in dieser Dissertation genauer beleuchtet. Hierzu wurden zunächst Hintergrundrecherchen zur Physiologie der Acylcarnitine durchgeführt. Im

folgenden Abschnitt wird deshalb die Physiologie des Herzstoffwechsels sowie der Fettsäure-Carnitin-Zyklus genauer beschrieben. Ziel war es, die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit in das komplexe metabolische System des Myokardstoffwechsels einzuordnen.

1.2. Der mitochondriale Metabolismus

Unter physiologischen Bedingungen werden mehr als 90% der ATP-Produktion in den Kardiomyozyten von der mitochondrialen, oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) bewerkstelligt. Die restlichen Prozente des Energiebedarfs werden aus der Glycolyse gewonnen. Die Mitochondrien sind die vorherrschenden Energie-Generatoren, d.h. die Kraftwerke der Zellen. Sie nehmen ca. 30% des Volumens in den Kardiomyozyten ein. Die Mitochondrien haben eine Doppel-Membranstruktur in Form einer inneren und äußeren Mitochondrienmembran. Aufgrund dieser Struktur bilden sich separate Kompartimente, wie der Intermembranraum und die mitochondriale Matrix. Kardiale Mitochondrien metabolisieren hauptsächlich Fettsäuren, aber sie können ebenfalls Glucose zur Generierung von ATP (OXPHOS) metabolisieren. Acetyl-CoA, ein metabolisches Zwischenprodukt, gewonnen aus der Oxidation von Glucose und Fettsäuren, wird genutzt, um Reduktionsäquivalente wie Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide (NADH) und Flavin-Adenin-Dinucleotide (FADH₂) im Citratzyklus zu generieren [26].

LpFA & ungezählte FFA	= 44%
FFA	= 41.9%
Aminosäuren	= 4,6%
Ketonkörper	= 6,4%
Lactat	= 2,8%
Rest	= < 1%

Tabelle 1: Prozentuale Auflistung der verwendeten Nährstoffe, in Abhängigkeit zur ATP Bildung, in kardialem Gewebe mit regulärer Auswurfsrate. LpFA = Lipoprotein-Derivate, FFA = Albumin Derivate. Erstellt nach Informationen aus: [27].

Welche Nährstoffe die Kardiomyozyten verstoffwechseln, lässt sich anhand der ATP-Produktion prozentual darstellen. In Tabelle 1 wird die Verteilung der verbrauchten Nährstoffe in Abhängigkeit zur ATP-Bildung aufgelistet. Es handelt sich hierbei um Daten, die in Patienten gewonnen wurden, die eine normale Ejektionsfraktion hatten und sich einem elektrophysiologischen Eingriff unterzogen. Lipoprotein-Derivate und Albumin-Derivate, also Fettsäuren gebunden an Trägerstoffe, bilden den Hauptteil der Nährstoffversorgung des Herzens. Ketonkörper, Lactat und Aminosäuren sowie Glucose nehmen hierbei einen geringeren Stellenwert ein [27].

1.3. Physiologie der Acylcarnitine

1.3.1 Struktureller Aufbau der Acylcarnitine

Acylcarnitine sind Fettsäuren, die in ihrer Transportform, an Carnitin gebunden, u.a. zum Transport in das Mitochondrium vorliegen [28].

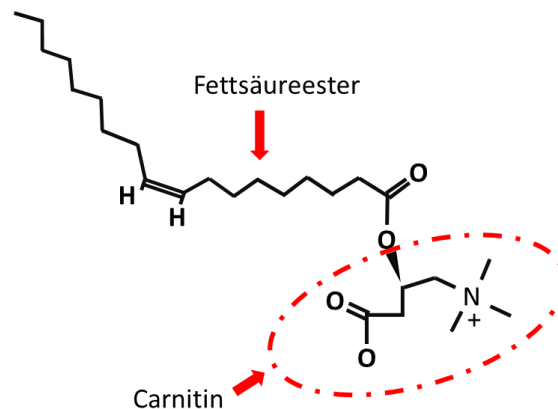


Abb.2: Strukturformel eines Acylcarnitins (Oleoylcarnitin C-Atome 18:1)

Erstellt nach Informationen aus: [28].

Die Abbildung 5 zeigt die Bindung eines Carnitins an eine ungesättigte Fettsäure (hier Oleoylcarnitin mit einer Doppelbindung und 18 C-Atomen). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Acylcarnitine waren Stearoylcarnitin, eine gesättigte Fettsäure mit 18 C-Atomen, und Oleoylcarnitin, eine ungesättigte Fettsäure mit 18 C-Atomen und einer Doppelbindung, sowie als kurzkettenige Kontrolle Propionylcarnitin mit 3 C-Atomen [28].

1.3.2 Struktureller Aufbau und physiologische Funktion der Fettsäuren

Fettsäuren (Stoffe mit verschiedenen Kohlenstoff-Wasserstoffketten) lassen sich nach dem Sättigungsgrad, der durch die Anzahl der Doppelbindungen zwischen den C-

Atomen bestimmt ist, und nach der Kettenlänge der C-Atome einteilen [29-31]. Laurinsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure gehören zu den gesättigten Fettsäuren, d.h. sie haben keine Doppelbindung zwischen den C-Atomen. Palmitoyleinsäure und Ölsäure (=Oleoyl) gehören zu den einfach ungesättigten Fettsäuren (eine Doppelbindung), Linolsäure und Arachidonsäure zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (mehrere Doppelbindungen). Fettsäuren sind lipophil und somit unlöslich in Wasser und damit auch im Blutplasma, was zu 59 - 90 % aus Wasser besteht. Deshalb müssen die Lipide an Transportproteine gebunden werden. Hierfür werden spezielle Lipoproteine (z.B. Low density Lipoproteine = LDL), welche Triglyceride zu den endothelständigen Lipoproteinlipasen (LPL) transportieren, bereitgestellt. Dort werden einzelne Fettsäuren von den Lipoproteinlipasen abgespalten und weiter zu den Zellen, z.B. den Kardiomyozyten transportiert [29]. Der primäre endogene Ligand des menschlichen Serums ist Albumin, der nicht veresterte Fettsäuren transportiert. Albumin ist das wichtigste Protein im menschlichen Blutplasma, das eine Konzentration von 0,1-0,4 g/L Blutplasma hat. Es ist ein wichtiger Transporter von Fettsäuren sowie anderen endogen gelösten Stoffen wie Hemin, Bilirubin und Tryptophan. Unter normalen Bedingungen werden zwischen 0.1 und 2 Mol Fettsäure per Mol Protein an Albumin gebunden [32]. Die Fettsäuren müssen durch die Plasmamembran in die Zelle geschleust werden. Fettsäure-Bindungsproteine und Fettsäure-Transportproteine ermöglichen den Transport durch die Plasmamembran der Zelle [29]. Im Zytoplasma der Zellen werden die Fettsäuren direkt an Coenzym A (CoA) gebunden und werden in das Mitochondrium transportiert. Als Acyl-CoA gelangen kurz- und mittelkettige Fettsäuren per Diffusion in Mitochondrien, während langkettige Fettsäuren das Acylcarnitin-Shuttle benötigen, um in Mitochondrien zu gelangen. In den Mitochondrien münden die Fettsäuren zur Energiegewinnung in die β -Oxidation, später in den Citratzyklus und die Atmungskette [29].

1.3.3. Struktureller Aufbau und physiologische Funktion der Carnitine

Carnitin (β -hydroxy- γ -trimethylammonium butyrate) ist ein hydrophobes Quaternaryamin [33], dessen funktionelle Gruppen die Ammonium-Gruppe und die Carboxyl-Gruppe sind [34].

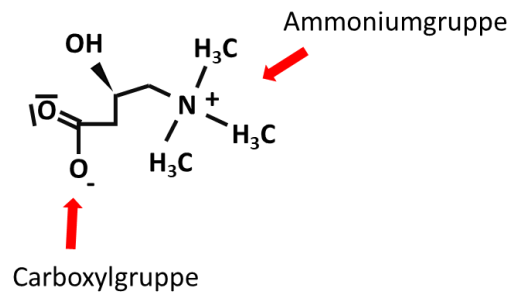


Abb.3: Strukturformel eines Carnitin Moleküls.

Erstellt nach Informationen aus: [33] [34].

Carnitin spielt eine essentielle Rolle im humanen Energie-Metabolismus. Die normale zirkulierende Carnitin-Konzentration im humanen Blutplasma liegt bei 25-50 μM [33]. Die Strukturformel von Carnitin ist in Abb.3 dargestellt. Das im Blut gelöste Carnitin kann über die Niere ausgeschieden werden. Die Balance zwischen Aufnahme von Carnitin über die Ernährung, der endogenen Biosynthese und der Effizienz der renalen Absorption spiegelt sich in der Carnitin-Homöostase wider [35]. Über die Ernährung werden die Carnitine besonders aus Fleisch und Milchprodukten aufgenommen. Endogen können Carnitine aus den Aminosäuren Lysin und Methionin synthetisiert werden. Hierbei liegt die endogene Synthese-Rate ungefähr bei 1 bis 2 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht/Tag [35-37]. Im humanen Stoffwechsel haben Carnitine die verschiedensten Funktionen. Aber die Hauptaufgabe der Carnitine besteht darin, langkettige Fettsäuren in Form von Acylcarnitinen zur Energiegewinnung in der β -Oxidation, in das Mitochondrium zu schleusen [33]. Carnitine helfen darüber hinaus bei der Beseitigung von anfallenden Acylresten, indem diese an Carnitine gebunden werden. Es entstehen Acylcarnitine. Die Acylreste stammen z.B. von Aminosäuren aus dem intermediären Metabolismus. Die Bindungsfunktion der Carnitine für Acylreste ist essentiell im menschlichen Körper, da sie neben den Acylresten auch organische Säuren binden und entfernen können. Bei Störungen der mitochondrialen Fettsäureoxidation ist dieser spezielle Mechanismus besonders wichtig. Die Akkumulation von Acyl-CoA in Organen, wie z.B. dem Herzen, kann zur Apoptose und Inflammation des Gewebes führen. Durch die Konjugation der Carnitine wird der Anteil an CoA- gebundenen Acyl-Resten gesenkt [38-40]. Die Carnitin Aufnahme vom Blut-Plasma ins Zytosol der Zelle wird von den OCTN2 -Transportern bewerkstelligt. Ein

Carnitin Mangel wird oftmals durch eine Mutation im SCIC22A5 Gen, welches den OCTN2 Transporter kodiert, verursacht. Carnitine sind, wie schon erwähnt, mitverantwortlich für den Fettsäure-Transport. Ein Carnitin-Mangel führt deshalb zu massiven Störungen in der Fettsäure-Oxidation. Da die Fettsäuren nicht mehr aus dem Gewebe gelöst und verarbeitet werden können, akkumulieren diese in Leber, Herz- und Skelettmuskel. Die Folgen sind gravierend und können von Hypoglykämie, hepatischer Enzephalopathie, Hepatopathie, Reye-Syndrom, Kardiomyopathie (CM), muskulärer Hypotonie bis zur Bewusstlosigkeit und zum plötzlichen Tod reichen [37]. Zur Diagnostik dieser angeborenen metabolischen Störung des Carnitin-Fettsäure-Stoffwechsels bei Neugeborenen kann man mit Hilfe einer Tandem-Massenspektroskopie den Carnitin Level im Blut-Plasma bestimmen. Bei einer zu frühen Messung des Carnitins bei den Neugeborenen können aber noch Carnitine der Mutter im Blut des Neugeborenen vorhanden sein [33, 37, 41, 42]. Eine kausale Therapie des primären Carnitin-Mangels ist heute noch nicht möglich. Die Patienten sprechen allerdings gut auf eine Carnitin Substitution von ca. 100-400mg/kg KG an. Ein frühzeitiger Beginn der Carnitin Substitution kann irreversible Organschäden verhindern. Kinder benötigen bei akuten Hypoglykämien meist zusätzlich eine intravenöse Gabe von Glukose. Die Hypoglykämien entstehen durch einen zu hohen Glukoseverbrauch beim mitochondrialen Metabolismus, da die Fettsäuren auf Grund des Carnitin-Mangels nicht in das Mitochondrium gelangen können [37]. Das Zusammenspiel der unterschiedlichen Organe für den Blut-Carnitin-Spiegel sowie die Aufnahme von Carnitin über die Darmzotten ist in der Übersicht in Abb.4 dargestellt [33, 34].

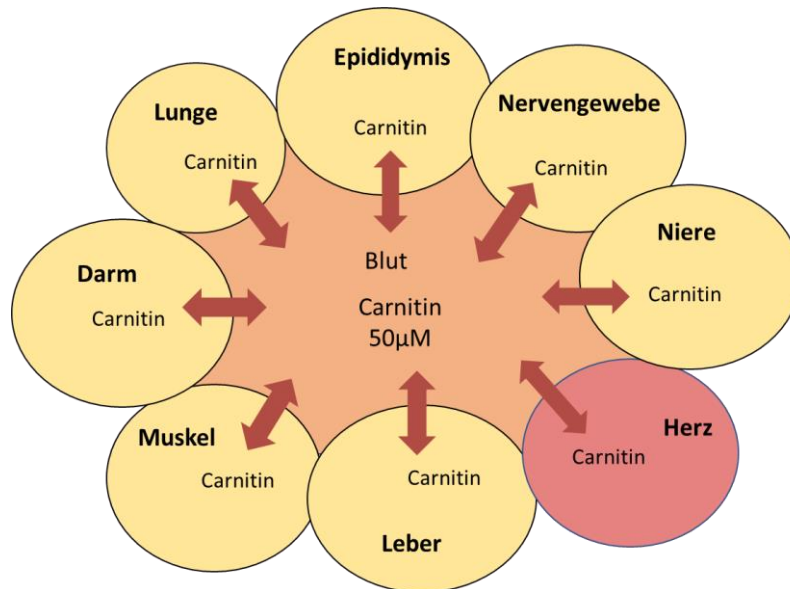


Abb.4: Graphische Darstellung des Blut Carnitin-Spiegels in Zusammenhang der verschiedenen Organe: Herz, Leber, Muskel, Intestinum, Respirationstrakt, Epydidymis, neurales Gewebe, Leber. Erstellt nach Informationen aus: [34].

1.4. Der Fettsäure-Carnitin-Zyklus in humanen Kardiomyozyten

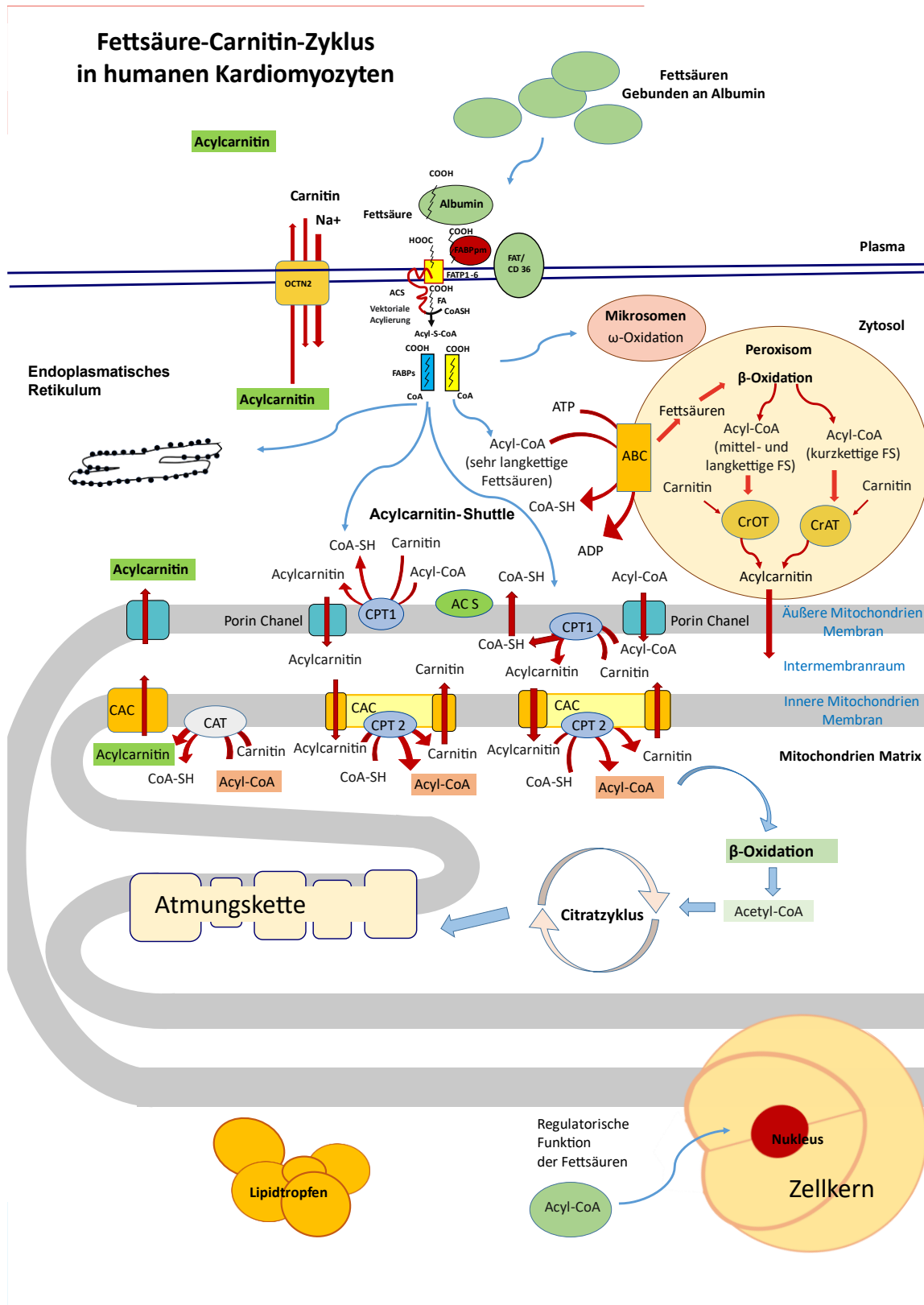


Abb.5: Fettsäure-Carnitin-Zyklus in humanen Kardiomyozyten Schematische Darstellung des Zusammenspiels von Fettsäuren und Carnitinen mit den Zellorganellen in Kardiomyozyten. Erstellt nach Informationen aus: [26, 28, 29, 34, 40, 41, 43-67].

Die Aufnahme der Fettsäuren in die Kardiomyozyten

Der menschliche Körper kann Fettsäuren aus drei unterschiedlichen Quellen gewinnen. Exogene Fettsäuren stammen aus Nahrungsfetten, z.B. Olivenölen, Butter, Sonnenblumenöl und anderen Pflanzenölen, die aus dem Darmlumen über das Blut zu den Körperzellen transportiert werden. Aus körpereigener Eigensynthese stammende Fettsäuren werden aus Acetyl-CoA, sowie aus C-Atom-Ketten, die bei der Hydrolyse von alkylierten Proteinen, Phospholipiden und Triglyceriden frei werden, hergestellt [52]. Außerdem können Fettsäuren aus dem Fettgewebe mobilisiert und mit Hilfe von Albumin im Blut transportiert werden [42]. Abb. 5 zeigt eine Gesamtübersicht über den Fettsäure-Carnitin-Zyklus; die einzelnen Teile dieses Zyklus werden in Abb. 6 noch einmal genauer beleuchtet.

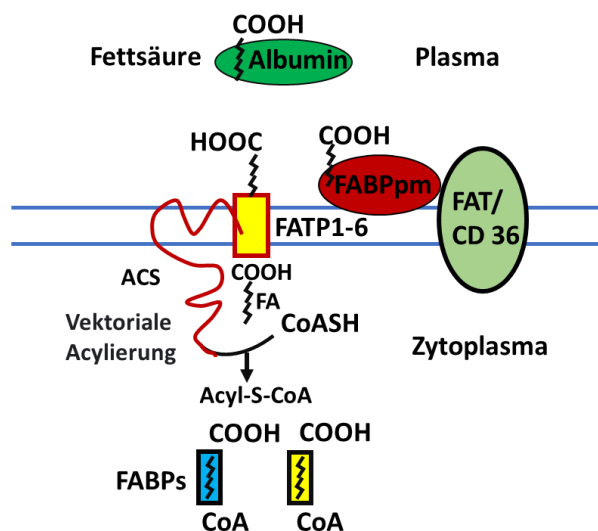


Abb.6: Fettsäuretransport durch die Zellmembran.

Erstellt nach Informationen aus: [33].

Fettsäuren, die sich im Plasma befinden, sind zumeist an Albumin gebunden [32]. Um Fettsäuren durch die Plasmamembran in die Kardiomyozyte zu schleusen, sind spezielle Fettsäurebindungs- und Transportproteine notwendig [29]. (Siehe Abb. 6) Die wichtigsten Proteine, die den Transport der Fettsäuren durch die Plasmamembran bewerkstelligen, sind Fettsäure-Transport-Proteine (FATP), Fettsäure-Translokasen (FAT/CD36), Caveoline und Plasmamembran-Fettsäure-bindende-Proteine (FABPpm) [33, 43, 46, 53].

Das Transportprotein FATP

FATP sind Transmembran-Proteine, welche für die Aufnahme von langkettigen (C 16-20) Fettsäuren in die Zelle zuständig sind. Im humanen Gewebe sind 6 unterschiedliche FATP bekannt (FATP1-6). Die FATP sind durch die Gene SLC27A1-6 codiert [53, 54]. FATP haben eine Acyl-CoA-Synthase (ACS) Aktivität, die Fettsäuren in Acyl-CoA Thioester umwandelt, um sie für den weiteren metabolischen Prozess zu aktivieren [40, 53, 55]. Die innere Acyl-CoA-Synthase Aktivität der FATP ist verantwortlich für einen konstanten Fettsäuregradienten vom extrazellulären Raum in das intrazelluläre Milieu. Mithilfe von vektorieller Acylierung werden langkettige Acyl-CoA in die Zelle gezogen. In Kardiomyozyten befinden sich u.a. FATP 1 und FATP 6. FATP 1 kommt vermehrt im Herzen, im Skelettmuskel und im weißen und braunen Fettgewebe vor. FATP 6 ist hauptsächlich im Herzen vorhanden und hier im Sarkolema der Kardiomyozyten und in der Plasmamembran lokalisiert. Das FATP 6 liegt neben anderen Fettsäuretransportproteinen (FAT/CD36) nahe an den Blutgefäßen des Herzens [33].

Die Fettsäure Translokase FAT/CD36

Die FAT/CD36 findet man vermehrt im Myokard, den Adipozyten, den Erythrozyten und den Hepatozyten. Dieses Transmembranprotein ermöglicht die Aufnahme der Fettsäuren in die Zelle sowie den intrazellulären Transport der Fettsäuren und deren Veresterung zu Triglyceriden in Herz und Skelettmuskel [33].

Das Integral-Membran-Protein Caveolin:

Caveoline sind Integral-Membran-Proteine. Von den Caveolinen sind verschiedene Untergruppen bekannt: Caveolin 1, Caveolin 2, Caveolin 3 [33]. Caveolin 3 ist vermehrt im Herzen zu finden und ist ebenfalls für den Fettsäuretransport von Bedeutung [68].

Das Plasmamembran-Fettsäure-bindende-Protein FABP:

Die Fettsäure bindenden Proteine sind Proteine mit einer hohen Affinität zu hydrophoben Liganden, wie z.B. freie gesättigte und ungesättigte langkettige Fettsäuren und ihre CoA Derivate; außerdem besteht eine Affinität zu Bilirubin, organischen Anionen und anderen kleinen Molekülen. Die FABP Isoformen sind in ihrer Expression Gewebe spezifisch. Man nimmt an, dass die FABP die Löslichkeit der Fettsäuren erleichtern und dabei helfen, diese zu den spezifischen zellulären Kompartimenten zu transportieren [43, 56, 57].

1.5. Interaktionen der Fettsäuren im Zytoplasma

In der Zelle werden alle Fettsäuren unabhängig von ihrer Herkunft (exogen, Eigensynthese oder aus intrazellulärer Hydrolyse) mithilfe einer Acyl-CoA-Synthase (ACS) an Acyl-CoA gebunden und so aktiviert [58]. Die entstandenen Acyl-CoA sind generell an Proteine und Membranen gebunden [52, 57]. Diese Acyl-CoA werden dann zu den spezifischen Zellorganellen transportiert. Es gibt eine Vielfalt metabolischer Wege, die die Fettsäuren einschlagen können. Sie können sowohl in den Mitochondrien als auch in den Peroxisomen oxidiert werden [43]. Die Oxidation der Fettsäuren, z.B. in den Mitochondrien und in den Peroxisomen, dient der Energiegewinnung und dem Erhalt der Lipid-Homöostase [46, 69]. In Abb. 5 ist eine Übersicht über einige der metabolischen Wege dargestellt.

Drei weitere Wege der Lipidhomöostase sind:

Einmal die Veresterung der in das endoplasmatische Retikulum transportierten Fettsäuren, zum anderen die Einlagerung in den Lipid-Tropfen und die Regulierung der Genexpression im Nucleus [43].

1.6. Die Bedeutung der Peroxisome und Mikrosome für den Fettsäure – Carnitin – Zyklus

1.6.1. Stoffwechsel des Peroxisom

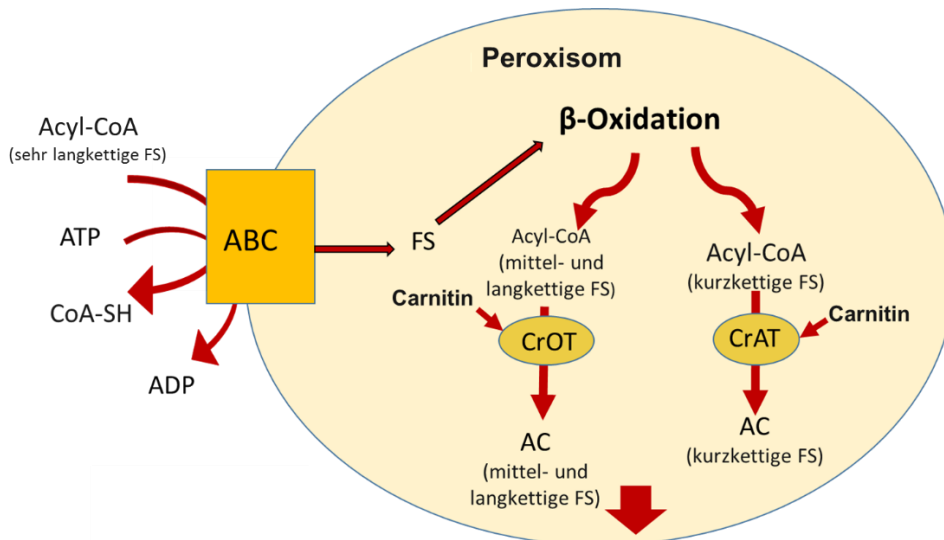


Abb.7: Schematische Darstellung des Fettsäure Metabolismus in den Peroxisomen
Erstellt nach Informationen aus: [33, 43-51, 70].

Unter physiologischen Bedingungen werden langkettige Fettsäuren über die Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) aufgenommen und primär in der mitochondrialen β -Oxidation metabolisiert. In das peroxisomale System gelangt nur ein kleiner Anteil der Fettsäuren (sehr langkettige Fettsäuren) [45]. Dies wird in Abb. 7 schematisch dargestellt. Bevorzugte Substrate für die peroxisomale β -Oxidation sind sehr langkettige Fettsäuren (24-29 Kohlenstoffatome), die kein Substrat der Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) sind, und deshalb nicht in das Mitochondrium gelangen können. Kurzkettige (4-6 Kohlenstoffatome), mittelkettige (6-12 Kohlenstoffatome) und langkettige Fettsäuren (12-24 Kohlenstoffatomen) gelangen nicht in das Peroxisom [30]. Die Acyl-CoA können über die Interaktion mit „ATP-binding cassette“ (ABC) Transportern, die auf der peroxisomalen Membran lokalisiert sind, in das Peroxisom gelangen. Es sind aktuell 3 Unterformen des ABC-Transporters bekannt: ABC 1, ABC 2 und ABC 3 [44, 46]. Alle drei Unterformen des ABC-Transporters sind „halbe Transporter“, die im Verbund als

Dimere arbeiten. Das an die Fettsäure gebundene CoA wird vom ABC-Transporter abgespalten und damit der Eintritt der freien Fettsäure in das Peroxisom ermöglicht [46-50]. Die peroxisomale β -Oxidation ist mit der β -Oxidation im Mitochondrium vergleichbar. Im Peroxisom werden die C-Atom-Ketten der Fettsäuren verkürzt. Die finalen Produkte der peroxisomalen β -Oxidation werden zur endgültigen Oxidation als CO_2 , H_2O und ATP in das Mitochondrium geschleust [70] [45, 51]. Im Peroxisom werden die Fettsäuren wieder an Carnitin gebunden, damit sie durch die Membranen von Peroxisomen und Mitochondrien geschleust werden können. Mittelkettige (6-12 Kohlenstoffatome) und langkettige Fettsäuren (12-24 Kohlenstoffatome) werden über die Carnitin-Octanoyltransferase (CrOT) an Carnitin gebunden. Kurzkettige Fettsäuren werden über die Carnitin-Acetyltransferase (CrAT) an Carnitin gebunden. Die so entstandenen Acylcarnitine werden dann aus dem Peroxisom in das Mitochondrium transportiert [30, 33, 43, 44].

1.6.2. Mikrosomaler Stoffwechsel

Im Gegensatz zu Mitochondrien und Peroxisomen findet in den Mikrosomen (Zellorganellen der Kardiomyozyten) die ω -Oxidation spezifischer Lipide statt. Die Produkte aus dem Abbau dieser Lipide werden in den mitochondrialen Metabolismus eingeschleust [33].

1.7. Die Bedeutung des Mitochondriums für den Fettsäure-Metabolismus der Kardiomyozyten

1.7.1. Der Transport von Fettsäuren über das Acyl-Carnitin-Shuttle

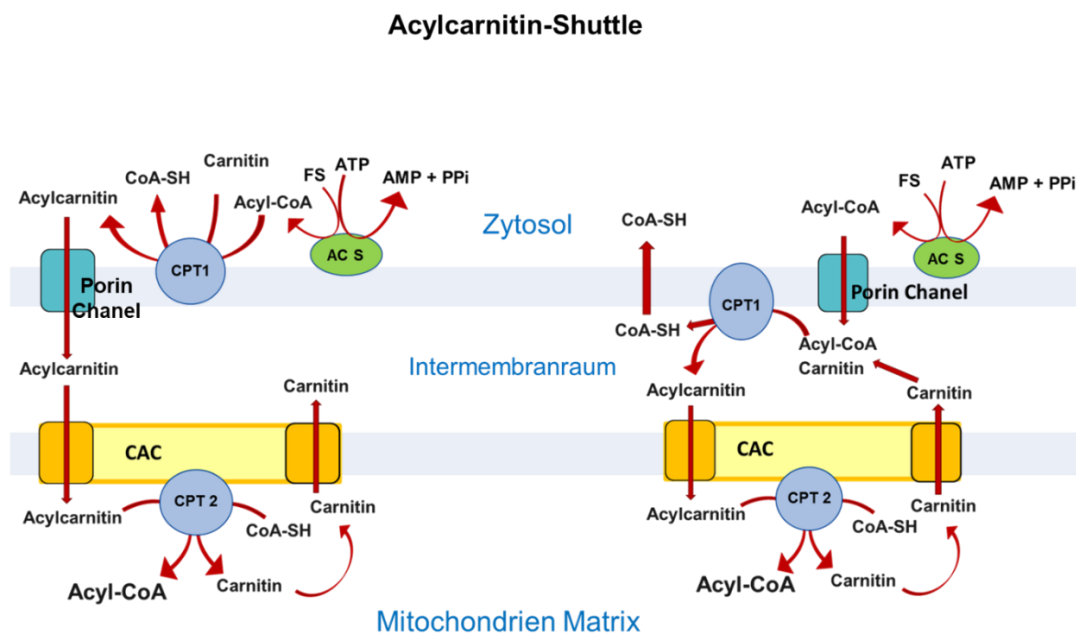


Abb.8: Schematische Darstellung des Acyl-Carnitin-Shuttles

Erstellt nach Informationen aus: [28, 29, 34, 59-62].

Die exakte Lokalisation der Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) in der äußeren Mitochondrienmembran, ob in Richtung Zytosol oder Intermembranraum, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ob der CPT1 so in den Kardiomyozyten lokalisiert ist, wie in Abb.8 dargestellt, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, deshalb sind in Abb. 8 die in der Literatur am häufigsten beschriebenen Varianten der Lokalisation der CPT1 dargestellt.

Durch den Acylcarnitin-Shuttle werden langkettige Fettsäuren in das Mitochondrium transportiert, wobei Carnitin eine Schlüsselrolle spielt [28, 59]. Generell werden in den Zellen Fettsäuren durch Katalyse von der ACS (Acyl-Coenzym A-Synthase) zu Acyl-CoA aktiviert [28]. (Siehe Abb.8) Durch einen „Porin Channel“ gelangen die als Acyl-CoA vorliegenden Fettsäuren in den intermembranösen Raum. Die innere

Mitochondrienmembran ist allerdings für CoA impermeabel [59]. Die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) in der äußeren Membran des Mitochondriums konjugiert an der 3-Hydroxylgruppe des Carnitins die Fettsäure an und spaltet das CoA ab [28, 59, 60]. Es sind 3 unterschiedliche Isoformen der Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) mit unterschiedlichen Lokalisationen im Säugetiergewebe bekannt [28]. Ebenso ist bekannt, dass nicht nur in den Mitochondrien Carnitin-Palmitoyl-Transferasen lokalisiert sind, sondern, dass auch in den Peroxisomen und dem endoplasmatischen Retikulum CPT-Aktivitäten zu finden sind [59, 71]. Mithilfe der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CAC), einem Transporter, der sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet, werden die Acylcarnitine im 1:1- Austausch zu Carnitin in die Matrix des Mitochondriums transportiert [59, 60]. Im Mitochondrium wird mit Hilfe der Carnitin-Palmitoyl-Transferase 2 (CPT2) das Carnitin abgespalten und die Fettsäure an CoA gebunden. Das Carnitin steht jetzt der CAC des „Shuttling-Cycle“ wieder zur Verfügung. Diese CPT2-Aktivität gewährleistet eine konstant bleibende Carnitin-Konzentration in der Zelle. Das CPT-Isoenzym-System (CPT1 und CPT2) kontrolliert die Rate der stattfindenden β -Oxidationen im Mitochondrium. Das Acylcarnitin-Shuttle kann unter experimentellen Bedingungen blockiert werden, indem man die CPT1, z.B. mit MalonylCoA oder Etomoxir inhibiert [28, 59, 61].

1.7.2. Der Fettsäure Metabolismus

Der Abbau von gesättigten geradzahligen Fettsäuren in der β -Oxidation:

Die β -Oxidation ist der primäre Prozess, um aus Fettsäuren Energie zu gewinnen [28]. Auch gesättigte geradzahlige Fettsäuren werden in der β -Oxidation zur Energiegewinnung genutzt, z.B. Stearoyl (18C-Atome) oder Palmitoyl (16C-Atome). Die β -Oxidation ist ein zyklischer Prozess, der aus 4 Einzelschritten besteht, die die Verkürzung der Fettsäurekette um 2 Kohlenstoffatome zur Folge hat. Die Energieausbeute der β -Oxidation beruht auf der Gewinnung von Acyl-CoA und Wasserstoff. Aus einer 16 C-Atom langen Fettsäure entstehen 8 Acetyl-CoA, 7 NADH₂ und 7 FADH₂. Es entsprechen 1 NADH₂ ca. 2,5 ATP und 1 FADH₂ ca. 1,5 ATP, dies ergibt insgesamt 28 ATP Moleküle. Im Citratzyklus werden die entstandenen 8 Acetyl-CoA Moleküle zu 24 NADH₂, zu 8 FADH₂ und zu 8 GTP sowie 16 CO₂ und 16 H₂O

Molekülen abgebaut. Die Energieausbeute bei Fettsäuren ist mit 38 kJ/g deutlich höher als bei Glukose mit 17 kJ/g [29].

Der Abbau von ungesättigten geradzahligen Fettsäuren:

Der Abbau von ungesättigten geradzahligen Fettsäuren wie Oleoyl (C18:1) erfolgt über einen Umweg. Die Doppelbindungen natürlicher Fettsäuren kommen meist in der cis-Stellung vor. Da Fettsäuren in der cis-Stellung nicht in die β -Oxidation eingeschleust werden können, wird die cis-Stellung der Doppelbindung durch die mitochondriale Isomerase zur trans-Stellung transformiert. Die trans-Doppelbindung wird mit Hilfe der Enoyl-CoA Hydratase hydratisiert und in die β -Oxidation eingeschleust [29].

Der Abbau von gesättigten ungeradzahligen Fettsäuren:

Ungeradzahlige gesättigte Fettsäuren wie Propionyl-CoA, das nur 3 C-Atome lang ist, können nicht in der β -Oxidation verstoffwechselt werden. Damit die ungeradzahligen gesättigten Fettsäuren in den Citratzyklus eingeschleust werden können, werden sie um ein weiteres C-Atom (aus CO_2) verlängert und zu Succinyl-CoA transformiert [29].

Die einzelnen Reaktionsschritte sind in Abb.9 dargestellt.

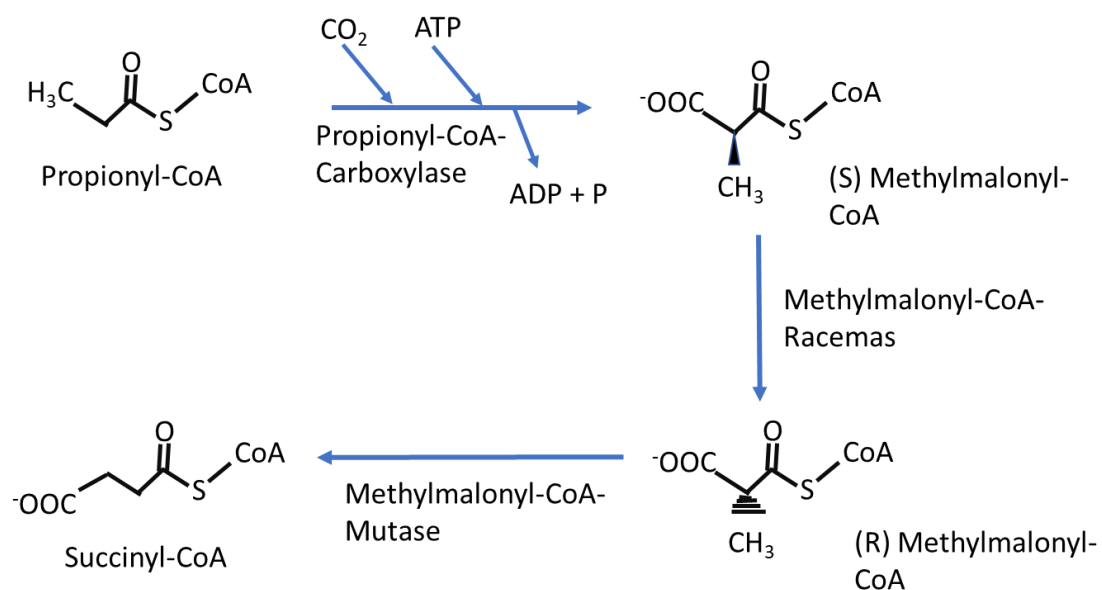


Abb.9: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zum Abbau von Propionyl-CoA. Erstellt nach Informationen aus: [29].

