

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Professor Dr. med. Stephan Zierz)

**Biochemische Charakterisierung mitochondrialer Myopathien in Trägern der
m.3243A>G Mutation und Patienten mit Carnitin-Palmitoyltransferase II-Mangel**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat., rer. medic. habil.
für das Fachgebiet Experimentelle Neurologie

kumulative Schrift vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. rer. nat. Leila Scholle
geboren am 19.09.1978 in Teheran/Iran

Gutachter: Prof. Dr. med. Aiden Haghikia

Prof. Dr. med. Peter Young

Lehrprobe am: 14.12.2021

Datum der Verteidigung: 01.03.2022

Referat

Mitochondriale Erkrankungen sind eine Gruppe seltener genetischer Störungen mit sehr heterogenem Ursprung. Im Allgemeinen wird mit der Bezeichnung mitochondriale Erkrankungen nur die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) klassifiziert. Ein Beispiel ist die m.3243A>G Mutation der mitochondrialen DNA (mtDNA). Darüber hinaus gibt es jedoch weitere mitochondriale Stoffwechselstörungen, die Erkrankungen verursachen. Unter anderem gilt dies für die Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) II, ein wichtiges Enzym des Transportsystems für Fettsäuren. Mutationen im *CPT2* Gen sind unter anderem ursächlich für die muskuläre Form des CPT II-Mangels. Der CPT II-Mangel ist die häufigste Störung des Lipidstoffwechsels im Skelettmuskel und wird den mitochondrialen Myopathien ohne direkten Einfluss auf die OXPHOS zugeordnet. Diese Arbeit fokussiert sich auf die biochemischen Konsequenzen der mitochondrialen Myopathien anhand der zwei genannten Beispiele.

Die Mutation m.3243A>G wird bei ungefähr 80% der Patienten mit MELAS-Syndrom nachgewiesen. Die relative Expression der an der mitochondrialen Biogenese beteiligten Gene in Myoblasten von Patienten mit m.3243A>G Mutation war überraschend ähnlich zu Kontrollmyoblasten. Anhand eines extrazellulären Flux Analyzers wurden signifikant niedrigere Schlüsselp Parameter der mitochondrialen Atmung in Myoblasten mit m.3243A>G Mutation verglichen mit Kontrollen gemessen. Das Vorhandensein von überschüssigem Palmitat zeigte bei Myoblasten mit der m.3243A>G Mutation einen negativen Effekt auf die respiratorischen Werte. Dies könnte den bereits in anderen Studien berichteten negativen Effekt von übermäßigem Palmitat auf die mitochondriale Funktion bestätigen. Da gesättigte Fettsäuren die Insulinresistenz erhöhen, könnten diese Ergebnisse aufzeigen, warum Patienten mit m.3243A>G Mutation ein höheres Risiko für die Entwicklung von Diabetes Typ 2 besitzen.

Bei Patienten mit muskulärer Form des CPT II-Mangels wurde bereits ein abnorm reguliertes Enzym im Gegensatz zu einem inaktiven Enzym postuliert. Die rekombinant hergestellte humane Wildtyp CPT II und ihre prominente Variante S113L zeigten die gleiche enzymatische Aktivität *in vitro*. Das mutierte Enzym wies jedoch eine abnorme thermische Destabilisierung bei Fieber-simulierenden Temperaturen und eine ausgeprägte Hemmung durch Malonyl-CoA auf. Darüber hinaus zeigte sich ein fehlender Aktivierungseffekt von Cardiolipin auf das mutierte Enzym bei physiologischen Temperaturen im Gegensatz zum Wildtyp. Acyl-L-Carnitine mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen in der Acylseitenkette führten zu einer Stabilisierung des mutierten Enzyms gegen thermische Inaktivierung. Die klinischen Beobachtungen bei Patienten mit CPT II-Mangel und die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Hinweis auf eine enzymatisch aktive aber instabile CPT II-Variante, die erst unter Stressbedingungen wie Fasten, Fieber oder Infektionen beeinträchtigt wird. Dabei konnten die Hypothesen der Instabilität und abnormen Regulierbarkeit des mutierten CPT II-Enzyms unter Einfluss verschiedener Effektoren und Umgebungsbedingungen bestätigt werden.

