Bedeutung des Carnitin-Transporters OCTN2 für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und eines akuten Myokardinfarktes

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

Karina Bonitz

geboren am 04.03.1984

in Berlin

Greifswald, 11. Mai 2015

Dekan: Prof. Dr. K. Fesser

1. Gutachter: Prof. Dr. H. K. Kroemer

2. Gutachter: Prof Dr. med. M. Fromm

Tag der Promotion: 27.11.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

Maße und Einheiten V

Abbildungsverzeichnis VI

1 Einleitung ..... - 1 -

1.1 Die physiologische Bedeutung des Carnitins ..... - 1 -

1.2 Carnitin-Mangelerscheinungen ..... - 5 -

1.3 Juvenile viscerale Steatose-Mäuse als Modellsystem der PCD ..... - 6 -

1.4 Der Carnitin/novel organic cation transporter (OCTN) 2 (*SLC22A5*) ..... - 7 -

1.5 Carnitin und Herzerkrankungen ..... - 9 -

1.6 Zielsetzung ..... - 12 -

2 Material ..... - 13 -

2.1 Geräte und Zubehör ..... - 13 -

2.1.1 Geräte ..... - 13 -

2.1.2 Zubehör ..... - 14 -

2.2 Chemikalien und Enzyme ..... - 15 -

2.3 Puffer und Lösungen ..... - 16 -

2.4 Genexpressions-Assays (LifeTechnologies) ..... - 16 -

2.5 Kits ..... - 17 -

2.6 Software ..... - 17 -

3 Methoden ..... - 18 -

3.1 Tierexperimentelle Arbeiten ..... - 18 -

3.1.1 Stämme ..... - 18 -

3.1.2 Tierhaltung ..... - 18 -

3.1.3 Studiendesign ..... - 19 -

3.1.3.1 Untersuchungen zur Kardiomyopathie ..... - 19 -

3.1.3.2 Myokardinfarkt ..... - 20 -

3.1.4 Kardiomyopathie-Untersuchungen ..... - 21 -

3.1.4.1 Kleintier-MRT ..... - 21 -

3.1.4.2 Konduktanz-Katheter-Methodik ..... - 25 -

3.1.5 Akuter Myokardinfarkt nach LCA-Ligatur ..... - 33 -

3.2 Molekularbiologische Methoden ..... - 36 -

3.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere ..... - 36 -

3.2.1.1 DNA-Isolation ..... - 36 -

3.2.1.2 Polymerasekettenreaktion ..... - 36 -
3.2.1.3 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese ..... - 38 -
3.2.2 RNA-Isolation ..... - 38 -
3.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren ..... - 39 -
3.2.4 RNA-Analyse ..... - 39 -
3.2.5 cDNA-Synthese ..... - 40 -
3.2.6 Real-Time PCR mittels TaqMan™-Technologie ..... - 41 -
3.2.7 Deproteinisierung und Carnitin-Assay ..... - 44 -
3.2.8 Enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) ..... - 45 -
3.3 Statistik und Berechnungen ..... - 46 -
4 Ergebnisse ..... - 47 -
4.1 Untersuchungen zur Herzfunktion ..... - 48 -
4.1.1 Allgemeine Parameter ..... - 48 -
4.1.2 Carnitin-Spiegel ..... - 51 -
4.1.2.1 Einfluss von Carnitin-haltigem Futter auf die Carnitin-Spiegel in Blut und Herzgewebe ..... - 51 -
4.1.2.2 Einfluss von Mildronat auf die Carnitin-Spiegel in Blut und Herzgewebe ..... - 52 -
4.1.3 MRT- und Konduktanz-Daten ..... - 53 -
4.1.3.1 Einfluss von Carnitin-haltigem Futter auf die Herzfunktion ..... - 53 -
4.1.3.2 Einfluss von Mildronat-haltigem Futter auf die Herzfunktion ..... - 60 -
4.1.4 NT-proBNP-Assay ..... - 63 -
4.1.5 Genexpressionsdaten ..... - 64 -
4.2 Bedeutung des Octn2 für die Entwicklung eines Myokardinfarkts ..... - 67 -
5 Diskussion ..... - 72 -
5.1 Einfluss einer verminderten OCTN2-Funktion auf die Herzfunktion ..... - 72 -
5.2 Bedeutung der OCTN2-Funktion für den akuten Myokardinfarkt ..... - 81 -
6 Zusammenfassung ..... - 86 -
7 Literaturverzeichnis ..... - 88 -
8 Anhang ..... - 101 -

Abkürzungsverzeichnis

2D/3D	zweidimensional/dreidimensional
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua dest, destilliertes Wasser
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Klappen	Atrioventrikularklappen
BNP	*B-type natriuretic peptide*, natriuretisches Peptid Typ B
bzw.	beziehungsweise
CACT	Carnitin-Acyl-Carnitin-Translokase
cDNA	(*complementary*) komplementäre DNA
CO	*cardiac output*, Herzzeitvolumen
Col1a2	*collagen, type I, alpha 2 (murin)*
CPT I/II	Carnitin-Palmitoyl-Transferase I/II
Ct	*Cycle of Theshold,* Schwellenwert
Ctgf	*connective tissue growth factor (murin)*
cTnI	kardiales (*cardiac*) Troponin I
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DNA	*desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
dP/dt_{max}	Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt_{min}	Druckabfallsgeschwindigkeit
ED	Enddiastole
EDD	*end-diastolic diameter,* enddiastolischer Durchmesser
EDL	*end-diastolic length*, enddiastolische Länge
EDP	*end-diastolic pressure*, enddiastolischer Druck
EDV	*end-diastolic volume*, enddiastolisches Volumen
EDV/KG	Körpergewicht-normiertes enddiastolisches Volumen
EDPVR	*end-diastolic pressure volume relationship*, enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung
EF	*ejection fraction*, Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assays*
ES	Endsystole
ESD	*end-systolic diameter,* endsystolischer Diameter
ESL	*end-systolic length,* endsystolische Länge
ESP	*end-systolic pressure*, endsystolischer Druck
ESPVR	*end-systolic pressure volume relationship*, endsystolische Druck-Volumen-Beziehung
ESV	*end-systolic volume*, endsystolisches Volumen
ESV/KG	Körpergewicht-normiertes endsystolisches Volumen
Ex/Em	Extinktion/Emission
Form.	Formel
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GF	Gesamtfläche
GTP	Guanosintriphosphat
HF	Hochfrequenz
h-FABP	*heart fatty acid binding protein*, herzspezifisches Fettsäure-bindendes Protein
hOCTN1	humanes OCTN1
hOCTN2	humanes OCTN2
HR	*heart rate*, Herzfrequenz
IA	Infarktareal

Ile	Isoleucin
jvs	*juvenile visceral steatosis* (Octn2-defiziente Mäuse)
KG	Körpergewicht
LAN	*linker-arm-modified nucleotide*, Linker-Arm-modifiziertes Nukleotid
LCA	*left coronary artery*, linke Koronararterie
LCFA	*long chain fatty acid,* langkettige Fettsäuren
Leu	Leucin
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVM	*left ventricular mass*, linksventrikuläre Masse
LVRI	*left ventricular remodeling index*
MRT	Magnetresonanztomographie
Myh6	*myosin, heavy polypeptide 6 (murin)*
NaCl	Natriumchlorid
Nos2	*nitric oxide synthase* 2 (murin)
Nppa	*natriuretic peptide type A (murin)*
NT-proBNP	N-terminales Fragment des BNP
OAT	*organic anion transporter*
OCT	*organic cation transporter*
OCTN2	Carnitin/novel organic cation transporter (OCTN) 2 (allgemeine Bedeutung)
Octn2	Carnitin/novel organic cation transporter (OCTN) 2 (murin)
o. g.	oben genannt
PBS	*phosphate buffered saline*, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion
PCD	primäre Carnitin-Defizienz
PEEP	*positive end-expiratory pressure*, positiver endexpiratorischer Druck
pH	*potentia Hydrogenii*
Phe	Phenylalanin
PIP	*peak inspiratory pressure*, positiver inspiratorischer Druck
P_{max}	maximaler linksventrikulärer Druck
P_{min}	minimaler linksventrikulärer Druck
PRSW	*preload recruitable stroke work,* aus der Vorlast rekrutierbare Schlagarbeit
RA	Risikoareal
R_n	normalisiertes Reportersignal
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RIN	*RNA integrity number*, RNA-Integritätsnummer
RNA	*ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
SLC22A5	solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5 (human)
Slc22a5	solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5 (murin)
SV	*stroke volume*, Schlagvolumen
SV/KG	Körpergewicht-normiertes Schlagvolumen
SW	*stroke work*, Schlagarbeit
Tab.	Tabelle
TMD	Transmembrandomäne
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem
Val	Valin
vgl.	vergleiche
vs.	versus
w/w	Gewichtsanteil
z. B.	zum Beispiel

Maße und Einheiten

°C	Grad Celsius
%	Prozent
kDa	Kilodalton
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
M	molar
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mT	Millitesla
nm	Nanometer
rpm	*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
Vol.-%	Volumenprozent
Wo	Woche
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung g

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Strukturformel des L-Carnitins ..... - 1 -
Abb. 2 Transportsystem für den Transfer langkettiger Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran (carnitine shuttle). PM: Plasmamembran, ÄM: äußere Mitochondrienmembran, IM: innere Mitochondrienmembran, OCTN2: Carnitin-Transportprotein, ACS: Acyl-CoA-Synthetase, CPT I: Carnitin-Palmitoyl-Transferase I, CPT II: Carnitin-Palmitoyl-Transferase II, CACT: Carnitin-Acyl-Carnitin-Translokase, CAT: Carnitin-Acyl-Transferase..... - 3 -
Abb. 3 Stellung des Carnitins im Intermediärstoffwechsel (nach Löster 2007[35])..... - 4 -
Abb. 4 Berechnete Sekundärstruktur/Transmembrantopologie von OCTN2 mit 8 nicht-synonymen Varianten der kodierenden Region. Polymorphe Varianten (Allelfrequenz > 1 %) sind als Quadrate dargestellt und seltenere Varianten als Kreise. Varianten mit signifikanten funktionellen Unterschieden zur OCTN2-Referenzsequenz sind gelb gekennzeichnet, alle anderen Varianten blau. Mutmaßliche N-Glykosylierungsstellen sind schwarz hervorgehoben und das Nukleotidbindungsmotiv ist als orange-farbene Linie markiert. Die drei funktionell bedeutsamen, nicht-synonymen Varianten sind mit einem Pfeil hervorgehoben (nach Urban et al. 2006[72]). ..... - 8 -
Abb. 5 Lokalisation des humanen OCTN2 (grün) im Gefäßendothel (Pfeil) des Herzens. Immunfluoreszenznachweis mit Kernfärbung (blau) (modifiziert nach Grube et al. 2011[77])..... - 9 -
Abb. 6 Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der tierexperimentellen Versuche..... - 19 -
Abb. 7 Übersicht über die Karenz-Zeiten der Carnitin-Applikation (A) und die Behandlungszeiträume mit Mildronat (B) von heterozygot-defizienten jvs-Mäusen ($jvs^{+/-}$) für die Bestimmung hämodynamischer Parameter..... - 20 -
Abb. 8 Übersicht über die Dauer von Carnitin-Karenz- und -Applikation der Versuchstiere für die tierexperimentellen Untersuchungen zum akuten Myokardinfarkt..... - 21 -
Abb. 9 Darstellung der Schnittebenen im MRT, schematische Ansicht und MRT-Abbilder des 2-Kammer-Blicks (A, D), 4-Kammer-Blicks (B, E) und der kurzen Achse (C, F); ([A-C] modifiziert nach yale.edu, [D-F] erstellt mit Segment)..... - 23 -
Abb. 10 Planimetrische Auswertung der Aufnahmen des 4-Kammer-Blicks (A) und der kurzen Achsen (B) zur Ermittlung der kardialen Volumina und der Ventrikelmasse. Die Analyse erfolgte durch Bestimmung der äußeren linksventrikulären Wand (grüne Linie) und des Ventrikellumens (rote Linie) im 4-Kammer-Blick und in jeder Schichtebene der kurzen Achsen. (erstellt mit Segment)..... - 24 -
Abb. 11 3D-Modell des vermessenen Herzens (A) und transversaler Schnitt in der Endsystole (ES; B) und Enddiastole (ED; C). Nach Ermittlung der 2D-Daten in den einzelnen Schichtebenen können diese zu einem 3D-Abbild des linken Ventrikels zusammengesetzt werden. (erstellt mit Segment) ..... - 25 -
Abb. 12 Mathematischer Zusammenhang zwischen Volumen und Konduktanz (rechts) eines elektrischen Leiters. V, Volumen; l, Abstand zwischen den Messelektroden; A, Oberfläche; R, elektrischer Widerstand; ρ, spezifischer Widerstand; G, Konduktanz ..... - 25 -
Abb. 13 Aufbau des Konduktanz-Katheters und Prinzip der Konduktanz-Katheter-Messung (modifiziert nach www.scisense.com [A], www.texasheartinstitute.org [B]) ..... - 27 -
Abb. 14 Einzelne Phasen des Herzzyklus in einem Druck-Volumen-Diagramm und die daraus resultierende Druck-Volumen-Kurve (modifiziert nach www.scisense.com)..... - 28 -
Abb. 15 Operationsprocedere der Konduktanz-Katheter-Messung mit Intubation (A-C), Eröffnung des Bauchraumes (D-F) und Katheterisierung des linken Ventrikels (G-I) ..... - 29 -
Abb. 16 Schematischer Ablauf der Induktion eines akuten Myokardinfarkts durch Ligatur der linken Koronararterie (LCA); graue Fläche: ischämischer Bereich, blaue Fläche: nicht-ischämischer Bereich (modifiziert nach http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/ 100160_1.htm) ..... - 33 -
Abb. 17 schematischer Aufbau der Apparatur zur Ventilation und Temperierung ..... - 34 -
Abb. 18 Operative Durchführung eines akuten Myokardinfarkts via LCA-Ligatur und anschließender Färbung des Herzens. A-D Intubation, E-H Eröffnung des Bauchraums, Ligatur der LCA und anschließender

Ischämie- und Reperfusionsphase, I-L Blutentnahme aus der Bauchaorta sowie Perfusion und Färbung des Herzens ..... - 35 -
Abb. 19 Bestimmung von Gesamtfläche, Risikoareal und Infarktgröße durch planimetrische Auswertung der Herzschnitte ..... - 36 -
Abb. 20 A. Sau96I-Konsensussequenz und Zielsequenz von wt- und jvs-Mäusen; B. Genotyp-spezifische Bandenmuster nach PCR und Restriktion mit Sau96I ..... - 38 -
Abb. 21 Schematische Übersicht der Real-Time PCR mittels TaqMan™-Prinzip; Q: Quencher-Farbstoff, R: Reporterflurochrom ..... - 42 -
Abb. 22 Graphische Darstellung der Real-Time PCR-Daten als Plot des Reportersignals (R_n) gegen die PCR-Zyklen (NTC: non template control) (aus McKew 2010)[116] ..... - 42 -
Abb. 23 Funktionsprinzip des L-Carnitin-Assay-Kits (BioVision, Milpitas, USA) ..... - 45 -
Abb. 24 Genotyp-spezifische Bandenmuster der verwendeten Mäuse nach Amplifikation und Restriktionsspaltung ..... - 47 -
Abb. 25 Körpergewicht (KG) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen ohne (A) und mit (B) Berücksichtigung des Geschlechts der Tiere. A: One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelter Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied. B: Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Vergleich von Männchen und Weibchen: $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ ..... - 49 -
Abb. 26 Körpergewicht (KG) von Wildtypen und jvs$^{+/-}$-Tieren mit und ohne Mildronat-Gabe (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{+}p < 0,05$, $^{+++}p < 0,001$ ..... - 49 -
Abb. 27 Korrelationsanalyse (Pearson) der durch Einwiegen und mittels MRT bestimmten linksventrikulären Massen (LVMs) ..... - 50 -
Abb. 28 Linksventrikuläre Masse bezogen auf das Körpergewicht (LVM/KG) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen nach Carnitin- (A) bzw. Mildronat-Gabe (B, ausschließlich männliche Tiere dargestellt). A: One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelter Gruppen: $^{*}p < 0,05$, $^{***}p < 0,001$ (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#\#\#}p < 0,001$ (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied. B: Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{++}p < 0,01$ ..... - 51 -
Abb. 29 Carnitin-Gehalt von Serum (A) und Herz (B) in wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen. One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: $^{***}p < 0,001$ (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#\#\#}p < 0,001$ (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0,05$ (zur Carnitin-behandelten wt-Gruppe) ..... - 52 -
Abb. 30 Carnitin-Gehalt von Serum (A) und Herz (B) in wt- und jvs$^{+/-}$-Mäusen nach Gabe von Mildronat (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Einfluss des Genotyps (wt (16 Wo) vs. jvs$^{+/-}$ (16 Wo)): $^{***}p < 0,001$; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{++}p < 0,01$, $^{+++}p < 0,001$ ..... - 53 -
Abb. 31 Schlagvolumen/Körpergewicht (SV/KG, A), Schlagvolumen/linksventrikuläre Masse (SV/LVM, B) und Ejektionsfraktion (EF, C) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren. A-C: One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#\#\#}p < 0,001$ (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied. D: Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Vergleich von Männchen und Weibchen: kein signifikanter Unterschied ..... - 54 -

Abb. 32 Korrelation (Pearson) der (A) mittels MRT und Konduktanz-Katheter erhaltenen Ejektionsfraktion (EF) und (B) der linksventrikulären Masse pro Körpergewicht (LVM/KG) mit der EF. ..... - 55 -
*Abb. 33 Linksventrikulärer Remodeling-Index (LVRI) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen. One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: ***p < 0,001 (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#\#}$p < 0,01 , $^{\#\#\#}$p < 0,001 (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelter Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied ..... - 56 -*
*Abb. 34 Endsystolische und enddiastolische Längen (ESL, A; EDL, B) des linken Ventrikels. One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: ***p < 0,001 (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#\#\#}$p < 0,001 (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied ..... - 56 -*
Abb. 35 Endsystolischer (A) und enddiastolischer (B) Druck von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren. One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied ..... - 57 -
*Abb. 36 Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt$_{max}$, A), endsystolische Druck-Volumen-Relation (ESPVR, B) und aus der Vorlast rekrutierbare Schlagarbeit (PRSW, C) als Parameter der systolischen Herzfunktion. One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: *p < 0,05, ***p < 0,001 (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#}$p < 0,05, $^{\#\#}$p < 0,01 (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied ..... - 58 -*
*Abb. 37 Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt$_{min}$, A), enddiastolische Druck-Volumen-Relation (EDPVR, B) und Tau Glantz (C) als Parameter der diastolischen Herzfunktion. One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: **p < 0,01, ***p < 0,001 (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss de Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#}$p < 0,05, $^{\#\#}$p < 0,01 (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied ..... - 59 -*
Abb. 38 Kardiale Funktionsparameter von Wildtypen und jvs$^{+/-}$-Mäusen nach Mildronat-Gabe. Enddiastolisches Volumen/Körpergewicht (EDV/KG, A), endsystolisches Volumen/Körpergewicht (ESV/KG, B), Schlagvolumen/Körpergewicht (SV/KG, C), Ejektionsfraktion (EF, D) (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{+}$p < 0,05, $^{++}$p < 0,01, $^{+++}$p < 0,001 ..... - 60 -
Abb. 39 Linksventrikulärer Remodeling-Index (LVRI) von Wildtypen und jvs$^{+/-}$-Mäusen nach Mildronat-Gabe (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{++}$p < 0,01, $^{+++}$p < 0,001 ..... - 61 -
Abb. 40 Kardiale Funktionsparameter von Wildtypen und jvs$^{+/-}$-Mäusen mit und ohne Mildronat-Gabe (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Länge des linken Ventrikels am Ende der Systole (ESL, A) und der Diastole (EDL, B). Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{+++}$p < 0,001 ..... - 62 -
*Abb. 41 Endsystolischer (A) und enddiastolischer (B) Druck von wt- und jvs$^{+/-}$-Tieren mit und ohne Mildronat-Behandlung (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): ***p < 0,001; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): kein signifikanter Unterschied- 62 -*
Abb. 42 Relativer NT-proBNP-Gehalt (normiert auf unbehandelte wt-Tiere) von wt, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen nach Carnitin- (A) und Mildronat-Gabe (B, ausschließlich männliche Tiere dargestellt). A: One-Way-

*ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{##}p < 0,01$ (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied. B: Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): ***p < 0,001; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): kein signifikanter Unterschied- 63 -*

Abb. 43 Genexpressionsdaten von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren mit und ohne Carnitin- bzw. Mildronat-Gabe (männl. Tiere): relative Expression des Carnitin-Transportproteins Octn2 (Slc22a5) (A), des natriuretischen Peptids Typ A (Nppa) (B), des connective tissue growth factor (Ctgf) (C) und des Kollagens Typ I (Col1a2) (D). One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Substanz-Applikation (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0,05$, Vergleich aller Mildronat-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied ..... - 65 -

*Abb. 44 Genexpressionsdaten von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren mit und ohne Carnitin- bzw. Mildronat-Behandlung: Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (Nos2, A) und myosin heavy chain 6 (Myh6, B). One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: *p < 0,05; Einfluss der Substanz-Applikation (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{#}p < 0,05$; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0,05$, Vergleich aller Mildronat-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied ..... - 66 -*

Abb. 45 Carnitin-Gehalt im Serum nach Fütterung mit und ohne Carnitin-supplementiertem Futter. One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Gabe (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{###}p < 0,001$; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied..... - 68 -

Abb. 46 Exemplarische Darstellung der einzelnen Gewebeschnitte der untersuchten Versuchsgruppen: wt-Tiere (+Carnitin, A; -Carnitin, B), jvs$^{+/-}$-Tiere (+Carnitin, C; -Carnitin, D) und jvs-Tiere (+Carnitin, E; -Carnitin, F) nach Evans Blue- und TTC-Färbung. Blauer Bereich: nicht-ischämisches Areal; roter Bereich: vitales Gewebe; weißer Bereich: nekrotisches Gewebe. Blaue Linie: Gesamtfläche; rote Linie: Risikoareal; grüne Linie: Infarktareal..... - 69 -

Abb. 47 Risikoareal von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren (A) und Korrelation (Pearson) des Risikoareals (RA) mit dem Infarktareal vom Risikoareal (RA) (B). A: One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Gabe (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0,05$..... - 70 -

*Abb. 48 Infarktareale (pro RA) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren ohne (A) und mit (B) Berücksichtigung des Geschlechts. A: One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: **p < 0,01 (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Gabe (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{#}p < 0,05$; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+++}p < 0,001$ (zur Carnitin-behandelten wt-Gruppe). B: Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Vergleich von Männchen und Weibchen: kein signifikanter Unterschied ..... - 70 -*

Abb. 49 Troponin-Gehalt (A) und h-FABP-Gehalt (B) im Serum von wt- , jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren. One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Gabe (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0,05$, $^{++}p < 0,01$ ..... - 71 -

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht der verwendeten Versuchstiere und deren Behandlung zur Bestimmung der hämodynamischen Parameter ..... - 19 -
Tab. 2 Übersicht der verwendeten Versuchstiere und deren Behandlung im Rahmen der Myokardinfarktuntersuchungen ..... - 20 -
Tab. 3 Mittels Konduktanz-Katheter bestimmte vorlastabhängige linksventrikuläre Parameter. ..... - 30 -
Tab. 4 Mittels Konduktanz-Katheter bestimmte vorlastunabhängige linksventrikuläre Parameter ..... - 32 -
Tab. 5 Zusammensetzung der Genotypisierungs-PCR ..... - 37 -
Tab. 6 Verwendetes PCR-Temperaturprofil mit der Taq-DNA-Polymerase ..... - 37 -
Tab. 7 Ansatz des Restriktionsverdaus mit Sau96I ..... - 38 -
Tab. 8 Ansatz zur Synthese von cDNA ..... - 40 -
Tab. 9 Temperaturprofil zur Synthese von cDNA ..... - 41 -
Tab. 10 Zusammensetzung eines Ansatzes einer Real-Time-PCR. ..... - 43 -
Tab. 11 Temperaturprofil der Real-Time-PCR ..... - 44 -
Tab. 12 Übersicht über die im Tierversuch verwendeten Gruppen ..... - 48 -
*Tab. 13 Zusammenfassung der Parameter zur Herzfunktion (vgl. Abb. 25 - Abb. 44; One-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Multiple Comparison Posttest: Vergleich von Carnitin-Applikation vs. Karenz der Carnitin-Applikation (innerhalb der einzelnen Genotypen): *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; Two-Way-ANOVA mit Bonferroni´s Posttest: Vergleich von Milronat-Applikation vs. ohne Mildronat-Applikation (ohne Carnitin): #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001. Die Statistik wurde aus den entsprechenden Abbildungen übernommen. ..... - 67 -*
Tab. 14 Übersicht über die im Tierversuch verwendeten Gruppen ..... - 68 -
Tab. 15 hämodynamische Parameter der MRT-Messung (Mittelwert ± Standardabweichung) ..... - 101 -
Tab. 16 hämodynamische Parameter der Konduktanz-Katheter-Messung (Mittelwert ± Standardabweichung) (Teil I). ..... - 102 -
Tab. 17 hämodynamische Parameter der Konduktanz-Katheter-Messung (Mittelwert ± Standardabweichung) (Teil II). ..... - 103 -
Tab. 18 Myokardinfarktdaten der verwendeten Tiergruppen ..... - 104 -
Tab. 19 Geschlechtsspezifische Myokardinfarktdaten der verwendeten Tiergruppen ..... - 104 -

1 EINLEITUNG

In Europa sind kardiovaskuläre Erkrankungen neben Krebs die Hauptursache von Morbidität und Mortalität (statistisches Bundesamt). Während die Erkrankungshäufigkeit der koronaren Herzkrankheit (KHK) sinkt, nehmen die Erkrankungszahlen bei der Herzinsuffizienz zu[1]. Trotz eines ausreichenden Blutangebots kann das Herz die benötigte Blutmenge hierbei nicht in ausreichendem Maße fördern und folglich den Bedarf des Organismus an Sauerstoff und Nährstoffen nicht decken.[2] Die Gründe einer Herzinsuffizienz sind vielfältig: als Auslöser werden Kontraktionsschwäche, Druck- oder Volumenüberlastung sowie eine begrenzte linksventrikuläre Funktion und Arrhythmien angesehen.[2] Ein Teil der Erkrankungen lässt sich auf eine steigende Arbeitslast und einen kardialen Energiemangel zurückführen. Das Herz ist ein einzigartiges Organ, das täglich mehr als 7.200 Liter Blut pumpt, über 6 kg ATP generiert und alle 30 Tage seine strukturellen Elemente erneuert.[3] Der Energie-Metabolismus spielt für dieses Organ damit eine entscheidende Rolle. Oft ist das Herzversagen jedoch nicht auf den Mangel von Energieträgern selbst zurückzuführen, sondern durch fehlende Mikronährstoffe bedingt.[3] Ein Vertreter dieser Substanzklasse ist das Carnitin (Abb. 1), ein Vitaminoid, welches aufgrund seiner zentralen Stellung im Stoffwechsel zur Aufrechterhaltung des Energiehaushalts essentiell ist.

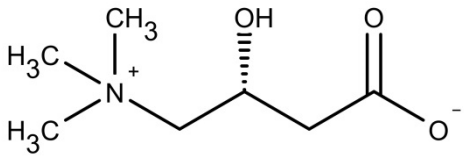


Abb. 1 Strukturformel des L-Carnitins

1.1 Die physiologische Bedeutung des Carnitins

L-Carnitin (β-Hydroxy-γ-trimethylammoniumbutyrat) ist ein natürlich vorkommendes hydrophiles Aminosäurederivat. Unter physiologischen Bedingungen liegt es aufgrund einer positiv geladenen, quartären Ammonium-Gruppe sowie einer negativ geladenen Carboxyl-Gruppe als Zwitterion vor.[4] Endogen kann es, vor allem in der Leber, aber auch in der Niere

und dem Gehirn[5,6], aus den Aminosäuren Lysin und Methionin synthetisiert werden[7]. Der Großteil des L-Carnitins (in der Folge als *Carnitin* bezeichnet), dem biologisch aktiven Stereoisomer[7], wird allerdings über Fleisch und Milchprodukte aus der Nahrung aufgenommen. Bei Menschen mit normaler Mischkost entspricht der exogen über die Nahrung zugeführte Anteil etwa 75 %, der Rest wird durch die körpereigene *de novo* Synthese bereitgestellt[8,9]. Die Carnitinaufnahme aus dem Darm erfolgt sekundär aktiv über Transporterproteine[10,11]. Carnitin wird in freier Form bzw. als Acylester glomerulär filtriert und ausgeschieden.[12] Dabei werden jedoch 95 % des Carnitins im proximalen Tubulus rückresorbiert, um die Carnitin-Homöostase im Körper aufrecht zu erhalten.[13] Die Carnitin-Konzentration weist sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch verschiedenen Geweben eine starke Variation auf. Im humanen Organismus konnten die höchsten lokalen Konzentrationen in Herz- und Muskelgewebe (Skelettmuskulatur: 2 - 3 mmol/kg[14]) gefunden werden.[15] Hierbei können die intrazellularen Carnitin-Konzentrationen, die des Extrazellularraums um das 20 - 50-fache überschreiten.[16] Über 99 % des gesamten Carnitins liegen daher intrazellular vor.[14] Der Anteil an zirkulierendem Carnitin beträgt lediglich 0,5 %, wobei die Plasma-Carnitin-Spiegel zwischen 40 - 60 µmol/l schwanken.[12] Die Aufnahme von Carnitin erfordert in den meisten Geweben Carrier-vermittelte Transport-Systeme, welche den hohen Konzentrationsgradienten zwischen Gewebe und Plasma aufrechterhalten.[17] Die Analyse des Carnitin-Transports lässt eine Heterogenität der Transportsysteme vermuten.[18] Leber und Gehirn weisen einen niedrig-affinen (K_m = 2 - 10 mM) Transport mit hoher Kapazität auf[19-21], wohingegen Fibroblasten, Muskel- und Herzzellen durch ein hoch-affines (K_m = 5 - 10 µM) Transportsystem mit niedriger Kapazität gekennzeichnet sind[22,23].

Carnitin besitzt, im Rahmen der Energiegewinnung, eine katalytische Funktion[24] und ist hierbei integraler Bestandteil für den Transport langkettiger Fettsäuren (LCFA, *long chain fatty acid*) aus dem Cytosol in den mitochondrialen Matrixraum. LCFA stellen, insbesondere für Herz- und Skelettmuskulatur, wichtige Energiesubstrate dar, da diese Organe auf die Energiegewinnung aus dem Abbau von Triglyceriden (β-Oxidation) angewiesen sind.[25,26] Bis zu 80 % des Energiebedarfs dieser Gewebe werden über den Abbau langkettiger Fettsäuren im Rahmen der β-Oxidation gedeckt. Im Gegensatz zu mittel- und kurzkettigen Fettsäuren können diese nicht über die innere Mitochondrienmembran diffundieren (Abb. 2). Genau hier liegt die entscheidende Funktion des Carnitins, das den Transfer der LCFA ins Innere des Mitochondriums ermöglicht (*carnitine shuttle*). Neben dem Carnitin selbst sind für diesen

Transport weitere Enzymsysteme notwendig. Mit Hilfe der Acyl-CoA-Synthetase erfolgt im Cytosol zunächst die Aktivierung der freien Fettsäure durch Kopplung an CoA. Das gebildete Acyl-CoA stellt dann ein Substrat für die Carnitin-Palmitoyl-Transferase I (CPT I) dar, welche die Fettsäure auf Carnitin überträgt. Die Carnitin-Acyl-Carnitin-Translokase (CACT), die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, vermittelt anschließend den Transport des Acyl-Carnitins in den mitochondrialen Matrixraum. Hier wird die Acyl-Gruppe durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase II (CPT II), unter Freisetzung des Carnitins, zurück auf das CoA übertragen und das Carnitin ins Cytosol zurücktransportiert, wo es für einen weiteren Zyklus zur Verfügung steht.

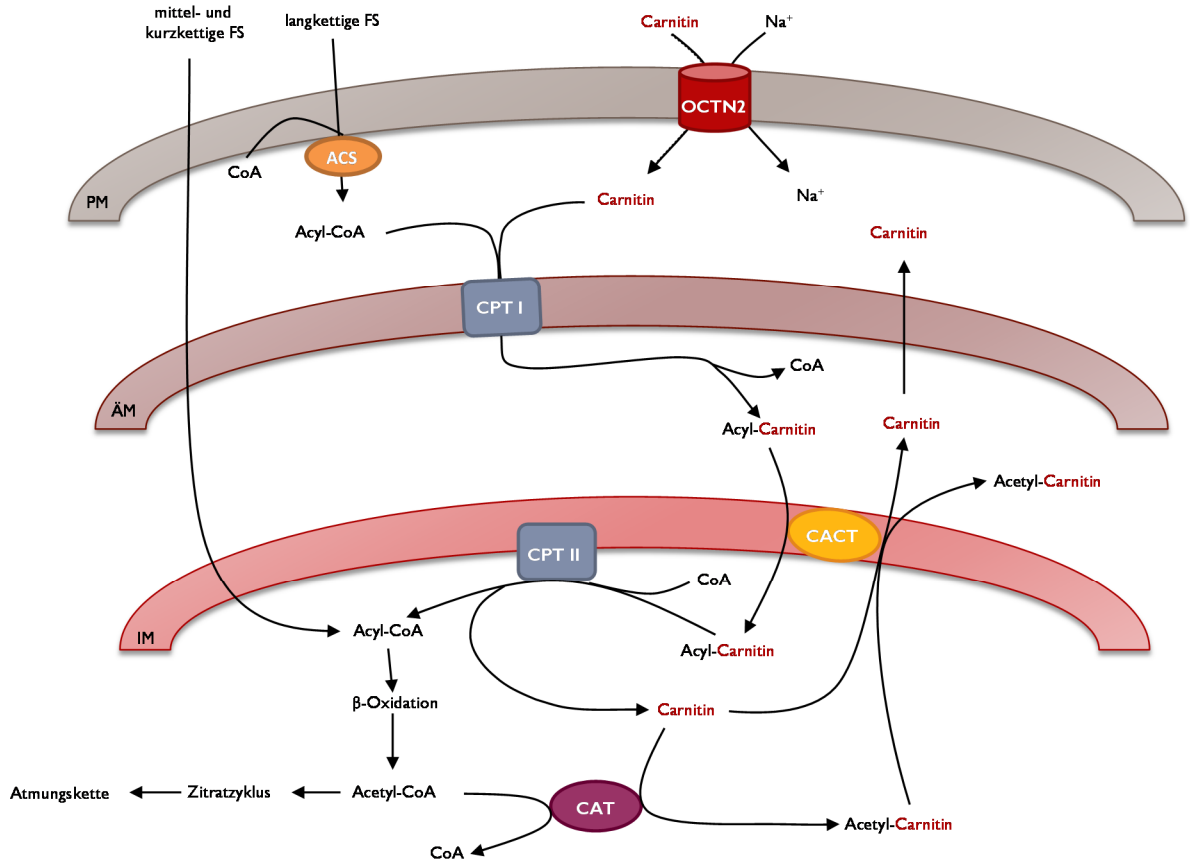


Abb. 2 Transportsystem für den Transfer langkettiger Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran (*carnitine shuttle*). PM: Plasmamembran, ÄM: äußere Mitochondrienmembran, IM: innere Mitochondrienmembran, OCTN2: Carnitin-Transportprotein, ACS: Acyl-CoA-Synthetase, CPT I: Carnitin-Palmitoyl-Transferase I, CPT II: Carnitin-Palmitoyl-Transferase II, CACT: Carnitin-Acyl-Carnitin-Translokase, CAT: Carnitin-Acyl-Transferase

Zusätzlich besitzt Carnitin eine Funktion in der Regulation des CoA-Pools, welcher insbesondere für den Muskel- und Leber-Metabolismus von Bedeutung ist.[24] Es verbessert die Wiederverwertung von CoA, indem es kurzkettige Acyl-Gruppen aus dem

mitochondrialen Matrixraum ins Cytosol und langkettige Acyl-Gruppen entgegengesetzt transportiert und damit sowohl den mitochondrialen als auch den cytosolischen Gehalt an freiem CoA erhöht.[27] Die Transformation von Acyl-CoA in Acyl-Carnitin ist zudem ein wichtiger Mechanismus, um die toxischen Acyl-Gruppen zu entfernen.[27] Die Akkumulation von Propionyl-CoA z. B. verursacht beim Menschen schwere metabolische Störungen und ist mit einer lebensbedrohlichen Propion- und Methylmalonazidurie assoziiert.[28,29] Eine Carnitin-Applikation vermindert die Akkumulation dieser toxischen Intermediate und regeneriert zugleich freies, mitochondriales CoA.[30] Eine verminderte Carnitin-Verfügbarkeit induziert demnach einen Anstieg im Acetyl-CoA/CoASH-Verhältnis und kann somit den Intermediärstoffwechsel, insbesondere die Glukoneogenese, Glykolyse, den Aminosäure-Katabolismus und die Ketonkörper-Produktion, beeinträchtigen.[14]

Neben der intrinsischen Rolle für bioenergetische Prozesse besitzt Carnitin viele weitere Funktionen (Abb. 3), die jedoch hauptsächlich auf der Interaktion von Carnitin mit Acyl-Gruppen beruhen. Carnitin ist z. B. auch für die Elimination organischer Säuren wie verzweigtkettiger Aminosäuren[31] oder Xenobiotika[32] wie Valproinsäure[33] von Bedeutung. Diese können in Form von Carnitin-Estern über die Zellmembranen diffundieren und renal ausgeschieden werden. Toxische Effekte durch Akkumulation dieser Verbindungen können somit verhindert werden.[34]

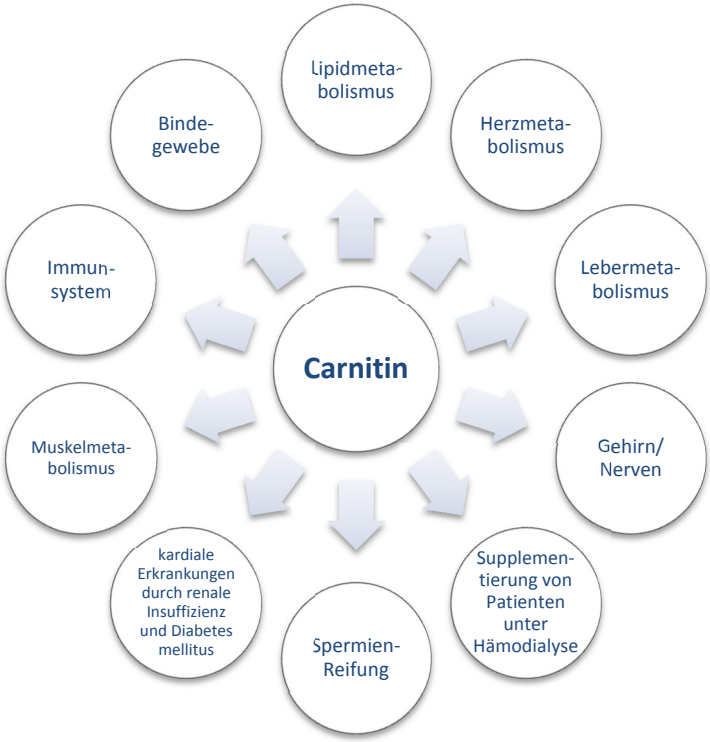


Abb. 3 Stellung des Carnitins im Intermediärstoffwechsel (nach Löster 2007[35])

Über die zentrale Stellung im Intermediärstoffwechsel hinaus weist Carnitin inhibitorische Effekte auf die Ceramid-Synthese[36] und Caspase-Aktivitäten[37] auf und wirkt dadurch anti-apoptotisch. Carnitin wirkt ferner immunmodulierend[7] und antioxidativ[38,39]. Bei Patienten mit einer unregulierten oder beeinträchtigten Immunfunktion konnte eine Verminderung des Serum- und Gewebe-Carnitin-Spiegels gezeigt werden.[40] Zudem konnten für Carnitin in den letzten Jahren neuroprotektive[39], neuromodulatorische[41] und neurotrophische[42] Eigenschaften nachgewiesen werden.[14] Das in neuralen Zellen akkumulierende Acetyl-Carnitin[43,44] vermittelt z. B. den Transfer von Acetyl-Gruppen für die neuronale Acetylcholin-Synthese[45]. Auch für den Leber-Metabolismus scheint Carnitin eine entscheidende Rolle zu spielen, da eine Carnitin-Defizienz ebenfalls mit Leberzirrhose assoziiert ist.[6] Darüber hinaus weisen Hämodialyse-Patienten als Begleiterscheinung gewöhnlich ebenfalls eine Carnitin-Insuffizienz auf. Aufgrund des Carnitin-Verlusts über die Dialysemembran und der eingeschränkten renalen Carnitinsynthese ist der Plasma- und Gewebe-Carnitin-Level von Patienten mit Langzeit-Hämodialyse deutlich reduziert.[46] Auch bei Patienten mit Diabetes sind verminderte Plasma-Carnitin-Level zu finden.[47] Neben dem Lipid-Metabolismus steuert Carnitin ebenfalls den Kohlenhydrat-Metabolismus, da es die Verwertung der Energieträger im peripheren Gewebe sowie die Insulinsensitivität der Zelle steigert.[48,49]

1.2 Carnitin-Mangelerscheinungen

Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass Störungen der Carnitinhomöostase mit schwerwiegenden, insbesondere metabolischen Folgen assoziiert sind. Auslöser kann dabei, neben genetischen Defekten im Enzymsystem des Carnitin-Zyklus, insbesondere auch ein Mangel an Carnitin selbst sein. Hierbei differenziert man zwischen sekundärer und primärer Carnitin-Defizienz.[7]

Die sekundäre Carnitin-Defizienz kann angeboren oder erworben sein. Mögliche Ursachen liegen dabei in Störungen der Fettsäure-Oxidation oder des Carnitin-Zyklus, sowie in Leber- und Nierenerkrankungen oder Unterernährung. Weiterhin zählt auch die infolge einer Therapie mit Valproinsäure beobachtet Carnitindefizienz in diese Gruppe.[50] Im Gegensatz zur primären Carnitin-Defizienz (PCD), welche durch einen Carnitin-Mangel selbst verursacht wird, ist dieser bei den sekundären Formen dieser Erkrankung lediglich die Folge.[51]

Die PCD (OMIM 212140), auch als systemische Carnitin-Defizienz bezeichnet, ist eine autosomale Störung der mitochondrialen β-Oxidation aufgrund eines stark verminderten

Plasma- und Gewebe-Carnitin-Spiegels. Die Inzidenz dieser Erkrankung variiert je nach Region zwischen 1 : 20.000 (Europa) und 1 : 120.000 (Australien).[52] Als Ursache konnten heterogene Mutationen im Gen *SLC22A5*, welches für einen hochaffinen Carnitin-Transporter (OCTN2) in der Plasmamembran kodiert, festgestellt werden.[53,54] Eine Defizienz dieses Transporters ist dabei unmittelbar mit der Entwicklung einer systemischen Carnitin-Defizienz verbunden.[53] Hintergrund ist neben dem renalen Carnitin-Verlust aufgrund einer fehlenden tubulären Rückresorption auch eine verminderte systemische und zelluläre Carnitinaufnahme.[55-57] Ein häufiges Erscheinungsbild dieser Krankheit ist eine progressive Kardiomyopathie mit oder ohne skelettale Muskelschwäche im Alter von 1 - 4 Jahren.[16] Darüber hinaus können Hypoglykämie[58], Hyperammonämie und Enzephalopathie[53] auftreten. Eine Studie zeigte bei 62,3 % der Patienten eine vorwiegend kardiale Manifestation mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit für die gleichzeitige Ausprägung eines kardialen und metabolischen Phänotyps.[59] Die beeinträchtigte Fettsäureoxidation führt zu einer unzureichenden Energieproduktion, reduzierter Ketogenese und Akkumulation von langkettigen Fettsäuren in den betreffenden Geweben.[16] Die Kardiomyopathie ist die gängigste klinische Manifestation bei Kindern mit PCD, wobei die Inzidenz der dilatativen Kardiomyopathie dabei höher ist als die der hypertrophen Form.[60] Sowohl die primäre, als auch die sekundäre Carnitin-Defizienz sind behandelbar. Durch frühzeitiges Erkennen und hochdosierte Substitution von Carnitin kann die Entwicklung der o. g. Symptome verhindern werden.