1.7.3. Der Ketonkörper Metabolismus

Dem menschlichen Herzen stehen neben Kohlenhydraten und Fetten noch weitere Nährstoffe zur Energiegewinnung zur Verfügung. Zu diesen zählen unter anderem die Ketonkörper. Ketonkörper werden in den Mitochondrien der Hepatozyten gebildet. Diese werden von der Leber nicht selbst verbraucht, sondern in das Blut abgegeben. Die gebildeten Ketonkörper werden vor allem von Herz- und Skelettmuskulatur als Energielieferant genutzt. Zu den Ketonkörpern zählen Acetoacetat, β -Hydroxybutyrat und Aceton.

Bei der Bildung von Ketonkörpern aus AcetylCoA Molekülen entsteht zunächst Acetoacetyl-CoA. Diese Reaktion entspricht der Umkehrung des letzten Schrittes der β -Oxidation. Das synthetisierte Acetoacetyl-CoA reagiert mit einem weiteren AcetylCoA, woraufhin 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA entsteht. Aus dem gebildeten 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA entsteht Acetoacetat, aus welchem 3-Hydroxybutyrat und Aceton gebildet werden können. Die Synthese von Ketonkörpern kommt vermehrt in Stoffwechsellagen vor, in denen ein relativer Glucosemangel herrscht. Es kommt z.B. bei verminderter Nahrungsaufnahme / Fasten oder Diabetes mellitus zu einem vermehrten Fettsäureabbau und somit zu einem Anstieg der Acetyl-CoA Konzentration und zu einer vermehrten Ketonkörpersynthese. Insbesondere Herz- und Skelettmuskulatur sowie der Kortex der Niere nutzen diese Ketonkörper als Energiequelle. Das Zentralnervensystem kann nach einer Gewöhnungsphase ebenfalls Ketonkörper verstoffwechseln, da Ketonkörper unabhängig von Insulin aufgenommen werden können. Acetoacetat und 3-Hydroxybutyrat können z.B. vom Myokard wieder in Acetyl CoA umgewandelt und in den Citratzyklus eingeschleust werden. Aceton, welches durch spontane Decarboxylierung aus Acetoacetat entsteht, kann im Stoffwechsel nicht weiterverwendet werden und wird über den Urin und über die Atemluft unverändert ausgeschieden [72].

1.7.4. Der Citratzyklus

Der Citratzyklus ist teilweise in der mitochondrialen Matrix und teilweise auf der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Die C-Fragmente, die aus dem Abbau von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Fettsäuren gewonnen werden,

münden im aeroben Gewebe in den Citratzyklus, den zentralen Abbaumechanismus für alle Nährstoffe, ein. Der Citratzyklus besteht aus einer zyklischen Sequenz von insgesamt 8 Reaktionen und ist die erste Stufe des oxidativen Stoffwechsels („Atmung“). Im Citratzyklus entstehen NADH und FADH₂ sowie GTP Moleküle, die anschließend in die Atmungskette geschleust werden. Da NADH und FADH₂ überwiegend in der Atmungskette verbraucht werden, läuft der Citratzyklus ebenfalls überwiegend unter aeroben Bedingungen ab [29].

1.8. Stoffwechsel Regulation durch den Randle Cycle

Den Zellen im menschlichen Körper stehen eine Vielzahl an unterschiedlichen Nährstoffen zur Verfügung. Kommt es im Blut zu einer erhöhten Menge an Glucose oder Fettsäuren, wird in der Zelle ein Auswahlmechanismus aktiv, der bestimmt, welches Substrat zuerst verstoffwechselt wird. Dieser Auswahlmechanismus kann mit dem Randle Cycle beschrieben werden [73].

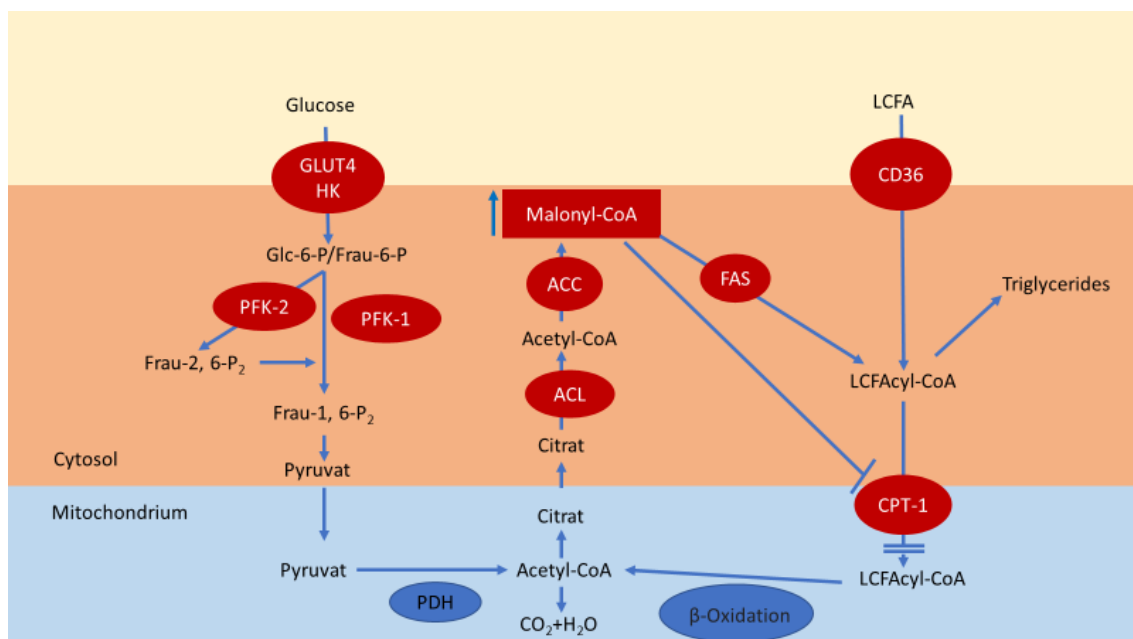


Abb.10: Randle Cycle, Zustand A, Hemmung der Verstoffwechslung von Fettsäuren
Erstellt nach Informationen aus: [73].

Der Randle Cycle beschreibt im Wesentlichen zwei Zustände des Zellstoffwechsels. In Zustand A liegt ein Überschuss an Glucose im Blut vor (dargestellt in Abb. 10). Die hohe Glucosekonzentration bewirkt eine erhöhte Glucoseaufnahme und Abbaurrate in der Zelle. Es entsteht ein erhöhtes Citratvorkommen im Mitochondrium. Das Citrat gelangt über die Mitochondrien-Membran ins Cytosol der Zelle und bewirkt dort über den Aufbau von MalonylCoA die Blockade des CPT1 Transporters. Der CPT1-Transporter ist Teil des Acylcarnitin-Shuttles, welches die Aufnahme langkettiger Fettsäuren in das Mitochondrium bewirkt. Durch die Blockade des CPT1-Transporters wird also die Aufnahme der Fettsäure in das Mitochondrium gehemmt und der Aufbau von Triglyceriden über die „fatty acid synthase“ (FAS) zur Lagerung z.B. im Fettgewebe gefördert. Hohe Glucosekonzentrationen bewirken also eine Hemmung des Fettsäureabbaus und eine Steigerung der Triglyceridaufbaus.

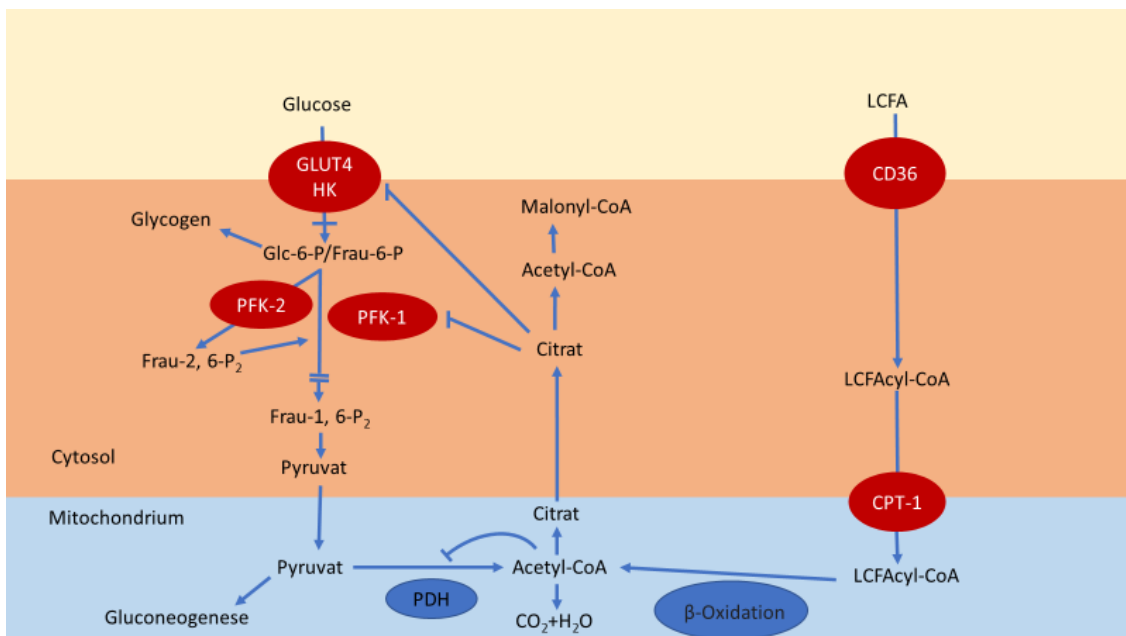


Abb. 11: Randle Cycle, Zustand B, Hemmung der Verstoffwechsellage von Glucose
Erstellt nach Informationen aus: [73].

In Zustand B des Randle Cycle liegt eine höhere Konzentration an Fettsäuren und eine niedrigere Konzentration an Glucose im Blut vor. Dies wird in Abb. 11 dargestellt. Der CD36 Transporter bewirkt unter anderem eine Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in die Zelle. Diese werden dann an CoA gebunden und zum Acylcarnitin-Shuttle

transportiert. In der β -Oxidation werden die aufgenommenen Fettsäuren zu Acetyl-CoA abgebaut. Ein Anstieg der Acetyl-CoA Konzentration im Mitochondrium bewirkt eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase (PDH). Diese Hemmung bewirkt, dass Pyruvat nicht weiter zu Acetyl-CoA verstoffwechselt werden kann. Durch den vermehrten Fettsäure-Abbau kommt es zu einer steigenden Konzentration an Acetyl-CoA und damit auch an Citrat. Dieser Citrat-Anstieg bewirkt eine Hemmung der Phosphofruktokinase (PFK) und des GLUT4 Transporters. Der GLUT4 Transporter bewirkt die Aufnahme von Glucose in die Zelle. Im Zytosol der Zelle wird über die Glycolyse, bei der auch die Phosphofruktokinase beteiligt ist, die Glucose zu Pyruvat abgebaut. Es kommt also zu einer Hemmung der Aufnahme und Verstoffwechslung von Glucose. Hohe Fettsäurekonzentrationen bewirken also eine Hemmung der Glucose Verstoffwechslung [73].

1.9. Der Weg der Fettsäuren als Acylcarnitine zurück ins Blutplasma

Im Mitochondrium können die an CoA gebundenen Fettsäuren zur Energiegewinnung in die β -Oxidation münden [67]. Sie können aber auch mit Hilfe des mitochondrialen Carnitin-Acylcarnitin-Transporters (CAT) erneut an Carnitin gebunden werden [31, 34, 63]. Die dabei neu gebildeten Acylcarnitine werden mit CAC-Transportern aus dem Mitochondrium transportiert. Die Acylcarnitine können mit dem OCTN2 Transporter im Austausch gegen Na^+ und Carnitin komplett die Zelle wieder verlassen [66, 67]. Abb. 12 zeigt diesen Stoffwechselweg schematisch auf.

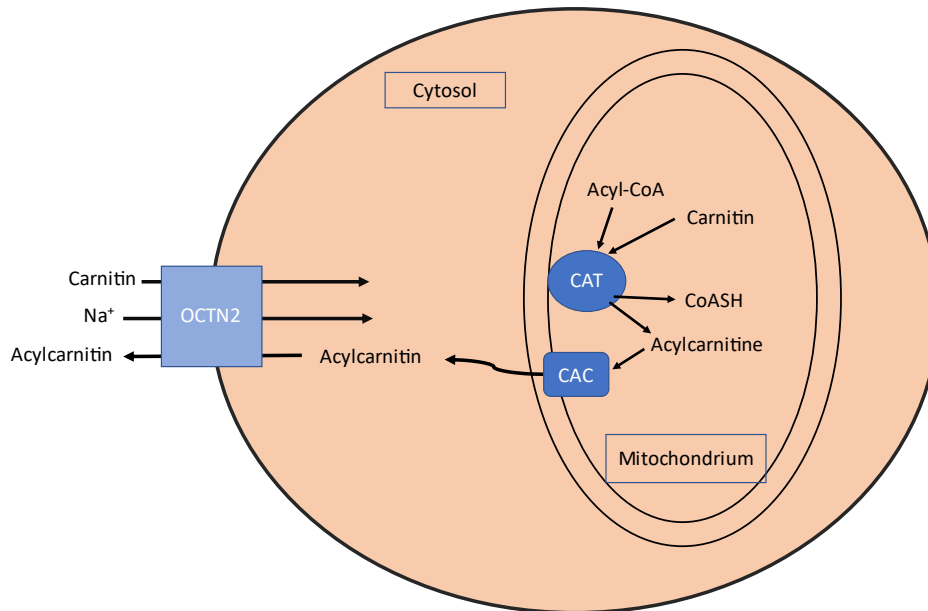


Abb. 12: Schematische Darstellung der Transportwege der Acylcarnitine.
Erstellt nach Informationen aus: [31, 34, 63] [66, 67].

1.9.1. OCTN Transporter

Der OCTN-Transporter gehört zu einer kleinen Subfamilie von Membran-Transport-Proteinen, die zur größeren Gruppe der SLC22 Familie gehören [34] [26]. Zur SLC22-Familie gehören viele Proteine, welche meist den Transport von organischen Kationen und Anionen katalysieren. Charakterisierend für die Proteine der SCLC22-Familie sind 12 hydrophobe Membran-Spanning-Segmente mit einer α -helikalen Sekundärstruktur, die mit einer hydrophoben Aminoacidschleife verbunden sind. Diese Transporter regulieren eine Reihe von Schlüssel-Metaboliten und Signal-Molekülen [34]. Die meisten Mitglieder der SCLC22-Familie werden als polyspezifisch betrachtet, weil sie viele organische Komponenten mit unterschiedlichen Strukturen, inklusive Medikamente, erkennen können. Die OCTN2 Transporter gelten einerseits sehr spezifisch für ein oder mehrere Substrate, andererseits sind sie als polyspezifische Transporter für viele Komponenten und Medikamente gelistet. Zwei der drei bekannten OCTN-Transporter sind im menschlichen Gewebe identifiziert worden. Diese wurden mit OCTN1 (SLC22A4) und OCTN2 (SLC22A5), welche zu 65% die gleiche Gensequenz haben, benannt. OCTN3 wurde nicht im humanen Gewebe gefunden. Der OCTN2-Transporter

spielt eine entscheidende Rolle in der Aufnahme von Carnitin aus der Nahrung und der Verteilung der Carnitine im humanen Gewebe. Ebenfalls werden von den OCTN2-Transportern Carnitin-Derivate in die unterschiedlichsten Gewebe transportiert. Die Rolle des OCTN1-Transporters ist noch nicht vollständig geklärt [34]. Die hoch affinen OCTN2-Carnitin-Transporter spielen eine regulierende Schlüsselrolle in der Carnitin Homöostase sowie des Acylcarnitinflusses [33, 34, 64, 65]. Dieser OCTN2-Transporter ist vermehrt im Herzen, im Muskel und in den Nieren vorhanden [41]. Der OCTN2-Transporter bewirkt einen elektrogenen Co-Transport von Na^+ , Carnitin und verschiedenen Carnitin-Derivaten. Endogene und exogene Carnitin-Derivate sind Substrate des OCTN2-Transporters. Acetylcarnitine und Acylcarnitine mit unterschiedlichen C-Atom-Kettenlängen lassen sich als physiologische Substrate des OCTN2-Transporters benennen. Der Transport von Carnitin durch den OCTN2-Transporter wird nicht durch die Veresterung von Carnitin, durch ein Acyl-Derivat, an der Carnitin-Hydroxylgruppe beeinträchtigt. Es gibt Vermutungen, dass der OCTN2-Transporter Transportfunktionen in die Zelle hinein haben könnte [34].

1.10. Problemstellung und Zielsetzung der Doktorarbeit

In Vorarbeiten unserer Kooperationspartner wurde beobachtet, dass erhöhte Konzentrationen von Acyl-Carnitinen im Blut mit dem Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert ist. Um zu klären, ob die erhöhten Acyl-Carnitine zu der Pathologie des Vorhofflimmerns beiträgt, war es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Acylcarnitinen auf die Funktion kardialer Mitochondrien zu untersuchen, da frühere Arbeiten zeigten, dass mitochondriale Dysfunktion zu Vorhofflimmern beitragen kann [12, 18]. Hierfür wurden kardiale Mitochondrien aus den Ventrikeln von C57BL/6N-Mäusen isoliert und Respirationmessungen mit einer Clark Elektrode durchgeführt. Mit der indirekten Messung des Metabolismus über die Respiration (Sauerstoffverbrauch) der Mitochondrien sollte ein Modell zur Erforschung der verschiedenen Einflüsse der Acylcarnitine auf den Metabolismus der Mitochondrien erstellt werden. Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit sollten dann in das komplexe metabolische System des Myokardstoffwechsels eingeordnet werden.

2. Material und Methodenteil

2.1. Versuchstiere

Das kardiale Gewebe und somit die Mitochondrien, die für die Versuche verwendet wurden, wurden aus dem Herz einer Maus gewonnen. Hierfür wurden nur wildtypische C57BL/6N Charles River Mäuse verwendet. Die C57BL/6N Charles River Mäuse haben eine schwarze Fellfarbe und werden mit dem MHC Haplotype: H2b; Strain Code: 027 klassifiziert. Die verwendeten Versuchstiere wurden bei der Charles River Germany GmbH & Co. KG (Sulzfeld, Deutschland) käuflich erworben. Bei den Versuchen wurden männliche Tiere im Alter von 12-16 Wochen verwendet [74].

2.1.1. Ethik- und Tierversuchsvotum

Zur Erstellung dieser Dissertationsarbeit musste kein zusätzlicher Antrag bezüglich „Ethik und Tierversuchsvotum“ gestellt werden. Alle benötigten Genehmigungen lagen der AG Maack und Professor Dr. Christoph Maack vor. Alle Tötungen der Versuchstiere wurden von entsprechend ausgebildeten Fachpersonal durchgeführt.

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit der europäischen Ethikverordnung (Richtlinie 2010/63/EU) durchgeführt. Die durchgeführten Versuchsreihen wurden von der Tierschutzkommission der medizinischen Fakultät und des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes geprüft und genehmigt.

Hierbei wurden die Mäuse bei einer Raumtemperatur zwischen 25 und 28 °C und einem natürlichen Tag-/Nacht-Rhythmus in Käfigen unter standardisierten Bedingungen gehalten.

2.2. Versuche mit isolierten kardialen Mitochondrien für Respirationsmessungen an der Clark Elektrode

2.2.1. Isolation kardialer Mitochondrien nach Mela & Seitz

Alle Isolationsschritte sowie die dazugehörigen Puffer und Materialien wurden auf Eis durchgeführt, damit die Mitochondrienfunktion möglichst lange erhalten blieb. Die für die Respirationsmessungen benötigten Mäuse (C57BL/6N), wurden mittels Genickbruch getötet. Das Herz der Mäuse wurde daraufhin aus dem Brustkorb entnommen, vom umgebenden Gewebe freipräpariert und das Blut herausgewaschen. Nachdem man die Ventrikel von den Vorhöfen abgetrennt hatte, wurden sie in ein Eppendorfgesäß mit 500 µl BSA (4mg/ml), Proteinase-Lösung (0,16 mg/ml) überführt. In der Lösung wurden die Ventrikel mit einer Schere zerkleinert. Das zerkleinerte Herzventrikelgewebe wurde danach im Homogenisator 7 Minuten lang homogenisiert, daraufhin wurde ein 500 µl BSA-Proteinase-Gemisch zugegeben und weitere 7 Minuten lang homogenisiert. Diese Suspension wurde dann in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge (Heraeus Fresco 21 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham) bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugation setzten sich die Zelltrümmer der Kardiomyozyten in Form eines Pellets von der mitochondrienhaltigen Suspension ab, da Mitochondrien ein niedrigeres spezifisches Gewicht haben. Die mitochondrienhaltige Suspension wurde abgenommen und 10 Minuten lang mit 7700 g zentrifugiert. Dadurch wurde die mitochondriale Fraktion von der zytosolischen Fraktion getrennt, die Mitochondrien lagen als Pellet vor. Es folgten 2 Waschschrte des Mitochondrien-Pellets. Dieses wurde mit 400 µl MSS-Lösung resuspendiert und mit 1 ml MSS vermischt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit der Mitochondrien-MSS-Suspension bei 4°C und 7700 g, für 10 Minuten, um die Mitochondrien aus der Suspension zu waschen. Mit dem jetzt erhaltenen Mitochondrien-Pellet wurde derselbe Resuspensions- und Zentrifugationsvorgang wiederholt. Das dabei gewonnene Pellet wurde in 100 µl MSS resuspendiert. Von dieser Suspension nahm man 2 µl ab und bestimmte mittels Bio-Rad Dc Protein Assay nach Lowry 1951 den Proteingehalt der Suspension [23, 75].

2.2.2. Aufbau und Funktion der Clark Elektrode

Die Clark-Elektrode wurde 1953 von Leland Clark entwickelt. Mit dieser speziellen Elektrode ist es möglich, polarographisch die Sauerstoffkonzentration verschiedener Lösungen, die sich in der Messkammer befinden, zu bestimmen.

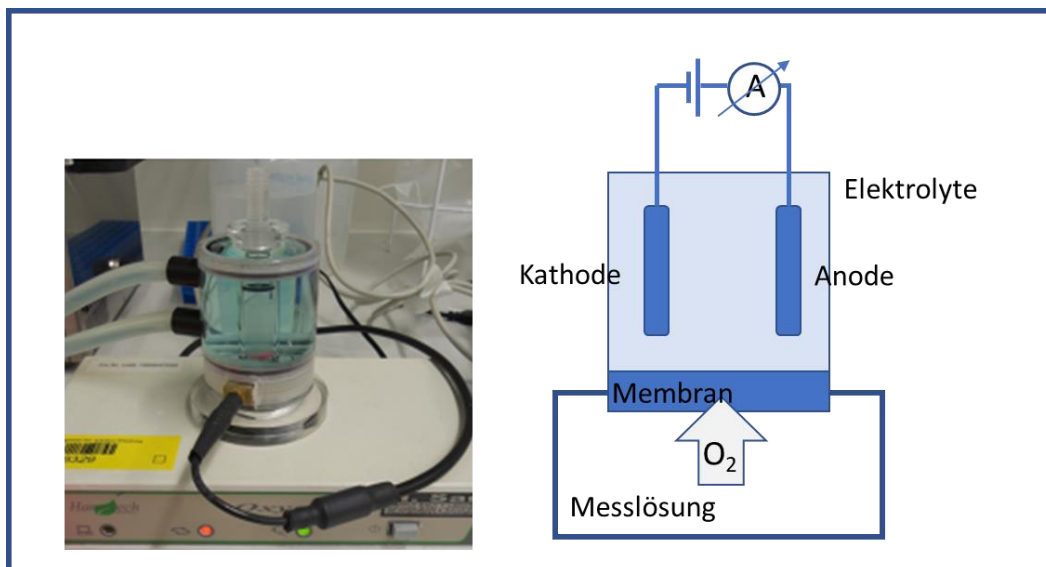


Abb. 13: Aufbau einer Clark-Elektrode
Erstellt nach Informationen aus: [76-79].

Die Clark-Elektrode (Abb. 13) besteht aus einer Silber-Anode und einer Platin-Kathode. Diese befinden sich in einem Messzylinder. Der Messzylinder ist von einem beheizten Wasserbad von 37°C umgeben. So ist immer eine konstante Temperatur, 37°C, der Messlösung gewährleistet. Anode und Kathode der Clark-Elektrode stehen über eine 1 M Elektrolyt KCl-Lösung miteinander in Verbindung. Eine sauerstoffdurchlässige Membran trennt Anode und Kathode von der Messlösung. An der Platin-Kathode liegt eine Polarisierungsspannung von -0,4 bis -0,8 V gegen die Silber-Anode an. Man befüllt die Messkammer mit einer Messlösung (z.B.: Atmungspuffer, Blut), dabei wird die sauerstoffdurchlässige Membran mit der Messlösung benetzt. Der in der Messlösung enthaltene O_2 diffundiert entsprechend seinem Partialdruck durch die Membran. Dieser O_2 -Transport ermöglicht die Messung der Sauerstoffkonzentration der Messlösung. Die Kathode reduziert den Sauerstoff durch die Abgabe von Elektronen an die O_2 Moleküle.

Es entstehen Hydroxid-Ionen (OH^-). Das in der Anode enthaltene Silber wird vom Chlorid aus der KCl Elektrolytlösung zu Silberionen oxidiert. Hierbei entstehen freie Elektronen, die ein messbares Signal erzeugen. Die oxidierten Silberionen bilden eine unlösliche AgCl-Kruste, die sich an der Anode anlagern, weil diese AgCl Kruste die elektrische Leitfähigkeit der Messanordnung behindert, muss sie vor der Messung entfernt werden.

Kathode: $\text{O}_2 + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{OH}^-$ und $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{OH}^-$

Anode: $4 \text{Ag} \rightarrow 4 \text{Ag}^+ + 4\text{e}^-$ und $4 \text{Ag}^+ + 4\text{Cl}^- \rightarrow 4 \text{AgCl}$

Der durch den Elektronenaustausch zwischen Kathode und Anode entstandene Strom ist proportional zum Partialdruck des Sauerstoffs in der Messlösung und wird mit einem Nanoampèremeter gemessen. Die Umrechnung der gemessenen Stromstärke zur Sauerstoffkonzentration in der Messlösung wird von dem zum System gehörenden Computerprogramm Oxygraph Plus bewerkstelligt. Auf diese Weise können die aktuelle Sauerstoffkonzentration und die Schwankungen des Sauerstoffgehalts der Messlösung aufgezeichnet werden. Wenn in der Messlösung vitale isolierte Mitochondrien enthalten sind, können diese durch Zugabe von Substraten z.B. Pyruvat/Malat oder Glutamat/Malat bzw. PalmitoylCoA und ADP, je nach Substratzugaben zu unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten angeregt werden. Dies zeigt sich bei den Respirationmessungen im unterschiedlichen Sauerstoffverbrauch. So sind Pyruvat/Malat oder Glutamat/Malat Komplex-I Substrate, während PalmitoylCoA ein Substrat der β -Oxidation ist. Dieser Sauerstoffabfall wird durch das Computerprogramm Oxygraph Plus graphisch dargestellt und kann in Echtzeit mitverfolgt werden. Die Auswertung der erhobenen Messdaten erfolgt über das Computer Programm Oxygraph Plus, Version 1.02, demselben Programm, mit dem die Messungen aufgezeichnet wurden. Die mit dem Computerprogramm Oxygraph Plus erhaltenen Messdaten wurden mit Microsoft Excel 2010 weiterverarbeitet. Die graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism Version 6.01 [76-79].

2.2.3. Auswertung der Messdaten

Die Auswertung und Darstellung der Messergebnisse wurden von Melanie Kern unter Anleitung von Dr. Alexander Nickel mit folgenden Programmen durchgeführt:

Oxygraph Plus

Mit dem Programm Oxygraph Plus wurden die direkten Messdaten der Clark-Elektrode erfasst und als Respirationskurven graphisch dargestellt. Dieser Rohdatensatz wurde mit Microsoft Excel verarbeitet und in das Programm GraphPad Prism 6 eingespeist.

GraphPad Prism 6

Die Erstellung der Graphen und Abbildungen erfolgte über das Programm GraphPad Prism 6. Die dazugehörige statistische Auswertung und die Signifikanzüberprüfung erfolgte ebenfalls im Programm GraphPad Prism. Es wurden für den Vergleich zweier Gruppen die 2 Wege ANOVA (=Two-way ANOVA) verwendet. Für den Vergleich von Datensätzen innerhalb einer Gruppe wurde die 1-Weg-ANOVA (=One-way ANOVA) verwendet.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P-Wert) wurde wie folgt in den Abbildungen dargestellt:

#	<0,05
##	<0,01
###	<0,001
####	<0,0001

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

Die Ergebnisse des Bonferoni-Post-Testes wurden mit Sternchen (*****) und grafisch mit Klammern in der Abbildung erkennbar gemacht. Die Signifikanzniveaus wurden analog wie vorher angegeben dargestellt:

*	<0,05
**	<0,01
***	<0,001
****	<0,0001

Die Verarbeitung und Formatierung dieser Dissertation und aller erhobenen Daten wurden mit den Programmen Excel, Word und PowerPoint durchgeführt.

2.2.4. Einteilung der mitochondrialen States für Respirationsmessungen

Die Messungen der Respiration der Mitochondrien an der Clark-Elektrode sind in unterschiedliche States gegliedert. Diese 4 States beschreiben verschiedene metabolische Zustände der Mitochondrien. Eine exemplarische Darstellung ist in Abb. 14 zu sehen. Der metabolische Zustand isolierter Mitochondrien kann durch die Zugabe von Substrat z.B. Pyruvat/Malat oder Glutamat/Malat oder PalmitoylCoA und ADP in die Messkammer beeinflusst werden.

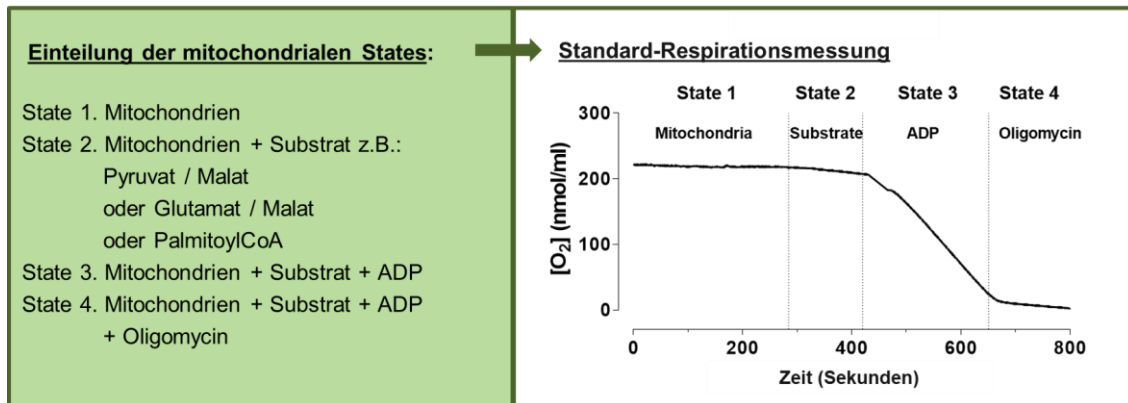


Abb.14: Einteilung der mitochondrialen States mit exemplarischer Darstellung einer Atmungsmessung

State 1

State 1 beschreibt den Zustand der Mitochondrien in Abwesenheit von Substrat und ADP (Adenosindiphosphat). Im State 1 befinden sich nur Mitochondrien, gelöst in 2ml Atmungspuffer (AP), in der Messkammer. Da keine weiteren Substrate zu den Mitochondrien dazu gegeben worden sind, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nur die minimale Eigenrespiration der Mitochondrien messen. Wird nun zu den Mitochondrien des State 1 ein Substrat zugefügt, wird dieser Zustand als State 2 bezeichnet.

State 2

Nach Zugabe eines oder mehrerer Substrate aber ohne ADP (Siehe Abb.38) kann eine geringfügige Respiration gemessen werden. Diese niedrige State 2 Atmungsrate wird teilweise durch das Mitochondrien eigene, geringfügige ADP ermöglicht oder durch einen geringen Anteil an entkoppelten Mitochondrien erzeugt.

State 3

In State 3 wurde ADP zu den Mitochondrien und dem Substrat hinzugefügt. Durch die Zugabe von ADP erhöhte sich die ATP Produktion an der F₁F₀-ATPase. Dadurch wurde die Atmungskette stimuliert und es konnte eine höhere mitochondriale Respiration gemessen werden. Die Stärke der Respiration kann durch die Zugabe verschiedener ADP-Konzentrationen gesteigert oder limitiert sein (durch Phosphorylierung von ADP zu ATP). Eine geringe Respiration lässt sich durch Erhöhung der ADP-Konzentration steigern. Ist die maximale Atmungsaktivität der Mitochondrien erreicht, kann diese nicht

mehr durch Zugaben von ADP erhöht werden. Die maximale Atmungsaktivität ist eine wichtige Kenngröße der mitochondrialen Respirationsmessung. Ist ADP vollständig verbraucht worden und zu ATP phosphoryliert, flacht die Respirationskurve ab und geht in den State 4 über, welcher bei intakten Mitochondrien in etwa im Größenbereich der State 2 Atmung liegt. Durch erneute ADP Zugabe kann daraufhin aber die Respiration wieder angeregt werden.

State 4

Der State 4 wird durch die Zugabe von Oligomycin zu der Mitochondrien-Suspension künstlich induziert. Oligomycin, ein von Streptomyces produziertes Antibiotikum, bindet an eine Untereinheit von F₀ der F₀F₁-ATPase. So inhibiert Oligomycin die F₀F₁-ATPase am Ende der Atmungskette, stoppt somit die ATP-Produktion und damit den Sauerstoffverbrauch. In State 4 wurde dadurch ein Zustand der Mitochondrien Atmung in Abwesenheit von ADP simuliert, weil durch die Entkopplung der F₁F₀-ATPase durch das Oligomycin am Ende der Atmungskette kein Sauerstoff mehr verbraucht wurde. Dieser Vorgang kann in vivo nicht beobachtet werden und dient der Beurteilung der Funktionsfähigkeit der Mitochondrien invitro. Eine minimale Restatmung im State 4 wird als „Leak-Atmung“ bezeichnet. Sie gibt Aufschluss über eine funktionierende innere Mitochondrienmembran bzw. erbringt den Nachweis, dass die Atmungskette der Mitochondrien nicht entkoppelt war. Die „Leak-Atmung“ ist das Resultat des Protonenflusses zwischen Intermembranraum und Mitochondrien Matrix. Dieser Protonenfluss wird durch die Entkopplung der F₀F₁-ATPase der mitochondrialen Atmungskette durch Oligomycin in State 4 hervorgerufen. Diese „Leak-Atmung“ ist in etwa so stark wie die State 2 Respiration [29, 80].

2.2.5. Respirationsmessungen mit isolierten kardialen Mitochondrien

400 µg Mitochondrien gelöst in Atmungspuffer ergeben ein Gemisch von 2 ml Gesamtvolumen. Dieses Gemisch wird in die Messkammer pipettiert, die danach verschlossen und die Messung gestartet wird. Die nun erfassten Messdaten entsprechen dem State 1. Sobald die Elektrode einen stabilen Arbeitszustand anzeigt, wurde mit der Hamilton Spritze Substrat z.B. Pyruvat/Malat, Glutamat/Malat oder PalmitoylCoA zugegeben (State 2).

Beschreibung des Standard-Messprotokolls:

Das Standard Messprotokoll wurde oft als Positiv-Kontrolle zur Evaluation der mitochondrialen Atmung als Ausdruck ihrer Vitalität verwendet. Für die Versuchsanordnung des Standard Messprotokolls wurde eine Kombination aus Pyruvat (5 mM) und Malat (5 mM) als Substrat verwendet. 3 Minuten nach Zugabe von Pyruvat / Malat als Substrat, wurde jeweils im Abstand von etwa 2 Minuten ADP in aufsteigender Konzentration von 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M und 1mM zugegeben. Bei einer ADP-Konzentration von 1 mM hat man die maximale Respirationsfähigkeit der Mitochondrien erreicht. Durch die Zugabe höherer ADP-Konzentrationen kann die Respiration nicht weiter gesteigert werden. Durch die Zugabe von 1,2 μ M Oligomycin und einer Wartezeit von 3 Minuten wurde der State 3 in den State 4 des Protokolls überführt.

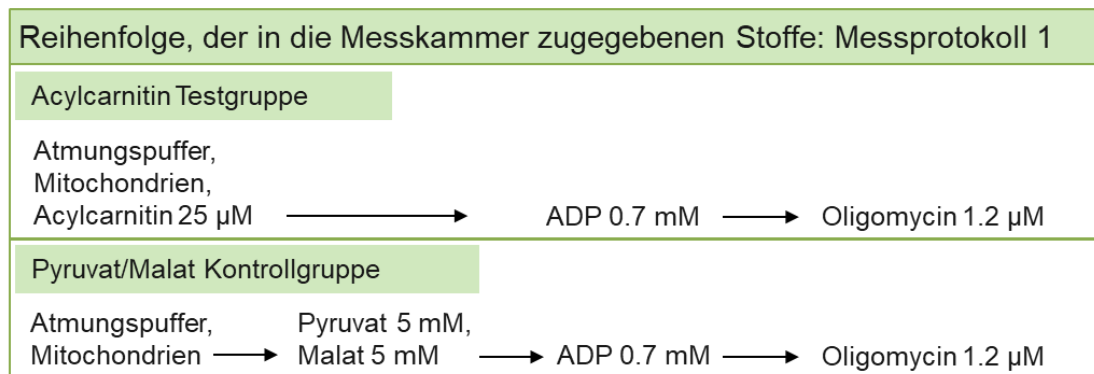
2.3. Übersicht über die für die Versuche verwendeten Protokolle

Die verschiedenen Protokolle beschreiben den Versuchsaufbau der Experimente. Alle Messungen der Respiration sind, wie zuvor beschrieben, in 4 States eingeteilt. Alle Konzentrationsangaben in den Protokollen beziehen sich auf die Endkonzentration der einzelnen Substanzen, jeweils gelöst in 2 ml Atmungspuffer, in der Messkammer. Die genaue Menge der benötigten Mitochondrien wurde für jeden Versuchstag mit Hilfe der Proteinbestimmung ermittelt [75]. Im Folgenden ist der Ablauf der verschiedenen Messprotokolle für die Respirationsmessungen mit der Clark Elektrode beschrieben. Es wurden Protokolle mit unterschiedlichen Substraten z.B. Pyruvat/Malat, PalmitoylCoA, Glutamat/Malat sowie unterschiedlichen Testsubstanzen Propionylcarnitin, Oleoylcarnitin, Stearoylcarnitin, Etomoxir und Carnitin erstellt. Bei den einzelnen Versuchen variierten sowohl die Konzentrationen als auch die Reihenfolge der zugegebenen Substanzen. Die unterschiedlichen Protokolle sollten die physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen der Acylcarnitine auf die kardialen Mitochondrien näher erforschen.