Fibroblast growth factor-21 (FGF-21) ist ein etablierter Biomarker, dessen Serumspiegel bei Patienten mit OXPHOS-Defekten und *CPT2* Knockout-Modellen erhöht ist. Im Unterschied dazu lagen die FGF-21-Werte von Patienten mit CPT II-Mangel im Normbereich, was gegen einen permanenten Enzymmangel spricht und die Hypothese der abnormen Regulierbarkeit auch *in vivo* unterstützt.

Scholle, Leila: Biochemische Charakterisierung mitochondrialer Myopathien in Trägern der m.3243A>G Mutation und Patienten mit Carnitin-Palmitoyltransferase II-Mangel, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Habil., 141 Seiten, 2021.

Inhaltverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Klassifikation mitochondrialer Myopathien.....	1
1.1.1. Mitochondriale Myopathien aufgrund primärer Defekte der OXPHOS	2
1.1.2. Mitochondriale Erkrankungen ohne Beteiligung der OXPHOS	5
1.2. Mitochondriale Biogenese	5
1.3. Defekte des Fettsäurestoffwechsels.....	7
1.3.1. Die Mitochondrienmembran und Cardiolipin.....	13
1.4. Diagnoseverfahren der mitochondrialen Myopathien	13
1.4.1. Diagnostik der OXPHOS-Störungen.....	14
1.4.2. Diagnostik des CPT II-Mangels	16
1.4.3. <i>Fibroblast growth factor 21</i> als potentieller Biomarker für mitochondriale Erkrankungen.....	17
1.5. Zielstellung	18
2. Diskussion.....	20
2.1. Biochemische Charakterisierung der mitochondrialen Myopathie in Trägern der m.3243A>G Mutation	20
2.1.1. Analyse der mitochondrialen Aktivität anhand eines extrazellulären XF96 Flux-Analysators	20
2.1.2. Regulation der mitochondrialen Biogenese durch die PGC-1 α -Kaskade.....	23
2.1.3. Untersuchung der Effekte von FAs auf die OXPHOS in Myoblasten der Träger der m.3243A>G Mutation.....	25
2.1.4. Korrelation zwischen mtDNA-Kopienzahl und Heteroplasmiegrad mit Phänotyp.....	28
2.2. Biochemische Charakterisierung der Variante S113L des humanen CPT II- Enzyms	30
2.2.1. Aktivität und Thermostabilität der CPT II-Enzyme	30
2.2.2. Der Effekt von natürlichen Substraten auf Stabilität des Enzyms	33
2.2.3. Der Regulierung von CPT II durch Malonyl-CoA	35
2.2.4. Der Einfluss von Cardiolipin auf Aktivität der CPT II-Enzyme.....	38
2.2.5. FGF-21-Serumspiegel in Patienten mit CPT II-Mangel.....	40
Zusammenfassung.....	44
Literaturverzeichnis	45
Thesen	60

Originalarbeiten	62
Selbstständigkeitserklärung	V
Erklärung über frühere Habilitationsversuche.....	VI
Tabellarischer Lebenslauf	VII
Danksagung	VIII

Abkürzungsverzeichnis (Abstände hinter die Abkürzungen)

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP-R	ATP-gebundene Atmung
B-CPT I	Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 aus Gehirn
BR	Basalatmung
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Bzw.	beziehungsweise
CACT	Carnitin/Acylcarnitin-Translokase
CER	Ceramiden
CK	Creatinkinase
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom-C-Oxidase
CPEO	chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
CR	<i>caloric restriction</i>
d. h.	das heißt
DAG	Diacylglycerolen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent Assay</i>
FAO	Fettsäureoxidation
FAs	Fettsäuren
FCCP	Protonophor Carbonylcyanid 4-(Trifluormethoxy) phenylhydrazon
FGF-21	<i>Fibroblast growth factor 21</i>
GDF-15	<i>Growth/Differentiation factor 15</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
His ₆ -N- <i>h</i> CPT2	humane Carnitin-Palmitoyltransferase 2 mit N-terminalem Hexahistidin- <i>tag</i>
LCFA	<i>long chain fatty acid</i>
L-CPT I	Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 aus Leber
LHON	Lebersche hereditäre Optikusneuropathie
M-CPT I	Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 aus Muskel
MD	Molekulardynamik

