

UNIVERSITÄTSKLINIKUM DES SAARLANDES
INNERE MEDIZIN III KARDIOLOGIE, ANGIOLOGIE UND INTERNISTISCHE INTENSIVMEDIZIN
KLINISCHE UND EXPERIMENTELLE MEDIZIN HOMBURG/SAAR
PROF. DR. ULRICH LAUFS

**Die AMP-Kinase als zentraler Mediator in der Verhinderung
Fettsäure-induzierter Apoptose und Lipidakkumulation in
Kardiomyozyten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

Lucas Adrian
geboren am 13.07.1990 in Sankt Wendel

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Zusammenfassung	8
1.1 Zusammenfassung.....	8
1.2 Abstract.....	10
2 Einleitung.....	12
2.1 Grundlagen des kardiomyozytären Fettsäuremetabolismus	12
2.1.1 Energiegewinnung durch Fettsäuren unter physiologischen Bedingungen	12
2.1.2 Die Rolle von Fettsäuren bei myokardialer Hypertrophie	13
2.2 Pathomechanismus der Myokardhypertrophie	14
2.3 Funktion der 5´-AMP-aktivierten Proteinkinase	16
2.4 Kardiomyozytäre Hypertrophie in der Python.....	18
2.5 Ziel der Arbeit.....	20
3 Material	21
3.1 Antikörper.....	21
3.1.1 Primärantikörper	21
3.1.2 Sekundärantikörper	21
3.2 Enzyme, Kits	22
3.3 Lösungen, Medien, Puffer	22
3.4 Sonstige Substanzen	24
3.5 Verbrauchsmaterialien	26
3.6 Geräte	26
3.7 Auswertprogramme.....	28
4 Methoden.....	29
4.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten neonataler Ratten	29
4.2 Proteinisolation für Western Blot.....	30
4.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry.....	31

4.4 Western Blot Analyse	31
4.4.1 Gelelektrophorese	31
4.4.2 Proteintransfer	32
4.4.3 Proteindetektion.....	33
4.5 Durchflusszytometrische Analyse	33
4.5.1 Analyse der Zellgröße	34
4.5.2 Analyse von Nekrose und Apoptose.....	34
4.6 Histologische Analyse	36
4.6.1 Anfertigung von Paraffinschnitten.....	36
4.6.2 HE-Färbung	37
4.6.3 Sirius-Red-Färbung	37
4.7 Mausmodell.....	38
4.7.1 Tierhaltung	38
4.7.2 Echokardiographie.....	38
4.7.3 Aortenligatur	38
4.7.4 Invasive Hämodynamikmessung	39
4.7.5 Tötung der Tiere und Organentnahme	40
4.8 Fettsäuresynthese.....	41
4.9 Fettsäure-Behandlung.....	43
4.9.1 Fettsäure-Behandlung im Mausmodell	43
4.9.2 Fettsäure-Behandlung isolierter Kardiomyozyten in Zellkultur.....	44
5 Ergebnisse.....	45
5.1 Ergebnisse Pilotprojekt nach 7 Tagen Fettsäure-Behandlung mit ALZET® mini-osmotischen Pumpen.....	45
5.1.1 Eine in-vivo-Behandlung von C57/Bl6-Mäusen mit dem Fettsäure-Mix über 7 Tage führt zu signifikanter Serum-Konzentrationszunahme von Palmitolein-, Myristin- und Palmitinsäure.....	45

5.1.2 Eine Applikation des Fettsäure-Mix über 7 Tage führt nicht zu einer signifikanten Änderung echokardiographischer Parameter	46
5.1.3 Eine Applikation des Fettsäure-Mix über 7 Tage führt nicht zu einer signifikanten Änderung von Herzgewicht, Körpergewicht und intrapulmonaler Flüssigkeitsmenge.....	47
5.1.4 Eine 7 tägige Behandlung mit dem Fettsäure-Mix führt nicht zu einer signifikanten Steigerung der Myozytenfläche im HE-Präparat.....	48
5.1.5 Eine 7 tägige Behandlung mit dem Fettsäure-Mix führt nicht zu einer signifikanten Änderung der Myokardfibrose	49
5.2 Ergebnisse Mausmodell nach 5 Wochen Fettsäure-Behandlung.....	50
5.2.1 Serummessung nach 5 Wochen.....	50
5.2.2 Der Fettsäure-Mix führt nach 5 Wochen echokardiographisch nicht zu kardialer Hypertrophie	51
5.2.3 Der Fettsäure-Mix hat keinen Einfluss auf Herz- und Körpergewicht	53
5.2.4 Der Fettsäure-Mix führt nach 5 Wochen in der HE-Färbung nicht zu Hypertrophie.....	54
5.2.5 Fibrose Sirius-Red.....	55
5.3 Zellkultur-Ergebnisse	56
5.3.1 Die Behandlung mit Myristinsäure, nicht jedoch mit dem Fettsäure-Mix führt zu signifikanter Größenzunahme der Kardiomyozyten.....	56
5.3.2 Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Palmitinsäure, nicht jedoch mit dem Fettsäure-Mix, führt zu vermehrter Apoptose	57
5.3.3 Sowohl der Fettsäure-Mix als auch der AMPK-Aktivator AICAR führen zu einer gesteigerten Phosphorylierung der AMPK, welche bei Behandlung mit Palmitinsäure ausbleibt.....	58
5.3.4 Im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit Palmitinsäure führen der Fettsäure-Mix und AICAR zu einer gesteigerten Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase	60
5.3.5 AICAR verhindert eine Palmitinsäure-induzierte Expressionssteigerung der Fettsäure-Translokase FAT/CD36.....	61

5.3.6 Aktivierung der AMP-Kinase verhindert Palmitinsäure-induzierte Lipidakkumulation.....	62
5.3.7 Palmitinsäure führt zu gesteigerter Phosphorylierung der Stress-aktivierten Proteinkinase SAPK/JNK.....	63
5.3.8 AMPK-Aktivator AICAR verhindert eine gesteigerte Apoptose durch Palmitinsäure.....	64
5.3.9 Die Inhibition der AMP-Kinase mittels Compound C führt zu gesteigerter Apoptose und ADRP-Expression	65
5.3.10 Ergebnisschema.....	67
6 Diskussion	69
6.1 Zusammenhang zwischen dem Fettsäure-Mix und kardialer Hypertrophie.....	69
6.2 Metabolische Veränderungen durch den Fettsäure-Mix und durch Palmitinsäure	71
6.3 Limitationen der Arbeit	74
6.4 Zusammenfassung der Studienergebnisse	74
7 Literaturverzeichnis	75
8 Dank	81

Abkürzungsverzeichnis

ACC Acetyl-CoA-Carboxylase

ADRP	adipose differentiation-related protein
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	5'-AMP-aktivierte Kinase
ANP	atrial natriuretic peptide
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	brain natriuretic peptide
BSA	bovines Serumalbumin
CBS	Cystathionin- β -Synthase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
eEF	eukaryontischer Elongationsfaktor
FABP	fatty acid binding protein
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAT/CD36	Fettsäuretranslokase CD36
FCS	forward scatter
FS-Mix	Fettsäure-Mix
GCMS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
GLUT	Glucose-Transporter
HCL	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LKB1	Liver Kinase B1
MHC	myosin heavy chain
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCS	newborn calf serum

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptors
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
SAPK/JNK	Stress-aktivierten Proteinkinase/Jun-amino-terminal-kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	side scatter
TAC	transaortic constriction
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Thr	Threonin
TSC	Tuberous sclerosis complex, Tuberin
Tyr	Tyrosin

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Die AMP-Kinase als zentraler Mediator in der Verhinderung Fettsäure-induzierter Apoptose und Lipidakkumulation in Kardiomyozyten

Palmitinsäure ist die am stärksten vertretene Fettsäure in unserer Nahrung und kann zytotoxische und apoptotische Effekte induzieren, wobei der Mechanismus noch weitgehend unklar ist [1]. Riquelme et al. beschrieben die myokardiale Wirkung einer spezifischen Kombination der Fettsäuren Palmitin-, Myristin- und Palmitoleinsäure (später als FS-Mix bezeichnet) im molaren Verhältnis von 16:6:1. [2; Science, 2011]. Diese Fettsäurekombination war in Schlangen (Pythons) nach einer großen Mahlzeit für eine physiologische kardiomyozytäre Hypertrophie verantwortlich und führte auch in Mäusen zu kardialer Hypertrophie [2]. Das Ziel dieser Arbeit war, den zugrunde liegenden Mechanismus weiter zu charakterisieren.

Der FS-Mix wurde über subkutane ALZET® mini-osmotische Pumpen über einen Zeitraum von 7 Tagen bei C57/Bl6 Mäusen infundiert. In einem zweiten Versuch wurden die Fettsäuren mittels subkutaner Spritzeninjektion über 5 Wochen zugeführt. Entgegen der Studienhypothesen wurde nach Behandlung der Mäuse mit dem FS-Mix keine Hypertrophie oder signifikante Veränderungen hämodynamischer Parameter beobachtet.

In weiteren Versuchsreihen wurden neonatale ventrikuläre Ratten-Kardiomyozyten mit dem FS-Mix oder mit Palmitinsäure behandelt. Durchflusszytometrische Analysen mittels Annexin V und Propidium Iodid zeigten eine auf $158 \pm 3\%$ gesteigerte Apoptose in den mit Palmitinsäure, nicht jedoch in den mit dem FS-Mix behandelten Kardiomyozyten. Die Behandlung mit dem FS-Mix führte im Gegensatz zur Behandlung mit Palmitinsäure zu einer auf $155 \pm 19\%$ gesteigerten Phosphorylierung der AMP aktivierten Proteinkinase (AMPK). Die AMPK ist eine ubiquitär exprimierte Proteinkinase und ein zentraler Regulator des zellulären Energiemetabolismus [3]. Die AMPK ist in der Lage, die Fettsäureoxidation unabhängig von der Fettsäureaufnahme zu steigern [4]. Die Phosphorylierung des AMPK-Target Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), dem Hauptregulator der Fettsäureoxidation, war in den mit dem FS-Mix behandelten Kardiomyozyten auf $177 \pm 23\%$ gesteigert. Die Behandlung

mit Palmitinsäure führte nicht zu einer Aktivierung von AMPK und ACC, jedoch zu einer auf $163 \pm 23\%$ gesteigerten Expression der Fettsäuretranslokase CD36 (FAT/CD36), welche für die Aufnahme von 50-70% der Fettsäuren im Herzen verantwortlich ist [5]. Die Expression von FAT/CD36 wurde durch den FS-Mix nicht beeinflusst. Da Palmitinsäure zu einer potentiell lipotoxischen Konstellation von gesteigerter Fettsäureaufnahme bei gleichbleibender Fettsäureoxidation führte, wurde auch ADRP (adipose differentiation-related protein), ein sensibler Marker für Lipidakkumulation, untersucht [6]. ADRP wurde lediglich in den mit Palmitinsäure behandelten Zellen mit $168 \pm 42\%$ vermehrt exprimiert. Dies war mit einer auf $172 \pm 22\%$ bzw. $173 \pm 27\%$ gesteigerten Phosphorylierung der Stress-aktivierten Proteinkinase/Jun-amino-terminal-kinase (SAPK/JNK) an Thr183 bzw. Tyr185 assoziiert. In mit dem FS-Mix behandelten Zellen blieb die Phosphorylierung der SAPK/JNK unverändert.

Präinkubation mit dem AMPK-Aktivator AICAR steigerte die AMPK- und ACC-Phosphorylierung in mit Palmitinsäure behandelten Zellen auf $170 \pm 30\%$ bzw. $242 \pm 33\%$. Zudem verhinderte die Präinkubation mit AICAR eine Hochregulierung von ADRP und eine gesteigerte Apoptose in Kardiomyozyten, die mit Palmitinsäure behandelt wurden. In Einklang mit diesen Beobachtungen führte eine Inhibition der AMPK durch Compound C in Kardiomyozyten, die mit dem FS-Mix behandelt wurden, zu einer Steigerung der ADRP-Expression auf $154 \pm 27\%$ und einer Steigerung der Apoptose auf $183 \pm 12\%$. Alle Ergebnisse waren signifikant mit $p < 0,05$.

Zusammenfassend führte Palmitinsäure in Kardiomyozyten zu Lipidakkumulation und gesteigerter Apoptose. Die Kombination von Palmitinsäure mit Myristin- und Palitoleinsäure (FS-Mix) führte zu gesteigerter Phosphorylierung der AMPK und verhinderte Palmitinsäure-induzierte Lipidakkumulation und Apoptose. Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren die AMPK als einen wichtigen Mediator in der Verhinderung von Fettsäure-induzierter Apoptose in Kardiomyozyten.

1.2 Abstract

AMP kinase prevents fatty acid induced apoptosis and lipid accumulation in cardiomyocytes

Palmitic acid is the main fatty acid occurring naturally in human nutrition and is known to induce cytotoxic and apoptotic effects in cardiomyocytes, however the underlying mechanisms are incompletely understood [1]. Riquelme et al. described the myocardial effect of a specific combination of the fatty acids palmitic, myristic and palmitoleic acid (later called FS-Mix) in a molar ratio of 16:6:1 [2; Science, 2011]. This fatty acid combination was described to cause a physiological hypertrophy of cardiomyocytes in snakes (pythons) after a big meal and was also found to cause cardiac hypertrophy in mice [2]. The aim of this study was to characterize the underlying mechanism.

The FS-Mix was applied by subcutaneous ALZET® mini-osmotic pumps for 7 days in C57/Bl6 mice. In a second experiment fatty acids were applied by subcutaneous injection over 5 weeks. Contrary to the study hypothesis hypertrophy or significant changes of hemodynamic parameters were not observed after treatment with the FS-Mix.

In further experiments neonatal rat ventricular cardiomyocytes were treated with the FS-Mix or palmitic acid. Flow cytometry using annexin V and propidium iodide revealed an increase of apoptosis to $158 \pm 3\%$ in cardiomyocytes treated with palmitic acid but not FS-Mix compared to untreated cells. Treatment with FS-Mix but not palmitic acid resulted in increased phosphorylation of AMP activated protein kinase (AMPK) to $155 \pm 19\%$. AMPK is an ubiquitarily expressed kinase regulating cellular energy metabolism [3]. AMPK is able to mediate up-regulation of fatty acid oxidation independent of fatty acid uptake [4]. Consequently, the phosphorylation of the AMPK target Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), that is a main regulator of fatty acid oxidation, was increased to $177 \pm 23\%$ in FS-Mix treated cardiomyocytes. Treatment of cardiomyocytes with palmitic acid failed to activate AMPK and ACC, but resulted in increased expression of fatty acid translocase CD36 (FAT/CD36) to $163 \pm 23\%$ which is responsible for 50-70% of fatty acid uptake in the heart [5]. FAT/CD36 expression in cardiomyocytes treated with FS-Mix was unaffected. Since palmitic acid treatment induced a potentially lipotoxic constellation of elevated fatty acid uptake without

increasing fatty acid oxidation, adipose differentiation-related protein (ADRP), a sensitive marker for cytosolic lipid accumulation, was assessed [6]. Expression of ADRP was increased to $168\pm42\%$ only in palmitic acid treated cells. This was associated with an increased phosphorylation of the stress-activated protein kinase/Jun-amino-terminal-kinase (SAPK/JNK) at Thr183 and Tyr185 to $172\pm22\%$ and $173\pm27\%$, respectively. In FS-Mix treated cells, phosphorylation of SAPK/JNK was unaltered.

Preincubation with the AMPK activator AICAR increased AMPK and ACC phosphorylation in palmitic acid treated cells to $170\pm30\%$ and $242\pm33\%$ respectively. In addition, pre-incubation with AICAR prevented up-regulation of ADRP and increased apoptosis in cardiomyocytes treated with palmitic acid. Confirming these findings, inhibition of AMPK by Compound C in FS-Mix treated cardiomyocytes resulted in increased ADRP expression to $154\pm27\%$ and increased apoptosis to $183\pm12\%$. All effects were significant with $p<0.05$.

In summary, treatment of cardiomyocytes with palmitic acid induced lipid accumulation resulting in increased apoptosis. Treatment with palmitic acid in combination with myristic and palmitoleic acid (FS-Mix) increased phosphorylation of AMPK and prevented palmitic acid induced lipid accumulation and apoptosis. The data identify AMPK as an important mediator in prevention of fatty acid induced apoptosis in cardiomyocytes.

2 Einleitung

2.1 Grundlagen des kardiomyozytären Fettsäuremetabolismus

2.1.1 Energiegewinnung durch Fettsäuren unter physiologischen Bedingungen

Von entscheidender Bedeutung für eine physiologische kontraktile Funktion der Kardiomyozyten ist die ständige Bereitstellung energiereicher Phosphate wie Kreatinphosphat und Adenosintriphosphat (ATP). Dabei stellen unter physiologischen Bedingungen Fettsäuren die wichtigste Energiequelle dar. Mehr als die Hälfte der ATP-Produktion im Myokard ist auf die Oxidation gesättigter und einfach ungesättigter Fettsäuren zurückzuführen [7]. Allerdings besitzt das Herz eine ausgeprägte Substratflexibilität, so dass abhängig von Substratangebot und Arbeitsbelastung eine Änderung der Substratpräferenz stattfindet. Dabei werden als Energielieferanten neben Fettsäuren Glucose, Laktat, Aminosäuren, Pyruvat und Ketonkörper verstoffwechselt. Bei maximaler Leistung steigt dabei der Anteil der durch Kohlenhydrate gewonnenen Energie [8].

Der Transport der freien Fettsäuren zum Herzen erfolgt gebunden an das Transportprotein Albumin [9]. Die Aufnahme in die Kardiomyozyten erfolgt über Fettsäuretransporter. Dabei spielt neben der Familie der fatty acid binding proteins (FABP) die Fettsäuretranslokase FAT/CD36, die für die Aufnahme von über der Hälfte der im Myokard vorhandenen Fettsäuren verantwortlich ist, eine herausragende Rolle [10]. Der eigentlich energieliefernde Prozess der Betaoxidation findet im Mitochondrium statt. Damit die reaktionsträgen Fettsäuren dorthin gelangen, müssen sie vorher aktiviert werden. Die Kopplung an Coenzym A und somit die Bildung von Acyl-CoA schafft eine energiereiche Thioesterbindung, die die weiteren Reaktionsschritte ermöglicht. Im Folgenden wird die Acylgruppe unter Abspaltung von Coenzym A mittels Acyl-Carnitin-Transferase I an Carnitin gekoppelt. Dieses Acylcarnitin wird dann im Antiport mit Carnitin durch den Carnitin-Acylcarnitin-Transporter ins Mitochondrium transportiert. In der mitochondrialen Matrix wird dann der Acylrest durch die Carnitin-Acyltransferase II wieder von Carnitin abgespalten und erneut auf Coenzym A übertragen. Dieser Transportvorgang wird durch Malonyl-CoA, dessen Herstellung durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) -dem Schlüsselenzym der Fettsäurebiosynthese- katalysiert wird, gehemmt. Der ACC

kommt so eine bedeutende Rolle in der Regulation der Fettsäureoxidation zu. Bei der Betaoxidation im Mitochondrium werden die Fettsäuren zunächst so oxidiert, dass die cis- in eine trans-Doppelbindung überführt wird. Dabei wird FAD zu FADH₂ reduziert. Im Folgenden wird an die Doppelbindung Wasser addiert und die entstehende Hydroxygruppe zur Ketogruppe oxidiert. In diesem Zug wird NAD zu NADH+H⁺ reduziert. Durch Abspaltung einer Acetyl-Gruppe und Kopplung an Coenzym A entsteht Acetyl-CoA, das in den Citratzyklus überführt wird oder zur Bildung von Ketonkörpern dient. So wird bei jedem Zyklus die Acylgruppe um 2 Kohlenstoffatome verkürzt. Bei Fettsäuren mit einer ungeraden Zahl an Kohlenstoffatomen entsteht im letzten Schritt Propionyl-CoA (3 Kohlenstoffatome), welches in Succinyl-CoA umgewandelt und dann ebenfalls dem Citratzyklus zugeführt wird. In jeder Oxidationsrunde entstehen somit 1 NADH+H⁺ und 1 FADH₂, die in der Atmungskette 1,5 bzw. 2,5 ATP liefern. Das entstandene Acetyl-CoA liefert über Citratzyklus und Atmungskette 10 ATP. Die vollständige Oxidation der Palmitinsäure mit 16 Kohlenstoffatomen liefert somit 106 ATP. Im Vergleich hierzu erbringt ein Molekül Glucose über die aerobe Atmung nur 32 ATP. Zusammenfassend spielen Fettsäuren unter physiologischen Bedingungen eine zentrale Rolle in der Bereitstellung energiereicher Phosphate im Herzen und garantieren somit die Aufrechterhaltung der kontraktilen Funktion.

2.1.2 Die Rolle von Fettsäuren bei myokardialer Hypertrophie

Metabolisches Remodeling findet in Abhängigkeit von kardialer Belastung und Substratverfügbarkeit statt. Dabei führt ein gesteigerter Energiebedarf nicht proportional zu einer Steigerung der unter physiologischen Bedingungen ablaufenden energieliefernden Prozesse. Der veränderte Energiebedarf durch vermehrte Proteinsynthese und gesteigerte kontraktile Arbeit bei Hypertrophie bedingt eine Verschiebung der Substratpräferenz. Eine Verschiebung der Balance zwischen Fettsäure- und Glucoseutilisation führt zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und somit zu vermehrtem oxidativem Stress. Dabei ist das Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und -Abbau wichtig für die Erhaltung der kardialen Funktion. Daher besitzt das Herz mehrere antioxidative Mechanismen, die die ROS-Level konstant halten [11].

In Mäusen wurde gezeigt, dass die ventrikuläre Druckbelastung bei kardialer Hypertrophie zur Verminderung des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors alpha (PPARalpha) führt. Dies wiederum hat eine Downregulation der Expression von Enzymen der Fettsäureoxidation zur Folge [12] [13]. Die verminderte Fettsäureoxidation ist in Studien mit diabetischen Mäusen mit einem erhöhten Gehalt kardiomyozytärer Triglyceride assoziiert, welche lipotoxisch und proapoptotisch wirken [14]. In Ratten wurde gezeigt, dass eine linksventrikuläre Volumenbelastung über eine verringerte Bildung von L-Carnitin und eine veränderte Aktivität der Carnitin-Acylcarnitin-Transferase sowohl die Aktivierung als auch die Mitochondrientranslokation langkettiger Fettsäuren wie Palmitinsäure vermindert [15]. Neben einer Downregulation der Fettsäureutilisation findet auch eine verminderte Verwertung von Ketonkörpern als Energielieferanten statt [16].

Als Kompensation der energetischen Lücke durch die verminderte Fettsäureoxidation kommt es im hypertrophierten Myokard zu gesteigerter Glucoseaufnahme und Glykolyse [8]. Diese Effekte sind abhängig vom Grad der Hypertrophie und bedingen eine saure Stoffwechsellage durch den vermehrten Anfall von Laktat [17]. Im Rahmen myokardialer Hypertrophie kommt es zusammenfassend zu einer Verschiebung der Substratpräferenz zu Gunsten der Verwertung von Kohlenhydraten, was eine Reihe maladaptiver metabolischer Veränderungen bedingt. Weitere Untersuchungen zum Verständnis der Interaktion zwischen Hypertrophie und Fettsäuremetabolismus sind notwendig.

2.2 Pathomechanismus der Myokardhypertrophie

Die Myokardhypertrophie in Folge linksventrikulärer Druck- oder Volumenbelastung ist ein wichtiger Prädispositionsfaktor für das Auftreten einer chronischen Herzinsuffizienz. Dabei sind die zellulären Signaltransduktionswege und die Auswirkung der Hypertrophie auf den zellulären Energiehaushalt noch nicht ausreichend verstanden.