2.3.1. Messprotokoll 1

Interaktion von Acylcarnitinen mit isolierten kardialen Mitochondrien

Einfluss von 25 μM Oleoylcarnitin oder Stearoylcarnitin auf die Respiration kardialer Mitochondrien



Tab.2: Schematische Darstellung Messprotokoll 1

Acylcarnitin Testgruppe:

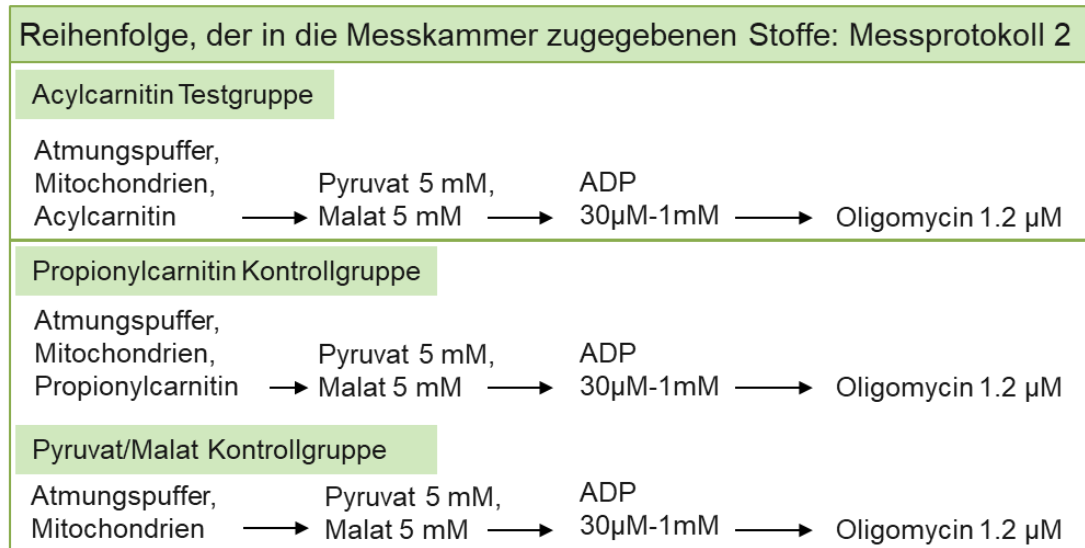
Atmungspuffer, Mitochondrien und 25 μM Oleoylcarnitin oder 25 μM Stearoylcarnitin wurden in die Messkammer der Clark-Elektrode appliziert und die Messung gestartet. Nach Ablauf von 3 Minuten wurde 0.7 mM ADP zugegeben und weitere 3 Minuten lang inkubiert. Die Messung der Respiration wurde mit der Zugabe von 1.2 μM Oligomycin nach weiteren 3 Minuten beendet.

Pyruvat/Malat Kontrollgruppe:

Atmungspuffer und Mitochondrien wurden zunächst in die Messkammer appliziert und die Respiration gemessen. Daraufhin folgte eine Inkubationsphase von 1 Minute, nach welcher 5 mM Pyruvat und 5 mM Malat zugegeben wurden. Nach Ablauf von 3 Minuten wurde 0.7 mM ADP zugegeben und weitere 3 Minuten inkubiert. Diese Messung endete mit der Zugabe von 1.2 μM Oligomycin nach weiteren 3 Minuten.

2.3.2. Messprotokoll 2

Respirationsmessung kardialer Mitochondrien mit Pyruvat / Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 1.



Tab.3: Schematische Darstellung Messprotokoll 2

Acylcarnitin Testgruppe:

Es wurden von Oleoylcarnitin und Stearoylcarnitin folgende Konzentrationen getestet: 0µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 25 µM. Zu Atmungspuffer und Mitochondrien wurden verschiedene Konzentrationen von Stearoylcarnitin oder Oleoylcarnitin in die Messkammer der Clark-Elektrode gegeben, und die Messung gestartet. 60 Sekunden später wurden 5 mM Pyruvat/Malat zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 180 Sekunden wurde schrittweise ADP in aufsteigenden Konzentrationen von 30 µM, 100 µM, 300 µM und 1 mM zugegeben. Mit der Zugabe von 1.2 µM Oligomycin endete die Messung nach weiteren 3 Minuten mit dem Tod der Mitochondrien.

Propionylcarnitin als Kontrollgruppe:

Mit derselben Versuchsanordnung wie bei den Experimenten mit den Acylcarnitin Testgruppen wurde mit 25 µM Propionylcarnitin als Kontrollgruppe getestet. Es sollte der Einfluss einer so hohen Acylcarnitin-Konzentration gemessen werden. Da Propionylcarnitin selbst in der verwendeten Höchstkonzentration von 25 µM keinen Einfluss auf die Atmung der Mitochondrien hatte, konnte Propionylcarnitin als Kontrollgruppe verwendet werden. Im menschlichen Körper kommt, wie bis jetzt

bekannt, Propionyl (3 C-Atome) an Carnitin gebunden nicht vor. Propionyl, das mit der Nahrung aufgenommen wird, wird an Glycerin oder CoA gebunden, verstoffwechselt. Es bleibt auch zu fragen, ob das Propionylcarnitin überhaupt mit dem Metabolismus der kardialen Mitochondrien interagieren kann.

Pyruvat/Malat Kontrollgruppe:

Es wurden außerdem Messungen in Abwesenheit von Acylcarnitinen durchgeführt, um die Vitalität der Mitochondrien ohne Einfluss von Acylcarnitinen zu messen.

2.3.3. Messprotokoll 3

Respirationsmessung kardialer Mitochondrien mit Pyruvat / Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3.

Reihenfolge, der in die Messkammer zugegebenen Stoffe: Messprotokoll 3				
Testgruppe				
Atmungspuffer, Mitochondrien	→ Pyruvat 5 mM, Malat 5 mM	→ ADP 0.7 mM	→ Acylcarnitin 10-25µM	→ Oligomycin 1.2 µM
Kontrollgruppen				
Atmungspuffer, Mitochondrien	→ Pyruvat 5 mM, Malat 5 mM	→ ADP 0.7 mM	→ Propionylcarnitin 10-25µM	→ Oligomycin 1.2 µM

Tab.4: Schematische Darstellung Messprotokoll 3

Der Ablauf dieses Versuchsaufbaus war nahezu identisch mit den zuvor beschriebenen Versuchs-Protokollen. Es wurden Atmungspuffer, Mitochondrien, 5 mM Pyruvat/Malat, 0.7 mM ADP in der zuvor beschriebenen Weise in die Messkammer eingebracht. So wurde eine State 3-Respiration erzeugt, welche dann mit unterschiedlichen Acylcarnitin-Konzentrationen beeinflusst wurde. Verwendet wurden Konzentrationen von 10 µM, 15 µM und 25 µM von Oleoylcarnitin sowie Stearoylcarnitin und 25 µM Propionylcarnitin. Wiederum beendet man das Experiment wie bei den anderen Versuchen mit der Zugabe von 1.2 µM Oligomycin.

2.3.4. Messprotokoll 4

Überprüfung der Reversibilität der Acylcarnitin-Effekte

Respirationsmessung mit Pyruvat/Malat als Substrat Vorinkubation der kardialen Mitochondrien und anschließende Auswaschung:

Testgruppe		Reihenfolge, der in die Messkammer zugegebenen Stoffe: Messprotokoll 4
Inkubation: Mitochondrien, Acylcarnitin	Auswaschung der Acylcarnitin aus den Mitochondrien	Atmungspuffer, Mitochondrien → Pyruvat 5 mM, Malat 5 mM → ADP 30µM-1mM → Oligomycin 1.2 µM
Kontrollgruppen		
Inkubation: Mitochondrien, Atmungspuffer	Waschung der Mitochondrien	Atmungspuffer, Mitochondrien → Pyruvat 5 mM, Malat 5 mM → ADP 30µM-1mM → Oligomycin 1.2 µM

Tab.5: Schematische Darstellung Messprotokoll 4

Schädigen Acylcarnitine (Oleo-yl- oder Stearoylcarnitin) die Mitochondrienmembran? Um diese Frage zu beantworten, wurden Mitochondrien mit 25 µM Oleo-yl- oder Stearoylcarnitin im Eppendorfgefäß für 1 Stunde, auf Eis gelagerte, inkubiert.

Die inkubierten Mitochondrien wurden jeweils im Eppendorfgefäß mit 7700 Umdrehungen für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das dabei entstandene, mitochondrienhaltige Pellet wurde mit 1 ml MSS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Als Kontrollgruppe durchliefen nicht mit einem Acylcarnitin, sondern nur mit Atmungspuffer behandelte Mitochondrien alle Inkubations- und Waschschrirte. Mit den zentrifugierten und gewaschenen Mitochondrien wurden Respirationsmessungen, wie zuvor im Standard Messprotokoll (Abb. 38) beschrieben, mit Pyruvat/Malat als Substrat und aufsteigenden ADP Konzentrationen gestartet.

2.3.5. Messprotokoll 5

Etomoxir und sein Einfluss auf kardiale Mitochondrien

In Messprotokoll 6 wurden Versuche mit zwei Testgruppen (eine mit 25 μM Oleoylcarnitin, die andere mit 25 μM Stearoylcarnitin und 30 μM Etomoxir) durchgeführt. Die Kontrollgruppe wurde nur mit 30 μM Etomoxir und nicht mit Acylcarnitinen behandelt. Etomoxir ist eine Substanz, durch welche der auf die Palmitoyl-Transferase 1 angewiesene Transfer der langkettigen Fettsäuren in das Mitochondrium und somit die Funktion des Acylcarnitin-Shuttles gehemmt werden.

Reihenfolge, der in die Messkammer zugegebenen Stoffe: Messprotokoll 5										
Testgruppe										
Atmungspuffer, Mitochondrien	→	Pyruvat 5 mM, Malat 5 mM	→	ADP 0.7 mM	→	Etomoxir 30 μM	→	Acylcarnitine 25 μM	→	Oligomycin 1.2 μM
Kontrollgruppen										
Atmungspuffer, Mitochondrien	→	Pyruvat 5 mM, Malat 5 mM	→	ADP 0.7 mM	→	Etomoxir 30 μM	→	Oligomycin 1.2 μM		

Tab.6: Schematische Darstellung Messprotokoll 5

Der Versuch begann mit der Zugabe von Atmungspuffer, 5 mM Pyruvat/Malat als Substrat und 0.7 μM ADP zu den Mitochondrien (State 3). Dann wurde die Respiration der Mitochondrien 90 Sekunden lang gemessen und eine dieser Mischung entsprechende Respiration erhalten. Zu dem Mitochondrien-Pyruvat-Malat-ADP-Gemisch gab man jetzt 30 μM Etomoxir. Die Respiration wurde wieder 90 Sekunden lang gemessen. Es zeigte sich eine verringerte Atmung der Mitochondrien. Zu der Mitochondrien-Pyruvat-Malat-ADP-Etomoxir-Mischung wurden 25 μM Oleoylcarnitin bzw. 25 μM Stearoylcarnitin zugegeben und die Respiration 180 Sekunden lang gemessen. Mit der Zugabe von 1.2 μM Oligomycin wurde das Experiment beendet. Die Messungen der Kontrollgruppe wurden ohne Zugabe von Acylcarnitinen, sondern nur mit der Zugabe von 30 μM Etomoxir in State 3 durchgeführt. Eine schematische Darstellung einer Messung ist in Abb. 15 dargestellt.

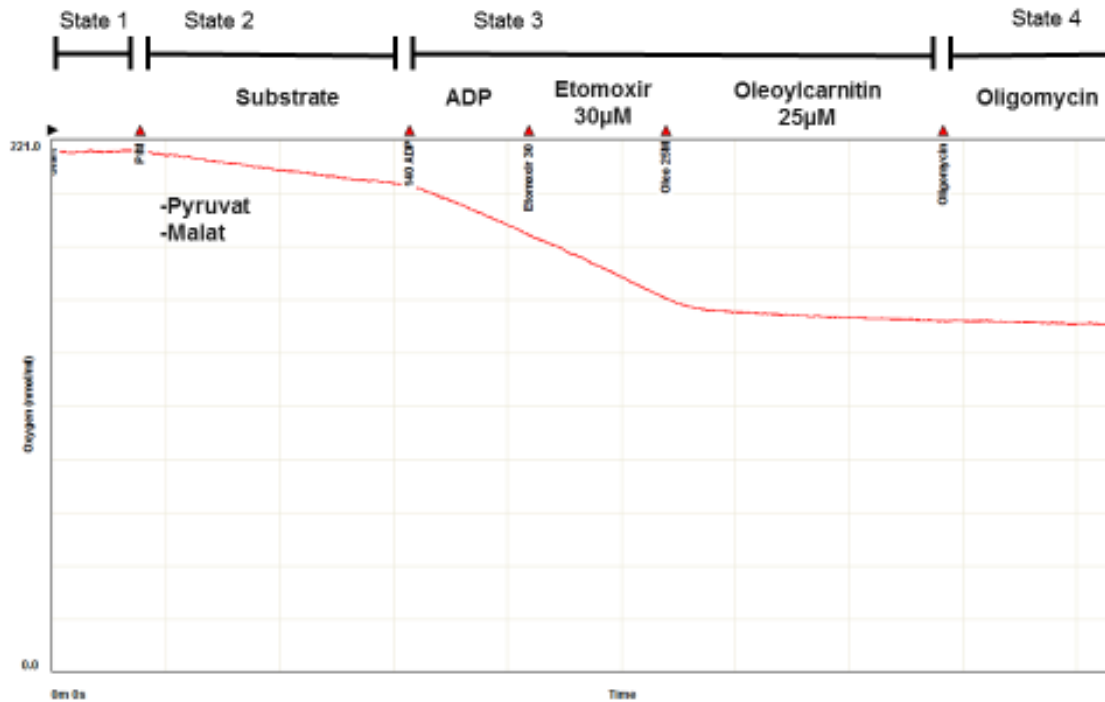


Abb. 15: Schematische Darstellung des Etomoxir Messprotokolls 5.

2.3.6. Messprotokoll 6

Respirationsmessung mit Glutamat/Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3

Diese Versuche wurden nach dem gleichen zeitlichen Schema wie bei den Versuchen mit Pyruvat/Malat durchgeführt. Im Unterschied zu den Versuchen mit 5 mM Pyruvat/Malat wurden bei diesem Versuch 5 mM Glutamat/Malat als Komplex I Substrat verwendet.

Reihenfolge, der in die Messkammer zugegebenen Stoffe: Messprotokoll 6					
Testgruppe					
Atmungspuffer, Mitochondrien	→	Glutamat 5 mM, Malat 5 mM	→	ADP 0.7 mM	
			→	Acylcarnitine 25µM	
				→	Oligomycin 1.2 µM
Kontrollgruppen					
Atmungspuffer, Mitochondrien	→	Glutamat 5 mM, Malat 5 mM	→	ADP 0.7 mM	
			→	Oligomycin 1.2 µM	

Tab.7: Schematische Darstellung Messprotokoll 6

Das Ziel war es, den Einfluss von Acylcarnitinen auf die Respiration mit unterschiedlichen Substraten genauer zu beleuchten. In die 2 ml Atmungspuffer-Mitochondrien-Mischung wurden 5mM Glutamat und 5 mM Malat zugegeben. Mit der Zugabe von 0.7 µM ADP wurde eine Respiration erzeugt und 90 Sekunden lang gemessen. Danach gab man 25 µM Oleoylcarnitin bzw. 25 µM Stearoylcarnitin zu. Die Zugabe von 1.2 µM Oligomycin beendete wiederum die Messung. Die Respiration der ohne Acylcarnitin behandelten Mitochondrien konnte in jedem Experiment vor der Acylcarnitin-Zugabe (als Kontrolle) gemessen werden. Um die Auswirkungen der Acylcarnitine auf die mitochondriale Respiration genauer zu erfassen, wurde die Auswertung der Respiration in State 3 in 3 Kompartimente aufgeteilt, um die Vergleichbarkeit zu anderen Experimenten zu gewährleisten (graphische Darstellung in Abb. 16 und 17.) In den vorangegangenen Experimenten wurde nur ein Zeitpunkt in State 3 ausgewertet.

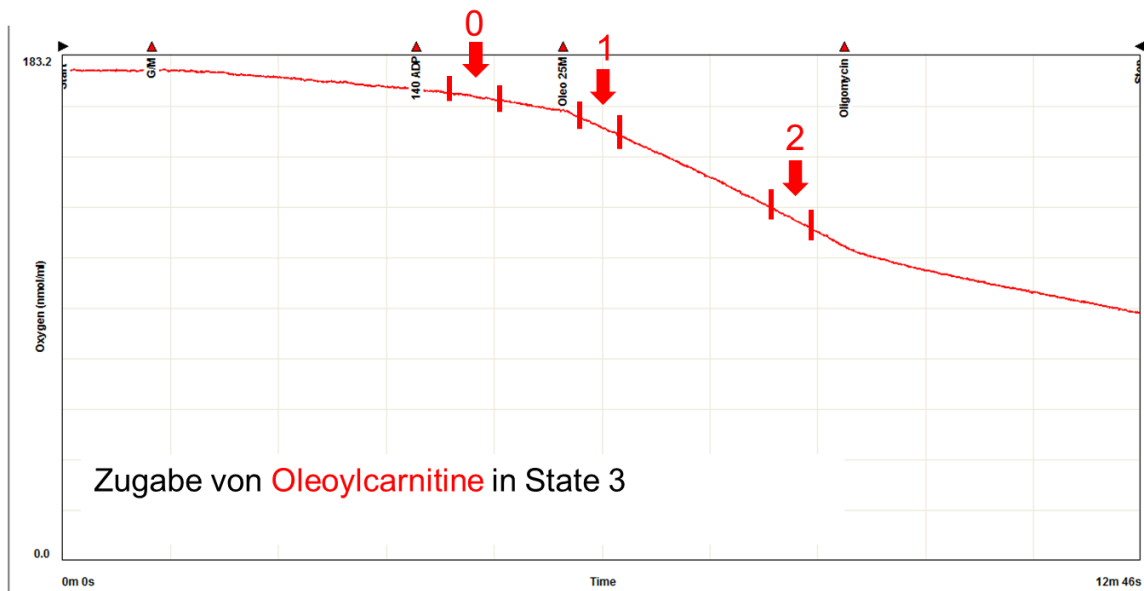


Abb. 16: Schematische Darstellung einer einzelnen Glutamat/Malat-Messung mit Zugabe von 25 μM Oleoylcarnitin im State 3.

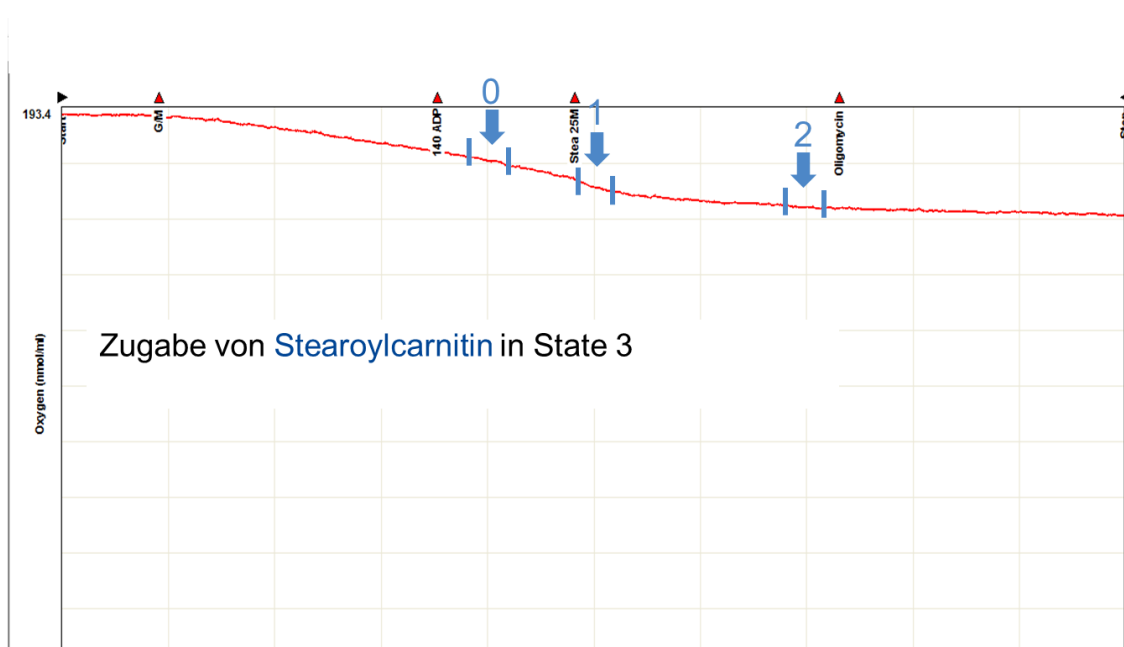


Abb. 17: Schematische Darstellung einer einzelnen Glutamat/Malat-Messung mit Zugabe von 25 μM Stearoylcarnitin im State 3.

Der Zeitpunkt 0 beschreibt die Respiration der Mitochondrien in Anwesenheit von Substrat, hier Glutamat/Malat, bei maximaler ADP-Konzentration und in Abwesenheit von Acylcarnitinen.

Zeitpunkt 1 beschreibt die unmittelbare Reaktion der Mitochondrien mit Substrat und ADP und der Zugabe von Acylcarnitin. Zeitpunkt 2 beschreibt die Langzeitwirkung der Behandlung mit Acylcarnitinen nach 3 Minuten.

2.3.7. Messprotokoll 7

Respirationsmessungen nach Fettsäure Protokoll (el Azzouzi)

PalmitoylCoA (C16) als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in

State 3:

Mit den Versuchen sollte die Wirkung der Acylcarnitine auf eine mit PalmitoylCoA (C16) erzeugte Respiration nachgewiesen werden. Die Versuche wurden, angelehnt an das Fettsäure-Protokoll nach el Azzouzi, durchgeführt [81].

Reihenfolge, der in die Messkammer zugegebenen Stoffe: Messprotokoll 7								
Testgruppe								
Atmungspuffer, Malat 3mM Carnitin 2mM Mitochondrien	→	PalmitoylCoA 6.25 µM	→	ADP 0.7 mM	→	Acylcarnitine 25µM	→	Oligomycin 1.2 µM
Kontrollgruppen								
Atmungspuffer, Malat 3mM Carnitin 2mM Mitochondrien	→	PalmitoylCoA 6.25 µM	→	ADP 0.7 mM	→		→	Oligomycin 1.2 µM

Tab.8: Schematische Darstellung Messprotokoll 7

3 mM Malat, 2 mM Carnitin und Mitochondrien wurden in 2 ml Atmungspuffer gelöst und in der Clark Elektrode 80 Sekunden lang inkubiert. Daraufhin folgte eine Zugabe von 6.25 µM PalmitoylCoA, woraufhin die Messung gestartet wurde. Nach 90 Sekunden wurde mit der Zugabe von 0.7 µM ADP eine Respiration erzeugt und weitere 90 Sekunden lang inkubiert, anschließend gab man 25 µM Acylcarnitine hinzu. 3 Minuten später beendeten 1.2 µM Oligomycin das Experiment. Die auf PalmitoylCoA gestützte Respiration war deutlich schwächer als die Respiration mit Pyruvat/Malat. Da der Start

der Messung sofort nach der PalmitoylCoA Zugabe erfolgte, konnte die Messung im State 1 (Mitochondrien ohne Substrat) nicht aufgezeichnet werden. Der Reaktionsverlauf in den Versuchen konnte genauer beschrieben werden, weil die Auswertung der Respiration in State 3 zu 3 Zeitpunkten erfasst wurde (Siehe Abb.18 und Abb.19).

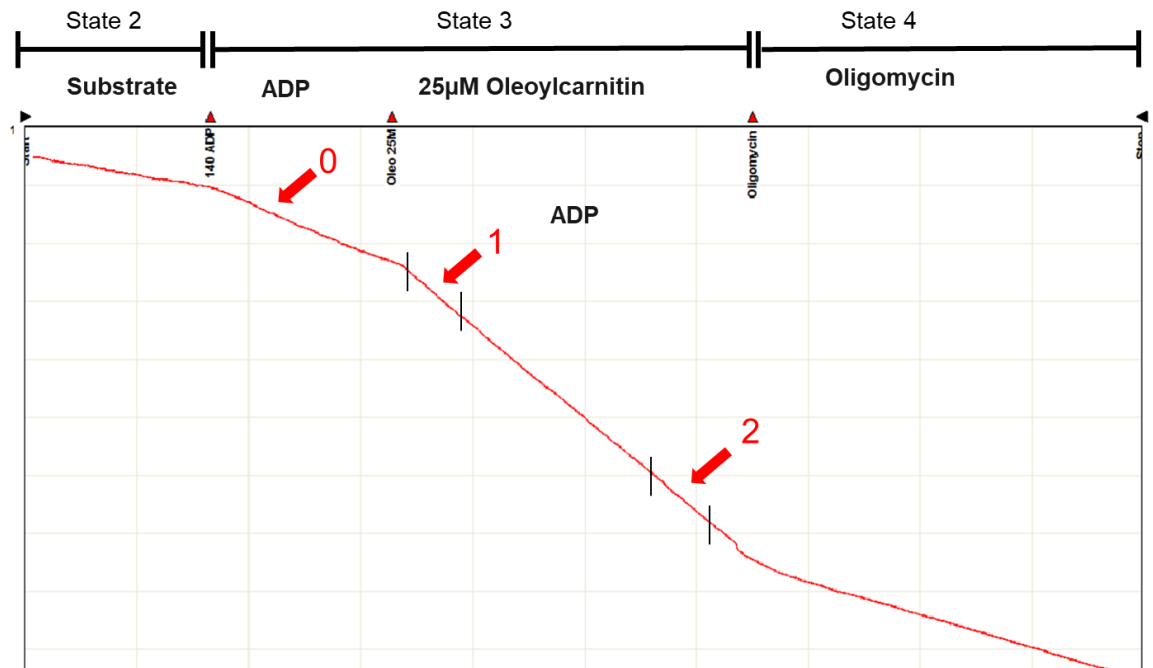


Abb.18: Schematische Darstellung der PalmitoylCoA gestützten Respiration mit Zugabe von 25 μM Oleoylcarnitin.

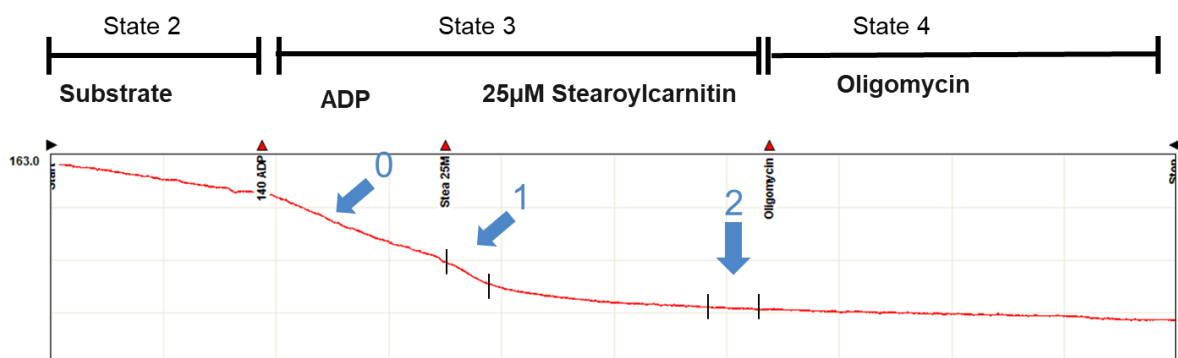


Abb.19: Schematische Darstellung der PalmitoylCoA gestützten Respiration mit Zugabe von 25 μM Stearoylcarnitin.

2.3.8. Messprotokoll 8

Respirationsmessung mit Pyruvat/Malat als Substrat in Anwesenheit von Carnitin in State 3

Bei diesem Versuch sollte geprüft werden, ob Carnitin ohne eine Bindung an Fettsäuren, also nicht als Acylcarnitin, in einer Konzentration von 25 μM in einem Substrat aus Pyruvat/Malat die Atmung der Mitochondrien beeinflusst. Die Überlegung war, ob Carnitine oder Acylcarnitine (Fettsäuren an Carnitin gebunden), für den inhibierenden Effekt auf die Mitochondrienatmung verantwortlich sind.

Reihenfolge, der in die Messkammer zugegebenen Stoffe: Messprotokoll 8				
Testgruppe				
Atmungspuffer, Mitochondrien	→ Pyruvat 5 mM, Malat 5 mM	→ ADP 0.7 mM	→ Carnitin 25 μM	→ Oligomycin 1.2 μM
Kontrollgruppen				
Atmungspuffer, Mitochondrien	→ Pyruvat 5 mM, Malat 5 mM	→ ADP 0.7 mM	→	Oligomycin 1.2 μM

Tab.9: Schematische Darstellung Messprotokoll 8

Die am höchsten verwendete Konzentration von 25 μM Acylcarnitin hatte in den vorangegangenen Versuchen eine absolut inhibierende Wirkung auf die Pyruvat/Malat-Atmung der Mitochondrien. Es wurde, wie in den Protokollen zuvor beschrieben, mit 5 mM Pyruvat/Malat und 0.7 μM ADP eine Respiration erzeugt (State 3). Diese Respiration wurde für 90 Sekunden gemessen und dann 25 μM Carnitin zugegeben. Nach 3 Minuten wurde Oligomycin zugegeben und so das Experiment beendet.

2.3.9. Entwicklung des Fettsäure Protokolls Kern 1

Während der Respirationsmessungen an der Clark-Elektrode zeigte sich, dass die experimentell erzeugte Fettsäure-Respiration mit Palmitoyl-CoA (16 C-Atome) nach el Azzouzi eine geringere Respiration induzierte, als bei den Versuchen mit Pyruvat/Malat zu beobachten war [81]. Während sich eine Respiration mit Pyruvat/Malat als Substrat an allen Versuchstagen leicht erzeugen ließ, waren erfolgreiche Respirationsmessungen mit dem Gemisch nach el Azzouzi aus Palmitoyl-CoA, Carnitin und Malat nur schwer zu erreichen. Das menschliche Herz bevorzugt für seinen Energiemetabolismus jedoch hauptsächlich Fettsäuren. Es gelang nicht, eine stabile reproduzierbare Fettsäure-Respiration zu erzeugen [81, 82]. Eventuell könnte es daran liegen, dass das verwendete Protokoll nicht alle jeweils benötigten Komponenten für die Mitochondrien-Atmung beinhaltet. Es sollte daher ein neues, auf Fettsäuren als Substrat basierendes Protokoll entwickelt werden. Ziel war es, Bedingungen zu schaffen, die isolierten kardialen Mitochondrien mit Fettsäuren zur Respiration auf einem möglichst hohen Level, vergleichbar mit dem der Pyruvat/Malat-Atmung, anzuregen. In den nachfolgenden Versuchen, die auf der Basis von el Azzouzi durchgeführt wurden, zeigte sich, dass Mitochondrien, die zusätzlich zur Substrat-Kombination nach el Azzouzi [81] (Palmitoyl-CoA, Malat, Carnitin und ADP) mit Acylcarnitinen wie Oleoylcarnitin oder Stearoylcarnitin behandelt worden waren, eine hohe Respiration zeigten. Da die so erzeugte Respiration aber nicht dem erwarteten Optimum entsprach, wurde überlegt, mit welcher Optimierung der einzelnen Substrate (Carnitin, Malat, Palmitoyl-CoA, Acylcarnitin) und der Optimierung ihrer Konzentrationen ein möglichst hoher Level der Respiration erzeugt werden könnte. Aus diesen Überlegungen heraus wurde mit der Entwicklung eines neuen Versuchsprotokolls, Kern 1 benannt, begonnen. Mit den Versuchen nach diesem Protokoll (Kern 1) sollte die spezifische Wirkung der Acylcarnitine auf die Respiration der Mitochondrien genauer untersucht werden. Es bestand jedoch auch die Möglichkeit, dass man zusätzlich auch den Einfluss noch unbekannter Substanzen aus dem Zytosol, wie z.B. Fettsäure-Transportproteine bei den Respirationsmessungen berücksichtigen muss. Der Stoffwechsel des kardialen Mitochondriums benötigt Carnitin, um langkettige Fettsäuren wie z.B. Palmitoyl-CoA (16 C-Atome) mit dem Acylcarnitin-Shuttle aufzunehmen (52). Welche Carnitin Konzentrationen werden für die Versuche nach Protokoll Kern 1 benötigt? Die Experimente mit langkettigen Fettsäuren nach Versuchsprotokoll Kern 1 stehen immer mit dem Acylcarnitin-Shuttle in Verbindung, da sie nur mit dem Acylcarnitin-Shuttle in

das Mitochondrium gelangen können. Es musste also ein Substrat mit einem anderen Zugangsweg ins Mitochondrium als mit dem Acylcarnitin-Shuttle gefunden werden. Es stellt sich die Frage, ob die von außen zugegebenen Carnitine überhaupt in das Mitochondrium gelangen und welche Konzentration hierfür benötigt wird. Es wäre möglich, dass das Acylcarnitin-Shuttle entweder durch die Isolation der Mitochondrien beschädigt worden war oder in den isolierten Mitochondrien wegen des fehlenden Zytosols der Kardiomyozyten gar nicht funktionieren konnte.

Die Überlegung war deshalb, als erstes eine Pyruvat/Malat-Respiration der isolierten Mitochondrien zu erzeugen, die in keinem Zusammenhang mit dem Acylcarnitin-Shuttle stand, so dass eine Respiration als Ausdruck eines funktionsfähigen Mitochondriums gemessen werden konnte. Dann wurden zu Pyruvat/Malat Carnitine, welche das Acylcarnitin-Shuttle für den Transport in das Mitochondrium benötigen, zugegeben. Um nun festzustellen, welche Carnitin-Konzentration eine hemmende oder steigernde Wirkung auf die mitochondriale Respiration hat, wurden Carnitine in verschiedenen Konzentrationen mit Pyruvat/Malat als Substrat getestet. Sollten die Carnitine die Pyruvat/Malat-Atmung beeinflussen, mussten sie in das Mitochondrium gelangt sein. Jetzt wurden verschiedene Experimente für Protokoll Kern 1 mit der Zugabe unterschiedlicher Carnitin-Konzentrationen zur Pyruvat/Malat-Mischung durchgeführt. Im Fettsäure-Protokoll nach el Azzouzi wurde zu dem Gemisch von Palmitoyl-CoA, Malat und ADP, Carnitin mit einer Konzentration von 2 mM zugegeben. Bei dieser Konzentration wurde die Pyruvat/Malat-Respiration der kardialen Mitochondrien gehemmt. Zur Ermittlung einer optimalen Carnitin-Konzentration, die sich nicht mehr inhibierend auf die Pyruvat/Malat-Atmung auswirkt, wurden verschiedene Konzentrationen des Carnitins getestet. Bei der Testung des Einflusses verschiedener Konzentrationen des Carnitins auf die Pyruvat/Malat-Atmung zeigte sich bei einer niedrigeren Konzentration von 25 μ M Carnitin eine leichte Steigerung der Pyruvat/Malat-Atmung. Die 20-fach höhere Konzentration des Carnitins von 500 μ M hatte weder eine steigernde noch eine hemmende Auswirkung auf die Pyruvat/Malat-Respiration; ebenso hatte auch eine Konzentration von 1 mM überhaupt keinen Einfluss auf die Höhe der Pyruvat/Malat-Respiration, während die doppelte Konzentration von 2 mM Carnitin die Pyruvat/Malat-Respiration inhibierte. Im zweiten Schritt sollte die Konzentration der Carnitine, bei der eine gute Fettsäure-Respiration gemessen werden konnte, ermittelt werden. Man muss bedenken, dass sowohl eine die Respiration inhibierende zu hohe Carnitin-Konzentration als auch eine zu niedrige Carnitin-Konzentration wegen des

damit verbundenen ungenügenden Fettsäuretransports mit dem Acylcarnitin-Shuttle die Fettsäure-Respiration negativ beeinflussen kann. In den darauffolgenden Versuchen wurden zu $6.25 \mu\text{M}$ PalmitoylCoA jeweils unterschiedliche Carnitin Konzentrationen ($500 \mu\text{M}$; 1 mM) und unterschiedliche Acylcarnitin Konzentrationen sowohl von Oleoylcarnitin als auch von Stearoylcarnitin ($5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$) zugegeben. Dabei zeigte sich, dass die Carnitin- und die Acylcarnitin Konzentrationen sich gegenseitig beeinflussen. Diese gegenseitige Beeinflussung ist durch die Bedeutung des Acylcarnitin-Shuttles für den Transport langkettiger Fettsäuren durch die innere Mitochondrienmembran zu erklären. So werden zum Beispiel Oleoylcarnitin und Stearoylcarnitin im Austausch 1:1 mit Carnitin durch die innere Mitochondrien-Membran transportiert [59]. Je höher also die verwendete Acylcarnitin Konzentration war, desto höher musste auch die Carnitin-Konzentration sein, um eine hohe Respiration zu erreichen. Eine maximale Respiration wurde auch mit einer niedrigeren Acylcarnitin-Konzentration und einer niedrigen Carnitin-Konzentration erreicht. Wobei die niedrigeren Acylcarnitin-Konzentrationen wahrscheinlich die physiologischeren Werte widerspiegeln. Die optimale Carnitin-Konzentration musste folglich für die hier benutzten Acylcarnitine Oleoylcarnitin oder Stearoylcarnitin neu ausgetestet und an das Protokoll Kern 1 angepasst werden. Eine Zugabe von 1 mM Carnitin zeigte in der Kombination mit einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ oder $15 \mu\text{M}$ Oleoylcarnitin bzw. Stearoylcarnitin mit jeweils $6.25 \mu\text{M}$ PalmitoylCoA und mit 3 mM Malat als Substrat die besten Ergebnisse. Deshalb wurde 1 mM Carnitin im Standard Protokoll Kern 1 verwendet. Diese Austarrierung der Konzentrationen wurde mit sehr niedrigen n-Zahlen ($n=1$ bis $n=3$) durchgeführt, da sie nur der Protokollentwicklung dienen.