MELAS	Mitochondriale Enzephalomyopathie, Lactatazidose und Schlaganfallähnliche Episoden
MERRF	Myoklonus Epilepsie mit <i>ragged red</i> -Fasern
MR	maximale Atmung
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
mtTFA	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
N	normal
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinitispigmentosa
NRF	<i>Nuclear Respiratory Factor</i>
OCR	<i>oxygen consumption rate</i>
OCTN2	<i>organic cation/carnitine transporter 2</i>
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PGC-1	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor-Gamma-Coaktivator 1
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time-polymerase chain reaction</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RRFs	<i>ragged red fibers</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RSV	Resveratrol
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SIRT	Sirtuin
SRC	Reserveatmungskapazität
TAG	Triacylglycerin
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

In seiner traditionellsten Definition ist das Mitochondrium die energieerzeugende Organelle der Zelle, die für die letzten Schritte des Metabolismus organischer Substanzen verantwortlich ist, um Energie für die Zelle in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zu erzeugen (McInnes, 2013). Die Mitochondrien liefern bis zu 90% des ATP der Zelle (Pizzorno, 2014). Sie werden aber nicht nur als "Kraftwerk der Zelle" bezeichnet (McBride et al., 2006), sie sind auch an verschiedenen zellulären Prozessen wie Stoffwechselregulierung, Apoptose, Kalziumhomöostase, Zellproliferation und -motilität beteiligt. Diese werden durch die in der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNA, mtDNA) kodierten Gene gesteuert (Schon et al., 2012).

Die menschliche mtDNA, bekannt auch als "das andere menschliche Genom", ist ein doppelsträngiges, ringförmiges Molekül bestehend aus 16569 bp. Die mtDNA enthält 37 Gene, die zwei ribosomale *ribonucleic acids* (rRNAs), 22 transfer-RNAs (tRNAs) und 13 Strukturproteine kodieren. Die Vererbung erfolgt maternal (Johns, 1995; Taanman, 1999). Obwohl die mtDNA weniger als 1% des gesamten zellulären Nukleinsäuregehaltes beträgt, ist sie von grundlegender Bedeutung für die Funktion jedes menschlichen Gewebes (Chinnery and Turnbull, 1999).

Die mtDNA ist gewebespezifisch in Hunderten bis Tausenden Kopien pro Zelle vorhanden. Daher können beim Auftreten einer mtDNA-Mutation normale und mutierte mtDNA innerhalb derselben Zelle koexistieren. Dieser Zustand, der als Heteroplasmie bezeichnet wird, ermöglicht die Persistenz einer ansonsten tödlichen Mutation. Homoplasmie ist das Vorhandensein einer völlig normaler oder vollständig mutierter mitochondrialer DNA. Durch replikative Segregation können sich die Proportionen von mutierten und normalen Molekülen bei der Verteilung der mtDNA in die Tochterzellen verändern (Johns, 1995; O'Hara et al., 2019; Wallace, 1994).

1.1. Klassifikation mitochondrialer Myopathien

Mitochondriale Erkrankungen werden in zwei Hauptgruppen „mit“ oder „ohne“ direkter Beteiligung der oxidativen Phosphorylierung (**OXPHOS**) unterschieden.

Genetische Defekte, die zu primären mitochondrialen Erkrankungen führen, können entweder auf Mutationen der nukleären oder mtDNA zurückzuführen sein. Die betroffenen Gene kodieren entweder direkt für OXPHOS-Proteine oder sie beeinflussen die OXPHOS-Funktion, indem sie die Produktion der komplexen Maschinerie beeinflussen, die für den OXPHOS-Prozess benötigt wird. Weitere mitochondriale Dysfunktionen können dagegen durch Defekte in Genen verursacht werden, die weder die Funktion noch die Produktion der OXPHOS-Proteine beeinflussen (Niyazov et al., 2016).