Während eine Druckbelastung des linken Ventrikels, beispielsweise im Rahmen einer arteriellen Hypertonie, zu einer konzentrischen Hypertrophie mit Verkleinerung des Ventrikellumens und Dickenzunahme der Ventrikelwand nach innen führt, zeigt sich bei einer Volumenüberladung, wie sie bei der Aortenklappeninsuffizienz vorkommt,

zunächst eine Dilatation des Ventrikels und im Folgenden eine exzentrische Hypertrophie mit Zunahme der Wanddicke nach außen. Zudem kommt es nach einem Myokardinfarkt zur Hypertrophie des nichtinfarzierten Myokards [18]. Im Gegensatz zur adaptiven Antwort bei Trainingshypertrophie [19] kommt es durch chronische Druck- oder Volumenbelastung [20] oder auch postischämisch [18] zur Initiierung maladaptiver Prozesse, die mit der Verschlechterung der linksventrikulären Funktion einhergehen und schließlich zu Herzinsuffizienz führen.

Die Myokardhypertrophie ist gekennzeichnet durch eine Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten in Assoziation mit erhöhter Proteinsynthese und Sarkomerdichte [21] [22]. An der Modulation dieser transkriptionalen Veränderungen sind vor allem die Proteinkinase C, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase und die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren beteiligt [22]. Zudem führt die Hypertrophie unabhängig von ihrer Ätiologie zur Reaktivierung des fetalen Genprogramms [20]. Dabei induziert die Aktivierung verschiedener Genprogramme verschiedene Hypertrophietypen [20]. Typischerweise findet man in diesem Zusammenhang eine erhöhte Expression des atrial natriuretic peptide (ANP), des brain natriuretic peptide (BNP), der fetalen Form des Motorproteins myosin heavy chain (MHC) und der fetalen Form der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ [18]. Dabei spielt im klinischen Alltag BNP eine wichtige Rolle in der Beurteilung der Herzinsuffizienz [23].

Die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxide durch die NADPH-Oxidase spielt in der Pathogenese der Hypertrophie eine wichtige Rolle [24].

Hypertrophie führt zur Aktivierung des Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) [24], einem Protein, welches an der Membrantranslokation des Glucosetransporters 4 (GLUT-4) beteiligt ist. Über diesen Mechanismus findet man im hypertrophierten Myokard eine vermehrte GLUT-4-Membranexpression und einen damit assoziierten gesteigerten Glucose-Uptake [25]. Parallel hierzu findet eine verminderte Oxidation von Fettsäuren statt [12] [13]. Dabei ist das physiologische Gleichgewicht zwischen Kohlenhydrat- und Fettsäureutilisation essentiell für die Erhaltung der kontraktilen Funktion im hypertrophierten Myokard [17]. Im hypertrophierten Herzen kommt es somit durch die Aktivierung verschiedener

Stoffwechselwege zur Vergrößerung der Kardiomyozyten bei gesteigerter Proteinsynthese [21] [22], zur Aktivierung des fetalen Genprogramms [20] und zur Verschiebung der Substratpräferenz [12] [13] [25]. Die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation dieser Veränderungen [25].

2.3 Funktion der 5'-AMP-aktivierten Proteinkinase

Die 5'-AMP-aktivierten Kinasen (AMPK) bilden eine Familie von Isoenzymen, die durch metabolischen Stress reguliert werden [3]. Sie werden in verschiedenen Organsystemen unterschiedlich stark exprimiert und zeigen organspezifisch eine unterschiedlich hohe Aktivität. Hohe Konzentrationen an für die AMPK kodierenden mRNAs finden sich vor allem in Herz, Skelettmuskel, Leber, Nieren, Gehirn, Brustdrüse, Lunge und in geringerer Konzentration auch im Fettgewebe [26].

Die Hauptaufgabe der AMPK besteht in der Minimierung energieverbrauchender und in der Förderung energieliefernder Prozesse [27]. Eine erhöhte Beanspruchung der kontraktilen Funktion der Kardiomyozyten ist assoziiert mit einem erhöhten zellulären Energieverbrauch. Der damit verbundene Anstieg des AMP/ATP-Verhältnisses aktiviert die AMPK [27]. Diese Aktivierung geschieht zum einen über ihre Phosphorylierung durch Upstream-Kinasen [28], zum anderen verhindert eine steigende AMP-Konzentration durch allosterische Bindung ihre Dephosphorylierung durch Phosphatasen [29]. Eine weitere Kontrolle der AMPK erfolgt durch Creatin, Phosphocreatin und den pH-Wert [27]. Das Creatin-Phosphocreatin-System hält die muskulären ATP-Level konstant und bildet eine unmittelbar zur Verfügung stehende Energiereserve. Erst nach deren Erschöpfung kommt es durch Aktivierung der AMPK zur Inhibition der Creatinkinase und zur Einleitung AMPK-abhängiger Stoffwechselwege [27].

Über eine Membrantranslokation des Fettsäuretransporters CD36 steigert die AMPK die Aufnahme langkettiger Fettsäuren [10]. Ein wichtiges Zielprotein der AMPK ist die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), welche durch die AMPK phosphoryliert und somit inhibiert wird [30]. Die ACC katalysiert die ATP-abhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA und somit den ersten und

geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fettsäuresynthese [31]. Malonyl-CoA wiederum inhibiert die Fettsäuretranslokation ins Mitochondrium und dadurch indirekt die Fettsäureoxidation, welche im Mitochondrium abläuft. Die AMPK führt somit durch Inhibition der ACC zu verminderten Malonyl-CoA-Spiegeln und damit zu gesteigerter Fettsäureoxidation [30] [32]. Zudem aktiviert die AMPK durch Phosphorylierung die Malonyl-CoA-Decarboxylase und fördert direkt den Malonyl-CoA-Abbau [33]. Die AMPK fungiert also als Fettsäuresensor, der diese dann dem Energiemetabolismus zuführt.

Weiterhin spielen Fettgewebshormone (Adipokine) in der Regulation der AMPK eine wichtige Rolle. Adiponectin und Leptin werden von Adipozyten produziert und stimulieren die Phosphorylierung der AMPK und steigern so die Fettsäureoxidation [34] [35]. Dieser Effekt wird durch direkte Hemmung der ACC zusätzlich verstärkt [35].

Parallel zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation steigert die AMPK die GLUT-4-Membrantranslokation und somit den Glucose-Uptake [10] [36]. Hiermit assoziiert sind eine gesteigerte Glykolyse [37], ein verminderter Glucosespiegel im Blut, eine gesteigerte Laktatproduktion und eine verminderte Gluconeogenese [34].

Die AMPK passt Proteinsynthese und Zellwachstum an die aktuelle Energieverfügbarkeit an, um so eine Energiemangelapoptose zu verhindern [38]. Diese Effekte werden über eine Aktivierung von Tuberin (TSC2) [38], die Inhibition des mammalian target of rapamycin (mTOR) [39] und des eukaryontischen Elongationsfaktors 2 (eEF2) [40] vermittelt.

Die Protein-Phosphatase und Insulin hemmen die AMPK in ihrer Funktion [41] [42] [43]. Hohe Fettsäurespiegel heben den inhibitorischen Effekt von Insulin auf die AMPK auf [44].

Kardiomyozyten von Ratten eignen sich gut zur Untersuchung AMPK-abhängiger Stoffwechselwege, da sie eine hohe Aktivität dieser Proteinkinase aufweisen [30]. So konnte in ischämischen Rattenherzen eine Phosphorylierung und somit Aktivierung der AMPK gezeigt werden [30]. Die bedeutendsten Aktivatoren der AMPK unter Ischämie sind hohe 5'-AMP-Spiegel und das bei Ischämie vermehrt exprimierte Tumorsuppressorprotein Liver Kinase B1 (LKB1) [45]. Hohe Fettsäurespiegel

potenzieren über allosterische Effekte die Aktivierbarkeit der AMPK durch LKB1 und steigern somit die Fettsäureoxidation [46]. Diese Prozesse sollen das Herz vor einem ischämisch bedingten Zellschaden schützen [45].

Die AMPK ist somit in der Regulation einer großen Anzahl von Stoffwechselwegen des Lipid- und Glucosemetabolismus unter Ischämie involviert [47]. Ihre Rolle im hypertrophierten Myokard ist hingegen noch unzureichend untersucht.

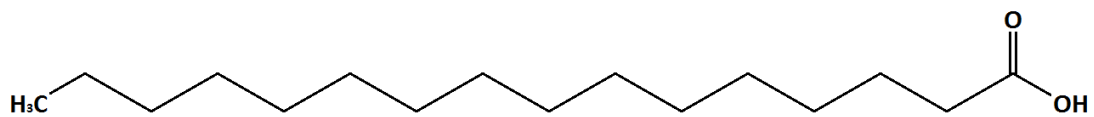
2.4 Kardiomyozytäre Hypertrophie in der Python

2011 zeigten Riquelme et al., dass es bei der burmesischen Python nach einer großen Mahlzeit zu einer bemerkenswerten Volumenzunahme des Herzens kommt [2; Science, 2011]. Histologisch zeigte sich eine kardiomyozytäre Hypertrophie ohne Hyperplasie. Trotz hoher postprandialer Fettsäurespiegel wurde keine kardiale Triglycerid- oder Fettsäureakkumulation nachgewiesen. Ebenfalls kam es nicht zu vermehrter Fibrose und Zellapoptose, sodass hier eine adaptive Hypertrophie ohne die Charakteristika einer maladaptiven Hypertrophie postuliert wurde. Als ursächlich beschrieben die Autoren eine spezifische Kombination der Fettsäuren Palmitoleinsäure (C16:1), Myristinsäure (C14:0) und Palmitinsäure (C16:0) im molaren Verhältnis von 1:6:16 (vgl. Abb. 1). Dieser Fettsäure-Mix konnte nach Transfusion in Mäusen und nach Behandlung neonataler Rattenkardiomyozyten auch hier eine kardiale Hypertrophie ohne pathologische Charakteristika erzeugen. Die Behandlung mit dem Fettsäure-Mix war zudem assoziiert mit einem gesteigerten Fettsäuretransport, vermehrter Fettsäureoxidation und der vermehrten Expression kardioprotektiver Enzyme. Die Beobachtungen von Riquelme et al. waren vor allem deshalb erstaunlich, da der Fettsäure-Mix Palmitinsäure enthält und diese proapoptotische Effekte induziert [1]. Als Mediatoren dieser metabolischen Effekte wurden Caspase, Ceramid und Bcl-2 identifiziert [48]. Dabei sind die genauen metabolischen Effekte sowohl des Fettsäure-Mix als auch der Palmitinsäure bislang nur unvollständig verstanden.

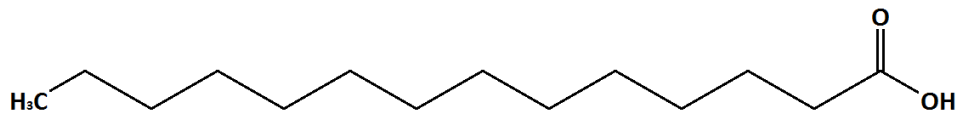
Es wurde bereits an neonatalen Rattenkardiomyozyten in Zellkultur gezeigt, dass die proapoptotischen Effekte von Palmitinsäure durch Ölsäure verhindert werden können [1]. Russo et al. zeigten, dass Myristinsäure, aber nicht Palmitinsäure, in Mäusen zu kardiomyozytärer Hypertrophie führt [49]. Palmitoleinsäure stimuliert als

Fettgewebshormon (Lipokin) den Muskel-Insulineffekt und supprimiert Steatohepatose [50]. Zudem bildet Fettgewebe mit Hilfe von Lipokinen wie Palmitoleinsäure ein endokrines Netzwerk zur Kommunikation mit anderen Organsystemen und zur Regulation der systemischen metabolischen Homöostase [50].

A Palmitinsäure (C16:0)



B Myristinsäure (C14:0)



C Palmitoleinsäure (16:1)

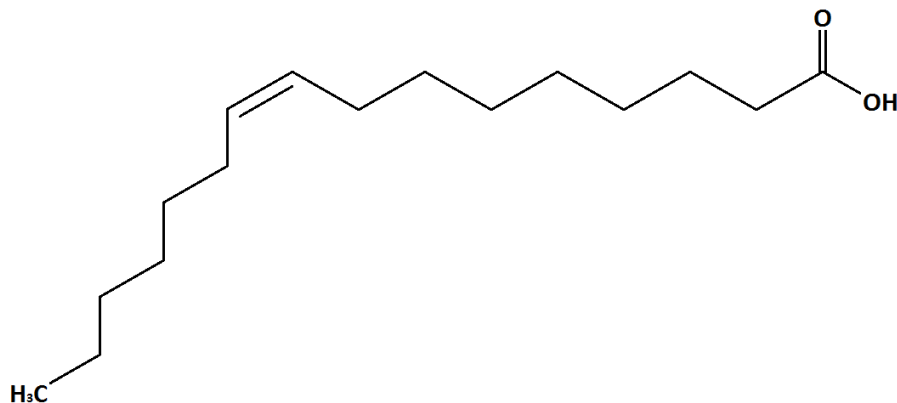


Abb. 1: Schematische Darstellung der in dem FS-Mix enthaltenen Fettsäuren.
A Palmitinsäure (C16:0) B Myristinsäure (C14:0) C Palmitoleinsäure (C16:1)

2.5 Ziel der Arbeit

Es wurde durch Riquelme et al. gezeigt, dass eine spezifische Kombination aus Fettsäuren eine physiologische kardiomyozytäre Hypertrophie ohne die Charakteristika einer Maladaptation (Fettsäureakkumulation, Fibrose, Apoptose) induzieren kann [2]. Dabei sind die genauen zellulären Mechanismen noch nicht hinreichend untersucht. Die Untersuchung der Aktivierung physiologischer Prozesse zur Induktion einer adaptiven Hypertrophie hat große Bedeutung im Zusammenhang mit der Behandlung kardialer Erkrankungen wie der hypertrophen Kardiomyopathie und der Herzinsuffizienz. Somit soll in dieser Arbeit untersucht werden:

1. der Einfluss des Fettsäure-Mix auf Kardiomyozytengröße und hämodynamische Parameter
2. der Einfluss des Fettsäure-Mix und von Palmitinsäure auf Apoptose von Kardiomyozyten
3. der Einfluss des Fettsäure-Mix und von Palmitinsäure auf den kardiomyozytären Fettsäuremetabolismus
4. die Rolle der AMPK in der Vermittlung der Effekte des Fettsäure-Mix und der Palmitinsäure

3 Material

3.1 Antikörper

3.1.1 Primärantikörper

P-ACC (Ser79)	Cell-Signaling
P-AMPK (Thr172)	Cell-Signaling
Alpha2-AMPK (C-20)	Santa Cruz Biotechnology
P-CamK	
CamK	
ADRP (AP125)	Fitzgerald
FAT/CD36 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology
Bax (B-9)	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-2 (N-19)	Santa Cruz Biotechnology
P-Tuberin/TSC2 (Thr1462)	Cell-Signaling
p53 (FL-393)	Santa Cruz Biotechnology
CTGF (L-20)	Santa Cruz Biotechnology
GLUT-1 (H-43)	Santa Cruz Biotechnology
GLUT-4 (1F8)	Cell-Signaling
SNAP-23	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH (6C5)	Santa Cruz Biotechnology

3.1.2 Sekundärantikörper

Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP	Bio-Rad Laboratories
Konjugat	
Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie
Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie

3.2 Enzyme, Kits

Substanz

Hersteller

DC Protein Assay Reagent A

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

DC Protein Assay Reagent B

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Developer G 153 A

Agfa, Mortsel, Belgien

Developer G 153 B

Agfa, Mortsel, Belgien

ECL Western Blotting Detection Reagents

GE, Healthcare, München

Collagenase Typ 2

Worthington Biochemical, Cell Systems

Pankreatin

Sigma-Aldrich Chemie, München

Rapid Fixer G 354

Agfa, Mortsel, Belgien

3.3 Lösungen, Medien, Puffer

Lösung, Medium, Puffer

Zusammensetzung

PBS (10x)

Aqua dest.

NaCl 80 g/l

KCl 2 g/l

Na₂HPO₄ 14,4 g/l

KH₂PO₄ 2,4 g/l

pH 7,4

PBS-Tween (10x)

PBS (10x)

1% Tween 20

pH 7,4

Lysepuffer für Proteine	5 ml 1M Tris pH 6 20 ml 10% SDS 10 ml Glycerol 15 ml Aqua dest. Vor der Proteinernte Zugabe von: 1 µl Leupeptin (10mg/ml) pro ml Lysepuffer 1 µl PMSF (100mM) pro ml Lysepuffer 0,6 µl Aprotinin (10mg/ml) pro ml Lysepuffer
Elektrophoresepuffer (10x)	144 mg/ml Glycin 30,3 mg/ml Tris 10 mg/ml SDS Aqua dest.
Transferpuffer für Western Blot (5x)	29 mg/ml Tris 145 mg/ml Glycin 5 mg/ml SDS Aqua dest.
Transferpuffer für Western Blot (1x)	200 ml 5x-Transferpuffer 200 ml Methanol 600 ml Aqua dest.
Stripping buffer	31,25ml 1M Tris-HCl pH 6,8 10g SDS 3,5ml beta-Mercaptoethanol 500ml Aqua dest.
ADS-Puffer	6,78 g/l NaCl 4,76 g/l HEPES 8 ml/l Na ₂ HPO ₄ (0,1 M in A. dest.) 1 g/l Glukose 0,4 g/l KCL 8 ml/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O (0,1 M in A. dest.) Aqua dest.

Enzym-Mix für Kardiomyozyten-Isolation	80 ml ADS-Puffer 48 mg Pankreatin (= 0,6 mg/ml) 40 mg Collagenase (= 0,5 mg/ml)
Kardiomyozyten-Nährmedium	F 10 (HAM + Glutamin) + 10 % Horse-Serum + 5 % Fetal calf serum (Kälberserum) + 1 % Penicillin/Streptomycin
Kardiomyozyten-Hungermedium	F 10 (HAM + Glutamin) + 1% Penicillin/Streptomycin
Ladepuffer für Western Blot	5 ml 50% Glycerol 1,25 g 10% SDS 2,5 ml 0,625 M Tris 125 µl/ml 1 M DTT Aqua dest. pH 7,6
Binding Buffer für FACS-Analyse	119,15 mg Hepes 409,08 mg NaCl 18,3775 mg CaCl ₂ 50 ml Aqua dest. pH 7,4
5% Trockenmilch-Lösung	50 ml 1x PBS-Tween 2,5 g Trockenmilchpulver
10% BSA-Lösung	1 g BSA 10 ml 1 x PBS

3.4 Sonstige Substanzen

Substanz	Hersteller
Acrylamid Electrophoresis Reagent 30%	Purity Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ammoniumpersulfat	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Annexin V-FITC	BD Biosciences
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, München

Compound C	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothritol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, München
EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
F 10 Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Fettsäuren:	
Palmitoleinsäure	Sigma-Aldrich Chemie, München
Myristinsäure	Sigma-Aldrich Chemie, München
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich Chemie, München
FKS (Fetales Kälberserum)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycin	VWR International, Darmstadt
Hämatoxilin	Sigma-Aldrich Chemie, München
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, München
Horse Serum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ketamin (Ketavet)	Pfizer, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
[NH ₄]HCO ₃	Sigma Aldrich Chemie, München
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
NCS (Neonatal Calf Serum)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
PMSF (Phenylmethansulfonfluorid)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Propidiumiodid	BD Biosciences
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	VWR International, Darmstadt
Sirius-Red-Lösung	Polysciences Inc.
TEMED (Tetramethylethylendiamid)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Tris-hydroxyethyl-aminoethan	VWR International, Darmstadt
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich Chemie, München

Trypsin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

3.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
ALZET® Mini-Osmose-Pumpe Modell 2001	Durect Corporation, Cupertino, CA, USA
Cell Scraper	Sarstedt, Inc., Newton, USA
Dialysemembran	Spectrum Laboratories
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Inc., Newton, USA
FACS-Röhrchen	BD Falcon
Falcon (50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Falcon Cell Strainer 70µm	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
High Performance autoradiography film	GE Healthcare, München
Objekträger	VWR International, Darmstadt
Mini-Trans-Blot Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Glas-Pipettenspitzen (5, 10, 25 ml)	Greiner-bio. one, Frickenhausen
Zellkulturschale (6 bzw. 10 x 2 cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale P6 Primaria	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA

3.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer Europe B. V., Breda, Niederlande
Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Milano, Italien
Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden
Mikroskope:	
Olympus CK 2	Olympus
Millar-Tip-Katheter SPR-671	Millar Instruments, Houston, Texas, USA

Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini Trans-Blot System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Röntgenkassette (24 x 30 cm)	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Scanner CanoScan D1250 V2F	Canon, Krefeld, Deutschland
Schüttel- und Mischgerät Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelwasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
Vortexer VV3	VWR International Darmstadt
Waagen:	
VIC-Series 0.01 g Precision Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
ALC-Series, 0.0001 g Analytical Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph Instruments, Schwabach
Heracell 150 Cell Culture Incubator	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus KS 12	Heraeus Holding, Hanau
Biofuge pico	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühlzentrifuge 1 K 15	SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Megafuge 1,0	Heraeus Holding, Hanau
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

3.7 Auswertprogramme

Anwendungsgebiet	Auswertprogramm
Betriebssystem	Microsoft Windows Vista
Western Blot Bandenanalyse	UVP Lab works Version 4.6 Image Studio Light
Statistische Auswertung und Diagrammerstellung	Microsoft Excel 2010 Graph Pad Prism 4.0
Histologische Auswertung der Kardiomyozytengröße	Lucia G Version 4.60
Statistische Tests	Student's t-tests Mann-Whitney-U-tests One-way ANOVA for multiple comparisons Post hoc comparisons: Bonferroni's Multiple Comparison Test

4 Methoden

4.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten neonataler Ratten

Die Isolation der neonatalen ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten erfolgte mit 3-5 Tage alten Sprague Dawley Ratten (Charles River) und begann mit der Tötung der Ratten durch Dekapitierung der Tiere mit einer Schere. Anschließend wurde der Kopf verworfen und der Körper kurz in 70 prozentigem Ethanol gespült. Mit einer zweiten Schere wurde der Thorax eröffnet, das Herz freigelegt und von den großen Gefäßen getrennt. Die isolierten Herzen wurden in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 10cm in ADS-Puffer gesammelt. Die Ventrikel wurden von Vorhöfen und Gefäßresten befreit und mit einem Cutter in kleine, annähernd gleich große Stücke geschnitten. Der ADS-Puffer wurde danach entfernt, ohne dabei Gewebestücke mit abzusaugen und es wurden 10ml Enzym-Mix hinzugegeben. Dieser Mix aus Ventrikelgewebe und Enzym-Mix wurde in einer sterilen Flasche bei 37°C für 5 Minuten im Schüttel-Wasserbad (ca. 90 U/min) inkubiert.

Der Überstand wurde nach Inkubation verworfen und nach erneuter Zugabe von 10ml Enzym-Mix wieder inkubiert, dieses mal für 20 Minuten. Der Überstand wurde nun in einem Falcon gesammelt und die Enzyme durch Zugabe von 2ml NCS in ihrer Funktion inhibiert. Dieser Falcon wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es werden 4ml NCS hinzupipettiert, in welchem das durch die Zentrifugation entstandene Pellet durch vorsichtiges Schütteln des Falcons gelöst wird. Der Falcon wurde bis zum Ende der Isolation bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert; dabei wurde der Deckel nur leicht aufgesetzt, um einen Gasaustausch zu gewährleisten.

Während der Zentrifugation wurde das restliche Ventrikelgewebe bereits erneut mit 10ml Enzym-Mix im Schüttel-Wasserbad inkubiert und das Prozedere wiederholte sich wie oben beschrieben noch 5 mal, wobei die Inkubationszeiten im Schüttel-Wasserbad variierten (25 min., 25 min., 15 min., 10 min., 10 min.). Die einzelnen Falcons wurden dann jeweils wie oben beschrieben bis zum Ende der Isolation inkubiert.