Bei den Versuchen für das Protokoll Kern 1 mit variierenden Konzentrationen von Palmitoyl-CoA und gleichbleibender Konzentration des Gemisches Carnitin, Acylcarnitin, Malat und ADP zeigte sich, dass die Stärke der Respiration nicht von der Palmitoyl-CoA-Konzentration abhing. Eine Erhöhung der PalmitoylCoA-Konzentration zeigte keine Erhöhung oder Veränderung der Respiration. Es kann vermutet werden, dass PalmitoylCoA nur als CoA-Spender agiert, und dass nur die Acylcarnitin-Konzentration den Level der Respiration bestimmt. Durch die Isolation der Mitochondrien aus den Kardiomyozyten haben die Mitochondrien keinen Kontakt mehr zu Zytosol. Damit könnte der erste Schritt des Acylcarnitin Shuttles (CPT1) in der äußeren Membran des Mitochondriums durch den fehlenden Kontakt zu Zytosol beeinträchtigt sein. Da die Acylcarnitine diesen ersten Schritt des Acylcarnitin-Shuttles in der äußeren Membran

überspringen, werden sie problemlos als Substrat in das Mitochondrium aufgenommen und bestimmen deshalb die Respiration. Im Gegensatz zu den Acylcarnitinen benötigt Palmitoyl-CoA die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) im ersten Schritt des Acylcarnitin-Shuttles, um an Carnitin gebunden und in das Mitochondrium transportiert zu werden. Aufgrund der Beobachtungen, dass die Konzentration des PalmitoylCoA die Respiration der Mitochondrien nicht beeinflusst, wurde im Standardprotokoll Kern 1 bei den Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen der Acylcarnitine, die Konzentration von PalmitoylCoA bei 6,25 μM belassen. Auch die exakte Reihenfolge der Zugabe von Malat, Carnitin, PalmitoylCoA, ADP und Acylcarnitin zu den isolierten Mitochondrien war entscheidend. Die Zugabe dieser Substanzen als Mischung in einem Versuchsschritt erzielte schlechtere Ergebnisse, als wenn diese Substanzen in einzelnen Inkubationsschritten mit zeitlichem Abstand den Mitochondrien zugegeben wurden. Die stärkste Respiration wurde erzielt, wenn die Mitochondrien zu einer Atmungspuffer-Malat-Carnitin-Mischung zugegeben wurden. Danach kamen noch PalmitoylCoA und Oleoylcarnitin oder Stearoylcarnitin in die Messkammer. Eine andere Reihenfolge der Zugabe der Substrate zeigte keine bessere Respiration. Dagegen war der Zeitpunkt der ADP – Zugabe weniger ausschlaggebend. Um den optimalen zeitlichen Abstand der Substratzugabe festzulegen, wurden Versuche mit verschiedenen zeitlichen Abständen der Substratzugabe durchgeführt. Die beste Kombination von Substratzugabe und zeitlichen Abständen wurde in Protokoll Kern 1 festgehalten.

Ablauf der Versuche nach Protokoll Kern 1:

Reihenfolge, der in die Messkammer zugegebenen Stoffe: Protokoll Kern 1								
Testgruppe								
Atmungspuffer, Malat 3mM Carnitin 1mM Mitochondrien	→	PalmitoylCoA 6.25 μ M	→	ADP 0.7 mM	→	Acylcarnitine 5-25 μ M	→	Oligomycin 1.2 μ M
Kontrollgruppen								
Atmungspuffer, Malat 3mM Carnitin 1mM Mitochondrien	→	PalmitoylCoA 6.25 μ M	→	ADP 0.7 mM	→	Propionylcarnitin 5-25 μ M	→	Oligomycin 1.2 μ M

Tab. 10: Schematische Darstellung Messprotokoll Kern 1

Das Protokoll Kern 1 eignet sich gut für die Durchführung der Versuche, kardiale Mitochondrien zur Metabolisierung von Fettsäuren anzugeregen. Hierfür müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

- Atmungspuffer, 1 mM Carnitin und 3 mM Malat wurden in die Messkammer der Clark-Elektrode gegeben, Mitochondrien zugegeben und für 90 Sekunden inkubiert. Von den 90 Sekunden Inkubationszeit entfielen 30 Sekunden auf den Verschluss der Messkammer und das Starten der Messung. In den restlichen 60 Sekunden wurde die Respiration aufgezeichnet.
- Danach wurden 6.25 μ M Palmitoyl-CoA in die Messkammer gegeben und 90 Sekunden lang inkubiert.
- Daraufhin wurde mit 0.7 mM ADP eine State-3-Respiration erzeugt; nach 90 Sekunden wurden die Acylcarnitine, Stearoylcarnitin, Oleoylcarnitin oder Propionylcarnitin (als Kontrollgruppe) in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben und die Respiration 180 Sekunden lang gemessen. Danach wurde der Versuch mit 1.2 μ M Oligomycin beendet.

Die Auswertung des State 3 des Protokolls Kern 1 wurde ebenfalls zu 3 verschiedenen Zeitpunkten erfasst (Siehe Abb. 20 und 21). Zeitpunkt 0 beschreibt den Zustand der Mitochondrien in Anwesenheit von Substrat (hier Carnitin, Malat, PalmitoylCoA) bei

Zugabe von ADP in einer maximalen Konzentration von $0.7 \mu\text{M}$ und in Abwesenheit von Acylcarnitinen. Zeitpunkt 1 beschreibt die unmittelbare Reaktion der Mitochondrien auf die zusätzliche Acylcarnitin-Gabe zu diesem Gemisch. Zeitpunkt 2 beschreibt die Wirkung der Acylcarnitin-Zugabe auf die Respiration nach 180 Sekunden. Während das Protokoll Kern 1 entwickelt wurde, um den Einfluss der Acylcarnitine, spezifisch für Oleoylcarnitin und Stearoylcarnitin in den Konzentrationen $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$ und $25 \mu\text{M}$ auf die Fettsäurerespiration, gestützt auf PalmitoylCoA, Carnitin, Malat und ADP zu untersuchen, sollte mit dem Protokoll Kern 2 die ADP-Sensitivität durch die Zugabe unterschiedlicher ADP-Konzentrationen auf die Fettsäure-Atmung getestet werden. Es ist daher mit den Fettsäure-Protokollen nach Kern gelungen, die physiologische Verstoffwechslung von Fettsäuren im Herzen in vitro zu simulieren.

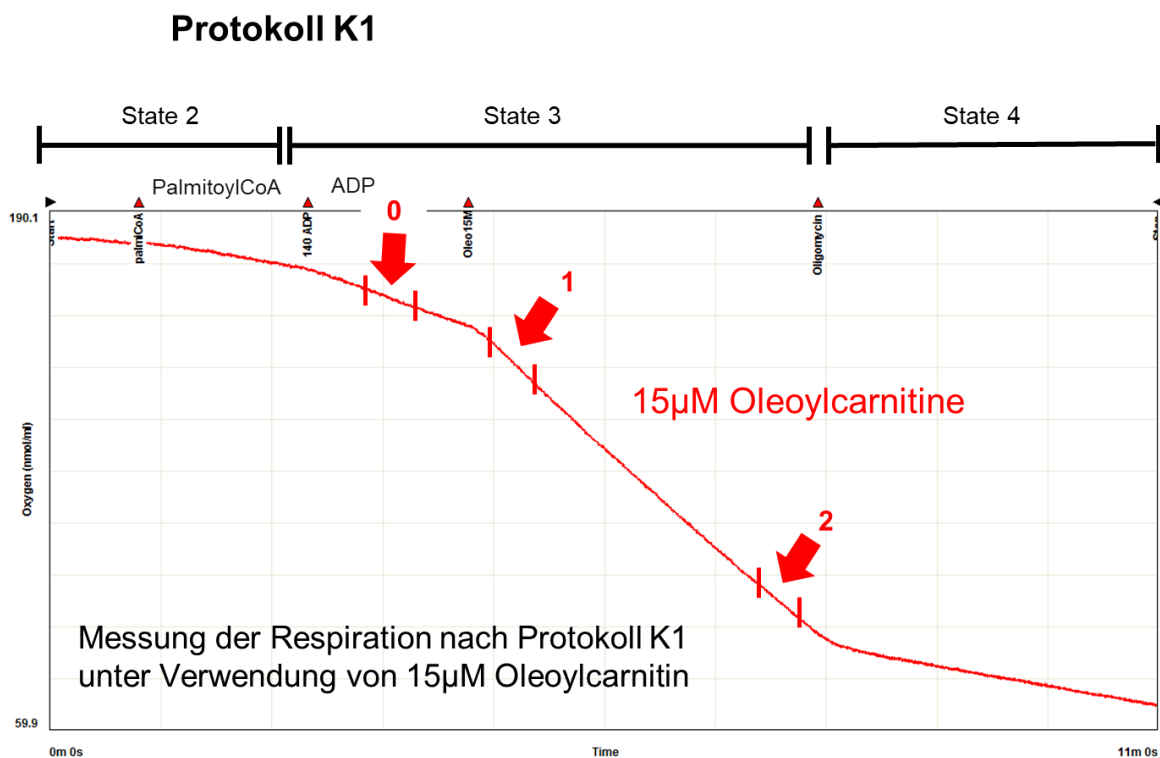


Abb.20: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung nach Protokoll Kern 1 mit Zugabe von $15 \mu\text{M}$ Oleoylcarnitin im State 3

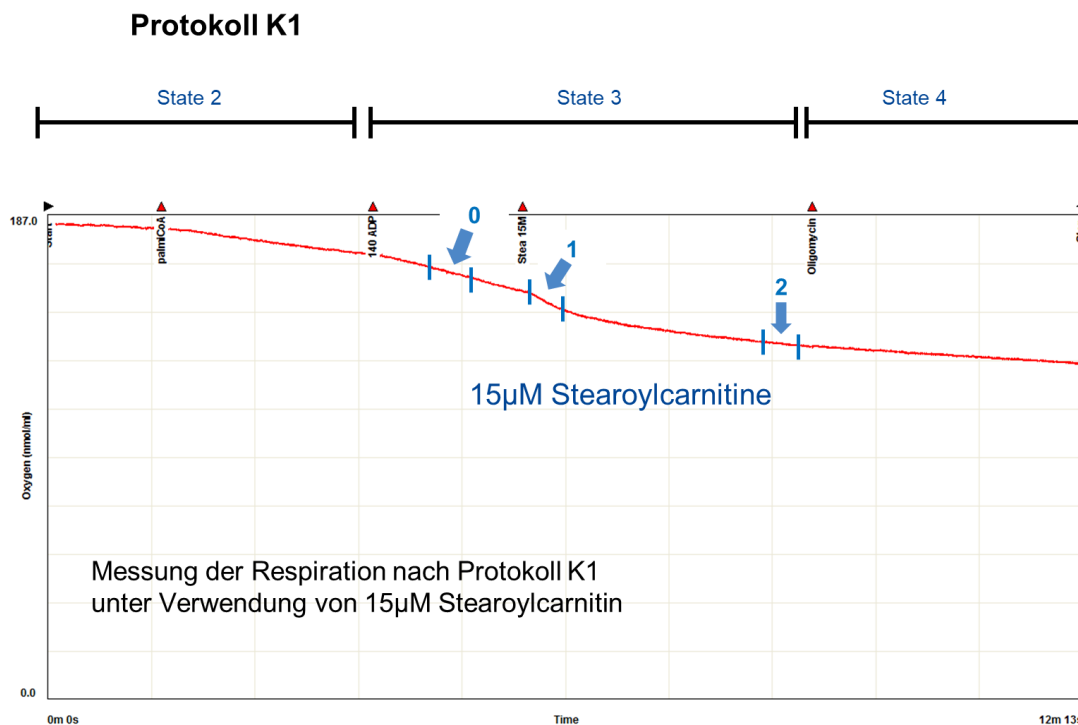


Abb.21: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung nach Protokoll Kern 1 mit Zugabe von 15 µM Stearoylcarnitin im State 3

Vergleich der Wirkung von Oleoylcarnitin bzw. Stearoylcarnitin mit den Konzentrationen von 5µM, 10µM, 15µM und 25µM auf die Fettsäure-Respiration nach Protokoll Kern 1 mit der Wirkung von Oleoylcarnitin bzw. Stearoylcarnitin derselben Konzentrationen auf die Pyruvat/Malat Respiration (Kohlenhydrat-Respiration) nach Messprotokoll 3:

Mit dem Protokoll Kern 1 wurde, wie zuvor beschrieben, ein gut funktionierendes Versuchsprotokoll entwickelt, welches die isolierten kardialen Mitochondrien zur Fettsäurerespiration anregt. In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, nachzuweisen, ob und in welcher Konzentration Acylcarnitine Einfluss auf Arrhythmien oder Vorhofflimmern des Herzens haben, indem man die Wirkung der Acylcarnitine auf den Stoffwechsel der kardialen Mitochondrien durch Respirationmessungen beurteilt. Das Protokoll Kern 1 wurde so entwickelt und optimiert, dass es mit anderen schon länger etablierten Versuchsprotokollen mit der Verwendung anderer Substrate z.B., Pyruvat/Malat, Glutamat/Malat quantitativ vergleichbar war. Da die Zugabe der verschiedenen Substrate so eingeteilt und die Messungen der Respiration auf einen

bestimmten Zeitpunkt festgelegt waren, konnte die Einteilung und die Normierung des Protokolls Kern 1 auf andere Versuche übertragen werden. Die Wirkung von Acylcarnitinen auf die Fettsäure-Atmung und die Wirkung der Acylcarnitine auf die Pyruvat/Malat-Atmung sollte mit diesen standardisierten Versuchen verglichen werden. Hierfür wurden zwei Versuchseinheiten durchgeführt. Zunächst wurden mit Hilfe des Protokolls Kern 1 unterschiedliche Konzentrationen (5 μM , 10 μM , 15 μM , 25 μM) von Stearoylcarnitin oder von Oleoylcarnitin getestet.

Vergleich, Protokoll Kern 1 mit Messprotokoll 3								
Kern 1								
Atmungspuffer, Malat 3mM Carnitin 1mM Mitochondrien	→	PalmitoylCoA 6.25 μM	→	ADP 0.7 mM	→	Acylcarnitine 5-25 μM	→	Oligomycin 1.2 μM
Messprotokoll 3								
Atmungspuffer, Mitochondrien	→	Pyruvat 5 mM, Malat 5 mM	→	ADP 0.7 mM	→	Acylcarnitine 5-25 μM	→	Oligomycin 1.2 μM

Tab. 11: Schematische Darstellung

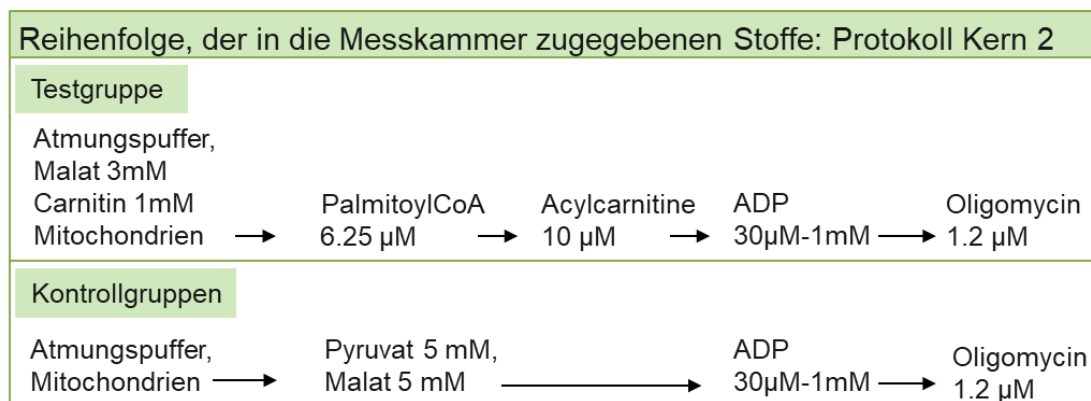
Messprotokoll Kern 1 im Vergleich mit Messprotokoll 3

In der zweiten Versuchseinheit wurde die Wirkung derselben Acylcarnitine in denselben Konzentrationen auf eine Pyruvat/Malat Respiration untersucht. Es wurde zunächst mit 5 mM Pyruvat/Malat und 0.7 mM ADP eine Respiration erzeugt und daraufhin die Acylcarnitine zugegeben. Diese Versuche waren, bis auf die festgelegten Zeiteinteilungen, identisch mit den Versuchen im Messprotokoll 3. Um die quantitative Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden die Acylcarnitine in beiden Versuchseinheiten 90 Sekunden nach der ADP-Zugabe zugegeben. Daraufhin konnten mit der standardisierten Auswertung der Respiration zu 3 Zeitpunkten, welche für Protokoll Kern 1 entwickelt wurden, beide Versuchseinheiten verglichen werden. Durch die Normierung der Auswertung und der Zugabe der Acylcarnitine in denselben Konzentrationen wie bei Kern 1 zu der Pyruvat/Malat-Atmung, konnte der Einfluss der Acylcarnitine auf die Fettsäurerespiration exakt mit dem Einfluss der Acylcarnitine auf die Pyruvat/Malat-Atmung verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass Oleoylcarnitin die Fettsäure-Respiration in allen verwendeten Konzentrationen steigerte, aber

konzentrationsabhängig die Pyruvat/Malat-Atmung hemmte. Stearoylcarnitin erzielte ähnliche Ergebnisse.

2.3.10. Entwicklung des Protokolls Kern 2

Das Protokoll Kern 2 wurde aus dem Protokoll Kern 1 entwickelt. Mit den Versuchen nach Protokoll Kern 1 sollte die Wirkung der Acylcarnitine auf die Fettsäure-Respiration kardialer Mitochondrien untersucht werden. Mit dem Protokoll Kern 2 sollte der Einfluss unterschiedlicher ADP-Konzentrationen auf die Fettsäure-Atmung der kardialen Mitochondrien, im Vergleich zu einer reinen Pyruvat/Malat-Atmung, untersucht werden. Außerdem sollten mit diesem Versuchsprotokoll die Experimente mehr den physiologischen Bedingungen angenähert werden. Die Atmung der kardialen Mitochondrien beträgt mit Pyruvat/Malat als Substrat im lebenden Organismus nur ca. 10-40 %. Im Gegensatz dazu verstoffwechseln die Mitochondrien bis zu 90 % Fettsäuren [7, 26].



Tab.12: Schematische Darstellung Messprotokoll Kern 2

Bevor man den Einfluss unterschiedlicher ADP-Konzentrationen testen konnte, musste eine Fettsäure-Respiration erzeugt werden. Das bedeutet, Bedingungen zu schaffen, in denen der Acylcarnitin-Shuttle, die β -Oxidation, der Citratzyklus und die Atmungskette der kardialen Mitochondrien funktionsfähig waren. Dazu wurden im Versuchsaufbau nach Protokoll Kern 2 Atmungspuffer, 1 mM Carnitin und 3 mM Malat in die Messkammer

der Clark-Elektrode gegeben, Mitochondrien zugegeben und für 90 Sekunden inkubiert. Von den 90 Sekunden Inkubationszeit entfielen 30 Sekunden auf den Verschluss der Messkammer und das Starten der Messung. In den restlichen 60 Sekunden wurden die erhaltenen Messdaten aufgezeichnet. Danach wurden $6.25 \mu\text{M}$ PalmitoylCoA in die Messkammer gegeben, 90 Sekunden lang inkubiert und $10 \mu\text{M}$ Oleoylcarnitin oder Stearoylcarnitin zugegeben. Es folgte im Abstand von jeweils 2 Minuten die Zugabe von ADP in den Konzentrationen von $30 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ und 1mM . Wie in allen Experimenten zuvor, beendete die $1.2 \mu\text{M}$ Oligomycin-Zugabe die Messung. Für die Versuche nach Protokoll Kern 2 dienten als Kontrollgruppe Messungen mit Pyruvat/Malat als Substrat und die Zugabe unterschiedlicher ADP-Konzentrationen ohne Zugabe von Acylcarnitinen (Darstellung in Abb. 22 - 24).

Protokoll Kern 2

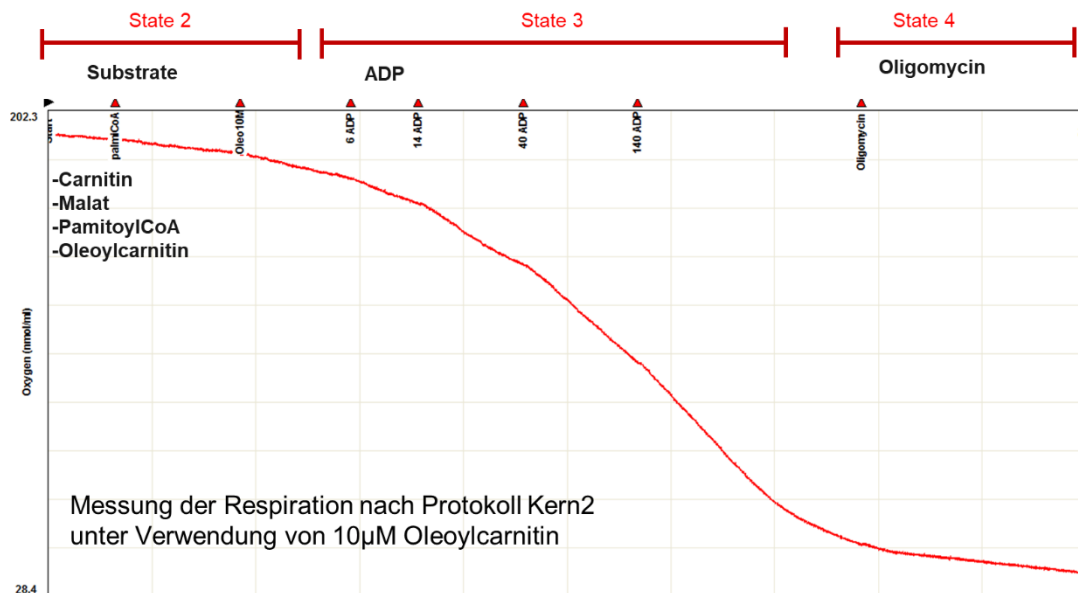


Abb. 22: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung nach Protokoll Kern 2 mit Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Oleoylcarnitin

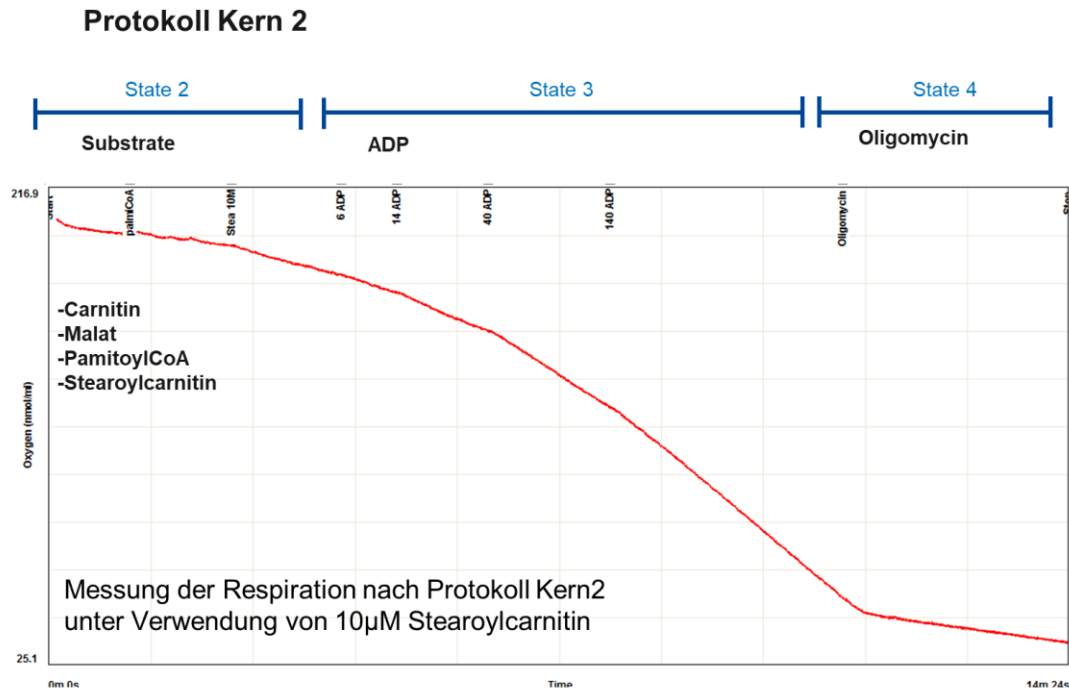


Abb.23: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung nach Protokoll Kern 2 mit Zugabe von 10 µM Stearoylcarnitin

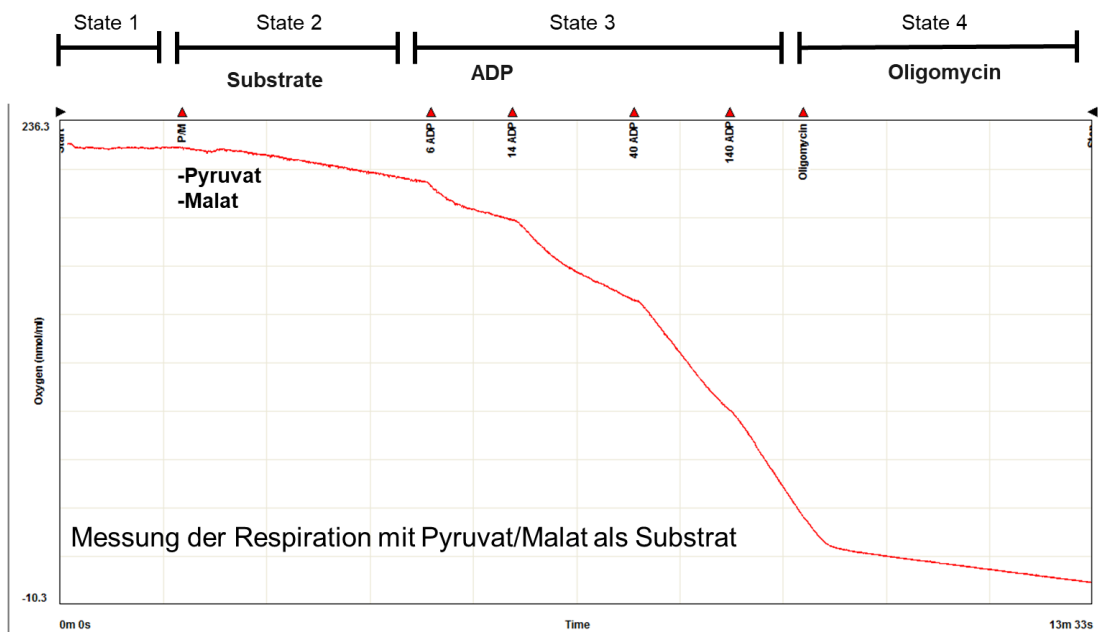


Abb.24: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung mit 5 mM Pyruvat und 5 mM Malat als Substrat und aufsteigenden ADP Konzentrationen.

2.4. Instrumentarium und Gerätschaften

Instrumente und Geräte	Hersteller
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Deckgläschen	VWR International, Darmstadt
Original Perfusor Spitze 50ml	
Falcon	Blue Max, 15 ml und 50ml
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Feinwaage	ABS 120-4 Kern & Sohn GmbH, Balingen
Magnetrührer	CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
Clark-Elektrode	Hansatech Instruments Ltd., England, Norfolk
Fluoreszenzplattenreader	Tecan Infinite M200 Pro, Crailsheim
Potter-Gefäße	Hartenstein, Würzburg
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Wärmethermostat mit Edelstahlbad und Variopumpe	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Feinschere	14088-10 Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pinzette zum Kanülieren	FD281R Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pinzette zur Thorakotomie	11272-30 Fin Scienc Tools GmbH, Heidelberg
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Wäremeschrank	Heraeus
Vortex Mixer	SN 41119030 Labnet International, NJ, USA
Vakuumpumpe	SP302SA Schwarzer Precision, Essen

Tab.13: Instrumente und Geräte

2.4.1. Verwendete Substanzen: Clark Elektrode

Isolutionslösung (IS)		
Substanz	Konzentration	Hersteller
Mannitol	225 mM	Sigma-Aldrich
Sucrose	75 mM	Merck
HEPES	2 mM	Sigma-Aldrich
EGTA	1 mM	Sigma-Aldrich
Der pH wurde auf 7,4 mit NaOH und KCL eingestellt		

Tab.14: Verwendete Substanzen: Isolutionslösung

Mitochondriensuspensionslösung (MSS)		
Substanz	Konzentration	Hersteller
Mannitol	225 mM	Sigma-Aldrich
Sucrose	75 mM	Merck
HEPES	2 mM	Sigma-Aldrich

Tab.15: Verwendete Substanzen: Mitochondriensuspensionslösung

BSA / Proteinaselösung (10 ml)		
Substanz	Konzentration	Hersteller
BSA	4 mg/ml	Sigma-Aldrich
Proteinase	0,16 mg/ml	Sigma-Aldrich

Tab.16: Verwendete Substanzen: BSA / Proteinaselösung

Atmungspuffer		
Substanz	Konzentration	Hersteller
KCl	137 mM	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	2 mM	Merck
MgCl ₂ *6H ₂ O	2.5 mM	Merck
HEPES	20 mM	Sigma-Aldrich
EGTA	0.5 mM	Sigma-Aldrich
Der pH-Wert wurde auf 7.2 mit NaOH und KCL eingestellt.		

Tab.17: Verwendete Substanzen: Atmungspuffer

Substanz	Hersteller
Reagenz A (für die Proteinbestimmung nach)	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien USA
Reagenz B	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien USA
Pyruvat	Sigma-Aldrich
Malat	Sigma-Aldrich
ADP	Sigma-Aldrich
Oligomycin	Sigma-Aldrich
Etomoxir	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
Glutamat	Sigma-Aldrich
PalmitoylCoA	Sigma-Aldrich
Carnitine	Sigma-Aldrich

Tab.18: Verwendete Substanzen

2.4.2. Verwendete Acylcarnitine

Substanz	Hersteller
Propionylcarnitin	Adventbio
Oleoylcarnitin	Adventbio
Stearoylcarnitin	Adventbio

Tab.19: Verwendete Substanzen: Acylcarnitine

3. Ergebnisse

Ergebnisse der Respirationsmessungen kardialer Mitochondrien

Einfluss von Acylcarnitinen auf die Atmung kardialer Mitochondrien

Bei Acylcarnitinen handelt es sich um Fettsäuren, welche an Carnitin gebunden sind. Die Verstoffwechslung von Fettsäuren über die β -Oxidation, den Citratzyklus und die Atmungskette findet im Mitochondrium statt. Deshalb ist es von großer Bedeutung, welche Auswirkungen Acylcarnitine in unterschiedlichen Konzentrationen auf kardiale Mitochondrien haben. Aus diesem Grund wurden Respirationsmessungen mit isolierten kardialen Mitochondrien und unterschiedlichen Substraten durchgeführt.

Alle Respirationsmessungen mit kardialen Mitochondrien wurden mit der Clark Elektrode erhoben und alle Versuche in dieselben 4 States unterteilt.

In der Messkammer befanden sich:

State 1. Isolierte Mitochondrien der Kardiomyozyten in Atmungspuffer gelöst

State 2. Kardiale Mitochondrien und Substratmischung aus Pyruvat/Malat, Glutamat/Malat, PalmitoylCoA oder Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin

State 3. Kardiale Mitochondrien, Substratmischung und ADP

State 4. Kardiale Mitochondrien, Substratmischung, ADP und Oligomycin

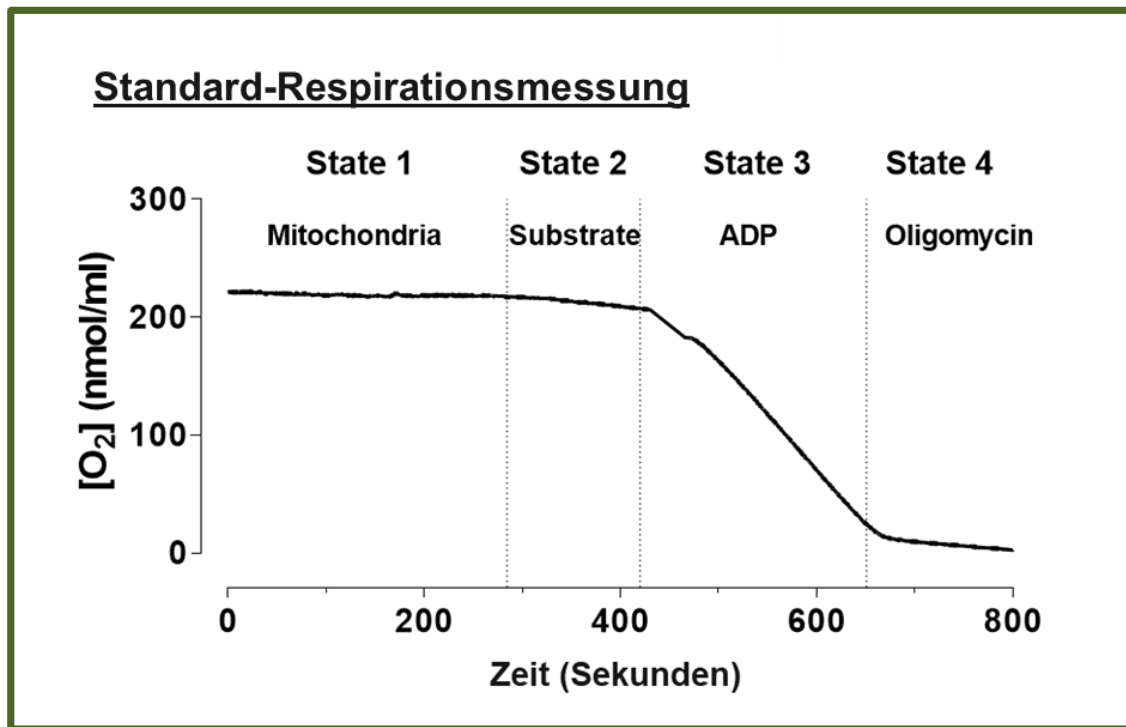
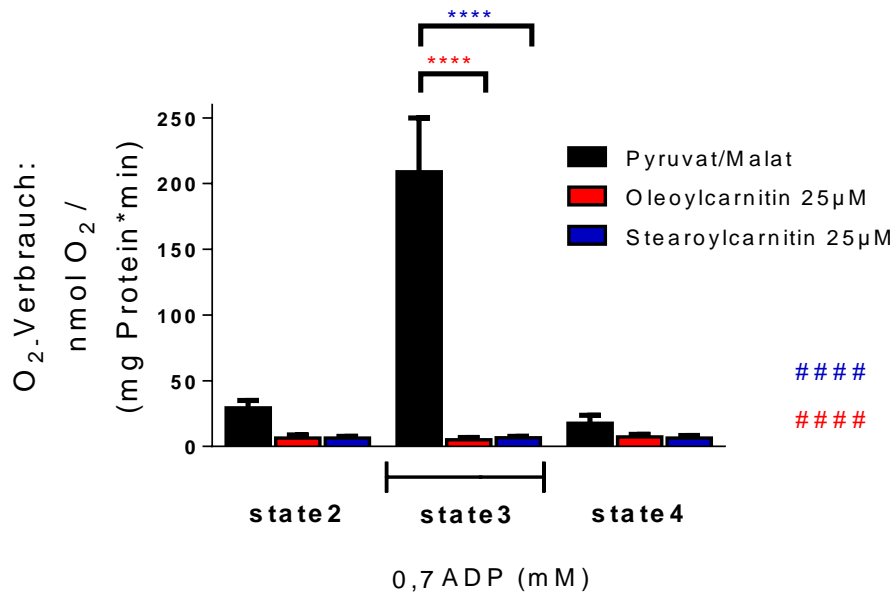


Abb.25: Exemplarische Darstellung einer Respirationsmessung, mit kardialen Mitochondrien

Als Substratmischung wurde in State 2, 3 und 4 immer Pyruvat/Malat oder Glutamat/Malat, PalmitoylCoA oder Acylcarnitine verwendet. Für die Respirationsmessungen wurden Mitochondrien aus Herzen von C57BL/6N Mäusen verwendet.

3.1. Interaktion von Acylcarnitinen mit isolierten Mitochondrien in State 1



2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,0001
Vergleich Oleoylcarnitin mit Kontrollgruppe

2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,0001
Vergleich Stearoylcarnitin mit Kontrollgruppe

Abb.26: Respirationsmessung:

Interaktion von Oleoylcarnitin bzw. Stearoylcarnitin mit kardialen isolierten Mitochondrien gelöst in Atmungspuffer. Messprotokoll 1

Oleoylcarnitin 25 µM: n = 3

Stearoylcarnitin 25 µM: n = 3

Pyruvat/Malat 5 mM: n = 13

Ob die getesteten Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitine alleine mit den isolierten Mitochondrien und ADP, die in Atmungspuffer gelöst wurden, interagieren oder sogar als Substrate des Metabolismus zur mitochondrialen Respiration dienen können, sollte in einem ersten Versuch geklärt werden. Der Sauerstoffverbrauch (Respiration) ist ein Maß für den

Metabolismus der isolierten Mitochondrien. Um Nährstoffe metabolisieren zu können, benötigen die isolierten Mitochondrien einen geeigneten Nährstoff, hier Substrat genannt, welcher sowohl in das Mitochondrium aufgenommen werden kann als auch im Stoffwechsel des Mitochondriums, wie z.B. in der β -Oxidation oder im Citratzyklus, abgebaut werden kann. Es wurden deshalb Messungen mit Atmungspuffer, isolierten Mitochondrien, 25 μ M Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin und 0.7 mM ADP (State 3) durchgeführt (Abb. 26). Diese Messungen wurden verglichen mit den Respirationmessungen der Kontrollgruppe. Als Kontrollgruppe wurden Messungen mit Pyruvat/Malat (5 mM) als Substrat mit isolierten Mitochondrien und 0,7 mM ADP, in Atmungspuffer gelöst, durchgeführt (State 3). Pyruvat und Malat sind Abbauprodukte der Glukose. Glukose wird *in vivo* in der Glycolyse zu Pyruvat abgebaut. Dieser Schritt findet allerdings im Zytosol und nicht im Mitochondrium statt. Da für die Versuche isolierte Mitochondrien verwendet wurden, die nicht mehr von Zytosol umgeben waren, musste direkt Pyruvat als Substrat verwendet werden. Malat ist Teil des Citratzyklus und bewirkt die Anregung des Stoffwechsels in den Mitochondrien. Das Protokoll der Respirationmessungen mit Pyruvat/Malat und ADP als Substrat ist ein gut etabliertes Standard-Protokoll (AG-Maack), das deshalb zuverlässig zur Validierung der Mitochondrien-Qualität, zum Vergleich mit anderen Protokollen und Substraten herangezogen werden kann. Isolierte vitale Mitochondrien können Substrat (=Nährstoff) unter Bildung von ATP aus ADP verstoffwechseln. Dabei wird Sauerstoff an der Atmungskette verbraucht.