1.1.1. Mitochondriale Myopathien aufgrund primärer Defekte der OXPHOS

Die häufigsten mitochondrialen Störungen werden auf eine Dysfunktion des OXPHOS-Systems zurückgeführt und treten mit einer geschätzten Häufigkeit von 1 in 5000 Lebendgeburten auf (Nsiah-Sefaa and McKenzie, 2016). mtDNA-Mutationen, die zu solchen Krankheiten führen, wurden bereits 1988 (Holt et al., 1988; Wallace et al., 1988) publiziert. Inzwischen gibt es Hunderte bekannte Punktmutationen, Deletionen oder *rearrangements* in der mtDNA, die mit mitochondrialen Erkrankungen assoziiert sind (Chan, 2006).

Deletionen der mtDNA

Die singulären mtDNA-Deletionen treten nahezu immer sporadisch und früh während der Embryonalentwicklung der Träger auf. Die identische Deletion ist in allen Zellen in den betroffenen Geweben vorhanden. Diese können in der frühen Kindheit auftreten, wie z. B. bei dem Pearson-Syndrom, oder im späteren Leben, wie z. B. bei der chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO) (Trifunov et al., 2018).

Das Auftreten von multiplen mtDNA-Deletionen unterschiedlicher Länge in betroffenen Geweben kann dagegen auf vererbte Mutationen in nukleären Genen zurückzuführen sein, deren Produkte an der Erhaltung und Replikation der mtDNA beteiligt sind. Solche Defekte können die intergenomische Kommunikation stören. Somit können sich mtDNA-Deletionen, die durch verschiedene genetische Defekte erzeugt werden, besonders innerhalb der

Muskelfasern mit unterschiedlichen Modi und Zeitpunkten ausbreiten (Trifunov et al., 2018; Tuppen et al., 2010). Als Beispiel sind Mutationen in nukleären Genen zu nennen, die 1) die Synthese der mitochondrialen DNA kontrollieren (*TK2*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B*, *DGUOK*, *LC25A4*, *MPV17* und *TYMP*); 2) für die mtDNA-Replikation benötigt werden (*POLG*, *POLG2*, *PEO1*, *RNASEH1*, *MGME1*, and *DNA2*) oder 3) eine Rolle bei der mitochondrialen Dynamik spielen (*OPA1* und *MFN2*).

Die Deletionen nehmen mit zunehmendem Alter proportional zu. Während singuläre mtDNA-Deletionen spontan auftreten und in den meisten Fällen nicht maternal übertragen werden, haben multiple mtDNA-Deletionen einen mendelschen Erbgang (El-Hattab and Scaglia, 2013; Rouzier et al., 2012; Suomalainen and Kaukonen, 2001). Zudem wurden multiple Deletionen mit degenerativen Erkrankungen und dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht (Kao et al., 1997).

Punktmutationen der mtDNA

Die mtDNA-Punktmutationen werden in der Regel maternal vererbt und wurden in proteinkodierenden Genen, tRNAs und rRNA beschrieben. Ihre klinische Ausprägung umfasst Phänotypen wie MELAS (Mitochondriale Enzephalomyopathie, Lactatazidose und schlaganfallähnliche Episoden), MERRF (Myoklonus Epilepsie mit *ragged red*-Fasern), NARP (Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa), Morbus Leigh (subakute nekrotisierende Enzephalomyelopathie) oder LHON (Lebersche hereditäre Optikusneuropathie) (Schapira, 2006; Zierz, 2014).