Am Ende wurden die Zellsuspensionen aller 6 Falcons zusammenpipettiert und bei Raumtemperatur und 700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und Kardiomyozyten-Nährmedium zum entstandenen Pellet hinzugegeben, welches nun durch leichtes Schütteln gelöst wurde. Die Suspension wurde mithilfe eines Filters filtriert, der nur Zellen bis zu einer Größe von 70µm durchlässt und dann gleichmäßig auf 3 Petrischalen verteilt, welche nun für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. In dieser Zeit adhärten die Fibroblasten am Boden der Petrischale.

Danach erfolgte die Zellzählung, wozu die Zellen mit Trypanblau, einem anionischen Diazofarbstoff, angefärbt wurden und dann in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop betrachtet wurden. Trypanblau wird dabei nur von membrangeschädigten Zellen aufgenommen, die daraufhin dunkelblau erscheinen, im Gegensatz zu den intakten, vitalen Zellen, welche sich weiterhin farblos darstellen. Anschließend wurden die Zellen in Nährmedium in gewünschter Dichte in Six-Wellplates ausgesäht.

4.2 Proteinisolation für Western Blot

Direkt vor dem Ernten der Zellen wurden zum Lysepuffer folgende Substanzen hinzugegeben: PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 1µl Stock/ml Lysepuffer), Leupeptin (1µl Stock/ml Lysepuffer), Aprotinin (0,6µl Stock/ml Lysepuffer). Die benötigte Menge an Lysepuffer wurde mit 100µl pro Sixwell berechnet.

Nach Absaugen des Zellmediums wurden die Sixwells mit 1xPBS gespült. Anschließend wurden pro Sixwell 100µl Lysepuffer hinzupipettiert und die Zellen mittels Cell-Scraper vom Sixwell-Boden gelöst. Diese Lysate wurden nun in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -20°C gelagert oder direkt weiter verwendet zur Proteinbestimmung.

4.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry

Zunächst wurden 2µl Gesamtlisat (aus Zellkultur oder von Gewebestücken) mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt. Danach erfolgte die Zugabe von 100µl Dc Protein Assay Reagent A. Dieser erste Reaktionsschritt dient der Komplexbildung zwischen den Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung und wird als Biuret-Reaktion bezeichnet. Im Folgenden wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert, welches wiederum zugegebenes Dc Protein Assay Reagent B (Molybdatophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure) reduziert und somit Molybdänblau entsteht. Diese Blaufärbung der Proteinlösung wurde nun zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometer bei 750nm herangezogen. Dieser Ansatz erfolgte drei mal pro Probe, so dass am Ende eine Dreifachbestimmung der Proteinkonzentration mit Berechnung des Mittelwertes stattfand.

4.4 Western Blot Analyse

Western Blot bezeichnet ein Verfahren, bei dem Proteine zunächst mittels Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und dann auf eine Trägermembran übertragen werden. Die Detektion eines spezifischen Proteins auf dieser Trägermembran erfolgt durch Zugabe monoklonaler Antikörper und Fluoreszenz- oder Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper gegen dieses Protein. Durch Intensitätsmessung der verschiedenen Banden ist eine Quantifizierung der Proteinmenge möglich, da die Intensität proportional zur Proteinmenge ist.

4.4.1 Gelelektrophorese

Es wurden je 50µg der jeweiligen Probe mit der gleichen Menge an 1x-Ladepuffer verwendet. Dabei wurde zuvor DTT (Dithiothreitol, Verhältnis 1:20) zum Ladepuffer hinzupipettiert, welches die für die Tertiärstruktur der Proteine wichtigen Disulfidbrücken durch Reduktion aufbricht. Danach wurden die Proteine bei 70°C für 7 Minuten gekocht. Dieser Schritt diente der weiteren Spaltung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine und somit der Denaturierung. Das im Ladepuffer enthaltene SDS maskiert die Eigenladung der Proteine und bewirkt somit eine konstante negative Ladungsverteilung, was durch gegenseitige Abstoßung

gemeinsam mit der Denaturierung eine Auflockerung und Linearisierung der Proteine führt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die hierfür verwendeten Gele waren 10%ige SDS-Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gele (Tab. 1), die in Mini-Gelkammern (1,5 mm tief) gegossen wurden. Dabei wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit einer Schicht Aqua dest. bedeckt, um eine gerade Gelgrenze zu erhalten. Die endgültige Polymerisation des Gels erkennt man an einer deutlich sichtbaren Gel-Wasser-Grenze. War diese zu erkennen wurde der Aqua dest.-Überstand entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Gelkamm zur Bildung der einzelnen Proben-Slots eingesetzt. Ein Low Range Marker lief in einem randständigen Slot als Ladekontrolle mit. Die Proben wurden mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Slots übertragen und mit einer Stromstärke von konstant 30 mA wurde die Elektrophorese gestartet.

Tab. 1: Zusammensetzung eines Gels für die SDS-PAGE

Substanz	Trenngel (10%)	Sammelgel
Aqua dest.	7,9 ml	3,4 ml
30% Acrylamid Mix	6,7 ml	0,83 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0 ml	0,63 ml
10% SDS	0,2 ml	0,05 ml
10% Ammonium-Persulfat	0,2 ml	0,05 ml
TEMED	0,008 ml	0,005 ml

4.4.2 Proteintransfer

Zur Fixierung der Proteine auf einer Nitrocellulosemembran für die weitere Analyse wurde das Mini Trans Blot System von Biorad verwendet. Mit Hilfe dieses Systems wird ein senkrecht zum Gel verlaufendes elektrisches Feld erzeugt, indem die Proteine in Richtung Anode wandern und auf Grund von ionischen und polaren Wechselwirkungen an der Nitrocellulosemembran anhaften bleiben. Das elektrophoretische Auftrennungsmuster bleibt dabei erhalten. Im Anschluss wurde

die Membran für 30 Minuten mit 5%iger Milch auf einem Schüttel- und Mischgerät geblockt.

4.4.3 Proteindetektion

Nach dem Blocken der Membranen wurden diese mit Orientierung an der Ladekontrolle, welche die verschiedenen Proteingrößen markiert, entsprechend der Größe der zu untersuchenden Proteine geschnitten, sodass die einzelnen Membranteile nun getrennt analysiert werden konnten. Es folgte die Inkubation der Membranen mit einem Primärantikörper in 1%iger Milch. Während der Inkubationszeit bei 4°C von 12 Stunden banden die Primärantikörper an die Epitope ihrer spezifischen Antigene auf den Membranen. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen wurden die Membranen dann mit 1x PBS-Tween (2 x 5 min. und 2 x 10 min.) und 1x PBS (2 x 3 min.) gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit einem peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 20 Minuten, wenn der Primärantikörper von Maus oder Ziege und für 30 Minuten, wenn dieser vom Kaninchen stammte. Diese Sekundärantikörper binden an die Fc-Fragmente der Primärantikörper. Um auch hier überschüssige Antikörper zu entfernen erfolgten die gleichen Waschschrte wie zuvor mit 1x PBS-Tween und 1x PBS. Die Sichtbarmachung der proteingebundenen Antikörper auf einem Röntgenfilm erfolgte durch eine Chemilumineszenzreaktion mit Hilfe eines ECL-Kits (enhanced chemiluminscence). Die Auswertung erfolgt durch einscannen der Banden am Computer und densitometrische Analyse mit Hilfe von UVP Lab Works Version 4.6 und Image Studio Light.

4.5 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl eine Laserlichtquelle passieren und aufgrund verschiedener Größe, Struktur und Anfärbung verschiedene Streueffekte des Licht verursachen, wodurch das Durchflusszytometer jeder Zelle einen Punkt in einem x-y-Koordinatensystem zuordnet. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter) ist abhängig von der Beugung des Lichtsstrahls und somit vom Zellvolumen und das Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter) hängt von der Lichtbrechung und damit von der Granularität der Zellen ab. Die Kombination aus Größe und Granularität erlaubt dann die Zuordnung

von Messpunkten zu einer bestimmten Zellpopulation. Die graphische Darstellung des Messergebnisses bezeichnet man als Dot Plot. Die in dieser Arbeit beschriebenen durchflusszytometrischen Methoden dienten der Analyse von Zellgröße, Nekrose und Apoptose von Zellen aus Zellkulturexperimenten.

4.5.1 Analyse der Zellgröße

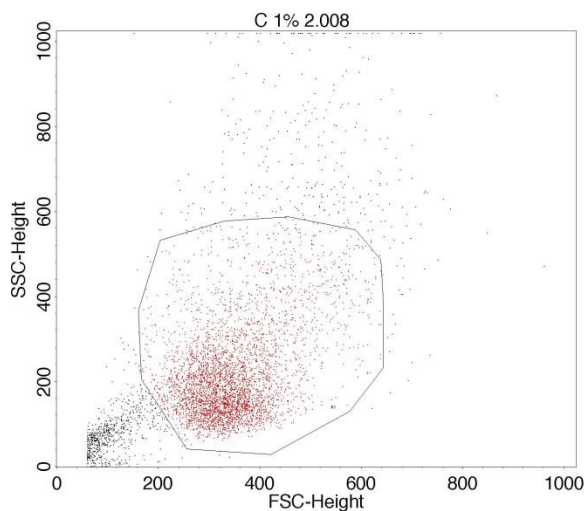
Zunächst wurde das Zellmedium aus den Sixwells abgesaugt und die Zellen mittels 1 ml Trypsin pro Sixwell für 4 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um die Zellen so vom Boden der Platten zu lösen. Um weitere proapoptotische Effekte des Trypsins zu stoppen wurde 1 ml Kardiomyozyten-Medium pro Sixwell hinzupipettiert. Die Zellen wurden dann in Durchflusszytometer-Röhrchen umpipettiert und bei 700 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahl-Saugpipette entfernt ohne das am Boden des Röhrchen befindliche Zell-Pellet abzusaugen. Es erfolgte die Zugabe von 500µl Binding buffer pro Röhrchen und die anschließende Messung der Kardiomyozytengröße (x_{mean}) der Proben im Durchflusszytometer. Dabei wurden die Einstellungen vorher so festgelegt, dass die Messung automatisch nach 25.000 registrierten Zellen stoppte. Nach der Messung einer Probe konnte diese dann verworfen werden. Die graphische Darstellung erfolgte im Dot Plot (Abbildung 1).

4.5.2 Analyse von Nekrose und Apoptose

Die Probenvorbereitung für die Messung von Nekrose und Apoptose erfolgte analog zu der für eine Größenmessung der Kardiomyozyten bis zur Zentrifugation der Zellen. Auch hier wurde unter Belassen des Zellpellets am Röhrchenboden der Überstand abgesaugt. Im Folgenden wurden dann pro Probe 100µl Binding buffer und 5µl Annexin V-FITC Apoptosis detection kit hinzupipettiert und gevortext, bevor dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Annexin V bindet dabei an Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin, welche in der Initialphase des Apoptosevorgangs von der Zellmembraninnen- zur –außenseite transloziert werden und ist somit ein guter Marker für apoptotische Zellen. Das für die Bindung benötigte Kalzium lieferte der Binding buffer. Im Annexin V-FITC Apoptosis detection kit ist Annexin V mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, der im Folgenden die Registrierung im Durchflusszytometer erlaubt. Nach den 15 Minuten wurden pro Probe 10µl Propidium Iodid und 200µl Binding buffer hinzupipettiert und erneut

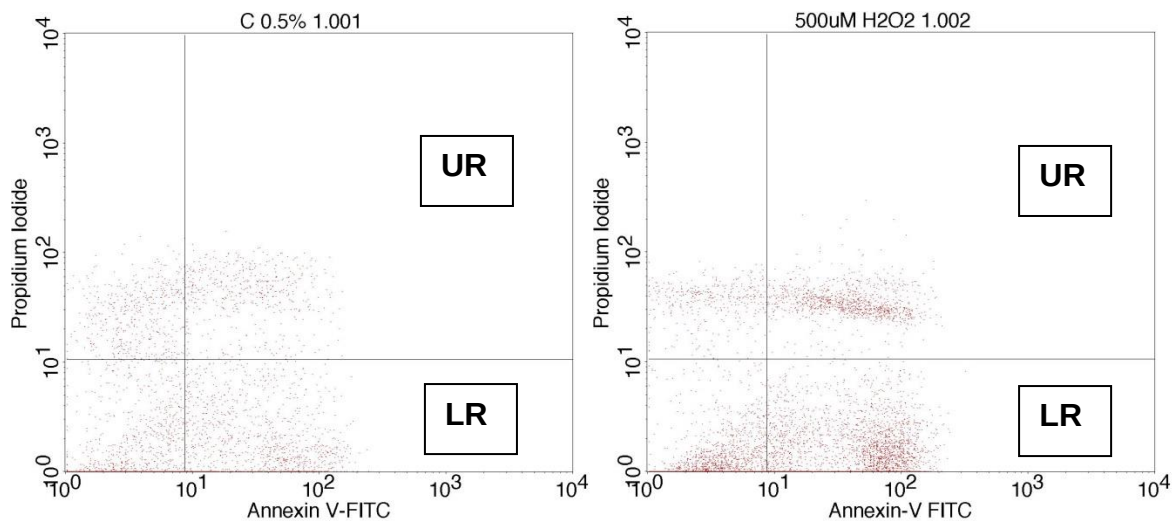
gevoertext. Propidium Iodid ist eine interkalierende Substanz mit Fluoreszenzeigenschaften, die sich an DNA und RNA anlagert, allerdings nicht membrangängig ist und somit nicht von vitalen Zellen aufgenommen wird. Die Anlagerung an die Nukleinsäurebasen verstärkt die Fluoreszenz, sodass eine Detektion im Durchflusszytometer möglich wird. Eine Inkubationszeit war hierfür nicht erforderlich. In Verbindung mit einer Annexin V-Inkubation sind doppelt positive Werte ein guter Indikator für nekrotische Zellen. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte auch hier so, dass nach 25.000 gemessenen Zellen automatisch getoppt wurde. Nekrose und Apoptose wurden vom Gerät in Prozent der Gesamtzahl der gemessenen Zellen angegeben und die graphische Darstellung der Messergebnisse erfolgte in Quadranten, wobei im unteren rechten (LR = lower right) die Annexin V positiven (apoptotischen) und im oberen rechten (UR = upper right) die Annexin V und Propidium-iodid doppelt positiven (nekrotischen) Zellen dargestellt wurden (Abbildung 1).

A



Der Kreis markiert die Kardiomyzytenpopulation, die zur Auswertung herangezogen wurde; SSC = side scatter; FSC = forward scatter

B



links: native Kardiomyozyten aus Zellkultur; rechts: Positiv-Kontrolle nach 60 Minuten Inkubation mit 500µM H₂O₂

Abb. 2: Graphische Darstellung der Messergebnisse einer durchflusszytometrischen Analyse von **A** Kardiomyozytengröße und **B** Nekrose und Apoptose im Dot Plot

4.6 Histologische Analyse

Die entnommenen Herzen dienen neben der Proteinanalyse mittels Western Blot ebenfalls der Größenbestimmung der Kardiomyozyten mittels HE-Färbung und mikroskopischer Analyse und der Fibrosequantifizierung mit Hilfe der Sirius-Red-Färbung.

4.6.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die bei -80°C gelagerten Herzen wurden in Paraffin eingebettet und mit Hilfe eines Mikrotoms 3µm dicke Schnitte abgespalten. Diese wurden dann auf der Oberfläche von 37°C warmem Wasser ausgelegt und dann auf Glasobjektträger übertragen. Die Schnitte trockneten danach an der Luft und dienten im Folgenden der HE- und Sirius-Red-Färbung.

4.6.2 HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Standard-Färbemethode und dient der Färbung von Zellen und der Zwischenzellmatrix im histologischen Schnittbild durch die beiden Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin. Hämatoxylin färbt dabei als basischer Farbstoff saure bzw. basophile Strukturen blau, wie zum Beispiel Zellkerne, denen die DNA ihren sauren Charakter verleiht. Eosin färbt als saurer Farbstoff basische oder azidophile Strukturen, wie Plasmaproteine oder das Kollagen der Interzellulärmatrix rot. Dabei durchliefen die auf Objektträgern befindlichen Schnitte eine Kaskade von Färbeschritten. Zunächst wurden diese in Isopropanol in absteigender Konzentration getaucht (2 x 2 min. 100 %ig, 2 x 2 min. 96 %ig, 2 x 2 min. 80 %ig). Nach kurzer Spülung mit Aqua dest. folgte die Färbung mit Hämatoxylin für 2 Minuten und nach erneuter Spülung mit Aqua dest. die mikroskopische Kontrolle der Kernfärbung. Dabei sollten die Zellkerne rot erscheinen. Sollte umliegendes Gewebe noch deutlich gefärbt sein wurde mit HCl gespült und erneut mikroskopisch kontrolliert. Danach wurde mittels Leitungswasser der pH Wert erhöht, was einen Farbumschlag von rot nach blau-violett bewirkte, sodass die Zellkerne nun ihre für die HE-Färbung charakteristische blaue Farbe erhielten. Die Eosin-Färbung erfolgte durch kurzes Eintauchen in 0,2% Eosin und anschließender Spülung mit Aqua dest. Danach durchliefen die Schnitte eine Isopropanol-Reihe in aufsteigender Konzentration (2 x 2 min. 96%, 2 x 2 min. 100%). Nach Behandlung mit Xylol (3 x 3 min.) wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt. Nach Verdunsten des Lösungsmittels erhärtet dieses den gefärbten Schnitt.

4.6.3 Sirius-Red-Färbung

Die Paraffinschnitte durchliefen zunächst eine absteigende Alkoholreihe (2 min. Ethanol 100%, 2 min. 90%, 2 min. 70%) und wurden anschließend mit Aqua dest. gespült (1 x 5 min, 1 x 10 min.). Danach wurden diese für 15 Minuten in 0,1%ige Sirius-Red-Lösung getaucht und nach erneutem Spülen mit Aqua dest. für 2 Minuten mit 90% und für 2 weitere Minuten mit 100% Ethanol behandelt. Nach 2 Minuten in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

4.7 Mausmodell

4.7.1 Tierhaltung

Zucht und Tierhaltung der verwendeten C57/B16-Mäuse erfolgte im Institut für experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Campus Homburg unter Standardbedingungen. Die Genehmigung zu den Tierversuchen erteilten das Veterinäramt und die Kreis-Polizei-Behörde des Saar-Pfalz-Kreises.

4.7.2 Echokardiographie

Im Rahmen des Pilotexperimentes erfolgte eine echokardiographische Untersuchung nach 7 Tagen Behandlung der Mäuse mit einer Fettsäure-Pumpe (s. Kap. 4.10.1.1 Fettsäurebehandlung im Rahmen des Pilotprojektes). Im zweiten Teil des Mausmodells erfolgte die Echokardiographie nach 5 Wochen Behandlung mittels subkutaner Fettsäure-Injektion (s. Kap. 4.10.1.2 Fettsäurebehandlung über 5 Wochen). Die Untersuchung erfolgte in der experimentellen Chirurgie der Universität des Saarlandes unter tierärztlicher Leitung. In beiden Fällen wurden die Mäuse zunächst mit Hilfe einer Enthaarungscreme linksthorakal enthaart und danach mittels Isofluran sediert. Die gemessenen Größen waren: IVSd, LVAWd, LVPWd, IVSs, LVAWs, LVPWs, LVIDd, LVIDs, FS, EF und LV-Masse.

4.7.3 Aortenligatur

Um bei den Mäusen eine druckinduzierte kardiale Hypertrophie zu erzeugen wurde in einer Operation das Lumen der Aorta ascendens eingeengt (Aortic banding), was eine akute Erhöhung der Nachlast mit sich brachte. Bei den Kontrolltieren wurde lediglich eine Thorakotomie mit Freilegung und Umschlingung der Aorta ohne Einengung des Lumens durchgeführt (Sham-Operation).

Zunächst wurden die Tiere mit einer Narkose aus 100 mg/kg KG Ketamin und 10 mg/kg KG Xylazin 1:10 mit NaCl 0,9 % verdünnt narkotisiert. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Wenn nach ca. 10 Minuten der Zwischenzehenreflex erloschen war, wurden die Augen mit einer Augensalbe bedeckt, um diese während der Operation zu schützen und zu befeuchten und die Mäuse wurden linkssternal desinfiziert und

rasiert. Die Intubation erfolgte mit einer Braunüle (20 G) und die Beatmungseinstellungen wurden mit einem Atemzugvolumen von 200 μ l und einer Atemfrequenz von 120/min festgelegt. Tubus, Hals und Extremitäten der Maus wurden dann mit Klebestreifen fixiert. Der Hautschnitt erfolgte vom Sternum bis zur linken Axilla. Darunter wurde der Musculus pectoralis major in der Mitte stumpf eröffnet, sodass die ersten drei Rippen nun einsehbar waren. Mit Hilfe einer Pinzette, die durch die Interkostalmuskulatur in den ersten Inerkostalraum eingeführt wurde, wurden die ersten beiden Rippen gespreizt und mit 3 Fäden, die diese Rippen umspannten und an der Unterlage fixiert wurden, konnte dieser Spalt offen gehalten werden. Im Folgenden wurde in der Tiefe die Aorta ascendens freipräpariert und ein Ethicon-Faden 6-0 zwischen Truncus brachiocephalicus und linker Arteria carotis communis mit Hilfe einer L-förmigen 24G-Nadel um das Aortenlumen geführt. Das Metallstück einer 27G-Braunüle wurde als Abstandshalter der Aorta angelegt und der Faden - Kanüle und Aorta umschlingend - verknotet. Das Metallstück wurde entfernt und die Fadenenden abgeschnitten. Der Musculus pectoralis major wurde dann mit einer kontinuierlichen Naht und die Haut mit drei Einzelknopfnähten vernäht. Sobald der Zwischenzehenreflex wieder auslösbar war wurde die Maus extubiert und bekam 0,1 ml Rimadyl gegen die Schmerzen. Zum Aufwachen wurden die Mäuse auf einem Heizkissen gelagert.

4.7.4 Invasive Hämodynamikmessung

Invasive Hämodynamikmessung, Tötung der Mäuse und anschließende Organentnahme erfolgten nach 5 wöchiger Fettsäure-Behandlung (s. Kap. 4.10.1.2 Fettsäurebehandlung über 5 Wochen). Zunächst wurden die Tiere wie in Kapitel 4.7.3 beschrieben narkotisiert und intubiert. Nach Entfernung der Haare linksthorakal erfolgte ein Hautschnitt und die Durchtrennung der 2. Bis 5. Rippe, was nun eine Sicht auf den schlagenden linken Ventrikel erlaubte. Mit Hilfe einer 24G-Nadel wurde der Apex punktiert und über diese Öffnung ein 1,4 Fr Millar-Tip-Katheter in den linken Ventrikel eingeführt. Dieser Katheter war mit einem Computer verbunden und erlaubte die Messung des maximalen systolischen Drucks (LVPs), des minimalen diastolischen Drucks (LVPd), des enddiastolischen linksventrikulären Drucks (LVEDP), der Druckänderung über die Zeit (dP_{max}/dt bzw. dP_{min}/dt) und der Herzfrequenz.

4.7.5 Tötung der Tiere und Organentnahme

Die Tötung der Mäuse erfolgte jeweils im Anschluss an die hämodynamische Messung mittels Millar-Tip-Katheter durch die subkutane Injektion von 1 g/kg KG Ketamin. Im Anschluss wurde der Thorax durch eine mediane Sternotomie und das Abdomen durch einen medianen Längsschnitt eröffnet. Es wurden Herz, Aorta, Leber, Niere und Tibia entnommen und in Eppendorfgefäßen bei -80°C gelagert. Ein Teil der Herzspitze wurde separat für spätere Western Blot Analysen gelagert und ein ringförmiger Ausschnitt wurde für spätere histologische Analysen in Formalin eingebettet. Die Lungen wurden entnommen und ihr Feuchtgewicht notiert. Nach 24 Stunden Lagerung im Inkubator bei 37°C wurde dann das Lungen-Trockengewicht erfasst und der Quotient – welcher eine Aussage über den ursprünglichen Wassergehalt der Lunge erlaubt – errechnet.