Der Abb. 26 kann entnommen werden, dass weder Oleoylcarnitin noch Stearoylcarnitin alleine eine Respiration (State 3) hervorrufen und somit unter diesen Bedingungen nicht von den isolierten Mitochondrien als Substrat (Nährstoff) metabolisiert werden können. Dagegen zeigten Messungen der Kontrollgruppe mit Zugabe von Pyruvat/Malat und ADP als Substrat für den mitochondrialen Metabolismus eine starke Respiration (State 3). Die verwendeten Mitochondrien waren also vollständig funktionsfähig. Die statistische Auswertung der Ergebnisse in Abb. 26 zeigt eine eindeutige Signifikanz zwischen Test und Kontrollgruppe und bestätigt damit das Ergebnis. Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin in Kombination mit ADP als Substrat, konnten den Metabolismus der Mitochondrien nicht anregen, da für die Aufnahme von Acylcarnitinen in das Mitochondrium Carnitin für den 1:1 Carnitin-Austausch für das Acylcarnitin-Shuttle benötigt wird. Außerdem ist zur Stimulation des Stoffwechsels (NAD(P)H-Produktion) des Mitochondriums Malat (Abbauprodukt der Glucose) notwendig. Dies erklärt, warum

bei den Versuchen mit diesen Acylcarnitinen alleine keine Respiration der Mitochondrien gemessen werden konnte.

3.2. Ergebnisse der Respirationsmessungen kardialer Mitochondrien mit Pyruvat/Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 1

Um die Wirkung der Acylcarnitine auf die mitochondriale Atmung besser zu verstehen, wurden Messungen mit Pyruvat/Malat als Substrat in Anwesenheit der Acylcarnitine Oleoylcarnitin, Stearoylcarnitin bzw. Propionylcarnitin (3 C-Atome) in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Acylcarnitine wurden im State 1, vor der Pyruvat/Malat Zugabe in State 2 zu den in Atmungspuffer gelösten Mitochondrien gegeben. Daraufhin wurden ansteigende ADP Konzentrationen (30 μM , 100 μM , 300 μM , 1 mM) zugegeben. Mit der Zugabe von 1.2 μM Oligomycin wurde das Experiment beendet. In Abb. 27 ist zur Übersicht eine Messung exemplarisch dargestellt.

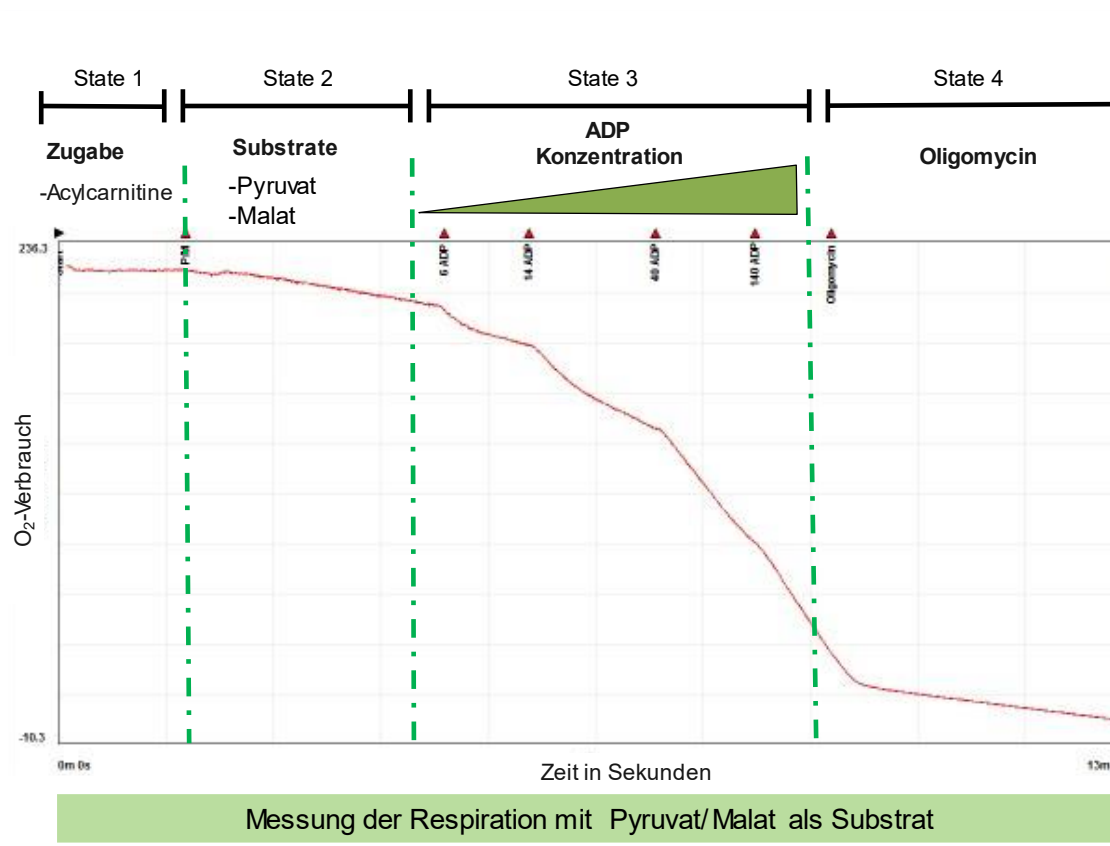
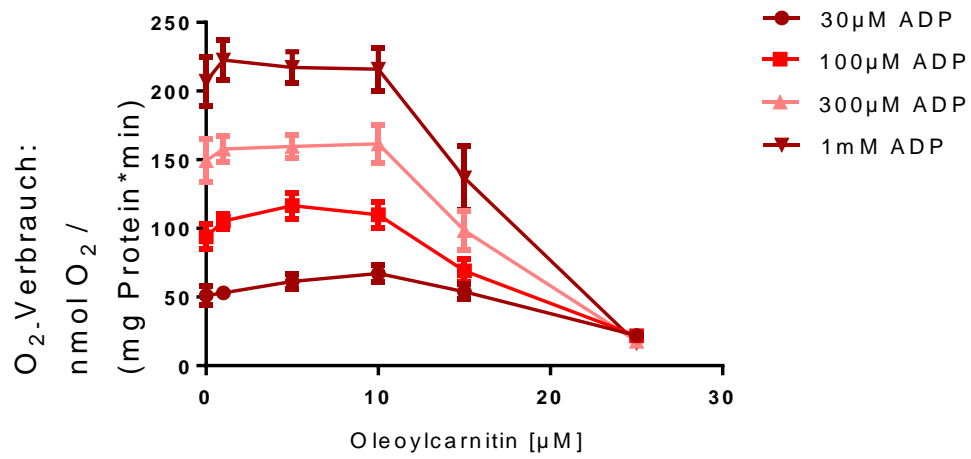
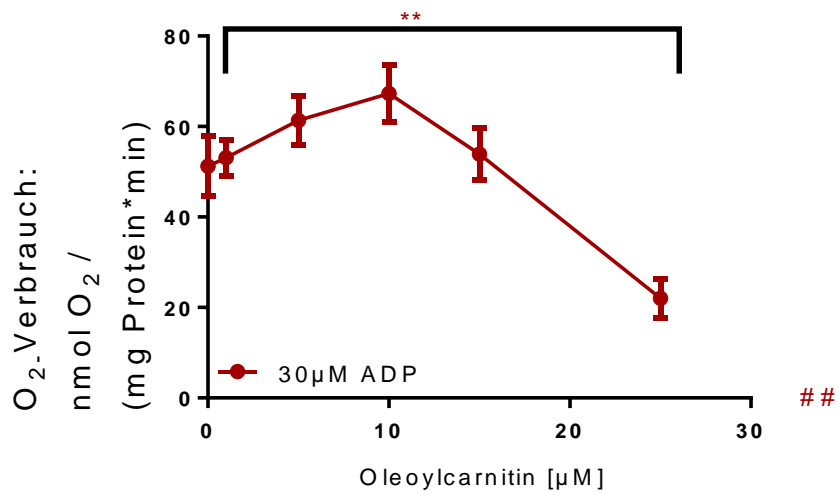


Abb.27: Exemplarische Messung der Respiration mit Pyruvat/Malat als Substrat in Abhängigkeit zur Zeit. Messprotokoll 2

A.

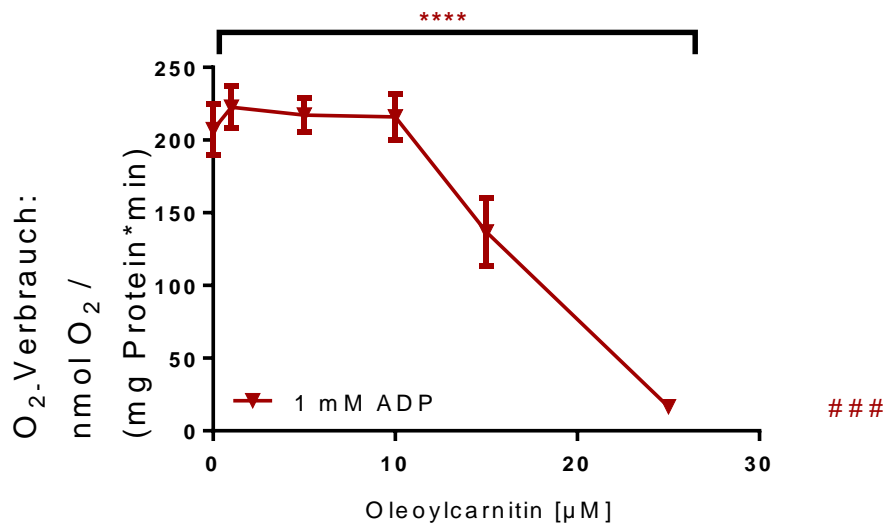


B.



1-Weg-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,01
Vergleich 1 μM zu 25 μM

C.



1-Weg-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,0001
 Vergleich 1µM zu 25µM

Abb.28: Inhibition der **Pyruvat/Malat**-gekoppelten Atmung nach Vorinkubation mit Oleoylcarnitin im State 1. Messprotokoll 2. Verwendung von Acylcarnitinen in den Konzentrationen von 1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM oder 25 µM im State 1, in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration (30 µM, 100 µM, 300 µM, 1 mM).

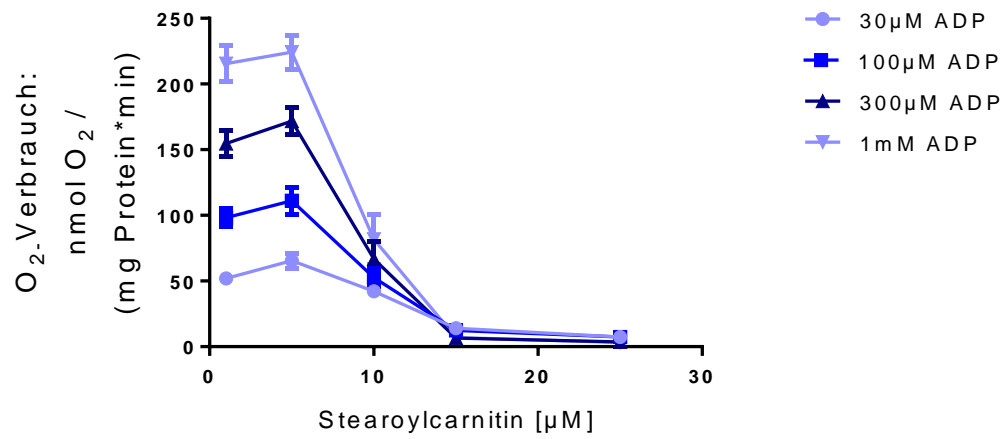
Oleoylcarnitin: 25 µM: n=7; 15 µM: n=8; 10 µM: n=7; 5 µM: n=7; 1 µM: n=7

A: Übersicht über den Verlauf aller ADP-Konzentrationen in Abhängigkeit zur Oleoylcarnitin Konzentration

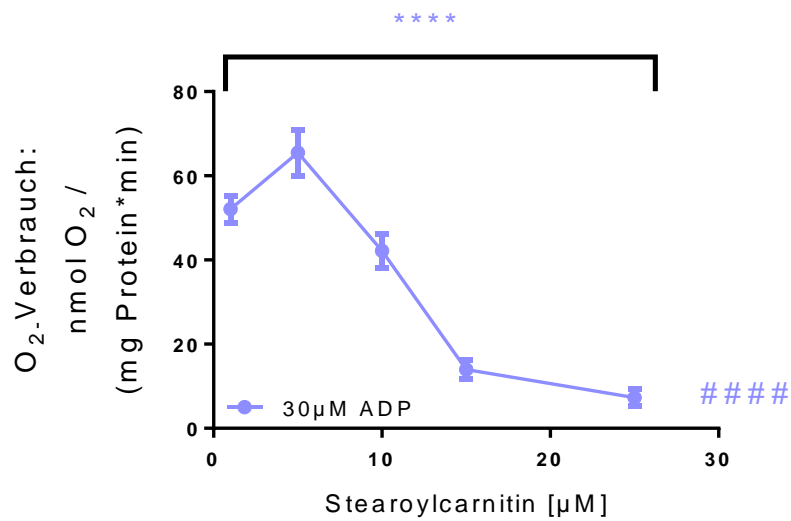
B: Statistische Auswertung der Abhängigkeit von 30 µM ADP in Abhängigkeit zur ansteigenden Oleoylcarnitin Konzentration von 1 µM-25 µM

C: Statistische Auswertung der Abhängigkeit von 1 mM ADP in Abhängigkeit zur ansteigenden Oleoylcarnitin Konzentration von 1 µM-25 µM

A.

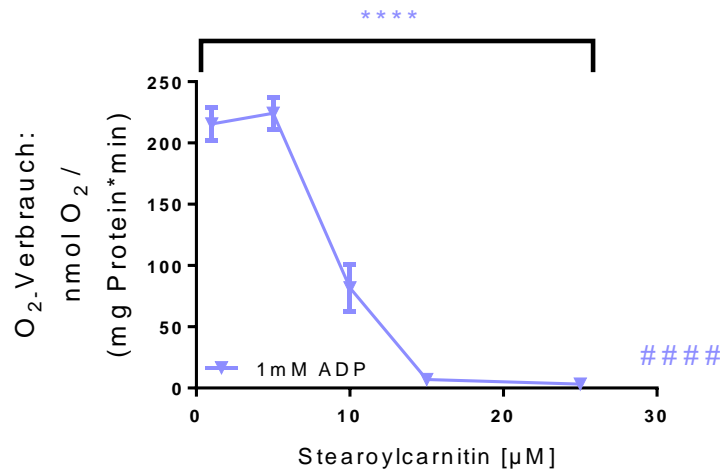


B.



1-Weg-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,0001
 Vergleich 1 μM zu 25 μM

C.



1-Weg-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,0001
 Vergleich 1 µM zu 25 µM

Abb.29: Inhibition der **Pyruvat/Malat**-gekoppelten Atmung nach Vorinkubation mit Stearoylcarnitin oder im State 1. Messprotokoll 2. Verwendung von Acylcarnitinen in den Konzentrationen von 1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM oder 25 µM im State 1, in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration (30 µM, 100 µM, 300 µM, 1 mM).

Stearoylcarnitin

25 µM: n=7; 15 µM: n=8; 10 µM: n=7; 5 µM: n=7; 1 µM: n=7

A: Übersicht über den Verlauf aller ADP-Konzentrationen in Abhängigkeit zur Stearoylcarnitin Konzentration

B: Statistische Auswertung der Abhängigkeit von 30µM ADP in Abhängigkeit zur ansteigenden Acylcarnitin Konzentration von 1 µM-25 µM

C: Statistische Auswertung der Abhängigkeit von 1mM ADP in Abhängigkeit zur ansteigenden Acylcarnitin Konzentration von 1 µM-25 µM

Abb. 28 A zeigt den Verlauf des Sauerstoffverbrauchs (Y-Achse) in Anwesenheit von Oleoylcarnitin (1, 5, 10, 15 und 25 µM) auf der X-Achse aufgetragen, in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration. Eine eindeutige Hemmung der Pyruvat/Malat gestützten

Respiration kann ab einer Konzentration von 15 μM Oleoylcarnitin gemessen werden. Diese Hemmung lässt sich in allen aufgetragenen ADP-Konzentrationen erkennen.

Das zugegebene ADP wird von den Mitochondrien unter Sauerstoff-Verbrauch zu ATP metabolisiert. Mit steigender ADP-Konzentration steigt also die Kapazität, den vorhandenen Nährstoff zu verstoffwechseln. Eine komplette Hemmung der Respiration, gemessen am Sauerstoffverbrauch, ist ab einer Konzentration von 25 μM Oleoylcarnitin zu verzeichnen. Abb. 28 B und C zeigen den gleichen Datensatz; zur statistischen Auswertung wurden die Abhängigkeiten von 30 μM ADP sowie 1mM ADP zur ansteigenden Oleoylcarnitin Konzentration (1 μM -25 μM) einzeln dargestellt. Die Statistik zeigt eine konzentrationsabhängige Hemmung der Atmung durch Oleoylcarnitin.

Abb. 29 A zeigt die hemmende Wirkung von Stearoylcarnitin (1-25 μM) auf die Pyruvat/Malat-Respiration in Abhängigkeit zur Konzentration. Bereits ab einer Konzentration von 10 μM wird die Respiration teilweise- und ab 15 μM komplett gehemmt. Abb. 29 B und C enthält den gleichen Datensatz wie Abb. 29 A; zur statistischen Auswertung sind auch hier die ADP-Konzentrationen von 30 μM und 1mM einzeln dargestellt. Es zeigt sich eine signifikante Hemmung der Pyruvat/Malat-gestützten Atmung durch 25 μM Stearoylcarnitin.

In den Abbildungen 28 und 29 wird eine komplette Hemmung der Respiration mit einem Wert von „0“ auf der Y-Achse aufgetragen. Bei einem Wert von „0“ wird demnach kein O_2 mehr von den Mitochondrien verbraucht. Als Kontrolle wurden Versuche in Abwesenheit von Aylcarnitinen, nur mit Pyruvat/Malat und ADP als Substrate durchgeführt (siehe Abb. 31). Die dabei gemessene Respiration entsprach der Respiration der Versuche, die mit Pyruvat/Malat, ADP und 1 μM und 5 μM Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin durchgeführt wurden.

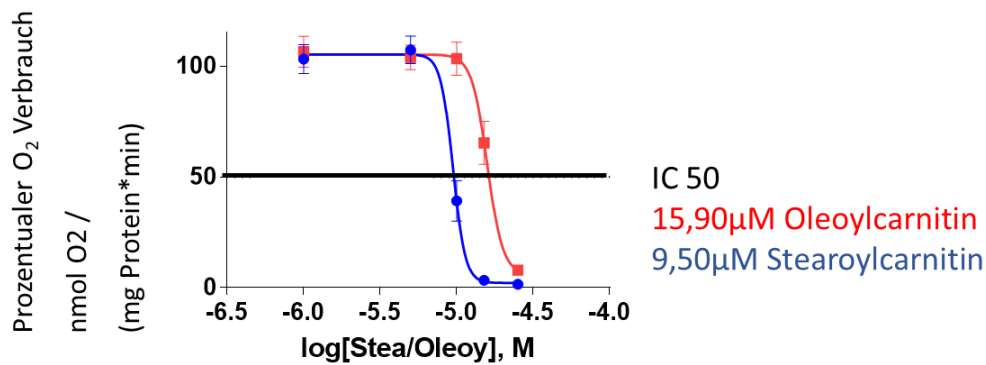
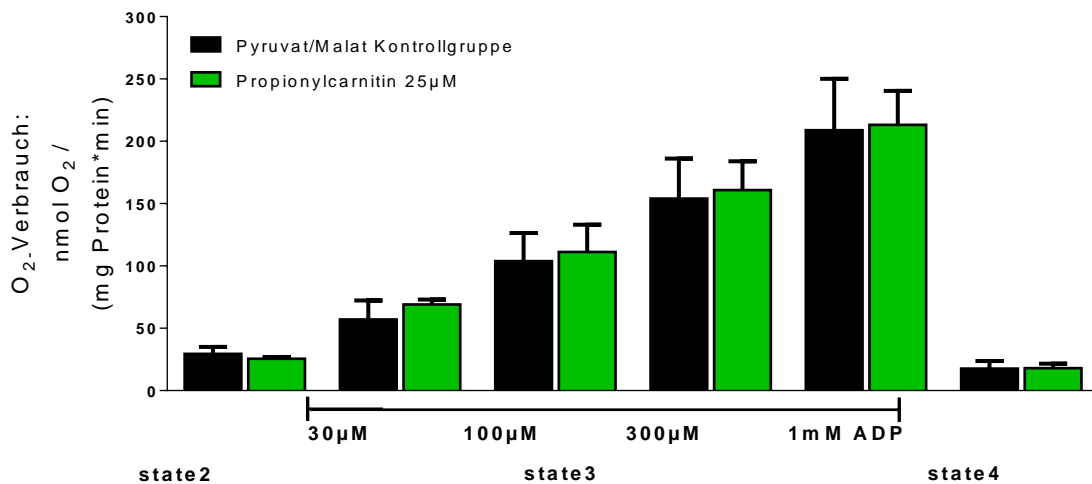


Abb.30: Logarithmische Auftragung des Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit zur zugefügten Acylcarnitin Konzentration von 1 μM, 5 μM, 10 μM, 15 μM oder 25 μM im State 1 und **Pyruvat/Malat** als Substrat.

Oleoylcarnitin 25 μM: n=7; 15 μM: n=8; 10 μM: n=7; 5 μM: n=7; 1 μM: n=7

Stearoylcarnitin 25 μM: n=7; 15 μM: n=8; 10 μM: n=7; 5 μM: n=7; 1 μM: n=7

Vergleicht man die inhibierenden Effekte von Oleoylcarnitin und Stearoylcarnitin auf die mitochondriale Respiration als Ausdruck des mitochondrialen Metabolismus, zeigt sich, dass Oleoylcarnitin bei höheren Konzentrationen denselben inhibierenden Effekt hat wie Stearoylcarnitin bei niedrigeren Konzentrationen (siehe Abb. 30). Die Konzentration, bei der 50% der maximalen Atmung inhibiert werden kann (IC₅₀), ist 15.9 μM für Oleoylcarnitin und 9.5 μM bei Stearoylcarnitin. Um die maximale Atmung der kardialen Mitochondrien ohne Zugabe von Oleoylcarnitin, Stearoylcarnitin oder Propionylcarnitinen zu bestimmen, wurden Kontrollmessungen der mitochondrialen Respiration nur mit Pyruvat/Malat und ADP als Substrat durchgeführt.



2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test keine Signifikanz
Vergleich Propionylcarnitin mit Kontrollgruppe

Abb.31: Respirationsmessungen mit **Pyruvat/Malat**, ADP als Substrat (schwarzer Balken) und Respirationsmessungen mit Pyruvat/Malat und ADP und Propionylcarnitin als Acylcarnitin (grüner Balken). Messprotokoll 2.

25 µM Propionylcarnitin: n = 4

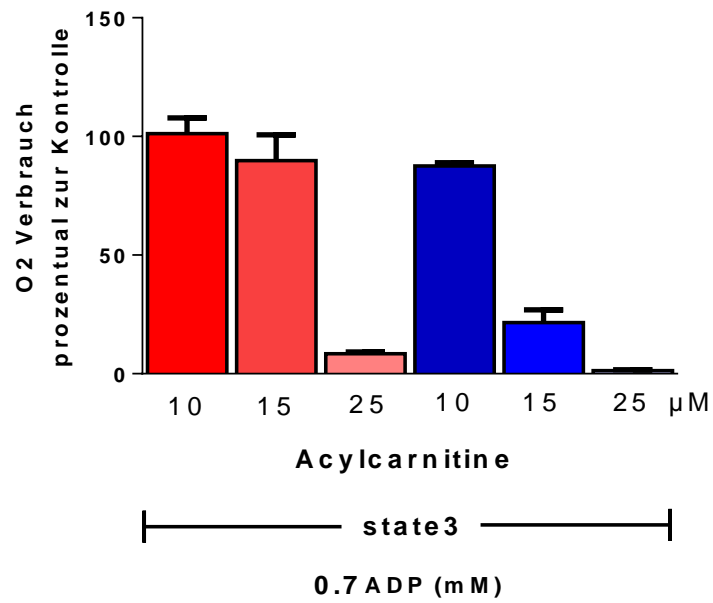
5 mM Pyruvat/Malat: n = 13

Propionylcarnitin (3 C-Atome) wurde mit einer Konzentration von 25 µM als Acylcarnitin-Kontrollgruppe (grün) verwendet. Abb. 31 zeigt den Verlauf des Sauerstoffverbrauchs in Anwesenheit (grün) und Abwesenheit (schwarz) von Propionylcarnitin in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration. Die Acylcarnitin-Kontrollgruppe Propionylcarnitin hatte keinen Einfluss auf die Pyruvat / Malat induziertes Atmung. Dies bestätigt die statistische Auswertung der Daten. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Respirationsmessungen in An- und Abwesenheit von Propionylcarnitin.

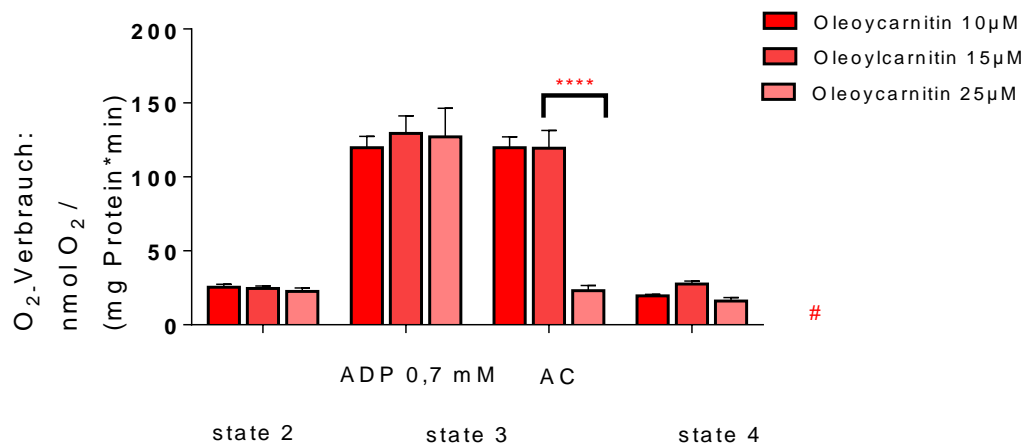
3.3. Ergebnisse der Respirationsmessungen mit Pyruvat/Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3.

In den Mitochondrien findet *in vivo* ständig Metabolismus statt. Um sich der physiologischen Situation des mitochondrialen Metabolismus anzunähern, mussten die Mitochondrien zunächst mit ADP und Pyruvat/Malat als Substrat zu ihrem Stoffwechsel angeregt werden. Der Einfluss der Acylcarnitine auf den mitochondrialen Metabolismus sollte mit der Zugabe von Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin im State 3 nachgewiesen werden, siehe Abb. 32.

A



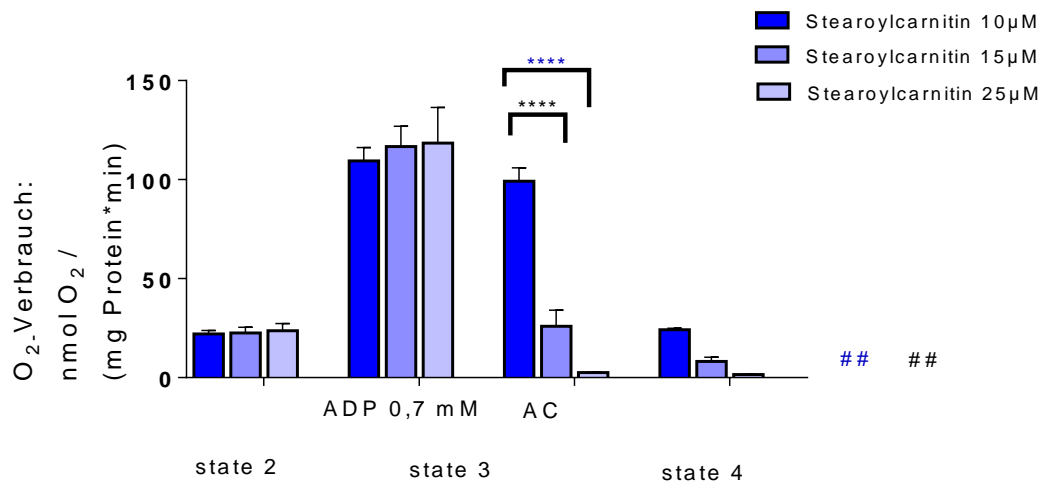
B



2-Wege-Anova, Bonferoni-post Test < 0,0001

Vergleich Oleoylcarintin in den Konznetrationen von 15µM und 25µM

C



2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,0001

Vergleich Stearoylcarnitin in den Konzentrationen 10µM und 15µM

2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,0001

Vergleich Stearoylcarnitin in den Konzentrationen 10µM und 25µM

Abb.32: Respirationsmessungen mit **Pyruvat/Malat** als Substrat, 0,7 µM ADP und Zugabe von Acylcarnitinen im State 3. Messprotokoll 3.

Oleoylcarnitin (rot dargestellt) 10 µM: n=4; 15 µM: n=5; 25 µM: n=4

Stearoylcarnitin (blau dargestellt) 10 µM: n=4; 15 µM: n=5; 25 µM: n=4

A: Prozentualer Sauerstoff-Verbrauch, unter Einfluss unterschiedlicher Acylcarnitin Konzentration in State 3.

B: Darstellung der von State 2 bis State 4 der Respirationsmessung, mit statistischer Auswertung, für Oleoylcarnitin

C: Darstellung der von State 2 bis State 4 der Respirationsmessung, mit statistischer Auswertung, für Stearoylcarnitin

Abb. 32 A zeigt in Abhängigkeit zur Acylcarnitin-Konzentration den prozentualen Sauerstoffverbrauch (Respiration). Im State 3 zeigen die getesteten Acylcarnitine eine inhibierende Wirkung auf die mitochondriale Atmung, in Abhängigkeit zu ihrer Konzentration. Dabei erreicht Oleoylcarnitin seine inhibierende Wirkung von ca. 90% erst mit einer Konzentration von 25 µM, dagegen zeigt Stearoylcarnitin eine ca. 75% Inhibition schon ab einer Konzentration von 15 µM. Versuche mit Propionylcarnitin in einer Konzentration von 25 µM zeigten weder eine inhibierende noch eine steigernde Wirkung auf den O₂ Verbrauch der Mitochondrien und sind deshalb in Abb. 32 nicht

aufgetragen. Abb. 32 B und Abb. 32 C zeigen die komplette Messung des Datensatzes, inklusive der statistischen Auswertung. Auch hier lässt sich eine deutliche, signifikante Hemmung der Respiration ab einer Konzentration von 25 μ M Oleoylcarnitin sowie 15 μ M Stearoylcarnitin erkennen.

3.4. Sind die inhibierenden Effekte von Acylcarnitinen auf die mitochondriale Pyruvat / Malat Respiration reversibel?

Angesichts der Inhibition der Atmung durch Acylcarnitine war zunächst unklar, ob diese die Mitochondrien irreversibel schädigen. Um dies zu klären, wurden die Mitochondrien mit 25 μ M Acylcarnitinen für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Hiernach wurden die Mitochondrien zentrifugiert und in Atmungspuffer resuspendiert, um die Acylcarnitine wieder aus den Mitochondrien zu entfernen. Als Kontrollgruppe durchliefen nicht mit Acylcarnitinen behandelte Mitochondrien alle Inkubations- und Waschschrte. Mit den gewaschenen Mitochondrien wurden Respirationmessungen mit aufsteigenden ADP Konzentrationen (30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1 mM) und mit Pyruvat/Malat als Substrat gestartet.

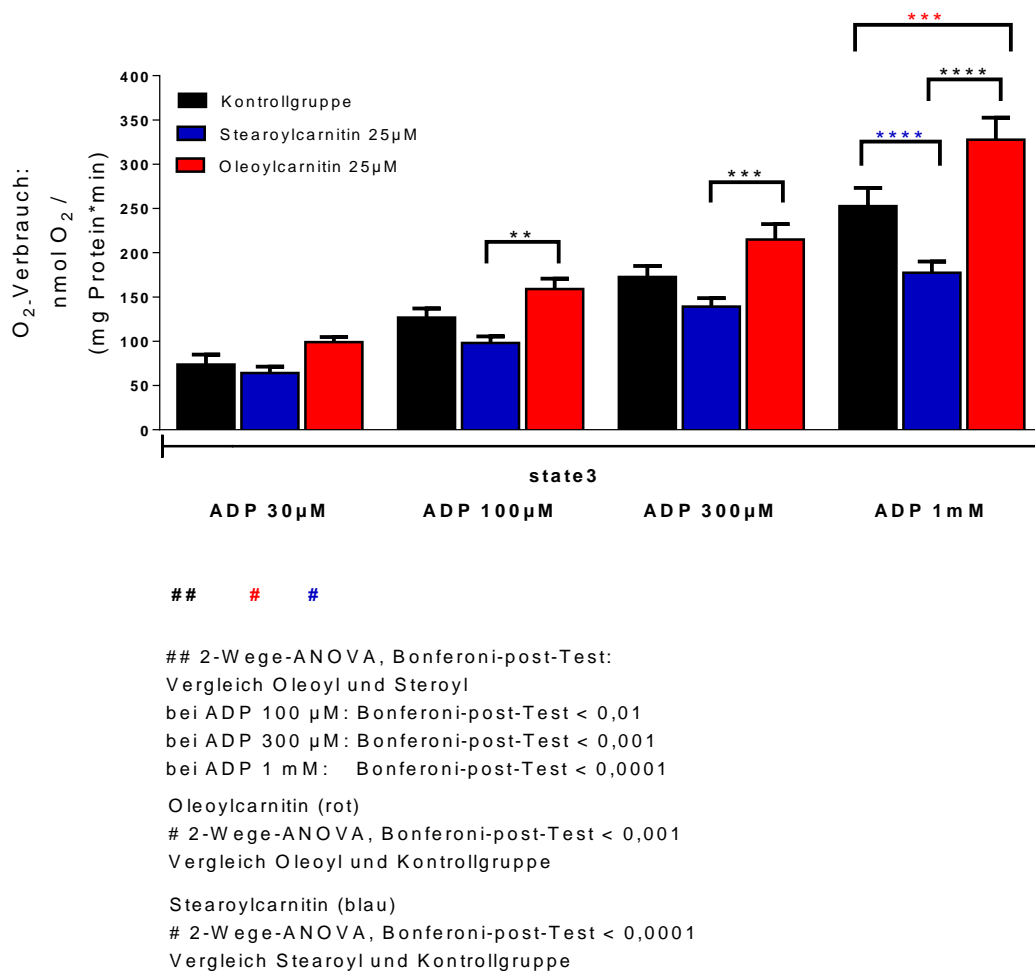


Abb.33: Respirationsmessungen nach Auswaschung von Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin, nach 1 Stunde Inkubation auf Eis. Messprotokoll 4.

Oleoylcarnitin: 25 µM n=3 (roter Balken):

Stearoylcarnitin: 25 µM n=5 (blauer Balken)

Kontrollgruppe: Mitochondrien gewaschen, ohne Vorkubation mit

Acylcarnitinen: n=4 (schwarzer Balken)

Der Inhibitionseffekt der Acylcarnitine wird durch den O₂-Verbrauch der Mitochondrien mit Pyruvat/Malat als Substrat gemessen. Nach der Auswaschung der Acylcarnitine konnte der Inhibitionseffekt der Acylcarnitine auf den durch die Pyruvat/Malat erzeugten mitochondrialen Metabolismus aufgehoben werden. Es wurde eine teilweise bis komplette Wiederherstellung der Respiration der Mitochondrien (nach Auswaschung der Acylcarnitine) mit Pyruvat/Malat als Substrat erzielt. Wie in Abb. 33 dargestellt, ließ sich Oleoylcarnitin komplett, Stearoylcarnitin teilweise auswaschen. Die inhibierenden

Effekte von Oleoylcarnitin und Stearoylcarnitin auf den Stoffwechsel der kardialen Mitochondrien sind also reversibel. Somit sind die inhibierenden Effekte nicht auf eine irreversible Schädigung der Mitochondrien bzw. deren Membran durch die Acylcarnitine zurückzuführen. Die statistische Auswertung der Daten in Abb. 33 ergab einen signifikanten Unterschied in den Respirations-Leveln vor allem bei einer ADP-Konzentration von 1mM, also bei maximaler Respiration.

3.5. Ergebnisse der Respirationsmessungen mit kardialen Mitochondrien und Etomoxir

Gibt es eine Substanz, mit der man den Transportweg der Fettsäuren durch die Mitochondrien-Membran beeinflussen kann bzw. die verschiedenen Mechanismen des Fettsäure-Transports in der Mitochondrien-Membran nachweisen könnte? Die Fragestellung war, ob man den Transportweg der Fettsäuren durch die Mitochondrien-Membran beeinflussen kann und, falls ja, mit welcher Substanz? Aus der Literatur ist bekannt, dass Etomoxir 2[6-Hexyl]oxiran-2-carboxylat ein Inhibitor der Carnitin Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1) ist [28, 59] (Siehe Abb. 35).