1.3 Juvenile viscerale Steatose-Mäuse als Modellsystem der PCD

Juvenile viscerale Steatose (jvs)-Mäuse (isoliert aus dem Stamm C3H-H-2(0)[61]), welche erstmals 1988 von Koizumi *et al.* beschrieben wurden[61], zeigen mit der Entwicklung einer Lipidakkumulation in der Leber, Hyperammonämie und Hypoglykämie ähnliche Symptome wie Patienten mit einer PCD[53,58,61,62]. Sie weisen Veränderungen in der intestinalen Absorption, Gewebeverteilung und Elimination des Carnitins[61,63] auf und eignen sich daher sehr gut als Modellsystem für die PCD. Für jvs-Mäuse konnte ein verminderter ATP-Gehalt[64] sowie eine Assoziation der kardialen Hypertrophie mit einer Lipid-Akkumulation und einer gesteigerten Anzahl an Mitochondrien[65] gefunden werden. Ähnliche morphologische Veränderungen konnten ebenfalls in der Skelettmuskulatur von Patienten mit einer primären Carnitin-Defizienz beobachtet werden.[65] Sowohl in jvs-Mäusen als auch in PCD-Patienten liegen genetische Varianten im *SLC22A5* vor.[53] In jvs-Mäusen tritt im kodierenden

Bereich des *Slc22a5* eine nichtsynonyme Mutation auf, welche in dem Austausch der Aminosäure Leucin zu Arginin an Position 352 und darin begründet zu einem Verlust bzw. einer Verminderung der OCTN2-Transportaktivität führt.[53] Die Verteilung des Carnitins ins Muskelgewebe, insbesondere in Herz- und Skelettmuskulatur, ist in diesen Tieren daher deutlich reduziert.[63] Homozygote jvs-Mäuse entwickeln eine Kardiomyopathie, die durch Hypertrophie, Störungen des myokardialen Energie-Metabolismus[64] und progressiver kardialer Dysfunktion[66] gekennzeichnet ist. Ohne eine Carnitin-Substitution überleben diese Tiere lediglich ca. 4 - 5 Wochen.[67,68] Kuwajima *et al.* konnten belegen, dass eine Carnitin-Defizienz bei jvs-Mäusen mit einer Hypertrophie der Myozyten in beiden Ventrikelwänden und im Septum einhergeht. Die Myozyten-Hypertrophie kann, wie bei der konzentrischen kardialen Hypertrophie, mehr der Vergrößerung der Zelldiameter als der Zelllänge zugeschrieben werden.[64] Die Untersuchungen von Kuwajima et *al*. ergaben, dass eine verminderte Energiezufuhr oder die fehlende Möglichkeit eine adäquate Energiemenge zu generieren für die myozelluläre, konzentrische Hypertrophie verantwortlich ist.[64] Das murine Octn2 besteht aus 557 Aminosäuren und besitzt eine Sequenzidentität von 85,5 % zum humanen OCTN2.[53] Zur näheren Untersuchung der physiologischen und pharmakologischen Rolle von OCTN2 stellen die jvs-Mäuse daher ein wichtiges Tiermodell dar.

1.4 Der Carnitin/novel organic cation transporter (OCTN) 2 (*SLC22A5*)

OCTN2 wurde 1998 entdeckt[56] und gehört zu den *novel organic cationen transporters* (OCTNs), welche sich zusammen mit den *organic cation transporters* (OCTs) und den *organic anion transporters* (OATs) in die Familie der *solute carrier* (SLC) 22A-Transporter eingliedern. Die Subfamilie der OCTNs setzt sich aus den Vertretern OCTN1 - 3 zusammen, welche sowohl endogene Substrate, wie Carnitin, als auch verschiedene Xenobiotika (hauptsächlich kationische Verbindungen)[69] erkennen. OCTN2 vermittelt einen hochaffinen, Natrium-abhängigen Transport von Carnitin und einen Natrium-unabhängigen Transport weiterer organischer Kationen.[56,70,71] Das Gen befindet sich auf Chromosom 5q31 und besteht aus 10 Exons und 9 Introns.[57] Die cDNA von hOCTN2 kodiert für ein Protein mit 557 Aminosäuren und einer berechneten molekularen Masse von 63 kDa. Mit einer Sequenzidentität von 77 % und einer Sequenzhomologie von 88 % weist die Aminosäuresequenz von hOCTN2 eine große Ähnlichkeit zu hOCTN1 auf.[57] Topologisch setzt es sich aus 12 α-helikalen Transmembrandomänen (TMDs) zusammen (Abb. 4).[57] Zwischen TMD 1 und 2 befindet sich eine größere extrazellulare Schleife (*loop*), welche aus 107 Aminosäuren besteht und drei

potenzielle Glykosylierungsstellen besitzt.[57] Neben einer weiteren intrazellularen Schleife zwischen TMD 6/7, konnte ein ATP/GTP-Bindungsmotiv[57] im intrazellularen *loop*, zwischen der vierten und fünften TMD, identifiziert werden (Abb. 4). Sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus sind zum Cytoplasma hin orientiert.

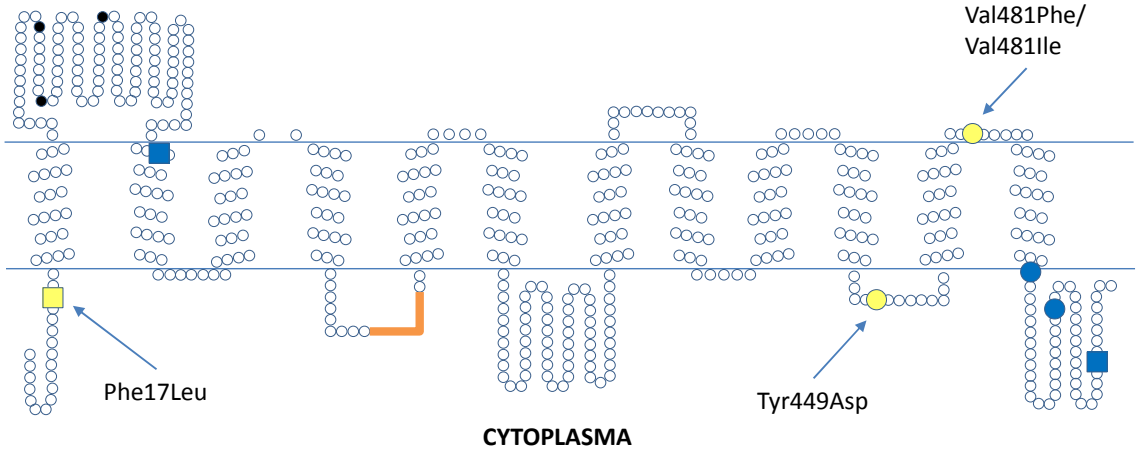


Abb. 4 Berechnete Sekundärstruktur/Transmembrantopologie von OCTN2 mit 8 nicht-synonymen Varianten der kodierenden Region. Polymorphe Varianten (Allelfrequenz > 1 %) sind als Quadrate dargestellt und seltenere Varianten als Kreise. Varianten mit signifikanten funktionellen Unterschieden zur OCTN2-Referenzsequenz sind gelb gekennzeichnet, alle anderen Varianten blau. Mutmaßliche N-Glykosylierungsstellen sind schwarz hervorgehoben und das Nukleotidbindungsmotiv ist als orange-farbene Linie markiert. Die drei funktionell bedeutsamen, nicht-synonymen Varianten sind mit einem Pfeil hervorgehoben (nach Urban *et al.* 2006[72]).

OCTN2 ist ubiquitär vorhanden[56,73], zeigt jedoch die stärkste Expression in Myokard[74], Skelettmuskulatur[57], Niere[63] und Plazenta[75]. Im humanen Herzen ist OCTN2 im Vergleich zu anderen OCT(N)s am stärksten exprimiert und im vaskulären Endothelium lokalisiert[76] (Abb. 5) [77].

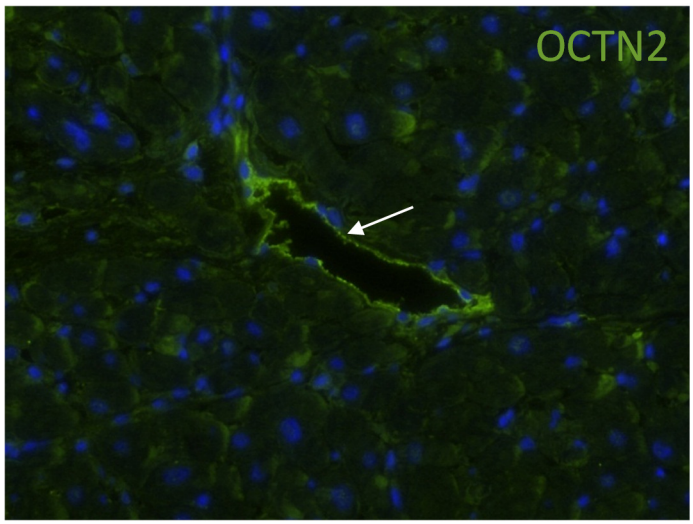


Abb. 5 Lokalisation des humanen OCTN2 (grün) im Gefäßendothel (Pfeil) des Herzens. Immunfluoreszenznachweis mit Kernfärbung (blau) (modifiziert nach Grube *et al.* 2011[77])

1.5 Carnitin und Herzerkrankungen

Die meisten kardialen Erkrankungen münden in einer Herzinsuffizienz, wobei die dilatative Kardiomyopathie (DCM) die dritthäufigste Ursache einer systolischen Herzinsuffizienz ist[78]. Bei jüngeren Erwachsenen ist die idiopathische DCM zudem die häufigste Indikation zur Herztransplantation.[79] Charakteristisch für die DCM ist eine zunehmende ventrikuläre (insbesondere linksventrikuläre) Dilatation und eine abnehmende systolische Funktion.[80] Patienten mit einer DCM weisen eine deutlich reduzierte Lebenserwartung auf. Die 5-Jahres-Mortalität liegt im Durchschnitt bei etwa 50 %.[81] Für einen Anteil von 20 - 30 % aller DCM-Fälle werden dabei auch genetische Ursachen diskutiert.[82,83] Vor diesem Hintergrund wurde auch die OCTN2-Expression in DCM-Patienten untersucht, welche sich als deutlich vermindert erwies.[77] Diese Expressionsänderung ging dabei sowohl mit einer Vergrößerung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters (LVEDD) als auch der Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) einher.[77]

Der kardiale Carnitin-Gehalt spielt auch in Sauerstoffmangelzuständen eine wichtige Rolle. Während einer myokardialen Ischämie resultiert das verminderte Sauerstoffangebot in einer Carnitin-Freisetzung aus dem ischämischen Myokard.[84] Dies geht mit Veränderungen im Verhältnis von freiem Carnitin zu Carnitin-Estern im Herzen einher. Weiterhin wird die oxidative Phosphorylierung entkoppelt, was zu einem Absinken der kardialen ATP-Konzentration[85] sowie einer Akkumulation von Fettsäuremetaboliten in den Myozyten

führt[86]. In dieser Situation können die Fettsäuren und deren Intermediate für die Wiederherstellung der kardialen Funktion nach Reperfusion des Herzens schädlich sein.[87] Bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt konnten in den nekrotischen Arealen des Myokards niedrige Carnitin-Konzentrationen gefunden werden, wohingegen die Carnitin-Level im umliegenden, gesunden Gewebe normal waren.[88] Im Grenzbereich beider Areale lagen die Carnitin-Konzentrationen zwischen nekrotischem und gesundem Gewebe, was auf einen Bereich hindeutet, in dem die metabolischen Schäden reversibel sind und für das die Wiederherstellung eines adäquaten Carnitin-Levels förderlich wäre.[89] Neben der Energiegewinnung aus dem Fettsäure-Metabolismus stellt die Glukose-Oxidation ebenfalls eine wichtige Quelle der ATP-Produktion dar. Im adulten Herzen ist der Beitrag der Glykolyse zur Energiegewinnung zwar relativ gering[90], doch reguliert das Herz die Kohlenhydrat- und Lipid-Komponenten der ATP-Produktion im Einklang mit der variierenden Substrat-Verfügbarkeit. Bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie konnte z. B. eine verminderte Expression des Carnitin-Transporters OCTN2 festgestellt werden, welche mit einer reduzierten Ejektionsfraktion assoziiert war.[76] Da Carnitin über seine Funktion als Transportmolekül langkettiger Fettsäuren hinaus ein entscheidender Regulator einiger Enzyme ist, die das Gleichgewicht zwischen Lipid- und Kohlenhydrat-Metabolismus im Herzen steuern[91], könnte es dem Untergang von Kardiomyozyten entgegenwirken. Dies konnte in klinischen und experimentellen Studien belegt werden, welche gezeigt haben, dass die Gabe von Carnitin myokardiale Schäden reduziert und die myokardiale Funktion nach Ischämie und Reperfusion im Erwachsenen verbessert.[92,93] In Tiermodellen verhindert Carnitin während der Ischämie den Verlust energiereicher Phosphate (ATP und Kreatininphosphat), erhält die mitochondrialen, mechanischen und elektrokardiographischen Funktionen und verhindert Gewebsnekrosen.[94]

Eine weitere Möglichkeit um ischämischen Schäden vorzubeugen ist die Optimierung der myokardialen Sauerstoffverwertung, beispielsweise durch pharmakologische Substanzen, die das Gleichgewicht von Fettsäure- und Glukose-Oxidation verschieben.[95,96] Einige experimentelle und klinische Studien haben dabei gezeigt, dass eine Kombination aus verminderter Fettsäure-Oxidation und gesteigerter Glukose-Oxidation die kardiale Funktion und Leistungsfähigkeit während und nach einer ischämischen Attacke verbessern.[97-100] Während einer Ischämie ist die Sauerstoffzufuhr zum Herzen entweder limitiert oder unterbrochen und führt zu deutlichen Veränderungen im myokardialen Energie-

Metabolismus.[101] Eine gesteigerte β-Oxidation kann eine intrazellulare Azidose und Calciumüberladung verursachen.[96] Ein möglicher Therapieansatz wäre in diesem Zusammenhang die Hemmung der β-Oxidation über Inhibitoren wie dem Mildronat. Dieses hemmt die γ-Butyrobetain-Hydroxylase in der Carnitin-Biosynthese[102] und zusätzlich als kompetitiver Inhibitor auch die Carnitin-Aufnahme über das OCTN2.[103] Zudem wird es mit ähnlich hoher Affinität wie Carnitin aufgenommen[104] und kann sowohl die Carnitin-Plasma-Konzentration senken[102] als auch die Reabsorption von Carnitin in den Nieren hemmen[105]. Für Mildronat konnte gezeigt werden, dass es den myokardialen Energie-Metabolismus von der Fettsäure-Oxidation zur Glukose-Oxidation hin verschiebt[106] und bei Ischämie so die Verarmung des Energiehaushalts an ATP im kardialen Gewebe verhindert.[107,108] Die antiischämischen Effekte von Mildronat konnten an isolierten Herzen (*in vitro*) und in Herzinfarktversuchen (*in vivo*) nachgewiesen werden.[106,108] Sowohl die orale als auch die intraperitoneale Anwendung von Mildronat reduzierte einerseits die Serum-Carnitin-Konzentration und andererseits die Infarktgröße nach einer Ischämie im Tierversuch.[107,109] Der verminderte Carnitin-Spiegel bei jvs-Mäusen könnte daher in dieser Hinsicht ebenfalls protektive Wirkungen unter Sauerstoffmangel-Zuständen besitzen.

1.6 Zielsetzung

Während Vorarbeiten von Grube *et al.*[77] eine verminderte mRNA-Expression des Transportproteins OCTN2 im Herzgewebe von Kardiomyopathie-Patienten zeigten, gibt es Hinweise, dass sich ein reduzierter Carnitin-Gehalt während eines akuten Myokardinfarkts positiv auswirkt[109]. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher die Bedeutung des OCTN2 bei der Pathogenese einer dilatativen Kardiomyopathie und der Ausprägung eines akuten Myokardinfarkts näher zu untersuchen. Dafür sollten die *juvenilen visceralen Steatose*-Mäuse, die eine funktionelle Carnitin-Defizienz aufwiesen, verwendet und hämodynamisch charakterisiert werden, wobei aufgrund ihrer nur leicht verminderten Carnitin-Transportfähigkeit vor allem heterozygote Tiere im Mittelpunkt des Interesses standen. Um deren kardiale Funktion zu beschreiben, wurden sowohl die linksventrikulären Druck- als auch Volumen-Parameter mittels Magnetresonanztomographie und anschließender Katheterisierung des linken Ventrikels ermittelt. Dabei wurden die jvs-Tiere wie auch die entsprechenden Kontrollen über einen Zeitraum von 16 Wochen zusätzlich zum normalen Futter mit Carnitin versorgt werden. Weiterhin wurde in dem System auch der Effekt einer zusätzlichen OCTN2-Hemmung, wie sie beispielsweise durch Pharmaka möglich ist, durch Gabe des OCTN2-Inhibitors Mildronat untersucht werden.

Neben der Herzfunktion wurde zusätzlich bei chronisch verminderter Carnitin-Versorgung die Bedeutung des OCTN2 für die Entwicklung des akuten Myokardinfarkt untersucht. Dieser wurde durch Ligatur der linken Koronararterie induziert und durch histologische Färbungen analysiert. In sich anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen wurden neben der Bestimmung der Carnitin-Spiegel spezifische Biomarker der Kardiomyopathie und des Myokardinfarktes überprüft, sowie die Expression Kardiomyopathie-assoziierter Gene bestimmt.

2 MATERIAL

2.1 Geräte und Zubehör

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage: research R200D	Sartorius, Göttingen
Biofuge	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank: BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
Datenakquisitions- und analysemodul: FA-404-PVL Scisense 404 Four Channel Recorder	Scisense Inc., London, Kanada
Digitalkamera: Ixus 230 HS	Canon, Tokyo, Japan
Druckminderer	Kayser, Koblenz
EKG-Einheit: Respiratory & ECG Unit	SA Instruments, Stony Brook, USA
Feinwaage: Acculab Atilon	Sartorius, Göttingen
Gasmisch-Einheit: ZUA-82	Föhr Medical Instruments, Seeheim-Jugenheim
Kaltlichtquelle: 1500 LCD	Schott AG, Mainz
Katheter: 1.2F Pressure-Volume Catheter (small mouse), Model: FTE-1212B-3518	Scisense Inc., London, Kanada
7 T-Kernspintomograph: ClinScan 70/30	Bruker BioSpin GmbH, Billerica, USA
Kontrolleinheit: FV896B Pressure-Volume Control Box	Scisense Inc., London, Kanada
Magnetrührgerät: MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mausbeatmungsgerät: MiniVent	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Mikro-Dismembrator S	B. Braun, Melsungen
Mikrotiterplattenlesegerät: Infinite®200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Narkosemittelverdampfer: Isofluran Vet. Med. Vapor	Drägerwerk AG, Lübeck
Oberflächen-Hochfrequenz(HF)-Spule: ClinScan 300 1H 2X2ARR	Bruker BioSpin GmbH, Billerica, USA
pH-Meter: phenomenal™	VWR, West Chester, USA
Spektrophotometer: Nano-Drop™ 1000	PeqLab, Erlangen
Sterilbank: Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau

Vortex Reaxtop	Heidolph, Schwabach
Waage: Explorer	Ohaus, Schweiz
Wärmeplatte	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Wasserbad	Julabo, Seelbach GFL, Burgwedel
Taqman-Gerät: 7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gel Logic 200 Imaging System	Kodak, Rochester, USA

2.1.2 Zubehör

Zubehör	Hersteller
27G x ¾ Kanülen	BD MicrolanceTM 3, Franklin Lakes, USA
26G x ½ Kanülen	BD MicrolanceTM 3, Franklin Lakes, USA
24G x 1 Kanülen	BD MicrolanceTM 3, Franklin Lakes, USA
Bepanthen Augensalbe	Bayer, Leverkusen
Chirurgisches Nahtmaterial Polyester-S ○ Meriderm schwarz, 2 x DSM 20-6, 7/0 USP ○ PET-Faden, Greenfil, 5 x 50cm 3/0 USP ○ PET-Faden, Greenfil, DRT 18, 2/0 USP	Catgut GmbH, Markneuenkirchen
Federschere: Spring Scissor straight	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinscheren: ToughCut® Iris Scissors	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
FR882B Calibration Cuvette	Scisense Inc., London, Kanada
Katheterhalterzange: Vessel Cannulation Forceps	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
kleinlumige Schläuche aus Polyethylen: Portex® Fine Bore Polyethylene Tubing	Smith Medical International Ltd., London, Großbritanien
MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
Mikrotiterplatten, 96-Well	NuncTM, Roskilde, Dänemark
Myojector U-100 Insulin Spritzen	Terumo, Tokio, Japan
Nadelhalter: Halsey	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Naturseide-S	Catgut GmbH, Markneuenkirchen
Pinzetten: Graefe Forceps	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

Pipetboyacu	Integra Bioscience, Chur, Schweiz
Spritze 1 ml	BD Plastipak, Franklin Lakes, USA
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Verödungsgerät: Small Vessel Cauterizer	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

2.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalie	Hersteller
ß-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen
dNTPs (10mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Co. LLC. , St. Louis
Evans Blue	Sigma-Aldrich Co. LLC. , St. Louis
FastDigest Sau96I (Cfr13I)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isofluran	Delta Select, Rimbach
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Co, St. Louis
KH_2PO_4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Levocarnitin	Euro OTC Pharma GmbH, Kamen
Mildronat	Grindex, Riga, Lettland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Co. LLC. , St. Louis
Natriumchlorid 0,9 %	B. Braun, Melsungen
$Na_2HPO_4 * 2\ H_2O$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natronlauge (4N)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium-Pentobarbital (Salz)	Sigma-Aldrich Co. LLC. , St. Louis
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Co. LLC. , St. Louis
Salzsäure 37 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase®	Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Tergazyme	Alconox, Inc., White Plains, USA
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma-Aldrich Co. LLC. , St. Louis

2.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	
	Stoff	Menge
Paraformaldehyd 4 %, pH 7,2	Paraformaldehyd	2 g
	1x PBS	ád 50 ml
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (1x PBS)	10x PBS	100 ml
	Aqua dest.	ád 1 l
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (10x PBS), pH 7,4	NaCl	80 g
	KCl	2,0 g
	$Na_2HPO_4 * 2\ H_2O$	14,4 g
	KH_2PO_4	2,4 g
	Aqua dest.	ád 1 l
TTC-Lösung 0,8 %	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	200 mg
	1x PBS	ád 25 ml

2.4 Genexpressions-Assays (LifeTechnologies)

Genexpressions-Assays	Gen	Assay-Nummer
Octn1	*Slc22a4*	Mm00457739_m1
Octn2	*Slc22a5*	Mm00441468_m1
Nos2	*Nos2*	Mm00440502_m1
Kollagen	*Col1a2*	Mm00483888_m1
connective tissue growth factor	*Ctgf*	Mm01192932_g1
natriuretic peptide type A	*Nppa*	Mm01255747_g1
myosin heavy polypeptide 6	*Myh6*	Mm00440359_m1

2.5 Kits

Kits	Hersteller
NucleoSpin® RNAII	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin® Tissue	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	LifeTechnologies, Darmstadt
Carnitin-Assay-Kit	BioVision, Milpitas, USA
Deproteinisierungs-Kit	BioVision, Milpitas, USA
h-FABP ELISA-Kit	Kamiya Biomedical Co, Tukwila, USA
NT-proBNP ELISA-Kit	Uscn Life Science, Houston, USA
Mouse Cardiac Tn-I (for serum) ELISA-Kit	Life Diagnostics, West Chester, USA
RNA 6000 Nano Assay-Kits	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

2.6 Software

Programm	Hersteller
Adobe Reader	Adobe Systems, San José, USA
GraphPad Prism 5, V5.01	GraphPad Software, La Jolla, USA
Image J	Wayne Rasband
LabScribe 2	iWorx, Dover, USA
Microsoft Office 2010 (Word, Powerpoint, Excel)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Referencemanager®	Thomson Reuters, New York, USA
Segment	Medviso, Lund, Schweden
Syngo	Siemens, München

3 METHODEN

3.1 Tierexperimentelle Arbeiten

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Tierversuche wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V) genehmigt und sind unter dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-041/10 hinterlegt.

3.1.1 Stämme

Für die tierexperimentellen Methoden wurden sowohl männliche als auch weibliche C57BL/6J- und C57BL/jvs-Mäuse im Alter von 12 bzw. 18 Wochen verwendet. Die C57BL/6J-Mäuse wurden bei Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts, USA) erworben. Zwei Zuchtpaare der C57BL/jvs-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Stephan Krähenbühl vom Institut „Klinische Pharmakologie und Toxikologie“ des Universitätsspitals in Basel (Schweiz) mit Zustimmung von Prof. Masahisa Horiuchi von der Universität Kagoshima (Japan), der den Stamm etabliert hat, bereitgestellt. Mit Hilfe dieser Zuchtpaare konnte in der Abteilung für Versuchstierkunde der Universität Greifswald eine Zuchtlinie etabliert werden. Als Hintergrundstamm wurden C57BL/6J-Mäuse verwendet.

3.1.2 Tierhaltung

Die Haltung erfolgte als offene Käfighaltung in einem Temperatur-kontrollierten Tierstall (20 - 24°C) mit einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 45 % und 65 % und einem circadianen Hell-Dunkel-Rhythmus (Hellphase zwischen 10-14 h). Die Tiere wurden auf Holzeinstreu in Makrolonkäfigen des Typs II (330 cm^2) gehalten. Besatzdichten von fünf Tieren pro Käfig wurden nicht überschritten. Die Tiere wurden mit pelletiertem Standardfutter (V1534-000 R/H, 10 mm [ssniff, Soest]) für Zucht und Haltung und Wasser *ad libitum* versorgt.

Aufgrund der Fragestellung dieser Arbeit wurde den Tieren zudem mit unterschiedlichen Substanzen supplementiertes Standardfutter verabreicht. Einem Teil der Tiere wurde Carnitin- bzw. Mildronat-haltiges Futter gegeben (sniff, SM R-Z, 10 mm mit 1,5 % Carnitin bzw. 0,2 % Mildronat). Die Versuchstiere wurden sowohl zur Bestimmung hämodynamischer Parameter mittels MRT und Konduktanz-Katheter als auch für ein akutes Myokardinfarkt-Modell verwendet.

3.1.3 Studiendesign

3.1.3.1 Untersuchungen zur Kardiomyopathie

Die Erhebung der hämodynamischen Daten erfolgte in einem Alter von 18 Wochen. Die vorangehende Behandlung/Fütterung wurde über einen Zeitraum von 16 Wochen durchgeführt (Abb. 6). Dabei wurden die Tiere entsprechend ihres *Slc22a5*-Genotyps in drei Gruppen eingeteilt.

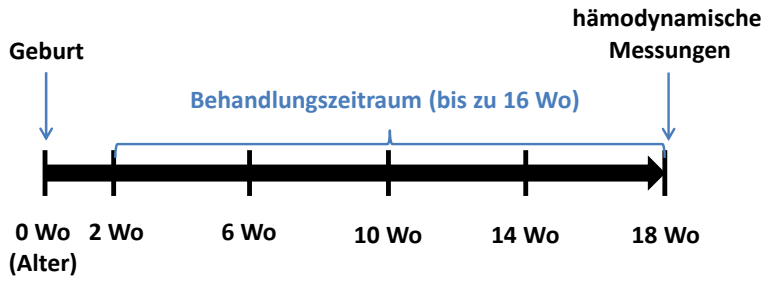


Abb. 6 Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der tierexperimentellen Versuche

Entsprechend der Applikation verschiedener Substanzen (Carnitin, Mildronat) und der unterschiedlichen Behandlungsdauer (Abb. 7) wurden die Versuchstiere einzelnen Untergruppen zugeordnet (Tab. 1).

Tab. 1 Übersicht der verwendeten Versuchstiere und deren Behandlung zur Bestimmung der hämodynamischen Parameter

Gruppe	**Wildtyp-Tiere**	**heterozygot Octn2-defiziente Tiere**	**homozygot Octn2-defiziente Tiere**
Stamm	*C57BL/6J*	*C57BL/jvs*	*C57BL/jvs*
Genotyp	wt	$jvs^{+/-}$	*jvs*

Behandlung	**Carnitin-Applikation**	**Karenz der Carnitin-Applikation**					**Mildronat-Applikation**			
Dauer [Wo]	16	2	4	8	12	16	4	8	12	16
wt	x	-	-	-	-	x	-	-	-	x
$jvs^{+/-}$	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x
jvs	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-

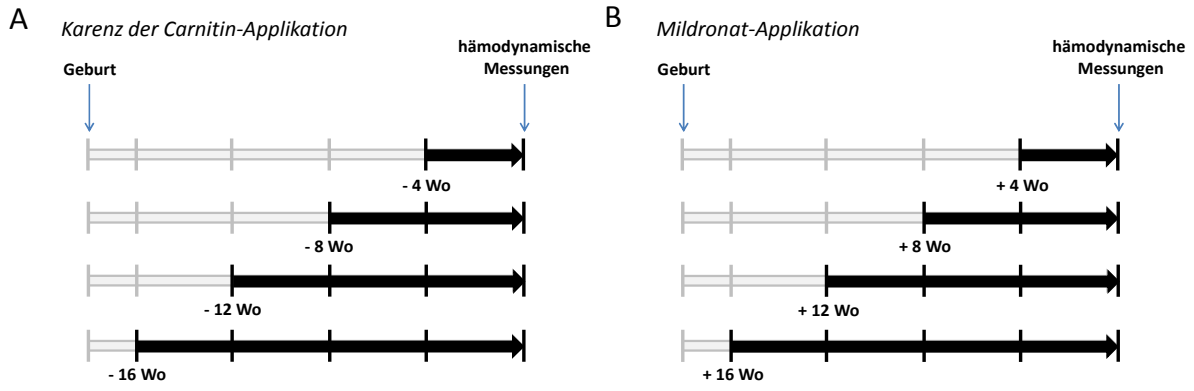


Abb. 7 Übersicht über die Karenz-Zeiten der Carnitin-Applikation (A) und die Behandlungszeiträume mit Mildronat (B) von heterozygot-defizienten jvs-Mäusen ($jvs^{+/-}$) für die Bestimmung hämodynamischer Parameter

3.1.3.2 Myokardinfarkt

Die Induktion eines akuten Myokardinfarkts wurde mit Versuchstieren im Alter von 12 Wochen durchgeführt, wobei der Behandlungszeitraum hier 6 Wochen betrug. Die Versuchstiere wurden ebenfalls Genotyp-spezifisch (hinsichtlich *octn2*) und entsprechend ihrer Behandlung in mehrere Gruppen eingeordnet (Abb. 8, Tab. 2):

Tab. 2 Übersicht der verwendeten Versuchstiere und deren Behandlung im Rahmen der Myokardinfarktuntersuchungen

Gruppe	**Wildtyp-Tiere**	**heterozygot Octn2-defiziente Tiere**	**homozygot Octn2-defiziente Tiere**
Stamm	*C57BL/6J*	*C57BL/jvs*	*C57BL/jvs*
Genotyp	wt	$jvs^{+/-}$	*jvs*

Behandlung	**Carnitin-Applikation**	**Karenz der Carnitin-Applikation**	
Dauer [Wo]	6	2	6
wt	x	-	x
$jvs^{+/-}$	x	-	x
jvs	x	x	-

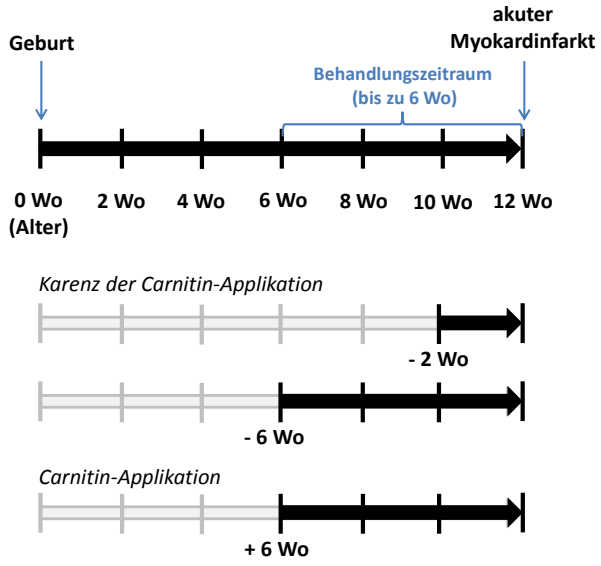


Abb. 8 Übersicht über die Dauer von Carnitin-Karenz- und -Applikation der Versuchstiere für die tierexperimentellen Untersuchungen zum akuten Myokardinfarkt

3.1.4 Kardiomyopathie-Untersuchungen

Die unter Tab. 1 aufgeführten Gruppen wurden im Alter von 18 Wochen zunächst mittels Kleintier-MRT und fünf Tage später mit dem Konduktanz-Katheter hämodynamisch charakterisiert.

3.1.4.1 Kleintier-MRT

Für die Konduktanz-Katheter-Methode (Admittanz-System, Berechnung nach Baan) ist eine unabhängige Bestimmung des Schlagvolumens notwendig. Dafür wurden alle Tiere im 7-Tesla-Kleintier-MRT in Greifswald vermessen. Die methodische Durchführung fand dabei durch Stefan Heinrich statt (Abteilung Adulte residente Stammzellen in der Herzinsuffizienztherapie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B, Universitätsmedizin Greifswald).

Die Messung wurde an einem Kleintier-MRT ClinScan 70/30 (Bruker BioSpin GmbH, Billerica, USA) mit einer Feldstärke von (7,1 Tesla) und einer Gradientenfeldstärke von 290 mT/m durchgeführt. Als Resonator wurde eine Oberflächen-Hochfrequenz(HF)-Spule (ClinScan 300 1H 2X2ARR) verwendet. Tier und HF-Spule wurden mit Hilfe einer Gleitschiene in den Scanner eingebracht, sodass das Tier stets an der gleichen Stelle positioniert werden konnte.

Narkose und Ventilation

Zur Narkotisierung wurden die Versuchstiere initial in einer transparenten Narkosekammer 1 min mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran in einer Konzentration von 4 Vol.-% (in 100 Vol.-% medizinischem Sauerstoff, Narkosemittelverdampfer: Dräger Vapor 19.3 Isofluran) und einer Fließgeschwindigkeit von 4 l/min begast. Zuvor wurde die Narkosekammer zur gleichmäßigen Verteilung des Narkotikums 4 min mit dem Narkosegas geflutet. Als Narkotikum wurde Isofluran gewählt, da es durch kurze An- und Abflutungsgeschwindigkeiten (Blut/Gas-Verteilungskoeffizient: 1,4) gekennzeichnet ist und nahezu vollständig pulmonal abgeatmet wird (Metabolismus: 0,17 %). Isofluran wirkt zwar negativ inotrop auf den Herzmuskel[110], die kardiale Depression ist jedoch im Vergleich zu anderen Inhalationsanästhetika relativ gering. Nach einsetzender Muskelrelaxation und Hypnose wurde eine ausreichende Narkosetiefe anhand der verminderten Atemfrequenz und der fehlenden Reflexe auf Schmerzreize (Kneifen des Schwanzes/der Zehen) sichergestellt. Anschließend wurde das Tier aus der Narkosekammer entnommen, in Bauchlage auf einer 1-Kanal-Hochfrequenzspule mit 4 Spulenelementen fixiert und mit einer Atemmaske versehen. Für den Versuchsverlauf wurde die Isoflurankonzentration auf 2 Vol.-% und die Fließgeschwindigkeit auf 1 l/min vermindert. Neben einer ausreichenden Narkosetiefe mussten weitere narkosebedingte Besonderheiten beachtet werden. Aufgrund des fehlenden Lidschlussreflexes unter Einwirkung eines Anästhetikums wurden die Augen des Versuchstieres zum Schutz vor Austrocknung der Hornhaut mit Augensalbe (Bepanthen, Bayer, Leverkusen) bedeckt. Weiterhin kann je nach Narkotikum eine unterschiedlich stark ausgeprägte Vasodilatation auftreten. Um eine Hypothermie zu vermeiden wurde die Körpertemperatur kontinuierlich mit Hilfe eines Rektalthermometers (mit gekoppelter Temperaturkontrolleinheit) bestimmt und während des gesamten Procedere mit Hilfe eines Heizkissens bei 37 °C gehalten. Zur Akquisition physiologischer Parameter wie der Herzfrequenz und Atmung und zur Vermeidung von Bewegungsartefakten während der MRT-Messung wurde das Versuchstier über die Vorderpfoten an eine EKG-Einheit (Respiratory & ECG Unit, SA Instruments, Stony Brook, USA) angeschlossen. Die MRT-Messung konnte damit auf den Herzrhythmus und die Atmung (Atemfrequenz: 35/min) abgestimmt (getriggert) werden.