4.8 Fettsäuresynthese

Die verwendeten C57/B16-Mäuse wurden nach Riquelme et al. [2] mit einem Fettsäuregemisch aus Palmitolein-, Myristin- und Palmitin- im Verhältnis 1:6:16 behandelt. Dabei wurden die einzelnen Fettsäuren nach de Vries et al. [7] zunächst separat synthetisiert und anschließend gemischt. Palmitoleinsäure lag flüssig, Myristin- und Palmitinsäure hingegen in Pulverform vor. Zunächst wurden 4 ml absoluten Ethanol in einem Becherglas vorgelegt und der Flüssigkeitsspiegel am Glas markiert. Die Fettsäuren wurden dann einzeln in Eppendorfgefäße abgefüllt (21,3 µl Palmitoleinsäure, 17,12 mg Myristinsäure und 19,24 mg Palmitinsäure). Mit einem Milliliter Ethanol aus dem Becherglas wurden die Fettsäuren in den Eppendorfgefäßen durch vortexen gelöst und dann jeweils in ein separates Becherglas mit 4 ml Etanol pipettiert. Danach wurden 4 ml 10 mM Na_2CO_3 hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde auf einem Magnetrührer unter Begasung mit Stickstoff auf 60°C erwärmt (Abb. 3A). Dabei musste fortwährend die Temperatur kontrolliert werden, da das einströmende Gas die Lösung abkühlte. Es wurde so lange begast bis der Ethanol verdampft war bzw. bis noch 4 ml Gesamtvolumen im Becherglas war, was man an der zu Anfang angebrachten Markierung erkennen konnte. Diese 4 ml wurden dann tropfenweise zu 10 ml 10% BSA-Lösung, die zuvor auf einem Magnetrührer auf 40°C erwärmt worden war, hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde dann in ein ca. 30 cm langes Stück eines Dialyseschlauchs gegeben, der am unteren Ende mit einem Clip verschlossen war. Das obere Ende wurde danach ebenfalls mit einem Clip verschlossen. Dieser Schlauch wurde dann in einem großen Becherglas in 250 ml 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ gelegt und bei 4°C auf einem Magnetrührer gelagert (Abb. 3B). Nach 1,5 Stunden wurde die Lösung im Glas ausgetauscht und insgesamt 4 mal, also 6 Stunden dialysiert. Die Lösung im Schlauch, die deutlich weniger geworden war, wurde dann in einen 50 ml-Falcon gegeben und im Exsikkator mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe über Nacht lyophilisiert. Das nun übriggebliebene Fettsäure-BSA-Pulver wurde in 10 ml 0,9% NaCl gelöst, um eine Endkonzentration von 10% BSA zu erreichen. Das BSA, an das die Fettsäuren jetzt gekoppelt sind, ist dabei für die Aufnahme in die Kardiomyozoten essentiell. Zur Synthese des Fettsäure-Mix wurden die Fettsäure-BSA-Lösungen aus Palmitoleinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 1:6:16 zusammenpipettiert. Die Messung der Endkonzentration der Fettsäuren in den synthetisierten Lösungen erfolgte mittels Gaschromatographie mit

Massenspektrometrie-Kopplung (GCMS) im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren.

A



B



Abb. 3: **A** Begasung der Lösung aus 4 ml Ethanol, 4 ml 10 mM Na_2CO_3 und jeweiliger Fettsäure mit Stickstoff unter Temperatur-Kontrolle und Erwärmen auf 60°C . **B** Dialyseschlauch mit Fettsäure-BSA-Lösung in 250 ml 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ bei 4°C .

4.9 Fettsäure-Behandlung

4.9.1 Fettsäure-Behandlung im Mausmodell

4.9.1.1 Fettsäurebehandlung im Rahmen des Pilotprojektes

Die verwendeten C57/Bl6-Mäuse (n = 10) waren alle männlich und zu Beginn des Projekts 2-4 Wochen alt. An Tag 1 wurden die Tiere operiert; dabei wurden 5 Mäuse einer Sham-OP zugeführt und 5 Mäusen wurde eine ALZET®-Mini-Osmose-Pumpe Modell 2001 implantiert. Die Implantation erfolgte rechts paravertebral subkutan. Die Pumpen hatten ein Fassungsvermögen von 200 µl und gaben pro Stunde 1µl des in Kapitel 4.9 beschriebenen Fettsäure-Gemisches ab. Der Behandlungszeitraum wurde mit 7 Tagen terminiert, da nach dieser Zeit nach Riquelme et. al bereits ein kardiomyozytäres Wachstum bei Mäusen zu beobachten sei [2]. Nach diesen 7 Tagen wurden die Tiere echokardiographisch untersucht. Die Untersuchung erfolgte nach thorakaler Enthaarung der Tiere in Sevofluran-Narkose. An Tag 8 erfolgte die Tötung der Mäuse und anschließende Entnahme von Serum, Herz, Lunge, Nieren, Fettgewebe und thorakaler Aorta. Mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GCMS) im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Leitung Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren) wurden die Fettsäure-Konzentrationen in den Mausseren gemessen, um so eine erfolgreiche Applikation zu überprüfen.

4.9.1.2 Fettsäurebehandlung über 5 Wochen

24 C57/Bl6-Mäuse wurden über 5 Wochen mit dem in Kapitel 4.9 beschriebenen Fettsäure-Gemisch oder einer Kontrolllösung ohne Fettsäuren behandelt. Die Applikation erfolgte mittels subkutaner Spritzeninjektion. Um dieselbe Fettsäuremenge pro Tag wie im Pilotprojekt zu applizieren, wurden den Tieren täglich 24 µl Fettsäure-Gemisch verabreicht. Nach 5-wöchiger Behandlung erfolgten echokardiographische Untersuchung, Hämodynamikmessung und Tötung der Tiere mit Organentnahme (Serum, Herz, Lunge, Nieren, Fettgewebe und thorakale Aorta). Auch hier erfolgte mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GCMS) im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Leitung Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren) eine Fettsäure-Konzentrationsmessung in den Mausseren.

4.9.2 Fettsäure-Behandlung isolierter Kardiomyozyten in Zellkultur

An Tag 2 nach der Kardiomyozytenisolation (s. Kapitel 4.1) erfolgte bei den Zellen ein Mediumwechsel. Pro Sixwell wurden nun 2 ml serumfreies Medium (Hungermedium) hinzugegeben. Die Zellen wurden sowohl mit dem Fettsäure-Gemisch als auch mit den einzelnen Fettsäuren behandelt. Dabei entsprachen beispielsweise 2 % Fettsäure-Behandlung 40 µl Fettsäure-BSA-Lösung bzw. 40 µl Fettsäure-Gemisch-BSA-Lösung in 2 ml Hungermedium. Die Kontrollzellen wurden mit 10 % BSA-Lösung in gleicher Relation zum Hungermedium wie die Fettsäuren behandelt. Die Behandlung erfolgte immer über 48 Stunden. Nach dieser Zeit standen die Zellen bereit für Western Blot, Durchflusszytometrie und Nativmikroskopie. Zusätzlich zu den Fettsäuren wurden die Zellen mit AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside) und Compound C behandelt. AICAR fungiert als membrangängiges AMP-Analogon als Aktivator der AMP-Kinase (AMPK). AICAR lag in Pulverform vor. Es wurden 50 mg AICAR-Pulver mit 1,936 ml NaCl 0,9 % als Stock für die spätere Behandlung angesetzt, was einer Konzentration von 100 mM entsprach. Die Zellen wurden mit 1 mM AICAR behandelt, was bei 2 ml Hungermedium somit der Zugabe von 10 µl AICAR-Stock entspricht. Compound C ist ein selektiver AMPK-Inhibitor und lag in flüssiger Form vor. Die Behandlung erfolgte mit 2 µl Compound C auf 2 ml Medium entsprechend einer Konzentration von 10 µM.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse Pilotprojekt nach 7 Tagen Fettsäure-Behandlung mit ALZET® mini-osmotischen Pumpen

5.1.1 Eine in-vivo-Behandlung von C57/Bl6-Mäusen mit dem Fettsäure-Mix über 7 Tage führt zu signifikanter Serum-Konzentrationszunahme von Palmitolein-, Myristin- und Palmitinsäure

Mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GCMS) im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Leitung Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren) wurden die Fettsäure-Konzentrationen in den Mausseren nach 7 Tagen Fettsäure-Behandlung gemessen, um so eine erfolgreiche Applikation zu überprüfen. Das Ergebnis war eine signifikante Steigerung der Konzentrationen der speziellen Fettsäuren des Fettsäure-Mix (Palmitolein-, Myristin- und Palmitinsäure).

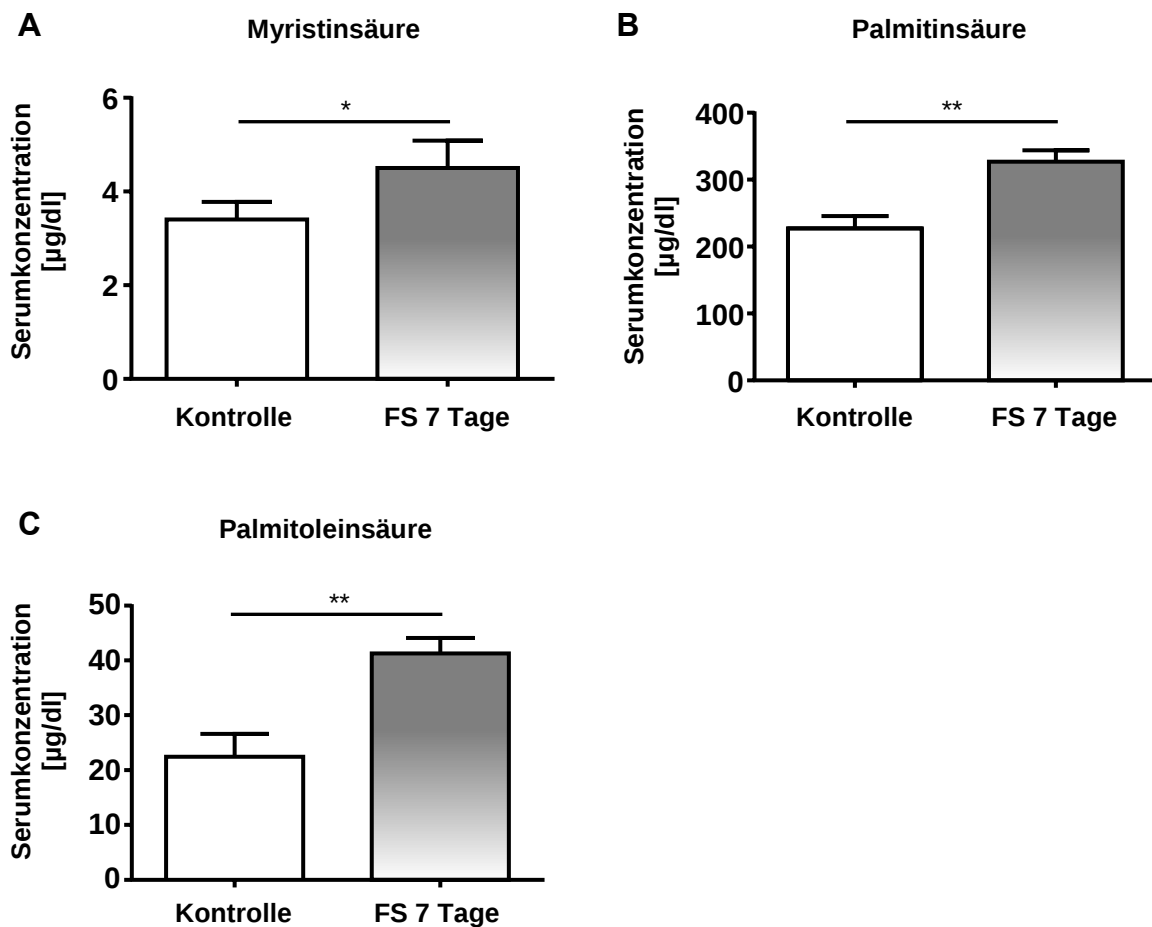


Abb. 4: Serumkonzentrationen von Myristin-, Palmitin-, und Palmitoleinsäure nach 7 tägiger subkutaner Fettsäure-Applikation mittels Alzet-Mini-Osmose-Pumpe. Analyse der Fettsäurekonzentrationen in C57/Bl6 Mäusen nach 7 tägiger Fettsäurebehandlung (1µl/h) mittels Alzet-Mini-Osmose-Pumpe (FS 7d, rot) und C57/Bl6 Mäusen ohne Behandlung (Kontrolle, blau) mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GCMS). Nach Behandlung zeigt sich eine Erhöhung der einzelnen Fettsäuren im Serum. n = 10, Kontrolle (n = 5), FS7d (n = 5) (*p<0.05; **p<0.01)

5.1.2 Eine Applikation des Fettsäure-Mix über 7 Tage führt nicht zu einer signifikanten Änderung echokardiographischer Parameter

An Tag 7 nach der Fettsäure-Pumpen-Implantation erfolgte eine echokardiographische Untersuchung der Mäuse. Die Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied der echokardiographischen Messgrößen (s. Tab. 2) zwischen Kontroll- und Fettsäure-Gruppe.

Messgröße	Einheit	Kontrolle	FS 7d	p-Wert
IVS; d	[mm]	0,68±0,2	0,87±0,08	0,97
IVS; s	[mm]	0,92±0,03	0,87±0,08	0,48
LVAW; d	[mm]	0,68±0,02	0,64±0,05	0,32
LVAW; s	[mm]	0,89±0,03	0,80±0,06	0,23
LVID; d	[mm]	4,78±0,14	4,37±0,37	0,23
LVID; s	[mm]	3,96±0,09	3,67±0,31	0,30
LVPW; d	[mm]	0,67±0,02	0,76±0,04	0,06
LVPW; s	[mm]	0,84±0,04	0,93±0,02	0,11
FS	[%]	17,16±1,01	16,28±0,87	0,49
EF	[%]	35,73±1,81	34,28±1,6	0,53
E/A		1,45±0,01	1,26±0,07	0,11
korr. LV-Masse	[mg]	103,33±7,32	98,5±10,89	0,68

Tab. 2: Vergleich echokardiographischer Parameter nach 7 tägiger Fettsäure-Behandlung durch Fettsäure-Pumpen mit unbehandelten Kontrollmäusen. Die Behandlung mit dem FS-Mix führte zu keiner Veränderung kardialer Funktionsparameter in der Echokardiografie. n = 10, Kontrolle (n = 5), FS7d (n = 5)

5.1.3 Eine Applikation des Fettsäure-Mix über 7 Tage führt nicht zu einer signifikanten Änderung von Herzgewicht, Körpergewicht und intrapulmonaler Flüssigkeitsmenge

Am 8. Tag nach der Fettsäure-Pumpen-Implantation wurden die Mäuse getötet und u. a. Herz und Lunge entnommen. Es zeigte sich bei den mit dem Fettsäure-Mix behandelten Tieren keine signifikante Änderung von Herz- und Körpergewicht. Auch der intrapulmonale Flüssigkeitsgehalt blieb unbeeinflusst.

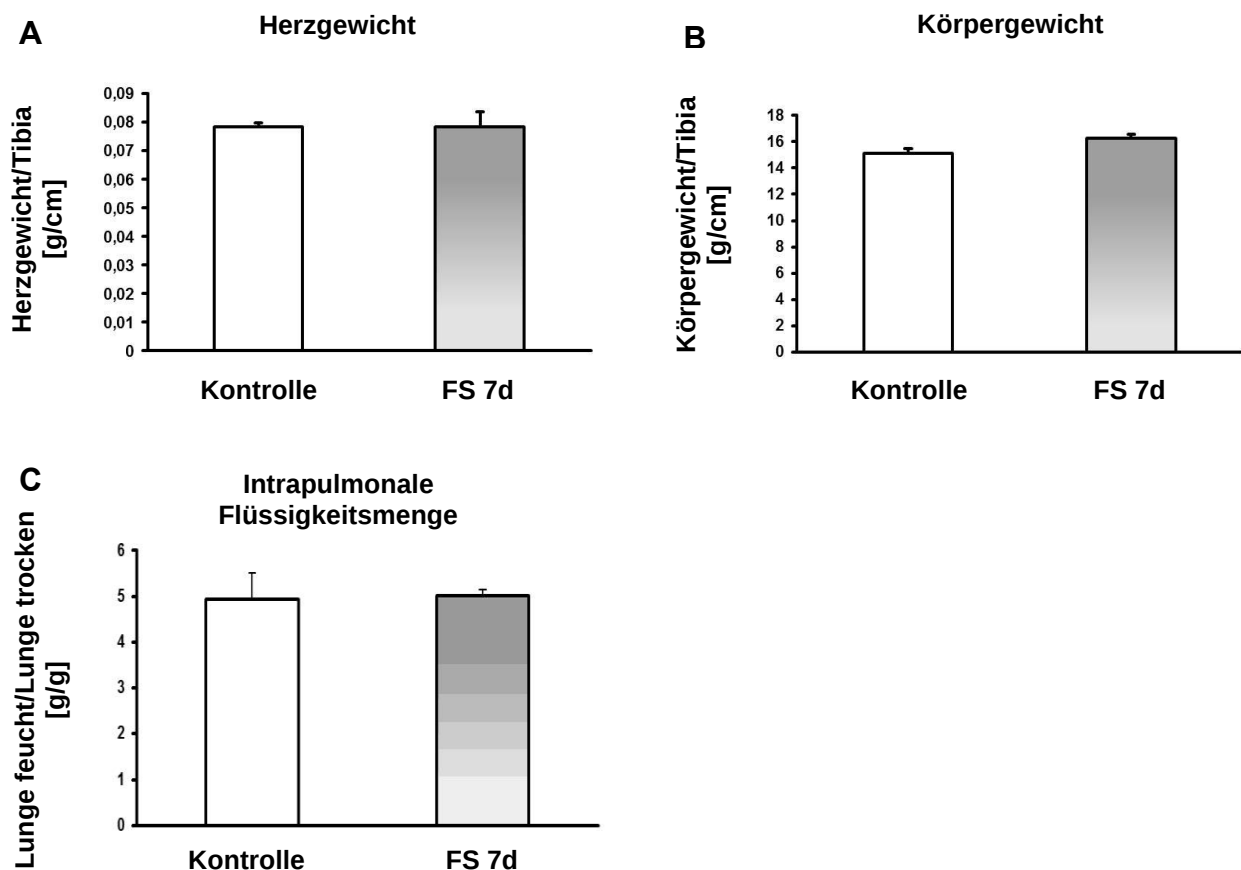


Abb. 5: Messung von Herz-, Körper- und Lungengewicht nach 7 tägiger Fettsäure-Behandlung. Die Behandlung mit dem FS-Mix hatte keinen Einfluss auf Herz- und Körpergewicht und intrapulmonale Flüssigkeitsmenge. n = 10, Kontrolle (n = 5), FS7d (n = 5)

5.1.4 Eine 7 tägige Behandlung mit dem Fettsäure-Mix führt nicht zu einer signifikanten Steigerung der Myozytenfläche im HE-Präparat

Nach Organentnahme der Herzen an Tag 8 wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Auswertung der der Kardiomyozytenfläche zeigte nach 7 Tagen keine Zunahme bei den mit dem Fettsäure-Mix behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

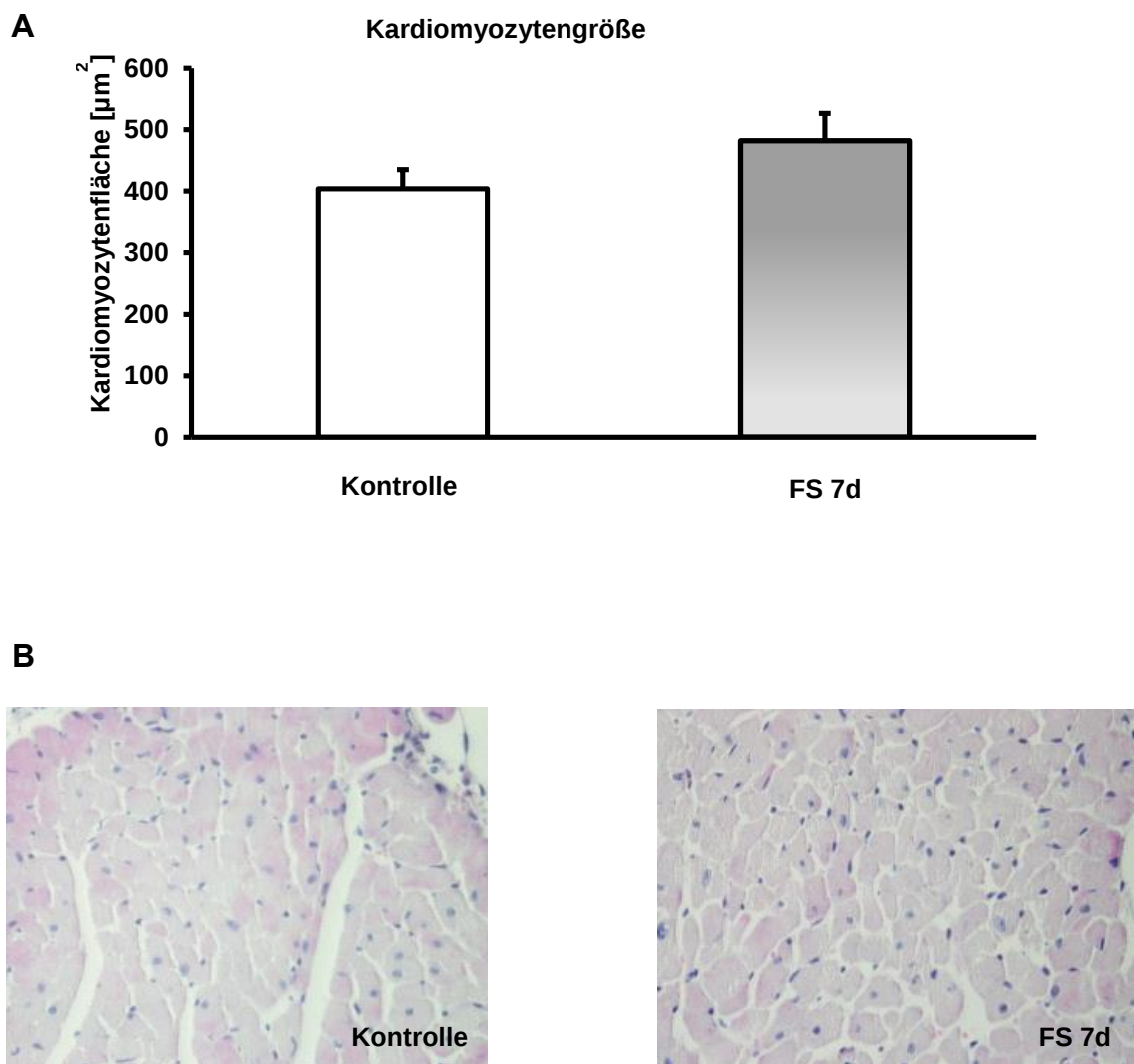


Abb. 6: Effekt des Fettsäure-Mix auf die Kardiomyozytengröße nach 7 tägiger Fettsäure-Behandlung. **A** Repräsentative Analyse der Kardiomyozytenfläche nach Fettsäure-Mix-Behandlung. Der FS-Mix führte nicht zu mikroskopisch messbarer Kardiomyozytenhypertrophie. **B** Repräsentative HE-Präparate von linksventrikulärem Myokard nach Fettsäure-Behandlung. $n = 10$ (Auswertung von 100 Kardiomyozyten pro Versuchstier)

5.1.5 Eine 7 tägige Behandlung mit dem Fettsäure-Mix führt nicht zu einer signifikanten Änderung der Myokardfibrose

Neben Hämatoxylin-Eosin- wurden nach Organentnahme auch Sirius-Red-Färbungen zur quantitativen Darstellung von Myokardfibrosen angefertigt. Diese zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und mit dem Fettsäure-Mix behandelten Mäusen.