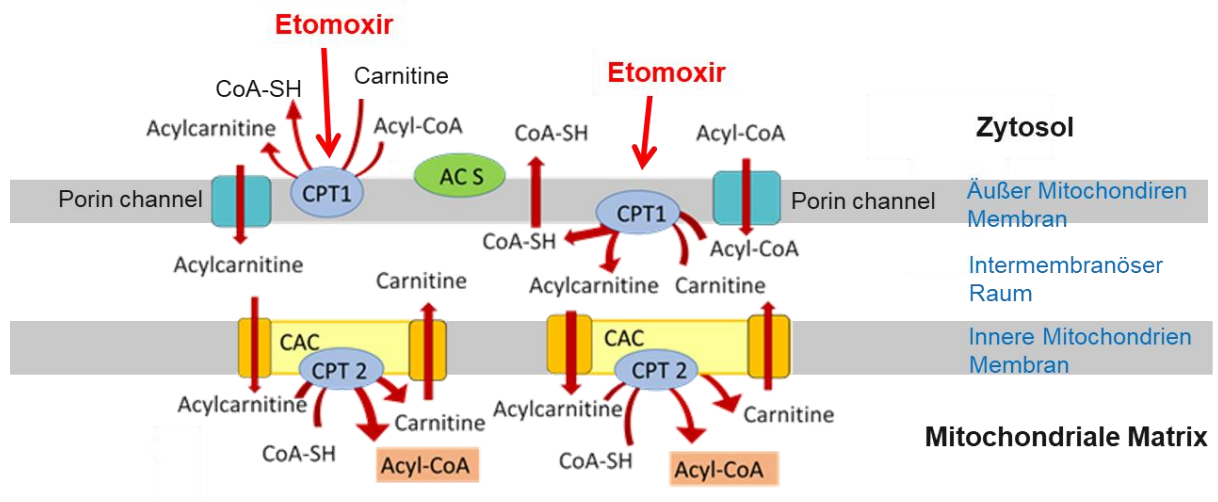


Abb.34: Schematische Darstellung der Wirkung von Etomoxir auf das Acylcarnitin Shuttle
Erstellt nach Informationen aus: [28, 59, 61].

Durch Etomoxir kann der auf die Palmitoyl-Transferase 1 angewiesene Transfer der langkettigen Fettsäuren in das Mitochondrium gehemmt werden (siehe Abb. 34 und 35). Damit wird auch die PalmitoylCoA gestützte Atmung des Mitochondriums inhibiert [28, 61]. In der Literatur wird eine Inhibition des Acylcarnitin-Shuttles durch Etomoxir in Krebszellen beschrieben. Ab einer Konzentration von 200 μM Etomoxir wurde nicht nur das Acylcarnitin-Shuttle, sondern auch Teile der Atmungskette (Komplex 1) der Krebszellen inhibiert [61]. Langkettige Fettsäuren können nicht durch Diffusion in das kardiale Mitochondrium gelangen, sondern werden durch das sogenannte Acylcarnitin-Shuttle in das Mitochondrium geschleust. Die Voraussetzung, dass die langkettigen Fettsäuren durch die Mitochondrien-Membran geschleust werden, ist ihre Bindung an Carnitin. Diese Bindung der langkettigen Fettsäuren an Carnitin zu Acylcarnitinen geschieht im Acylcarnitin-Shuttle durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1. Durch diese Bindung an Carnitin können die langkettigen Fettsäuren als Acylcarnitine in das Mitochondrium gelangen. Im Mitochondrium werden die an Carnitin gebundenen Fettsäuren mit Hilfe der Carnitin Palmitoyl-Transferase 2 an CoA gebunden. Der Hauptanteil der an CoA gebundenen Fettsäuren wird in der β -Oxidation zur Energiegewinnung herangezogen. Um die inhibierenden Effekte des Etomoxirs auf das Acylcarnitin-Shuttle zu ermitteln, wurden verschiedene Experimente mit verschiedenen Etomoxir-Konzentrationen und verschiedenen Substraten durchgeführt.

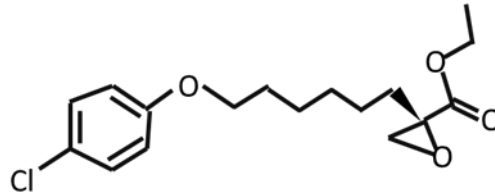
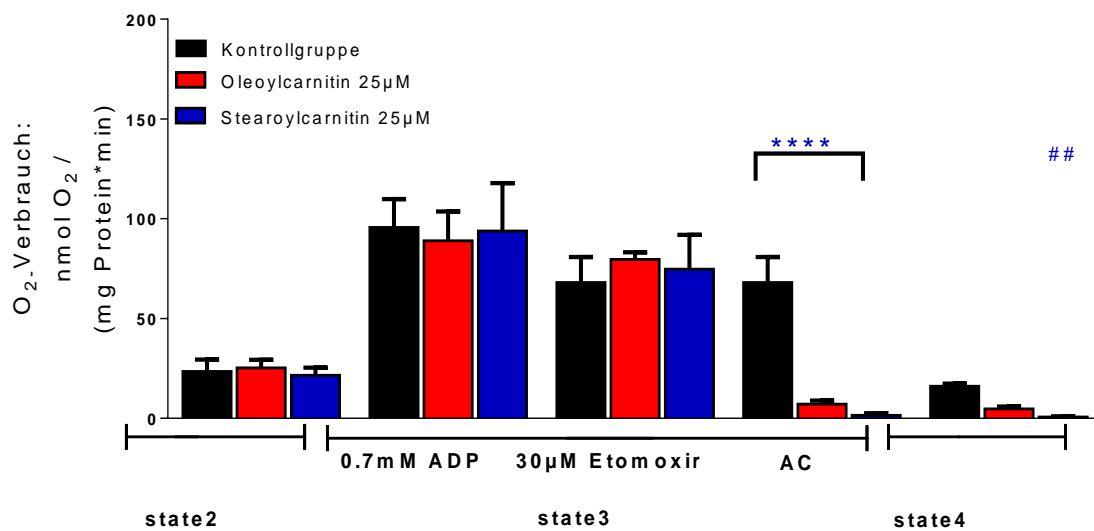


Abb.35: Strukturformel von Etomoxir.

Erstellt nach Informationen aus: [28, 59, 61].

Eine mittlere Konzentration von 30 μM Etomoxir hatte eine deutlich inhibierende Wirkung auf die PalmitoylCoA gestützte Atmung. Die Respiration der Mitochondrien reduzierte sich mit der Zugabe von 30 μM Etomoxir, wurde aber nicht vollständig blockiert. Dies ist in Abb. 36 dargestellt. Daraus kann man schließen, dass Etomoxir in einer Konzentration von 30 μM nur das Acylcarnitin-Shuttle beeinflusst. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Experimenten 30 μM Etomoxir verwendet.



Oleoylcarnitin (rot)
 2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test keine Signifikanz
 Vergleich Oleoylcarnitin mit Kontrollgruppe

Stearoylcarnitin (blau)
 ## 2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,0001
 Vergleich Stearoylcarnitin mit Kontrollgruppe

Abb.36: Respirationsmessungen mit **Pyruvat/Malat** als Substrat, mit 30 µM Etomoxir und 25 µM Acylcarnitinen in State 3. Messprotokoll 5.

Testgruppe: Etomoxir 30 µM + Oleoylcarnitin 25 µM (in Atmungspuffer und Pyruvat/Malat): n= 3 (roter Balken); Etomoxir 30 µM + Stearoylcarnitin 25 µM (in Atmungspuffer und Pyruvat/Malat): n=5 (blauer Balken); Kontrollgruppe: Etomoxir 30 µM (in Atmungspuffer und Pyruvat/Malat): n=4 (schwarzer Balken)

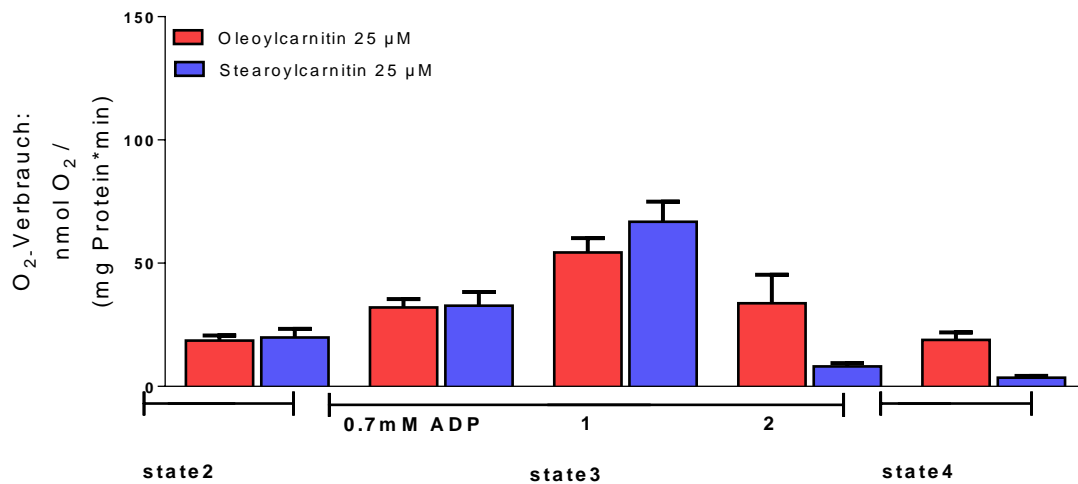
In Abb. 36 wurde eine mit 5 mM Pyruvat/Malat und 0,7 mM ADP gestützte Atmung induziert. Im so erzeugten State 3 folgte zuerst eine 30 µM Etomoxir und dann eine 25 µM Acylcarnitin Zugabe. In den zuvor beschriebenen Versuchen mit Etomoxir wurden die Mitochondrien erst mit Etomoxir und Acylcarnitinen behandelt und danach wurde mit ADP-Zugabe der Stoffwechsel angeregt. Dies war notwendig, um die Einflüsse von Etomoxir und Acylcarnitinen auf kardiiale Mitochondrien zu erfassen. In den in Abb. 36 gezeigten Versuchen wurde zunächst eine Respiration, also eine Stoffwechselleistung, erzeugt und daraufhin das Etomoxir und die Acylcarnitine zugegeben. In einer physiologisch arbeitenden Kardiomyozyte laufen permanent Stoffwechselvorgänge ab, die in Abb. 36 gezeigten Versuche sind also näher an der physiologischen Situation in

einer Kardiomyozyte. In der Kontrollgruppe wurden die Mitochondrien nur mit 30 μM Etomoxir, in State 3, und Pyruvat/Malat und ADP ohne Zugabe von Acylcarnitinen behandelt. Der Oleoylcarnitin und Stearoylcarnitin spezifische Inhibitions-Effekt auf die Pyruvat/Malat induzierte Atmung lässt sich auch hier durch Etomoxir in einer Konzentration von 30 μM nicht beeinflussen. Die statistische Auswertung ergab bei Stearoylcarnitin auch weiterhin eine signifikante Hemmung der Respiration. Bei Oleoylcarnitin ist das Ergebnis optisch in der Grafik ähnlich zu entnehmen, konnte aber nicht statistisch bestätigt werden.

3.6. Ergebnisse der Respirationsmessung mit Glutamat/Malat als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3.

Um die Auswirkungen von Acylcarnitinen auf den Stoffwechsel der Mitochondrien genauer beurteilen zu können bzw. um festzustellen, ob die gemessenen Inhibitionseffekte der Acylcarnitine substratspezifisch sind, wurden Respirationsmessungen mit unterschiedlichen Substraten, wie Pyruvat/Malat, Glutamat/Malat und PalmitoylCoA durchgeführt. Die Messungen der Respiration erfolgten mit Glutamat/Malat als Substrat und mit einer durch 0.7 mM ADP induzierten Respiration in Anwesenheit von Oleoylcarnitin oder Stearoylcarnitin in State 3.

Um die Auswirkungen der Acylcarnitine genauer zu erfassen, wurde die Auswertung der State 3 Respiration in 3 Zeitpunkte aufgeteilt. Zeitpunkt 0 beschreibt den Zustand der Mitochondrien in Anwesenheit von Substrat bei maximaler ADP Konzentration von 0.7 μM und in Abwesenheit von Acylcarnitinen. Zeitpunkt 1 beschreibt die unmittelbare Reaktion der Mitochondrien auf die Zugabe der Acylcarnitine. Zeitpunkt 2 beschreibt die längere Einwirkung (180 Sekunden) der Acylcarnitine auf die Mitochondrien.



2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test
 Vergleich Oleoylcarnitin mit Stearoylcarnitin keine Signifikanz

Abb. 37: Respirationsmessungen mit **Glutamat/Malat** als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3. Messprotokoll 6.

Oleoylcarnitin 25 μM: n=5 (roter Balken)

Stearoylcarnitin 25 μM: n=3 (blauer Balken)

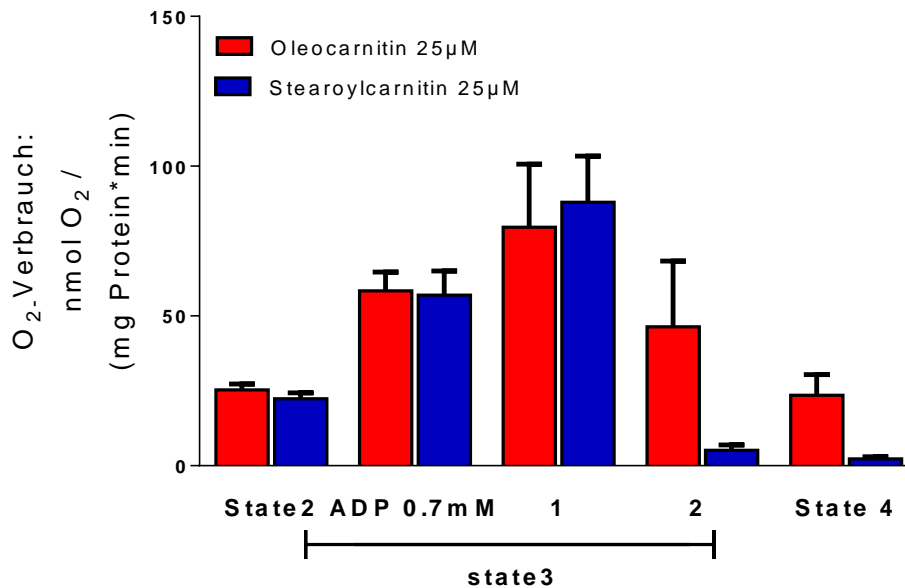
Die Respiration der Mitochondrien mit Glutamat/Malat als Substrat ließ sich nach Zugabe von 25 μM Oleoylcarnitin zum Zeitpunkt 1 zunächst steigern. Zum Zeitpunkt 2 reduzierte sich die Respiration wieder auf den Ursprungslevel zum Zeitpunkt 0, die Respiration war also noch messbar. Diese Respiration endete aber mit der Oligomicin Zugabe (State 4), da Oligomicin die ATPase vollständig inhibiert. Nach einer Zugabe von 25 μM Stearoylcarnitin steigerte sich die Respiration zunächst zum Zeitpunkt 1, dann stellte sich jedoch ein starker inhibitorischer Effekt ein (Abb. 37). Stearoylcarnitin löst folglich einen substratspezifischen inhibitorischen Effekt aus, sowohl mit Pyruvat/Malat als auch mit Glutamat/Malat als Substrat. Dagegen hat Oleoylcarnitin eine hemmende Respirationswirkung mit Pyruvat/Malat als Substrat, aber eine transiente steigernde Respirationswirkungen mit Glutamat/Malat als Substrat. Die statistische Auswertung konnte dieses Ergebnis nicht bestätigen, obwohl visuell ein Unterschied in den Grafiken sichtbar ist.

3.7. Ergebnisse der Respirationsmessungen nach el Azzouzi

Versuche mit PalmitoylCoA als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3.

Um die Auswirkungen von Acylcarnitinen auf den Fettsäure-Stoffwechsel genauer beurteilen zu können, wurde die Respiration mit Palmitoyl-CoA (16 C-Atome) als Substrat gemessen. Die Experimente wurden anhand des Fettsäure Protokolls nach el Azzouzi 2013 [81] durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe von 2 mM Carnitin, 3 mM Malat und 6,25 μ M PalmitoylCoA eine Respiration erzeugt, und dann 25 μ M Oleoylcarnitin oder Stearoylcarnitin zugegeben. Wie zuvor bei der Glutamat/Malat-Respiration wurde, um die Einflüsse der Acylcarnitine auf die Respiration genauer zu erfassen, die Auswertung der State 3 Respiration auf 3 Zeitpunkte aufgeteilt.

Zum Zeitpunkt 0 wurde die initiale Respiration in Abwesenheit von Acylcarnitin gemessen. Mit der Zugabe von 25 μ M Acylcarnitinen wurde direkt danach der Zeitpunkt 1 gemessen und nach Ablauf von 180 Sekunden Zeitpunkt 2.



2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test

Vergleich Oleoylcarnitin mit Stearoylcarnitin keine Signifikanz

Abb.38: Respirationsmessungen mit $6.25 \mu\text{M}$ **PalmitoylCoA** als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3. Messprotokoll 7. nach el Azzouzi [81].

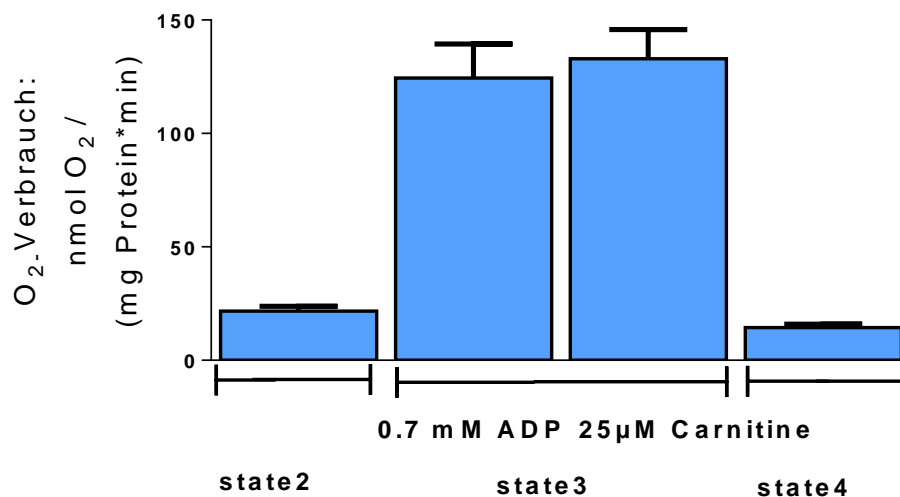
Oleoylcarnitin $25 \mu\text{M}$: $n=5$ (roter Balken)

Stearoylcarnitin $25 \mu\text{M}$: $n=6$ (blauer Balken)

Zum Zeitpunkt 1 steigerte sowohl Oleoylcarnitin ($25 \mu\text{M}$), als auch Stearoylcarnitin ($25 \mu\text{M}$) die Respiration. Eine längere Einwirkung (180 Sekunden) der Acylcarnitine auf die Respiration wird im Zeitpunkt 2 erfasst. Nach 180 Sekunden hatte Oleoylcarnitin eine steigernde Wirkung, aber Stearoylcarnitin eine inhibierende Wirkung. Die Ergebnisse mit dem Fettsäure-Protokoll nach el Azzouzi [81] sind sehr ähnlich mit den Ergebnissen mit dem Versuchs-Protokoll mit Glutamat/Malat als Substrat. Auch hier konnte die statistische Auswertung der Abb. 38 das Ergebnis nicht bestätigen.

3.8. Ergebnisse der Respirationsmessungen mit kardialen Mitochondrien mit Pyruvat/Malat als Substrat in Anwesenheit von ungebundenem Carnitin in State 3.

Mit diesen Versuchen sollte getestet werden, ob Carnitine ohne Bindung an Fettsäuren Einfluss auf die Pyruvat/Malat-Atmung haben. Der Einfluss der Carnitine auf die Pyruvat/Malat-Atmung der kardialen Mitochondrien sollte getestet werden, da die Carnitine eine immens wichtige Aufgabe im humanen Stoffwechsel haben. Die Carnitin Konzentration liegt im Blutplasma bei 25 μM bis 50 μM , sodass die hier verwendete Carnitin Konzentration fast dem physiologischen Blutplasma Spiegel entspricht [41]. Es wurde eine Pyruvat/Malat gestützte Atmung induziert und daraufhin im State 3 unterschiedliche Carnitin Konzentrationen zugegeben.



2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test

Vergleich Oleoylcarnitin vor und nach Zugabe keine Signifikanz

Abb.39: Respirationsmessungen mit 5mM **Pyruvat/Malat** als Substrat in Anwesenheit von 25 μM Carnitin in State 3. Messprotokoll 8

Testgruppe mit Carnitin 25 μM : n= 6

Bei einer Konzentration des Carnitins von 25 μM ließ sich kein signifikanter Einfluss auf die Pyruvat/Malat Respiration messen (Abb. 39). Auch bei mehrmaligen Versuchen, zur Sicherung der Resultate, ließen sich keine nennenswerten Veränderungen feststellen, was die statistische Auswertung bestätigt. Diese Versuche zeigen, dass Carnitine alleine keine Substrate für den Metabolismus der Mitochondrien sind, sondern lediglich eine Transportfunktion für Fettsäuren haben. Bei einer Konzentration von 200 μM Carnitin wurde die Respiration der Mitochondrien reduziert (nicht gezeigt).

3.9. Ergebnisse der Respirationmessung nach Protokoll Kern 2 mit PalmitoylCoA und Acylcarnitinen als Substrate des Stoffwechsels kardialer Mitochondrien

Können Acylcarnitine als Substrate der mitochondrialen Respiration verwendet werden?

In den vorherigen Versuchen wurde das Fettsäure-Protokoll nach el Azzouzi verwendet. Dieses wies jedoch eine schwache Respirations-Leistung auf. Deshalb wurden zwei neue Protokolle, Kern 1 und Kern 2, für eine mitochondriale Respiration auf Fettsäuren Basis aufgestellt. Durch die Veränderung der Bedingungen, wie z.B. der Carnitin Konzentration, konnten stabile und leicht reproduzierbare Respirationmessungen mit Fettsäuren durchgeführt werden. Das Fettsäure Protokoll Kern 2 wurde wie das Standard Respirations-Protokoll mit Pyruvat/Malat als Substrat aufgebaut. Zunächst wurden die Substrate zugegeben und danach die ADP-Konzentration schrittweise erhöht (siehe Abb. 40 als schematische Darstellung).

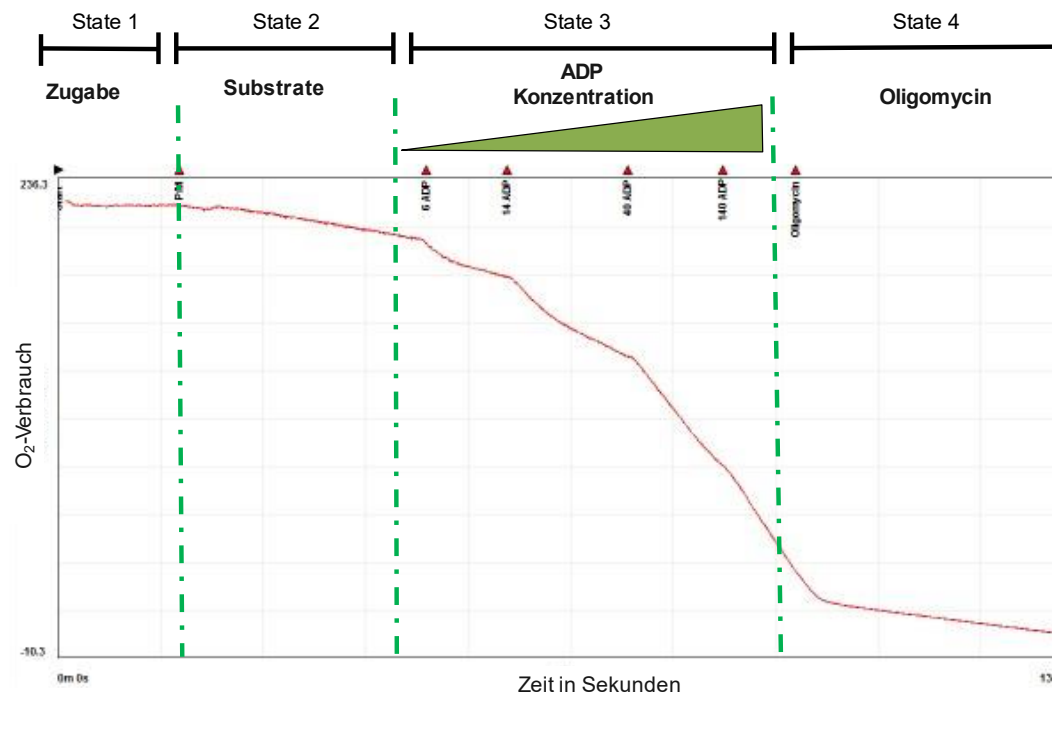


Abb.40: Schematische Darstellung des Standard Messprotokolls

Für die Versuche nach Protokoll Kern 2 wurden 1 mM Carnitin und 3 mM Malat in Atmungspuffer gelöst, die Mitochondrien zugegeben und für 90 Sekunden inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Messkammer geschlossen, die Messung gestartet und nach Ablauf der Inkubationszeit (90 Sekunden) 6.25 μM PalmitoylCoA zugegeben. Nach weiteren 90 Sekunden wurden 10 μM Oleoyl- oder Stearoylcarnitin zugegeben und wieder für 90 Sekunden inkubiert. Daraufhin wurden in aufsteigenden Konzentrationen 30 μM bis 1 mM ADP zugegeben. Der Versuch wurde mit der Zugabe von 1.2 μM Oligomycin beendet. Als Vergleichsgruppe diente hier eine Messung mit Pyruvat/Malat als Substrat in Abwesenheit von Acylcarnitinen.

Respirationsmessungen mit Pyruvat/Malat als Substrat nach dem Standardmessprotokoll. Die statistische Auswertung belegt diese Einschätzung.

3.10. Ergebnisse der Respirationsmessungen nach Protokoll Kern 1

Protokoll Kern 1 rückt die Funktion der Acylcarnitine als Substrate der mitochondrialen Respiration mehr in den Mittelpunkt. Die Versuche nach Kern 2 sollten die Sensitivität des Stoffwechsels der Fettsäure-Atmung mit dem neu aufgestellten Fettsäure-Protokoll untersuchen. Hierbei stand auch die Wirkung der unterschiedlichen ADP-Konzentrationen auf die Fettsäure-Respiration im Fokus, sowie die Vergleichbarkeit des Versuchsaufbaus mit vorherigen Experimenten. In **Protokoll Kern 1** wurde *zuerst* eine PalmitoylCoA gestützte Respiration erzeugt und danach Acylcarnitine in unterschiedlichen Konzentrationen in den laufenden Stoffwechsel zugegeben. Im Gegensatz dazu wurden in **Protokoll Kern 2** *zuerst die Acylcarnitine* mit den Mitochondrien inkubiert und erst danach die Atmung mit der Zugabe ansteigenden ADP-Konzentrationen erzeugt.

Die Bedingungen für Protokoll Kern 1 lassen sich wie folgt beschreiben:

Mit 1mM Carnitin, 3 mM Malat und 6,25 μ M PalmitoylCoA als Substrat wurde bei einer ADP Konzentration von 0,7 μ M eine Respiration der Mitochondrien erzeugt. Nach der Zugabe von Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin in den Konzentrationen von 10 μ M, 15 μ M oder 25 μ M im State 3 wurde erneut die mitochondriale Respiration gemessen. Um die mitochondriale Respiration genauer erfassen zu können, wurde wie zuvor, bei den Glutamt/Malat Messungen, der State 3 in drei Abschnitte geteilt und diese zu 3 Zeitpunkten erfasst. (siehe Abb. 42).

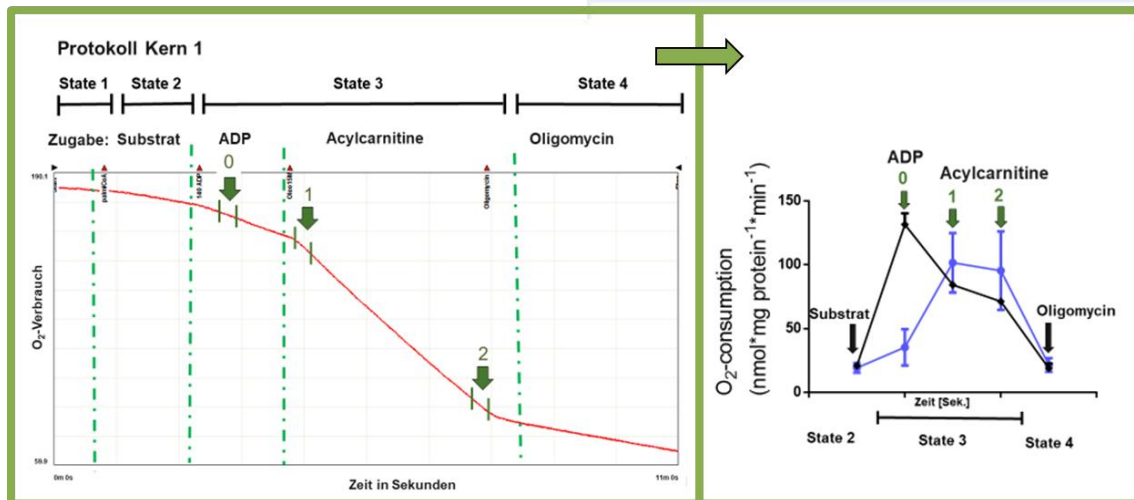


Abb.42: Schematischer Aufbau einer Messung nach Protokoll Kern 1, graphische Darstellung von 2 Messungen im Vergleich

Zeitpunkt 0 beschreibt den Zustand der Mitochondrien bei maximaler ADP Konzentration von 0.7 μM und in Abwesenheit von Acylcarnitinen.

Zeitpunkt 1 beschreibt die unmittelbare Reaktion der Mitochondrien auf die Acylcarnitin-Zugabe.

Zeitpunkt 2 beschreibt die Langzeitwirkung der Acylcarnitin-Behandlung.

3.11. Respirationsmessungen nach Protokoll Kern 1 im Vergleich zu Respirationsmessungen nach dem Standard-Protokoll mit Pyruvat/Malat als Substrat

Der direkte Vergleich der Wirkung von Oleoylcarnitin und Stearoylcarnitin auf die Respiration, erzeugt mit unterschiedlichen Substraten, wird in den folgenden Versuchseinheiten gezogen. Es wurden mit den Acylcarnitinen Oleoylcarnitin bzw. Stearoylcarnitin in denselben Konzentrationen von 10 μM , 15 μM und 25 μM Messungen mit PalmitoylCoA als Substrat nach Protokoll Kern 1 sowie Messungen mit Pyruvat/Malat als Substrat durchgeführt. Die Acylcarnitine wurden bei allen Versuchen im State 3 genau 90 Sekunden nach 0.7 μM ADP Zugabe zugegeben. Die Wirkung der Acylcarnitine auf die Respiration der Mitochondrien wurden in 3 Messpunkten erfasst.

3.11.1. Die Wirkung von Oleoylcarnitin auf die Respiration der kardialen Mitochondrien nach Protokoll Kern 1 im Vergleich zur Respiration, erzeugt durch Pyruvat/Malat als Substrat nach dem Standard Protokoll.

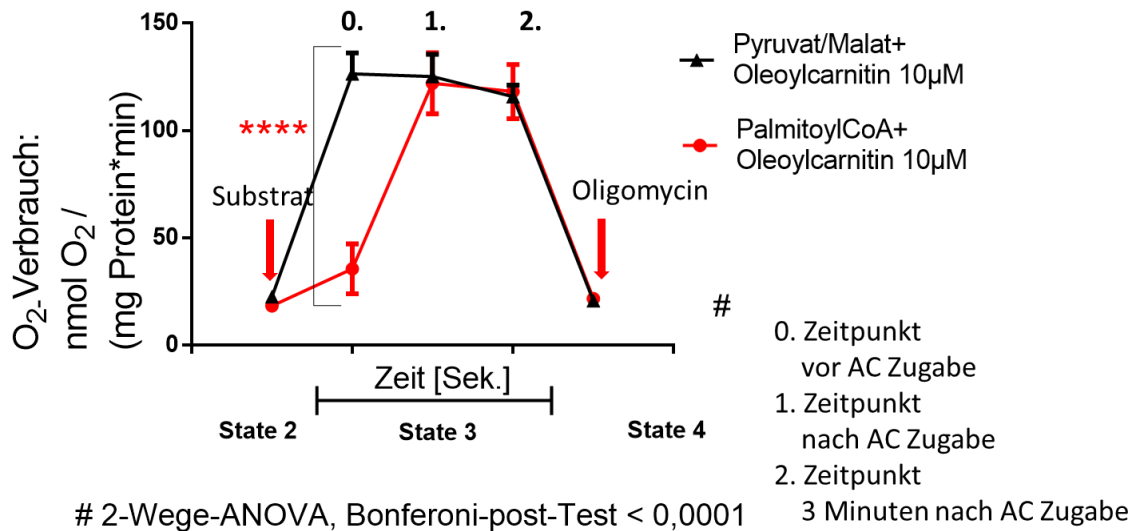
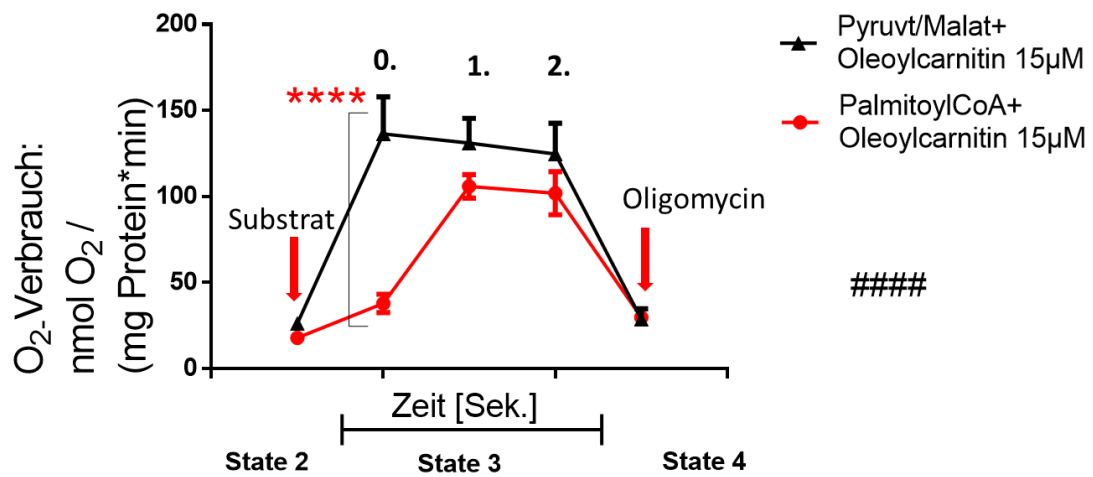


Abb.43: Respirationmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 10 µM Oleoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat-**Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA-**Respiration unter Zugabe von 10 µM Oleoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Kern 1 + Oleoylcarnitin: 10 µM n=5

Pyruvat/Malat (5 mM) + Oleoylcarnitin: 10 µM n=4



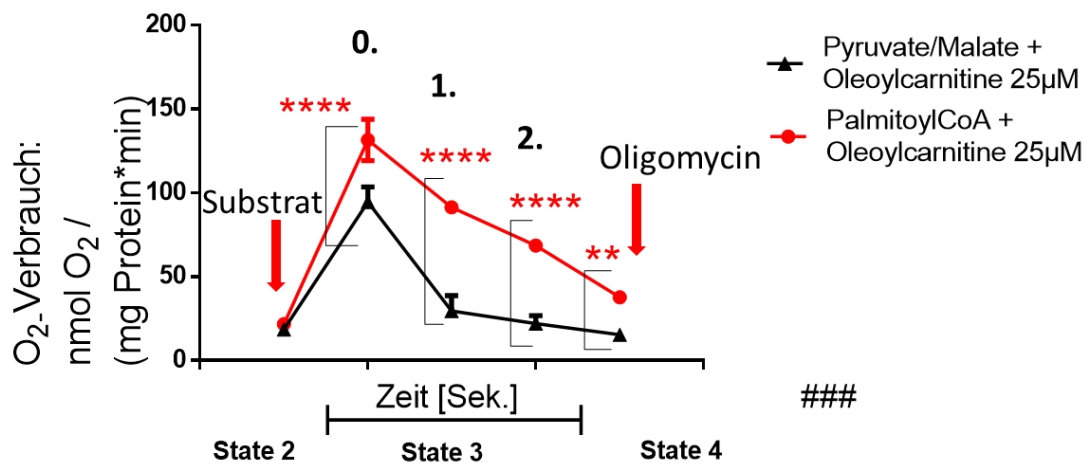
2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test < 0,0001

Abb.44: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 15 µM Oleoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat**-Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA**-Respiration unter Zugabe von 15 µM Oleoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Kern 1 + Oleoylcarnitin: 15 µM n=7

Pyruvat/Malat (5 mM) + Oleoylcarnitin: 15 µM n=6



2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test :
 Zeitpunkt 0: Bonferoni-post-Test: < 0,0001
 Zeitpunkt 1: Bonferoni-post-Test: < 0,0001
 Zeitpunkt 2: Bonferoni-post-Test: < 0,0001
 Oligomycin: Bonferoni-post-Test: < 0,01

Abb.45: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von $25 \mu\text{M}$ Oleoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat**-Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA**-Respiration unter Zugabe von $25 \mu\text{M}$ Oleoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Kern 1 + Oleoylcarnitin: $25 \mu\text{M}$ $n=3$

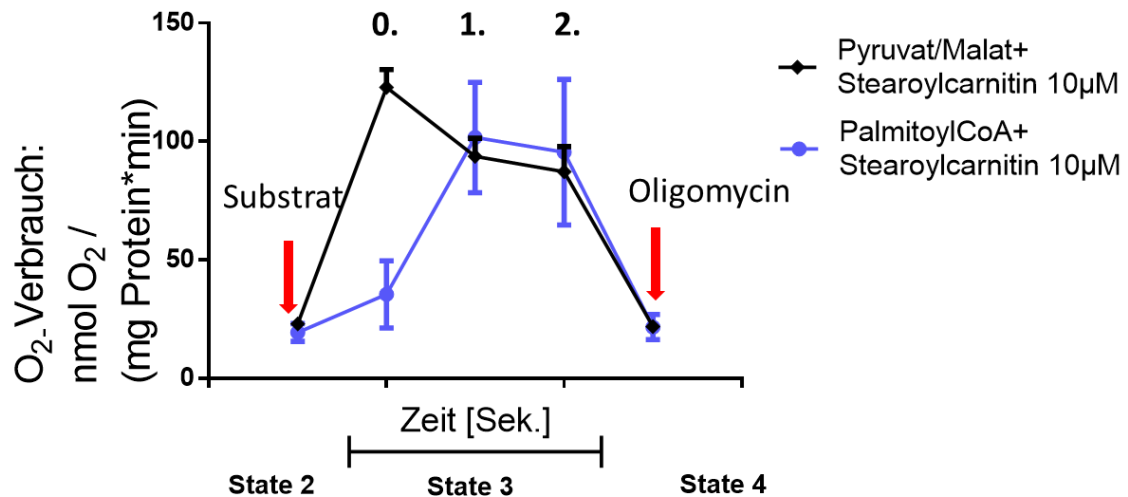
Pyruvat/Malat (5 mM) + Oleoylcarnitin: $25 \mu\text{M}$ $n=4$

Zu Beginn der Respirationsmessung in Abb. 43 ist die Fettsäure-Respiration signifikant unter dem Level der Pyruvat/Malat-Respiration. Vergleicht man jedoch die Wirkung von $10 \mu\text{M}$ Oleoylcarnitin sowohl auf die Pyruvat/Malat erzeugte Respiration als auch auf die PalmitoylCoA erzeugte Respiration, zeigte sich zum Zeitpunkt 2 der gleiche Respirationslevel sowohl bei der Pyruvat/Malat-Respiration als auch bei der Palmitoylcarnitin gestützten Respiration. Wie in Abb. 43 zu sehen steigerte die Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Oleoylcarnitin die Respiration der Fettsäuren-Atmung. Die statistische Auswertung der Abb. 43 bestätigt einen signifikanten Unterschied der Respiration vor der Acylcarnitin Zugabe zum Zeitpunkt 0. Nach der Acylcarnitin-Zugabe zum Zeitpunkt 1 und 2 lässt sich kein statistischer Unterschied erkennen.