Messprozedur

Zu Beginn der Messung wurden zunächst raumachsenorientierte (transversale, koronare, sagittale) *localizer*-Sequenzen mit geringer räumlicher und zeitlicher Auflösung (keine Triggerung, Mischbild der gesamten Herzaktion) durchgeführt. Anschließend wurden zur Bestimmung der vertikalen bzw. horizontalen linksventrikulären langen Achse 2-Kammer- bzw. 4-Kammer-*localizer*-Sequenzen aufgenommen. Der 2-Kammer-Schnitt bildet das linke Atrium und den linken Ventrikel sagittal ab. Durch die Mitte der Mitralklappe und des linksventrikulären Apex wird auf einen transversalen Suchschnitt der 2-Kammer-Schnitt geplant (Abb. 9A, D). Die Planung des 4-Kammer-Blicks erfolgt (frontal) im 2-Kammer-Blick und stellt beide Atrien und Ventrikel des Herzens dar (Abb. 9B, E). Zur Darstellung der kurzen Achse werden nun senkrecht zur 4-Kammer-Ebene transversale Schnitte angefertigt. Hierbei werden senkrecht zum Septum und ausgehend vom ersten geschlossenen Myokardring hin zum Apex Schnitte im Abstand von 1 mm vom linken Ventrikel aufgenommen (Abb. 9C, F).

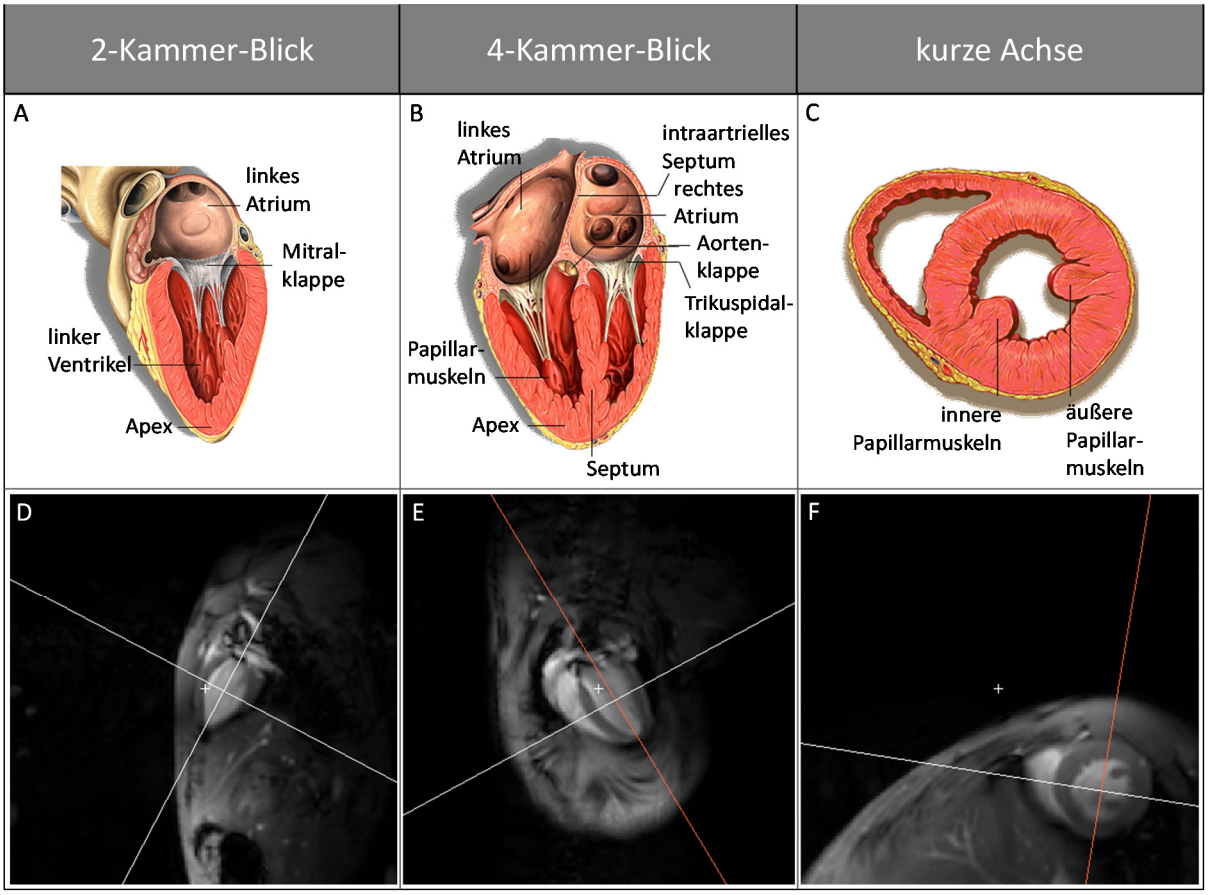


Abb. 9 Darstellung der Schnittebenen im MRT, schematische Ansicht und MRT-Abbilder des 2-Kammer-Blicks (A, D), 4-Kammer-Blicks (B, E) und der kurzen Achse (C, F); ([A-C] modifiziert nach yale.edu, [D-F] erstellt mit Segment)

Zur Messung aller notwendigen Sequenzen benötigt man pro Tier ca. 45 min (von Anfang bis Ende der Narkose). Nach Ermittlung aller Parameter wurde das Versuchstier zum Einleiten der Aufwachphase in einen mit Infrarotlicht (zur Wärmeerhaltung) versehenen Einzelkäfig verbracht und bis zum vollständigen Erwachen beobachtet.

Volumenquantifizierung

Die Analyse der linksventrikulären Volumina erfolgte semi-automatisch anhand der Methode nach Simpson mit der MRT-Bild-Analyse-Software *Segment* (Medviso, Lund, Schweden). Hierbei wurden die kurzen Achsen am Ende der Systole bzw. der Diastole zur Bestimmung der epikardialen und endokardialen Strukturen verwendet und aus der Summe der planimetrischen Ventrikel-Flächen, Schichtdicken und -abstände das Ventrikel-Volumen und die Ventrikel-Masse ermittelt (Abb. 10).

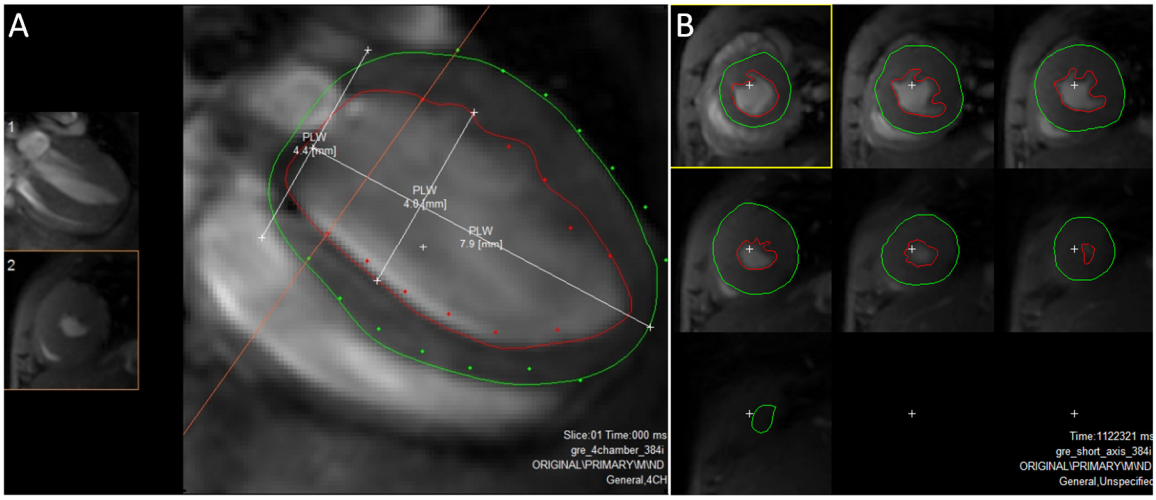


Abb. 10 Planimetrische Auswertung der Aufnahmen des 4-Kammer-Blicks (A) und der kurzen Achsen (B) zur Ermittlung der kardialen Volumina und der Ventrikelmasse. Die Analyse erfolgte durch Bestimmung der äußeren linksventrikulären Wand (grüne Linie) und des Ventrikellumens (rote Linie) im 4-Kammer-Blick und in jeder Schichtebene der kurzen Achsen. (erstellt mit Segment)

Anhand dieser Berechnungen konnten spezifische Volumenparameter wie enddiastolisches und endsystolisches Volumen (EDV, ESV), Schlagvolumen (SV), Ejektionsfraktion (EF) und das Herzzeitvolumen (CO) erfasst werden. Weiterhin wurde die linksventrikuläre Masse (LVM) bestimmt und die endsystolischen und enddiastolischen Diameter (ESD, EDD) und Längen (ESL, EDL) vermessen.

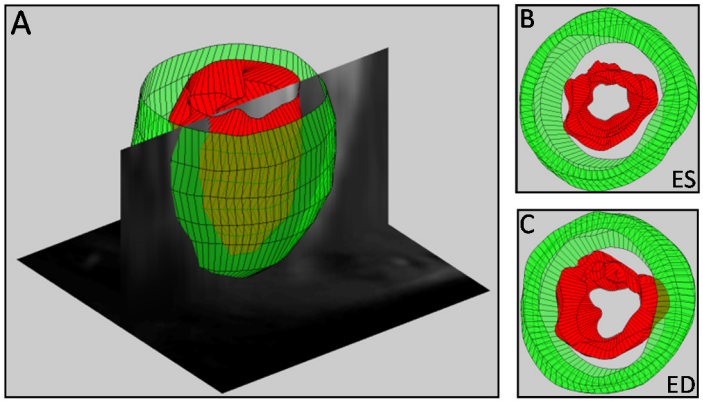


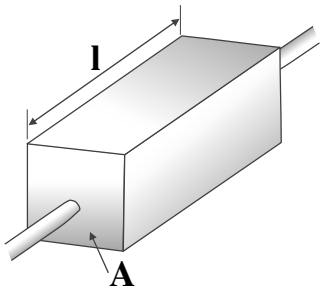
Abb. 11 3D-Modell des vermessenen Herzens (A) und transversaler Schnitt in der Endsystole (ES; B) und Enddiastole (ED; C). Nach Ermittlung der 2D-Daten in den einzelnen Schichtebenen können diese zu einem 3D-Abbild des linken Ventrikels zusammengesetzt werden. (erstellt mit Segment)

3.1.4.2 Konduktanz-Katheter-Methodik

Zur parallelen Bestimmung von Druck- und Volumenverhältnissen im linken Ventrikel wurde die Methode der Konduktanz-Katheter-Messung herangezogen. Sowohl die systolische als auch die diastolische linksventrikuläre Herzfunktion kann mit dieser Methodik sehr präzise abgebildet werden. Im Folgenden wird zunächst das Funktionsprinzip der Konduktanz-Katheter-Methodik dargelegt, bevor die experimentelle Vorgehensweise erläutert wird.

Prinzip der Konduktanz-Messung

Die Konduktanz ist definiert als der Kehrwert des elektrischen Widerstands. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes an leitfähiges Material (hier Blut) kann zeitabhängig eine Spannung gemessen werden. Volumenänderungen im linken Ventrikel können als reziproke Änderungen im Widerstand registriert werden. Demzufolge kann das Ventrikelvolumen in direkter Proportionalität zur Leitfähigkeit (Konduktanz) wiedergegeben werden (Abb. 12).



(1) $\boldsymbol{V = l \cdot A}$ $\quad R = \rho \cdot \frac{l}{A} \rightarrow A = \rho \cdot \frac{l}{R} \quad G = \frac{1}{R}$

(2) $\boldsymbol{V = l \cdot \rho \cdot \frac{l}{R} = l^2 \rho \frac{1}{R}}$

(3) $\boldsymbol{V = l^2 \rho\, G}$

Abb. 12 Mathematischer Zusammenhang zwischen Volumen und Konduktanz (rechts) eines elektrischen Leiters. V, Volumen; l, Abstand zwischen den Messelektroden; A, Oberfläche; R, elektrischer Widerstand; ρ, spezifischer Widerstand; G, Konduktanz

Die klassische Konduktanz-Theorie beruht auf einem linearen Zusammenhang zwischen Volumen und Konduktanz. Die in Abb. 12 (3) dargestellte Gleichung wurde durch einen Feldkorrekturfaktor α ergänzt (Berechnung nach Baan)[111].

$$V = \frac{1}{\alpha} l^2 \rho (G_t - G_p)$$

Form. 1 Berechnung des Volumens anhand eines linearen Zusammenhangs mit dem zeitlich variierenden Konduktanz-Signal (Berechnung nach Baan)[111]. α, Feldkorrekturfaktor (in Baans Berechnung als 1 angenommen); G_t, gemessene Konduktanz; G_p, parallele Konduktanz

Die Erhebung der hämodynamischen Daten für die vorliegende Arbeit erfolgte im Gegensatz zur klassischen Konduktanz mit der Admittanz-Technik. Die Leitfähigkeit des Blutes wird hierbei über einen nicht-linearen Zusammenhang (Berechnung nach Wei)[112] in ein Volumensignal konvertiert.

$$V = \frac{1}{1 - \frac{G_b}{\gamma}} \rho l^2 \, (G_b)$$

$$\gamma = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

$$a = SV - \rho l^2 \, (G_{b\text{-}ED} - G_{b\text{-}ES})$$
$$b = -SV(G_{b\text{-}ED} + G_{b\text{-}ES})$$
$$c = SV \, G_{b\text{-}ED} \, G_{b\text{-}ES}$$

Form. 2 Nicht-linearer Zusammenhang von Konduktanz und Ventrikelvolumen (Berechnung nach Wei).[112] G_b, Konduktanz des Blutes; SV, Schlagvolumen; $G_{b\text{-}ED}$, Konduktanz im Blut während der Enddiastole; $G_{b\text{-}ES}$, Konduktanz im Blut während der Endsystole

Das Volumen kann durch die Berücksichtigung eines nicht-linearen elektrischen Feldes im Ventrikel durch diese mathematische Näherung genauer wiedergegeben werden. Im Gegensatz zum klassischen Ansatz bietet diese Methode den Vorteil der Echtzeitkorrektur der parallelen Konduktanz, welche über den Ventrikel hinaus detektiert wird. Ein zusätzlicher Eingriff zur Bestimmung der parallelen Konduktanz per Injektion einer hypertonen NaCl-Lösung in die *vena jugularis* ist damit nicht mehr nötig. Zusätzlich kann über die Bestimmung des Phasenwinkels der Sitz des Katheters überprüft und optimiert werden.

Für die Konduktanz-Messungen wurde das ADVantage™ PV-System und ein 1.2F Druck-Volumen-Katheter mit einem Messelektrodenabstand von 4,5 mm verwendet. Der verwendete Druck-Volumen-Katheter besteht aus vier Elektroden und einem Drucksensor (Abb. 13A). Über die äußeren zwei Anregungselektroden (distal und proximal) wird durch Anlegen eines Wechselstroms im Herzen ein elektrisches Feld generiert. Über die inneren Messelektroden können dann Spannungsänderungen detektiert werden, welche

proportional zu Veränderungen des elektrischen Widerstandes und damit zum Volumen sind (Abb. 13B).

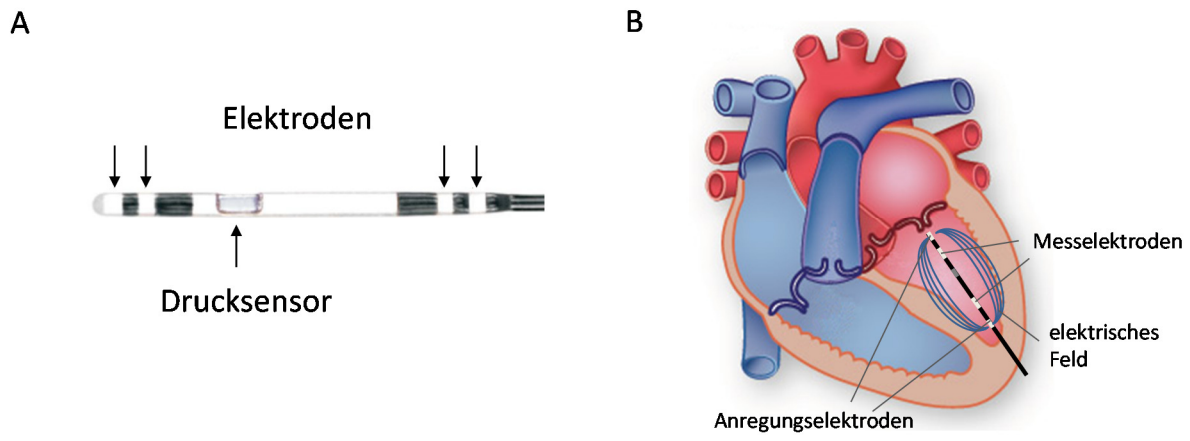


Abb. 13 Aufbau des Konduktanz-Katheters und Prinzip der Konduktanz-Katheter-Messung (modifiziert nach www.scisense.com [A], www.texasheartinstitute.org [B])

Durch die kontinuierliche Aufnahme der Druck- und Volumenverhältnisse im linken Ventrikel kann der kardiale Zyklus aufgezeichnet und in Form eines Druck-Volumen-Diagramms dargestellt werden. Ein einzelner kardialer Zyklus kann in vier Phasen untergliedert werden: diastolische Füllphase, isovolumetrische Kontraktion, Auswurfphase und isovolumetrische Relaxation (Abb. 14). Während der Füllphase (Diastole) sind die Atrioventrikularklappen (AV-Klappen) aufgrund des intraventrikulären Druckabfalls geöffnet und ermöglichen den Blutfluss in die Ventrikel. Der sich füllende Ventrikel expandiert, wird in seiner Elastizität reduziert und der intraventrikuläre Druck steigt. Sobald kein Druckgradient mehr zwischen Atrium und Ventrikel besteht, schließen sich bei maximaler Füllung (Enddiastole) die AV-Klappen und die isovolumetrische Kontraktion wird eingeleitet. In dieser Phase steigt bei konstantem Volumen der linksventrikuläre Druck an. Wenn der Druck im Inneren des linken Ventrikels den diastolischen Druck der Aorta überschreitet, öffnen sich die Aortenklappen und die Auswurfphase (Systole) beginnt. In der Auswurfphase sinkt das Volumen und der linksventrikuläre Druck steigt auf seinen Höchstwert an (Endsystole). Nach dem Schließen der Aortenklappen sinkt in der anschließenden isovolumetrischen Relaxation der linksventrikuläre Druck bei gleichbleibendem Volumen. Fällt der linksventrikuläre Druck unter den Druck des Atriums, öffnen sich die Mitralklappen und der Ventrikel füllt sich erneut (Diastole).

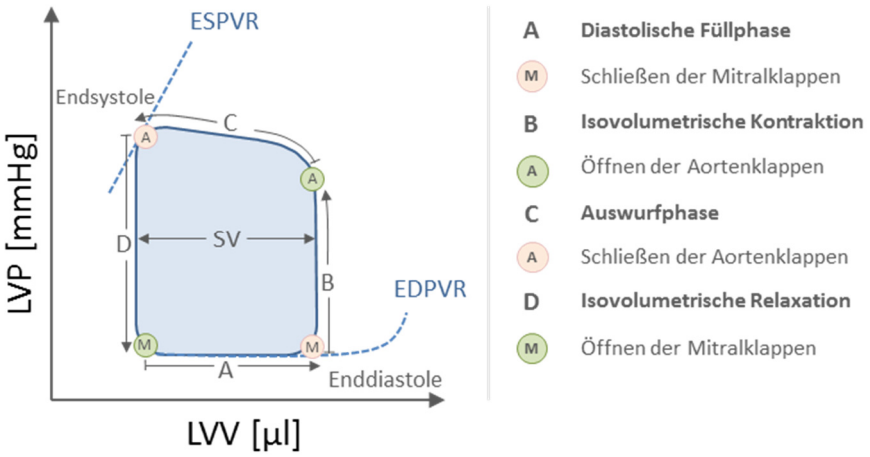


Abb. 14 Einzelne Phasen des Herzzyklus in einem Druck-Volumen-Diagramm und die daraus resultierende Druck-Volumen-Kurve (modifiziert nach www.scisense.com)

Fünf Tage nach Erhebung der kardialen Parameter wurden die Versuchstiere, mit Hilfe der bildgebenden Magnetresonanztomographie (MRT), erneut hämodynamisch charakterisiert. Hierbei konnten ebenfalls die Volumenparameter als auch zusätzlich zum MRT Druckverhältnisse des linken Ventrikels bestimmt werden.

Narkose und Ventilation

Für die Konduktanz-Katheter-Messungen wurden die Versuchstiere zunächst initial mit Isofluran betäubt. Nach Intubation über die Trachea wurde eine Verlaufsnarkose von 4 Vol.-% Isofluran während der Präparation und 2 Vol.-% während der hämodynamischen Messung eingestellt. Die Beatmung erfolgte mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch (Beatmungsfrequenz: 110 Züge/min, Beatmungsvolumen: individuelle Anpassung auf 200 - 350 µl). Zur Erhaltung der Körpertemperatur wurde eine Wärmeplatte (37 °C) mit Temperatur-Kontrolleinheit eingesetzt.

Operativer Eingriff und erhobene Parameter

Nach Durchtrennung der Haut und des Peritoneums unterhalb des Sternums wurde das Diaphragma eröffnet, der Corpus am Sternum aufgespannt und das Perikard durchtrennt. Anschließend wurde vom Apex (Herzspitze) ausgehend der linke Ventrikel mit einer 26G-Nadel punktiert und ein 1.2F Druck-Volumen-Katheter eingeführt (Abb. 15). Dieser wurde vor der Messung jeweils mindestens 30 min in einer Reinigungslösung (Tergazyme) aufbewahrt. Anschließend wurde der Druck in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) auf „0“ eingestellt. Nach Einführen des Katheters in den linken Ventrikel wurde eine

Einschlagphase von ca. 5 min abgewartet und bei stabiler Herzfrequenz mit der Messung begonnen.

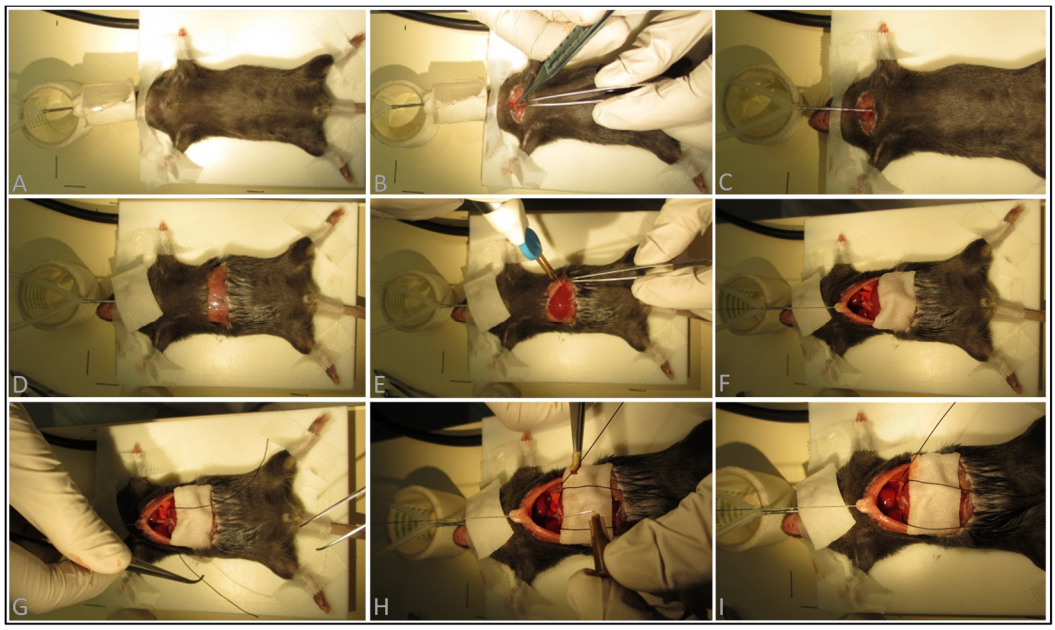


Abb. 15 Operationsprocedere der Konduktanz-Katheter-Messung mit Intubation (A-C), Eröffnung des Bauchraumes (D-F) und Katheterisierung des linken Ventrikels (G-I)

Vorlastabhängige linksventrikuläre Parameter

Zur Bestimmung der basalen, vorlastabhängigen hämodynamischen Parameter wurde der Katheter in den linken Ventrikel eingeführt und nach Prüfung des optimalen Sitzes fixiert. Nach einer adäquaten Anpassungsphase wurde die Ventilation für ca. 3 Sekunden unterbunden und die Druck-Volumen-Kurven während des Atemstillstands aufgezeichnet. Durch die kurzzeitige Apnoe lassen sich atmungsbedingte Artefakte minimieren. Für die Erhebung der Parameter wurden zwischen 20 und 30 Herzschläge/Druck-Volumen-Kurven zu Grunde gelegt und analysiert. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der analysierten Herzschläge.

Tab. 3 Mittels Konduktanz-Katheter bestimmte vorlastabhängige linksventrikuläre Parameter.

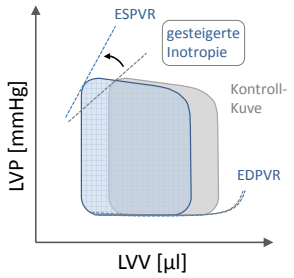
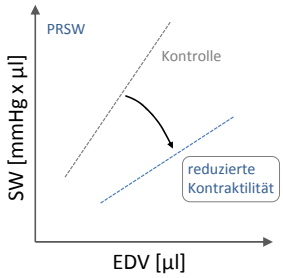
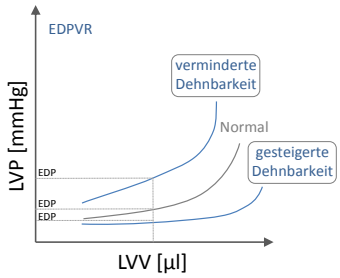
Parameter	Abkürzung [Maßeinheit]	Definition/Berechnung
global		
Herzrate *(heart rate)*	HR [min^{-1}]	gibt die Schläge des Herzens pro Minute wieder
linksventrikulärer endsystolischer Druck *(endsystolic pressure)*	ESP [mmHg]	gibt den linksventrikulären Druck am Ende der Systole an
linksventrikulärer enddiastolischer Druck (*enddiastolic pressure*)	EDP [mmHg]	gibt den linksventrikulären Druck am Ende der Diastole an
maximaler linksventrikulärer Druck *(maximum leftventricular pressure)*	P_{max} [mmHg]	vom linken Ventrikel maximal erreichter Druck
minimaler linksventrikulärer Druck (*minimum leftventricular pressure*)	P_{min} [mmHg]	vom linken Ventrikel minimal erreichter Druck
endsystolisches Volumen *(endsystolic volume)*	ESV [µl]	linksventrikuläres Volumen am Ende der Systole
enddiastolisches Volumen *(enddiastolic volume)*	EDV [µl]	linksventrikuläres Volumen am Ende der Diastole
Schlagvolumen *(stroke volume)*	SV [µl]	Anteil des in das kardiovaskuläre System abgegebenen Blutvolumens des Herzens, $SV = ESV - EDV$
Herzzeitvolumen *(cardiac output)*	CO [ml/min]	beschreibt das pro Minute in den Körperkreislauf gepumpte Blutvolumen, $CO = SV \cdot HR$

systolisch		
linksventrikuläre Ejektionsfraktion *(left ventricular ejection fraction)*	EF [%]	Anteil des in das kardiovaskuläre System abgegebenen Blutvolumens des Herzens vom Gesamtvolumen des linken Ventrikels, $EF = \frac{EDV - ESV}{EDV} \cdot 100$
linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit *(peak rate of pressure rise)*	dP/dt_{max} [mmHg/s]	Geschwindigkeit des Druckanstieges im linken Ventrikel, Parameter der Kontraktilität/Inotropie, Berechnung aus 1. Ableitung der linksventrikulären Druckkurve
linksventrikuläre Schlagarbeit *(left ventrikular stroke work)*	SW [mmHg µl]	wird von der Fläche der Druck-Volumen-Kurve repräsentiert, beschreibt die vom linken Ventrikel notwendige Kraft, um das Schlagvolumen in die Aorta zu pumpen
diastolisch		
linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit *(peak rate of pressure decline)*	dP/dt_{min} [mmHg/s]	Geschwindigkeit des Druckabfalls im linken Ventrikel, Parameter der frühen diastolischen Relaxation, Berechnung aus 1. Ableitung der linksventrikulären Druckkurve

Vorlastunabhängige linksventrikuläre Parameter

Zur Bestimmung dieser Parameter wurde die Vorlast während der Konduktanz-Katheter-Messung temporär vermindert. Hierzu wurde ein Bindfaden um die *Vena cava inferior* (untere Hohlvene) gelegt und durch Anheben des Fadens für drei Sekunden verschlossen. Durch den resultierenden Druck- und Volumenabfall entstanden verkleinerte und nach links verschobene Druck-Volumen-Kurven. Um mögliche Atemartefakte zu minimieren, wurde ebenfalls kurzzeitig (3 s) unter Apnoe gearbeitet. Zur Erhebung der vorlastunabhängigen Parameter wurden 7 - 15 Herzschläge unter Okklusion analysiert.

Tab. 4 Mittels Konduktanz-Katheter bestimmte vorlastunabhängige linksventrikuläre Parameter

Parameter	Abkürzung [Maßeinheit]	Definition/Berechnung
systolisch		
endsystolische Druck-Volumen-Beziehung *(endsystolic pressure volume relation)* 	ESPVR [mmHg/µl]	Parameter der linksventrikulären Kontraktilität, Anstieg der linearen Regression durch die endsystolsichen Druck-Volumen-Punkte
aus der Vorlast rekrutierbare Schlagarbeit *(preload recruitable stroke work)* 	PRSW [mmHg]	Anstieg der linearen Regression von Schlagarbeit und dem enddiastolischen Volumen, Parameter der myokardialen Kontraktilität
diastolisch		
enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung *(enddiastolic pressure volume relation)* 	EDPVR [mmHg/µl]	Parameter für die intrinsische linksventrikuläre Steifigkeit/Dehnbarkeit während der passiven diastolischen Füllphase, Steigung (linear) bzw. Steilheit (exponentiell) einer linearen bzw. exponentiellen Funktion durch die enddiastolischen Druck-Volumen-Punkte
isovolumetrische Relaxationskonstante *(isovolumic relaxation constant)*	Tau [ms]	Zeitraum des exponentiellen linksventrikulären Druckabfalls während der isovolumetrischen Relaxation

*Abbildungen modifiziert nach www.scisense.com.

Nach Abschluss der Messung wurde den Versuchstieren das Blut aus dem linken Ventrikel entnommen und als Serum (Zentrifugation des Vollbluts für 10 min, 3.500 rpm) bei -20 °C aufbewahrt. Weiterhin wurden Herz, Nieren, Nebennieren, Dünndarm, Dickdarm, Pankreas und Gehirn entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.5 Akuter Myokardinfarkt nach LCA-Ligatur

Zur Induktion eines akuten Myokardinfarkts wurde die Methode der Ligatur der linken Koronararterie (LCA, *Arteria coronaria sinistra*)[113] durchgeführt, bei welcher der absteigende Ast dieses Gefäßes temporär verschlossen wird. Anschließend folgen eine Reperfusionsphase und die Bestimmung myokardialer Schäden durch Behandlung mit Farbstoffen.

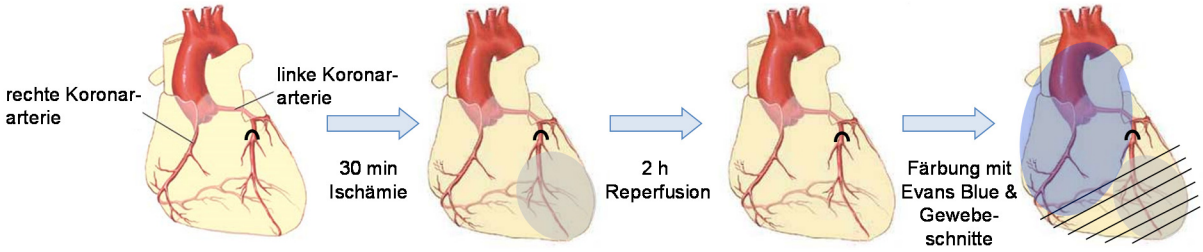


Abb. 16 Schematischer Ablauf der Induktion eines akuten Myokardinfarkts durch Ligatur der linken Koronararterie (LCA); graue Fläche: ischämischer Bereich, blaue Fläche: nicht-ischämischer Bereich (modifiziert nach http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100160_1.htm)

Narkose und Ventilation

Im Gegensatz zu den Konduktanz-Katheter-Untersuchungen wurde die Anästhesie in diesem Versuchsteil mit Natrium-Pentobarbital durchgeführt, da für Isofluran ein reduzierender Einfluss auf die Infarktgröße festgestellt werden konnte.[114,115] Zur Narkotisierung wurde den Versuchstieren initial Natrium-Pentobarbital in einer Konzentration von 70 mg/kg (bolus) intraperitoneal injiziert und während des Versuchs mit 35 mg/kg nachdosiert. Die Überprüfung und Gewährleistung der Narkosetiefe erfolgte durch Beobachtung einer verminderten Atemfrequenz und der fehlenden Reflexe auf Schmerzreize (Kneifen des Schwanzes/der Zehen). Natrium-Pentobarbital besitzt sowohl eine hypnotische, muskelrelaxierende als auch (in hohen Dosen) analgetische Wirkung. Natrium-Pentobarbital wirkt relativ stark atemdepressiv, sodass die Versuchstiere künstlich beatmet werden

mussten. Die Beatmung mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch (Beatmungsfrequenz: 110 Züge/min, Beatmungsvolumen: individuelle Anpassung auf 200 - 350 µl) fand über Intubation nach einem Trachealschnitt statt. Das Atemvolumen konnte über die gesamte Prozedur durch Anlegen eines positiven inspiratorischen Drucks (PIP) von 10 cm Wassersäule und eines positiven endexpiratorischer Drucks (PEEP) von 3 cm Wassersäule überprüft und angepasst werden. Um zu gewährleisten, dass die Versuchstiere während der Versuchsprozedur nicht auskühlen, wurde die Körpertemperatur mit Hilfe einer Wärmeplatte mit Temperatur-Kontrolleinheit über ein rektales Thermometer bei 37 °C gehalten (Abb. 17).

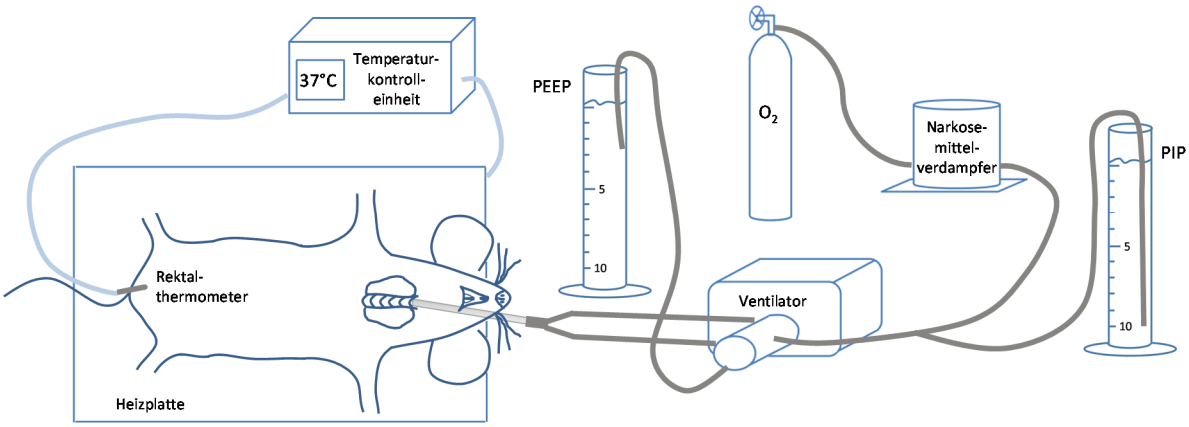


Abb. 17 schematischer Aufbau der Apparatur zur Ventilation und Temperierung

Operative Durchführung

Anschließend wurde der Brustraum eröffnet, indem Haut- und Muskelschichten transversal durchtrennt wurden. Dies erfolgte zur Vermeidung von Blutungen mit Hilfe eines Verödungsgerätes (Cauterizer). Danach wurden die Rippen durchtrennt, bis zum Herzen präpariert und der Corpus aufgespreizt. Nach Entfernung des Perikards wurde die auf dem linken Ventrikel befindliche linke Koronararterie (*left coronary artery*, LCA) mit einer 7-0 Nadel-Faden-Kombination umstochen und durch transienten Verschluss mittels Plastiktube eine Ischämiephase von 30 min eingeleitet (Abb. 16). Anschließend folgte eine zweistündige Reperfusionsphase. Während dieser Phasen wurden die Versuchstiere zur zusätzlichen Wärmeisolation mit einer Aluminiumdecke abgedeckt. Nach Beendigung der Reperfusionsphase wurde die Bauchaorta (*Aorta abdominalis*) im Bereich des Abdomens freipräpariert und durch Punktion mit einer 24G-Nadel Blut abgenommen. Anschließend wurde die Bauchaorta zwischen Diaphragma und Herz freigelegt. Über Punktion dieses Gefäßes mit einem PET-Schlauch wurde das Herz mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %

NaCl) perfundiert. Anschließend wurde die LCA permanent verschlossen und der nicht-ischämische Bereich durch Applikation eines blauen Farbstoffes (Evans Blue) angefärbt (Abb. 18).

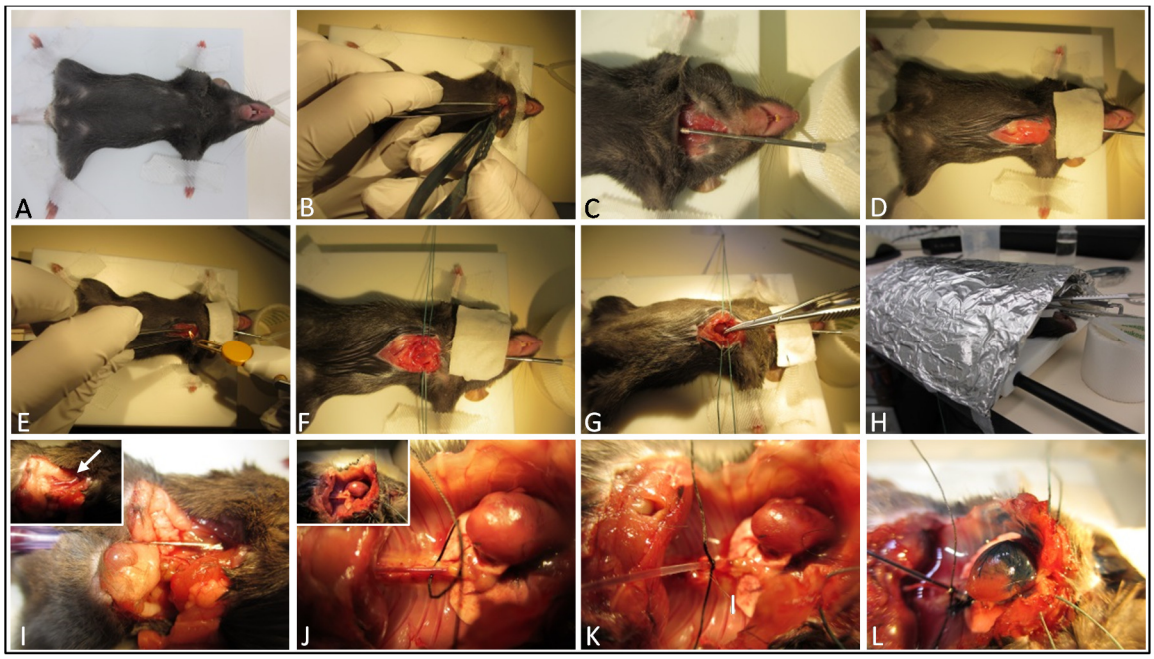


Abb. 18 Operative Durchführung eines akuten Myokardinfarkts via LCA-Ligatur und anschließender Färbung des Herzens. A-D Intubation, E-H Eröffnung des Bauchraums, Ligatur der LCA und anschließender Ischämie- und Reperfusionsphase, I-L Blutentnahme aus der Bauchaorta sowie Perfusion und Färbung des Herzens

Organaufarbeitung und Datenerhebung

Das gefärbte Herz wurde entnommen und bei -20 °C für 20 min tiefgefroren. Von der Herzspitze ausgehend wurde das Herz bis zum künstlichen Gefäßverschluss in ca. 6 Scheiben geschnitten und für 20 min bei 37 °C in 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC) inkubiert. TTC fungiert hierbei als Redoxfarbstoff und reagiert in Anwesenheit von Dehydrogenasen mit dem NADH in vitalem Gewebe. Dieses wird unter Reduktion des TTCs zum Formazan oxidiert und das vitale Gewebe erscheint entsprechend rot, nekrotisches Gewebe hingegen weiß. Zur Fixierung wurden die Herzscheiben (zwischen 2 Objektträgern) drei Tage in 4 %igem Paraformaldehyd (pH 7,2) bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurden die Herzscheiben fotografiert und die Bilder planimetrisch ausgewertet. Dabei ist die Gesamtfläche, das Risikoareal (ischämischer Bereich; nicht blau) und das Herzinfarktareal (abgestorbener Bereich; weiß) jeder Herzscheibe bestimmt worden. Durch Summation der Einzelwerte konnte das Risiko- und Herzinfarktareal für jedes Versuchstier ermittelt werden.