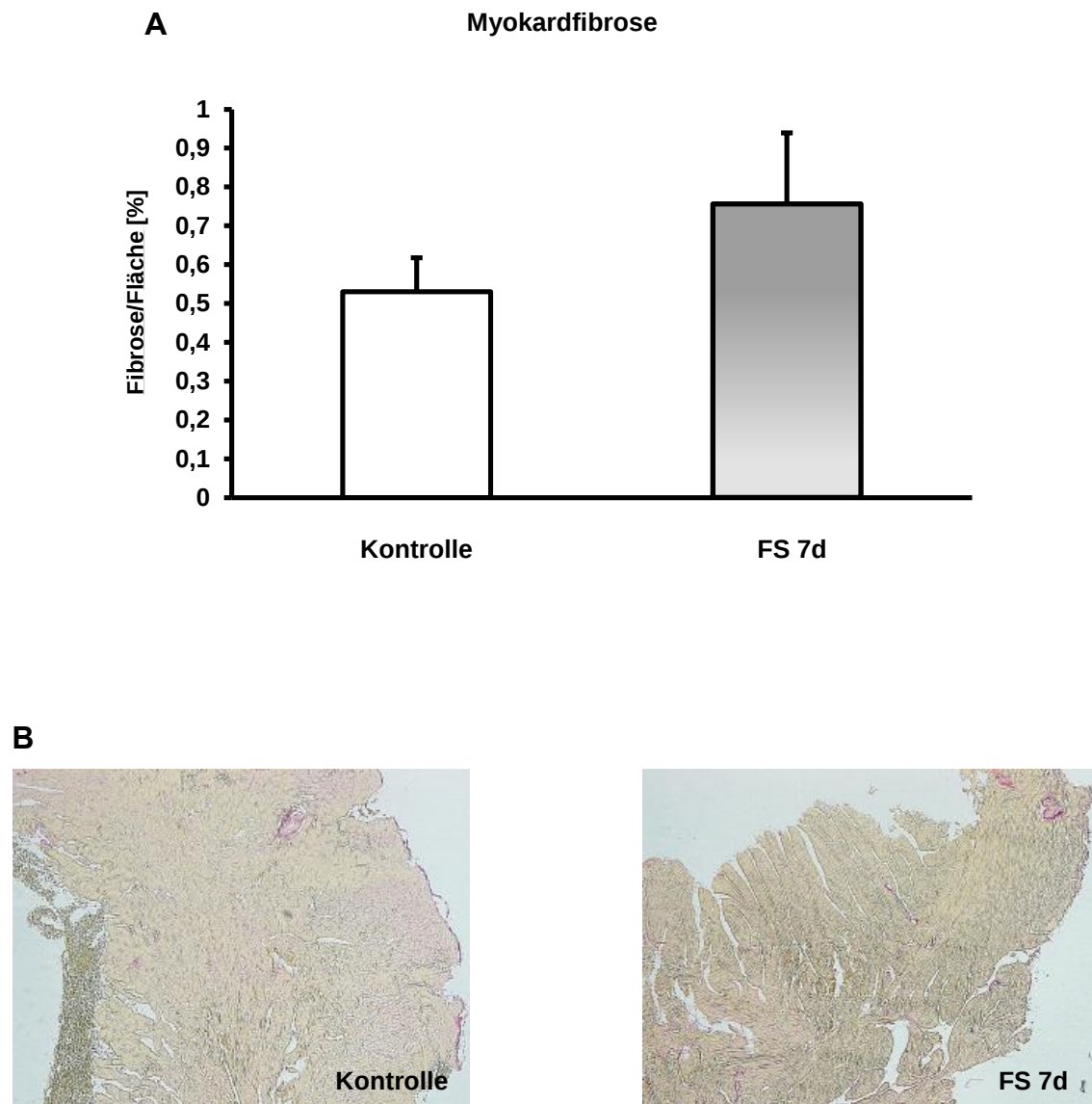


Abb. 7: Quantitativer Effekt des Fettsäure-Mix auf die Myokardfibrose nach 7 tägiger Fettsäure-Behandlung. **A** Repräsentative Analyse der Myokardfibrose in Parafinschnitten aus linksventrikulärem Myokard nach Sirius-Red-Färbung. Die Behandlung mit dem FS-Mix hatte keine kardiale Fibrose zur Folge. **B** Repräsentative Sirius-Red-Präparate von linksventrikulärem Myokard n = 10

5.2 Ergebnisse Mausmodell nach 5 Wochen Fettsäure-Behandlung

Im zweiten Teil unseres Projektes zur in-vivo-Fettsäure-Behandlung von C57/Bl6-Mäusen (Charles River) wurde sowohl die Versuchstieranzahl (n=24) als auch der Behandlungszeitraum (5 Wochen) verlängert, um so einen möglichen Effekt des Fettsäure-Mix deutlicher sichtbar zu machen.

5.2.1 Serummessung nach 5 Wochen

Nach 5 Wochen Behandlung mit dem FS-Mix zeigte sich keine Steigerung der Serumspiegel von Myristin-, Palmitin- und Palmitoleinsäure.

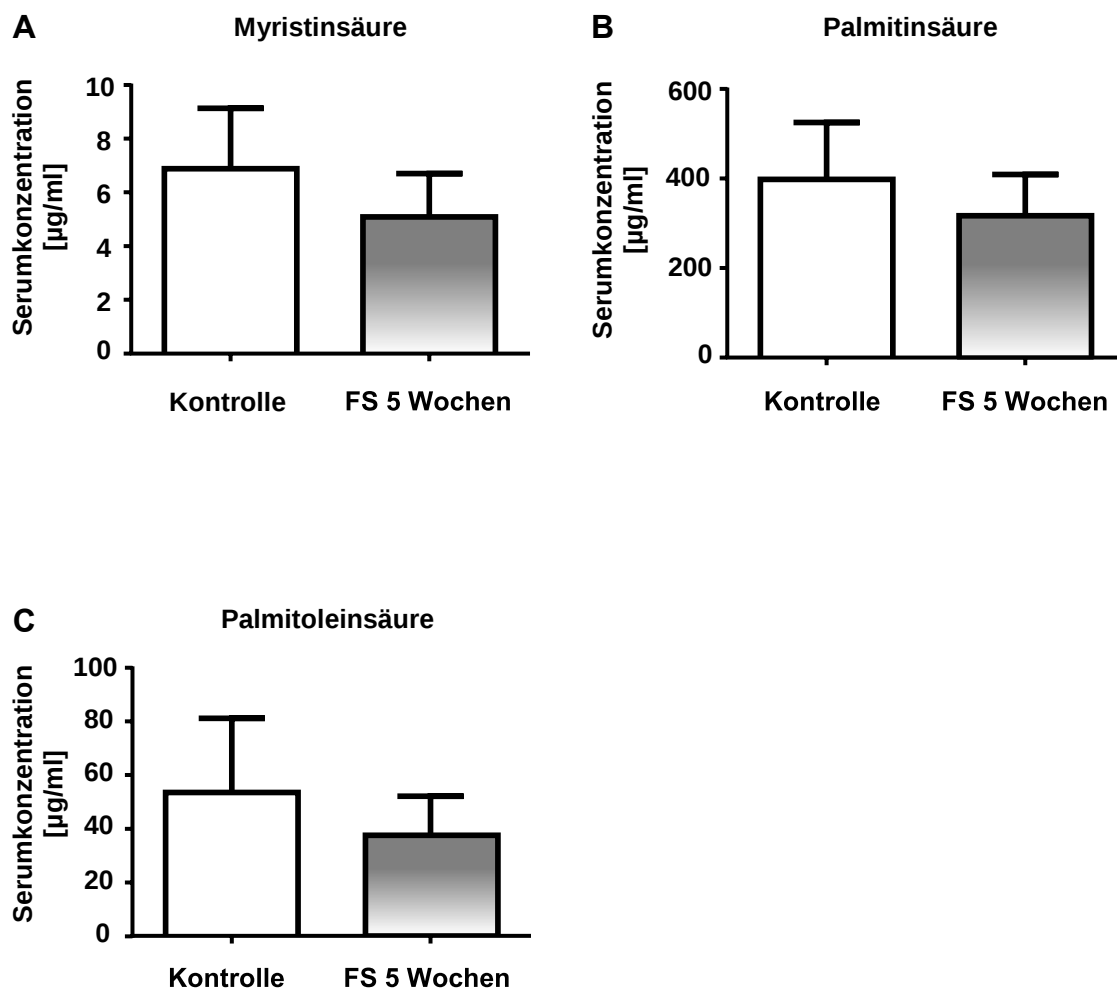


Abb. 8: Serumkonzentrationen von Myristin-, Palmitin-, und Palmitoleinsäure nach 5 Wochen subkutaner Fettsäure-Applikation. Repräsentative Analyse der Fettsäurekonzentrationen in C57/Bl6 Mäusen nach 5 Wochen Fettsäurebehandlung mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GCMS). Es zeigt sich keine Erhöhung der einzelnen Fettsäuren im Serum nach 5 Wochen. n = 24

5.2.2 Der Fettsäure-Mix führt nach 5 Wochen echokardiographisch nicht zu kardialer Hypertrophie

Sowohl vor (später als Baseline bezeichnet, Tab. 3) als auch nach der 5 wöchigen Behandlung mit dem Fettsäure-Mix wurden alle Mäuse echokardiographisch untersucht. Dabei zeigte sich zunächst wie erwartet eine kardiale Hypertrophie nach TAC-Operation (Zunahme von IVSd, LVAWd und linksventrikulärer Masse). Die Hypertrophie nach TAC-Operation war unabhängig von der Fettsäure-Behandlung. Eine Hypertrophie durch die Fettsäure-Behandlung blieb aus (kein signifikanter Unterschied zwischen den Fettsäure- und Kontrollgruppen). Im Vergleich aller Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied des LVID und der Ejektionsfraktion gefunden.

Messgröße	Einheit	Kontrolle Sham	FS Sham	Kontrolle TAC	FS TAC
IVS; d	[mm]	0,60±0,05	0,59±0,03	0,67±0,01	0,67±0,01
IVS; s	[mm]	0,72±0,05	0,73±0,03	0,90±0,05	0,87±0,02
LVAW; d	[mm]	0,56±0,01	0,55±0,03	0,67±0,02	0,66±0,02
LVAW; s	[mm]	0,71±0,01	0,76±0,02	0,84±0,04	0,84±0,03
LVID; d	[mm]	4,41±0,12	4,60±0,13	4,81±0,06	4,77±0,09
LVID; s	[mm]	3,60±0,13	3,67±0,12	4,01±0,09	4,02±0,11
LVPW; d	[mm]	0,59±0,04	0,65±0,01	0,68±0,05	0,78±0,03
LVPW; s	[mm]	0,79±0,02	0,89±0,02	0,88±0,05	0,98±0,04
FS	[%]	18,28±1,15	20,35±0,58	16,51±1,21	15,84±1,52
EF	[%]	38,77±1,58	41,58±1,03	34,51±2,25	33,11±2,93
E/A		1,82±0,15	1,96±0,20	2,12±0,25	1,84±0,14
korr. LV-Masse	[mg]	72,70±5,56	82,40±3,97	102,81±3,85	107,99±9,27

Tab. 3: Vergleich echokardiographischer Parameter nach 5 wöchiger Fettsäure-Behandlung durch tägliche subkutane Applikation mit unbehandelten Kontrollmäusen. Die Behandlung mit dem FS-Mix führte zu keiner Veränderung kardialer Funktionsparameter in der Echokardiografie. n = 24, Kontrolle Sham (n = 5), Kontrolle TAC (n = 6), FS Sham (n = 5), FS TAC (n = 8)

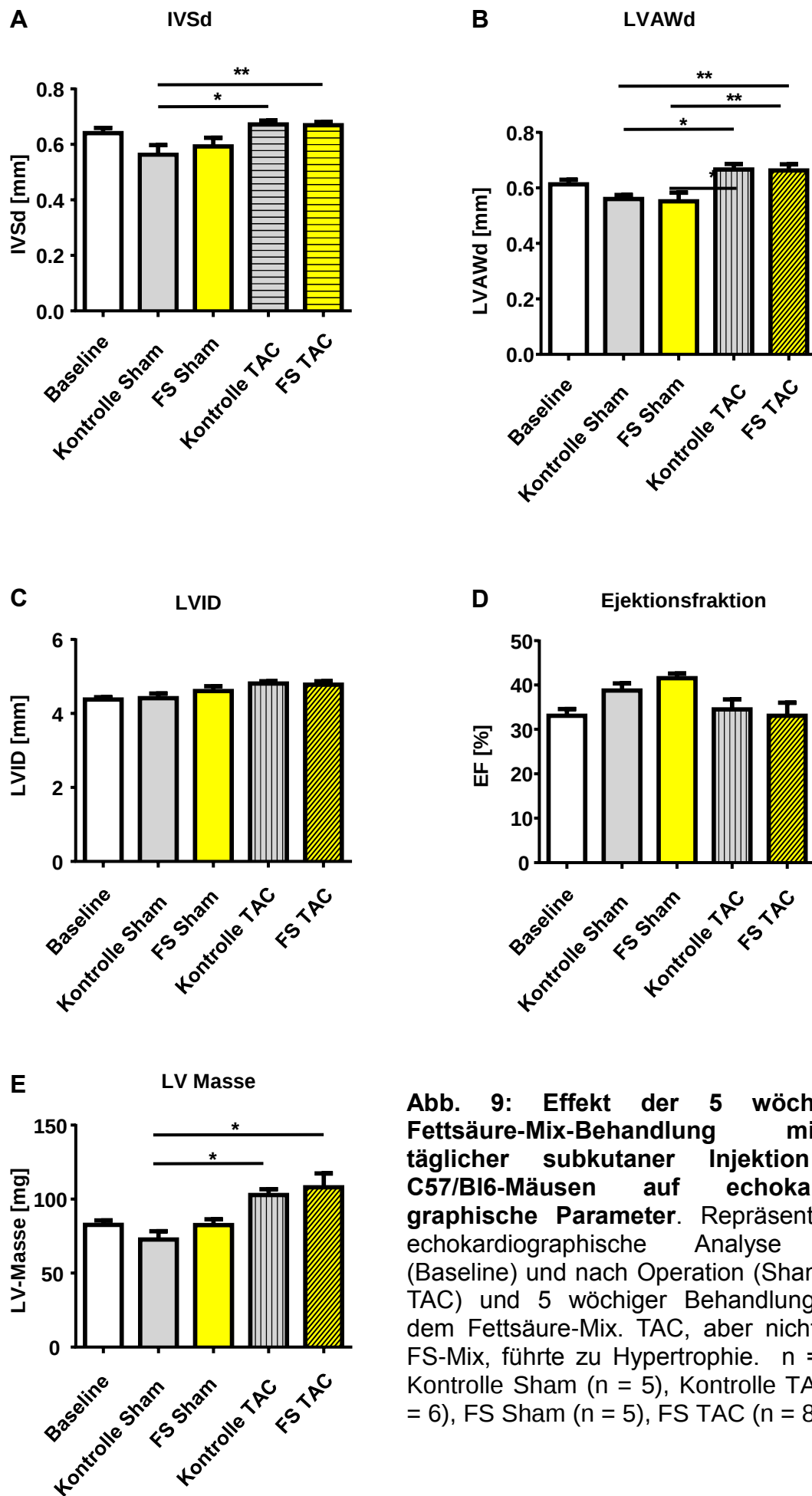


Abb. 9: Effekt der 5 wöchigen Fettsäure-Mix-Behandlung mittels täglicher subkutaner Injektion in C57/Bl6-Mäusen auf echokardiographische Parameter. Repräsentative echokardiographische Analyse vor (Baseline) und nach Operation (Sham vs. TAC) und 5 wöchiger Behandlung mit dem Fettsäure-Mix. TAC, aber nicht der FS-Mix, führte zu Hypertrophie. n = 24, Kontrolle Sham (n = 5), Kontrolle TAC (n = 6), FS Sham (n = 5), FS TAC (n = 8)

5.2.3 Der Fettsäure-Mix hat keinen Einfluss auf Herz- und Körpergewicht

Nacht Tötung der Tiere und Organentnahme zeigte sich passend zu den echokardiographischen Befunden eine Zunahme des Herzgewichts durch TAC-Operation jedoch nicht durch die Fettsäurebehandlung. Das Körpergewicht wurde nicht beeinflusst. Ebenso fanden sich keine messbaren Unterschiede in der Auswertung des intrapulmonalen Flüssigkeitsgehalts.

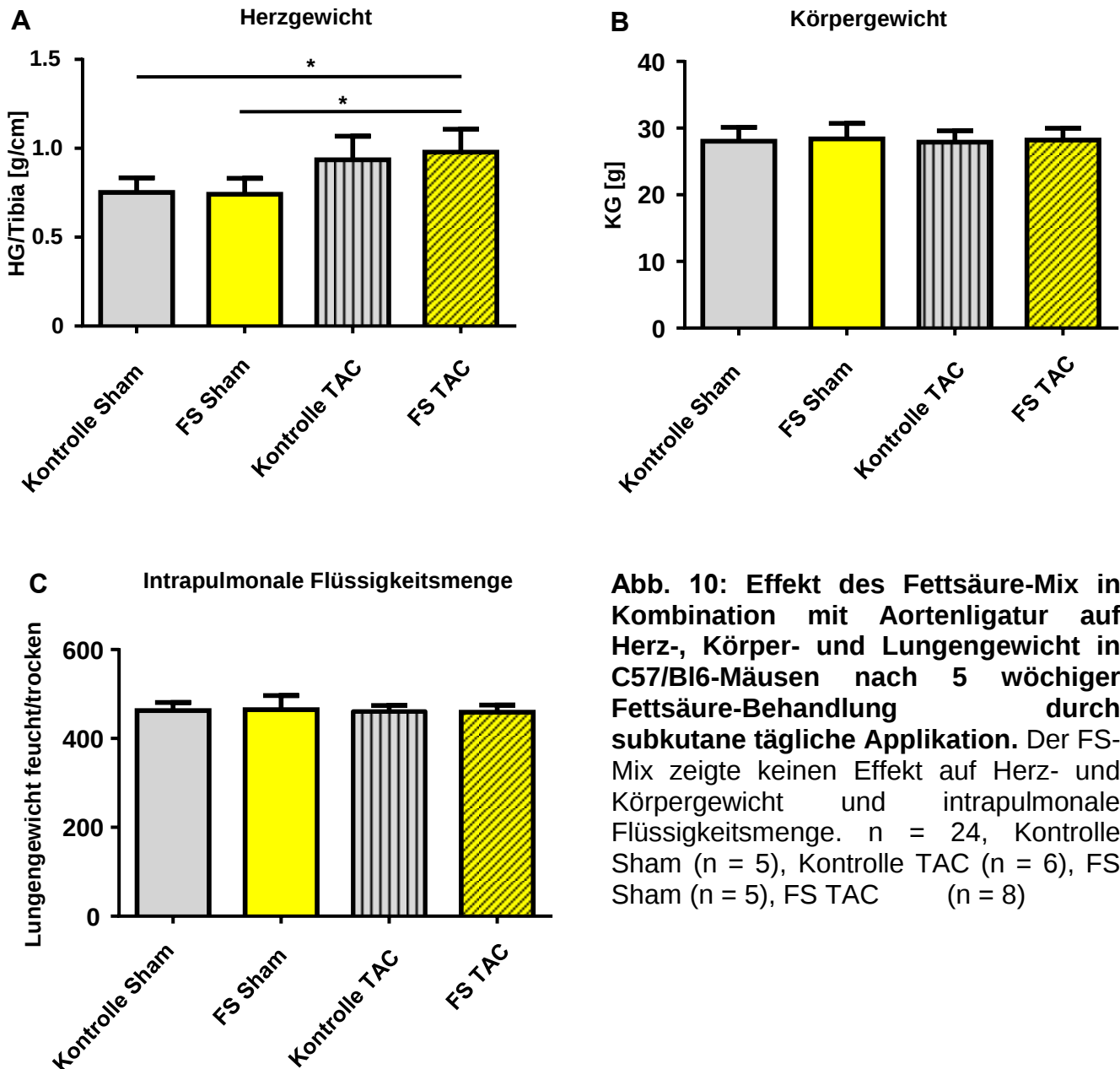


Abb. 10: Effekt des Fettsäure-Mix in Kombination mit Aortenligatur auf Herz-, Körper- und Lungengewicht in C57/Bl6-Mäusen nach 5 wöchiger Fettsäure-Behandlung durch subkutane tägliche Applikation. Der FS-Mix zeigte keinen Effekt auf Herz- und Körpergewicht und intrapulmonale Flüssigkeitsmenge. n = 24, Kontrolle Sham (n = 5), Kontrolle TAC (n = 6), FS Sham (n = 5), FS TAC (n = 8)

5.2.4 Der Fettsäure-Mix führt nach 5 Wochen in der HE-Färbung nicht zu Hypertrophie

Die Auswertung der Kardiomyozytengröße in den HE-Schnitten zeigte unter den Kontrolltieren eine Zunahme durch TAC-Operation, welche in der Fettsäure-Gruppe ausblieb. Zudem waren die Kardiomyozyten in der Sham-Gruppe durch Fettsäurebehandlung leicht vergrößert. Diese Ergebnisse waren nicht signifikant.

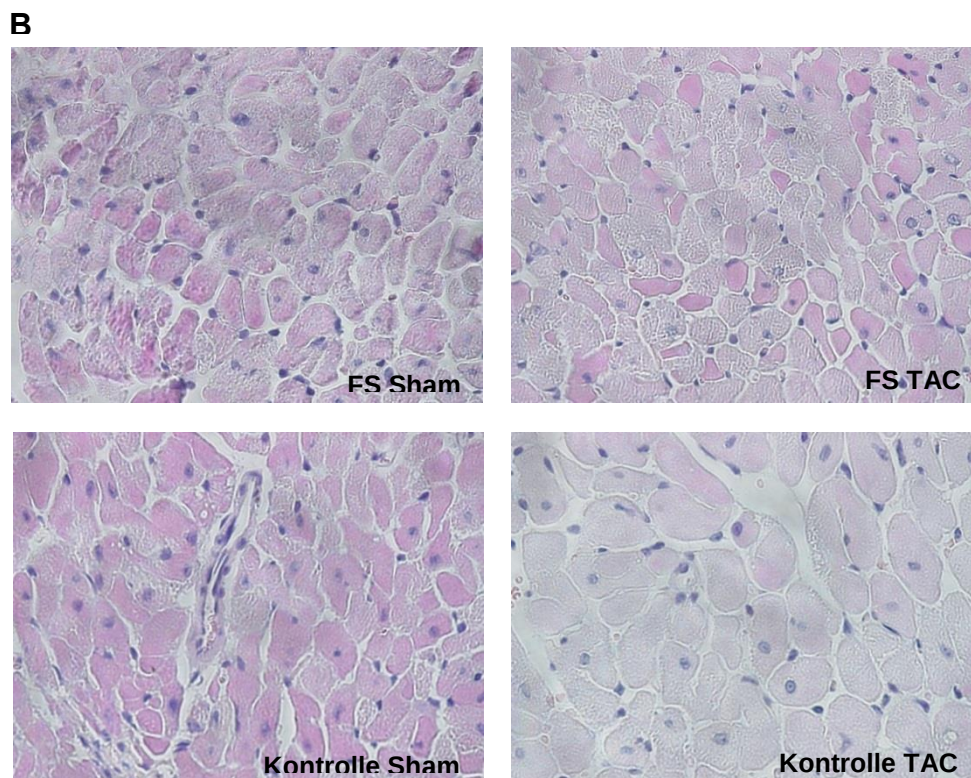
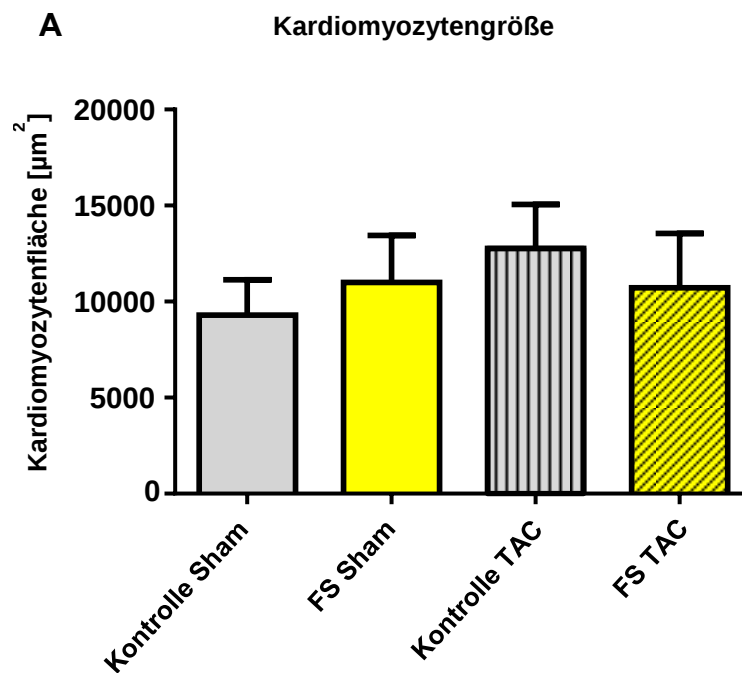


Abb. 11: Effekt des Fettsäure-Mix in Kombination mit Aortenligatur auf die Kardiomyozytengröße nach 5 wöchiger Fettsäure-Behandlung durch subkutane tägliche Applikation. **A** Repräsentative Analyse der Kardiomyozytenfläche von HE-gefärbtem Myokard. Unter Behandlung mit dem FS-Mix kam es zu keiner signifikanten Zunahme der Kardiomyozytengröße. **B** Repräsentative HE-Präparate von linksventrikulärem Myokard. n = 24, Kontrolle Sham (n = 5), Kontrolle TAC (n = 6), FS Sham (n = 5), FS TAC (n = 8)

5.2.5 Fibrose Sirius-Red

Die quantitative Analyse der Myokardfibrose nach 5 wöchiger Fettsäure-Behandlung zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der 4 Gruppen.