Nach der Zugabe von 15 μM Oleoylcarnitin, dargestellt in Abb. 44, zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Fettsäure-Respiration. Zum Zeitpunkt 1 und 2 kommt es bei beiden Substraten zu einem ähnlichen Respirationlevel. Auch hier kann die statistische Auswertung diese Bewertung bestätigen.

Die Zugabe von 25 μM Oleoylcarnitin zeigte eine komplette Inhibition der Pyruvat/Malat-Respiration, während sich die PalmitoylCoA-Respiration, also die Fettsäure gestützte Respiration nach der Zugabe von 25 μM Oleoylcarnitin nur reduzierte [Abb. 45]. Die Versuche zeigen, dass mit steigender Oleoylcarnitin Konzentration die Pyruvat/Malat-Atmung rückläufig ist und die Fettsäure-Atmung gesteigert wird. Dies lässt auf einen Oleoylcarnitin gesteuerten Substrat-Switch von Pyruvat/Malat- zur Fettsäureatmung schließen. Die Statistik zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Respirations-Formen.

3.11.2. Die Wirkung von Stearoylcarnitin auf die Respiration der kardialen Mitochondrien nach Protokoll Kern 1 im Vergleich zur Respiration, erzeugt durch Pyruvat/Malat als Substrat nach dem Standard Protokoll.



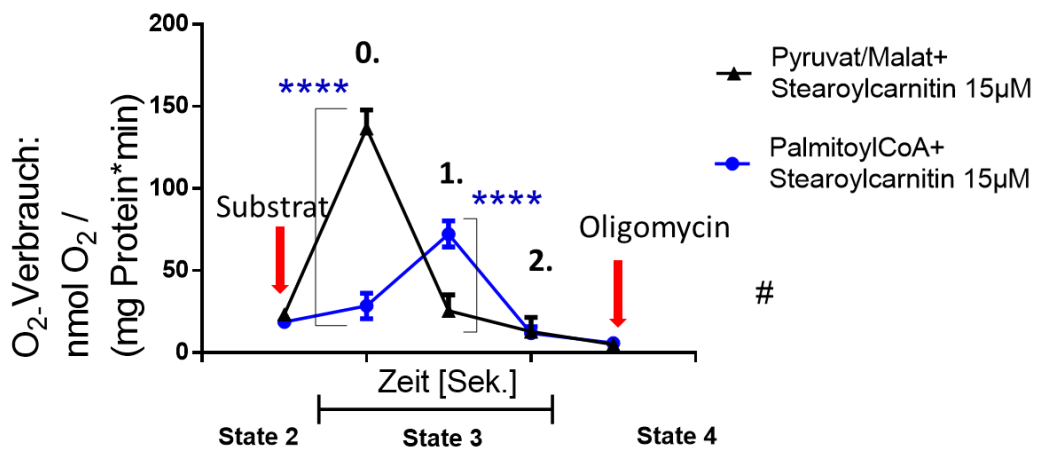
2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test keine Signifikanz

Abb.46: Respirationmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 10 µM Stearoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat**-Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA**-Respiration unter Zugabe von 10 µM Stearoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Kern 1+ Stearoylcarnitin: 10 µM n=5

Pyruvat/Malat (5 mM)+ Stearoylcarnitin: 10 µM n=4



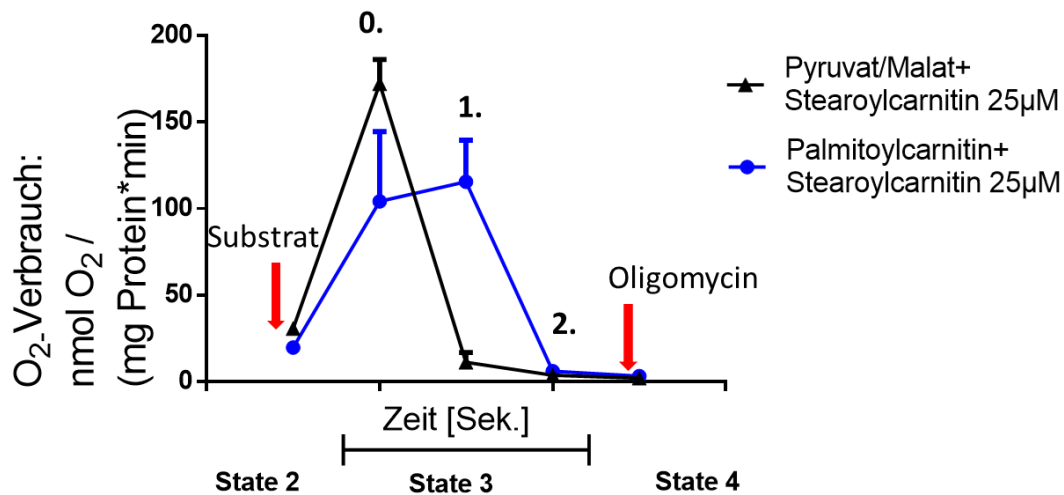
2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test:
 Zeitpunkt 0: Bonferoni-post-Test: < 0,0001
 Zeitpunkt 1: Bonferoni-post-Test: < 0,0001

Abb.47: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 15 µM Stearoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat**-Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA**-Respiration unter Zugabe von 15 µM Stearoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Kern 1 + Stearoylcarnitin: 15 µM n=3

Pyruvat/Malat (5 mM) + Stearoylcarnitin: 15 µM n=4



2-Wege-ANOVA, Bonferoni-post-Test keine Signifikanz

Abb.48: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 25 µM Stearoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat**-Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA**-Respiration unter Zugabe von 25 µM Stearoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Kern 1+ Stearoylcarnitin: 25 µM n=4

Pyruvat/Malat (5 mM) + Stearoylcarnitin: 25 µM n=4

Vergleicht man den Einfluss von Stearoylcarnitin in der Konzentration von 10 µM auf die PalmitoylCoA gestützte Respiration, zeigte sich eine Steigerung der Fettsäure-Respiration. Mit der Zugabe von 10 µM Stearoylcarnitin steigerte sich also die PalmitoylCoA-Respiration, jedoch wurde die Pyruvat/Malat-Respiration reduziert, wie in Abb. 46 dargestellt. In der Statistik lässt sich dieser Trend leider noch nicht bestätigen. Es findet also hier tendenziell ein Stearoylcarnitin regulierter Substratswitch von Pyruvat/Malat - zur Fettsäureatmung statt. 15 µM Stearoylcarnitin bzw. 25 µM Stearoylcarnitin inhibierten sowohl die Pyruvat/Malat-Respiration als auch die PalmitoylCoA-Respiration zum Zeitpunkt 2 [Abb.47; Abb.48]. Zu hohe Fettsäurekonzentrationen, die bei den Versuchen aber im unphysiologischen Bereich waren, könnten also den Stoffwechsel der Mitochondrien überfordern.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Daten, erhoben mit kardialen Mitochondrien unter dem Einfluss von Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Acylcarnitine konzentrationsabhängig eine inhibierende Wirkung auf die Pyruvat/Malat-Atmung haben. Dabei ist eine höhere Konzentration von Oleoylcarnitin (IC_{50} 15,9 μ M) zur Verminderung der Respiration nötig, während Stearoylcarnitin (IC_{50} 9,5 μ M) schon in niedrigeren Konzentrationen die Respiration vermindert. Es gibt aber Unterschiede zwischen den respiratorischen Bedingungen, den sog. *respiratory states*. Im State 3 (in Anwesenheit von ADP) müssen höhere Konzentrationen der Acylcarnitine verwendet werden als im State 1 (in Abwesenheit von Substraten und ADP), um eine Inhibition zu erreichen. Allerdings sind die Konzentrationsunterschiede unter dem Aspekt der Acylcarnitin-Akkumulation kritisch zu betrachten, da Acylcarnitine in Zellen bzw. Membranen akkumulieren. Deshalb können Experimente mit geringen Konzentrationsunterschieden Ergebnisse mit einer großen Varianz ergeben. Vergleicht man die unterschiedlichen Substrate, mit denen die Versuche durchgeführt wurden, ließ sich erkennen, dass Stearoylcarnitin in hohen Konzentrationen (25 μ M) die Respiration inhibierte, unabhängig von den zugegebenen Substratkombinationen, d.h., Pyruvat/Malat, Glutamat/Malat oder PalmitoylCoA. Oleoylcarnitin inhibierte in hohen Konzentrationen (25 μ M) die Pyruvat/Malat-Respiration der kardialen Mitochondrien, steigerte aber mit den Substraten Glutamat/Malat und PalmitoylCoA deren Respiration. Der einzige Unterschied zwischen Oleoylcarnitin und Stearoylcarnitin ist aber nur eine Doppelbindung am 9. C-Atom von Oleoylcarnitin (cis- Δ^9 -18:1). Sowohl Oleoyl als auch Stearoyl werden in der β -Oxidation metabolisiert, wobei die Doppelbindung von Oleoyl durch die mitochondriale Isomerase von der cis- in die trans-Stellung überführt und daraufhin hydratisiert wird. Die Reaktion ist in Abb. 49 schematisch dargestellt. Ob dieser Unterschied in der strukturellen Bindung in der cis-Stellung und ob der Unterschied in der Metabolisierung von Oleoyl im Vergleich zu Stearoyl die Respirations-Unterschiede mit hervorruft, ließ sich in Rahmen dieser Doktorarbeit nicht klären [29].

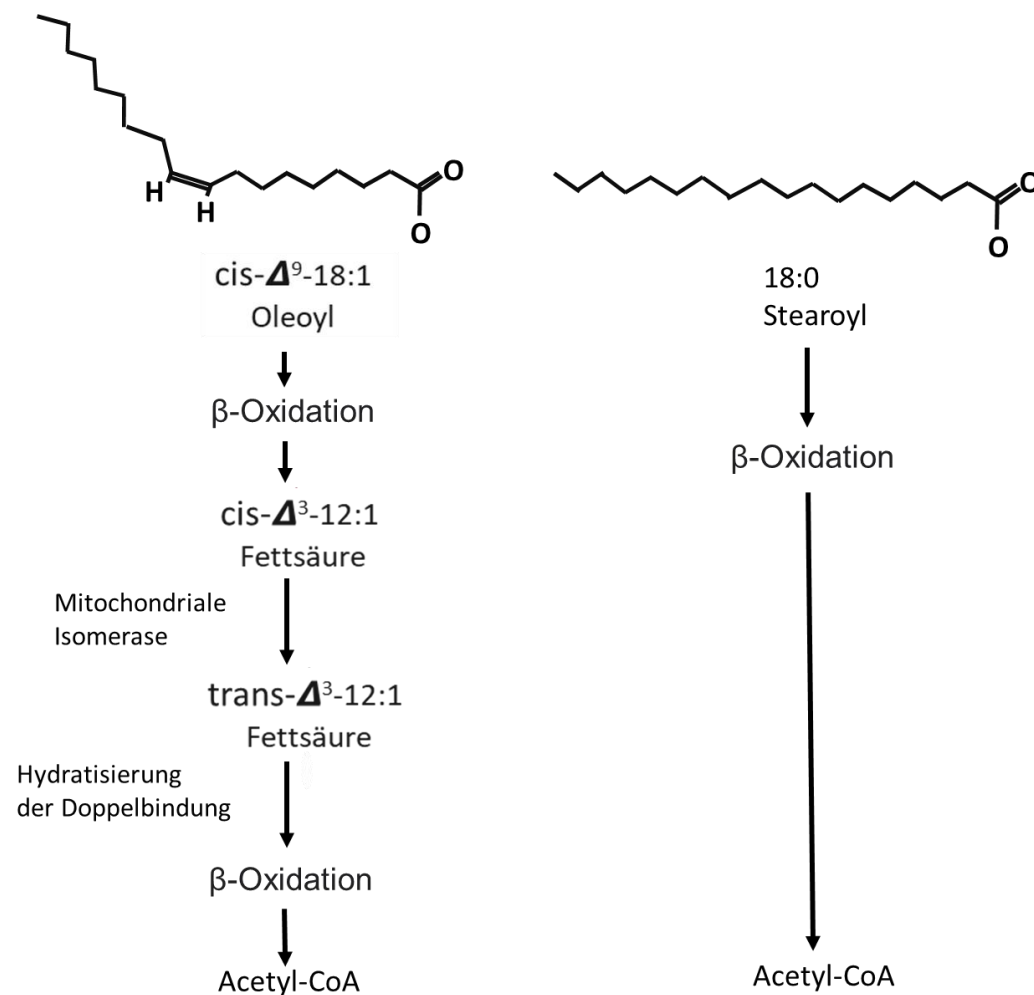


Abb.49: Schematische Darstellung der Abbauwege von Oleoyl (C18:1) links im Vergleich zu Stearoyl (C18) rechts. Erstellt nach Informationen aus: [29].

4.2. Regulation eines Substratswitches von Pyruvat zur Fettsäure-Respiration in kardialen Mitochondrien

Wie schon in der Einleitung erwähnt ist bekannt, dass unter physiologischen Bedingungen mehr als 90% der ATP-Produktion in den Mitochondrien der Kardiomyozyten von Fettsäuren gedeckt werden, während nur ein kleiner Teil aus der Glukose Oxidation bzw. Glykolyse stammt [26]. Können Acylcarnitine den Stoffwechsel

der kardialen Mitochondrien so beeinflussen, dass diese bevorzugt Fettsäuren verstoffwechseln?

In der Kombination mit Palmitoyl-CoA, einer Fettsäure mit 16 C-Atomen, Carnitin und Malat steigerten die Acylcarnitine Oleoylcarnitin bzw. Stearoylcarnitin die mitochondriale Atmung mit einem Optimum um 10-15 μM , während diese Konzentrationen die Pyruvat/Malat-Atmung beginnend inhibieren. Bei höheren Konzentrationen der Acyl-Carnitine (d.h. 25 μM) kommt es zur Inhibition der Atmung unabhängig vom vorliegenden Substrat. Diese Daten legen nahe, dass Acyl-Carnitine eine Präferenz der Substrat-Utilisation von Glukose- (Pyruvat-) zu Fettsäure-Oxidation fördern könnten.

4.3. Regulationspunkte des von Oleoylcarnitin regulierte Substratswitch von Glukose zur Fettsäure-Respiration in kardialen Mitochondrien

Die Ergebnisse könnten ein Hinweis dafür sein, wie die Substrat-Selektion in den kardialen Mitochondrien reguliert wird. Mit der Verwendung unterschiedlicher Substrat Kombinationen (Pyruvat/Malat; Gluatmat/Malat; PalmitoylCoA/Malat/Carnitin), die in unterschiedlichen Stoffwechselwegen abgebaut werden, sollte herausgefunden werden, wo genau diese Regulierung bzw. der Switch von dem Substrat Pyruvat auf das Substrat Fettsäure durch die Acylcarnitine vollzogen werden könnte. Eine Übersicht ist in Abb. 50 dargestellt.

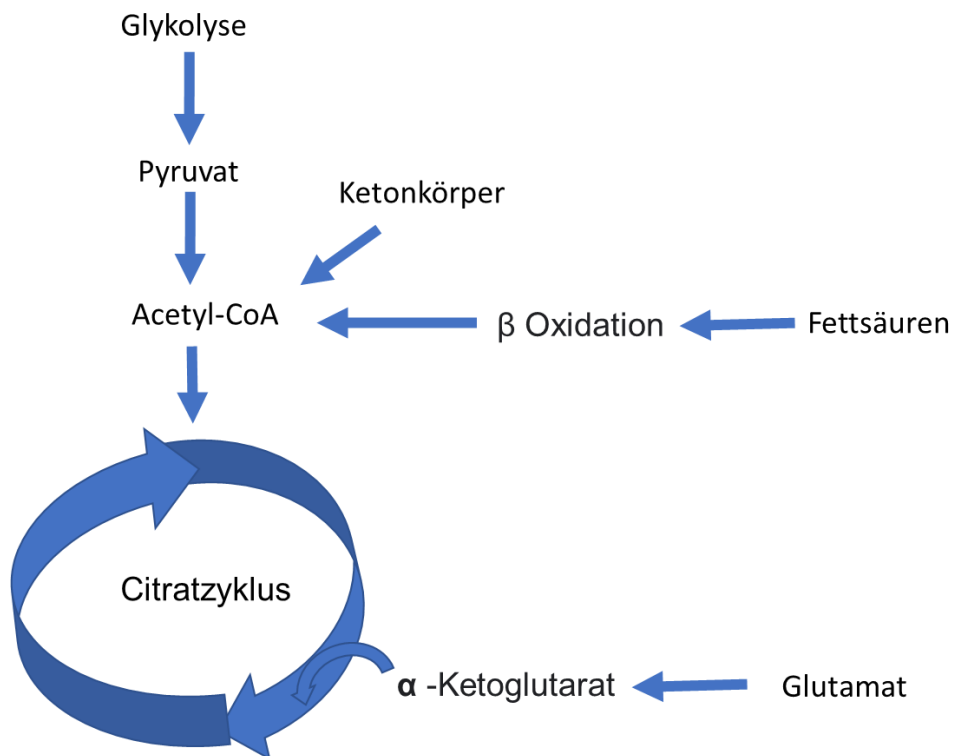


Abb.50: Schematische Darstellung der Stoffwechselwege zum Abbau von Pyruvat, Glutamat und Fettsäuren. Erstellt nach Informationen aus: [7, 26].

Beim Abbau von Glukose in der Glykolyse im Zytosol der Kardiomyozyte entsteht Pyruvat, welches in das Mitochondrium transportiert wird. Pyruvat wird nach der Aufnahme in das Mitochondrium zu Acetyl-CoA umgewandelt und daraufhin im Citratzyklus im Mitochondrium abgebaut. Eine Pyruvat/Malat gestützte Atmung wird von 25 μM Oleoylcarnitin inhibiert. Glutamat, z.B. gewonnen aus der Aminosäure Glutamin, wird zu α -Ketoglutarat umgewandelt und ebenfalls im Citratzyklus abgebaut.

Eine Glutamat/Malat gestützte Atmung wird jedoch von 25 μM Oleoylcarnitin nicht inhibiert, sondern - zumindest temporär - gesteigert. Hierbei muss kritisch betrachtet werden, dass die Respirationslevel bei einer Glutamat/Malat-Respiration immer deutlich schwächer waren als bei allen anderen Substraten. PalmitoylCoA ist eine Fettsäure mit 16 C-Atomen und wird im Mitochondrium über die β -Oxidation zu Acetyl-CoA umgebaut. Daraufhin wird das gewonnene Acetyl-CoA im Citratzyklus abgebaut. Eine PalmitoylCoA gestützte Respiration wird ebenfalls von 25 μM Oleoylcarnitin nicht inhibiert. Die von Oleoylcarnitin nicht inhibierte, mit Glutamat/Malat bzw. PalmitoylCoA erzeugte Respiration, lässt den Schluss zu, dass die Substrat-Regulation folglich nicht bei den

Enzymen der β -Oxidation oder des Citratzyklus stattfinden kann. Man könnte deshalb theoretisch die an der β -Oxidation und am Citratzyklus beteiligten Enzyme ein- bzw. ausgrenzen. Der Abbau der Glukose über die Glycolyse zum Abbauprodukt Pyruvat findet im Zytosol der Kardiomyozyte statt und kann deshalb nicht Teil der Regulation durch Acylcarnitine und des hier untersuchten Substrat-Switches sein, da in den Respirationsmessungen isolierte Mitochondrien (d.h. eine Zellorganelle ohne Zytosol) verwendet wurden. Es wäre möglich, dass Oleoylcarnitin die Aufnahme von Pyruvat in das Mitochondrium verhindert, oder dass Enzyme, die Pyruvat in das Mitochondrium einschleusen, konzentrationsabhängig von Oleoylcarnitin reguliert werden oder sogar inhibiert werden (siehe Abb. 51).

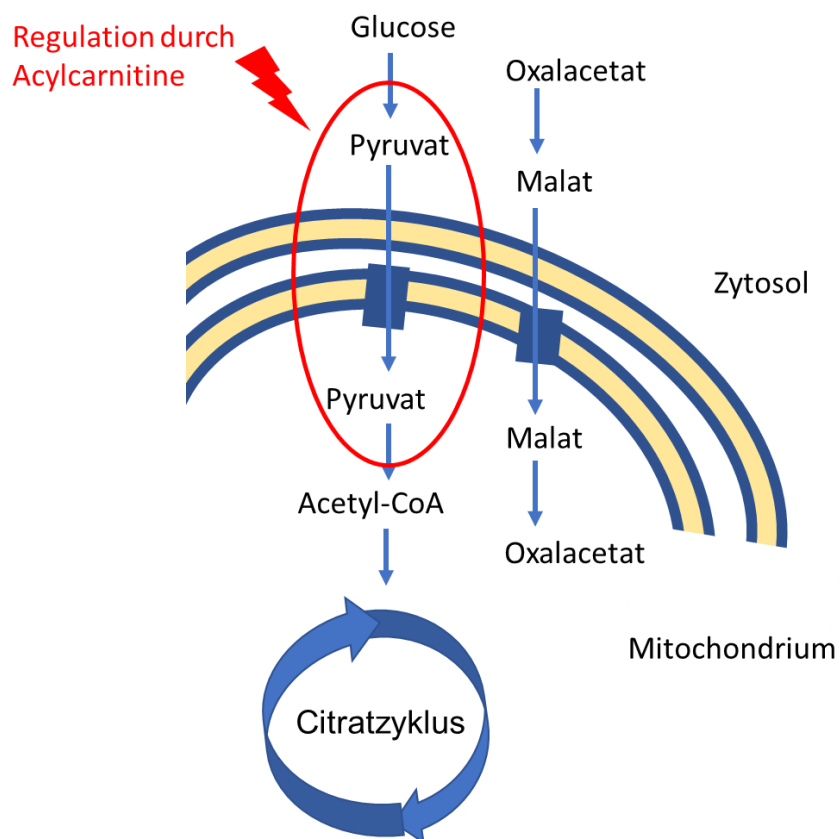


Abb.51: Schematische Darstellung der vermutlich durch Oleoylcarnitine regulierten Aufnahme bzw. Stoffwechselwege des Pyruvats im Mitochondrium. Erstellt nach Informationen aus: [7, 26].

Dieser Oleoylcarnitin regulierte Substratswitch von Glukose- zu Fettsäure-Atmung würde erklären, warum das menschliche Herz Fettsäuren bevorzugt metabolisieren kann. Dies zeigt auch der hohe Anteil von bis zu 90% der Fettsäuren (im Gegensatz zu 10-40% Glucose) am kardialen Energieverbrauch [7, 26]. Theoretisch wäre es möglich, dass, sobald sich genügend Fettsäuren für den Energiebedarf der Kardiomyozyte in der Zelle angereichert haben, diese über das Acylcarnitin-Shuttle als Acylcarnitine in das Mitochondrium gelangen. Daraufhin steigt die Acylcarnitin-Konzentration im Mitochondrium an, über den „CAC“-Transporter können die gebildeten Acylcarnitine das Mitochondrium wieder verlassen und die Aufnahme sowie der Abbau von Pyruvat wird herunterreguliert oder sogar ganz inhibiert. Diese Theorie könnte auch mit der Physiologie des klassischen Substrat-Switches, der im Randle-Cycle formuliert wird, vereinbar sein. Sinkt die Fettsäurekonzentration wieder ab, wird in gleichem Maße der Pyruvat- und damit der Glucoseabbau gesteigert. Da im menschlichen Blut immer Glucose und Fettsäuren vorhanden sind, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, ist durch die Interaktion von Fettsäuren und Glukose im Metabolismus von Kardiomyozyten und Mitochondrien immer eine optimale Energieversorgung des Herzens gewährleistet [7, 26].

4.4. Einordnung der Resultate in das Modell des Randle Cycle

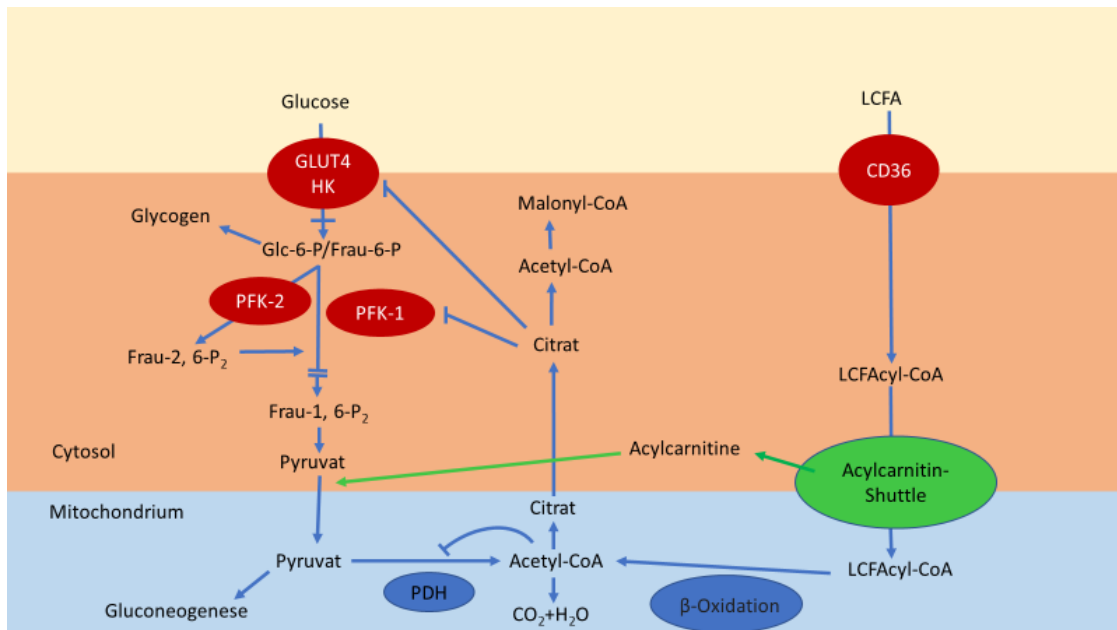


Abb.52: Hemmung der Pyruvat/Malat Respiration durch Acylcarnitine, eingeordnet in das Modell des Randle Cycle. Erstellt nach Informationen aus: [73].

Der Randle Cycle ist ein allgemeines Modell, das die Regulation der Substrat-Auswahl einzelner Zellen beschreibt. Dieser wurde nicht spezifisch auf das Herzmuskel-Gewebe zugeschnitten. In diesem Modell wird beschrieben, wie eine erhöhte Glucose-Konzentration die Verstoffwechslung von Fettsäuren sowie erhöhte Fettsäure-Konzentrationen den Glucose-Stoffwechsel hemmen können. Einer der Regulationspunkte für die Hemmung der Verstoffwechslung von Fettsäuren ist der CPT1-Transporter, welcher Teil des Acylcarnitin-Shuttles ist [73]. Der CPT1 Transporter bindet Fettsäuren an Carnitin, um sie als Acylcarnitine durch die Membranen in das Mitochondrium zu schleusen. Alle weiteren Regulationspunkte, die den Fettstoffwechsel betreffen, liegen außerhalb des Mitochondriums. In den hier vorliegenden Experimenten wurden isolierte kardiale Mitochondrien und an Carnitin gebundene Fettsäuren, also Acylcarnitine, verwendet. Es wurde also die Funktion des CPT1-Transporters umgangen. Die logische Folge daraus wäre, dass die Hemmung der Fettsäure-Atmung mit Acylcarnitinen als Substrat nicht durch die Zugabe von Pyruvat gehemmt werden könnte. Dem Randle Cycle zufolge kann eine erhöhte AcetylCoA-Konzentration im

Mitochondrium die Verstoffwechslung von Pyruvat über die Pyruvatdehydrogenase (PDH) hemmen. Auf den ersten Blick liegt der Schluss nahe, dass die hemmenden Effekte der Acylcarnitine auf die Pyruvat/Malat Respiration sich ebenso erklären lassen. Dieses Argument verliert allerdings bei genauerer Betrachtung des Aufbaus des Acylcarnitin-Shuttles seine Kraft.

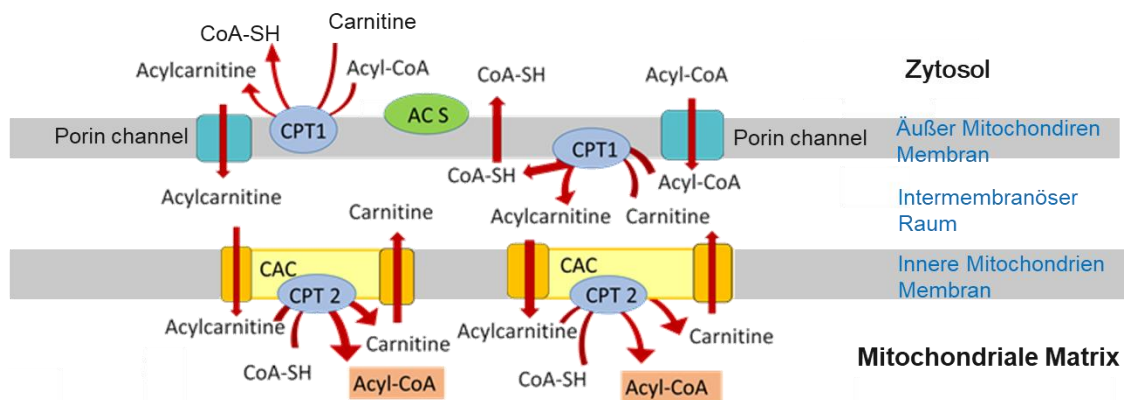


Abb.53: Schematische Darstellung des Acylcarnitin-Shuttles

Erstellt nach Informationen aus: [28, 29, 34, 57, 60-62].

Fettsäuren gelangen, gebunden an Carnitin, als Acylcarnitine vorliegend in den intermembranösen Raum. Um die „innere Mitochondrien Membran“ zu passieren, findet über den CAC-Transporter ein 1:1 Austausch mit Carnitin statt (siehe Abb. 53). In Experimenten, in denen eine auf Acylcarnitin-basierte Fettsäure-Respiration erzeugt werden soll, muss immer Carnitin zugegeben werden, um den CAC-Transporter funktionsfähig zu halten. Die Ergebnisse zeigen auch, dass sich nur in Anwesenheit von Carnitin und PalmitoylCoA eine Acylcarnitin-gestützte Atmung erzeugen lässt. Das bedeutet, dass ohne Carnitine die Acylcarnitine nicht die „Innere Mitochondrien Membran“ passieren und in das Mitochondrium gelangen können. Diese These bestätigen die Versuche nach Protokoll „Kern 1“, bei dessen Entwicklung die ideale Carnitin-Konzentration im Verhältnis zur Acylcarnitin-Konzentration ermittelt wurde. Die Experimente mit Pyruvat/Malat zeigen, dass Acylcarnitine bei alleiniger Zugabe eine Pyruvat/Malat-Respiration hemmen können. Diese Hemmung der Atmung durch die Acylcarnitine, ohne Carnitin Zugabe, d.h. ohne Eintritt in die Matrix des Mitochondriums, lassen den Schluss zu, dass sich ein zusätzlicher Regulationspunkt in oder an der Membran des Mitochondriums befinden könnte. Die experimentellen Ergebnisse dieser Doktorarbeit widersprechen dem Randle Cycle also nicht, sondern ergänzen diesen. Ob

dieser vermutlich neue Regulationspunkt an der Mitochondrienmembran nur spezifisch in kardialen Mitochondrien auftritt oder generalisiert im humanen Organismus vorliegt, könnten zukünftige Studien zeigen.

4.5. Ursachen und Folgen erhöhter Acylcarnitin-Konzentrationen

Wichtig wäre es besonders für Patienten mit Arrhythmien und Vorhofflimmern herauszufinden, weshalb die Blut-Plasmawerte von Oleoylcarnitin im Patientenblut ansteigen. Eine metabolische Störung des Carnitin-Fettsäure-Zyklus sowie eine Überfunktion der CPT 1 oder eine Unterfunktion der CPT 2 wären denkbar. (Diese Überlegungen sind angelehnt an [62]. Eine Störung des OCTN2-Transporters würde ebenfalls zu einem Anstieg der Acylcarnitin Blut-Plasmawerte führen. Die genaue Lokalisation der Transportmechanismen, die zu einem Anstieg der Acylcarnitin-Blut-Plasmawerte führen, ist äußerst schwierig zu bestimmen, da die Acylcarnitine in den unterschiedlichen Zellorganellen bzw. Organen an vielfältigen Interaktionen beteiligt sind.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wird vermutet, dass der OCTN2-Transporter Eintrittspforte der Carnitine und Austrittspforte der Acylcarnitine in die Kardiomyozyte ist. Der OCTN2-Transporter befindet sich in der Plasmamembran der Kardiomyozyten und hat sowohl zum extrazellulären Raum als auch zum Zytosol der Kardiomyozyten Kontakt. Die Acylcarnitine benötigen einen spezifischen Transporter, um aus der Zelle ausgeschleust zu werden [34]. Dies lässt den Umkehrschluss zu, dass die Acylcarnitine nicht durch die Plasmamembran der Kardiomyozyten ins Blutplasma diffundieren können, sondern auch aktiv ggf. durch den OCTN2-Transporter aus dem Blutplasma in die Zelle transportiert werden müssen. Eine erhöhte Acylcarnitin-Außenkonzentration im Blut könnte also einen vermehrten Transport der Acylcarnitine durch den OCTN2-Transporter in die Zelle bewirken (siehe Abb. 54).

Funktionen des OCTN2 Transporters

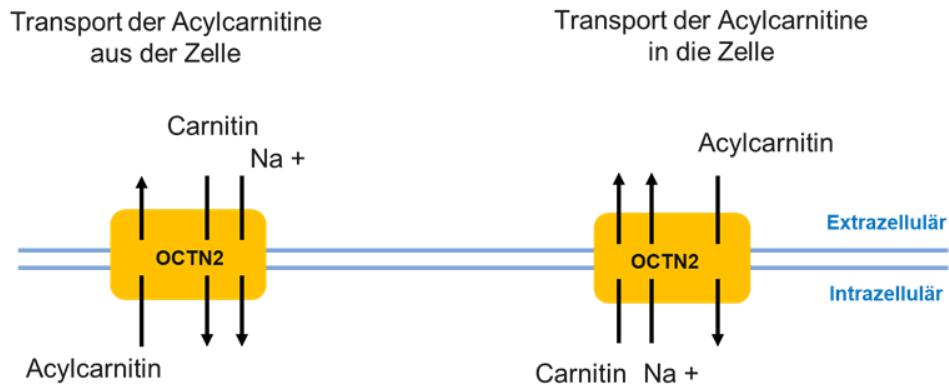


Abb.54: Schematische Darstellung der OCTN2 Transportfunktionen
 Erstellt nach Informationen aus: [29].

Die Arrhythmien könnten also durch Einfluss der Acylcarnitine auf den Stoffwechsel der Kardiomyozyten ausgelöst werden. Ein Gegenargument hierfür wären die großen Konzentrationsunterschiede, die zur Blockade des Stoffwechsels in den Mitochondrien benötigt werden. Gleichzeitig könnte ein vermehrter Transport der Acylcarnitine durch den OCTN2 ein Absinken der Na⁺-Konzentration in der Zelle bewirken und das feinabgestimmte Konzentrationsverhältnis zwischen Natrium, Kalium und Calcium in der Kardiomyozyte stören und so zu Arrhythmien führen. Besonders der Na-abhängige Na/Ca-Austauscher, der Ca²⁺ aus der Zelle transportiert, könnte durch ein Absinken der intrazellulären Na⁺-Konzentration beeinflusst werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob eine Reduktion oder vollständige Blockade durch pharmakologische Inhibition des OCTN2-Transporters möglich wäre. Wäre es also möglich, durch bestimmte Medikamente die Aufnahme von Acylcarnitinen in die Kardiomyozyte zu verringern und damit Arrhythmien zu verhindern? Eine andere Theorie für die Auslösung von Arrhythmien wäre, dass Acylcarnitine in hohen Konzentrationen die Zellmembran der Kardiomyozyte beschädigen. In diesem Falle wäre eine Inhibition des OCTN2-Transporters natürlich wirkungslos, da die Schädigung der Kardiomyozyte an der Plasmamembran und damit auch am OCTN2-Transporter stattgefunden hat. Um den Einfluss dieser Inhibitoren zu erforschen und damit die Funktion des OCTN2-

Transporters besser zu verstehen, wären weitere Experimente notwendig. Bei allen Experimenten wurde die Tatsache außer Acht gelassen, dass intrazellulär viele unterschiedlich gebundene Fettsäuren und auch Acylcarnitine vorliegen, was bei den Überlegungen zu möglichen Versuchen zunächst ausgeklammert wurde [29].