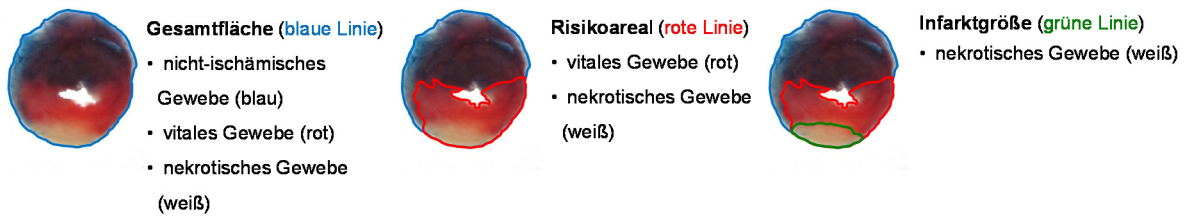


Abb. 19 Bestimmung von Gesamtfläche, Risikoareal und Infarktgröße durch planimetrische Auswertung der Herzschnitte

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde aus Schwanz- bzw. Ohrbioptaten DNA isoliert (vgl. 3.2.1.1) und anschließend mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) analysiert. Dafür wurde zunächst ein Teil des Zielgens mittels PCR amplifiziert (vgl. Tab. 5, Tab. 6) und anschließend enzymatisch gespalten. Anhand des entstehenden Bandenmusters konnte daraufhin der Genotyp bestimmt werden (vgl. Abb. 20).

3.2.1.1 DNA-Isolation

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte mit dem NucleoSpin®Tissue-Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) nach Arbeitsvorschrift des Anbieters. Dabei wurden die homogenisierten Proben zunächst durch chaotrope Salze lysiert und die Nukleinsäure an die Silica-Membran gebunden. Durch mehrere Waschschritte werden anschließend Salze, Metabolite und makromolekulare Zellkomponenten entfernt. Die Aufarbeitung fand bei Raumtemperatur statt. Die DNA wurde in Elutionspuffer aufgenommen und bis zur Konzentrationsbestimmung auf Eis aufbewahrt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.2.1.2 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) ist es möglich bereits geringe Mengen einer DNA-Sequenz *in vitro* zu vervielfältigen. Zunächst wird ein Reaktionsansatz aus DNA-Matrize (*DNA-Template*), Primer-Molekülen, Nukleotiden und der Polymerase hergestellt (PCR-Mastermix) (Tab. 5).

Tab. 5 Zusammensetzung der Genotypisierungs-PCR

Komponenten	Endkonzentration	Volumen
10x PCR-Puffer	1x	2,5 µl
50 mM $MgCl_2$	2 mM	1,0 µl
10 µM forward Primer: mOCTN2_275_for	0,4 µM	1,0 µl
10 µM reverse Primer: mOCTN2_rev_716	0,4 µM	1,0 µl
10 mM dNTPs	0,4 mM	1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)		0,5
DNA-Template	ca. 1 µg	x
Aqua dest.		18,0-x
Gesamtvolumen		25,0 µl

Anschließend werden die Proben in einem Thermocycler wiederkehrenden Zyklen aus Denaturierung, Hybridisierung (Annealing) und Elongation unterzogen (Tab. 6). Bei der Denaturierung werden die komplementären DNA-Stränge durch Erhitzung auf 94 °C aufgeschmolzen. In der folgenden Hybridisierung wird durch das Herabsetzen der Temperatur auf 67 °C eine Anlagerung der Primer gewährleistet. Diese der DNA komplementären Oligosequenzen sind Voraussetzung für die Bindung der DNA-Polymerase, welche weitere komplementäre Nukleotide anlagert. Für eine bestmögliche Verlängerung des neu entstehenden DNA-Stranges wird die Temperatur im Elongationszyklus so gewählt, dass sie der optimalen Arbeitstemperatur der eingesetzten Polymerase entspricht (hier 72 °C). Innerhalb eines Zyklus wird die Zielsequenz theoretisch verdoppelt, was zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz führt.

Tab. 6 Verwendetes PCR-Temperaturprofil mit der Taq-DNA-Polymerase

Einzelschritte	Temperatur	Zeit	Zyklus
initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	45 s	
Annealing	67 °C	30 s	2 - 36
Elongation	72 °C	90 s	
finale Elongation	72 °C	10 min	37

3.2.1.3 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Die mittels PCR amplifizierte DNA wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym Sau96I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 10 min bei 37 °C verdaut (Tab. 7). Aufgrund der Selektivität dieses Enzyms konnte nach anschließender Gelelektrophorese (2,5 % Agarose) anhand des Bandenmusters zwischen Wildtyp-Tieren, heterozygot- und homozygot-Octn2-defizienten Tieren unterschieden werden (Abb. 20).

Tab. 7 Ansatz des Restriktionsverdaus mit Sau96I

Komponenten	Endkonzentration	Volumen
10x FastDigest®Green buffer	1x	2,0 µl
FastDigest Sau96I (Cfr13I)		0,5 µl
DNA-Template (aus PCR)		6,0 µl
Aqua dest.		11,0 µl
Gesamtvolumen		20,0 µl

Verdau für 10 min bei 37 °C im Wasserbad

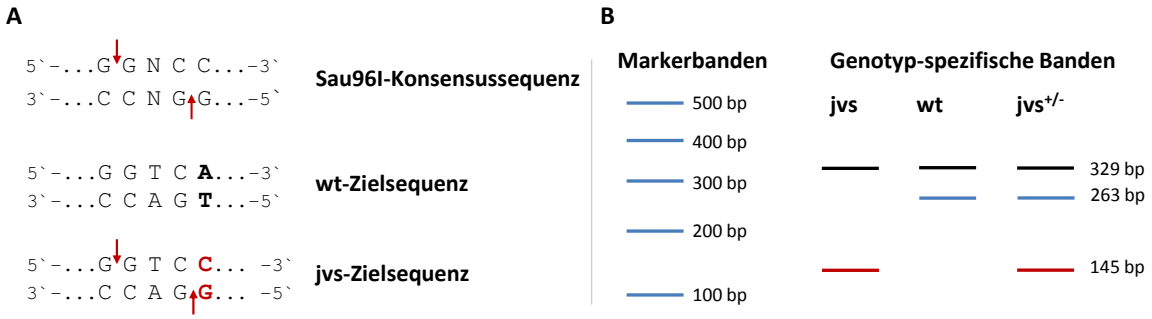


Abb. 20 A. Sau96I-Konsensussequenz und Zielsequenz von wt- und jvs-Mäusen; B. Genotyp-spezifische Bandenmuster nach PCR und Restriktion mit Sau96I

3.2.2 RNA-Isolation

Während der Organentnahme bei den Versuchstieren wurden 2-40 mg große Gewebestücke von der Spitze des Herzens (linker Ventrikel) entnommen. Für die Isolation der RNA wurden diese in einem separaten Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 350 µl Lysepuffer (RA1, RNA II Nucleo Spin, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) des RNA-Isolationskits und 3,5 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe eines Dismembrators (Mikro Dismembrator S, B. Braun, Melsungen) bei 2.500 rpm für 1,5 min homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C

gelagert. Während der Prozedur wurde permanent auf Trockeneis bzw. in flüssigem Stickstoff gearbeitet, um ein Auftauen des Gewebes zu vermeiden.

Die Aufarbeitung der RNA erfolgte bei Raumtemperatur mit dem Isolationskit NucleoSpin®Extract II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) anhand der Arbeitsvorschrift des Anbieters. Die RNA wurde in RNase-freiem Aqua dest. eluiert, bis zur Quantifizierung auf Eis und nachfolgend bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers (Nano-Drop™ 1000, PeqLab, Erlangen). Es wird ein Absorptionsspektrum im Bereich von 190 - 840 nm aufgenommen, sodass ebenfalls Lösungsmittel- und Proteinverunreinigungen detektiert werden können. Für möglichst reine RNA sollte der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} etwa 2,0 bzw. für DNA 1,8 entsprechen. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination mit Protein oder anderen Komponenten hin. Des Weiteren wird zur Beurteilung des Reinheitsgrades der Absorptionsquotient A_{260}/A_{230} herangezogen. Reine Nukleinsäuren liegen in einem Bereich von 1,8 - 2,2, wobei niedrigere Werte auf eine Kontamination der Probe mit Phenolen (z. B. aus den Isolationsreagenzien) oder Kohlenhydraten hinweisen. Zur Quantifizierung wurde jeweils 1 µl Probe aufgetragen. Zur Konzentrationsberechnung wird das Lambert-Beer-Gesetz herangezogen.

$$c = \frac{(A \cdot e)}{b}$$

Form. 3 Lambert-Beer-Gesetz: c, Nukleinsäurekonzentration in ng/µl; A, Extinktionskoeffizient in AU (absorbance units); e, Wellenlängen-abhängiger Extinktionskoeffizient in ng-cm/µl; b, Schichtdicke

Als Extinktionskoeffizient wird für doppelsträngige DNA, einzelsträngige DNA bzw. RNA 50, 33 bzw. 40 ng-cm/µl angenommen.

3.2.4 RNA-Analyse

Die Qualität der RNA wurde mit Hilfe des RNA 6.000 Nano Assay-Kits (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) untersucht. Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde auf eine *Lab-on-Chip*-Technologie zurückgegriffen. Dabei wurden je 1 µl der zu analysierenden Proben in

Kavitäten eines Nanochips eingebracht, mit Hilfe einer Kapillar-Elektrophorese der Größe nach in die einzelnen RNA-Fraktionen der rRNA, mRNA und fragmentierter RNAs aufgetrennt und deren Laufzeiten durch einen Fluoreszenzdetektor registriert. Die Konzentrationen der RNA-Proben lagen dabei im Bereich von 16 - 263 ng/µl. Aus diesen Daten wurde ein virtuelles Elektropherogramm erzeugt, welches die Größenverteilung der RNA-Fragmente darstellt und auf dessen Grundlage die Qualität der RNA beurteilt werden kann. Bei degradierter RNA ist der Gehalt der 18S- und 28S-Fragmente vermindert, deshalb wird automatisch das Verhältnis der 18S zur 28S ribosomalen Untereinheit berechnet (im Idealfall = 2). Zur Standardisierung und Beurteilung der RNA-Qualität wird weiterhin die RNA-Integritätsnummer (*RNA Integrity Number* [RIN]) herangezogen. Diese beruht auf einem Nummernsystem von 1 bis 10, wobei 1 für den maximalen und 10 für den minimalen Degradationsgrad steht.

3.2.5 cDNA-Synthese

Für Genexpressionsanalysen war es zunächst erforderlich die RNA in komplementäre DNA (cDNA) zu überführen, da RNA nicht als PCR-Template eingesetzt werden kann. Durch die reverse Transkription (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies, Darmstadt) mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) und Oligonukleotid-Primern (random Hexamers) wurde eine definierte Menge an RNA in cDNA umgeschrieben (Tab. 8, Tab. 9).

Tab. 8 Ansatz zur Synthese von cDNA

Komponenten	Endkonzentration	Volumen pro Ansatz
10x RT-Puffer	1x	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM)		4,4 µl
dNTPs (2,5 mM)		4,0 µl
Oligonukleotid-Primer:		1,0 µl
10x random Hexamers		
RNAse-Inhibitor		0,4 µl
reverseTranskriptase:		0,8 µl
Multiscribe® (50 U/µl)		
RNA (300-500 ng/µl) + Aqua dest.		7,4 µl
Gesamtvolumen		20 µl

Tab. 9 Temperaturprofil zur Synthese von cDNA

Einzelschritte	Temperatur	Zeit	Schritt
Anlagerung	25 °C	10 min	1
reverse Transkription	37 °C	60 min	2
Denaturierung	95 °C	5 min	3

3.2.6 Real-Time PCR mittels TaqMan™-Technologie

Die Grundlagen dieser quantitativen PCR-Methode beruhen auf den Prinzipien einer gewöhnlichen Polymerasekettenreaktion. Der Vorteil dieser Methodik gegenüber einer herkömmlichen PCR mit Endpunkt-Messung ist die Möglichkeit die Anzahl der gebildeten DNA-Moleküle in Echtzeit zu verfolgen. Somit wird eine Quantifizierung der Produktmenge im exponentiellen Bereich der PCR ohne vorherige, diesbezügliche Optimierung möglich. Zur Quantifizierung wird dabei eine fluorogene Sonde eingesetzt, welche bei der TaqMan-Technologie aus einem Oligonukleotid besteht. Diese ist am 5'-Ende durch kovalent Bindung mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff markiert und am 3'-Ende über einen Linker-Arm-modifiziertes Nukleotid (LAN) mit einem Quencher-Farbstoff verbunden. Zusätzlich ist das 3'-Ende mit einem Phosphatrest blockiert, um eine Elongation während der PCR Reaktion zu verhindern. Bei Anregung der intakten Sonde mit der Anregungswellenlänge des Reporterfarbstoffs wird vom diesem Licht emittiert. Befindet sich das Reporterfluorochrom in räumlicher Nähe zum Quencher wird diese Lichtemission durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Während der Polymerasekettenreaktion hybridisiert die Sonde im Bereich zwischen den Primern an den DNA-Matritzenstrang und wird in der anschließenden Elongationsphase durch die Taq-Polymerase verdrängt (Abb. 21). Durch die entstehende Y-förmige Sekundärstruktur wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert und die hybridisierte Sonde fragmentiert. Die Sonden-Hydrolyse verursacht eine räumliche Entfernung von Reporter- und Quencher-Farbstoff, was mit einer Unterbrechung des FRET einhergeht. In jedem Zyklus steigt somit sowohl die Produktmenge als auch die Fluoreszenzintensität des freigesetzten Reporterfarbstoffes.

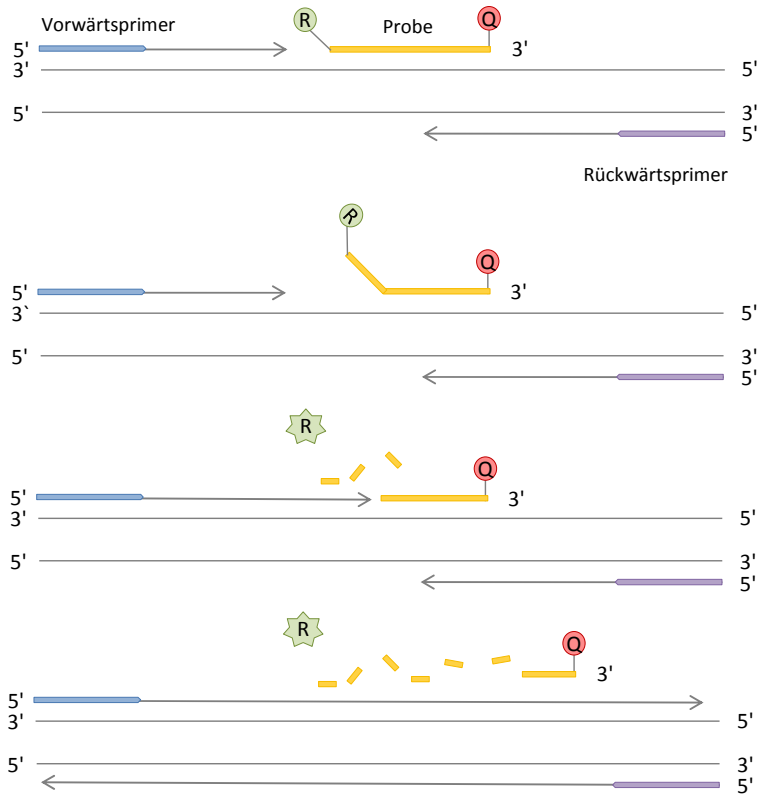


Abb. 21 Schematische Übersicht der Real-Time PCR mittels TaqMan™-Prinzip; Q: Quencher-Farbstoff, R: Reporterflurochrom

Die Quantifizierung der PCR-Produkte findet in der exponentiellen Amplifikationsphase statt. Dafür wird zum einen der Schwellenwert (*Threshold line*) berechnet, als auch der PCR-Zyklus bestimmt, in dem das Fluoreszenzsignal des Reporterfluorochroms diesen Schwellenwert erreicht (C*t-Wert, Cycle of Threshold*). Der nummerische Ct-Wert ist hierbei invers proportional zur gebildeten Menge des PCR-Produktes.

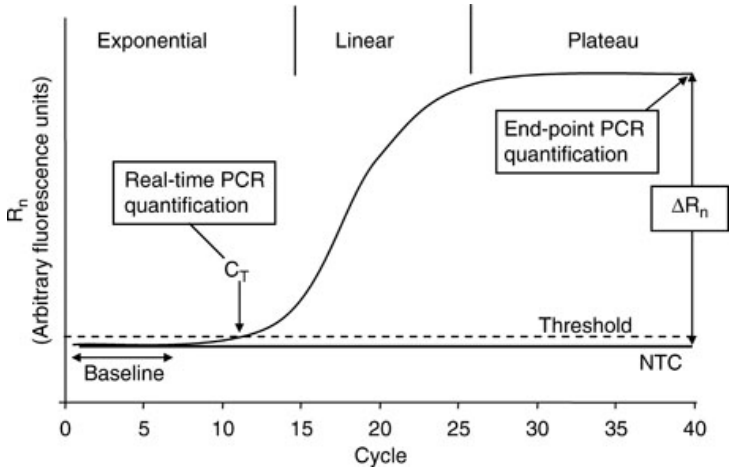


Abb. 22 Graphische Darstellung der *Real-Time PCR*-Daten als Plot des Reportersignals (R_n) gegen die PCR-Zyklen (NTC: *non template control*) (aus McKew 2010)[116]

Zur Bestimmung der Expression des zu untersuchenden Zielgens wurde in dieser Arbeit nicht die exakte Kopienzahl bestimmt (absolute Quantifizierung), sondern eine relative Quantifizierung mit Hilfe der vergleichenden Ct-Methode ($2^{-\Delta\Delta CT}$-Methode) durchgeführt. Dabei wird für eine Probe die Expression des Zielgens in Relation zu einem Referenzgen (meist ein *housekeeping*-Gen: konstitutiv exprimierte Gene wie GAPDH oder 18 S-rRNA) semiquantitativ ermittelt und anschließend im Verhältnis zu einer Kontrollprobe dargestellt. Voraussetzung für diese Methodik ist eine annähernd gleiche PCR-Effizienz für Ziel- und Referenzgen.

Für die zu untersuchende Probe A als auch für die Probe B (meist Kontrollprobe) wird dabei jeweils der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des Zielgens subtrahiert (ΔCt). Anschließend wird die Differenz (ΔCt) der Probe B von der Differenz der Probe A abgezogen (ΔΔCt) und das Ergebnis als negativer Wert (-ΔΔCt) in den Exponenten zur Basis 2 gesetzt. Als Resultat erhält man den auf das Referenzgen normalisierten Expressionsunterschied des Zielgens zweier Proben zueinander, wobei die Expression in der Kontrollprobe (Probe B) gleich 1 ist (Form. 4).

$$n\text{-}facher\ Expressionsunterschied = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \begin{matrix}[(Ct - Wert\ Zielgen - Ct - Wert\ Referenzgen)ProbeA] - \\ [(Ct - Wert\ Zielgen - Ct - Wert\ Referenzgen)Probe\ B]\end{matrix}$$

Form. 4 Berechnung des Expressionsunterschiedes zweier Proben in Relation zu einem Referenzgen (vergleichende Ct-Methode)

Für die Expressionsstudien wurden die in Tab. 10 aufgeführten Komponenten vereint und mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl je Kavität in eine 96-Well-Platte transferiert. Jede Probe wurde mindestens als Doppelbestimmung vermessen.

Tab. 10 Zusammensetzung eines Ansatzes einer Real-Time-PCR.

Komponenten	Endkonzentration	Volumen/ Einfachbestimmung
Gene Expression Mastermix 2x	1x	5 µl
Primer/Sonden Mix 10x	1x	1 µl
cDNA-Template (10 ng/µl)	10 ng/Ansatz	1 µl
Aqua dest.	-	3 µl
Gesamtvolumen		10 µl

Die Real-Time-PCR wurde mit dem in Tab. 11 aufgeführten Temperaturprotokoll durchgeführt.

Tab. 11 Temperaturprofil der Real-Time-PCR

Einzelschritte	Temperatur	Zeit	Zyklus
Uracil-N-Glycosylase-Inkubation	50 °C	1 min	1
Aktivierung der DNA-Polymerase/ initiale Denaturierung	95 °C	10 min	2
Denaturierung	95°C	15 sec	3 - 45
Annealing/Elongation	60°C	1 min	

3.2.7 Deproteinisierung und Carnitin-Assay

Um den Gehalt an Carnitin in biologischen Materialien zu bestimmen, müssen zunächst interferierende Proteine aus den Proben eliminiert werden. Während das Serum (400 µl) direkt verwendet werden konnte, wurden die kardialen Gewebeproben mit einem Gewicht von 3 - 51 mg zunächst mit Hilfe eines Dismembrators in 400 µl PBS homogenisiert (2.500 rpm, 1,5 min). Anschließend wurden alle Proben mit 100 µl eiskalter Perchlorsäure (Deproteinisierungs-Kit, BioVision, Milpitas, USA) versetzt, 5 min auf Eis inkubiert und bei 13.000 x g für 2 min zentrifugiert. 380 µl des Überstandes wurden daraufhin in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur Neutralisation der Perchlorsäure mit 20 µl eiskalter Neutralisationslösung (Deproteinisierungs-Kit, BioVision, Milpitas, USA) versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben vorsichtig zentrifugiert und konnten direkt für den L-Carnitin-Assay verwendet werden. Hier wurden jeweils 50 µl deproteinisiertes Probenvolumen eingesetzt. Während der Serum-Carnitin-Spiegel direkt bestimmt werden konnte, wurden die Ergebnisse des kardialen Carnitin-Gehalts auf die Masse der entsprechenden Gewebeprobe normalisiert. Der Assay selbst beruht auf dem Transfer einer Acetyl-Gruppe von Coenzym A (CoA) auf ungebundenes Carnitin. Das dabei frei werdende CoA ruft daraufhin unter Emission eines Fluoreszenzsignals (Ex/Em 535/587 nm) bzw. einer Absorptionsänderung (570 nm) die Oxidation der, im Assay enthaltenen, *„Oxi-Red-Probe“* hervor. Die Durchführung des L-Carnitin-Assay-Kits erfolgte entsprechend der Gebrauchsanleitung des Herstellers (BioVision, Milpitas, USA) als fluorometrischer Assay.

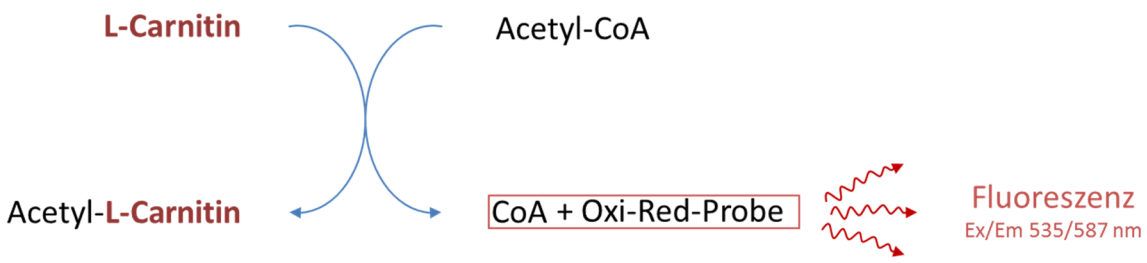


Abb. 23 Funktionsprinzip des L-Carnitin-Assay-Kits (BioVision, Milpitas, USA)

3.2.8 Enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs)

Enzyme linked immunosorbent assays ermöglichen den spezifischen Nachweis eines Antigens oder Antikörpers in einer Probe. Man unterscheidet zwischen direkten und indirekten Assays. Bei der direkten Variante werden zur Detektion im Gegensatz zur indirekten Methode ausschließlich primäre Antikörper verwendet. Alle im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten ELISAs beruhen auf einem direkten Nachweis mittels *Sandwich*-Methodik. Hierbei werden an einer Festphase (Mikrotiterplatte) gebundene Antikörper (Fangantikörper, *capture antibodies*) mit Probenvolumen versehen. Enthält die zu untersuchende Probe das Zielantigen, so bindet dieses selektiv an die Fangantikörper und bildet einen Antigen-Antikörperkomplex. In einem zweiten Schritt werden nicht gebundene Moleküle weggewaschen. Anschließend wird ein zweiter, enzymmarkierter Primärantikörper hinzugegeben, welcher ebenfalls an das Zielantigen bindet. Nach einem erneuten Waschschritt wird die Testlösung dann mit Enzymsubstrat versehen und es kommt zu einer Farbentwicklung. Nach Abstoppen der Enzymreaktion kann die Absorption der Testlösung bestimmt werden. Die detektierte Färbung ist dabei proportional zur Menge des Zielantigens in der Probe.

Mit Hilfe der ELISA-Technologie wurden kardiale Bioptate und Serumproben analysiert. Es wurde der Nachweis von kardialem Troponin I (cTnI), herzspezifischem Fettsäure-bindendem Protein (h-FABP, *heart fatty acid binding protein*) und des N-terminalen Fragments vom natriuretischen Peptid Typ B (NT-proBNP; BNP, *brain natriuretic peptide*) untersucht.

3.3 Statistik und Berechnungen

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm *GraphPad Prism 5* durchgeführt. Zur Überprüfung auf Ausreißer wurde der *Outlier calculator* (GraphPad Software, http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm) verwendet, welchem der Ausreißertest nach Grubbs zugrunde liegt. Die Analyse erfolgte Parameter-spezifisch mit einem Signifikanzlevel von 0,05. Als Ausreißer identifizierte Werte wurden sowohl bei der graphischen Darstellung als auch bei der statistischen Analyse ausgeschlossen. Aufgrund vereinzelt verstorbener Versuchstiere, sowie eines limitierten Probenvolumens des Serums konnte nicht für alle im Versuch eingeschlossenen Tiere ein kompletter Datensatz bestimmt werden. Zudem wurde ein Teil der Versuche ausschließlich mit männlichen Tieren durchgeführt. Je nach Analysemethode differieren die Endzahlen der Tiere daher. Die erhobenen Daten werden in Form von Box-Plot-Diagrammen abgebildet, in denen der Median und der Interquartilbereich vom 5.-95. Perzentil dargestellt ist. Alle im Fließtext des Ergebnisteils angegebenen Werte geben dabei den Median der jeweiligen Subgruppe wieder. Die im Einzelnen verwendeten statistischen Tests sind in den Beschriftungen der jeweiligen Abbildungen vermerkt.

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit sind in zwei Abschnitte gegliedert, die im Folgenden separat dargestellt werden. In einem Octn2-defizienten Mausmodell wurde dabei die Bedeutung einer Carnitin-Applikation bzw. der Behandlung mit einem Inhibitor der Carnitinhomöostase untersucht. Im ersten Abschnitt stand der Einfluss von Octn2 und Carnitin auf die Herzfunktion und die Ausbildung einer Kardiomyopathie im Vordergrund (vgl. 4.1), wohingegen sich der zweite Abschnitt mit dem Einfluss beider Faktoren auf das Ausmaß des Gewebeschadens bei einem Myokardinfarkt (vgl. 4.2) beschäftigte.

Für beide Teilbereiche wurden *juvenile viscerale Steatose*-Mäuse verwendet, welche speziell für die aufgeführten Tierversuchsvorhaben gezüchtet wurden. Im Rahmen der Zucht wurden die Tiere standardmäßig, anhand der Methodik des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP, 3.2.1), genotypisiert. In Abb. 24 ist exemplarisch ein Agarosegel mit dem Bandenmuster der jeweiligen Spaltprodukte dargestellt, welche eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden konnten.

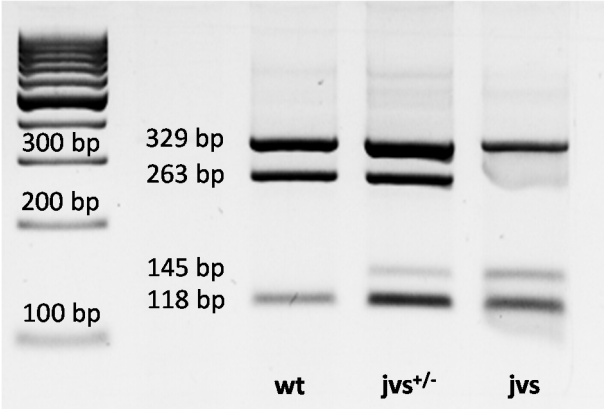


Abb. 24 Genotyp-spezifische Bandenmuster der verwendeten Mäuse nach Amplifikation und Restriktionsspaltung

Die Applikation von Carnitin ist in allen folgenden Abbildungen unterhalb des Diagramms in der Zeile „Carnitin“ mit einem „+“ gekennzeichnet. Wurde einer Gruppe die Carnitin-Applikation entzogen ist die Dauer in der Zeile „Carnitin-Karenz“ vermerkt. Umfasste der Versuch eine Mildronat-Gabe, so wurde die Zeitdauer mit und ohne Mildronat auf der Abszisse gekennzeichnet.

4.1 Untersuchungen zur Herzfunktion

4.1.1 Allgemeine Parameter

Entsprechend des Studienaufbaus wurden Tiere dreier Genotypen (wt, jvs$^{+/-}$, jvs) verwendet und mit den jeweiligen Substanzen behandelt (Tab. 1). Dabei wurden alle Tiere mit Carnitin supplementiertem Futter (1,5 % w/w) versorgt. Während je eine Gruppe pro Genotyp durchgängig dieses Futter erhielt, wurden die restlichen Tiere für definierte Zeiträume (2 - 16 Wochen) auf Standardfutter (ohne zusätzliches Carnitin) bzw. Mildronat-haltiges Futter (0,2 % w/w) umgestellt. Alle Gruppen, außer den Mildronat-behandelten Tieren, setzten sich jeweils aus weiblichen und männlichen Tieren mit einer Endzahl von 8 - 13 Tieren (Summe beider Geschlechter) zusammen (Tab. 12).

Tab. 12 Übersicht über die im Tierversuch verwendeten Gruppen

Gruppe	Substanz	Carnitin-Karenz/Mildronat-Gabe	Endzahl n (m/w)
wt	Carnitin	-	12 (7/5)
	-	16 Wo	13 (7/6)
	Mildronat	16 Wo	12 (12/0)
jvs$^{+/-}$	Carnitin	-	10 (5/5)
	-	4 Wo	11 (6/5)
	-	8 Wo	10 (5/5)
	-	12 Wo	9 (5/4)
	-	16 Wo	11 (5/6)
	Mildronat	4 Wo	9 (9/0)
	Mildronat	8 Wo	10 (10/0)
	Mildronat	12 Wo	10 (10/0)
	Mildronat	16 Wo	10 (10/0)
jvs	Carnitin	-	8 (3/5)
	-	2 Wo	10 (5/5)
	-	4 Wo	10 (5/5)

Im Rahmen der funktionellen Untersuchungen wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. In Abb. 25 sind die Körpergewichte der einzelnen Gruppen dargestellt. Zwischen den einzelnen Gruppen war weder innerhalb eines Genotyps, noch Genotyp-übergreifend ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Abb. 25A). Da es sich um eine inhomogene Gruppe aus männlichen und weiblichen Tieren handelt, wurden die Daten darüber hinaus geschlechtsspezifisch ausgewertet. Dabei zeigte sich eindeutig, dass die Männchen bezüglich des Körpergewichts in nahezu allen Gruppen signifikant schwerer waren. Eine versuchsbedingte Gewichtsveränderung zeigte sich allerdings auch geschlechtsadaptiert nicht (Abb. 25B).

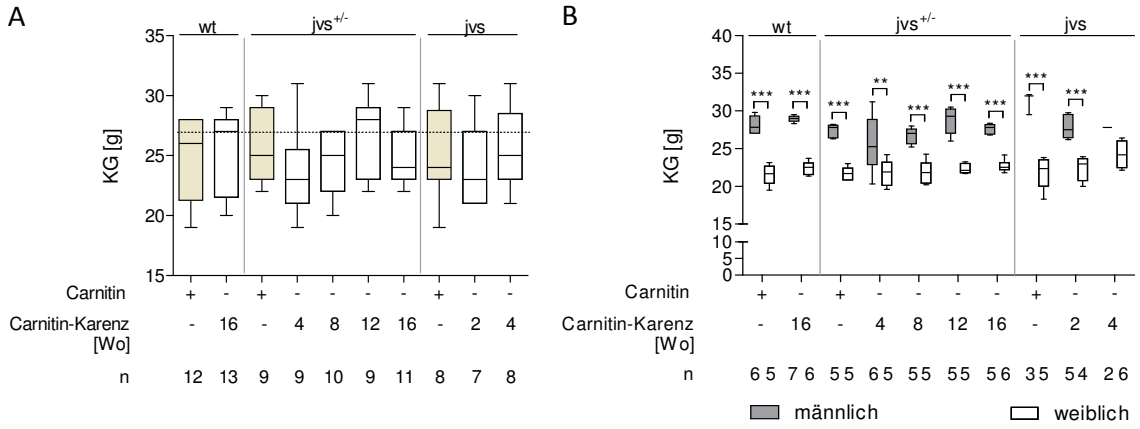


Abb. 25 Körpergewicht (KG) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen ohne (A) und mit (B) Berücksichtigung des Geschlechts der Tiere. A: One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelter Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied. B: Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Vergleich von Männchen und Weibchen: **p < 0,01, ***p < 0,001

Die Gabe von Mildronat, die nur für Männchen erfolgte, führte sowohl in Wildtyp- als auch in jvs$^{+/-}$-Tieren zu einer Erhöhung des Körpergewichts (Abb. 26). Dieser Effekt war bei den jvs$^{+/-}$ -Tieren, die über 4 und 8 Wochen Mildronat erhielten, am stärksten ausgeprägt und mit Blick auf das Endgewicht unabhängig von der Dauer der Mildronat-Behandlung.

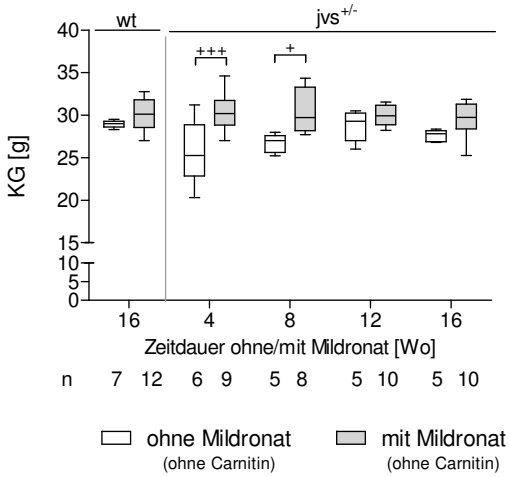


Abb. 26 Körpergewicht (KG) von Wildtypen und jvs$^{+/-}$-Tieren mit und ohne Mildronat-Gabe (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{+}$p < 0,05, $^{+++}$p < 0,001

Die Änderung des Körpergewichts hat ebenfalls eine Veränderung der Organgewichte[117], wie des Herzens[107], und damit der kardialen Volumina[109] zur Folge. Daher wurden die Volumen-Parameter bei den folgenden Auswertungen auf das Körpergewicht (KG) der Tiere normiert. Da insbesondere eine Veränderung des Herzgewichts auch pathophysiologisch bedingt sein kann, sollte neben den normierten Volumina auch die linksventrikuläre Masse (LVM) als weiterer Parameter betrachtet werden. Dafür wurden zunächst die mittels MRT bestimmten LVMs mit den durch Wiegen ermittelten Werten verglichen. Die Ergebnisse beider Methoden korrelierten hoch signifikant miteinander (Abb. 27), sodass anhand dessen die Zuverlässigkeit der MRT-basierten Datenerhebung und -analyse bestätigt werden konnte. Im Folgenden werden ausschließlich die durch Einwaage bestimmten Massen dargestellt.

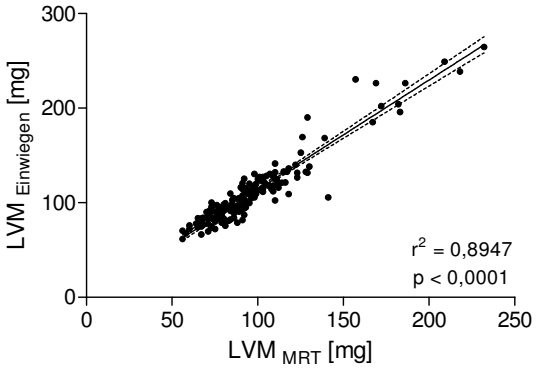


Abb. 27 Korrelationsanalyse (Pearson) der durch Einwiegen und mittels MRT bestimmten linksventrikulären Massen (LVMs)

Zur Bewertung möglicher kardialer Remodeling-Prozesse wurde im Anschluss die LVM der jeweiligen Versuchsgruppen mit dem Körpergewicht assoziiert. Insbesondere die unbehandelten jvs-Tiere hoben sich hier deutlich ab: Die LVM/KG stieg bereits nach 2-wöchigem Entzug des Carnitin-angereicherten Futters signifikant von 3,3 auf 4,4 mg/g KG an (Abb. 28A). Deutlicher wurde der Unterschied nach 4-wöchigem Entzug. Hier war eine Steigerung der LVM/KG, um mehr als das Doppelte, auf 7,8 mg/g KG zu erkennen. Für wt- und jvs$^{+/-}$-Tiere waren, unabhängig von der Carnitin-Gabe, hingegen keinerlei Unterschiede zu verzeichnen.

Eine Mildronat-Behandlung dagegen verursachte in jvs$^{+/-}$-Tieren, nach 4 und 8 Wochen Applikationsdauer, neben einem deutlich erhöhten Körpergewicht (Abb. 26), einen signifikanten Anstieg der LVM/KG um etwa 27 % (Abb. 28B).

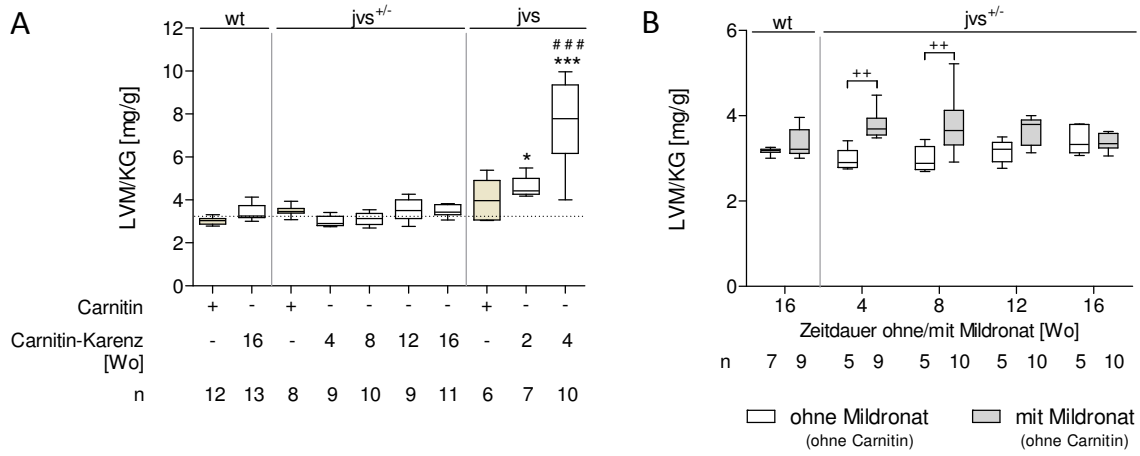


Abb. 28 Linksventrikuläre Masse bezogen auf das Körpergewicht (LVM/KG) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen nach Carnitin- (A) bzw. Mildronat-Gabe (B, ausschließlich männliche Tiere dargestellt). A: One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelter Gruppen: *p < 0,05, ***p < 0,001 (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{###}$p < 0,001 (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied. B: Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{++}$p < 0,01

4.1.2 Carnitin-Spiegel

Entsprechend der zugrunde liegenden Hypothese war der Versuchsaufbau im Wesentlichen darauf ausgelegt die Carnitin-Spiegel zu modulieren. Daher wurde zunächst die Konzentration des freien Carnitins im Serum und Herzgewebe der Tiere untersucht (3.2.7).