5.3 Zellkultur-Ergebnisse

5.3.1 Die Behandlung mit Myristinsäure, nicht jedoch mit dem Fettsäure-Mix führt zu einer Größenzunahme der Kardiomyozyten

Riquelme et al. beschrieben eine Zellgrößenzunahme in Zellkultur nach Behandlung mit dem FS-Mix [2]. Eine nativmikroskopische Analyse der Zellgröße nach 48 stündiger Behandlung mit 2% FS-Mix, sowie mit 2% der einzelnen im FS-Mix enthaltenen Fettsäuren (Palmitoleinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure) zeigte nur bei Behandlung mit Myristinsäure eine signifikante Größenzunahme der Kardiomyozyten. Der FS-Mix und Palmitinsäure führten nicht zu Hypertrophie.

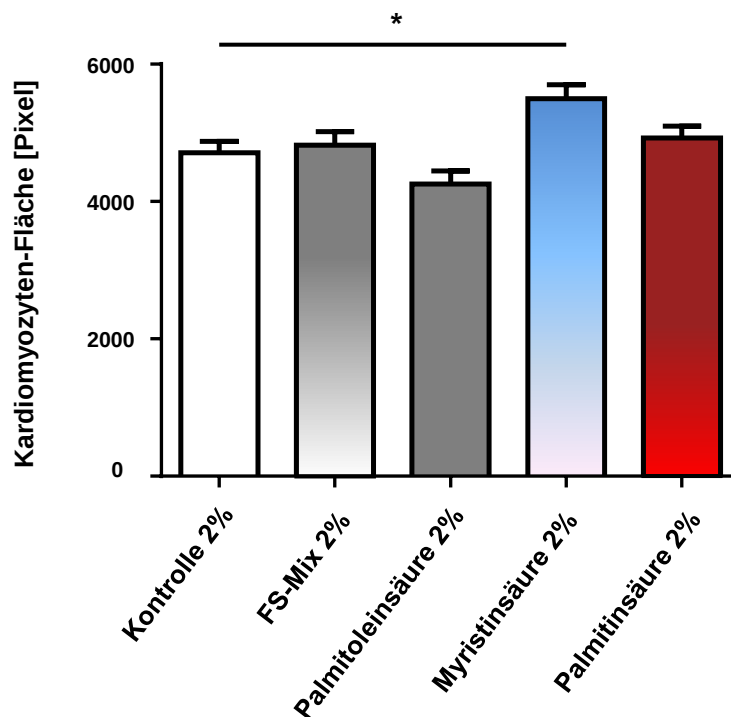


Abb. 12: Effekt von FS-Mix, Palmitoleinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure auf die Kardiomyozytengröße. Nativmikroskopie der Kardiomyozyten nach 48 Stunden Inkubation mit dem FS-Mix, Palmitoleinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure. Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Myristinsäure, nicht aber mit Palmitinsäure oder dem FS-Mix, führte nach 48h zu einer Zunahme der Zellgröße. n = 150 (*p<0.05)

5.3.2 Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Palmitinsäure, nicht jedoch mit dem Fettsäure-Mix, führt zu vermehrter Apoptose

Bei den durch Riquelme et al. beschriebenen physiologischen Effekten des FS-Mix auf die Kardiomyozyten und den bereits bekannten proapoptotischen Effekten von Palmitinsäure, welche Teil des FS-Mix ist, stellte sich nun die Frage wie sich die Behandlung der Kardiomyozyten mit dem FS-Mix auf die Apoptoserate auswirkt. Hierzu wurden die isolierten Zellen über 48 Stunden in Zellkultur mit 1% und 2% FS-Mix sowie 1% und 2% Palmitinsäure inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine durchflusszytometrische Apoptose-Messung nach Markierung der apoptotischen Zellen mittels Annexin V. Eine Stunde vor der Messung wurde zu einer unbehandelten Gruppe (Positivkontrollen) H_2O_2 pipettiert, sodass eine Konzentration von 1mM H_2O_2 erreicht wurde. Palmitinsäure 1% führte zu einer Steigerung der Apoptose auf $158 \pm 3\%$, Palmitinsäure 2% auf $333 \pm 21\%$. Dieser Effekt blieb bei Behandlung mit dem FS-Mix aus.

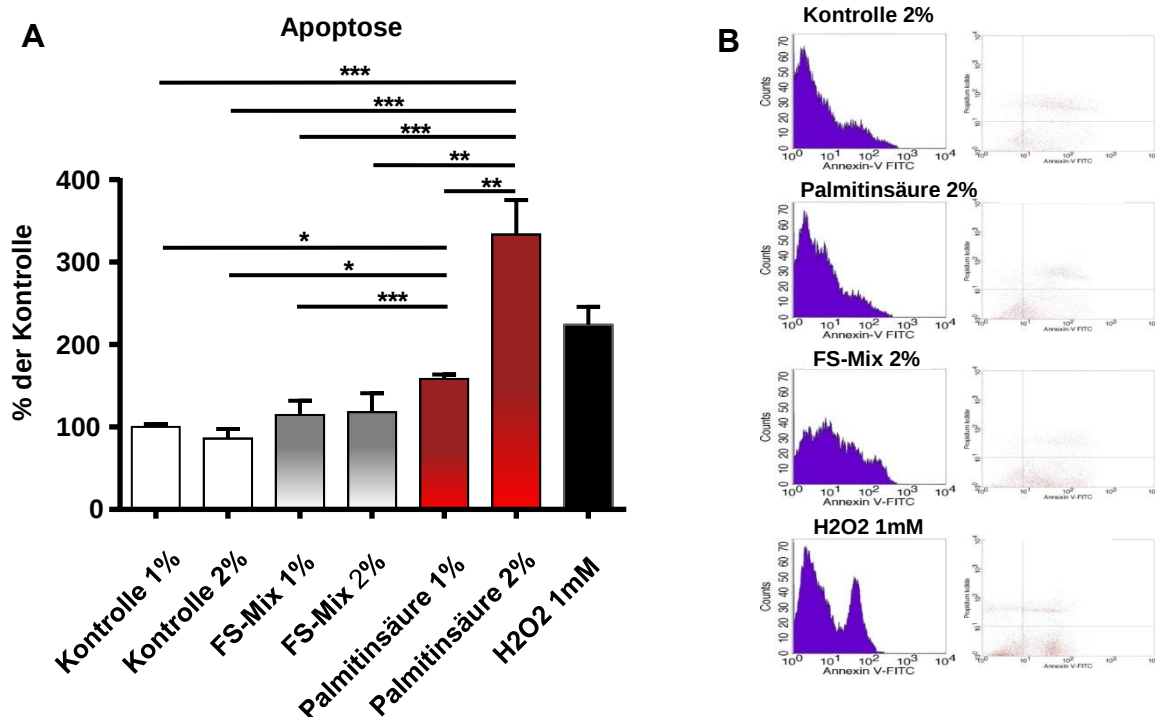
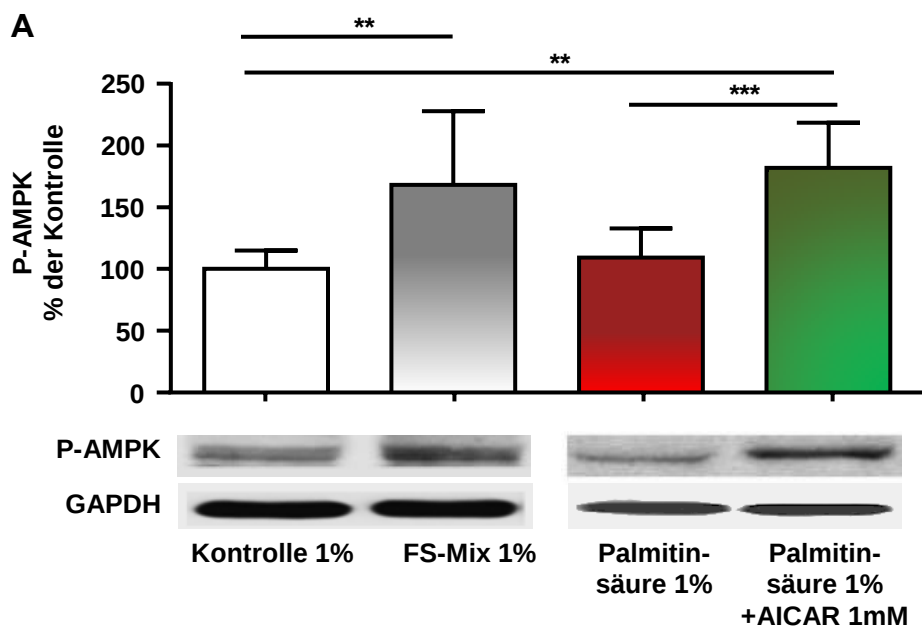


Abb. 13: Effekt von FS-Mix und Palmitinsäure auf die Apoptoserate der Kardiomyozyten. **A** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Apoptose in Kardiomyozyten mittels Annexin V nach 48 stündiger Inkubation mit 1% und 2% FS-Mix, Palmitoleinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure. Palmitinsäure führte konzentrationsabhängig zu Apoptose. **B** Repräsentative Dop-Plot-Darstellung der durchflusszytometrischen Apoptoseanalyse in Kardiomyozyten nach 48 Stunden Fettsäurebehandlung. Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Palmitinsäure, nicht jedoch mit dem Fettsäure-Mix, führte zu vermehrter Apoptose. $n = 18 - 32$; (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

5.3.3 Sowohl der Fettsäure-Mix als auch der AMPK-Aktivator AICAR führen zu einer gesteigerten Phosphorylierung der AMPK, welche bei Behandlung mit Palmitinsäure ausbleibt

Im Folgenden wurde die AMPK als zentraler Regulator des zellulären Energiemetabolismus untersucht. Es folgten Western Blot Analysen nach 48 stündiger Behandlung mit dem Fettsäure-Mix und Palmitinsäure. Dabei wurde eine Gruppe mit dem AMPK-Aktivator AICAR (1mM) eine Stunde vor der Palmitinsäure-Behandlung präinkubiert. Die Auswertung zeigte eine auf $155 \pm 19\%$ gesteigerte Phosphorylierung der AMP-Kinase bei Behandlung mit dem Fettsäure-Mix. Diese Aktivierung blieb bei Behandlung der Kardiomyozyten mit Palmitinsäure aus, konnte jedoch durch Präinkubation mit AICAR auf $170 \pm 30\%$ gesteigert werden. Die Expression der AMP-Kinase blieb dabei in allen Fällen unbeeinflusst.



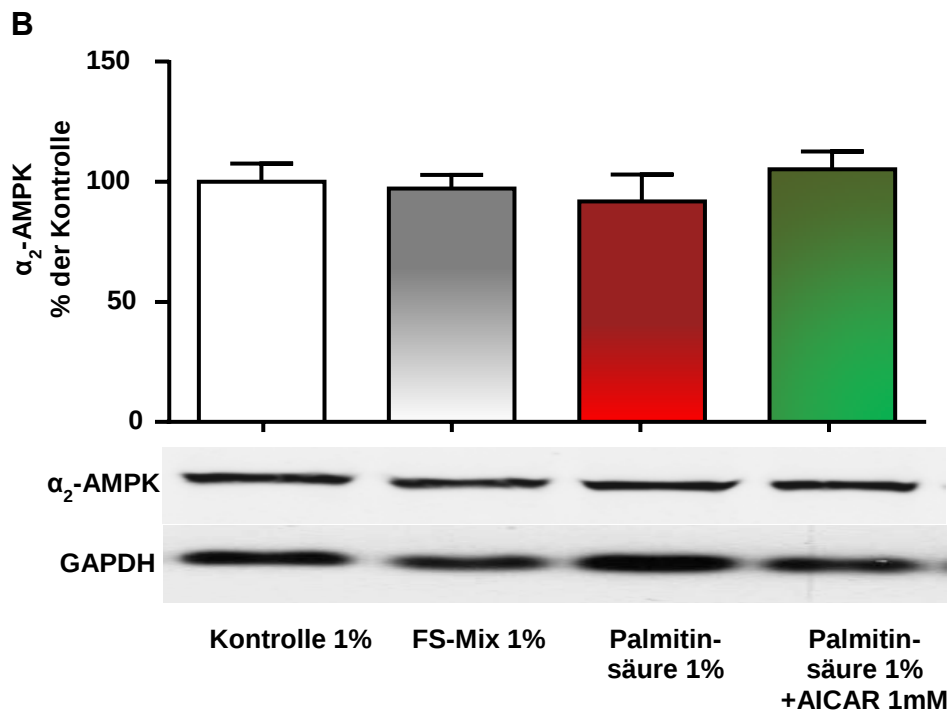


Abb. 14: Effekt von FS-Mix, Palmitinsäure und AMPK-Aktivator AICAR auf die AMP-Kinase. Repräsentative Western Blot Analyse der **A** Phosphorylierung und **B** Expression der AMP-Kinase in Kardiomyozyten nach 48 stündiger Behandlung mit 1% FS-Mix, 1% Palmitinsäure und Präinkubation Palmitinsäure-behandelter Zellen mit 1mM AICAR. Der FS-Mix und AICAR steigerten die Phosphorylierung der AMPK. Dies blieb unter Behandlung mit Palmitinsäure aus. n = 5-20 (**p<0.01; ***p<0.001)

5.3.4 Im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit Palmitinsäure führen der Fettsäure-Mix und AICAR zu einer gesteigerten Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Phosphorylierung des AMPK-Target Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC). Die ACC ist im dephosphorylierten Zustand aktiv, sodass eine Phosphorylierung durch die AMP-Kinase zur Inaktivierung und somit zu vermehrter Fettsäureoxidation führt [30]. Konsekutiv zur gesteigerten Aktivierung der AMP-Kinase durch den Fettsäure-Mix konnte unter gleichen Bedingungen auch eine auf $177 \pm 23\%$ gesteigerte Phosphorylierung der ACC beobachtet werden. Diese Aktivierung zeigte sich nicht in den mit Palmitinsäure behandelten Kardiomyozyten, konnte allerdings durch Präinkubation mit AICAR auf $242 \pm 33\%$ gesteigert werden.

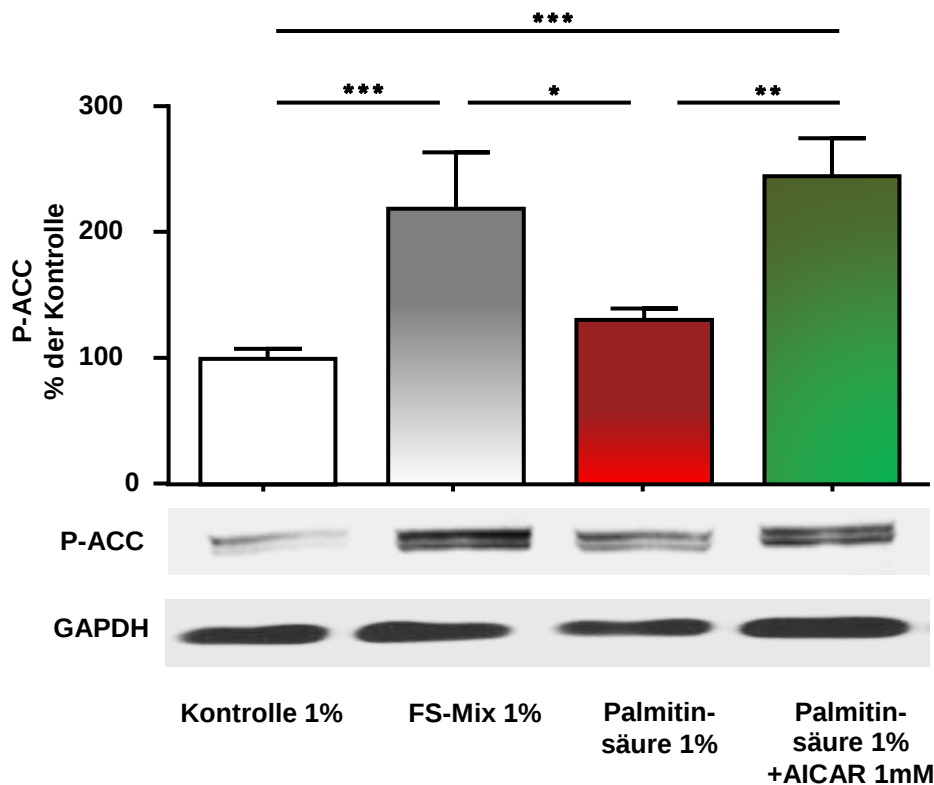


Abb. 15: Effekt von FS-Mix, Palmitinsäure und AMPK-Aktivator AICAR auf die Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase. Repräsentative Western Blot Analyse der Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) in Kardiomyozyten nach 48 stündiger Behandlung mit 1% FS-Mix, 1% Palmitinsäure und Präinkubation Palmitinsäure-behandelter Zellen mit 1mM AICAR. Der FS-Mix und AICAR steigerten die Phosphorylierung der ACC. Dieser Effekt blieb unter Behandlung mit Palmitinsäure aus. n = 8-29 (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

5.3.5 AICAR verhindert eine Palmitinsäure-induzierte Expressionssteigerung der Fettsäure-Translokase FAT/CD36

Im Folgenden wurde die Fettsäure-Translokase CD36, welche für die Aufnahme von 50 – 70% der im Myokard vorhandenen Fettsäuren verantwortlich ist, untersucht. Palmitinsäurebehandlung führte zu einer auf $163 \pm 23\%$ gesteigerten Expression dieser Fettsäure-Translokase. Dieser Effekt blieb bei Präinkubation mit AICAR aus. Eine Behandlung mit dem Fettsäure-Mix führte zu keiner signifikanten Änderung der Expression.

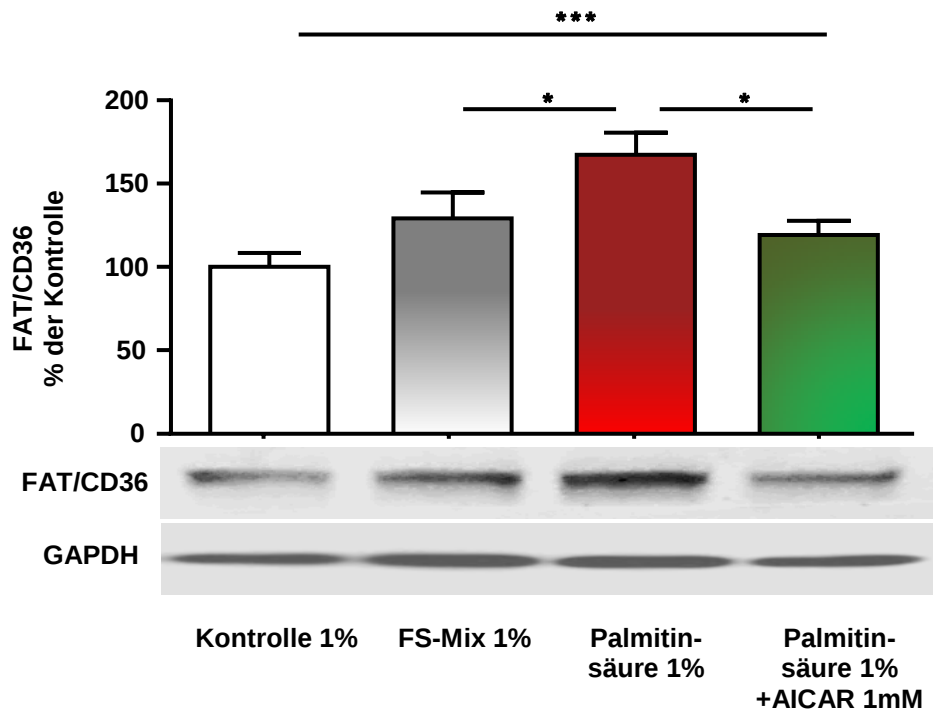


Abb. 16: Effekt von FS-Mix, Palmitinsäure und AMPK-Aktivator AICAR auf die Expression der Fettsäure-Translokase CD36. Repräsentative Western Blot Analyse der Expression der Fettsäure-Translokase CD36 (FAT/CD36) in Kardiomyozyten nach 48 stündiger Inkubation mit FS-Mix, Palmitinsäure und Präinkubation Palmitinsäure-behandelter Zellen mit AICAR. Palmitinsäure führte zu vermehrter Expression der FAT/CD36. Dies konnte durch die Präinkubation mit AICAR verhindert werden. $n = 14-21$ (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)

5.3.6 Aktivierung der AMP-Kinase verhindert Palmitinsäure-induzierte Lipidakkumulation

Die Experimente zeigen in den Kardiomyozyten durch Behandlung mit Palmitinsäure Hinweise auf eine gesteigerte Fettsäureaufnahme (gesteigerte Expression der Fettsäure-Translokase CD36) bei unveränderter Fettsäureoxidation (keine Änderung der Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase). Palmitinsäure steigerte die Expression des Adipose differentiation related protein (ADRP), einem sensitiven Marker für Lipidakkumulation, in diesen Zellen auf $168 \pm 42\%$.