In der Kohortenstudie von Professor Zeller wurden erhöhte Acylcarnitin-Konzentrationen im Blut-Plasma der Probanden mit der Wahrscheinlichkeit des Entstehens von Vorhofflimmern assoziiert. Es handelte sich hierbei um langkettige Acylcarnitine mit 18 C-Atomen mit einer Doppelbindung [18]. In der schon erwähnten New-Zealand-Studie konnte bei der Auswertung der Serumproben eine Assoziation von Vorhofflimmern sowohl mit C18:1 als auch C18:2 erfolgen. Eine Testung anderer langkettiger Fettsäuren wäre also ebenfalls interessant, wie z.B. mit Linolsäure. Linolsäure hat eine Kettenlänge von 18 C-Atomen genau wie die schon als Acylcarnitine getesteten Fettsäuren Oleoyl und Stearoyl. Im Unterschied zu Stearoyl ohne Doppelbindung sowie zu Oleoyl mit einer Doppelbindung (9. C-Atom) besitzt Linolsäure zwei Doppelbindungen (9. und 12. C-Atom) [17, 20, 29]. Welchen Einfluss diese zweite Doppelbindung auf Respirations-Experimente mit Linolcarnitin hätte, wäre sicher auch eine interessante Fragestellung für weitere Experimente. Die mitochondriale Respiration könnte mit Versuchen mit Fettsäuren verschiedener C-Atom-Kettenlängen sowie verschiedener Doppelbindungen genauer erforscht werden. Es wären verschiedene Einflüsse mehrfach ungesättigter Fettsäuren sowie mittel- und kurzkettiger Fettsäuren auf den Metabolismus kardialer Mitochondrien oder Kardiomyozyten zu testen. Im gesunden Herzmuskelgewebe ist ein hoher Energieumsatz erforderlich, vor allem zu der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und der muskulären Kontraktion. Dieser wird hauptsächlich durch die Oxidation von Fettsäuren gedeckt. Im Vergleich zur Glucose-Verstoffwechslung lässt sich über die β -Oxidation mehr Energie, mehr ATP gewinnen. Gleichzeitig steigt auch der Sauerstoffverbrauch pro ATP. Eine mögliche pathologische Veränderung des Stoffwechsels zu Ungunsten des Herzmuskels wird in aktuellen Studien vermutet. Die Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien legen den Schluss nahe, dass eine zu hohe Konzentration von langkettigen Acylcarnitinen die Atmung der Mitochondrien stört. Diese Störung könnte ggf. die Krebs-Zyklus-abhängige Zufuhr von Elektronen über die Transportkette behindern. Dies wurde in der Würzburger-Studie vermutet.

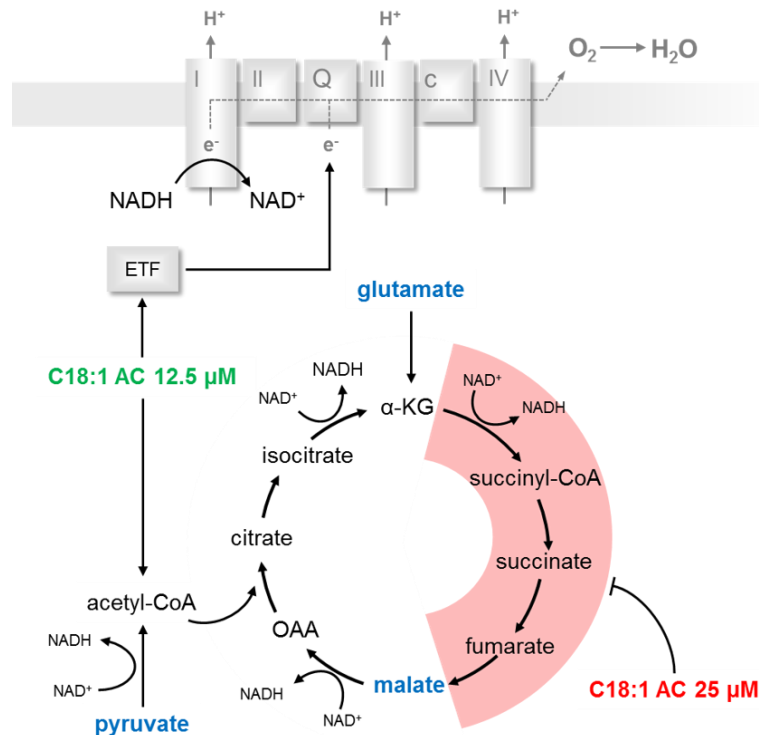


Abb.55. Schematische Darstellung der vermuteten Stoffwechsel Störung.

Erstellt und freigegeben von Dr. Edoardo Bertero.

Durch die Untersuchung einer möglichen Verbindung zwischen kardiometabolischen Veränderungen, Acylcarnitin-Konzentrationen und tatsächlichem Vorhofflimmern, wie z.B. in der New-Zealand-Studie und Würzburger-Kohorten-Studie, sollen neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Beide Studien beziehen sich auf eine Situation mit gestörtem oxidativem Stoffwechsel, z.B. während Myokardischämie. Aus der Ischämie des Myokards, d.h. des Sauerstoffmangels, resultiert eine Blockade der fettsäurebasierten Atmung (dargestellt in Abb. 55). Dies könnte zu einer Akkumulation von langkettigen Acylcarnitinen im Mitochondrium führen. Ein lokaler Anstieg der Acylcarnitin-Konzentration könnte somit den Stoffwechsel stören und Arrhythmien verursachen. Auch einen hohe Gewebekonzentration der Acylcarnitine steht im Verdacht, die Gewebekonzentration zu erhöhen und somit die Arrhythmien auszulösen [20, 22, 24, 25].

4.6. Schlussfolgerung

Acylcarnitine nehmen Einfluss auf den Stoffwechsel der kardialen Mitochondrien, indem sie die Pyruvat-abhängige Atmung inhibieren, während sie gleichzeitig die Oxidation von anderen Fettsäuren aufrechterhalten. Dies könnte die bereits im Rahmen des Randle-Zyklus beschriebenen Regulationsmechanismen, die die metabolische Flexibilität des Herzens begründen, um einen weiteren Mechanismus ergänzen. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass langkettige Acylcarnitine in sehr hohen Konzentrationen inhibierende und ggf. pathologische Wirkungen auf die Respiration der kardialen Mitochondrien haben. Die o.g. Regulation des Substratmetabolismus ist allerdings eher nicht die Grundlage für die an Zellen beobachteten Arrhythmien. Eine Überlastung des kardialen Metabolismus könnte hingegen ursächlich sein. Der genaue Mechanismus für die Arrhythmien konnte somit zwar nicht hinreichend aufgeklärt werden, allerdings könnten die Ergebnisse bedeuten, dass bei Patienten mit Vorhofflimmern die beobachteten erhöhten Plasmakonzentrationen von Acylcarnitinen zum Entstehen von Vorhofflimmern beitragen könnten.

Zusammenfassung

Langkettige Acylcarnitine wie Oleoylcarnitin sind arrhythmogen wirkende Metaboliten, deren Rolle im Zusammenhang mit Vorhofflimmern noch unvollständig erforscht sind. Ziel dieser Dissertation war es, dazu beizutragen, den Einfluss langkettiger Acylcarnitine auf den kardialen Metabolismus besser zu verstehen. Dabei wurden für die Daten aktuelle Studien genutzt, welche sich mit dem Einfluss von Acylcarnitinen auf kardiales Gewebe bzw. kardial vorerkrankten Patienten beschäftigten. Hierzu zählten unter anderem die Daten einer Kohorten-Studie mit 9660 Probanden von Professor Dr. rer. nat. Tanja Zeller in Hamburg. Diese Daten zeigten, dass Patienten mit Vorhofflimmern erhöhte Acylcarnitin-Blutplasma-Werte aufwiesen. Bei den Acylcarnitinen handelt es sich um Fettsäuren mit 18 Kohlenstoff- (C-) Atomen und einer Doppelbindung. Der Hauptvertreter dieser Fettsäuren ist Oleoylcarnitin. Dass Oleoylcarnitin eine besondere Rolle bei der Entwicklung von Arrhythmien zufällt, konnten andere Studien bestätigen. Auf Grund dieser Grundlage wurden initiale Experimente durchgeführt. Für alle Experimente wurde Oleoylcarnitin mit 18 C-Atomen und einer Doppelbindung bzw. Stearoylcarnitin mit 18 C-Atomen ohne Doppelbindung in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Um den Einfluss der Acylcarnitine auf den kardialen Metabolismus bestimmen zu können, wurden aus C57BL/6N Mäusen kardiale Mitochondrien isoliert und deren Respiration (Sauerstoffverbrauch) als Ausdruck der metabolischen Leistung und damit der Vitalität der Mitochondrien mit Hilfe der Clark Elektrode bestimmt. Die Mitochondrien wurden mit verschiedenen Substraten, d.h., mit Pyruvat/Malat (Komplex 1 Substrat), Glutamat/Malat (Komplex 1 Substrat nach Anaplerose) oder Palmitoyl-CoA (β -Oxidations-Substrat) und unterschiedlichen Konzentrationen von Acylcarnitinen behandelt und die Respiration gemessen.

Im Gegensatz zur Pyruvat/Malat-gestützten Respiration, die durch den Einfluss von hohen (bis 25 μ M) Oleoylcarnitin Konzentrationen vermindert bis inhibiert wurde, steigerte zumindest zeitweise Oleoylcarnitin die PalmitoylCoA- sowie die Glutamat/Malat-gestützte Respiration. Wobei kritisch zu betrachten ist, dass die Respirationslevel einer Glutamat/Malat-gestützten Respiration insgesamt auf einem niedrigeren Level sind als mit Pyruvat/Malat als Substrat.

Der inhibierende Acylcarnitin-Effekt auf die Pyruvat/Malat-Atmung konnte nicht mit Etomoxir, einem Inhibitor der Carnitin Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1), beeinflusst werden, aber als CPT1-Inhibitor konnte Etomoxir die auf PalmitoylCoA gestützte Respiration konzentrationsabhängig reduzieren. Die inhibierenden Effekte der Acylcarnitine waren zudem reversibel und verursachten somit keine irreversiblen

Schäden an den Mitochondrien. Es wird geschlussfolgert, dass die hier getesteten Oleoyl- und Stearoylcarnitine eine regulierende Funktion auf die flexible Substratverarbeitung des Herzens haben. Sie können den Abbau der Glycolyse-Endprodukte inhibieren, gleichzeitig die Fettsäure-Respiration unterstützen und somit mit einem Substratswitch den Stoffwechsel der Mitochondrien beeinflussen. Gleichzeitig könnte es bei Situationen mit gestörtem oxidativem Stoffwechsel, z.B. während Myokardischämie zur Überlastung des Metabolismus oder sogar Blockade der Respiration kommen. Diese Respirationsblockade könnte ein Auslöser für Arrhythmien und Vorhofflimmern sein.

Literaturverzeichnis

1. Schotten, U., et al., *Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(1): p. 265-325.
2. Kirchhof, P., et al., *Early Rhythm-Control Therapy in Patients with Atrial Fibrillation*. *N Engl J Med*, 2020. **383**(14): p. 1305-1316.
3. Ruff, C.T., et al., *Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials*. *Lancet*, 2014. **383**(9921): p. 955-62.
4. Krause, J., et al., *Human-Engineered Atrial Tissue for Studying Atrial Fibrillation*. *Methods Mol Biol*, 2022. **2485**: p. 159-173.
5. Köster, R., *Duale Reihe Innere Medizin Auflage 4* ed. C.H. Ralf Köster, Jan Kähler, Ulrich Fischer-Rasokat, Thorsten Dill, Christoph Liebetrau, Roland Brandt, Henrik Schneider, Christoph A. Nienaber, Andreas Schuchert, Karl-Heinz Kuck, Sabine Ernst, Erik Wißner, Thomas Hofmann, Tushar Thomas Chatterjee, Heiko Stern, Won-Keun Kim, Michael Petzsch, Jochen Hinkelbein. 2018, Georg Thieme Verlag KG / Rüdiger Straße 14 / 70469 Stuttgart. 115-122; 137-139.
6. Böhm, M., *Innere Medizin*, ed. M.H. M. Böhm, W. Schmiegeler 2009, Herausgegeben von M. M. Böhm, M. Hallek, W. Schmiegeler
Begründet von M. Cassen, V. Diehl und K. Kochsik
Innere Medizin
6., komplett überarbeitete Auflage 2009
Urban & Fischer Verlag
Elsevier GmbH, München
7. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(1): p. 207-58.
8. McCain, C.S., T.A. Knotts, and S.H. Adams, *Acylcarnitines--old actors auditioning for new roles in metabolic physiology*. *Nat Rev Endocrinol*, 2015. **11**(10): p. 617-25.
9. Gurr, *Sixth Edition Lipids Biochemistry, Biotechnology and Health*. 2016: p. Seite: 86.
10. Lu, Z., et al., *Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: autonomic mechanism for atrial electrical remodeling induced by short-term rapid atrial pacing*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2008. **1**(3): p. 184-92.
11. Kirchhof, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2016. **50**(5): p. e1-e88.
12. Mason, F.E., et al., *Cellular and mitochondrial mechanisms of atrial fibrillation*. *Basic Res Cardiol*, 2020. **115**(6): p. 72.
13. Ausma, J., et al., *Atrial high energy phosphate content and mitochondrial enzyme activity during chronic atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2000. **47**(4): p. 788-96.
14. Barth, A.S., et al., *Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature*. *Circ Res*, 2005. **96**(9): p. 1022-9.
15. Opacic, D., et al., *Atrial metabolism and tissue perfusion as determinants of electrical and structural remodelling in atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2016. **109**(4): p. 527-41.
16. Smith, E., et al., *Altered Acylcarnitine Metabolism Is Associated With an Increased Risk of Atrial Fibrillation*. *J Am Heart Assoc*, 2020. **9**(21): p. e016737.
17. Zeller, P.D.r.n.T., in *Zeller Leitung; Labor/Biobank Stellv.: Gleichstellungsbeauftragte für das wiss. Personal*

Campus Forschung N27 , 3. Etage, Raumnummer 03.040

MARTINISTRASSE 52

20246 HAMBURG

Telefon: +49 (0) 40 7410 - 56575

E-Mail: t.zeller@uke.de

Zusammenarbeit mit:

Klinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie, Universitäres

Herzzentrum Hamburg GmbH, Hamburg; Institut für Experimentelle

Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg.

18. Zeller, T., et al., *BiomarCaRE: rationale and design of the European BiomarCaRE project including 300,000 participants from 13 European countries*. Eur J Epidemiol, 2014. **29**(10): p. 777-90.
19. Guasch-Ferre, M., et al., *Plasma acylcarnitines and risk of cardiovascular disease: effect of Mediterranean diet interventions*. Am J Clin Nutr, 2016. **103**(6): p. 1408-16.
20. Lau, D.H., et al., *Pathophysiology of Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation: Rotors, Foci and Fibrosis*. Heart Lung Circ, 2017. **26**(9): p. 887-893.
21. Harada, M., et al., *Metabolic Considerations in Atrial Fibrillation- Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities*. Circ J, 2017. **81**(12): p. 1749-1757.
22. McCann, M.R., et al., *L-Carnitine and Acylcarnitines: Mitochondrial Biomarkers for Precision Medicine*. Metabolites, 2021. **11**(1).
23. Mela, L. and S. Seitz, *Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue*. Methods Enzymol, 1979. **55**: p. 39-46.
24. Ogawa, H., et al., *Progression From Paroxysmal to Sustained Atrial Fibrillation Is Associated With Increased Adverse Events*. Stroke, 2018. **49**(10): p. 2301-2308.
25. Nickel, A.G., et al., *Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure*. Cell Metab, 2015. **22**(3): p. 472-84.
26. Yang, K.C., et al., *Mechanisms of sudden cardiac death: oxidants and metabolism*. Circ Res, 2015. **116**(12): p. 1937-55.
27. Murashige, D., et al., *Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart*. Science, 2020. **370**(6514): p. 364-368.
28. Lu, X., et al., *Metabolic profiling analysis upon acylcarnitines in tissues of hepatocellular carcinoma revealed the inhibited carnitine shuttle system caused by the downregulated carnitine palmitoyltransferase 2*. Mol Carcinog, 2019. **58**(5): p. 749-759.
29. Scharl, M., *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*
 vol. M. Scharl; M Gessler; A. von Eckardstein
 Biochemie und Molekularbiologie des Menschen
 ELSEVIER GmbH, München
 Der Urban und Fischer Verlag ist ein Imprint der ELSEVIER GmbH
 Auflage 2009
 Seite: 164-165; 188; 212; 210-218
 2009: Der Urban und Fischer Verlag ist ein Imprint der ELSEVIER GmbH
30. Eaton, S., K. Bartlett, and M. Pourfarzam, *Mammalian mitochondrial beta-oxidation*. Biochem J, 1996. **320** (Pt 2): p. 345-57.
31. Hoene, M., et al., *Muscle and liver-specific alterations in lipid and acylcarnitine metabolism after a single bout of exercise in mice*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22218.
32. Anguizola, J., et al., *Chromatographic analysis of the effects of fatty acids and glycation on binding by probes for Sudlow sites I and II to human serum albumin*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016. **1021**: p. 175-181.

33. Longo, N., M. Frigeni, and M. Pasquali, *Carnitine transport and fatty acid oxidation*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1863**(10): p. 2422-35.
34. Pochini, L., et al., *OCTN: A Small Transporter Subfamily with Great Relevance to Human Pathophysiology, Drug Discovery, and Diagnostics*. *SLAS Discov*, 2019. **24**(2): p. 89-110.
35. Rebouche, C.J., *Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1033**: p. 30-41.
36. Scaglia, F. and N. Longo, *Primary and secondary alterations of neonatal carnitine metabolism*. *Semin Perinatol*, 1999. **23**(2): p. 152-61.
37. Kliemann, „*Der primäre Carnitin-Mangel im erweiterten Neugeborenen-Screening*“
2010: Justus-Liebig-Universität Gießen
38. Bieber, L.L., *Carnitine*. *Annu Rev Biochem*, 1988. **57**: p. 261-83.
39. Drosatos, K. and P.C. Schulze, *Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications*. *Curr Heart Fail Rep*, 2013. **10**(2): p. 109-21.
40. Houten, S.M. and R.J. Wanders, *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation*. *J Inherit Metab Dis*, 2010. **33**(5): p. 469-77.
41. Longo, N., C. Amat di San Filippo, and M. Pasquali, *Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle*. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2006. **142C**(2): p. 77-85.
42. Pasquali, M., et al., *Biochemical findings in common inborn errors of metabolism*. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2006. **142C**(2): p. 64-76.
43. Berlanga, A., et al., *Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease*. *Clin Exp Gastroenterol*, 2014. **7**: p. 221-39.
44. Violante, S., et al., *Peroxisomes contribute to the acylcarnitine production when the carnitine shuttle is deficient*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1831**(9): p. 1467-74.
45. Wanders, R.J., *Metabolic functions of peroxisomes in health and disease*. *Biochimie*, 2014. **98**: p. 36-44.
46. Schrader, M., et al., *Peroxisome-mitochondria interplay and disease*. *J Inherit Metab Dis*, 2015. **38**(4): p. 681-702.
47. De Marcos Lousa, C., et al., *Intrinsic acyl-CoA thioesterase activity of a peroxisomal ATP binding cassette transporter is required for transport and metabolism of fatty acids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(4): p. 1279-84.
48. van Roermund, C.W., et al., *A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1841**(4): p. 563-8.
49. van Roermund, C.W., et al., *The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters*. *FASEB J*, 2008. **22**(12): p. 4201-8.
50. van Roermund, C.W., et al., *Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid beta-oxidation*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1811**(3): p. 148-52.
51. Le Borgne, F., et al., *Changes in carnitine octanoyltransferase activity induce alteration in fatty acid metabolism*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **409**(4): p. 699-704.
52. Cooper, D.E., et al., *Physiological Consequences of Compartmentalized Acyl-CoA Metabolism*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(33): p. 20023-31.
53. Anderson, C.M. and A. Stahl, *SLC27 fatty acid transport proteins*. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(2-3): p. 516-28.
54. Doege, H. and A. Stahl, *Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models*. *Physiology (Bethesda)*, 2006. **21**: p. 259-68.
55. Black, P.N. and C.C. DiRusso, *Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(3): p. 286-98.
56. Furuhashi, M. and G.S. Hotamisligil, *Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(6): p. 489-503.

57. Grevengoed, T.J., E.L. Klett, and R.A. Coleman, *Acyl-CoA metabolism and partitioning*. *Annu Rev Nutr*, 2014. **34**: p. 1-30.
58. Watkins, P.A., et al., *Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(12): p. 2736-50.
59. Gurr, *Biochemistry, Biotechnology and Health*
Vol. Gurr Harwood Frayn Murphy Michell; Michael I. Gurr. John L. Harwood. Keith N. Frayn. Denis J. Murphy and Robert H.; Michell; Verlag: Wiley Blackwell
Sixth Edition Lipids; Biochemistry, Biotechnology and Health; This edition first published 2016; Seite: 86. 2016.
60. Noland, R.C., et al., *Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(34): p. 22840-52.
61. Yao, C.H., et al., *Identifying off-target effects of etomoxir reveals that carnitine palmitoyltransferase I is essential for cancer cell proliferation independent of beta-oxidation*. *PLoS Biol*, 2018. **16**(3): p. e2003782.
62. Liepinsh, E., et al., *Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria*. *Biochem J*, 2016. **473**(9): p. 1191-202.
63. Arduini, A., et al., *Carnitine in metabolic disease: potential for pharmacological intervention*. *Pharmacol Ther*, 2008. **120**(2): p. 149-56.
64. Tamai, I., et al., *Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(32): p. 20378-82.
65. Makrecka-Kuka, M., et al., *Plasma acylcarnitine concentrations reflect the acylcarnitine profile in cardiac tissues*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 17528.
66. Tonazzi, A., et al., *Nitric oxide inhibits the mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier through reversible S-nitrosylation of cysteine 136*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2017. **1858**(7): p. 475-482.
67. Horn, *Biochemie des Menschen*
Das Lehrbuch für das Medizinstudium
Vol. Florian Horn; Biochemie des Menschen; Das Lehrbuch für das Medizinstudium; 4., aktualisierte und erweiterte Auflage; Georg Thieme Verlag
Stuttgart , New York; Seite: 204; 218-220; 223-225; 228; 130.
68. Kong, C.H.T., et al., *Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 preserves t-tubular I_{Ca} during heart failure in mice*. *Exp Physiol*, 2019. **104**(5): p. 654-666.
69. Wanders, R.J., *Peroxisomes in human health and disease: metabolic pathways, metabolite transport, interplay with other organelles and signal transduction*. *Subcell Biochem*, 2013. **69**: p. 23-44.
70. Wanders, R.J., et al., *Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1801**(3): p. 272-80.
71. Scaduto, R.C., Jr. and L.W. Grottyhann, *Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives*. *Biophys J*, 1999. **76**(1 Pt 1): p. 469-77.
72. Hutterer. Vol. Dr.rer.nat.Rudi Hutterer „Fit in Biochemie, Das Prüfungstraining für Mediziner, Chemiker und Biologen“1 Auflage 2010 Vieweg+Teubner / GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden 2010; Informationen aus Seite: 244,297,298, 429,439, 573. 2010.
73. Hue, L. and H. Taegtmeyer, *The Randle cycle revisited: a new head for an old hat*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **297**(3): p. E578-91.
74. Deutschland, C.R.G.G.C.K.S.W.S.
75. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
76. Lehninger, A.L., *Phosphorylation coupled to oxidation of dihydrodiphosphopyridine nucleotide*. *J Biol Chem*, 1951. **190**(1): p. 345-59.

77. Kreuzer, F. and C.G. Nessler, Jr., *Method of polarographic in vivo continuous recording of blood oxygen tension*. *Science*, 1958. **128**(3330): p. 1005-6.
78. Clark, L.C., Jr., et al., *Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography*. *J Appl Physiol*, 1953. **6**(3): p. 189-93.
79. Heiko, B. 2006, Aus der Abteilung Herz- und Gefäßchirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik; der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.; Der Einfluß veränderter Arbeitslast auf die Regulation der respiratorischen Kapazität isolierter Mitochondrien; INAUGURAL – DISSERTATION; zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades; der Medizinischen Fakultät; der Albert-Ludwigs-Universität; Freiburg i. Br.
80. Chance, B. and G.R. Williams, *The respiratory chain and oxidative phosphorylation*. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*, 1956. **17**: p. 65-134.
81. el Azzouzi, H., et al., *The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a approximately 214 targets myocardial PPARdelta and impairs mitochondrial fatty acid oxidation*. *Cell Metab*, 2013. **18**(3): p. 341-54.
82. Heckmann, S.L., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Schmidt R., Lang F., Heckmann, M.; 31. Auflage Springer Verlag
Lehrbuch-medizin.de; Seite: 567; 518-522. Springer Verlag

Appendix

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
O ₂ ⁻	Superoxidradikale
OH-	Hydroxylradikal
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium-Ion
Cytc	Cytochrom c
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZR	Extrazellularraum
FAD ⁺	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
H ⁺	Wasserstoff-Ion (Proton)
H ₂ O	Wasser
Hz	Herz (Frequenz)
M	Molar (Konzentration)
mM	Millimol
μM	Mikromol
min.	Minute
Na ⁺	Natrium-Ion
NAD(P) ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat) (oxidierte Form)
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat) (reduzierte Form)
GTP	Guanosintriphosphat
O ₂	Sauerstoff
s	Sekunde
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
WT	Wildtyp
Oleoyl-AC	Oleoycarnitin
Stearoyl-AC	Stearoylcarnitin
PPC-AC	Propionylcarnitn
AC	Acylcarnitin

AP	Atmungspuffer
FS	Fettsäure
EHTs	engineert heart tissue
C18:1	Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung
C18:2	Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen und zwei Doppelbindung
OXPPOS	oxidativen Phosphorylierung
mV	millivolt
FAT/CD36	Fettsäure Translokase
Caveoline	spezifischer Name eines Integral-Membran-Proteins
FABP	spezifischer Name eines Fettsäure bindenden Proteins
LC-MS/MS	Liquid „chromatography-mass spectrometry“
PAF	paroxysmale Vorhofflimmern
SAF	persistierendem Vorhofflimmern
g	Erdbeschleunigung

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: *Resultate aus der Studie BiomarCaRE*

Graphische Darstellung des Einflusses von Oleoylcarnitin (C18:1) auf die Wahrscheinlichkeit von Vorhofflimmern in Abhängigkeit zur Zeit

Erstellt von AG Zeller, für Verwendung freigegeben durch Prof. Zeller

Abb.2: *Strukturformel eines Acylcarnitins (Oleoylcarnitin C-Atome 18:1)*

Erstellt nach Informationen aus [28].

Abb.3: *Strukturformel eines Carnitin Moleküls.*

Erstellt nach Informationen aus: [33] [34].

Abb.4: *Graphische Darstellung des Blut Carnitin-Spiegels in Zusammenhang der verschiedenen Organe: Herz, Leber, Muskel, Intestinum, Respirationstrakt, Epydidymis, neurales Gewebe, Leber. Erstellt nach Informationen aus: [34].*

Abb.5: *Fettsäure-Carnitin-Zyklus in humanen Kardiomyozyten*

Schematische Darstellung des Zusammenspiels von Fettsäuren und Carnitinen mit den Zellorganellen in Kardiomyozyten. Erstellt nach Informationen aus: [26, 28, 29, 34, 40, 41, 43-67]

Abb.6: *Fettsäuretransport durch die Zellmembran.*

Erstellt nach Informationen aus: [33].

Abb.7: *Schematische Darstellung des Fettsäure Metabolismus in den Peroxisomen*

Erstellt nach Informationen aus:[33, 43-51, 70]

Abb.8: *Schematische Darstellung des Acyl-Carnitin-Shuttles*

Erstellt nach Informationen aus:[28, 29, 34, 59-62]

Abb.9: *Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zum Abbau von*

Propionyl-CoA. Erstellt nach Informationen aus: [29].

Abb.10: Randle Cycle, Zustand A, Hemmung der Verstoffwechselung von Fettsäuren
Erstellt nach Informationen aus: [73]

Abb.11: Randle Cycle, Zustand B, Hemmung der Verstoffwechselung von Glucose
Erstellt nach Informationen aus: [73]

Abb.12: Schematische Darstellung der Transportwege der Acylcarnitine.
Erstellt nach Informationen aus: [31, 34, 63] [66, 67]

Abb.13: Aufbau einer Clark-Elektrode
Erstellt nach Informationen aus: [76-79]

Abb.14: Einteilung der mitochondrialen States mit exemplarischer Darstellung einer Atmungsmessung

Abb.15: Schematische Darstellung des Etomoxir Messprotokolls 5.

Abb.16: Schematische Darstellung einer einzelnen Glutamat/Malat-Messung mit Zugabe von 25 μM Oleoylcarnitin im State 3.

Abb.17: Schematische Darstellung einer einzelnen Glutamat/Malat-Messung mit Zugabe von 25 μM Stearoylcarnitin im State 3.

Abb.18: Schematische Darstellung der PalmitoylCoA gestützten Respiration mit Zugabe von 25 μM Oleoylcarnitin.

Abb.19: Schematische Darstellung der PalmitoylCoA gestützten Respiration mit Zugabe von 25 μM Stearoylcarnitin.

Abb.20: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung nach Protokoll Kern 1 mit Zugabe von 15 μM Oleoylcarnitin im State 3

Abb.21: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung nach Protokoll Kern 1

mit Zugabe von 15 μM Stearoylcarnitin im State 3

Abb. 22: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung nach Protokoll Kern 2 mit Zugabe von 10 μM Oleoylcarnitin

Abb.23: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung nach Protokoll Kern 2 mit Zugabe von 10 μM Stearoylcarnitin

Abb.24: Schematische Darstellung einer einzelnen Messung mit 5 mM Pyruvat und 5 mM Malat als Substrat und aufsteigenden ADP Konzentrationen.

Abb.25: Exemplarische Darstellung einer Respirationsmessung, mit kardialen Mitochondrien

Abb.26: Respirationsmessung:

Interaktion von Oleoylcarnitin bzw. Stearoylcarnitin mit kardialen isolierten Mitochondrien gelöst in Atmungspuffer.

Abb.27: Exemplarische Messung der Respiration mit Pyruvat/Malat als Substrat in Abhängigkeit zur Zeit

Abb.28: Inhibition der Pyruvat/Malat-gekoppelten Atmung nach Vorinkubation mit Oleoylcarnitin im State 1. Messprotokoll 2. Verwendung von Acylcarnitinen in den Konzentrationen von 1 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM oder 25 μM im State 1, in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration (30 μM , 100 μM , 300 μM , 1mM).

A: Übersicht über den Verlauf aller ADP-Konzentrationen in Abhängigkeit zur Oleoylcarnitin Konzentration

B: Statistische Auswertung der Abhängigkeit von 30 μM ADP in Abhängigkeit zur ansteigenden Oleoylcarnitin Konzentration von 1 μM -25 μM

C: Statistische Auswertung der Abhängigkeit von 1mM ADP in Abhängigkeit zur ansteigenden Oleoylcarnitin Konzentration von 1 μM -25 μM

Abb.29: Inhibition der **Pyruvat/Malat**-gekoppelten Atmung nach Vorinkubation mit Stearoylcarnitin oder im State 1. Messprotokoll 2. Verwendung von Acylcarnitinen in den Konzentrationen von $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $15\mu\text{M}$ oder $25\mu\text{M}$ im State 1, in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration ($30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $300\mu\text{M}$, 1mM).

A: Übersicht über den Verlauf aller ADP-Konzentrationen in Abhängigkeit zur Stearoylcarnitin Konzentration

B: Statistische Auswertung der Abhängigkeit von $30\mu\text{M}$ ADP in Abhängigkeit zur ansteigenden Acylcarnitin Konzentration von $1\mu\text{M}$ - $25\mu\text{M}$

C: Statistische Auswertung der Abhängigkeit von 1mM ADP in Abhängigkeit zur ansteigenden Acylcarnitin Konzentration von $1\mu\text{M}$ - $25\mu\text{M}$

Abb.30: Logarithmische Auftragung des Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit zur zugefügten Acylcarnitin Konzentration von $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $15\mu\text{M}$ oder $25\mu\text{M}$ im State 1 und **Pyruvat/Malat** als Substrat.

Abb.31: Respirationsmessungen mit **Pyruvat/Malat**, ADP als Substrat (schwarzer Balken) und Respirationsmessungen mit Pyruvat/Malat und ADP und Propionylcarnitin als Acylcarnitin (grüner Balken).

Abb.32: Respirationsmessungen mit **Pyruvat/Malat** als Substrat, $0.7\mu\text{M}$ ADP und Zugabe von Acylcarnitinen im State 3

A: Prozentualer Sauerstoff-Verbrauch, unter Einfluss unterschiedlicher Acylcarnitin Konzentration in State 3.

B: Darstellung der von State 2 bis State 4 der Respirationsmessung, mit statistischer Auswertung, für Oleoylcarnitin

C: Darstellung der von State 2 bis State 4 der Respirationsmessung, mit statistischer Auswertung, für Stearoylcarnitin

Abb.33: Respirationsmessungen nach Auswaschung von Oleoyl- bzw. Stearoylcarnitin, nach 1 Stunde Inkubation auf Eis.

Abb.34: Schematische Darstellung der Wirkung von Etomoxir auf das Acylcarnitin Shuttle

Erstellt nach Informationen aus: [28, 59, 61].

Abb.35: Strukturformel von Etomoxir.

Erstellt nach Informationen aus: [28, 59, 61].

Abb.36: Respirationsmessungen mit **Pyruvat/Malat** als Substrat, mit 30 μM Etomoxir und 25 μM Acylcarnitinen in State 3

Testgruppe: Etomoxir 30 μM + Oleoylcarnitin 25 μM (in Atmungspuffer und Pyruvat/Malat): $n=3$ (roter Balken); Etomoxir 30 μM + Stearoylcarnitin 25 μM (in Atmungspuffer und Pyruvat/Malat): $n=5$ (blauer Balken); Kontrollgruppe: Etomoxir 30 μM (in Atmungspuffer und Pyruvat/Malat): $n=4$ (schwarzer Balken)

Abb.37: Respirationsmessungen mit **Glutamat/Malat** als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3.

Abb.38: Respirationsmessungen mit 6.25 μM **PalmitoylCoA** als Substrat in Anwesenheit von Acylcarnitinen in State 3.

Protokoll nach el Azzouzi 2013 [81]

Abb.39: Respirationsmessungen mit 5mM **Pyruvat/Malat** als Substrat in Anwesenheit von 25 μM Carnitin in State 3

Abb.40: Schematische Darstellung des Standard Messprotokolls

Abb.41: Respirationsmessungen nach Protokoll Kern 2

PalmitoylCoA und Acylcarnitine als Substrate der mitochondrialen Respiration.

Abb.42: Schematischer Aufbau einer Messung nach Protokoll Kern 1, graphische Darstellung von 2 Messungen im Vergleich

Abb.43: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 10 μM Oleoylcarnitin auf die Pyruvat/Malat-

Respiration im Vergleich zu der PalmitoylCoA-Respiration unter Zugabe von 10 μM Oleoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Abb.44: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 15 μM Oleoylcarnitin auf die Pyruvat/Malat-Respiration im Vergleich zu der PalmitoylCoA-Respiration unter Zugabe von 15 μM Oleoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Abb.45: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 25 μM Oleoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat-**Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA-**Respiration unter Zugabe von 25 μM Oleoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Abb.46: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 10 μM Stearoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat-**Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA-**Respiration unter Zugabe von 10 μM Stearoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Abb.47: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 15 μM Stearoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat-**Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA-**Respiration unter Zugabe von 15 μM Stearoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Abb.48: Respirationsmessungen

Darstellung der Auswirkungen von 25 μM Stearoylcarnitin auf die **Pyruvat/Malat-**Respiration im Vergleich zu der **PalmitoylCoA-**Respiration unter Zugabe von 25 μM Stearoylcarnitin nach Protokoll Kern 1.

Abb.49: Schematische Darstellung der Abbauege von Oleoyl (C18:1) links im Vergleich zu Stearoyl (C18) rechts. Erstellt nach Informationen aus: [29]

Abb.50: Schematische Darstellung der Stoffwechselwege zum Abbau von Pyruvat, Glutamat und Fettsäuren. Erstellt nach Informationen aus: [7, 26]

Abb.51: Schematische Darstellung der vermutlich durch Oleoylcarnitine regulierten Aufnahme bzw. Stoffwechselwege des Pyruvats im Mitochondrium. Erstellt nach Informationen aus: [7, 26]

Abb.52: Hemmung der Pyruvat/Malat Respiration durch Acylcarnitine, eingeordnet in das Modell des Randle Cycle. Erstellt nach Informationen aus: [73].

Abb.53: Schematische Darstellung des Acylcarnitin-Shuttles
Erstellt nach Informationen aus:[28, 29, 34, 57, 60-62]

Abb.54: Schematische Darstellung der OCTN2 Transportfunktionen
Erstellt nach Informationen aus: [29].

Abb.55. Schematische Darstellung der vermuteten Stoffwechsel Störung.
Erstellt und freigegeben von Dr. Edoardo Bertero

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prozentuale Auflistung der verwendeten Nährstoffe, in Abhängigkeit zur ATP Bildung, in kardialen Gewebe mit regulärer Auswurfsrate. LpFA = Lipoprotein-Derivate, FFA = Albumin Derivate. Erstellt nach Informationen aus: [27].

Tab.2: Schematische Darstellung Messprotokoll 1

Tab.3: Schematische Darstellung Messprotokoll 2

Tab.4: Schematische Darstellung Messprotokoll 3

Tab.5: Schematische Darstellung Messprotokoll 4

Tab.6: Schematische Darstellung Messprotokoll 5

Tab.7: Schematische Darstellung Messprotokoll 6

Tab.8: Schematische Darstellung Messprotokoll 7

Tab.9: Schematische Darstellung Messprotokoll 8

Tab.10: Schematische Darstellung Messprotokoll Kern 1

Tab.11: Schematische Darstellung

Messprotokoll Kern 1 im Vergleich mit Messprotokoll 3

Tab.12: Schematische Darstellung Messprotokoll Kern 2

Tab.13: Instrumente und Geräte

Tab.14: Verwendete Substanzen: Isolationslösung

Tab.15: Verwendete Substanzen: Mitochondriensuspensionslösung

Tab.16: Verwendete Substanzen: BSA / Proteinase-Lösung

Tab.17: Verwendete Substanzen: Atmungspuffer

Tab.18: Verwendete Substanzen

Tab.19: Verwendete Substanzen: Acylcarnitine

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank Herrn Professor Dr. med Christoph Maack für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Hilfe und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit aussprechen. Professor Maack weckte in mir die Begeisterung für wissenschaftliches Denken, was diesen Lebensabschnitt für mich unvergesslich macht. Ich danke auch für die vielen Meetings und Präsentationen, die ich bei Herrn Professor Dr. Maack halten durfte, besonders für die Möglichkeit, auf der 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim 2019 einen Vortrag über mein Thema zu halten. Ebenfalls gilt mein Dank besonders Dr. rer. nat. Alexander Nickel, Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas, Dr. rer. nat. Vasco Sequeira, Dr. med. Edoardo Bertero, Dr. rer. nat. Jan Dudek und allen Team-Mitgliedern der AG-Maack. Außerordentlich danke ich auch den Labormitarbeitern Alice Schaaf, Michelle Gulentz und Rebekka Springel, die mich mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung unterstützten. Des Weiteren danke ich besonders meinen Freundinnen Kristina und Sophia für ihre Unterstützung bei spontanen PC-Käufen, für das Lesen und die Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit und vor allem für ihre Freundschaft. Abschließend möchte ich mich noch bei all denjenigen bedanken, die mich persönlich in allen Lebenslagen unterstützt haben.