4.1.2.1 Einfluss von Carnitin-haltigem Futter auf die Carnitin-Spiegel in Blut und Herzgewebe

Bei der Verwendung des Carnitin-supplementierten Futters zeigten sich in allen drei Gruppen (wt, jvs$^{+/-}$, jvs) signifikant höhere Serum-Carnitin-Spiegel von 14 - 18 µmol/l. Ohne Carnitin-Applikation traten hingegen starke Genotyp-abhängige Unterschiede auf: Während der Carnitin-Spiegel im Serum der Wildtyp- und jvs$^{+/-}$-Tiere bei etwa 12 bzw. 10 µmol/l lag, ist er in den jvs-Mäusen mit 3 - 4 µmol/l deutlich geringer. Der Zeitrahmen, in dem die Tiere kein Carnitin-supplementiertes Futter erhalten haben, ist hierbei unerheblich (Abb. 29A).

Im Gegensatz zum Serum wiesen die kardialen Carnitin-Level aller drei Gruppen nach Carnitin-Gabe keinerlei Erhöhungen, sondern tendenziell sogar Verminderungen auf (Abb. 29B). Mit zunehmender Dauer des Entzugs an Carnitin-supplementiertem Futter stieg

der Gehalt an kardialem Carnitin an. Bei jvs$^{+/-}$-Tieren war der Carnitin-Spiegel nach 4, 8 und 12 Wochen um 38, 67 und 78 % angestiegen. Die Carnitin-Spiegel der jvs-Tiere lagen unabhängig von der Futtersorte deutlich unterhalb derer der wt- und jvs$^{+/-}$-Tiere.

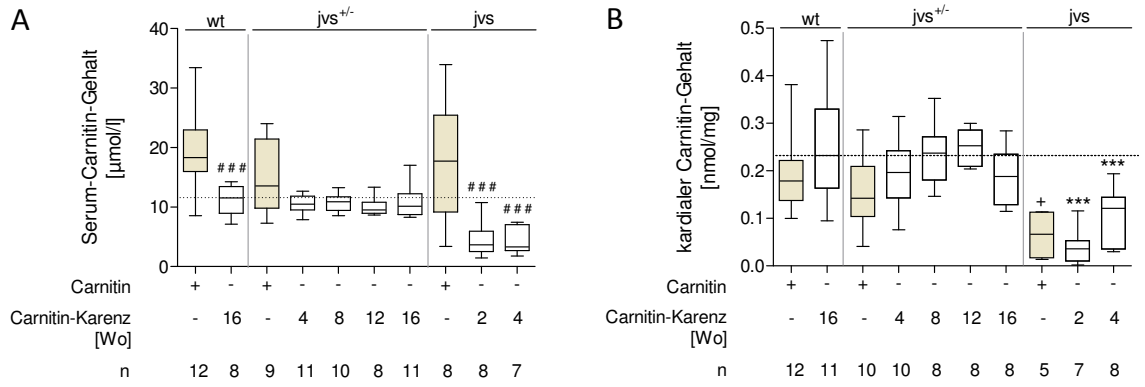


Abb. 29 Carnitin-Gehalt von Serum (A) und Herz (B) in wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen. One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: ***$p < 0{,}001$ (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{###}p < 0{,}001$ (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0{,}05$ (zur Carnitin-behandelten wt-Gruppe)

4.1.2.2 Einfluss von Mildronat auf die Carnitin-Spiegel in Blut und Herzgewebe

Der Effekt von Mildronat auf die Herz- und Serum-Carnitin-Spiegel wurde in Wildtyp- und jvs$^{+/-}$- Tieren untersucht. Der Versuchsaufbau war dabei analog zu den unbehandelten Tieren, mit dem Unterschied, dass dem Haltungsfutter Mildronat beigemischt wurde. Die Gabe von Mildronat führte in beiden Gruppen zu einem deutlichen Absinken des Carnitin-Gehalts in Serum (Abb. 30A) und Herzen (Abb. 30B). In den Wildtyp-Tieren sank der Serum-Carnitin-Spiegel bei Mildronat-Gabe von 11 auf 7 µmol/l ab, während die jvs$^{+/-}$-Tiere, abhängig von der Behandlungsdauer, einen deutlich stärkeren Effekt zeigten: Der Carnitin-Spiegel hatte nach 8 Wochen Mildronat-Behandlung mit 4 µmol/l den Talspiegel erreicht, stieg nach längerer Applikationszeit jedoch wieder leicht an.

Bezüglich der kardialen Carnitin-Spiegel reagierten die Wildtyp-Tiere am stärksten auf die Mildronat-Gabe. Der Carnitin-Gehalt fiel hierbei von 0,23 auf 0,04 nmol/mg, während er in den jvs$^{+/-}$-Tieren nur auf etwa 0,12 nmol/mg absank. Die Dauer der Behandlung zeigte hier wiederum keinen Effekt.

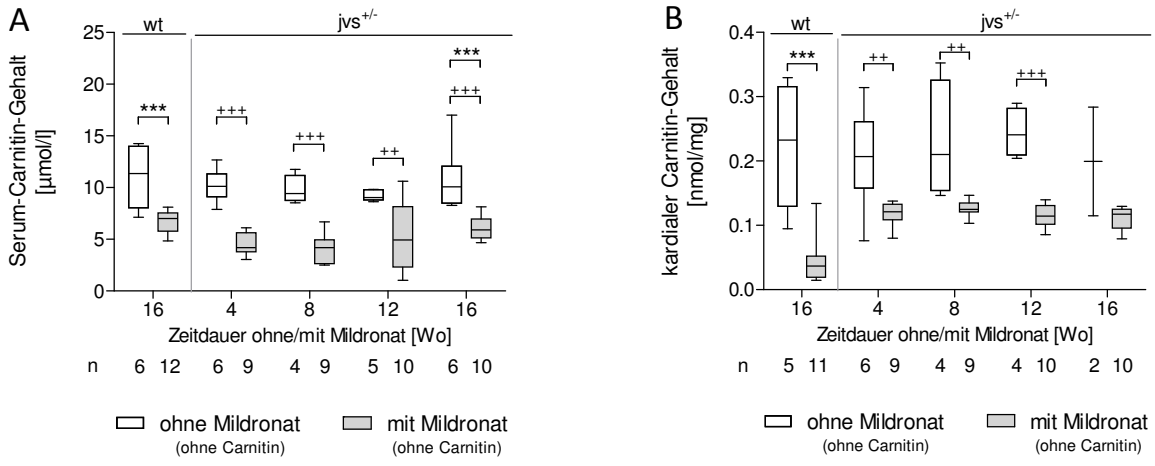


Abb. 30 Carnitin-Gehalt von Serum (A) und Herz (B) in wt- und jvs$^{+/-}$-Mäusen nach Gabe von Mildronat (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Einfluss des Genotyps (wt (16 Wo) vs. jvs$^{+/-}$ (16 Wo)): ***$p < 0{,}001$; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{++}p < 0{,}01$, $^{+++}p < 0{,}001$

4.1.3 MRT- und Konduktanz-Daten

Zur hämodynamischen Charakterisierung von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren wurden deren linksventrikulären Funktionsparameter mittels Kleintier-MRT und Konduktanz-Katheter bestimmt (vgl. 3.1.4.2). Das MRT lieferte dabei vor allem Volumen-basierte Parameter, sowie Informationen über das Gewicht, den Durchmesser und die Länge des linken Ventrikels (Tab. 15), während die anschließende Katheterisierung des linken Ventrikels zusätzlich auch Druck-basierte Größen erfasste (Tab. 16, Tab. 17). Dem entsprechend werden im Folgenden MRT-basierte Volumen und Größenparameter sowie Konduktanz-basierte Druckparameter abgebildet.

4.1.3.1 Einfluss von Carnitin-haltigem Futter auf die Herzfunktion

Um zu überprüfen welchen Einfluss eine Carnitin-Applikation auf die Herzfunktion besitzt, wurden sowohl Wildtyp- als auch hetero- und homozygote jvs-Mäuse dem Studiendesign entsprechend mit und ohne Carnitin-Futter versorgt. Die kardialen Volumina der Versuchstiere wurden zum einen als enddiastolisches Volumen (EDV) am Ende der Füllphase und zum anderen als endsystolisches Volumen (ESV) am Ende der Auswurfphase des linken Ventrikels bestimmt. Weder das Körpergewicht-normierte EDV, noch ESV (Tab. 15) unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen, sodass auch das Körpergewicht-normierte Schlagvolumen (SV) unverändert blieb (Abb. 31A). Durch Normierung des

Schlagvolumens auf die linksventrikuläre Masse (SV/LVM) konnte man bei unsupplementierten jvs-Tieren hingegen eine deutliche Reduktion beobachten (Abb. 31B)

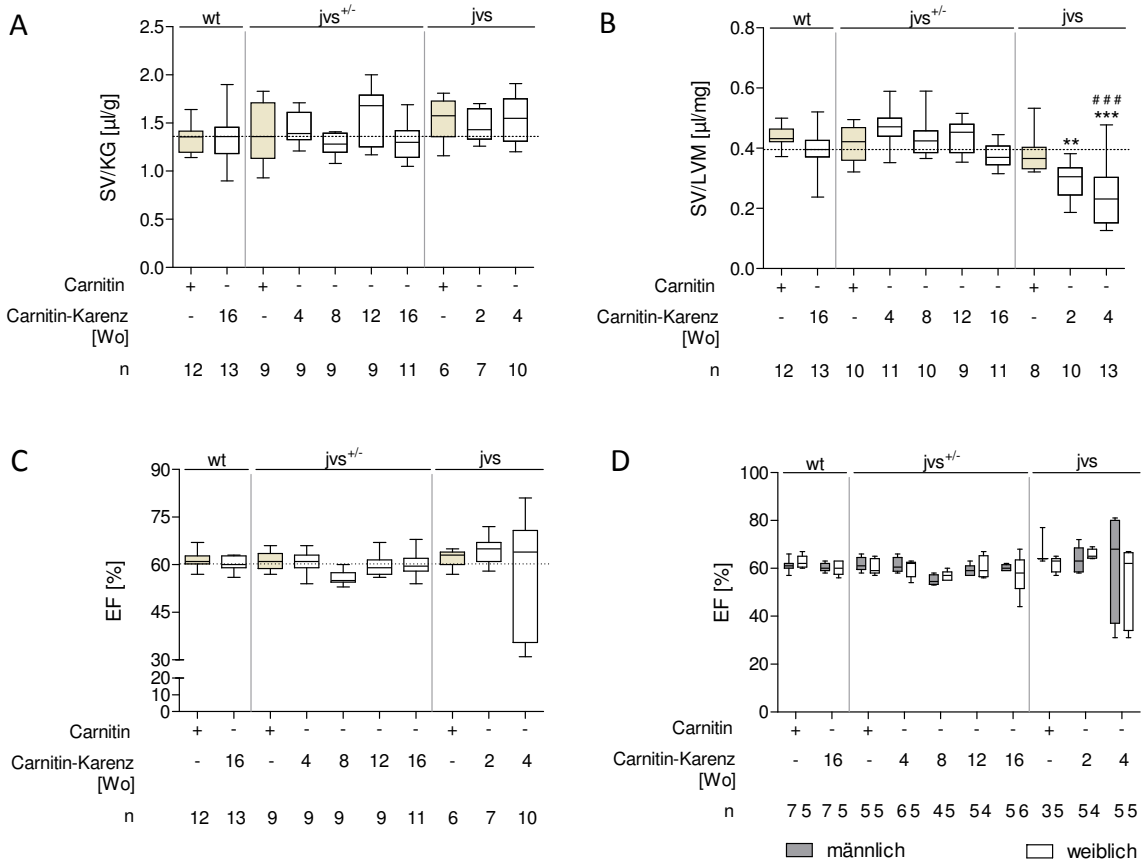


Abb. 31 Schlagvolumen/Körpergewicht (SV/KG, A), Schlagvolumen/linksventrikuläre Masse (SV/LVM, B) und Ejektionsfraktion (EF, C) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren. A-C: One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: **$p < 0{,}01$, ***$p < 0{,}001$ (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{###}p < 0{,}001$ (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied. D: Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Vergleich von Männchen und Weibchen: kein signifikanter Unterschied

Als weiterer funktioneller Parameter für die Herzleistung wurde die Ejektionsfraktion (EF) bestimmt, welche den Anteil des ausgeworfenen Volumens (SV) vom Gesamtvolumen (EDV) des linken Ventrikels wiedergibt. Die EF war in nahezu allen Gruppen unverändert (Abb. 31C). Jvs$^{+/-}$-Tiere, welchen für acht Wochen das supplementierte Carnitin-Futter entzogen wurde, zeigten eine leichte Verminderung dieses Parameters um 5 % im Vergleich zur nativen Kontrollgruppe (wt ohne Carnitin). Auffällig ist, dass die Ejektionsfraktion bei jvs-Tieren nach vier Wochen ohne Substitution sehr stark streute (min: 31 %, max: 81 %). Zur weiteren Analyse wurden die Daten daraufhin geschlechtsspezifisch ausgewertet, wobei sich

jedoch keinerlei signifikante geschlechtsbedingte Unterschiede zeigten. Bis auf die unbehandelte jvs-Subgruppe zeigten alle anderen Tiere EFs im physiologischen Bereich (min: 53 %, max: 72 %). Bei der Gegenüberstellung der MRT- und Konduktanz-Katheter-basierten Datensätze zeigte sich dabei ausschließlich in den jvs-Gruppen eine signifikante Korrelation (Abb. 32A). Aus Abb. 32B geht weiterhin deutlich hervor, dass der zuvor beschriebene Anstieg der LVM/KG dieser Tiere (Abb. 28) negativ mit der EF korrelierte.

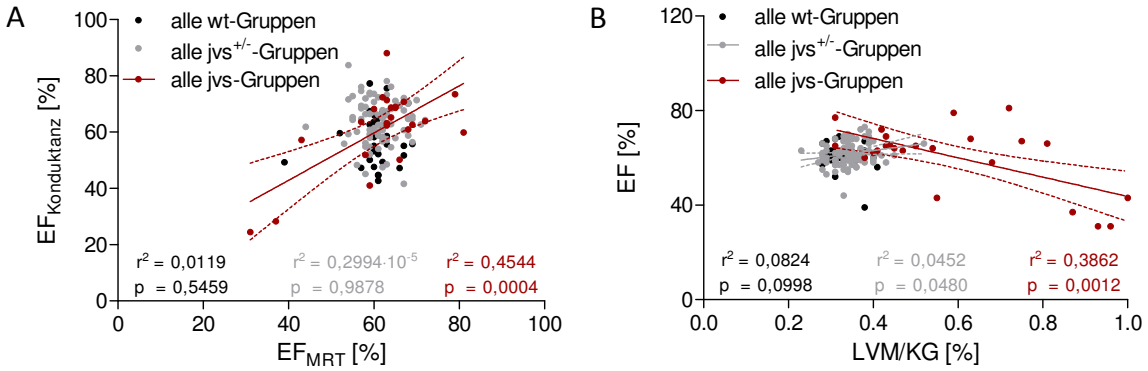


Abb. 32 Korrelation (Pearson) der (A) mittels MRT und Konduktanz-Katheter erhaltenen Ejektionsfraktion (EF) und (B) der linksventrikulären Masse pro Körpergewicht (LVM/KG) mit der EF.

Zur Bewertung möglicher kardialer Umbauprozesse (kardiales Remodeling) kann der linksventrikuläre Remodeling-Index (LVRI) herangezogen werden. Dieser gibt die Masse des linken Ventrikels (LVM) bezogen auf das enddiastolische Volumen (EDV) wieder[118] und setzt damit Herzgewicht und Herzfunktion in Beziehung zueinander. Der LVRI von Wildtypen und jvs$^{+/-}$-Tieren lag in etwa auf dem gleichen Niveau, wobei für 4 - 12 Wochen unbehandelte jvs$^{+/-}$-Gruppen durch einen tendenziell niedrigeren Wert gekennzeichnet waren. Im Gegensatz zu den jvs$^{+/-}$-Tieren hatte die ausbleibende Carnitin-Gabe bei jvs-Mäusen wesentlich stärkere Effekte: Gegenüber unbehandelten Wildtypen stieg LVRI nach 2 Wochen signifikant um das 1,4-Fache und nach 4 Wochen um das 1,8-Fache an (Abb. 33).

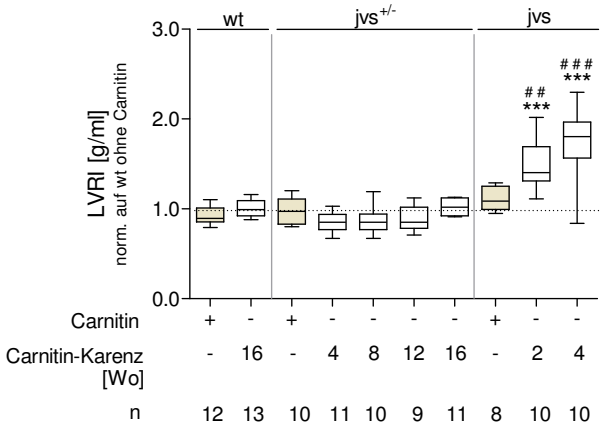


Abb. 33 Linksventrikulärer Remodeling-Index (LVRI) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen. One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: ***p < 0,001 (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{##}$p < 0,01 , $^{###}$p < 0,001 (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelter Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied

Des Weiteren wurden sowohl Längen als auch Durchmesser in der Endsystole (ESL, ESD) und Diastole (EDL, EDD) bestimmt. Hinsichtlich der Durchmesser zeigten alle hier untersuchten Gruppen keinerlei Unterschiede zueinander (Daten nicht dargestellt, vgl. Anhang, Tab. 15).

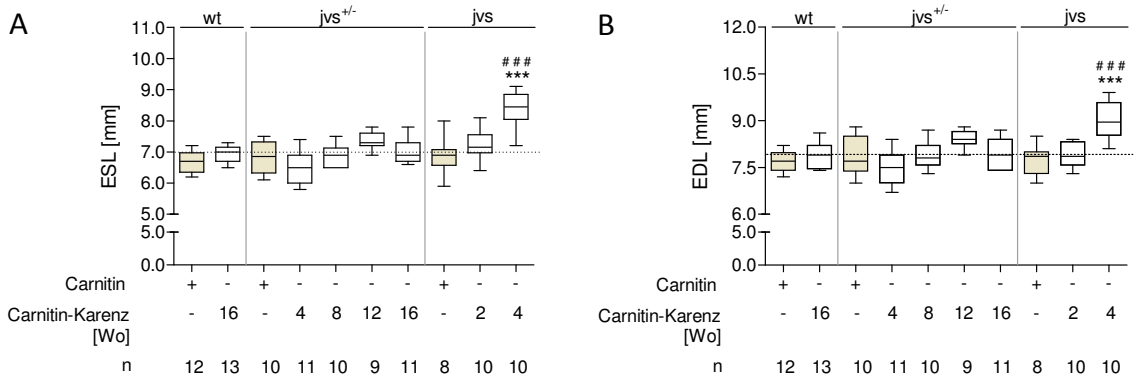


Abb. 34 Endsystolische und enddiastolische Längen (ESL, A; EDL, B) des linken Ventrikels. One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: ***p < 0,001 (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{###}$p < 0,001 (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied

Die Längen waren für die wt-Gruppen ebenfalls nahezu gleichbleibend (Abb. 34). Die jvs$^{+/-}$-Gruppe hingegen zeigte für diese Parameter bei einer fehlenden Carnitin-Applikation über vier Wochen zunächst eine leichte Abnahme. Im weiteren Verlauf sah man für ESL und EDL tendenziell eine zeitabhängige Zunahme, die jedoch bei längerer Carnitin-Karenz

(16 Wochen) nicht mehr zu beobachten war (Abb. 34A, B). Wesentlich deutlichere Veränderungen zeigten jvs-Tiere, bei denen ESL und EDL nach 4 Wochen ohne Carnitin-Gabe signifikant um 21 bzw. 13 % anstieg.

Neben den Volumen-basierten Daten und den vermessenen Größen konnten mit Hilfe der Konduktanz-Methodik zusätzlich Druck-basierte Parameter erhoben werden. Die Ermittlung der Konduktanz-Daten erfolgte fünf Tage nach der MRT-Untersuchung.

Globale Parameter

Als globale Funktionsparameter wurden der endsystolische und enddiastolische Druck (ESP; EDP) im linken Ventrikel bestimmt (Abb. 35). Die wt- und jvs$^{+/-}$-Gruppen zeigten hier keine Auffälligkeiten. Die Druckverhältnisse bewegten sich am Ende der Systole bzw. Diastole zwischen 82 - 88 mmHg bzw. 4 - 7 mmHg. Bei jvs-Tieren hingegen sanken ESP und EDP nach 4-wöchigem Entzug des angereicherten Futters auf 70,5 mmHg (-21 %) und 3,3 mmHg (-29 %).

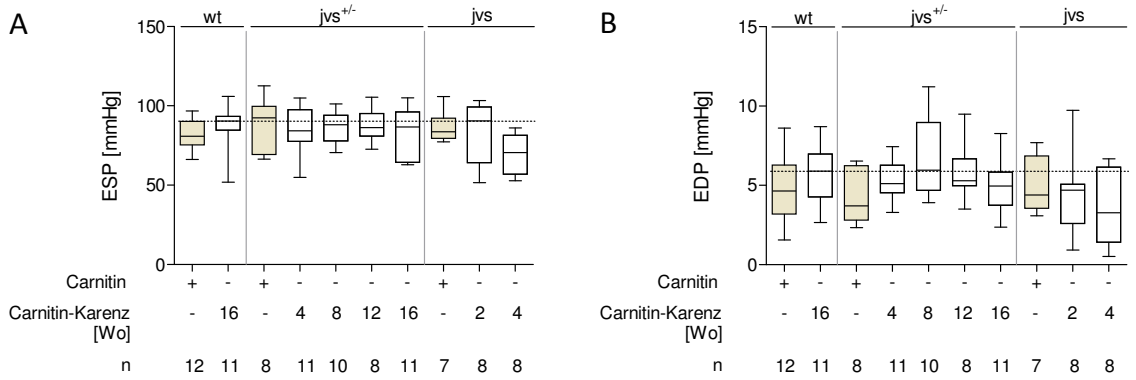


Abb. 35 Endsystolischer (A) und enddiastolischer (B) Druck von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren. One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied

Systolische Parameter

Zur Beurteilung der systolischen Herzfunktion und Kontraktilität wurden insbesondere Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}), endsystolische Druck-Volumen-Relation (ESPVR) und die aus der Vorlast rekrutierbare Schlagarbeit (PRSW) herangezogen. Die Druckanstiegsgeschwindigkeit sank bei Wildtyp-Tieren durch Carnitin-Applikation deutlich von 10.505 mmHg/min auf 7.020 mmHg/min, was einer Reduktion um 65 % entspricht (Abb. 36A). Ähnliche Veränderungen waren ebenfalls für ESPVR und PRSW (Abb. 36B, C) erkennbar. Bei $jvs^{+/-}$-Mäusen war dieser Effekt hingegen nicht zu beobachten. Jvs-Mäuse zeigten hinsichtlich der Kontraktilität gegenteilige Resultate: Nach 4 Wochen ohne Carnitin-Gabe war sowohl dP/dt_{max} als auch ESPVR um ca. die Hälfte vermindert.

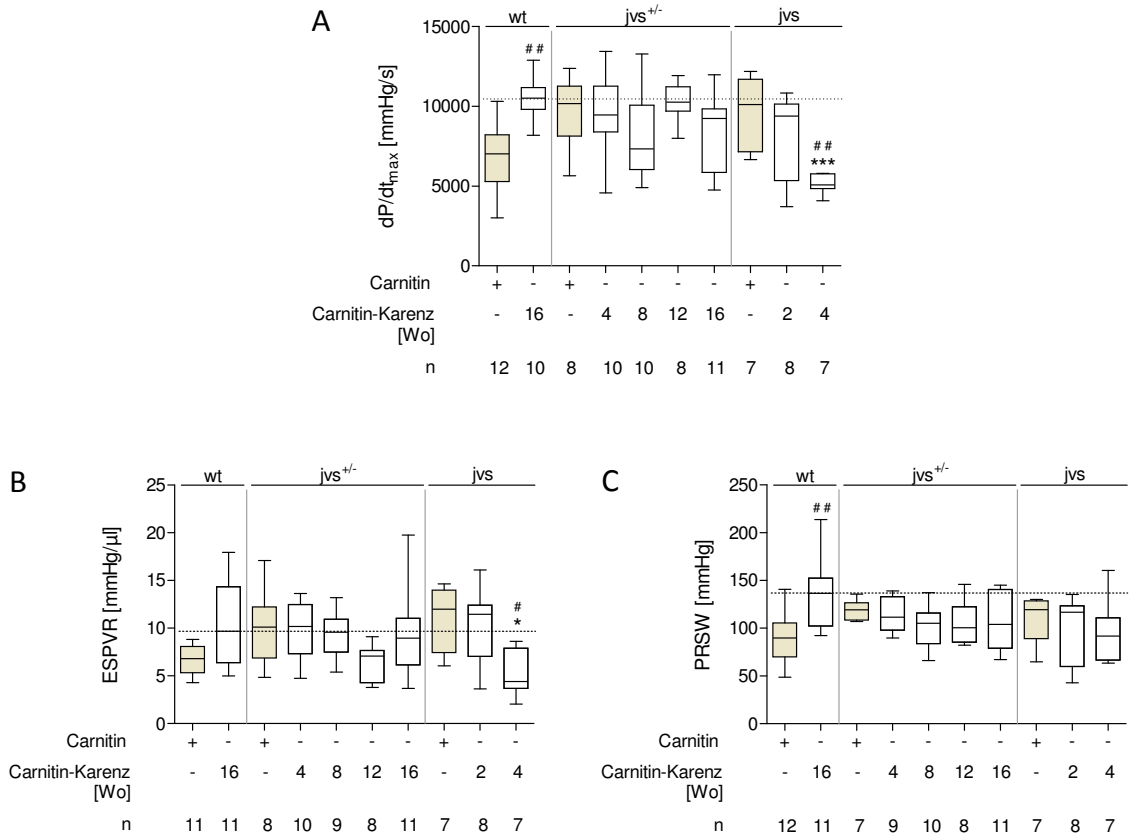


Abb. 36 Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}, A), endsystolische Druck-Volumen-Relation (ESPVR, B) und aus der Vorlast rekrutierbare Schlagarbeit (PRSW, C) als Parameter der systolischen Herzfunktion. One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: $^{*}p < 0{,}05$, $^{***}p < 0{,}001$ (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#}p < 0{,}05$, $^{\#\#}p < 0{,}01$ (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied

Diastolische Parameter

Bei Carnitin-behandelten Wildtyp-Tieren zeigte sich hier ein eher geringfügiger Effekt. Während für dP/dt_{min} (Abb. 37A) eine signifikante Erhöhung zu verzeichnen war, blieben die enddiastolische Druck-Volumen-Relation (EDPVR) und Tau Glantz (Relaxationszeit) (Abb. 37B, C) unverändert. Gegenüber den nativen Wildtypen wiesen $jvs^{+/-}$-Tiere nach Carnitin-Gabe einen erhöhten Anstieg der EDPVR auf, welcher im zeitlichen Verlauf ohne zusätzliches Carnitin (bis 12 Wochen) wieder auf wt-Niveau abfiel. Blieben die $jvs^{+/-}$-Tiere jedoch gänzlich unbehandelt, lag eine deutlich erhöhte Steifigkeit vor. Tau Glantz blieb sowohl bei Wildtypen als auch bei $jvs^{+/-}$-Tieren mit und ohne Carnitin-Zusatz unverändert (Abb. 37C). Im Vergleich zu nativen Wildtypen lagen für jvs-Mäuse insbesondere nach 4 Wochen fehlender Substitution signifikant erhöhte Werte für dP/dt_{min} und Tau Glantz vor.

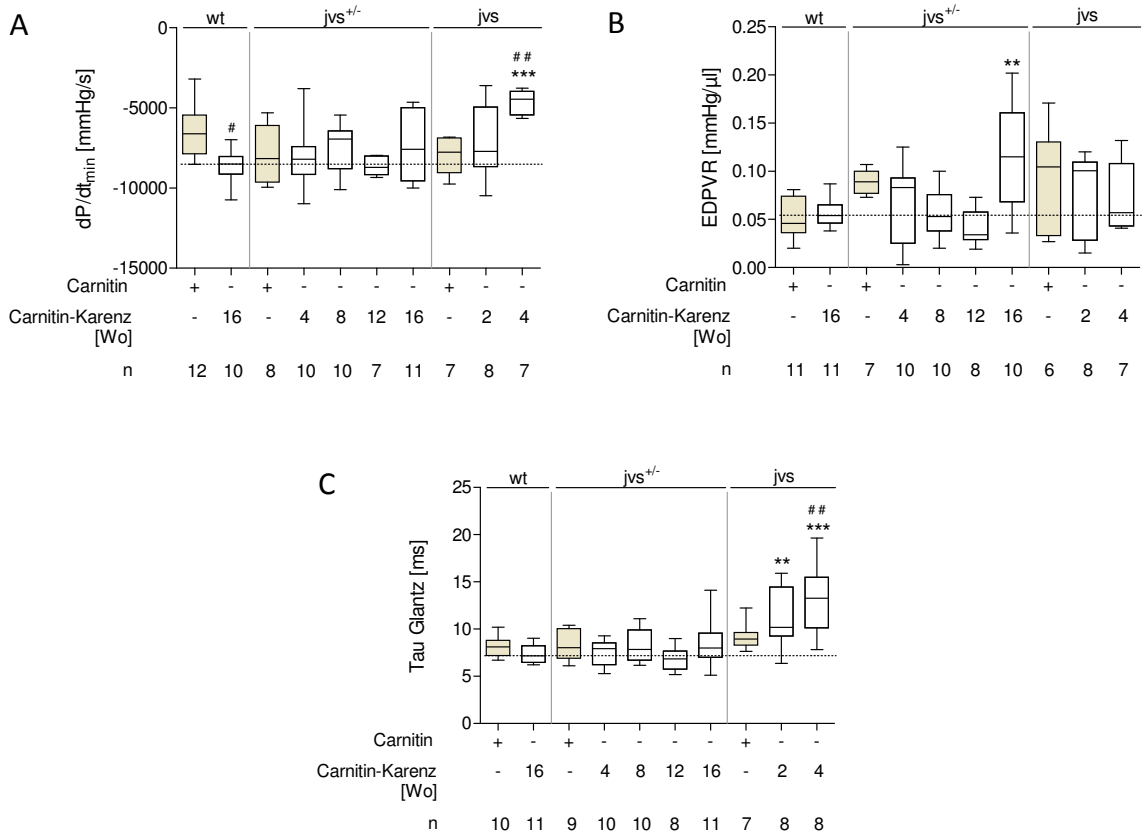


Abb. 37 Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}, A), enddiastolische Druck-Volumen-Relation (EDPVR, B) und Tau Glantz (C) als Parameter der diastolischen Herzfunktion. One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: $^{**}p < 0{,}01$, $^{***}p < 0{,}001$ (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss de Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#}p < 0{,}05$, $^{\#\#}p < 0{,}01$ (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied

4.1.3.2 Einfluss von Mildronat-haltigem Futter auf die Herzfunktion

Neben den hämodynamischen Effekten einer Carnitin-Applikation, sollte auch der Einfluss einer pharmakologischen Carnitin-Karenz untersucht werden. Hierzu wurde Mildronat, ein Hemmstoff der Carnitin-Synthese und des Carnitin-Transports, verwendet.[119] Die Versuchstiere wurden dafür analog zum vorherigen Versuch initial mit Carnitin-Futter versorgt. Anschließend wurde das zusätzliche Carnitin entzogen und durch Mildronat-haltiges Futter ersetzt (vgl. 3.1.3.1, Abb. 7, Tab. 1). Da ausschließlich männliche Tiere mit Mildronat versorgt wurden, sind im Folgenden auch nur die Männchen der entsprechenden Kontrollgruppen dargestellt.

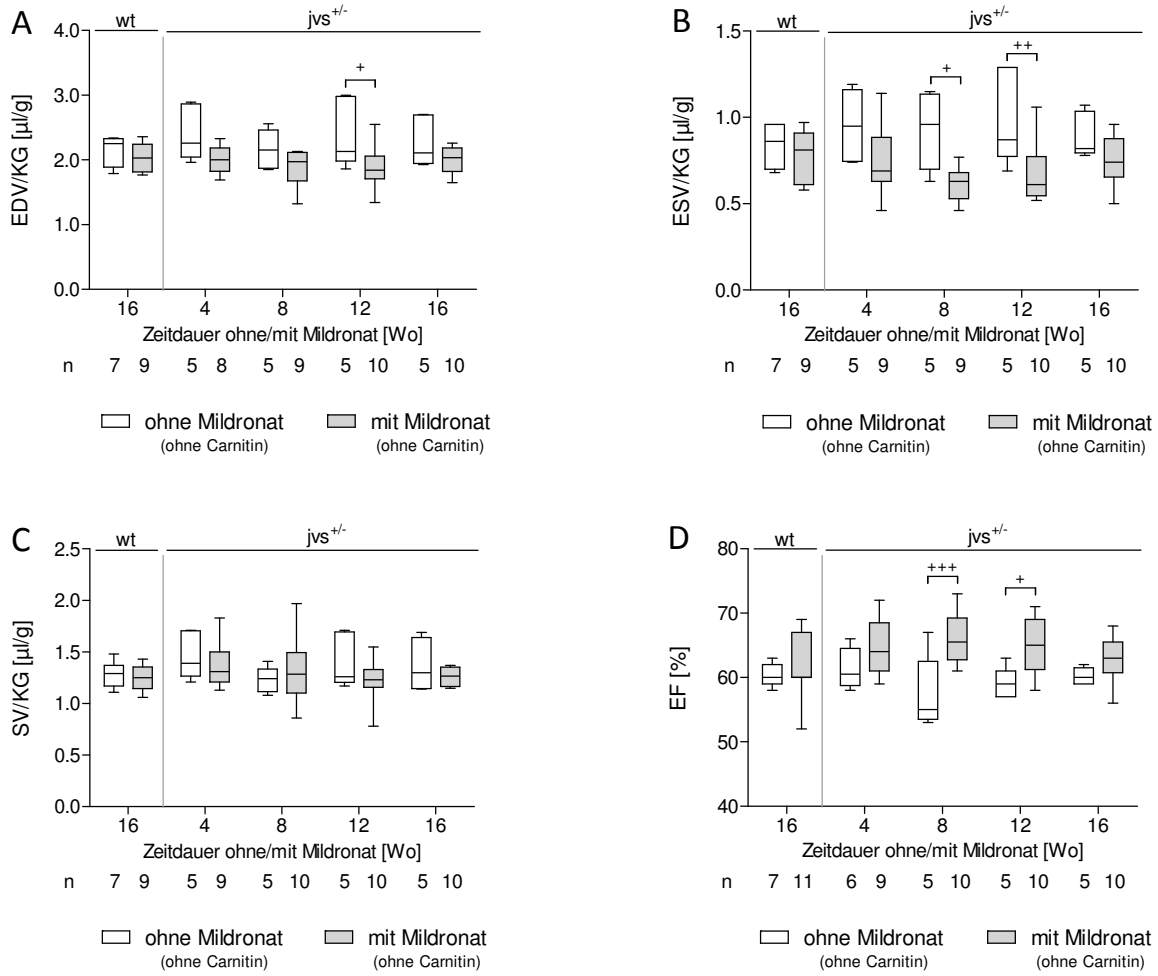


Abb. 38 Kardiale Funktionsparameter von Wildtypen und jvs$^{+/-}$-Mäusen nach Mildronat-Gabe. Enddiastolisches Volumen/Körpergewicht (EDV/KG, A), endsystolisches Volumen/Körpergewicht (ESV/KG, B), Schlagvolumen/Körpergewicht (SV/KG, C), Ejektionsfraktion (EF, D) (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{+}p < 0{,}05$, $^{++}p < 0{,}01$, $^{+++}p < 0{,}001$

Während EDV/KG bei Mildronat-Gabe für wt- und jvs$^{+/-}$-Tiere nur leicht fiel, sank ESV/KG behandelter jvs$^{+/-}$-Mäuse deutlich ab (Abb. 38A, B). Der Effekt war dabei nach 8 und 12 Wochen Behandlungsdauer am stärksten ausgeprägt. Die EF der jvs$^{+/-}$-Tiere stieg durch Gabe des OCTN2-Inhibitors in diesem Zeitraum daher ebenfalls signifikant um 15 bzw. 10 % an (Abb. 38D). SV/KG blieb hingegen, unabhängig von der Substanz-Gabe, für alle Tier-Gruppen in etwa gleich.

Aufgrund der Mildronat-bedingten Veränderungen von LVM und EDV zeigte sich bei jvs$^{+/-}$-Tieren für LVRI eine deutliche Zunahme nach 4 - 12 Wochen Behandlungsdauer (Abb. 39). Während hierbei ein Anstieg von bis zu 53 % (12 Wochen) erkennbar war, rief die maximale Applikationsdauer des Mildronats (16 Wochen) bei jvs$^{+/-}$-Mäusen und auch bei Wildtypen kaum erkennbare Effekte hervor.

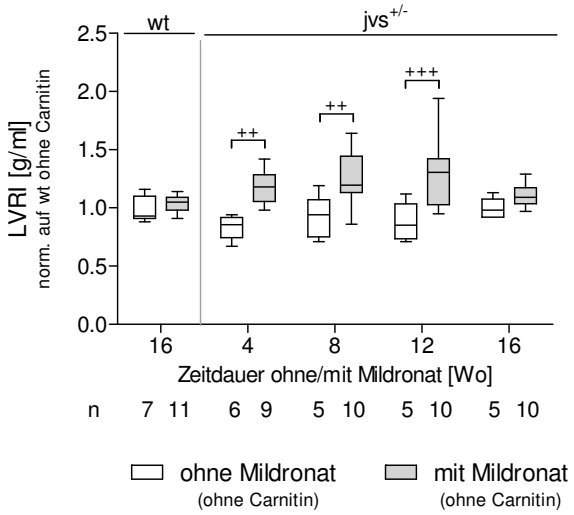


Abb. 39 Linksventrikulärer Remodeling-Index (LVRI) von Wildtypen und jvs$^{+/-}$-Mäusen nach Mildronat-Gabe (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{++}p < 0{,}01$, $^{+++}p < 0{,}001$

Eine Veränderung von ESL und EDL konnte für Wildtyp-Tiere unter Mildronat-Behandlung nicht beobachtet werden. Bei jvs$^{+/-}$-Tieren konnte das Absinken beider Größenparameter nach 4-wöchiger Carnitin-Karenz jedoch durch Mildronat-Gabe revertiert werden. Da bei fehlender Carnitin-Applikation für mehr als 4 Wochen kaum eine Reduktion von ESL und EDL auftrat, war der revertierende Mildronat-Effekt bei längerer Behandlung ebenfalls nicht

mehr zu beobachten. Die Werte lagen dann in etwa auf dem Niveau der Tiere ohne Carnitin-Behandlung.