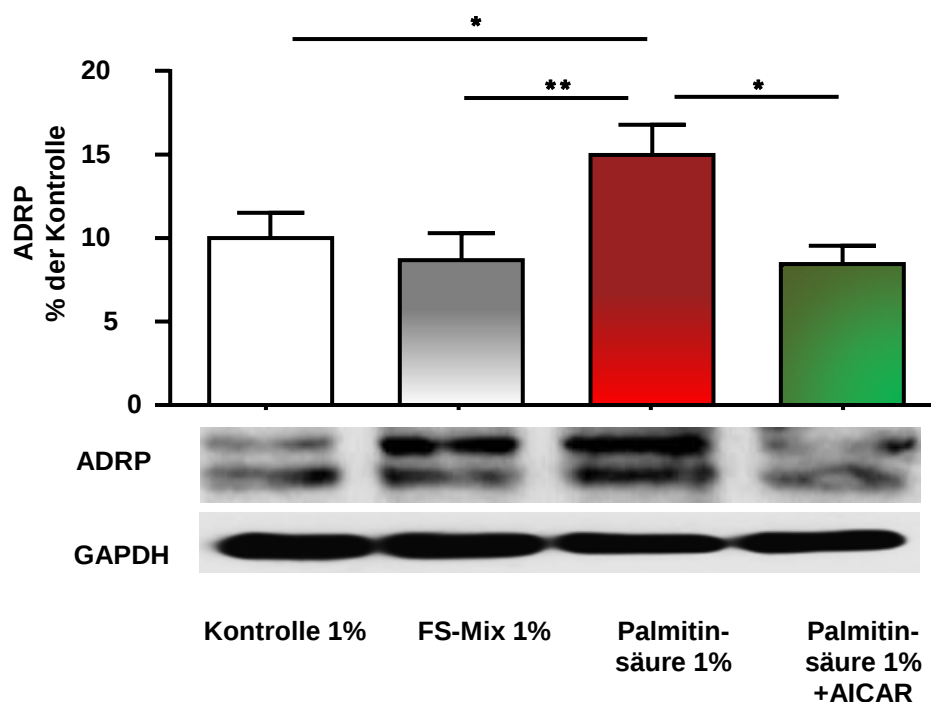


Abb. 17: Effekt von FS-Mix, Palmitinsäure und AMPK-Aktivator AICAR auf die Expression des Adipose differentiation related protein (ADRP). Repräsentative Western Blot Analyse der Expression des Adipose differentiation related protein (ADRP) in Kardiomyozyten nach 48 stündiger Inkubation mit FS-Mix, Palmitinsäure und Präinkubation Palmitinsäure-behandelter Zellen mit AICAR. Palmitinsäure, aber nicht der FS-Mix, führte zu vermehrter Expression des Lipidmarkers ADRP. AICAR verhinderte eine gesteigerte ADRP-Expression in Palmitinsäure-behandelten Zellen. $n = 8-23$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

5.3.7 Palmitinsäure führt zu gesteigerter Phosphorylierung der Stress-aktivierten Proteinkinase SAPK/JNK

Die Stress-aktivierte Proteinkinase SAPK/JNK wird durch zahlreiche zelluläre Stressfaktoren aktiviert und führt ihrerseits wiederum auf verschiedenen Wegen zu Apoptose. Western Blot Analysen nach 48 stündiger Behandlung von Kardiomyozyten mit 1% Fettsäure-Mix, 1% Palmitinsäure und 1% Palmitinsäure nach Präinkubation (1h) mit 1mM AICAR zeigten eine auf $172 \pm 22\%$ bzw. $173 \pm 27\%$ gesteigerte Phosphorylierung der SAP-Kinase an Thr183 bzw. Tyr185 bei Behandlung mit Palmitinsäure, nicht jedoch bei Behandlung mit dem Fettsäure-Mix. Die Präinkubation der mit Palmitinsäure behandelten Zellen mit AICAR führte nicht zu gesteigerter Phosphorylierung.

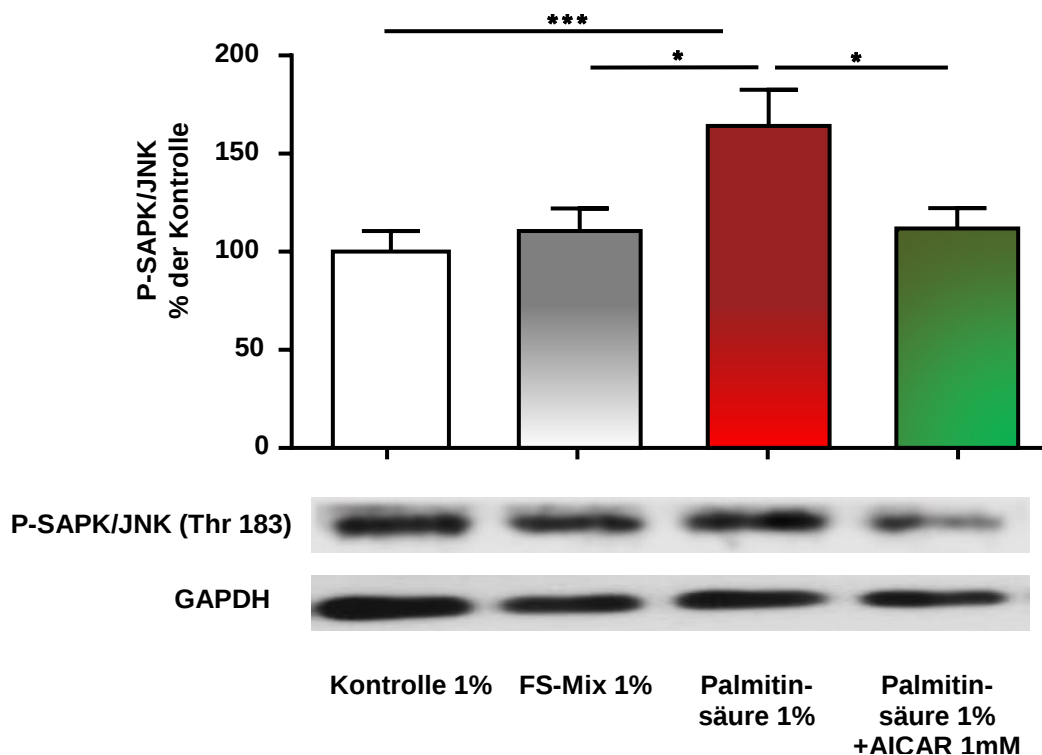


Abb. 18: Effekt von FS-Mix, Palmitinsäure und AMPK-Aktivator AICAR auf die Phosphorylierung der Stress-aktivierten Proteinkinase (SAP/JNK). Repräsentative Western Blot Analyse der Phosphorylierung der Stress-aktivierten Proteinkinase (SAP/JNK) in Kardiomyozyten nach 48 stündiger Inkubation mit FS-Mix, Palmitinsäure und Präinkubation Palmitinsäure-behandelter Zellen mit AICAR. Im Gegensatz zum FS-Mix führte Palmitinsäure zu vermehrter Phosphorylierung der SAPK/JNK. Diese Aktivierung konnte durch AICAR verhindert werden. $n = 5-15$ (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)

5.3.8 AMPK-Aktivator AICAR verhindert eine gesteigerte Apoptose durch Palmitinsäure

Die Behandlung mit AICAR führte zur Aktivierung der AMPK und verhinderte eine gesteigerte Expression von FAT/CD36 und ADRP und eine vermehrte Phosphorylierung der SAPK/JNK in Palmitinsäure-behandelten Zellen. Im Folgenden wurde überprüft, ob AICAR auch die proapoptotischen Effekte von Palmitinsäure inhibiert. Nach 48 Stunden zeigte sich in der durchflusszytometrischen Apoptose-Analyse mittels Annexin V im Vergleich zur Kontrolle keine gesteigerte Apoptose in den mit Palmitinsäure behandelten Zellen, die mit AICAR präinkubiert wurden.

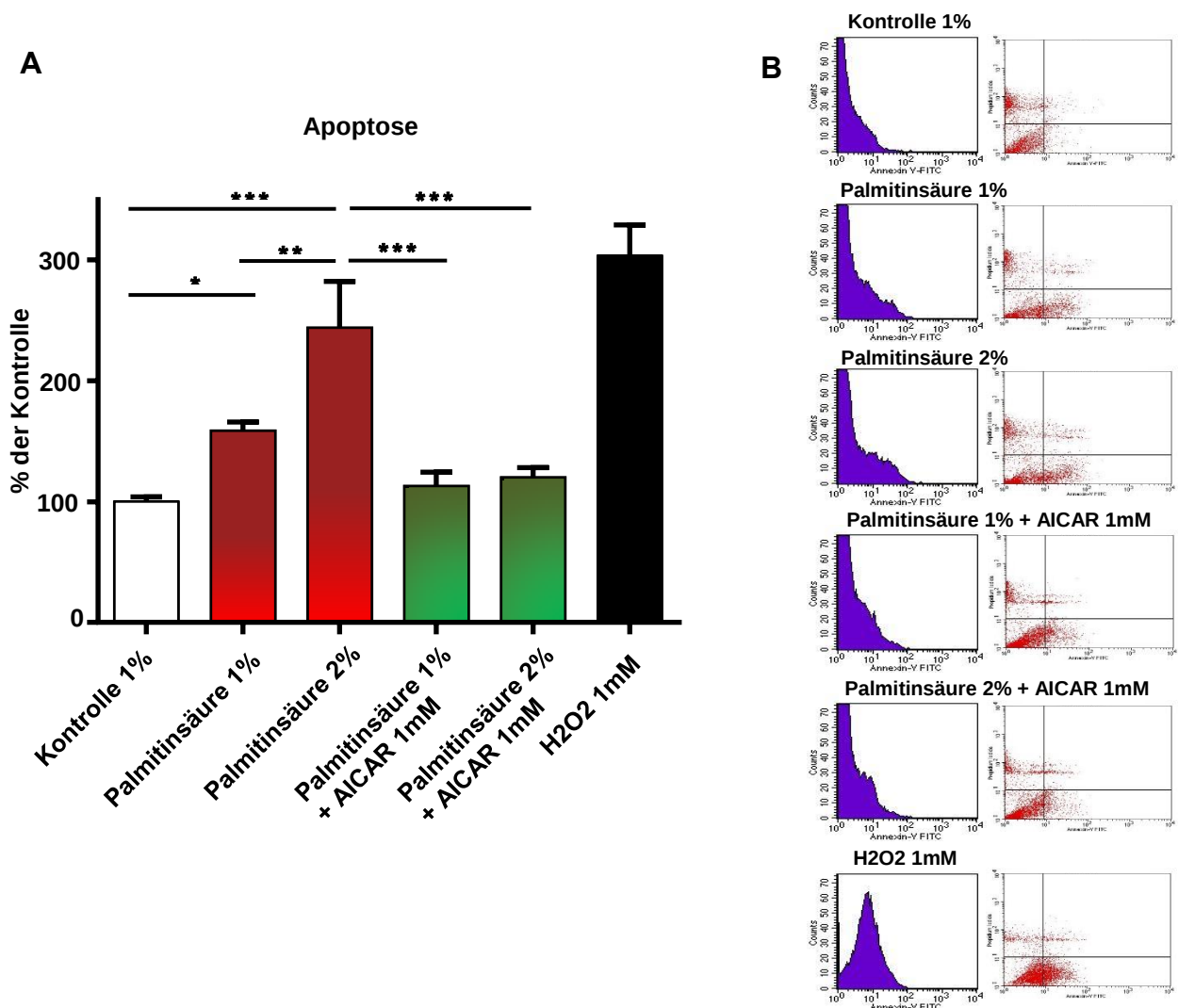
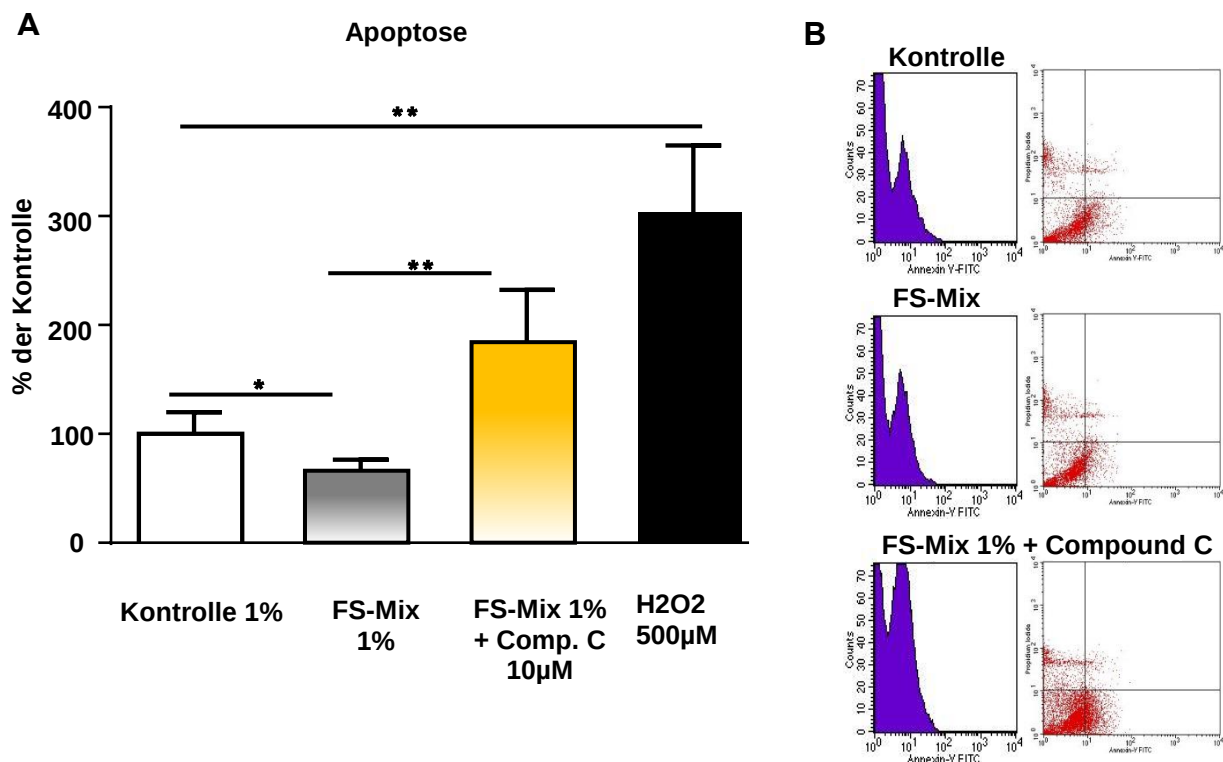


Abb. 19: Effekt von Palmitinsäure und AICAR auf die Apoptoserate der Kardiomyozyten. **A** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Apoptose in Kardiomyozyten mittels Annexin V nach 48 stündiger Inkubation mit 1% und 2% Palmitinsäure und Präinkubation mit AICAR. Präinkubation mit AICAR verhinderte eine Palmitinsäure-induzierte Apoptose. **B** Repräsentative Dot-Plot-Darstellung der durchflusszytometrischen Apoptoseanalyse in Kardiomyozyten nach 48 stündiger Fettsäurebehandlung und Präinkubation mit AICAR. n = 18 – 32; (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

5.3.9 Die Inhibition der AMP-Kinase mittels Compound C führt zu gesteigerter Apoptose und ADRP-Expression

Verhinderte eine Aktivierung der AMP-Kinase mittels AICAR auf der einen Seite eine Palmitinsäure-induzierte gesteigerte Apoptose, eine gesteigerte Expression der Fettsäure-Translokase CD36 und von ADRP und eine gesteigerte Phosphorylierung der Stress-aktivierten Proteinkinase SAPK/JNK, so stellte sich nun die Frage, ob diese Effekte durch Hemmung der AMP-Kinase auch in umgekehrter Weise zu beobachten waren. Hierzu wurden die Kardiomyozyten über 48 Stunden mit 1% Fettsäure-Mix behandelt. Ein Teil dieser Zellen wurde dabei mit dem AMPK-Inhibitor Compound C in einer Konzentration von 10µM eine Stunde vorinkubiert. Passend zu unseren Beobachtungen einer verminderten Apoptoserate durch AICAR zeigten durchflusszytometrische Analysen mittels Annexin V eine gesteigerte Apoptoserate in den mit Compound C vorbehandelten Zellen auf $183 \pm 12\%$. Zudem zeigte sich eine auf $154 \pm 27\%$ gesteigerte Expression von ADRP durch Compound C.



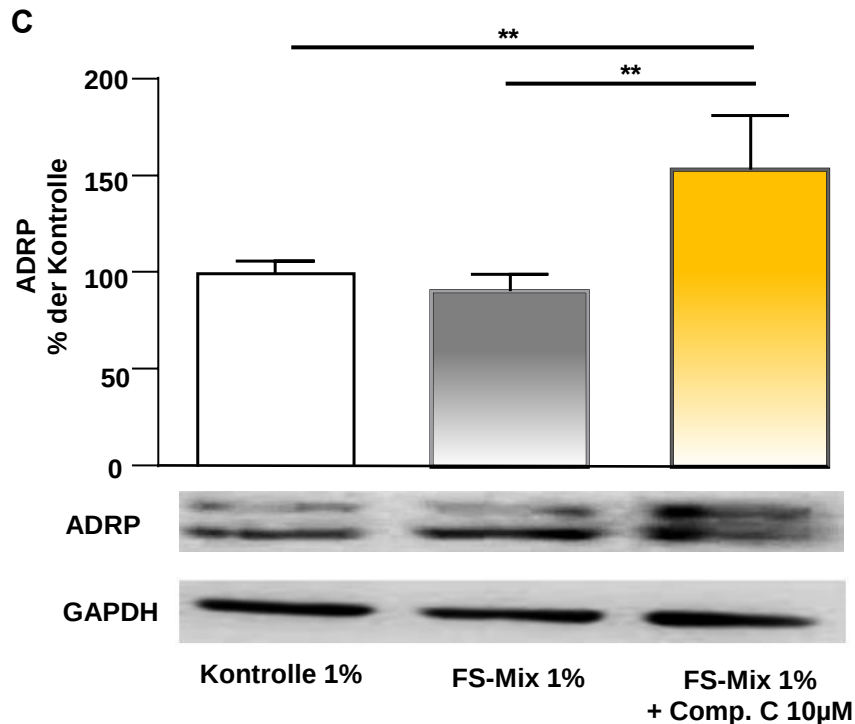


Abb. 20: Effekt von FS-Mix und Compound C auf Apoptoserate und ADRP-Expression. **A** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Apoptose in Kardiomyozyten mittels Annexin V nach 48 stündiger Inkubation mit 1% FS-Mix und Präinkubation mit dem AMP-Kinase-Inhibitor Compound C (10µM). Durch Hemmung der AMPK in den mit dem FS-Mix behandelten Zellen kam es zu gesteigerter Apoptose. **B** Repräsentative Dot-Plot-Darstellung der durchflusszytometrischen Apoptoseanalyse in Kardiomyozyten nach 48 Stunden Fettsäurebehandlung (s. A). $n = 12-32$ (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) **C** Repräsentative Western Blot Analyse der Expression des Adipose differentiation related protein (ADRP) in Kardiomyozyten nach 48 stündiger Inkubation mit 1% FS-Mix und Präinkubation mit dem AMP-Kinase-Inhibitor Compound C (10µM). Die Inhibition der AMPK bei Behandlung mit dem FS-Mix steigerte die Expression ADRP als Marker für Lipidakkumulation. $n = 6-23$ (** $p < 0.01$)

5.3.10 Ergebnisschema

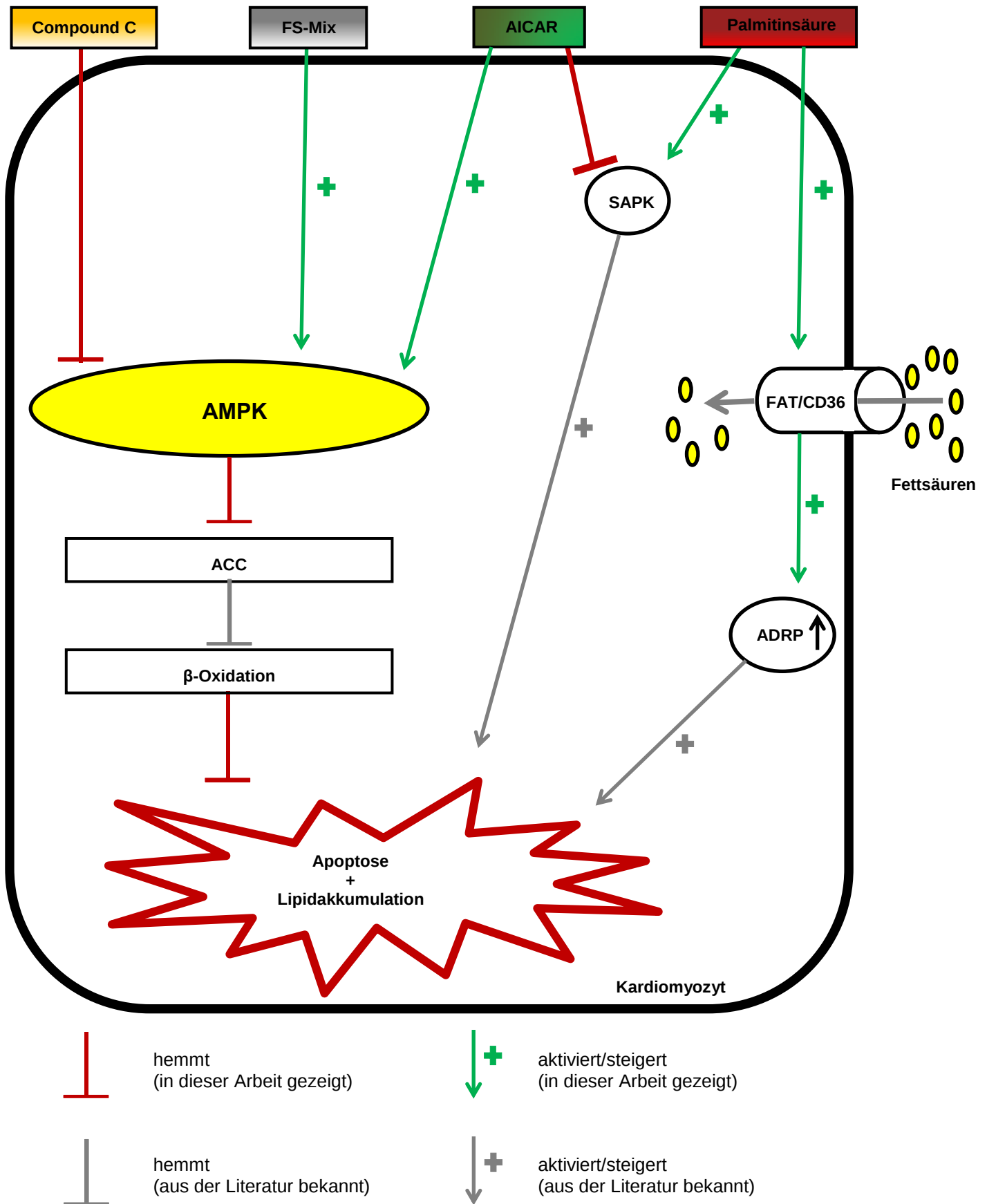


Abb. 21: Ergebnisschema. Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit. Compound C führt zu einer Inhibition der AMPK. Im Folgenden kommt es durch eine vermehrte ACC-Aktivität (Wegfall der Hemmung durch die AMPK) zu verminderter β -Oxidation. Dies ist assoziiert mit vermehrter Lipidakkumulation und Apoptose. Der FS-Mix und AICAR führen über eine vermehrte Aktivierung der AMPK zu einer Minderung der ACC-Aktivität und somit zu vermehrter β -Oxidation. Eine durch die alleinige Behandlung der Kardiomyozyten mit Palmitinsäure gesteigerte Lipidakkumulation und Apoptose kann somit verhindert werden. Zudem verhindert AICAR eine durch Palmitinsäure gesteigerte Aktivität der SAPK, welche ihrerseits Apoptosewege einleitet. Palmitinsäure steigert die Expression der Fettsäuretranslokase CD36 und parallel die Expression des Lipidakkumulationsmarkers ADRP, was mit einer gesteigerten Apoptoserate assoziiert ist. FS-Mix – Fettsäuremix, AICAR - 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, SAPK – Stress-aktivierte Proteinkinase, AMPK – AMP-aktivierte Proteinkinase, FAT/CD36 – Fettsäuretranslokase CD36, ADRP – adipose differentiation related protein, ACC – Acetyl-CoA-carboxylase.

6 Diskussion

Chronische Druck- und Volumenbelastung des Herzen sowie kardiale Ischämie führen zu ventrikulärer Hypertrophie mit maladaptivem Remodeling und somit zu kardialer Dysfunktion und Herzinsuffizienz [21]. Für das Verständnis der zu Grunde liegenden Pathologie und für die Ableitung entsprechender Therapien ist das Wissen über die beteiligten Stoffwechselwege essentiell. Noch nicht vollständig verstanden ist der Einfluss der Hypertrophie auf Änderungen im Fettsäuremetabolismus des Herzen und umgekehrt der Einfluss von Fettsäuren auf die Entstehung kardialer Hypertrophie.

6.1 Zusammenhang zwischen dem Fettsäure-Mix und kardialer Hypertrophie

Die Python zählt zu den fleischfressenden Reptilien, die zwischen großen Mahlzeiten lange Fastenperioden durchmachen. Demzufolge muss sich der Organismus dieser Schlange postprandial auf eine metabolische Extremsituation einstellen. Im Rahmen dieses Adaptationsvorgangs kommt es zu einem bemerkenswerten Organwachstum. Die Masse des Verdauungstraktes steigt in den ersten 24-48 Stunden nach Nahrungsaufnahme auf rund ein Viertel des Körpergewichtes an [51]. Riquelme et al. zeigten, dass die burmesische Python postprandial eine physiologische Hypertrophie des Herzen entwickelt ohne die Merkmale eines maladaptiven Remodelings wie Lipidakkumulation, Fibrose und Apoptose aufzuweisen [2; Science, 2011]. Bereits zuvor wurde gezeigt, dass diese Pythonart nach einer großen Mahlzeit nach langer Hungerperiode eine Zunahme der Ventrikelmasse um bis zu 40% aufweist [52]. Dies ist assoziiert mit einer gesteigerten Expression von Genen, die für Proteine kodieren, die an der Muskelkontraktion beteiligt sind. Das linksventrikuläre Ejektionsvolumen ist in diesen Tieren postprandial gesteigert. Diese kardiale Hypertrophie wird als physiologisch und vollständig reversibel beschrieben [52]. Riquelme et al. beschrieben nun zum ersten mal einen Fettsäure-Mix aus den Fettsäuren Palmitin-, Myristin- und Palmitoleinsäure in einem spezifischen Verhältnis als ursächlich für die Größenzunahme und die folgenden metabolischen Veränderungen [2]. Ein Maximum des kardialen Volumens wurde 3 Tage nach Nahrungsaufnahme beobachtet. Als indirekter Hypertrophieparameter diente das Verhältnis der Nuclei zur Auszählungsfläche. Dieses war im postprandialen Herzen signifikant erniedrigt und deutet damit auf eine zelluläre Hypertrophie ohne Hyperplasie. Die Behandlung ventrikulärer Ratten-Kardiomyozyten in Zellkultur sowie von Pythons und Mäusen in

vivo sowohl mit postprandial entnommenem Pythonplasma als auch mit dem Fettsäure-Mix führten zu zellulärer Hypertrophie. Im Hinblick auf die Therapie der pathologisch-hypertrophen Kardiomyopathie sind die Kenntnisse über diese physiologische Hypertrophie von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden C57/Bl6-Mäuse mit dem von Riquelme et al. [2] beschriebenen Fettsäure-Mix behandelt. Nach 7 Tagen Applikation des Fettsäure-Mix mittels ALZET® mini-osmotischen Pumpen zeigten sich signifikant erhöhte Serumwerte der applizierten Fettsäuren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Histologisch zeigte sich jedoch keine kardiomyozytäre Hypertrophie und echokardiografisch keine Änderung hämodynamischer Parameter. Es kam durch den Fettsäure-Mix nicht zu gesteigerter kardialer Fibrose. Nach der Überlegung, eine längere Behandlungsdauer der Mäuse könnte einen nach 7 Tagen noch nicht sichtbare Hypertrophie deutlich machen wurden in einem zweiten Experiment eine neue Gruppe von C57/Bl6-Mäusen mittels subkutaner Spritzeninjektion des Fettsäure-Mix über 5 Wochen behandelt. Diese wurden nun entweder mit dem Fettsäure-Mix oder einer Kontrolllösung ohne Fettsäuren und entweder einer Aortenligatur- oder einer Sham-Operation unterzogen sodass 4 Gruppen betrachtet wurden. Nach 5 Wochen konnten keine erhöhten Serumwerte der einzelnen Fettsäuren bestimmt werden. Wir gehen davon aus, dass nach dieser langen Zeit Adaptations- bzw. Umverteilungsvorgänge eingetreten und somit für diesen Umstand verantwortlich sind. Auch hier zeigte sich keine Hypertrophie und keine Beeinflussung hämodynamischer Parameter.

Russo et. al zeigten bereits an isolierten Maus-Kardiomyozyten, dass die Behandlung mit Myristinsäure, nicht jedoch mit Palmitinsäure zu zellulärer Hypertrophie führt [49]. In dieser Arbeit wird jetzt erstmals gezeigt, dass auch die Behandlung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten von Ratten mit Myristinsäure im Gegensatz zu Palmitinsäure zu Hypertrophie führt und bestätigt somit die Hypothese einer Myristinsäure-induzierten Hypertrophie ventrikulärer Kardiomyozyten.

Wir postulieren, dass die durch den Fettsäure-Mix induzierte Hypertrophie möglicherweise eine fakultative und nicht obligate Komponente des physiologischen Adaptationsvorgangs des Herzen an eine postprandiale Situation ist. Diese Überlegungen werden durch die Ergebnisse einer Arbeit von Jensen et al. bestätigt [51]. In dieser Studie wurden Pythons nach 3 Wochen Hungern bzw. nach 24 oder 48 Stunden Fütterung mit Mäusen untersucht und verglichen. Es wurden keine signifikanten hämodynamischen Veränderungen nach Nahrungsaufnahme gemessen. Zudem kam es nicht zu einer Zunahme der Ventrikelmasse oder -größe. Diese Daten wurden wie in der vorliegenden Arbeit echokardiografisch erhoben [51]. Weitere Studien sind notwendig um die Bedingungen zu untersuchen, die zu postprandialer kardialer Hypertrophie in der Python führen.

6.2 Metabolische Veränderungen durch den Fettsäure-Mix und durch Palmitinsäure

Unter physiologischen Bedingungen wird über die Hälfte des kardialen ATP durch die Oxidation von Fettsäuren gewonnen [7]. Im pathologisch hypertrophierten Myokard verschiebt sich die Substratpräferenz zu Gunsten der Verwertung von Kohlenhydraten [8]. Diese Veränderungen sind assoziiert mit einer Reihe maladaptiver metabolischer Prozesse, wie vermehrtem oxidativem Stress durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [11]. Der durch Riquelme et al. beschriebene Fettsäure-Mix führt zu einer physiologischen Hypertrophie, bei der diese maladaptiven Veränderungen ausbleiben [2]. Dies ist zum einen erstaunlich, da die enthaltene Palmitinsäure mit Zellapoptose assoziiert ist [1] und zum anderen, da in den Schlangen postprandial sehr hohe Serum-Triglyceridspiegel gemessen wurden [2]. Ziel dieser Arbeit war es, die metabolischen Veränderungen zu charakterisieren, die dazu führen, dass der Fettsäure-Mix Lipotoxizität durch hohe Triglyceridspiegel und Apoptose durch Palmitinsäure verhindert. Der 5'-AMP-aktivierten Kinase (AMPK) kommt in der Regulation dieser metabolischen Veränderungen eine zentrale Rolle zu. In vielen Studien konnte bereits die Aktivierung der AMPK mit konsekutivem Downstream-Signaling unter Myokardischämie gezeigt werden [30]. Ihre Rolle in der Pathogenese der druck- und volumeninduzierten Hypertrophie und in der Vermittlung der Effekte des beschriebenen Fettsäure-Mix ist hingegen noch wenig untersucht.

Palmitinsäure ist bekanntermaßen mit Lipotoxizität und Apoptose assoziiert [1]. Auch diese Arbeit zeigt eine gesteigerte Apoptose von isolierten Kardiomyozyten, die mit Palmitinsäure behandelt wurden. Die Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK/JNK) wird durch metabolischen Stress aktiviert und induziert selbst über mehrere Wege Apoptose [1]. Phosphoryliert liegt sie in ihrer aktiven Form vor. Palmitinsäure führte in unseren Versuchen zu vermehrter Phosphorylierung dieser Kinase. Wir postulieren, dass Palmitinsäure über einen noch unbekannten Mechanismus zu einer Aktivierung der SAPK/JNK führt und somit Zell-Apoptose einleitet. Der Zusatz von Myristin- und Palmitoleinsäure im Sinne des beschriebenen Fettsäure-Mix verhinderte eine durch Palmitinsäure gesteigerte Apoptose.

Um den zu Grunde liegenden Mechanismus genauer zu untersuchen und unter der Hypothese, dass die AMPK an der Regulation der Fettsäure-induzierten Apoptose beteiligt ist, wurden die Zellen mit dem AMPK-Aktivator AICAR behandelt. Diese AMPK-Aktivierung verhinderte die Palmitinsäure-induzierte Apoptose. Da sowohl der Fettsäure-Mix als auch die AMPK-Aktivierung durch AICAR die zytotoxischen Effekte der Palmitinsäure verhinderten, stellte sich die Frage, welchen Einfluss der Fettsäure-Mix auf die AMPK hat. Es zeigte sich, dass sowohl der Fettsäure-Mix als auch AICAR zu einer gesteigerten Phosphorylierung und somit Aktivierung der AMPK führen. In beiden Fällen zeigte sich zudem eine vermehrte Phosphorylierung und somit Inhibition der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), einem wichtigen Zielprotein der AMPK. Palmitinsäure führte weder zur Aktivierung der AMPK noch zu gesteigerter Phosphorylierung der ACC. Während Palmitinsäure zu einer vermehrten Expression der Fettsäuretranslokase CD36 führte, wurde diese durch die gleichzeitige Gabe von AICAR verhindert. Zudem verhinderte eine gleichzeitige Gabe von AICAR zu Palmitinsäure eine gesteigerte Expression von ADRP durch Palmitinsäure. ADRP ist ein etablierter Marker für zelluläre Lipidakkumulation [53] [54]. Es zeigt sich hier durch die Behandlung mit Palmitinsäure eine gesteigerte Fettsäureaufnahme bei gleichbleibender Fettsäureoxidation, was mit der Erhöhung von Markern für Lipidakkumulation assoziiert ist. Auch diesen Punkt sehen wir als Bestandteil der Palmitinsäure-induzierten Apoptosekaskade, da bereits gezeigt wurde, dass kardiomyozytäre Lipidakkumulation mit zytotoxischen Effekten assoziiert ist und zu Apoptose führt [14]. Durch den Fettsäure-Mix kommt es zu gesteigerter

Fettsäureoxidation ohne die vermehrte Aufnahme weiterer Fettsäuren. Eine Lipidakkumulation durch Palmitinsäure kann somit verhindert werden.

Um diesen Mechanismus der Palmitinsäure-induzierten Apoptose mit der AMPK als zentralem Regulator zu überprüfen wurde diese unter Behandlung mit dem Fettsäure-Mix mittels Compound C inhibiert. Der Wegfall der AMPK-Funktion führte zu gesteigerter Apoptose und ADRP-Expression.

Zusammenfassend verhindert der Fettsäure-Mix Apoptose und Lipidakkumulation. Palmitoleinsäure, welche im beschriebenen Mix enthalten ist, ist als Lipokin in der Lage, die Insulinsensitivität zu regulieren [50]. In der postprandialen Python findet eine vermehrte intestinale Mobilisation dieser Fettsäure statt [55]. Diaz et al. [56] zeigten, dass Palmitinsäure die Expression von Mitofusin 2 (MTF2) vermindert. Dieses Protein sitzt in der äußeren Membran von Mitochondrium und Endoplasmatischem Retikulum und schützt Zellen vor metabolischem Stress und Insulinresistenz. Die so durch Palmitinsäure induzierte Lipotoxizität und Insulinresistenz konnten durch Palmitoleinsäure nicht nachgewiesen werden [56]. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass Myristinsäure durch die Aktivierung der Ceramid-Synthese zytotoxische Effekte von Palmitinsäure potenziert und auch an der Entstehung der nicht-alkoholischen Steatohepatosis (NASH) beteiligt ist [57]. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen in Zusammenschau mit Daten aus früheren Studien die Hypothese, dass Palmitoleinsäure die zytotoxischen Effekte von Palmitinsäure antagonisiert.

6.3 Limitationen der Arbeit

Die durchgeführten Experimente wurden in vivo an Mäusen und in vitro an isolierten Ratten-Kardiomyozyten durchgeführt. Dieser Versuchsaufbau bildet ein Modell zur Untersuchung von Stoffwechselvorgängen, die nicht direkt auf den Menschen und nicht unmittelbar von in vitro auf in vivo übertragbar sind.

Die beschriebenen Veränderungen, die postprandial in Schlangen auftreten sind nur bedingt auf Säugetiere zu übertragen. Das Herz der Python zeigt Unterschiede in Anatomie und Physiologie im Vergleich zum Säuger. Es ist gekennzeichnet durch zwei Vorhöfe und einen Single-Ventrikel, der nur unvollständig in ein Cavum arteriosum, venosum und pulmonale getrennt wird [58]. Diese unvollständige Trennung bedingt einen Rechts-Links-Shunt, der sich je nach Stoffwechsellaage verändert und somit veränderte Sauerstoffpartialdrücke in den postprandialen Adaptationsvorgängen mit berücksichtigt werden müssen [51].

6.4 Zusammenfassung der Studienergebnisse

Diese Studie zeigt, dass eine kardiomyozytäre Hypertrophie keine direkte und obligate Folge des Fettsäure-Mix ist. Die Untersuchung weiterer Einflussfaktoren, die im Zusammenspiel zu Hypertrophie führen wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Die Experimente zeigen, dass Myristinsäure in Rattenkardiomyozyten eine Hypertrophie induziert.

Es wird bestätigt, dass Palmitinsäure in Kardiomyozyten zu Apoptose führt. Als beteiligte Mechanismen identifiziert diese Arbeit eine Lipidakkumulation und eine Aktivierung des SAPK/JNK-Weges. Der Fettsäure-Mix verhindert die Palmitinsäure-induzierte Lipidakkumulation und Apoptose. Diese Studie identifiziert die AMPK als zentralen Vermittler dieser kardioprotektiven Effekte.

7 Literaturverzeichnis

- [1]. **Miller TA, et al.** Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 336(1):309-315. (2005).
- [2]. **Riquelme CA, et al.** Fatty acids identified in the Burmese python promote beneficial cardiac growth. *Science* 334(6055):528-531. (2011).
- [3]. **Stapleton, D. et al.** Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J. Biol. Chem.* 271, 611-614 . (1996).
- [4]. **Dyck, J.R. et al.** Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. *Eur. J Biochem.* 262, 184-190. (1999).
- [5]. **Kuang M, Febbraio M, Wagg C, Lopaschuk GD, & Dyck JR.** Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia. *Circulation* 109(12):1550-1557. (2004) .
- [6]. **Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, & Keenan TW.** Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 294(2):309-321. (1998).
- [7]. **de Vries JE, et al.** Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res* 38(7):1384-1394. (1997) .
- [8]. **Allard, M.F., Schonekess, B.O., Henning, S.L., English, D.R. & Lopaschuk, G.D.** Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am. J. Physiol* 267, H742-H750. (1994).
- [9]. **van der Vusse, G.J., van Bilsen, M. & Glatz, J.F.** Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc. Res.* 45, 279-293. (2000).
- [10]. **Luiken, J.J. et al.** Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* 52, 1627-1634 . (2003).

- [11]. **Ritchie, RH & Delbridge LM.** Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(1-2):159-166. (2006).
- [12]. **Kagaya, Y. et al.** Effects of long-term pressure overload on regional myocardial glucose and free fatty acid uptake in rats. A quantitative autoradiographic study. *Circulation* 81, 1353-1361. (1990).
- [13]. **Lehman, J.J. & Kelly, D.P.** Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart Fail. Rev.* 7, 175-185. (2002).
- [14]. **Zhou YT, et al.** Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4):1784-1789. (2000).
- [15]. **Alaoui-Talibi, Z., Landormy, S., Loireau, A. & Moravec, J.** Fatty acid oxidation and mechanical performance of volume-overloaded rat hearts. *Am. J. Physiol* 262, H1068-H1074. (1992).
- [16]. **Taegtmeyer, H. & Overturf, M.L.** Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit. *Hypertension* 11, 416-426. (1988).
- [17]. **Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF.** Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev.*;7:161-73. (2002).
- [18]. **Gidh-Jain, M., Huang, B., Jain, P., Gick, G. & El Sherif, N.** Alterations in cardiac gene expression during ventricular remodeling following experimental myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30, 627-637. (1998).
- [19]. **Kemppainen J, et al.** Myocardial and skeletal muscle glucose uptake during exercise in humans. *J Physiol* 542(Pt 2):403-412. (2002).
- [20]. **Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Jr., Thaik CM, & Colucci WS.** Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* 92(9):2385-2390. (1995).
- [21]. **Frey, N & Olson EN.** Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual review of physiology* 65:45-79. (2003).

- [22]. **Sugden, P.H. & Clerk, A.** Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Med.* 76, 725-746. (1998).
- [23]. **Yamamoto, K. et al.** Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension* 28, 988-994. (1996).
- [24]. **Custodis F, Eberl M, Kilter H, Bohm M, & Laufs U.** Association of RhoGDIalpha with Rac1 GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 71(2):342-351. (2006).
- [25]. **Stuck BJ, Lenski M, Bohm M, & Laufs U.** Metabolic switch and hypertrophy of cardiomyocytes following treatment with angiotensin II are prevented by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 283(47):32562-32569. (2008).
- [26]. **Verhoeven, A.J. et al.** The AMP-activated protein kinase gene is highly expressed in rat skeletal muscle. Alternative splicing and tissue distribution of the mRNA. *Eur. J. Biochem.* 228, 236-243 . (1995).
- [27]. **Ponticos, M. et al.** Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J.* 17, 1688-1699. (1998).
- [28]. **Woods, A. et al.** Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by sitedirected mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 28434-28442 . (2003).
- [29]. **Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T. & Hardie, D.G.** 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMPactivated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* 377, 421-425 . (1995).
- [30]. **Kudo N, Gillespie JG, Kung L, Witters LA, Schulz R, Clanachan AS, et al.** Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. *Biochim Biophys Acta.*;1301:67-75. (1996).
- [31]. **Hunkeler M, Stutfeld E, Hagmann A, Imseng S, Maier T.** The dynamic organization of fungal acetyl-CoA carboxylase. *Nat Commun.*; 7:11196. (2016).

- [32]. **Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD.** High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.*;270:17513-20. (1995).
- [33]. **Hopkins, T.A., Dyck, J.R. & Lopaschuk, G.D.** AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 207-212. (2003).
- [34]. **Yamauchi, T. et al.** Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8, 1288-1295. (2002).
- [35]. **Minokoshi, Y. et al.** Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339-343 . (2002).
- [36]. **Russell, R.R., III, Bergeron, R., Shulman, G.I. & Young, L.H.** Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol* 277, H643-H649. (1999).
- [37]. **Marsin, A.S. et al.** Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* 10, 1247-1255 . (2000).
- [38]. **Inoki K, Zhu T, & Guan KL.** TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115(5):577-590. (2003).
- [39]. **Chan, A.Y., Soltys, C.L., Young, M.E., Proud, C.G. & Dyck, J.R.** Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* 279, 32771-32779. (2004).
- [40]. **Browne, G.J., Finn, S.G. & Proud, C.G.** Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *J. Biol. Chem.* 279, 12220-12231. (2004).
- [41]. **Carling, D., Zammit, V.A. & Hardie, D.G.** A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* 223, 217-222 . (1987).

- [42]. **Clark, H., Carling, D. & Saggerson, D.** Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. *Eur. J. Biochem.* 271, 2215-2224 . (2004).
- [43]. **Witters, L.A. & Kemp, B.E.** Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 2864-2867 . (1992).
- [44]. **Folmes, C.D., Clanachan, A.S. & Lopaschuk, G.D.** Fatty acids attenuate insulin regulation of 5'-AMP-activated protein kinase and insulin cardioprotection after ischemia. *Circ. Res.* 99, 61-68. (2006).
- [45]. **Sakamoto, K. et al.** Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPK α 2 but not AMPK α 1. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 290, E780-E788 . (2006).
- [46]. **Watt, M.J., Steinberg, G.R., Chen, Z.P., Kemp, B.E. & Febbraio, M.A.** Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *J. Physiol* 574, 139-147. (2006).
- [47]. **Carling, D. et al.** Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J. Biol. Chem.* 269, 11442-11448. (1994).
- [48]. **Lupi R, et al.** Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51(5):1437-1442. (2002).
- [49]. **Russo SB, Baicu CF, Van Laer A, Geng T, Kasiganesan H, Zile MR, et al.** Ceramide synthase 5 mediates lipid-induced autophagy and hypertrophy in cardiomyocytes. *J Clin Invest.*;122:3919-30. (2012).
- [50]. **Cao H, et al.** Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134(6):933-944. (2008).
- [51]. **Jensen B, Larsen CK, Nielsen JM, Simonsen LS, Wang T.** Change of cardiac function, but not form, in postprandial pythons. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*;160:35-42. (2011).

- [52]. **Andersen JB, Rourke BC, Caiozzo VJ, Bennett AF, Hicks JW.** Physiology: postprandial cardiac hypertrophy in pythons. *Nature*, 434(7029):37-8. (2005).
- [53]. **Mak KM, Ren C, Ponomarenko A, Cao Q, & Lieber CS.** Adipose differentiation-related protein is a reliable lipid droplet marker in alcoholic fatty liver of rats. *Alcohol Clin Exp Res* 32(4):683-689. (2008) .
- [54]. **Muthusamy K, Halbert G, & Roberts F.** Immunohistochemical staining for adipophilin, perilipin and TIP47. *J Clin Pathol* 59(11):1166-1170. (2006) .
- [55]. **Astarita G, et al.** Postprandial increase of oleoylethanolamide mobilization in small intestine of the Burmese python (*Python molurus*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 290:R1407. (2006).
- [56]. **Diaz, et al.** Saturated lipids decrease mitofusin 2 leading to endoplasmic reticulum stress activation and insulin resistance in hypothalamic cells. *Brain Res.*19;1627:80-9. (2015).
- [57]. **Martínez L et al.** Myristic acid potentiates palmitic acid-induced lipotoxicity and steatohepatitis associated with lipodystrophy by sustaining de novo ceramide synthesis. *Oncotarget.*;6(39):41479-96. (2015).
- [58]. **Jensen B, Nyengaard JR, Pedersen M, Wang T.** Anatomy of the python heart. *Anat Sci Int.*;85(4):194-203. (2010).

8 Dank

In erster Linie gilt mein Dank meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ulrich Laufs, der mir dieses spannende Thema überlassen und mich stets mit Ideen und Anregungen unterstützt hat.

Zudem möchte ich mich bei meinem Betreuer, Dr. Matthias Lenski, bedanken. Er hat das Projekt stets vorangetrieben und mir immer mit Rat zur Seite gestanden und mich auch in der praktischen Durchführung der Experimente unterstützt.

Weiterhin möchte ich dem gesamten kardiologischen Forschungsteam der Arbeitsgruppe Laufs danken. Namentlich möchte ich hier Ellen Becker im Speziellen danken, die zu jedem Zeitpunkt strukturiert und organisiert Experimente durchgeführt hat und somit einen wichtigen Beitrag zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen hat.

Zu guter Letzt möchte ich auch meinen Eltern danken, die mir nicht nur mein Medizinstudium ermöglicht haben, sondern die auf dem Weg durch die Medizin und die wissenschaftliche Arbeit an der Universität stets hinter mir standen und mich motivierten den von mir gewählten Weg zu gehen.