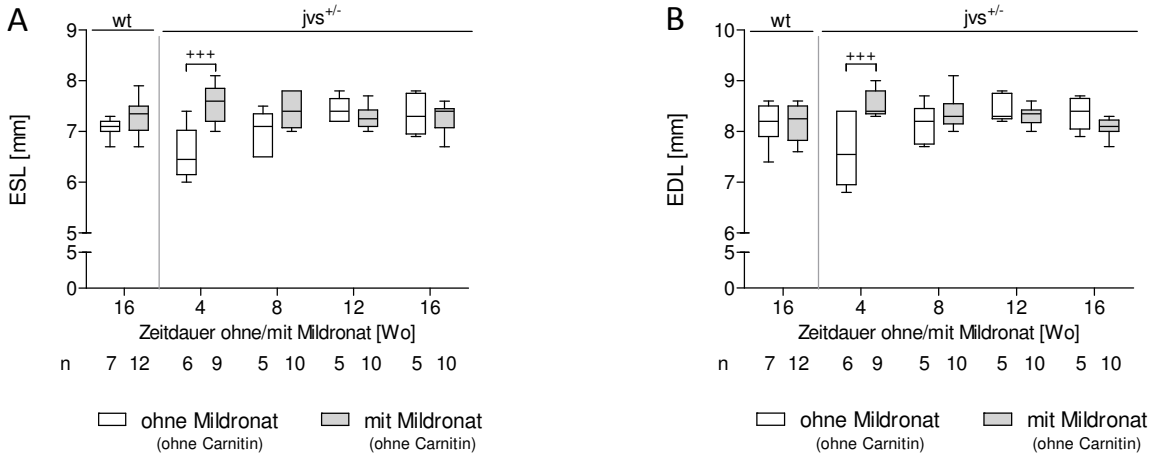


Abb. 40 Kardiale Funktionsparameter von Wildtypen und jvs$^{+/-}$-Mäusen mit und ohne Mildronat-Gabe (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Länge des linken Ventrikels am Ende der Systole (ESL, A) und der Diastole (EDL, B). Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): $^{+++}p < 0{,}001$

Globale Parameter

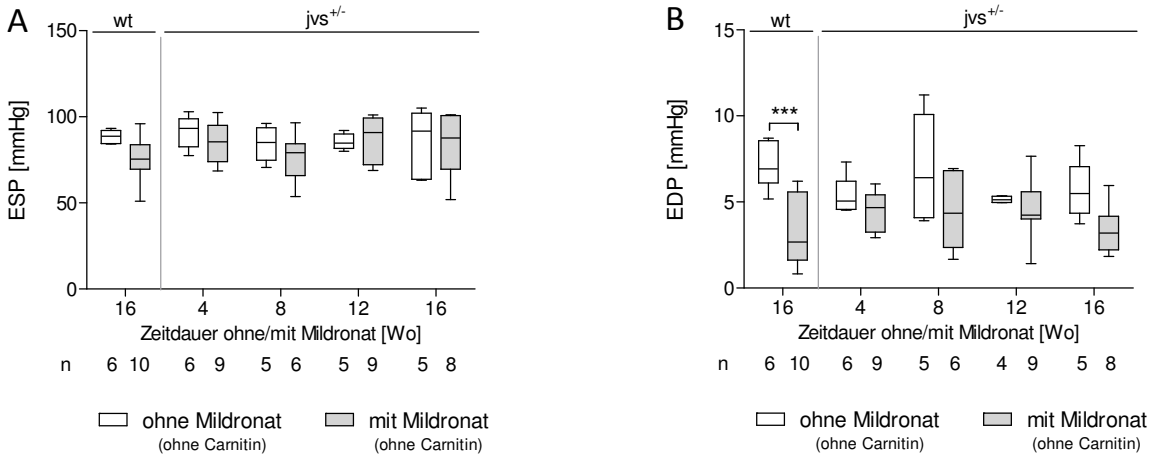


Abb. 41 Endsystolischer (A) und enddiastolischer (B) Druck von wt- und jvs$^{+/-}$-Tieren mit und ohne Mildronat-Behandlung (ausschließlich männliche Tiere dargestellt). Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): $^{***}p < 0{,}001$; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): kein signifikanter Unterschied

Während für Mildronat-behandelte Wildtypen hinsichtlich der endsystolischen Druckverhältnisse nur ein leichter Rückgang zu beobachten war, stellte sich die Wirkung auf

den diastolischen Druck wesentlich prägnanter dar. EDP war in dieser Gruppe signifikant um 55 % vermindert und sank bei jvs$^{+/-}$-Tieren mit 8- bis 16-wöchiger Mildronat-Behandlung ebenfalls tendenziell ab.

Systolische und diastolische Parameter

Durch eine Behandlung mit Mildronat waren sowohl bezüglich der systolischen Parameter (EF, dP/dt$_{max}$, SW, ESPVR und PRSW) als auch der diastolischen Parameter (dP/dt$_{min}$, EDPVR und Tau) keine signifikanten Veränderungen zu unbehandelten Tieren festzustellen (vgl. Anhang, Tab. 16 und Tab. 17).

4.1.4 NT-proBNP-Assay

Hinsichtlich des NT-proBNP-Assays (prognostischer Biomarker für eine kardiale Dysfunktion) waren lediglich für wt-Tiere, welche mit Carnitin- bzw. Mildronat-angereichertem Futter gehalten wurden, signifikante Unterschiede zu erkennen. Mit der Zufütterung von Carnitin bzw. Mildronat sank der NT-proBNP-Gehalt im Serum um 58 % bzw. 78 % ab.

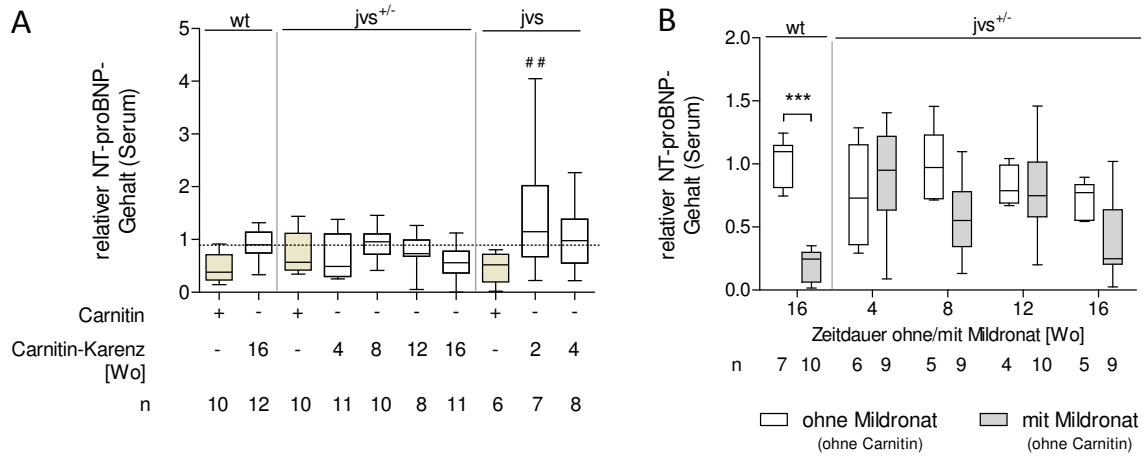


Abb. 42 Relativer NT-proBNP-Gehalt (normiert auf unbehandelte wt-Tiere) von wt, jvs$^{+/-}$- und jvs-Mäusen nach Carnitin- (A) und Mildronat-Gabe (B, ausschließlich männliche Tiere dargestellt). A: One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Karenz (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{##}p < 0{,}01$ (zur Carnitin-behandelten Gruppe); Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied. B: Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Einfluss des Genotyps (wt [16 Wo] vs. jvs$^{+/-}$ [16 Wo]): $***p < 0{,}001$; Einfluss der Behandlungsdauer (Vergleich zwischen den einzelnen jvs$^{+/-}$-Gruppen): kein signifikanter Unterschied

4.1.5 Genexpressionsdaten

Zur Bestimmung der kardialen Genexpression wurden vom Apex ausgehend Bioptate vom Herzen entnommen und für die Genexpressionsanalysen aufgearbeitet (vgl. 3.2.2 - 3.2.6). In Abb. 43 sind die Expressionen der untersuchten Gene von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren, jeweils unbehandelt und mit Carnitin- bzw. Mildronat-Gabe (max. Behandlungszeitraum), dargestellt. Aufgrund der ausschließlich an Männchen durchgeführten Mildronat-Gabe sind hier lediglich männliche Tiere gezeigt.

Zunächst wurde die Expression des Carnitin-Transporters Octn2 (*Slc22a5*) untersucht, die zwischen den einzelnen Gruppen zwar Tendenzen, jedoch keine signifikanten Unterschiede erkennen ließ. Die *Slc22a5*-Expression war in jvs$^{+/-}$-Tieren im Vergleich zu wt-Tieren um 17 % und bei jvs-Tieren um 26 % vermindert. Die Carnitin-Applikation hob die kardiale *Slc22a5*-Expression, sowohl in wt- (+61 %) als auch in jvs$^{+/-}$-Tieren (+23 %), an. Bei jvs-Tieren hingegen war diesbezüglich keinerlei Unterschied zu verzeichnen. Die Gabe von Mildronat steigerte das *Slc22a5*-Expressionslevel ebenfalls: bei wt-Tieren um etwa 19 % und bei jvs$^{+/-}$-Tieren um 24 % gegenüber den vollkommen unbehandelten Tieren.

Weiterhin wurde die Expression von *Nppa* als spezifischer Marker für ein differenziert arbeitendes Myokard[120] untersucht. Zum Zeitpunkt der Geburt wird die *Nppa*-Expression herunterreguliert, kann jedoch durch verschiedene kardiovaskuläre Störungen reaktiviert werden.[120] Wt-Tiere wiesen sowohl durch Carnitin-Applikation als auch durch Mildronat-Gabe eine verminderte *Nppa*-Expression auf, wobei das Expressionsniveau um 32 % bzw. 44 % gesenkt wurde (Abb. 43B). Bei jvs$^{+/-}$-Tieren lagen die *Nppa*-Expressionslevel bei Carnitin-Applikation und unbehandelt deutlich unterhalb der Wildtyp-Vergleichsgruppe. Auch hier verursachte die Carnitin-Gabe ein Absinken der *Nppa*-Expression (auf 41 %), wohingegen die Behandlung mit Mildronat keinerlei Veränderungen hervorrief. Jvs-Tiere ohne Substitution zeigten mit einer 1,4-fachen Erhöhung gegenüber nativen wt-Tieren das höchste *Nppa*-Expressionsniveau. Wie bei der wt- und jvs$^{+/-}$-Gruppe bewirkte eine Carnitin-Gabe auch hier einen deutlichen Abfall des Expressionslevels (auf 60 %).

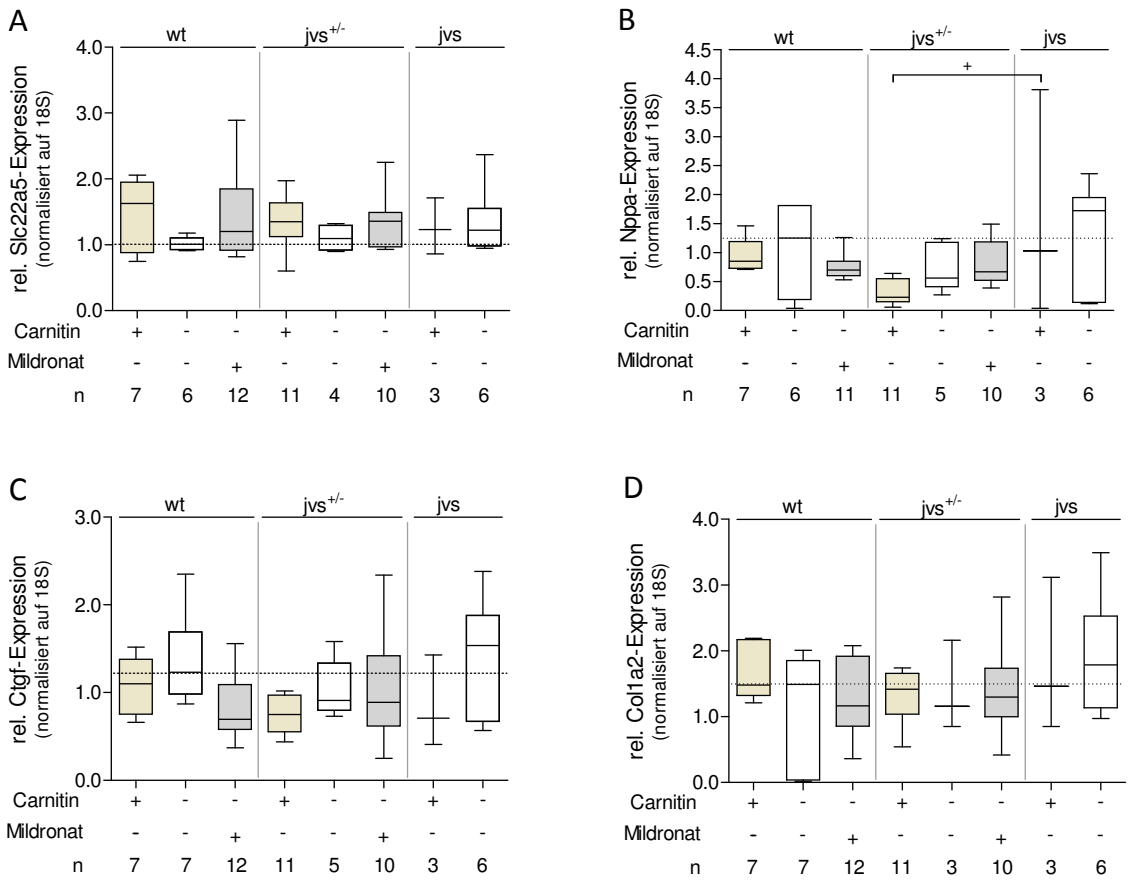


Abb. 43 Genexpressionsdaten von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren mit und ohne Carnitin- bzw. Mildronat-Gabe (männl. Tiere): relative Expression des Carnitin-Transportproteins Octn2 (*Slc22a5*) (A), des natriuretischen Peptids Typ A (*Nppa*) (B), des connective tissue growth factor (*Ctgf*) (C) und des Kollagens Typ I (*Col1a2*) (D). One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Substanz-Applikation (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0{,}05$, Vergleich aller Mildronat-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied

Um zu überprüfen, ob bei den Mäusen ein Myokard-Remodeling eingesetzt hat, wurden weiterhin die Expressionen des *connective tissue growth factors* (*Ctgf*) und des Kollagens (*Col1a2*) untersucht. Bei wt-Tieren wurde die *Ctgf*-Expression durch Carnitin-Applikation um 11 % und bei Mildronat-Gabe um 56 % gesenkt (Abb. 43C). Im Vergleich dazu wurde *Ctgf* in den entsprechend behandelten jvs$^{+/-}$-Tieren weniger stark exprimiert. Bei Supplementation des Futters mit Carnitin sank die *Ctgf*-Expression hier um 18 %, während die Mildronat-Gabe keinerlei Expressionsänderung hervorrief. Carnitin-behandelte jvs-Tiere wiesen ein nahezu gleiches Expressionsniveau wie die analoge jvs$^{+/-}$-Gruppe auf, während in unbehandelten jvs-Tieren die *Ctgf*-Expression gegenüber den entsprechenden Vergleichsgruppen deutlich

erhöht war. Die Expression von *Col1α2* differierte in den hier untersuchten Tieren nur wenig. Lediglich in Mildronat-behandelten wt-Tieren war eine leicht verminderte *Col1α2*-Expression zu finden (Abb. 43D). In den jvs$^{+/-}$- Tieren zeigte sich eine tendenziell erhöhte Expression bei Carnitin- als auch Mildronat-Gabe, während Carnitin die Expression in jvs-Tieren eher verminderte. Insgesamt waren diese Effekte jedoch nicht signifikant.

Weiterhin wurde die Expression der Stickstoff-Synthetase *Nos2*, für die bereits Hinweise auf einen Zusammenhang mit einer Mildronat-Gabe vorlagen, und des *Myh6*, als wesentlicher Bestandteil des murinen Myosins, gemessen. Es zeigte sich eine verminderte *Nos2*-Expression sowohl in den heterozygoten als auch in den homozygoten jvs-Tieren. Während die Carnitin-Gabe bei keiner Gruppe einen signifikanten Einfluss auf die Expression hatte, führte die Mildronat-Behandlung in den wt-Tieren zu einem deutlichen Abfall der *Nos2*-Expression um über 40 % (Abb. 44A). Dieser Effekt zeigte sich tendenziell (Abfall um etwa 10 %) auch in der jvs$^{+/-}$-Gruppe.

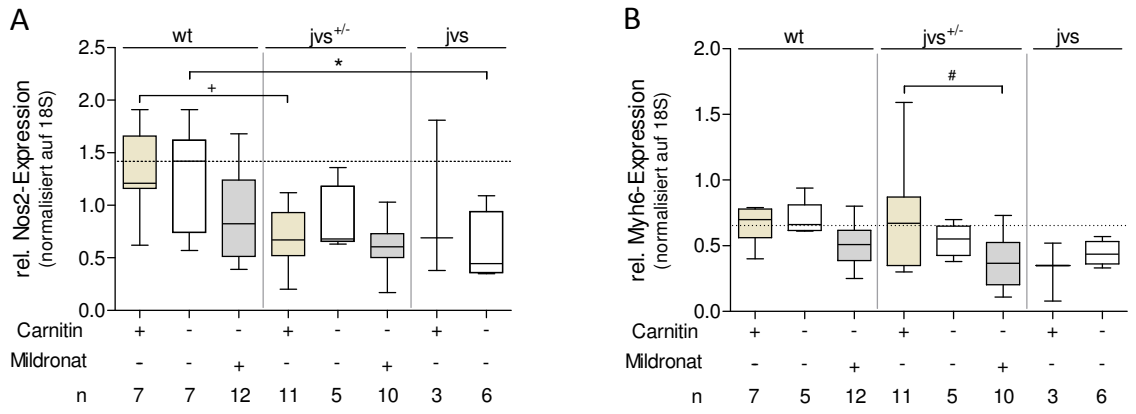


Abb. 44 Genexpressionsdaten von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren mit und ohne Carnitin- bzw. Mildronat-Behandlung: Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (*Nos2*, A) und myosin heavy chain 6 (*Myh6*, B). One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: *$p < 0,05$; Einfluss der Substanz-Applikation (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#}p < 0,05$; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0,05$, Vergleich aller Mildronat-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied

Ähnliche Effekte wie bei der *Nos2* zeigten sich auch für das *Myh6*, wobei diese jedoch deutlich schwächer ausgeprägt waren. Die Carnitin-Gabe führte in den Wildtypen, sowie den heterozygoten jvs-Mäusen zu einer minimalen Erhöhung der *Myh6*-Expression (Abb. 44B), während unter Mildronat das Expressionsniveau in beiden Gruppen deutlich geringer war.

In Tab. 13 sind die Untersuchungsergebnisse zur Herzfunktion zusammengefasst.

Tab. 13 Zusammenfassung der Parameter zur Herzfunktion (vgl. Abb. 25 - Abb. 44; One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich von Carnitin-Applikation vs. Karenz der Carnitin-Applikation (innerhalb der einzelnen Genotypen): *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Vergleich von Milronat-Applikation vs. ohne Mildronat-Applikation (ohne Carnitin): #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001. Die Statistik wurde aus den entsprechenden Abbildungen übernommen.

	Parameter	Karenz der Carnitin-Applikation			Mildronat-Applikation		
		wt (16Wo)	$jvs^{+/-}$ (16 Wo)	Jvs (4 Wo)	wt	$jvs^{+/-}$ (8 Wo)	$jvs^{+/-}$ (16 Wo)
Allgemein	LVM/KG	→	→	↑ ***	→	↑	→
Carnitin-Gehalt	Serum	↓ ***	→	↓ ***	↓ ###	↓ ###	↓ ###
	Herz	→	→	→	↓ ###	↓ ##	↘
Funktions-parameter	EDV/KG	→	→	→	→	→	→
	ESV/KG	→	→	→	→	↓ #	→
	SV/KG	→	→	→	→	→	→
	EF	→	→	→	→	↑ ###	→
	LVRI	→	→	↑ ***	→	↑ ##	→
	ESP	→	→	↘	→	→	→
	EDP	→	→	→	↓ ###	→	→
	dP/dt_{max}	↑ **	→	↓ **	→	→	→
	ESPVR	↗	→	↓ *	→	→	→
	PRSW	↑ **	→	→	→	→	→
	dP/dt_{min}	↓ *	→	↑ **	→	→	→
	EDPVR	→	→	→	→	→	→
	Tau Glantz	→	→	↑ **	→	→	→
NT-proBNP-Gehalt	Serum	→	→	→	↓ ###	↘	↘
Gen-expression	*Slc22a5*	↘	→	→	→		→
	Nppa	→	→	→	↘		→
	Ctgf	→	→	↗	↘		→
	Col1a2	→	→	→	→		→
	Nos2	→	→	→	↘		→
	Myh6	→	→	→	→		→

4.2 Bedeutung des Octn2 für die Entwicklung eines Myokardinfarkts

Entsprechend des Studiendesigns (vgl. 3.1.3.2) wurden wt-, $jvs^{+/-}$- und jvs-Mäuse mit Carnitin-supplementiertem (6 Wochen) und unsupplementiertem Haltungsfutter versorgt.

Die Gruppen setzten sich aus männlichen und weiblichen Tieren zusammen und wiesen zusammen Endzahlen von 3 - 11 Tieren auf.

Tab. 14 Übersicht über die im Tierversuch verwendeten Gruppen

Gruppe	Substanz	Carnitin-Karenz/Mildronat-Gabe	Endzahl n (m/w)
wt	Carnitin	6 Wo	(7/6)
	-	6 Wo	(7/5)
$jvs^{+/-}$	Carnitin	6 Wo	(6/5)
	-	6 Wo	(2/6)
jvs	Carnitin	6 Wo	(3/4)
	-	2 Wo	(0/3)

Anschließend wurde bei den Tieren ein akuter Herzinfarkt via LCA-Ligatur induziert (vgl. 3.1.3.2). Neben der Quantifizierung der Infarktgröße wurde auch die Carnitin-Konzentration im Serum sowie Biomarker für die Herzinfarkt-Entwicklung bestimmt.

Carnitin-Spiegel im Serum

Mit Blick auf den Carnitin-Spiegel zeigten sich im Serum der mit supplementiertem Futter gehaltenen Tiere keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen, wobei die Spiegel insgesamt deutlich über den Werten der unbehandelten Tiere lagen. Bei letzteren war dabei ein deutlicher Gen-Dosis-Effekt zu erkennen (Abb. 45). Aufgrund der hohen Mortalität unbehandelter jvs-Tiere (ca. 50 % der Tiere sterben ohne zusätzliches Carnitin innerhalb von 4 Wochen[67,68]) war die jvs-Gruppe jedoch sehr klein (n=3), so dass hier keine statistische Absicherung erfolgen konnte.

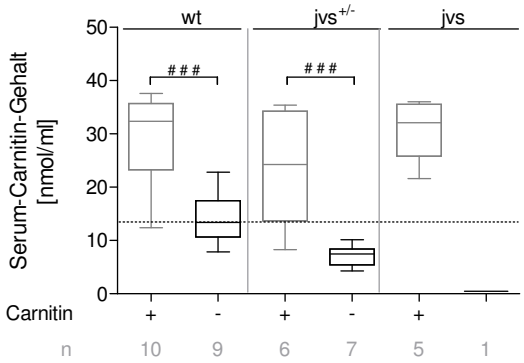


Abb. 45 Carnitin-Gehalt im Serum nach Fütterung mit und ohne Carnitin-supplementiertem Futter. One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Gabe (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{###}p < 0{,}001$; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): kein signifikanter Unterschied

Infarktparameter

Zur Beurteilung des Myokardinfarkts wurden neben dem eigentlichen Infarktareal (IF) auch das Risikoareal (RA) und die Gesamtfläche (GF) bestimmt und Behandlungs- bzw. Genotyp-abhängig ausgewertet. In Abb. 46 sind die angefärbten, konsekutiven Gewebeschnitte für die jeweils untersuchten Gruppen exemplarisch dargestellt.

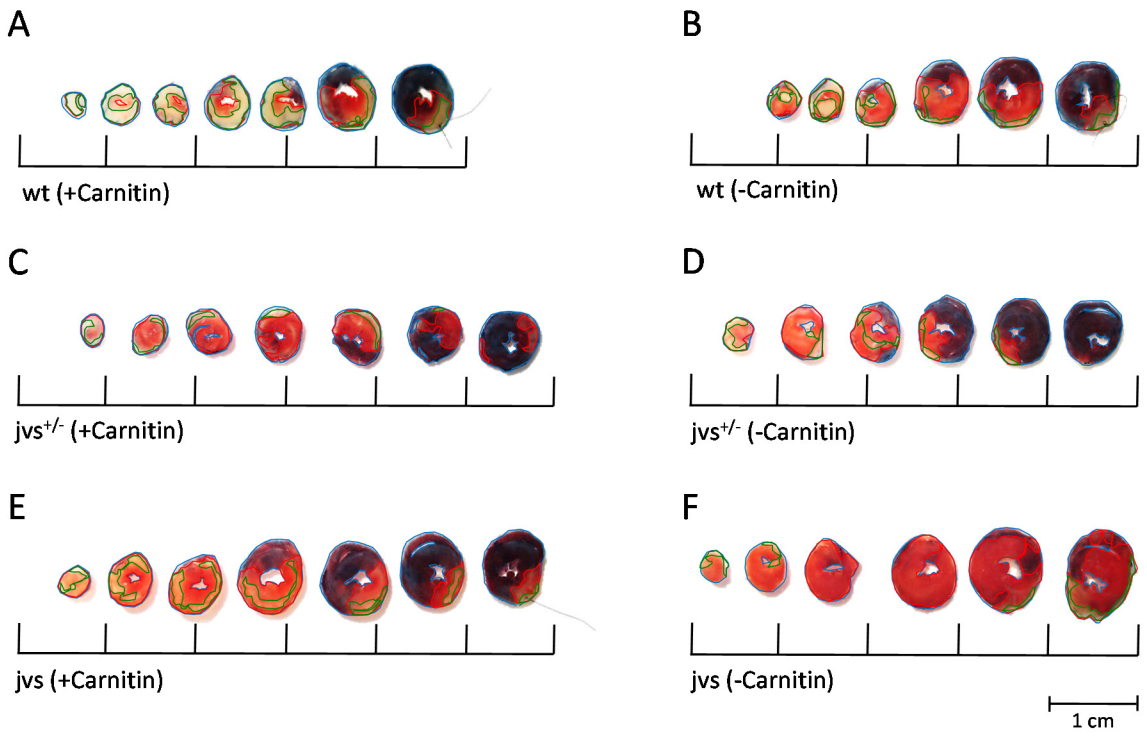


Abb. 46 Exemplarische Darstellung der einzelnen Gewebeschnitte der untersuchten Versuchsgruppen: wt-Tiere (+Carnitin, A; -Carnitin, B), jvs$^{+/-}$-Tiere (+Carnitin, C; -Carnitin, D) und jvs-Tiere (+Carnitin, E; -Carnitin, F) nach Evans Blue- und TTC-Färbung. Blauer Bereich: nicht-ischämisches Areal; roter Bereich: vitales Gewebe; weißer Bereich: nekrotisches Gewebe. Blaue Linie: Gesamtfläche; rote Linie: Risikoareal; grüne Linie: Infarktareal

Das RA betrug dabei durchschnittlich 50 % (25 - 95 %) der GF und zeigte keinen Behandlungs-, aber einen Genotyp-abhängigen Unterschied zwischen Carnitin-behandelten wt- und jvs$^{+/-}$-Tieren (Abb. 47A)), wobei die jvs$^{+/-}$-Tiere ein geringeres RA aufwiesen. Daher wurde untersucht, ob die relative Infarktgröße von der Größe des RA abhängig ist. Hierzu wurde das IA auf das RA normiert, gegen das RA aufgetragen und beide Werte miteinander korreliert (Abb. 47B). Dabei zeigte sich keine signifikante Korrelation beider Parameter, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die relative Infarktgröße unabhängig von der Größe des RA ist. In der Folge ist daher das IA nur in Abhängigkeit zum RA dargestellt.

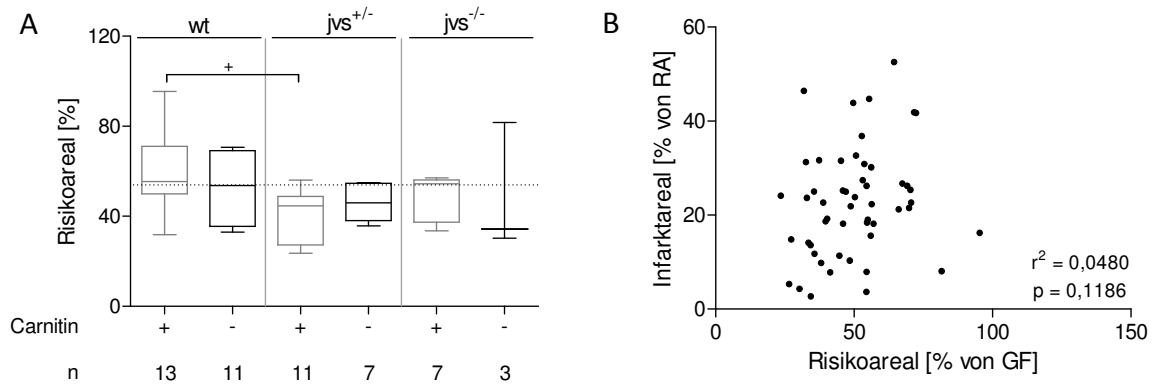


Abb. 47 Risikoareal von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren (A) und Korrelation (Pearson) des Risikoareals (RA) mit dem Infarktareal vom Risikoareal (RA) (B). A: One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Gabe (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0,05$

Betrachtet man die einzelnen Gruppen, so zeigte sich in den unbehandelten Tieren ein deutlicher Gendosiseffekt (Abb. 48A). Während wt-Tiere ein durchschnittliches Infarktareal von 24 % vom RA aufwiesen, lag dieses bei den heterozygoten Tieren bei 16 % und bei den jvs-Tieren bei 5 %. Zu berücksichtigen war hier jedoch die aus o. g. Gründen relativ geringe n-Zahl der jvs-Tiere. Bei den Carnitin-behandelten Tieren zeigte sich tendenziell ein ähnliches Bild, jedoch war der Effekt, insbesondere zu den jvs-Tieren weniger stark ausgeprägt.

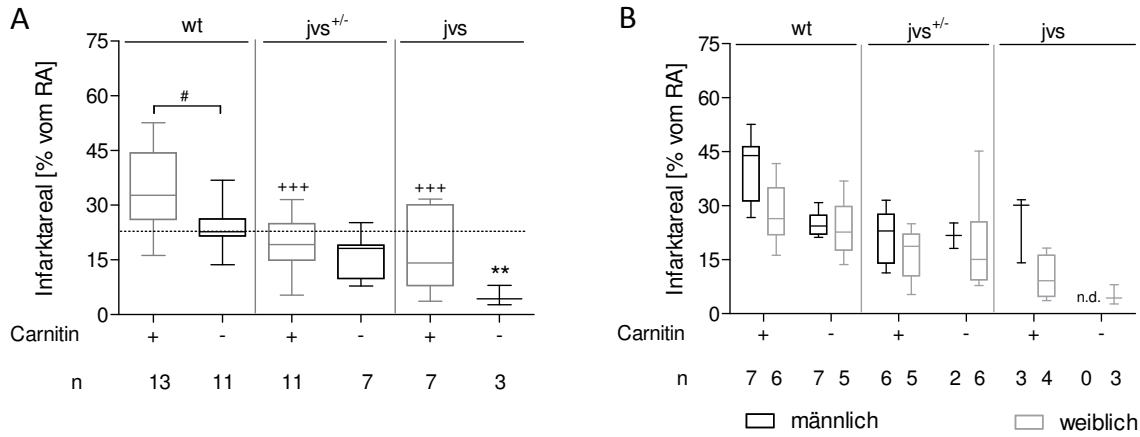


Abb. 48 Infarktareale (pro RA) von wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren ohne (A) und mit (B) Berücksichtigung des Geschlechts. A: One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: $^{**}p < 0,01$ (zur nativen wt-Gruppe); Einfluss der Carnitin-Gabe (innerhalb der einzelnen Genotypen): $^{\#}p < 0,05$; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+++}$ $p < 0,001$ (zur Carnitin-behandelten wt-Gruppe). B: Two-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s* Posttest: Vergleich von Männchen und Weibchen: kein signifikanter Unterschied

Vergleicht man zusätzlich das Resultat einer Carnitin-Gabe innerhalb der jeweiligen Genotypen, so zeigte sich tendenziell ein größeres relatives IA in den Tiere, die zusätzlich Carnitin erhalten haben. Dieser Effekt war bei jedem Genotyp zu beobachten und bei den Wildtyp-Tiere am stärksten ausgeprägt. Die geschlechtsspezifische Auswertung der Infarktareale ergab in fast allen untersuchten Gruppen bei weiblichen Tieren ein tendenziell kleineres IA (Abb. 48B). Die größten Unterschiede zwischen den Geschlechtern waren diesbezüglich bei Carnitin-substituierten Wildtypen und jvs-Mäusen zu sehen. Aufgrund der geringen Endzahl ist die Aussagekraft dieser Vergleiche bei den jvs-Tieren allerdings begrenzt.

Biomarker für die Schädigung des Herzens

Zur molekularbiologischen Beurteilung der Schädigung am Herzen wurde sowohl kardiales Troponin I (cTnI) als auch das herzspezifische Fettsäure-bindende Protein (h-FABP) als Biomarker bestimmt.

In Abb. 49A ist das Serum-Troponin der jeweiligen Gruppen dargestellt. Lediglich Carnitin-behandelte jvs$^{+/-}$-Mäuse zeigten signifikant verminderte Konzentrationen. Es besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen Genotyp, Behandlungsmodus und Infarktgröße. Ein ähnliches Bild zeigte auch das h-FABP, bei dem sich nur jvs-Mäuse mit und ohne Carnitin-Applikation signifikant unterschieden.

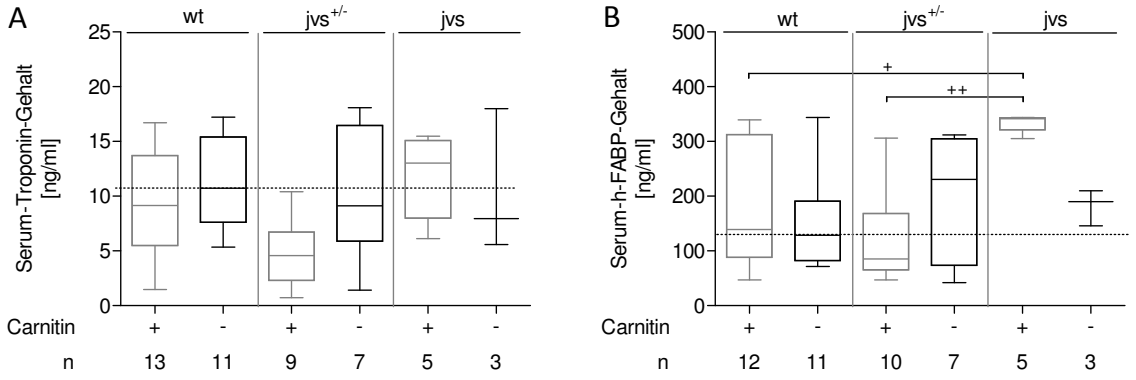


Abb. 49 Troponin-Gehalt (A) und h-FABP-Gehalt (B) im Serum von wt- , jvs$^{+/-}$- und jvs-Tieren. One-Way-ANOVA mit *Bonferroni´s Multiple Comparison* Posttest: Vergleich aller unbehandelten Gruppen: kein signifikanter Unterschied; Einfluss der Carnitin-Gabe (innerhalb der einzelnen Genotypen): kein signifikanter Unterschied; Vergleich aller Carnitin-behandelten Gruppen (Genotyp-übergreifend): $^{+}p < 0{,}05$, $^{++}p < 0{,}01$

5 DISKUSSION

5.1 Einfluss einer verminderten OCTN2-Funktion auf die Herzfunktion

Ausgangspunkt für die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Arbeiten waren Untersuchungen an kardialen Gewebeproben von DCM-Patienten. Genexpressionsanalysen zeigten hier eine verminderte Expression des kardialen *SLC22A5*, welche zudem mit linksventrikulären Funktionsparametern dieser Patienten assoziiert war.[75,76] Aufgrund dieser Ergebnisse wurde spekuliert, dass es im Rahmen einer Herzinsuffizienz zu einer Einschränkung der kardialen Carnitin-Versorgung mit Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel kommen könnte. Die verminderte *SLC22A5*-Expression würde somit einen Risikofaktor in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz darstellen, da eine verminderte Expression Auswirkungen auf die kardiale Carnitin-Versorgung und damit auf den Energiestoffwechsel haben sollte. Diese Hypothese wird gestützt vom Phänotyp einer systemischen Carnitin-Defizienz, wie sie durch eine *loss of function* Mutation im *SLC22A5*-Gen ausgelöst wird und dessen Hauptsymptom eine Kardiomyopathie ist[121,122]. Einen vergleichbaren Phänotyp zeigen *juvenile viscerale steatosis (jvs)*-Mäuse, die ebenfalls einen Defekt im *SLC22A5*-Gen aufweisen. Heterozygote Träger der systemischen Carnitin-Defizienz (PCD), welche mutierte Varianten des OCTN2 aufweisen[121] und für die es ebenfalls Hinweise auf ein erhöhtes Risiko hinsichtlich einer kardiale Hypertrophie gibt[123], zeigen, ähnlich wie die $jvs^{+/-}$-Tiere, nur leicht reduzierte Carnitin-Level im Blut[55,124]. Da $jvs^{+/-}$-Mäuse aufgrund ihrer nur leicht verringerten Carnitin-Transportfähigkeit am ehesten der verminderten OCTN2-Expression von DCM-Patienten entsprechen, lag der Fokus dieser Untersuchungen vorwiegend auf Tieren mit einer heterozygot ausgeprägten OCTN2-Defizienz. Infolge dessen war es das primäre Ziel der Arbeit, den Einfluss einer verminderten OCTN2-Expression/-Funktion auf die Herzfunktion zu untersuchen. Hierzu wurden heterozygote jvs-Mäuse nativ und unter mehrmonatiger Carnitin-Applikation bzw. Gabe des Carnitin-Analogons Mildronat, als pharmakologischen OCTN2-Inhibitor, hinsichtlich der Herzfunktion untersucht. Neben diesem Hauptziel wurde weiterhin der Einfluss des OCTN2 auf die Entwicklung eines Herzinfarkts untersucht, sodass die vorliegende Arbeit insgesamt einen detaillierten Einblick in die Bedeutung des Carnitin-Transporters OCTN2 für die Herzfunktion gibt.

Vor den eigentlichen Untersuchungen zur Herzfunktion wurden die wt- und jvs-Tiere zunächst hinsichtlich ihrer Carnitin-Spiegel als Maß für die Beeinträchtigung der Transportfunktion des OCTN2 untersucht.

Insgesamt differieren wt- und jvs$^{+/-}$-Tiere in unserer Studie nur leicht hinsichtlich des Gehalts an freiem Carnitin im Serum und im Herzgewebe. Auch phänotypisch sind wt- und jvs$^{+/-}$-Tiere kaum zu unterscheiden. Ohne Carnitin-Behandlung unterscheidet sich das freie Carnitin im Serum der wt- und jvs$^{+/-}$-Tieren lediglich um etwa 10 %. Es weist damit eine deutlich geringere Differenz auf, als dies aus früheren Arbeiten, die einen um bis zu 30 % verminderten Carnitin-Spiegel in den heterozygoten Tieren beschreiben, zu erwarten gewesen wäre.[125] Bei Carnitin-Applikation steigt der Carnitin-Spiegel im Serum der wt-Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren erwartungsgemäß an. Der Anstieg des Serum-Carnitins durch Carnitin-Gabe wurde bereits von Müller *et al.*[126] an gesunden humanen Probanden nachgewiesen. Im Vergleich zum Serum zeigt sich beim kardialen Carnitin-Spiegel zwischen heterozygoten jvs- und Wildtyp-Tieren ohne Carnitin-Gabe ein etwas stärkerer Effekt, welcher interessanterweise nur nach einer Carnitin-Karenz von 4 und 16 Wochen und nicht zu den anderen beiden Zeitpunkten auftritt. Im Gegensatz zum Serum führt die Applikation von Carnitin im Herzen, sowohl bei wt- als auch bei jvs$^{+/-}$-Mäusen, zu keinen signifikanten Unterschieden. Die homozygoten jvs-Tiere ohne Carnitin-Applikation zeigen hingegen stark verminderte Carnitin-Spiegel, insbesondere mit Blick auf die Gewebe-Spiegel. Dass der Effekt hier besonders stark ausgeprägt ist, kann dadurch erklärt werden, dass insbesondere bei Carnitin-Gabe andere Transportmechanismen, wie die Diffusion, zwar eine Aufnahme ins Blut ermöglichen[127], die Aufnahme ins Gewebe jedoch stark vom OCTN2 abhängig ist. Insgesamt ist für den Zusammenhang von OCTN2-Funktion und Carnitin-Spiegel ein deutlicher Gendosis-Effekt zu erkennen, der bei den homozygoten jvs-Mäusen überproportional zum Tragen kommt, während heterozygote Tiere den partiellen Funktionsverlust von OCTN2 relativ gut kompensieren können. Übertragen auf die eingangs erwähnten DCM-Patienten wäre demnach nur ein geringfügig verminderter Carnitin-Spiegel zu erwarten. Neben der Expression gibt es ebenfalls pharmakologische Faktoren, die die Funktion des OCTN2 beeinflussen; so wirken u. a. kardiovaskulär eingesetzte Substanzen wie Verapamil als OCTN2-Inhibitoren[76]. Die Einnahme dieser Pharmaka könnte sich demnach zusammen mit der veränderten Expression ebenfalls auf die Carnitin-Homöostase und damit den Energiestoffwechsel auswirken.

Daher wurde im vorliegenden Mausmodell ebenfalls der Einfluss einer OCTN2-Hemmung untersucht. Als Inhibitor wurde hierbei Mildronat, ein synthetisches Strukturanalogon des Carnitins[76,104], ausgewählt. Dieses ist bereits als kompetitiver Inhibitor des OCTN2 beschrieben[76] und reduziert den Plasma-Carnitin-Spiegel (gesunder Probanden) im Tierversuch und im Menschen nachweislich[107]. In dieser Funktion wird es auch therapeutisch im Rahmen ischämischer Herzerkrankungen eingesetzt, wobei neben der OCTN2-Hemmung lange Zeit insbesondere die Hemmung der endogenen Carnitin-Synthese als zentraler Wirkmechanismus angenommen wurde[108]. Eine Hemmung der β-Oxidation durch Mildronat kann jedoch nur nach wiederholter Administration (über mehrere Tage) erreicht werden.[128] Da Mildronat sowohl hinsichtlich der Transporter-Affinität als auch der Natrium-Abhängigkeit dem Carnitin sehr stark ähnelt, stellt es ein exzellentes Substrat für OCTN2 dar.[104] Es war daher zu erwarten, dass sich der Carnitin-Spiegel unter Mildronat-Behandlung vermindert. Dies bestätigte sich im Rahmen dieser Arbeit, als gezeigt werden konnte, dass der Serum-Carnitin-Gehalt durch die Gabe von Mildronat sowohl von wt- als auch von $jvs^{+/-}$-Tieren gesenkt werden kann. Während bei $jvs^{+/-}$-Tieren nach 4- bis 12-wöchiger Mildronat-Applikation zunächst ein geringerer Carnitin-Spiegel vorlag als bei den entsprechenden wt-Tieren, trat dieser Unterschied nach 16 Wochen nicht mehr auf. Da bei $jvs^{+/-}$-Tieren im Vergleich zu wt-Tieren bereits initial ein leicht verminderter Serum-Carnitin-Spiegel erkennbar war, ist insbesondere der zweite Befund interessant. Der nach 16-wöchiger Mildronat-Gabe beobachtete Wiederanstieg der Carnitin-Konzentration im Serum scheint dabei Folge eines Adaptionsmechanismus zu sein, der bereits in anderen Modellen beobachtet wurde. So konnte eine Studie an Patienten, die mit Valproinsäure behandelt wurden, zeigen, dass die Reabsorption von freiem Carnitin bei Langzeit-Behandlung verstärkt war.[129] Ratten mit einer durch Mildronat-Gabe verminderten Plasma-Carnitin-Konzentration zeigten ebenfalls eine höhere renale Transport-Aktivität für Carnitin und darüber hinaus eine höhere renale Octn2-mRNA-Expression als Kontrolltiere.[130] Anders ist dies bei den kardialen Carnitin-Spiegeln. Durch Mildronat-Applikation wird der Gehalt an freiem Carnitin bei wt-Tieren hier, sowohl absolut als auch relativ, deutlich stärker gesenkt als bei $jvs^{+/-}$-Tieren. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass bei heterozygot-defizienten Tieren neben dem Carnitin auch das Mildronat schlechter aufgenommen wird und daher systemisch geringere Konzentrationen erreicht werden. Die Hemmwirkung auf nicht intestinales Octn2 wäre damit geringer. Da aus methodischen Gründen nur die Konzentration an freiem Carnitin

bestimmt wurde, welches nicht zwangsweise mit dem Gesamt-Carnitin-Gehalt korrelieren muss[131], ist die Aussagekraft hier zudem limitiert.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine verminderte Aktivität bzw. eine (zusätzliche) Hemmung des OCTN2-Transporters mit reduzierten Carnitin-Spiegeln einhergeht, sollte nun deren Einfluss auf die linksventrikuläre Herzfunktion analysiert werden. Für diese Untersuchungen wurde u. a. das Körpergewicht der Tiere bestimmt. Hierbei fiel neben den zu erwartenden Unterschieden zwischen männlichen und weiblichen Tieren auf, dass Mildronat-behandelte Tiere geringfügig schwerer waren als die entsprechenden Kontrolltiere. Dieser Effekt war bei den $jvs^{+/-}$-Tieren deutlich stärker ausgeprägt als bei den Wildtypen und ist eventuell eher auf Effekte des Entzugs des Carnitin-supplementierten Futters zurückzuführen als auf das Mildronat selbst. Einschränkend muss hierbei allerdings gesagt werden, dass keine individuelle Berechnung der Gewichtszunahmen durchgeführt wurde und daher weitere Untersuchungen hinsichtlich der Gewichtsveränderungen unter Mildronat-Gabe erfolgen sollten.

Während sich bei $jvs^{+/-}$-Tieren mit und ohne Carnitin-Applikation hinsichtlich LVM/KG keinerlei Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben, führte eine Carnitin-Gabe sowohl bei wt- als auch bei jvs-Tieren zu einer Verminderung dieses Parameters. Bei der Gegenüberstellung von unbehandelten Wildtypen und entsprechenden jvs-Tieren zeigen letztere eine 2,4-fache Erhöhung von LVM/KG, was auf pathophysiologische Veränderungen hindeutet. Diese Veränderungen weisen auf kardiale Umbauprozesse, z. B. im Rahmen einer Hypertrophie, hin, die aus einer unzureichenden Carnitin-Versorgung resultieren können. An jvs-Mäusen konnte dies bereits 1993 von Horiuchi *et al.* gezeigt werden.[132] Neben dem erhöhten Herzgewicht bestätigten sie damit auch frühere Befunde von Takahashi *et al.*[66], welche die Effekte bei diesen Tieren vor allem auf eine vermehrte Einlagerung von Fetten zurückführten. So konnte hier beispielsweise gezeigt werden, dass unsubstituierte jvs-Mäuse einen signifikant höheren Gehalt an 1,2-Diacylglyzerol und Triglyzeriden im Herzen aufweisen.[66] Da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass jvs-Mäuse neben der Fetteinlagerung eine Hypertrophie ausbilden[132], war ein Anstieg der LVM/KG für unsubstituierte jvs-Tiere zu erwarten. Bei Mildronat-behandelten $jvs^{+/-}$-Tieren war zu Beginn der Mildronat-Gabe (bis zur 8. Woche) ebenfalls eine erhöhte LVM/KG feststellbar, sodass

auch hier hypertrophe Veränderungen vermutet werden können. Interessanterweise hat sich diese Beobachtung jedoch bei längerer Applikationsdauer nicht fortgesetzt.

Für eine detailliertere Beurteilung der Herzfunktion können die akquirierten Volumen- und Druck-Parameter herangezogen werden. Die Herzfunktionsdaten wurden mit zwei verschiedenen Methoden (MRT und Konduktanz-Katheter) bestimmt. Beide Methoden ergaben dabei ähnliche Ergebnisse, wobei auffiel, dass die mit der Konduktanz-Methodik ermittelten absoluten Volumenwerte ca. 20 % unterhalb der MRT-Werte lagen (vgl. Anhang, Tab. 15 und Tab. 16). Diese methodischen Unterschiede konnten bereits in einer Studie von Jacoby *et al.* gezeigt werden.[133] Die Relation der einzelnen Gruppen zueinander wurde von beiden Methoden jedoch in gleicher Weise wiedergegeben. Das MRT gilt als Goldstandard für kardiale Volumenbestimmungen, da das Volumen der einzelnen Schnittebenen nicht auf speziellen geometrischen Näherungen basiert.[133] In der vorliegenden Arbeit beschränkten sich die Abbildungen daher ausschließlich auf MRT-basierte Volumendaten (für die Katheter-basierten Werte vgl. Anhang). Weiterhin war es mittels MRT möglich Massen- und Größenbestimmungen durchzuführen, welche alternativ nur *ex vivo* ermittelt werden können. Die Genauigkeit des MRTs wurde durch Präparation des linken Ventrikels überprüft, wobei die Werte beider Methoden hochsignifikant miteinander korrelierten. Um darüber hinaus Druck-Parameter zu erheben, wurde zusätzlich die Konduktanz-Katheter-Methodik durchgeführt, wobei das mittels MRT ermittelte Schlagvolumen als Grundlage für die Berechnungen verwendet wurde.

Für homozygote jvs-Tiere ohne Carnitin-Substitution war, anhand von Literaturdaten, eine sichtbare kardiale Beeinträchtigung zu erwarten.[61,134] Nach Absetzen des Carnitin-supplementierten Futters zeigt sich sowohl für das SV/LVM als auch für die EF eine deutliche Reduktion. Der merkliche Anstieg des LVRI deutet überdies auf die Entwicklung einer Hypertrophie hin. Insgesamt zeigt sich bei diesen Tieren damit das erwartete Bild. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Methoden zur kardialen Charakterisierung geeignet sind. Werden diese Tiere hingegen mit Carnitin-supplementiertem Futter versorgt, bleiben die Werte im Normalbereich und die hypertrophen Prozesse können weitestgehend unterbunden werden. Auch dies ist bereits aus der Literatur bekannt und kann durch eine normale Mortalitätsrate belegt werden. Ein ähnliches Bild zeigt sich zudem bei Patienten mit *loss of function* Varianten im *SLC22A5*-Gen,

bei welchen ein verminderter Carnitin-Spiegel im Blut mittels hochdosierter Carnitin-Substitution kompensiert[52] und so einer Kardiomyopathie (bei frühzeitiger Gabe) entgegengewirkt werden kann.[122,135]

Um die kardialen Auswirkungen einer verminderten *Slc22a5*-Expression zu untersuchen, lag der Fokus vorrangig auf jvs$^{+/-}$-Tieren. Bei vollständigem Entzug des Carnitin-supplementierten Futters über einen Zeitraum von 16 Wochen zeigten diese im Vergleich zu Wildtypen weder hinsichtlich der EF noch der Größenparameter des Herzens deutliche Unterschiede. Auch die systolischen und diastolischen Parameter zeigten keine Fehlfunktionen. Für diese Tiere wurden in Verlaufskontrollen auch kürzere Zeiträume betrachtet: Hier zeigte sich nach 8 Wochen ohne zusätzliches Carnitin eine leicht reduzierte EF, die jedoch weiterhin im physiologischen Bereich lag. Die leichte Erhöhung des SV/LVM, der systolischen und diastolischen Längenparameter sowie die tendenzielle Verminderung des LVRI bei jvs$^{+/-}$-Tieren (nach 12 Wochen Carnitin-Karenz) gegenüber Wildtypen könnten hingegen auf einsetzende dilatative Prozesse hindeuten. Eine Applikation von Carnitin bewirkt bei wt-Tieren insgesamt keinerlei Veränderungen der kardialen Pumpleistung. Hinsichtlich der diastolischen und systolischen Funktion zeigen sich jedoch Auffälligkeiten: Während die diastolischen Parameter nur teilweise verändert vorliegen, sind die systolischen Eigenschaften wesentlich stärker beeinträchtigt. Die Verminderung von dP/dt_{max}, PRSW und ESPVR weisen hierbei auf eine Verminderung der systolischen Kapazität, insbesondere der Kontraktilität, hin. Ein erhöhtes Carnitin-Angebot geht bei Wildtyptieren demnach mit einer Einschränkung der systolischen Herzfunktion einher. Dieser Befund ist, insbesondere angesichts des als unbedenklich eingestuften und in breiten Bevölkerungsteilen angewendeten Einsatzes von Carnitin als Nahrungsergänzungsmittel, interessant. Carnitin wurde weiterhin allgemein bei kardiovaskulären Erkrankungen empfohlen und zeigte u. a. bei Patienten mit chronischem Herzversagen und peripherer vaskulärer Erkrankung positive Effekte.[92,93,136] Dennoch wird von Stanley *et al*. darauf hingewiesen, dass in den letzten 40 Jahren nur in zwei Fällen einer Carnitin-Defizienz-bedingten Störung ein eindeutiger Nutzen einer Carnitin-Behandlung nachgewiesen werden konnte.[12] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Carnitin-Applikation bei einer transienten Ischämie, sowohl die Verletzung als auch die Wiederherstellung der kontraktilen Herzfunktion verschlechtert.[137]

Im Gegensatz zu den wt-Tieren ruft eine Carnitin-Applikation bei jvs$^{+/-}$-Tieren kaum Veränderungen gegenüber unbehandelten jvs$^{+/-}$-Tieren hervor. Insgesamt wirkt sich eine heterozygote Defizienz des OCTN2-Transportproteins nicht einschränkend auf die kardiale Funktionalität der Mäuse aus. Neben dem Einfluss Carnitin-supplementierten Futters auf die Herzfunktion von Wildtypen und heterozygoten jvs-Mäusen wurde analog auch eine 16-wöchige Gabe des OCTN2-Inhibitors Mildronat untersucht. Vor dem Hintergrund der (bis zur 8. Woche) erhöhten LVM/KG von jvs$^{+/-}$-Mäusen unter Mildronat-Behandlung, könnte die beobachtete Erhöhung der EF und Verminderung des ESV/KG dieser Tiere auf einen Kompensationsmechanismus hindeuten, um ein konstantes Herzzeitvolumen aufrecht zu erhalten.

Neben der hämodynamischen Charakterisierung wurden ebenfalls molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, um auch eventuelle distinkte Veränderungen zu erfassen. Es wurde zunächst der Gehalt des Herzinsuffizienzmarkers NT-proBNP untersucht. Sowohl der BNP- als auch der NT-proBNP-Spiegel liegen während einer Herzinsuffizienz erhöht vor[138] und geben den Schweregrad der Herzinsuffizienz wieder[139,140]. Der NT-proBNP-Spiegel zeigte in unseren Untersuchungen allerdings ebenfalls keine Veränderung zwischen Wildtyp- und jvs-Tieren. Interessanterweise führte die Mildronat-Behandlung sogar zu einer signifikanten Reduktion der peripheren NT-proBNP-Spiegel, die bei wt-Tieren stärker ausgeprägt war als bei jvs$^{+/-}$-Tieren. Einen ähnlichen Effekt konnten McDonagh *et al.* bereits bei Patienten finden, die unter einer kardial wirksamen Medikation standen.[141] Die jvs-Genotyp-abhängigen Unterschiede sind dabei sehr wahrscheinlich auf unterschiedliche kardiale Mildronat-Konzentrationen zurückzuführen, da es sich beim Mildronat, wie beim Carnitin, um ein OCTN2-Substrat handelt. Neben der Steigerung der EF bei jvs$^{+/-}$-Tieren untermauern diese Daten den positiven Einfluss von Mildronat hinsichtlich der kardialen Funktionsparameter. Dabei handelt es sich allerdings um Effekte, welche sowohl auf den jvs$^{+/-}$-Genotyp beschränkt als auch zeitlich begrenzt (bei einer Mildronat-Applikation von bis zu 12 Wochen) auftraten.

Zusätzlich zum BNP wurde die Expression verschiedener Gene untersucht, für die eine Veränderung im Rahmen einer Herzinsuffizienz beschrieben ist. Dazu gehörte das natriuretische Peptid Typ A (*Nppa*), dessen Expression durch kardiovaskuläre Störungen induziert werden kann[120], und das *Myh6* (*myosin heavy chain 6*), welches bei

Herzerkrankungen herabreguliert ist[142]. Hier zeigen Studien, dass eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion mit einem koordinierten Anstieg der *Myh6*- und einem Abfall der *Myh7*-mRNA-Expression in Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie assoziiert ist.[143] Um ein mögliches Myokard-Remodeling zu beurteilen, wurde weiterhin die Expression von *Ctgf* (*connective tissue growth factor*) untersucht, welche bei fibrotischen Erkrankungen erhöht vorliegt[144]. Eine Blockade des *Ctgfs* durch einen neutralisierenden Antikörper führte in *in vitro* Versuchen zudem dazu, dass induzierte pro-fibrotische Effekte aufgehoben werden konnten.[145] Weiterhin wurde die Expression von Kollagen (*Col1a2*) bestimmt, dessen Induktion ein Charakteristikum der Herzinsuffizienz ist. Zur Bewertung inflammatorischer Prozesse, wie sie häufig an der Entwicklung einer Kardiomyopathie beteiligt sind[146,147], wurde darüber hinaus die *Nos2*-Expression bestimmt. Aufgrund der hämodynamisch nur geringfügig ausgeprägten Beeinträchtigung der jvs$^{+/-}$-Mäuse lag die Vermutung nahe, dass eine veränderte *Slc22a5*-Expression in Form eines Gegenregulationsmechanismus an diesem Effekt beteiligt sein könnte. Eine Induktion der renalen OCTN2-mRNA-Expression konnte bereits von Schurch *et. al* bei Ratten mit einer verminderten Plasma-Carnitin-Konzentration festgestellt werden.[130] Daher wurde ebenfalls dessen Expression bestimmt, welche jedoch keinerlei auffällige Unterschiede zwischen den einzelnen jvs-Genotypen zeigte. Die durch die *loss of function* Mutation im *Slc22a5* der jvs-Mäuse verändert vorliegenden Carnitin-Spiegel führen demnach nicht zu einem veränderten Expressionsprofil dieses Gens. Während sich die Expression der übrigen Gene bei jvs$^{+/-}$-Tieren weder unter Carnitin- noch unter Mildronat-Gabe änderte, konnte bei Wildtyp-Tieren unter Mildronat-Behandlung ein leichtes Absinken der Expression aller untersuchten Gene (außer *Slc22a5*) beobachtet werden. Neben einem verminderten NT-proBNP-Spiegel sprechen diese Daten ebenfalls für einen positiven Einfluss von Mildronat auf das Herz. Bei jvs$^{+/-}$-Tieren konnte dieser Effekt, trotz ebenfalls verminderter NT-proBNP-Spiegel, nicht gezeigt werden. Im Vergleich zu Wildtypen konnte hier jedoch ein generell vermindertes Expressionsniveau von *Nppa*, *Ctgf* und insbesondere von *Nos2* beobachtet werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass eine Überexpression der *Nos2* in Kardiomyozyten mit einem Anstieg myokardialer Peroxynitrite, myokardialer Fibrose, ventrikulärer Hypertrophie, kongestivem Herzversagen[148] und plötzlichem Herztod[149] in Zusammenhang gebracht werden konnte. Zhang *et al.* konnten zudem nachweisen, dass Mäuse, die mit einem selektiven Nos2-Inhibitor behandelt wurden, nach einer transversalen

Aortenkonstriktion zur Induktion einer ventrikulären Dysfunktion, ein signifikant erhöhtes Überleben aufwiesen.[148] Darüber hinaus zeigten diese sowie Nos2-defiziente Tiere, welche die gleiche Prozedur durchliefen, eine signifikant verminderte *Nppa*-Expression im Vergleich zu konstringierten Wildtypen.[148] Die verminderte *Nppa*-Expression in den Mildronat-behandelten Tieren könnte daher evtl. durch dessen Einfluss auf die *Nos2*-Expression zu erklären sein.

Insgesamt fügen sich die Untersuchungen zur kardialen Genexpression in die bisherigen Ergebnisse zu den jvs-Mäusen ein. Diese zeigen interessanterweise weder bei moderat herabgesetzter OCTN2-Funktion noch durch dessen zusätzliche pharmakologische Hemmung eine Verschlechterung der Herzleistung. Einige hämodynamische sowie molekularbiologische Veränderungen deuten bei Gabe von Mildronat sogar auf eine positive Wirkung hin. Zwar führt die Mildronat-Gabe zu einem deutlichen Absinken der Carnitin-Spiegel, was jedoch – zumindest im Beobachtungszeitraum – nicht mit einer Einschränkung der Herzfunktion assoziiert war. Dieser Befund gilt dabei nicht nur für Wildtyp-Tiere, sondern auch für heterozygote jvs-Mäuse mit einem bereits initial leicht verminderten Carnitin-Spiegel. Vor diesem Hintergrund ist zu vermuten, dass eine pharmakologische OCTN2-Inhibition nicht zu einer Verschlechterung der Prognose von DCM-Patienten mit verminderter *SLC22A5*-Expression führt. Hierbei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass Herzinsuffizienz häufig über Jahre behandelt wird und der hier durchgeführte Tierversuch aus praktischen Erwägungen nur über einen Zeitraum von 4 Monaten durchgeführt wurde. Des Weiteren wurde nur mit Tieren gearbeitet, die nicht kardial vorbelastet waren.

Übertragen auf die DCM-Patienten sollte die verminderte *SLC22A5*-Expression damit nicht ursächlich für die verringerte Herzleistung sein. Die Daten dieser Arbeiten legen sogar nahe, dass sich eine moderate Hemmung der Carnitinhomöostase, z. B. durch Mildronat, unter Umständen protektiv auf die Herzfunktion auswirken kann. Vor dem Hintergrund der vorliegenden Daten scheint eine Mildronat-Applikation daher relativ sicher zu sein. Um diese Hypothesen zu überprüfen, müssten jedoch weiterführende Studien an entsprechenden Herzinsuffizienzmodellen durchgeführt werden.

5.2 Bedeutung der OCTN2-Funktion für den akuten Myokardinfarkt

Aus tierexperimentellen und klinischen Studien ist bekannt, dass eine Hemmung des Carnitin-Systems, z. B. durch das Carnitin-Analogon Mildronat, vor Ischämie- und Reperfusionsschäden im Rahmen eines Herzinfarkts schützt.[107,109] Sesti *et al.* konnten zeigen, dass eine 10-tägige Behandlung von Ratten mit Mildronat die myokardiale Infarktgröße in einem Tiermodel des akuten Myokardinfarkts reduziert.[109] Als molekularer Hintergrund wird dabei angenommen, dass der kardioprotektive Effekt von Mildronat auf der Hemmung der Carnitin-Biosynthese und der kompetitiven Hemmung am Carnitin-Transporter OCTN2 beruht.[107,150,151] Beide Mechanismen gehen schlussendlich mit einer Verminderung des Carnitin-Levels in Plasma und Herzgewebe einher. [107,150,151] Dieser protektive Effekt des Mildronats könnte durch die enge Verknüpfung von Glukose- und Fettsäure-Metabolismus erklärt werden. Eine gesteigerte Oxidation der Fettsäuren besitzt einen inhibitorischen Effekt auf die Glykolyse und Glukose-Oxidation, wohingegen die Stimulation des Glukose-Metabolismus die Oxidation der Fettsäuren inhibiert. Mildronat reduziert die β-Oxidation, indem es durch die Carnitinverknappung den Transport aktivierter FS in die Mitochondrien hemmt[108] und in hypoxisch perfundierten Rattenherzen den *steady state* der Glukose-Oxidation steigert[106]. Ursächlich dafür könnte ein durch Mildronat induzierter präkonditionierungsähnlicher Effekt sein. Kuka *et al.* konnten bei Langzeitanwendung von Mildronat an Ratten dessen kardioprotektive Wirkung auf Änderungen in der Fettsäure- und Glukose-Metabolismus-bezogenen Genexpression zurückführen.[152] Mildronat hemmt darüber hinaus die Aktivität der Carnitin-Palmitoyl-Transferase-I und vermindert den Gehalt an aktivierten freien Fettsäuren (FFS).[153] Aktivierte FFS besitzen detergentienartige Eigenschaften und beschädigen mitochondriale Membranen.[103] Die Verminderung des Carnitin-Levels führt überdies zu einer signifikanten Reduktion der Akkumulation langkettiger Acyl-Carnitine im Cytoplasma sowie langkettiger Acyl-CoA-Moleküle in den Mitochondrien.[103,108,154] Die Akkumulation der Fettsäure-Intermediate ist cytotoxisch, da diese amphiphilen Moleküle einige Membran-gebundene Enzyme inhibieren, die an der Regulation der Zellfunktion beteiligt sind.[155-157] Es könnte daher angenommen werden, dass eine verminderte Akkumulation freier Fettsäuren und deren Intermediate die Membran-Integrität erhält und das zellulare Überleben unter ischämischen Bedingungen verbessert.[103]

Nach dieser Hypothese sollte ein ähnlicher Effekt auch bei jvs-Mäusen zu beobachten sein, deren Carnitinhomöostase aufgrund des defekten Octn2 gestört ist. Daher wurden diese

Tiere auch hinsichtlich der Entwicklung eines akuten Herzinfarkts durch Ligatur der linken Koronararterie (*Arteria coronaria sinistra*) untersucht. Durch den Verschluss dieses Gefäßes wird ein Teilbereich des Herzens von der Durchblutung abgeschnitten, welcher als Risikoareal bezeichnet wird. Da die untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Größe des Risikoareals zeigten, wurde das Infarktareal anschließend auf diesen Bereich normiert. Sowohl bei unbehandelten als auch Carnitin-behandelten Tieren zeigte sich ein deutlicher Gendosis-Effekt, wobei die Infarktgröße positiv mit der Anzahl defekter *Slc22a5*-Allele korrelierte. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Genotyp-bedingten Unterschiede zu einem veränderten Energiestoffwechsel in Octn2-defizienten Tieren führen.[158] Fettsäuren fungieren als hauptsächlicher Energietreibstoff für das normale, nüchterne, adulte, menschliche Herz und stellen ca. 60 - 80 % der erforderlichen Energie bereit.[159] Die Nutzung der kardialen Energiesubstrate ist dynamisch und kann entsprechend des vorherrschenden physiologischen oder pathophysiologischen Millieus verändert werden.[160] So verläuft der partielle Abbau von Glukose zu Pyruvat zur ATP-Gewinnung ohne Sauerstoff-Verbrauch (anaerobe Glykolyse), während unter bestimmten Bedingungen (z. B. Hypoxie) Pyruvat zu Laktat konvertiert werden kann.[161] Eine gesteigerte Glukose-Verwertung als Antwort auf Hypoxie könnte auftreten, da es im Vergleich zu Fettsäuren ein Sauerstoff-effizienteres Energie-Substrat ist, um ATP zu generieren.[161] Während einer leichten ischämischen Episode (wie z. B. während eines Angina-Pectoris-Anfalls), vermindert sich der oxidative Metabolismus im Verhältnis zur Verminderung des Sauerstoffgehalts und die ATP-Produktion über Glykolyse steigt an.[162] Ein weiteres Indiz für eine Verbesserung der energetischen Situation durch eine Verschiebung zur Glykolyse hin gibt die Glukose-Insulin-Kalium-Therapie. Diese steigert die Glykolyse-Rate und senkt auch die Konzentration zirkulierender freier Fettsäuren.[163,164] Der Shift in Richtung Glukose-Verwendung vermindert die Infarktgröße.[163] Neben dem Transport langkettiger Fettsäuren über die Mitochondrienmembran ist Carnitin auch an der reversiblen Transesterfizierung zur Bildung von Estern wie Acetyl-Carnitin über den Acetyltransferase-Pfad beteiligt.[165] Dies vermindert das intramitochondriale Acetyl-CoA/CoA-Verhältnis[166], was zu einer Stimulation der Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC) führt[167]. Daher sollte die Rolle des Carnitins als Regulator der myokardialen Glukose-Verwertung ebenfalls in Betracht gezogen werden.[168]

Die positive Korrelation zwischen Infarktareal und Octn2-Funktion wird bei unbehandelten Tieren durch einen analogen Gendosis-Effekt hinsichtlich des Serum-Carnitin-Gehalts wiedergegeben. Je geringer hier der Carnitin-Gehalt (Serum) ist, desto kleiner ist auch das Infarktareal. Ein verminderter Carnitin-Spiegel bereitet damit den zellulären Metabolismus und die membranären Strukturen auf das Überleben von ischämischen Stress-Bedingungen vor.[103] Es ist bekannt, dass ischämische Präkonditionierung den zellulären Energie-Metabolismus modifizieren kann.[103] Die Modulation der Carnitin-Wege kann ebenfalls zu metabolischen Konsequenzen führen, ähnlich denen, die durch Präkonditionierung induziert werden.[103] Neben dieser Stoffwechsel-bedingten Erklärung könnte auch die zuvor beschriebene Veränderung der Genexpression, wie die verminderte *Nos2*-Expression, eine Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass eine *Nos2*-Defizienz eine milde bis moderate Verminderung der Infarkt-induzierten Mortalität hervorruft, die ventrikuläre Funktion verbessert, den myokardialen Nitrotyrosin-Gehalt und die Plasma-Nitrate reduziert und antiapoptotisch auf die akute und chronische Phase des Myokardinfarkts wirkt.[169-171] Chen *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass selektive pharmakologische Nos2-Inhibitoren die linksventrikuläre Kontraktilität und den myokardialen Sauerstoffverbrauch in der Endphase des Schrittmacher-induzierten Herzversagens beim Kaninchen verbessern[172].

Appliziert man den einzelnen Genotypen nun über 6 Wochen Carnitin, liegt das Infarktareal oberhalb dessen, der jeweils unbehandelten Gruppen. Eine Ausnahme diesbezüglich stellen die jvs$^{+/-}$-Mäuse dar, bei denen dieser Parameter annähernd identisch ist. Obwohl der Serum-Carnitin-Gehalt Carnitin-behandelter wt-, jvs$^{+/-}$- und jvs-Tiere annähernd gleich war, zeigte sich insgesamt auch hier die bereits bei den unbehandelten Gruppen beobachtete Abhängigkeit des Infarktareals von der Octn2-Funktion. Dabei muss berücksichtigt werden, dass der Carnitin-Spiegel im Serum nicht dem der Kardiomyozyten entspricht. Während dieser unter Carnitin-Gabe bei eingeschränkter Octn2-Funktion im Serum ähnliche Werte erreicht wie in Wildtypen, könnte der kardiale Carnitin-Spiegel im Vergleich zu wt-Tieren deutlich geringer sein. Dieses Phänomen konnte bereits im ersten Studienteil zur Herzfunktion heterozygoter jvs-Mäuse (vgl. Abb. 29B) sowie von Kuwajima *et al.*[173] beobachtet werden. Während der kardiale Carnitin-Spiegel unter Carnitin-Gabe von jvs$^{+/-}$-Tieren im Vergleich zu Wildtypen nur geringfügig vermindert war, lag dieser bei behandelten jvs-Tieren deutlich reduziert vor. Im Vergleich zu den im ersten Studienteil ermittelten Carnitin-Spiegeln zeigten sich jedoch auch partielle Unterschiede. Diese könnten in dem

unterschiedlichen Alter der Tiere als auch der unterschiedlich langen Applikationsdauer des Carnitins begründet sein. Die Carnitin-Spiegel in den drei Gruppen, waren jedoch, relativ zueinander, vergleichbar.

Zur Beurteilung des Myokardinfarkts wurden weiterhin Troponin und das herzspezifische Fettsäure-bindende Protein (h-FABP) als Biomarker im Serum bestimmt. Da Troponin T und I im Herzmuskel eine besondere Isoform (cTnT/cTnI) exprimieren[174,175] und nach einem Myokardinfarkt[176] sowie bei Myokarditis[177] erhöhte Level aufweisen, können beide Peptide zur Diagnose von myokardialen Schäden herangezogen werden. FABPs liegen im Cytoplasma von Fettsäure-verwendenden Zellen in Leber, Skelettmuskulatur und Herz vor.[178] Nach Zellschädigung durch myokardiale Ischämie wird h-FABP rasch in die Zirkulation freigesetzt, von wo aus es unverändert über die Nieren ausgeschieden wird. H-FABP (als früher Marker) und cTnT/cTnI (als spezifische Marker) sind demnach mögliche Kandidaten für die biochemische Bestimmung des myokardialen Schadens.[179] Für beide Marker zeigten sich jedoch keine Genotyp-abhängigen oder behandlungsbedingten Unterschiede. Eine Erklärung hierfür könnte die cTnT-Plasma-Konzentration sein, die erst 48 Stunden nach Operation einen hochspezifischen und sensitiven Indikator für kardiale Nekrosen darstellt und dabei nicht mit der Infarktgröße korreliert.[179] Die Plasma-h-FABP-Konzentration korreliert hingegen bereits 4 Stunden nach Gefäßverschluss mit der Infarktgröße.[179] Da es sich bei uns jedoch um einen akuten Myokardinfarkt handelte, betrug die postoperative Zeit, einschließlich Reperfusionsphase, lediglich 2,5 Stunden, so dass hier evtl. vor der möglichen Veränderung dieses Parameters gemessen wurde. Bei den Carnitin-substituierten jvs-Mäusen passt zwar der, im Vergleich zu unsubstituierten Tieren, höhere h-FABP-Spiegel zu deren größeren Infarktarealen, aufgrund der geringen Anzahl äußert sich dies jedoch nicht in einem signifikanten Unterschied. Insgesamt korreliert der vorliegende h-FABP-Spiegel aller Gruppen nicht mit dem Infarktareal der Tiere. Möglicherweise ist die Zeitspanne, ähnlich wie bei der Bestimmung des Troponin-Gehalts, zu kurz, um eventuelle Effekte zu detektieren.

Insgesamt zeigte sich bei den Untersuchungen zum Herzinfarkt ein deutlicher Gendosis-Effekt, welcher zudem durch Gabe des OCTN2-Substrats Carnitin teilweise aufgehoben werden konnte. Ein geringerer Carnitin-Gehalt kann damit als positiv für die Größe eines Myokardinfarkts angesehen werden. Mit Mildronat steht bereits ein klinisch eingesetzter Hemmstoff der Carnitin-Biosynthese und des -Transports zur Verfügung. Unsere Arbeiten

zeigen jedoch, dass auch eine alleinige OCTN2-Hemmung hier protektiv ist. Dieser Umstand könnte für die Entwicklung neuer Substanzen genutzt werden, um beispielsweise die endogene Carnitin-Synthese nicht zu beeinflussen, was unter Umständen ein Vorteil gegenüber dem Mildronat sein könnte. Weiterhin sollte vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse untersucht werden inwieweit der Carnitin-Spiegel mit dem Auftreten von Herzinfarkten bzw. deren Ausprägung assoziiert ist. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass es genetische Varianten des OCTN2 gibt, für die eine geringfügige Beeinflussung des Carnitin-Spiegels gezeigt werden konnte. Auch der bislang häufige Einsatz von Carnitin als Nahrungsergänzungsmittel sollte angesichts dieser Ergebnisse – zumindest bei Risikopatienten – kritisch hinterfragt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den Haupttodesursachen in der westlichen Bevölkerung. Die Morbidität und Mortalität der Herzinsuffizienz und ischämischer Erkrankungen sind trotz vielfältiger Therapieansätze weiterhin sehr hoch. Bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) konnte hinsichtlich der Genexpression des Carnitin-Transporters OCTN2 eine deutliche Reduktion festgestellt werden.[77] Diese korrelierte signifikant mit einer verminderten Ejektionsfraktion (EF)[77] und stellt somit einen möglichen Risikofaktor für die Entwicklung bzw. Progression einer DCM dar. Physiologisch ist die OCTN2-vermittelte Carnitin-Aufnahme von besonderer Bedeutung für die Energiegewinnung der Zelle über die β-Oxidation. Zusätzlich zu dieser endogenen Verbindung können jedoch auch zahlreiche Arzneistoffe, wie Mildronat, von OCTN2 transportiert werden und die Carnitin-Aufnahme hemmen. Ein Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es demzufolge, den Einfluss einer verminderten OCTN2-Funktion auf die Entwicklung einer DCM, anhand hämodynamischer Analysen (MRT und Konduktanz-Katheter-Technik) zu überprüfen. Dafür wurden Mäuse, die homo- oder heterozygot eine Mutation im *Octn2*-Gen (Slc22a5) aufwiesen (sogenannte *juvenile viscerale Steatose*-Mäuse) und entsprechende Kontrolltiere als Modell verwendet. Die heterozygot-defizienten Tiere unterschieden sich dabei sowohl hinsichtlich des Gehalts an freiem Carnitin im Serum und im Herzgewebe als auch hinsichtlich der hämodynamischen Parameter (wie z. B. EF, LVRI und dP/dt_{min}) nur wenig von den Kontrollen. Die Modulation des Carnitin-Spiegels durch pharmakologische Intervention mit Mildronat ging zwar mit einer Verminderung des Carnitin-Spiegels einher, resultierte jedoch nicht in einer pathophysiologisch veränderten Herzfunktion. Interessanterweise deuten einige kardiale und molekularbiologische Parameter (wie z. B. EF und NT-proBNP-Gehalt) unter Hemmung des OCTN2 tendenziell sogar auf eine leicht verbesserte Herzfunktion hin.

Außerdem wurde in diesem Tiermodell auch der Einfluss der OCTN2-Funktion und damit der Carnitinversorgung für das Ausmaß der Gewebeschädigung beim akuten Myokardinfarkt untersucht. Diese Untersuchungen zeigten ebenfalls keine negativen Auswirkungen bei verminderter OCTN2-Funktion. Sie sprachen im Gegenteil für eine protektive Wirkung eines reduzierten Carnitin-Spiegels hinsichtlich Ischämie-bedingter kardialer Schädigungen. So

zeigte sich ein deutlicher Gendosis-Effekt hinsichtlich Carnitin-Spiegel und Infarktareal, der durch Carnitin-Applikation teilweise wieder aufgehoben werden konnte.

Insgesamt ist aus den Untersuchungen zur kardialen Bedeutung von OCTN2 hervorgegangen, dass eine moderate Beeinträchtigung der Transportfunktion und damit der Carnitin-Spiegel keinen negativen Einfluss auf die Herzfunktion besitzt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

(1) DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KARDIOLOGIE-HERZ-UND KREISLAUFFORSCHUNG e.V. Deutscher Herzbericht: Herzmedizin-Fortschritte: Sterblichkeit nimmt weiter ab, immer bessere Versorgung. Neuer Pressetext DKG 01/2014. 2014.

(2) Löster H. Carnitin und Herzinsuffizienz. Carnitin und seine Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen. Bottrop: Ponte Press Verlags-GmbH; 2007:276.

(3) Soukoulis V, Dihu JB, Sole M et al. Micronutrient deficiencies an unmet need in heart failure. J Am Coll Cardiol. 2009;54:1660-1673.

(4) Shaw RD, Li BU, Hamilton JW, Shug AL, Olsen WA. Carnitine transport in rat small intestine. Am J Physiol. 1983;245:G376-G381.

(5) Carter AL, Abney TO, Lapp DF. Biosynthesis and metabolism of carnitine. J Child Neurol. 1995;10 Suppl 2:S3-S7.

(6) Cave MC, Hurt RT, Frazier TH et al. Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition. Nutr Clin Pract. 2008;23:16-34.

(7) Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. Nutr Metab (Lond). 2010;7:30.

(8) Rebouche CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. FASEB J. 1992;6:3379-3386.

(9) Tein I, Bukovac SW, Xie ZW. Characterization of the human plasmalemmal carnitine transporter in cultured skin fibroblasts. Arch Biochem Biophys. 1996;329:145-155.

(10) Gudjonsson H, Li BU, Shug AL, Olsen WA. Studies of carnitine metabolism in relation to intestinal absorption. Am J Physiol. 1985;248:G313-G319.

(11) Li BU, Bummer PM, Hamilton JW et al. Uptake of L-carnitine by rat jejunal brush border microvillous membrane vesicles. Evidence of passive diffusion. Dig Dis Sci. 1990;35:333-339.

(12) Stanley CA. Carnitine deficiency disorders in children. Ann N Y Acad Sci. 2004;1033:42-51.

(13) Glube N, Closs E, Langguth P. OCTN2-mediated carnitine uptake in a newly discovered human proximal tubule cell line (Caki-1). Mol Pharm. 2007;4:160-168.

(14) Ribas GS, Vargas CR, Wajner M. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. Gene. 2014;533:469-476.

(15) Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. Physiol Rev. 1983;63:1420-1480.

(16) Fu L, Huang M, Chen S. Primary Carnitine Deficiency and Cardiomyopathy. Korean Circ J. 2013;43:785-792.

(17) Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C. OCTN cation transporters in health and disease: role as drug targets and assay development. J Biomol Screen. 2013;18:851-867.

(18) Scaglia F, Wang Y, Longo N. Functional characterization of the carnitine transporter defective in primary carnitine deficiency. Arch Biochem Biophys. 1999;364:99-106.

(19) Burlina AP, Sershen H, Debler EA, Lajtha A. Uptake of acetyl-L-carnitine in the brain. Neurochem Res. 1989;14:489-493.

(20) Christiansen RZ, Bremer J. Active transport of butyrobetaine and carnitine into isolated liver cells. Biochim Biophys Acta. 1976;448:562-577.

(21) Kispal G, Melegh B, Alkonyi I, Sandor A. Enhanced uptake of carnitine by perfused rat liver following starvation. Biochim Biophys Acta. 1987;896:96-102.

(22) Bohmer T, Eiklid K, Jonsen J. Carnitine uptake into human heart cells in culture. Biochim Biophys Acta. 1977;465:627-633.

(23) Rebouche CJ, Engel AG. Carnitine transport in cultured muscle cells and skin fibroblasts from patients with primary systemic carnitine deficiency. In Vitro. 1982;18:495-500.

(24) Harmeyer J. The physiological role of L-Carnitine. Lohmann Information. 2002;27:1-8.

(25) Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. J Physiol. 2007;581:431-444.

(26) Zammit VA, Ramsay RR, Bonomini M, Arduini A. Carnitine, mitochondrial function and therapy. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61:1353-1362.

(27) Evangeliou A, Vlassopoulos D. Carnitine metabolism and deficit--when supplementation is necessary? Curr Pharm Biotechnol. 2003;4:211-219.

(28) Morath MA, Okun JG, Muller IB et al. Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria--a pathophysiological approach. J Inherit Metab Dis. 2008;31:35-43.

(29) Schwab MA, Sauer SW, Okun JG et al. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. Biochem J. 2006;398:107-112.

(30) Bonnet D, Martin D, Pascale DL et al. Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. Circulation. 1999;100:2248-2253.

(31) Bieber LL, Choi YR. Isolation and identification of aliphatic short-chain acylcarnitines from beef heart: possible role for carnitine in branched-chain amino acid metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74:2795-2798.

(32) Quistad GB, Staiger LE, Schooley DA. The role of carnitine in the conjugation of acidic xenobiotics. Drug Metab Dispos. 1986;14:521-525.

(33) Millington DS, Bohan TP, Roe CR, Yergey AL, Liberato DJ. Valproylcarnitine: a novel drug metabolite identified by fast atom bombardment and thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. Clin Chim Acta. 1985;145:69-76.

(34) Chapela SP, Kriguer N, Fernandez EH, Stella CA. Involvement of L-carnitine in cellular metabolism: beyond Acyl-CoA transport. Mini Rev Med Chem. 2009;9:1518-1526.

(35) Löster H. Einleitung. Carnitin und seine Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen. Bottrop: Ponte Press Verlags-GmbH; 2007:1-2.

(36) Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Hatem S et al. L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. FASEB J. 1999;13:1501-1510.

(37) Mutomba MC, Yuan H, Konyavko M et al. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. FEBS Lett. 2000;478:19-25.

(38) Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. L-Carnitine protects plasma components against oxidative alterations. Nutrition. 2011;27:693-699.

(39) Shores NJ, Keeffe EB. Is oral L-acyl-carnitine an effective therapy for hepatic encephalopathy? Review of the literature. Dig Dis Sci. 2008;53:2330-2333.

(40) Famularo G, De SC, Trinchieri V, Mosca L. Carnitines and its congeners: a metabolic pathway to the regulation of immune response and inflammation. Ann N Y Acad Sci. 2004;1033:132-138.

(41) Virmani A, Binienda Z. Role of carnitine esters in brain neuropathology. Mol Aspects Med. 2004;25:533-549.

(42) Bigini P, Larini S, Pasquali C, Muzio V, Mennini T. Acetyl-L-carnitine shows neuroprotective and neurotrophic activity in primary culture of rat embryo motoneurons. Neurosci Lett. 2002;329:334-338.

(43) Mroczkowska JE, Galla HJ, Nalecz MJ, Nalecz KA. Evidence for an asymmetrical uptake of L-carnitine in the blood-brain barrier in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 1997;241:127-131.

(44) Shug AL, Schmidt MJ, Golden GT, Fariello RG. The distribution and role of carnitine in the mammalian brain. Life Sci. 1982;31:2869-2874.

(45) Nalecz KA, Nalecz MJ. Carnitine--a known compound, a novel function in neural cells. Acta Neurobiol Exp (Wars). 1996;56:597-609.

(46) Golper TA, Wolfson M, Ahmad S et al. Multicenter trial of L-carnitine in maintenance hemodialysis patients. I. Carnitine concentrations and lipid effects. Kidney Int. 1990;38:904-911.

(47) De PE, Gatti R, Sicolo N et al. Plasma and urine free L-carnitine in human diabetes mellitus. Acta Diabetol Lat. 1981;18:91-95.

(48) Ferrannini E, Buzzigoli G, Bevilacqua S et al. Interaction of carnitine with insulin-stimulated glucose metabolism in humans. Am J Physiol. 1988;255:E946-E952.

(49) Proulx F, Lacroix J, Qureshi IA et al. Acquired carnitine abnormalities in critically ill children. Eur J Pediatr. 1997;156:864-869.

(50) Paulson DJ. Carnitine deficiency-induced cardiomyopathy. Mol Cell Biochem. 1998;180:33-41.

(51) Stanley CA, Bennet MJ. Defects in Metabolism of Lipid. In: Kliegman RM, Behrman RE, Stanton BF, St.Geme J, Schor N, eds. Nelson text-book of pediatrics. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2011:460-461.

(52) Magoulas PL, El-Hattab AW. Systemic primary carnitine deficiency: an overview of clinical manifestations, diagnosis, and management. Orphanet J Rare Dis. 2012;7:68.

(53) Nezu J, Tamai I, Oku A et al. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. Nat Genet. 1999;21:91-94.

(54) Wang Y, Ye J, Ganapathy V, Longo N. Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:2356-2360.

(55) Scaglia F, Wang Y, Singh RH et al. Defective urinary carnitine transport in heterozygotes for primary carnitine deficiency. Genet Med. 1998;1:34-39.

(56) Tamai I, Ohashi R, Nezu J et al. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. J Biol Chem. 1998;273:20378-20382.

(57) Wu X, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. Biochem Biophys Res Commun. 1998;246:589-595.

(58) Treem WR, Stanley CA, Finegold DN, Hale DE, Coates PM. Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle, and fibroblasts. N Engl J Med. 1988;319:1331-1336.

(59) Shibbani K, Fahed A, Al-Shaar L et al. Primary carnitine deficiency: novel mutations and insights into the cardiac phenotype. Clin Genet. 2013.

(60) Kilic M, Ozgul RK, Coskun T et al. Identification of mutations and evaluation of cardiomyopathy in Turkish patients with primary carnitine deficiency. JIMD Rep. 2012;3:17-23.

(61) Koizumi T, Nikaido H, Hayakawa J, Nonomura A, Yoneda T. Infantile disease with microvesicular fatty infiltration of viscera spontaneously occurring in the C3H-H-2(0) strain of mouse with similarities to Reye's syndrome. Lab Anim. 1988;22:83-87.

(62) Breningstall GN. Carnitine deficiency syndromes. Pediatr Neurol. 1990;6:75-81.

(63) Yokogawa K, Higashi Y, Tamai I et al. Decreased tissue distribution of L-carnitine in juvenile visceral steatosis mice. J Pharmacol Exp Ther. 1999;289:224-230.

(64) Kuwajima M, Lu K, Sei M et al. Characteristics of cardiac hypertrophy in the juvenile visceral steatosis mouse with systemic carnitine deficiency. J Mol Cell Cardiol. 1998;30:773-781.

(65) Miyagawa J, Kuwajima M, Hanafusa T et al. Mitochondrial abnormalities of muscle tissue in mice with juvenile visceral steatosis associated with systemic carnitine deficiency. Virchows Arch. 1995;426:271-279.

(66) Takahashi R, Okumura K, Asai T et al. Dietary fish oil attenuates cardiac hypertrophy in lipotoxic cardiomyopathy due to systemic carnitine deficiency. Cardiovasc Res. 2005;68:213-223.

(67) Shekhawat PS, Yang HS, Bennett MJ et al. Carnitine content and expression of mitochondrial beta-oxidation enzymes in placentas of wild-type (OCTN2(+/+)) and OCTN2 Null (OCTN2(-/-)) Mice. Pediatr Res. 2004;56:323-328.

(68) Sonne S, Shekhawat PS, Matern D, Ganapathy V, Ignatowicz L. Carnitine deficiency in OCTN2-/- newborn mice leads to a severe gut and immune phenotype with widespread atrophy, apoptosis and a pro-inflammatory response. PLoS One. 2012;7:e47729.

(69) Tamai I. Pharmacological and pathophysiological roles of carnitine/organic cation transporters (OCTNs: SLC22A4, SLC22A5 and Slc22a21). Biopharm Drug Dispos. 2013;34:29-44.

(70) Ohashi R, Tamai I, Nezu JJ et al. Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. Mol Pharmacol. 2001;59:358-366.

(71) Wu X, Huang W, Prasad PD et al. Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. J Pharmacol Exp Ther. 1999;290:1482-1492.

(72) Urban TJ, Gallagher RC, Brown C et al. Functional genetic diversity in the high-affinity carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). Mol Pharmacol. 2006;70:1602-1611.

(73) Tamai I, Ohashi R, Nezu JI et al. Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. J Biol Chem. 2000;275:40064-40072.

(74) Iwata D, Kato Y, Wakayama T et al. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN2 (SLC22A5) in distribution of its substrate carnitine to the heart. Drug Metab Pharmacokinet. 2008;23:207-215.

(75) Grube M, Meyer Zu SH, Draber K et al. Expression, localization, and function of the carnitine transporter octn2 (slc22a5) in human placenta. Drug Metab Dispos. 2005;33:31-37.

(76) Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Prager D et al. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). Circulation. 2006;113:1114-1122.

(77) Grube M, Ameling S, Noutsias M et al. Selective regulation of cardiac organic cation transporter novel type 2 (OCTN2) in dilated cardiomyopathy. Am J Pathol. 2011;178:2547-2559.

(78) Osterziel KJ, Hassfeld S, Geier C, Perrot A. [Familial dilated cardiomyopathy]. Herz. 2005;30:529-534.

(79) Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report-2000. J Heart Lung Transplant. 2000;19:909-931.

(80) Richardson P, McKenna W, Bristow M et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. Circulation. 1996;93:841-842.

(81) Felker GM, Thompson RE, Hare JM et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. N Engl J Med. 2000;342:1077-1084.

(82) Schonberger J, Seidman CE. Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy. Am J Hum Genet. 2001;69:249-260.

(83) Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. Cell. 2001;104:557-567.

(84) Lango R, Smolenski RT, Narkiewicz M, Suchorzewska J, Lysiak-Szydlowska W. Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. Cardiovasc Res. 2001;51:21-29.

(85) Shug AL, Thomsen JH, Folts JD et al. Changes in tissue levels of carnitine and other metabolites during myocardial ischemia and anoxia. Arch Biochem Biophys. 1978;187:25-33.

(86) Najafi M, Garjani A. Short term administration of L-carnitine can be detrimental to the ischemic heart. Adv Pharm Bull. 2014;4:1-3.

(87) Ford DA. Alterations in myocardial lipid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. Prog Lipid Res. 2002;41:6-26.

(88) Gaby AR. Nutritional treatments for acute myocardial infarction. Altern Med Rev. 2010;15:113-123.

(89) Spagnoli LG, Corsi M, Villaschi S, Palmieri G, Maccari F. Myocardial carnitine deficiency in acute myocardial infarction. Lancet. 1982;1:1419-1420.

(90) Saddik M, Lopaschuk GD. Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. J Biol Chem. 1991;266:8162-8170.

(91) Lopaschuk G. Regulation of carbohydrate metabolism in ischemia and reperfusion. Am Heart J. 2000;139:S115-S119.

(92) Arsenian MA. Carnitine and its derivatives in cardiovascular disease. Prog Cardiovasc Dis. 1997;40:265-286.

(93) Ferrari R, Merli E, Cicchitelli G et al. Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on cardiovascular diseases: a review. Ann N Y Acad Sci. 2004;1033:79-91.

(94) Lopaschuk GD. Carnitine and myocardial glucose metabolism. In: De Dimone C, Famkularo, G, eds. Carnitine today. Austin (Tx): R.G. Landes; 1997:71-93.

(95) Fragasso G. Inhibition of free fatty acids metabolism as a therapeutic target in patients with heart failure. Int J Clin Pract. 2007;61:603-610.

(96) Wang W, Lopaschuk GD. Metabolic therapy for the treatment of ischemic heart disease: reality and expectations. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2007;5:1123-1134.

(97) Clarke B, Spedding M, Patmore L, McCormack JG. Protective effects of ranolazine in guinea-pig hearts during low-flow ischaemia and their association with increases in active pyruvate dehydrogenase. Br J Pharmacol. 1993;109:748-750.

(98) Kantor PF, Lucien A, Kozak R, Lopaschuk GD. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. Circ Res. 2000;86:580-588.

(99) McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic, and reperfused ischemic rat hearts. Circulation. 1996;93:135-142.

(100) Stanley WC. Partial fatty acid oxidation inhibitors for stable angina. Expert Opin Investig Drugs. 2002;11:615-629.

(101) Stanley WC. Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2004;9 Suppl 1:S31-S45.

(102) Spaniol M, Brooks H, Auer L et al. Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency. Eur J Biochem. 2001;268:1876-1887.

(103) Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. Trends Cardiovasc Med. 2002;12:275-279.

(104) Grigat S, Fork C, Bach M et al. The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. Drug Metab Dispos. 2009;37:330-337.

(105) Kuwajima M, Harashima H, Hayashi M et al. Pharmacokinetic analysis of the cardioprotective effect of 3-(2,2, 2-trimethylhydrazinium) propionate in mice: inhibition of carnitine transport in kidney. J Pharmacol Exp Ther. 1999;289:93-102.

(106) Asaka N, Muranaka Y, Kirimoto T, Miyake H. Cardioprotective profile of MET-88, an inhibitor of carnitine synthesis, and insulin during hypoxia in isolated perfused rat hearts. Fundam Clin Pharmacol. 1998;12:158-163.

(107) Liepinsh E, Vilskersts R, Loca D et al. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. J Cardiovasc Pharmacol. 2006;48:314-319.

(108) Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV et al. 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. Biochem Pharmacol. 1988;37:195-202.

(109) Sesti C, Simkhovich BZ, Kalvinsh I, Kloner RA. Mildronate, a novel fatty acid oxidation inhibitor and antianginal agent, reduces myocardial infarct size without affecting hemodynamics. J Cardiovasc Pharmacol. 2006;47:493-499.

(110) Lundeen G, Manohar M, Parks C. Systemic distribution of blood flow in swine while awake and during 1.0 and 1.5 MAC isoflurane anesthesia with or without 50% nitrous oxide. Anesth Analg. 1983;62:499-512.

(111) Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG et al. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. Circulation. 1984;70:812-823.

(112) Wei CL, Valvano JW, Feldman MD, Pearce JA. Nonlinear conductance-volume relationship for murine conductance catheter measurement system. IEEE Trans Biomed Eng. 2005;52:1654-1661.

(113) Michael LH, Entman ML, Hartley CJ et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. Am J Physiol. 1995;269:H2147-H2154.

(114) Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS et al. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. Anesthesiology. 2005;102:102-109.

(115) Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. Anesthesiology. 1997;87:361-370.

(116) McKew BA, Smith CJ. Real-Time PCR Approaches for Analysis of Hydrocarbon-Degrading Bacterial Communities. In: Timmis KN, ed. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer Berlin Heidelberg; 2010:3995-4009.

(117) Joubert DM. An analysis of factors influencing post-natal growth and development of the muscle fibre. The Journal of Agricultural Science. 1956;59-102.

(118) De CS, Caselli S, Maron M et al. Left ventricular remodelling index (LVRI) in various pathophysiological conditions: a real-time three-dimensional echocardiographic study. Heart. 2007;93:205-209.

(119) Sjakste N, Kalvinsh I. Mildronat: an antiischemic drug with multiple indications. Pharmacologyonline. 2006;1:1-18.

(120) Houweling AC, van Borren MM, Moorman AF, Christoffels VM. Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease. Cardiovasc Res. 2005;67:583-593.

(121) Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2006;142C:77-85.

(122) Waber LJ, Valle D, Neill C, DiMauro S, Shug A. Carnitine deficiency presenting as familial cardiomyopathy: a treatable defect in carnitine transport. J Pediatr. 1982;101:700-705.

(123) Amat di San FC, Taylor MR, Mestroni L, Botto LD, Longo N. Cardiomyopathy and carnitine deficiency. Mol Genet Metab. 2008;94:162-166.

(124) Koizumi A, Nozaki J, Ohura T et al. Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. Hum Mol Genet. 1999;8:2247-2254.

(125) Hashimoto N, Suzuki F, Tamai I et al. Gene-dose effect on carnitine transport activity in embryonic fibroblasts of JVS mice as a model of human carnitine transporter deficiency. Biochem Pharmacol. 1998;55:1729-1732.

(126) Muller DM, Seim H, Kiess W, Loster H, Richter T. Effects of oral L-carnitine supplementation on in vivo long-chain fatty acid oxidation in healthy adults. Metabolism. 2002;51:1389-1391.

(127) Marciani P, Lindi C, Marzo A et al. L-carnitine and carnitine ester transport in the rat small intestine. Pharmacol Res. 1991;23:157-162.

(128) Sjakste N, Gutcaits A, Kalvinsh I. Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications. CNS Drug Rev. 2005;11:151-168.

(129) Stadler DD, Bale JF, Jr., Chenard CA, Rebouche CJ. Effect of long-term valproic acid administration on the efficiency of carnitine reabsorption in humans. Metabolism. 1999;48:74-79.

(130) Schurch R, Todesco L, Novakova K et al. The plasma carnitine concentration regulates renal OCTN2 expression and carnitine transport in rats. Eur J Pharmacol. 2010;635:171-176.

(131) Primassin S, Ter VF, Mayatepek E, Spiekerkoetter U. Carnitine supplementation induces acylcarnitine production in tissues of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice, without replenishing low free carnitine. Pediatr Res. 2008;63:632-637.

(132) Horiuchi M, Yoshida H, Kobayashi K et al. Cardiac hypertrophy in juvenile visceral steatosis (jvs) mice with systemic carnitine deficiency. FEBS Lett. 1993;326:267-271.

(133) Jacoby C, Molojavyi A, Flogel U et al. Direct comparison of magnetic resonance imaging and conductance microcatheter in the evaluation of left ventricular function in mice. Basic Res Cardiol. 2006;101:87-95.

(134) Horiuchi M, Kobayashi K, Yamaguchi S et al. Primary defect of juvenile visceral steatosis (jvs) mouse with systemic carnitine deficiency is probably in renal carnitine transport system. Biochim Biophys Acta. 1994;1226:25-30.

(135) Tripp ME, Katcher ML, Peters HA et al. Systemic carnitine deficiency presenting as familial endocardial fibroelastosis: a treatable cardiomyopathy. N Engl J Med. 1981;305:385-390.

(136) Iliceto S, Scrutinio D, Bruzzi P et al. Effects of L-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the L-Carnitine Ecocardiografia Digitalizzata Infarto Miocardico (CEDIM) Trial. J Am Coll Cardiol. 1995;26:380-387.

(137) Diaz R, Lorita J, Soley M, Ramirez I. Carnitine worsens both injury and recovery of contractile function after transient ischemia in perfused rat heart. J Physiol Biochem. 2008;64:1-8.

(138) Januzzi JL, Jr., Camargo CA, Anwaruddin S et al. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. Am J Cardiol. 2005;95:948-954.

(139) Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. N Engl J Med. 2002;347:161-167.

(140) Maisel AS, McCullough PA. Cardiac natriuretic peptides:a proteomic window to cardiac function and clinical management. Rev Cardiovasc Med. 2003;4 Suppl 4:S3-12.

(141) McDonagh TA, Holmer S, Raymond I et al. NT-proBNP and the diagnosis of heart failure: a pooled analysis of three European epidemiological studies. Eur J Heart Fail. 2004;6:269-273.

(142) Lowes BD, Minobe W, Abraham WT et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. J Clin Invest. 1997;100:2315-2324.

(143) Abraham WT, Gilbert EM, Lowes BD et al. Coordinate changes in Myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype. Mol Med. 2002;8:750-760.

(144) Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. Lancet. 2004;363:62-64.

(145) Zhang J, Chang L, Chen C et al. Rad GTPase inhibits cardiac fibrosis through connective tissue growth factor. Cardiovasc Res. 2011;91:90-98.

(146) Bronzwaer JG, Heymes C, Visser CA, Paulus WJ. Myocardial fibrosis blunts nitric oxide synthase-related preload reserve in human dilated cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;284:H10-H16.

(147) Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C et al. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. Circulation. 2001;104:39-45.

(148) Zhang P, Xu X, Hu X et al. Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure. Circ Res. 2007;100:1089-1098.

(149) Mungrue IN, Gros R, You X et al. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. J Clin Invest. 2002;109:735-743.

(150) Liepinsh E, Vilskersts R, Zvejniece L et al. Protective effects of mildronate in an experimental model of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rats. Br J Pharmacol. 2009;157:1549-1556.

(151) Vilskersts R, Liepinsh E, Mateuszuk L et al. Mildronate, a regulator of energy metabolism, reduces atherosclerosis in apoE/LDLR-/- mice. Pharmacology. 2009;83:287-293.

(152) Kuka J, Vilskersts R, Cirule H et al. The cardioprotective effect of mildronate is diminished after co-treatment with L-carnitine. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2012;17:215-222.

(153) Tsoko M, Beauseigneur F, Gresti J et al. Enhancement of activities relative to fatty acid oxidation in the liver of rats depleted of L-carnitine by D-carnitine and a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor. Biochem Pharmacol. 1995;49:1403-1410.

(154) Kirimoto T, Nobori K, Asaka N et al. Beneficial effect of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on energy metabolism in ischemic dog hearts. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1996;331:163-178.

(155) Corr PB, Gross RW, Sobel BE. Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. Circ Res. 1984;55:135-154.

(156) Piper HM, Das A. Detrimental actions of endogenous fatty acids and their derivatives. A study of ischaemic mitochondrial injury. Basic Res Cardiol. 1987;82 Suppl 1:187-196.

(157) Yamada KA, McHowat J, Yan GX et al. Cellular uncoupling induced by accumulation of long-chain acylcarnitine during ischemia. Circ Res. 1994;74:83-95.

(158) Knapp AC, Todesco L, Torok M, Beier K, Krahenbuhl S. Effect of carnitine deprivation on carnitine homeostasis and energy metabolism in mice with systemic carnitine deficiency. Ann Nutr Metab. 2008;52:136-144.

(159) Opie LH. Metabolism of the heart in health and disease. II. Am Heart J. 1969;77:100-122.

(160) Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. Physiol Rev. 2005;85:1093-1129.

(161) Essop MF. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. J Physiol. 2007;584:715-726.

(162) Lopaschuk G. The role of fatty acid oxidation in cardiac ischemia and reperfusion. Advanced Studies in Medicine. 2004;4:S803-S807.

(163) Jonassen AK, Aasum E, Riemersma RA, Mjos OD, Larsen TS. Glucose-insulin-potassium reduces infarct size when administered during reperfusion. Cardiovasc Drugs Ther. 2000;14:615-623.

(164) SODI-PALLARES D, TESTELLI MR, FISHLEDER BL et al. Effects of an intravenous infusion of a potassium-glucose-insulin solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. A preliminary clinical report. Am J Cardiol. 1962;9:166-181.

(165) Lysiak W, Toth PP, Suelter CH, Bieber LL. Quantitation of the efflux of acylcarnitines from rat heart, brain, and liver mitochondria. J Biol Chem. 1986;261:13698-13703.

(166) Lysiak W, Lilly K, DiLisa F, Toth PP, Bieber LL. Quantitation of the effect of L-carnitine on the levels of acid-soluble short-chain acyl-CoA and CoASH in rat heart and liver mitochondria. J Biol Chem. 1988;263:1151-1156.

(167) Uziel G, Garavaglia B, Di DS. Carnitine stimulation of pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) in isolated human skeletal muscle mitochondria. Muscle Nerve. 1988;11:720-724.

(168) Broderick TL, Quinney HA, Lopaschuk GD. Carnitine stimulation of glucose oxidation in the fatty acid perfused isolated working rat heart. J Biol Chem. 1992;267:3758-3763.

(169) Feng Q, Lu X, Jones DL, Shen J, Arnold JM. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. Circulation. 2001;104:700-704.

(170) Liu YH, Carretero OA, Cingolani OH et al. Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;289:H2616-H2623.

(171) Sam F, Sawyer DB, Xie Z et al. Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction. Circ Res. 2001;89:351-356.

(172) Chen Y, Traverse JH, Du R, Hou M, Bache RJ. Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart. Circulation. 2002;106:273-279.

(173) Kuwajima M, Horiuchi M, Harashima H et al. Cardiomegaly in the juvenile visceral steatosis (JVS) mouse is reduced with acute elevation of heart short-chain acyl-carnitine level after L-carnitine injection. FEBS Lett. 1999;443:261-266.

(174) Pearlstone JR, Carpenter MR, Smillie LB. Amino acid sequence of rabbit cardiac troponin T. J Biol Chem. 1986;261:16795-16810.

(175) Wilkinson JM, Grand RJ. Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. Nature. 1978;271:31-35.

(176) Mair J. Cardiac troponin I and troponin T: are enzymes still relevant as cardiac markers? Clin Chim Acta. 1997;257:99-115.

(177) Smith SC, Ladenson JH, Mason JW, Jaffe AS. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. Experimental and clinical correlates. Circulation. 1997;95:163-168.

(178) Offner GD, Brecher P, Sawlivich WB, Costello CE, Troxler RF. Characterization and amino acid sequence of a fatty acid-binding protein from human heart. Biochem J. 1988;252:191-198.

(179) Aartsen WM, Pelsers MM, Hermens WT et al. Heart fatty acid binding protein and cardiac troponin T plasma concentrations as markers for myocardial infarction after coronary artery ligation in mice. Pflugers Arch. 2000;439:416-422.

8 ANHANG

Tab. 15 hämodynamische Parameter der MRT-Messung (Mittelwert ± Standardabweichung)

Gruppe	Substanz	Carnitin-Karenz/ Mildronat-Suppl.	Endzahl n	HR [bpm]	CO [ml/min]	EDV [µl]	ESV [µl]	SV [µl]	EF [%]	LVM [mg]	LVRI [g/ml]	EDL [mm]	EDD [mm]	ESL [mm]	ESD [mm]
wt	-	-	13	541,54 ± 14,20	18,16 ± 3,09	55,62 ± 7,63	22,85 ± 4,12	33,54 ± 5,00	58,69 ± 6,30	84,69 ± 6,75	1,46 ± 0,13	7,90 ± 0,42	3,81 ± 0,14	6,94 ± 0,25	2,40 ± 0,21
	Carnitin	-	12	524,58 ± 17,51	17,34 ± 3,24	53,50 ± 10,04	20,58 ± 4,52	33,00 ± 5,66	61,75 ± 2,67	75,00 ± 11,98	1,35± 0,15	7,72 ± 0,31	3,78 ± 0,31	6,68 ± 0,33	2,19 ± 0,26
	Mildronat	16 Wo	12	537,50 ± 27,92	20,30 ± 2,07	61,67 ± 6,75	23,75 ± 4,79	37,75 ± 3,11	61,67 ± 4,64	99,25 ± 7,19	1,55 ± 0,16	8,17 ± 0,33	4,05 ± 0,26	7,29 ± 0,32	2,42 ± 0,29
$jvs^{+/-}$	Carnitin	-	10	526,50 ± 15,64	18,94 ± 5,56	59,30 ± 16,81	22,90 ± 6,44	36,20 ± 10,91	61,20 ± 3,01	86,20 ± 15,94	1,43 ± 0,22	7,85 ± 0,63	3,86 ± 0,28	6,80 ± 0,50	2,29 ± 0,21
	-	4 Wo	11	522,27 ± 21,95	17,74 ± 4,54	55,91 ± 14,17	22,18 ± 6,23	33,91 ± 8,20	60,73 ± 3,26	72,27 ± 12,27	1,25 ± 0,16	7,48 ± 0,58	3,70 ± 0,38	6,50 ± 0,50	2,33 ± 0,26
	-	8 Wo	10	534,00 ± 22,83	17,57 ± 2,49	57,90 ± 8,59	24,80 ± 4,34	33,00 ± 5,42	57,10 ± 4,04	76,20 ± 8,16	1,28 ± 0,22	7,88 ± 0,41	3,77 ± 0,20	6,89 ± 0,33	2,45 ± 0,16
	-	12 Wo	9	530,56 ± 24,55	21,31 ± 3,34	67,44 ± 12,56	27,33 ± 6,52	40,00 ± 6,67	59,56 ± 3,47	90,89 ± 5,88	1,32 ± 0,20	8,40 ± 0,27	4,03 ± 0,28	7,37 ± 0,27	2,50 ± 0,27
	-	16 Wo	11	532,73 ± 19,92	17,48 ± 3,45	55,82 ± 10,70	23,00 ± 4,63	33,00 ± 7,46	58,64 ± 5,95	86,82 ± 11,44	1,49 ± 0,12	7,94 ± 0,48	3,77 ± 0,34	7,02 ± 0,42	2,46 ± 0,20
	Mildronat	4 Wo	9	545,56 ± 19,44	21,98 ± 3,51	62,44 ± 11,51	22,11 ± 5,86	40,33 ± 6,63	64,89 ± 4,48	111,6 ± 10,09	1,73 ± 0,20	8,56 ± 0,25	4,04 ± 0,26	7,57 ± 0,37	2,46 ± 0,40
	Mildronat	8 Wo	10	542,50 ± 24,07	21,51 ± 5,53	60,40 ± 18,21	20,60 ± 7,90	39,90 ± 11,11	66,10 ± 3,83	112,5 ± 18,45	1,85 ± 0,35	8,37 ± 0,33	3,84 ± 0,28	7,39 ± 0,33	2,37 ± 0,33
	Mildronat	12 Wo	10	526,50 ± 25,61	19,81 ± 3,12	58,30 ± 11,02	20,70 ± 5,66	37,70 ± 6,22	64,90 ± 4,51	112,2 ± 11,01	1,90 ± 0,43	8,32 ± 0,18	3,91 ± 0,29	7,27 ± 0,22	2,17 ± 0,26
	Mildronat	16 Wo	10	539,00 ± 15,60	20,22 ± 2,55	59,60 ± 8,47	22,20 ± 4,80	37,50 ± 4,43	62,90 ± 3,48	100,4 ± 8,21	1,62 ± 0,13	8,10 ± 0,18	3,93 ± 0,22	7,28 ± 0,28	2,34 ± 0,31
jvs	Carnitin	-	8	528,13 ± 19,63	20,09 ± 6,01	58,88 ± 14,65	21,13 ± 5,96	37,88 ± 10,63	64,00 ± 5,83	101,4 ± 31,55	1,63 ± 0,19	7,72 ± 0,49	3,94 ± 0,41	6,89 ± 0,59	2,62 ± 0,67
	-	2 Wo	10	539,00 ± 23,55	18,62 ± 2,54	53,60 ± 7,47	19,10 ± 4,04	34,60 ± 4,88	62,30 ± 7,93	122,6 ± 32,05	2,17 ± 0,41	7,90 ± 0,39	3,70 ± 0,30	7,25 ± 0,51	2,31 ± 0,33
	-	4 Wo	10	480,50 ± 65,17	18,77 ± 4,51	74,00 ± 18,89	35,40 ± 23,50	38,80 ± 6,01	56,50 ± 19,24	192,3 ± 45,79	2,54 ± 0,59	9,01 ± 0,63	4,08 ± 0,32	8,36 ± 0,59	2,54 ± 0,89

Tab. 16 hämodynamische Parameter der Konduktanz-Katheter-Messung (Mittelwert ± Standardabweichung) (Teil I).

Gruppe	Substanz	Carnitin-Karenz/ Mildronat-Suppl.	Endzahl n	HR [bpm]	EDV [µl]	ESV [µl]	SV [µl]	EF [%]
wt	-	-	11	587,23 ± 37,61	42,26 ± 7,77	16,56 ± 4,96	25,70 ± 4,74	61,06 ± 7,86
	Carnitin	-	12	522,46 ± 63,62	53,12 ± 10,40	25,85 ± 8,26	27,27 ± 3,51	52,32 ± 7,33
	Mildronat	16 Wo	10	601,39 ± 44,48	50,63 ± 8,54	20,96 ± 7,76	29,67 ± 5,01	59,19 ± 9,60
$jvs^{+/-}$	Carnitin	-	8	568,89 ± 44,47	47,16 ± 11,18	16,77 ± 4,16	30,39 ± 9,34	63,80 ± 7,92
	-	4 Wo	10	591,17 ± 34,33	40,49 ± 9,04	13,78 ± 3,48	26,71 ± 7,12	65,66 ± 6,77
	-	8 Wo	10	575,66 ± 57,53	39,79 ± 6,84	13,47 ± 3,74	26,32 ± 6,18	65,94 ± 9,19
	-	12 Wo	8	589,02 ± 34,82	53,03 ± 10,40	19,50 ± 6,75	33,53 ± 9,76	62,88 ± 12,14
	-	16 Wo	11	578,05 ± 69,41	42,58 ± 11,91	16,27 ± 7,88	26,31 ± 5,52	63,26 ± 9,67
	Mildronat	4 Wo	9	589,31 ± 52,42	53,70 ± 12,58	20,84 ± 6,33	32,85 ± 7,46	61,40 ± 5,66
	Mildronat	8 Wo	6	586,96 ± 57,46	53,32 ± 13,90	19,21 ± 7,37	34,11 ± 8,97	64,53 ± 9,81
	Mildronat	12 Wo	9	591,81 ± 49,44	56,45 ± 12,15	22,26 ± 4,86	34,19 ± 7,94	60,30 ± 3,79
	Mildronat	16 Wo	9	561,80 ± 31,84	47,93 ± 6,10	16,11 ± 3,68	31,82 ± 4,73	66,48 ± 6,14
jvs	Carnitin	-	7	597,05 ± 54,93	46,85 ± 17,64	15,59 ± 5,61	31,25 ± 12,35	66,60 ± 3,46
	-	2 Wo	8	554,95 ± 84,79	45,35 ± 13,35	18,36 ± 10,86	26,98 ± 4,62	62,36 ± 13,65
	-	4 Wo	8	506,32 ± 29,26	61,19 ± 13,26	29,24 ± 18,98	31,95 ± 8,45	55,06 ± 19,34

Tab. 17 hämodynamische Parameter der Konduktanz-Katheter-Messung (Mittelwert ± Standardabweichung) (Teil II).

Gruppe	Substanz	Carnitin-Karenz/ Mildronat-Suppl.	Endzahl n	ESP [mmHg]	EDP [mmHg]	dP/dt_{max} [mmHg/s]	dP/dt_{min}	ESPVR	EDPVR	PRSW	Tau Glantz
wt	-	-	11	88,54 ± 4,03	5,79 ± 1,95	9926,86 ± 2292,98	-8229,47 ± 1773,05	10,38 ± 4,19	0,057 ± 0,015	133,04 ± 36,26	7,38 ± 1,02
	Carnitin	-	12	82,35 ± 9,54	4,86 ± 2,15	6779,85 ± 2118,08	-6496,40 ± 1591,79	7,38 ± 3,04	0,059 ± 0,032	89,24 ± 24,27	9,47 ± 3,46
	Mildronat	16 Wo	10	75,60 ± 12,44	3,18 ± 2,01	8034,97 ± 1897,04	-7047,84 ± 2210,23	6,31 ± 2,02	0,073 ± 0,022	104,06 ± 34,52	9,08 ± 3,41
$jvs^{+/-}$	Carnitin	-	8	87,36 ± 9,74	4,24 ± 1,71	9644,19 ± 2192,62	-7941,84 ± 1763,17	10,03 ± 3,95	0,098 ± 0,026	111,35 ± 21,91	8,31 ± 1,60
	-	4 Wo	10	91,46 ± 9,20	5,35 ± 1,35	9471,22 ± 2372,74	-8074,84 ± 1876,23	9,88 ± 2,87	0,065 ± 0,042	121,50 ± 30,12	7,58 ± 1,29
	-	8 Wo	10	84,41 ± 10,05	6,82 ± 2,49	8080,25 ± 2643,98	-7474,81 ± 1446,00	10,33 ± 3,79	0,056 ± 0,024	102,01 ± 21,82	8,17 ± 1,67
	-	12 Wo	8	85,64 ± 4,63	5,80 ± 1,77	10258,2 ± 1196,44	-8399,98 ± 964,18	6,42 ± 1,90	0,040 ± 0,019	104,41 ± 22,27	6,83 ± 1,22
	-	16 Wo	11	86,64 ± 13,47	5,06 ± 1,72	8220,01 ± 2567,50	-7342,73 ± 2154,48	9,89 ± 5,36	0,140 ± 0,095	104,53 ± 28,94	8,65 ± 2,71
	Mildronat	4 Wo	9	85,61 ± 14,93	4,47 ± 1,13	9303,20 ± 1942,77	-8039,75 ± 1476,82	8,65 ± 2,63	0,052 ± 0,029	125,83 ± 28,84	8,48 ± 2,75
	Mildronat	8 Wo	6	78,72 ± 12,79	4,45 ± 2,16	7051,47 ± 2256,71	-6643,11 ± 2037,38	9,92 ± 6,47	0,055 ± 0,034	89,77 ± 28,65	8,91 ± 2,29
	Mildronat	12 Wo	9	87,27 ± 13,07	4,63 ± 1,68	8783,05 ± 2558,02	-8152,52 ± 2261,65	7,14 ± 3,08	0,079 ± 0,053	113,18 ± 34,78	9,08 ± 4,68
	Mildronat	16 Wo	9	93,63 ± 34,94	2,97 ± 1,69	9408,67 ± 2925,95	-8666,96 ± 2560,40	7,12 ± 1,73	0,118 ± 0,057	126,84 ± 19,69	7,99 ± 2,50
jvs	Carnitin	-	7	87,31 ± 9,83	4,97 ± 1,76	9841,15 ± 2188,86	-7978,65 ± 1181,32	11,12 ± 3,25	0,130 ± 0,110	108,01 ± 24,30	9,25 ± 1,47
	-	2 Wo	8	83,31 ±19,26	4,50 ± 2,58	8226,68 ± 2690,07	-7216,92 ± 2298,84	10,32 ± 3,89	0,078 ± 0,042	99,74 ± 35,39	10,98 ± 3,26
	-	4 Wo	8	69,82 ±12,30	3,58 ± 2,35	5551,05 ± 1358,06	-5156,83 ± 1531,71	5,07 ± 2,38	0,073 ± 0,034	96,20 ± 32,75	13,19 ± 3,67

Tab. 18 Myokardinfarktdaten der verwendeten Tiergruppen

Gruppe	Substanz	Karenz/Dauer der Carnitin-Applikation	Endzahl n	Risikoareal [%]	Infarktareal (von GF) [%]	Infarktareal (von RA) [%]
wt	-	6 Wo	12	52,76 ± 15,16	12,91 ± 4,75	24,24 ± 5,87
	Carnitin	6Wo	13	58,89 ± 17,33	20,02 ± 7,53	34,98 ± 10,88
$jvs^{+/-}$	-	6 Wo	8	45,25 ± 7,54	7,38 ± 3,55	15,76 ± 6,15
	Carnitin	6 Wo	11	41,26 ± 11,16	8,29 ± 4,17	19,44 ± 7,43
jvs	-	2 Wo	3	48,78 ± 28,55	2,94 ± 3,15	5,03 ± 2,74
	Carnitin	6 Wo	7	48,80 ± 9,57	7,89 ± 5,32	16,59 ± 10,82

Tab. 19 Geschlechtsspezifische Myokardinfarktdaten der verwendeten Tiergruppen

Gruppe	Substanz	Karenz/Dauer der Carnitin-Applikation	Endzahl n		Risikoareal [%]		Infarktareal (von GF) [%]		Infarktareal (von RA) [%]	
			m	w	m	w	m	w	m	w
wt	-	6 Wo	7	5	52,31 ± 15,17	53,30 ± 16,92	13,00 ± 4,10	12,80 ± 5,94	24,88 ± 3,44	23,47 ± 8,37
	Carnitin	6Wo	7	6	53,33 ± 16,16	65,38 ± 17,72	21,94 ± 8,37	17,78 ± 6,41	41,06 ± 8,99	27,88 ± 8,65
$jvs^{+/-}$	-	6 Wo	2	6	45,97 ± 0,06	44,96 ± 9,21	9,98 ± 2,28	6,34 ± 3,59	21,71 ± 4,99	18,67 ± 13,75
	Carnitin	6 Wo	6	5	40,71 ± 12,41	41,92 ± 10,85	9,02 ± 4,69	7,41 ± 3,76	21,66 ± 7,45	16,76 ± 7,22
jvs	-	2 Wo	0	3		48,78 ± 28,55		2,94 ± 3,15		5,03 ± 2,74
	Carnitin	6 Wo	3	4	44,88 ± 15,99	50,37 ± 7,92	10,85 ± 8,63	6,71 ± 4,20	25,33 ± 9,72	10,03 ± 6,10

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt sowie keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Greifswald, 11.05.2015

_____

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich sowohl mit praktischer als auch fachlicher Expertise bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heyo K. Kroemer für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die finanzielle Unterstützung zur Realisierung der Versuchsvorhaben.

Herrn Dr. Grube danke ich für die Ermöglichung der sehr guten Forschungsvoraussetzungen und -möglichkeiten, aber auch für die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Matthias Schwebe, Stefan Heinrich und Susan Herzog für die ausgezeichnete praktische Unterstützung bei den Tierversuchen, den vielen spannenden Gesprächen und die sehr angenehme Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Beruflichen und Privaten bedanken.

Ein weiteres aufrichtiges Dankeschön geht an Frau PD Jedlitschky und Sabine Lahmann für die wertvollen fachlichen bzw. sprachlichen Korrekturhinweise und Anmerkungen.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, für ihre fortwährende Unterstützung und ihren Glauben an mich. Sie haben dabei geholfen, jede neue Herausforderung zu bewältigen.