Mehr als die Hälfte der gemeldeten krankheitsbezogenen Punktmutationen befinden sich innerhalb der mt-tRNA-Gene. Mitochondriale Erkrankungen verursacht durch Störungen in OXPHOS sind die häufigsten angeborenen Stoffwechselstörungen, wobei zwischen 15% und 25% der Fälle durch pathogene mitochondriale mtDNA-Mutationen verursacht werden. Mutationen der mt-tRNA können die gesamte mitochondriale Translation beeinträchtigen, indem sie die Verfügbarkeit funktioneller mt-tRNAs reduzieren. Viele verschiedene mt-tRNA-Mutationen können ein breites Spektrum menschlicher

Erkrankungen verursachen. Besonders energiebedürftige Gewebe wie das Muskel- und Nervensystem sind von mitochondrialen Defekten betroffen (Abbott et al., 2014; Sallevelt et al., 2017; Tuppen et al., 2010).

m.3243A>G Mutation

Die Mutation m.3243A>G ist eine Punktmutation im *MT-TL1*-Gen (kodierend für mt-tRNA^{Leu(UUR)}) (Gorman et al., 2015). Die Populationshäufigkeit der Mutation beträgt ~1:15.000, was sie zu einer der häufigsten neurogenetischen Krankheiten macht (Majamaa et al., 1998). Eine negative signifikante Korrelation der mtDNA-Kopienzahl des Skelettmuskels mit einer reduzierten Gesamterkrankungslast in Trägern der m.3243A>G Mutation wurde berichtet (Grady et al., 2018).

Ungefähr 80% der Patienten mit MELAS (MIM540000) tragen die Punktmutation m.3243A>G. Das MELAS-Syndrom ist eine der häufigsten maternal vererbten mitochondrialen Störungen und stellt eine Multiorganerkrankung mit einem breiten Spektrum an Manifestationen dar, darunter schlaganfallartige Episoden, Demenz, Epilepsie, Laktatazidämie, Myopathie, rezidivierende Kopfschmerzen, Hörstörungen, Diabetes und Kleinwuchs. Die m.3243A>G Mutation führt zu einer gestörten mitochondrialen Translation und Proteinsynthese einschließlich der Untereinheiten des mitochondrialen Elektronentransportkettenkomplexes, was zu einer gestörten mitochondrialen Energieproduktion führt. Diese Dysfunktion der Mitochondrien könnte wiederum zu der beim MELAS-Syndrom beobachteten Multiorgan-Dysfunktion führen (El-Hattab et al., 2015; Goto et al., 1990; Kobayashi et al., 1992).

Bei ca. 21-33% der MELAS-Patienten tritt Diabetes mellitus auf. Der Diabetes beim MELAS-Syndrom manifestiert sich als Typ 1 oder Typ 2. Personen mit Typ 2-Diabetes können zunächst mit Diät behandelt werden. Bei der Entwicklung einer signifikanten Insulinopenie, werden die betroffenen Personen möglicherweise eine Insulinbehandlung benötigen (El-Hattab et al., 2015). Die diabetogene Natur der m.3243A>G-Mutation wurde in Verbindung mit dem Vorhandensein dieser Mutation in hoher Heteroplasmie in Pankreas-Zellen gebracht. Die Studien über postmortale Heteroplasmiekonzentrationen in

einzelnen Geweben haben allerdings keinen überzeugenden Zusammenhang diesbezüglich gezeigt (Maassen et al., 2004).

Patienten mit höheren Heteroplasmiewerten haben tendenziell eine höhere Krankheitslast und Progressionsrate. Krankheitslast und Progression variieren jedoch stark zwischen den Individuen und das damit verbundene klinische Spektrum ist breit. Im Allgemeinen weisen postmitotische Gewebe wie Neuronen, Skelett- und Herzmuskel hohe Mengen an mutierter mtDNA auf und sind häufig klinisch betroffen. Im Vergleich dazu nimmt der Anteil an mutierter mtDNA in schnell teilenden Geweben, wie dem Knochenmark mit der Zeit meistens deutlich ab und diese Organe sind nur selten klinisch betroffen (Chinnery and Turnbull, 1999; Grady et al., 2018; Pickett et al., 2018).

1.1.2. Mitochondriale Erkrankungen ohne Beteiligung der OXPHOS

Zu dieser Gruppe gehören die Störungen des Zitratzyklus und des Laktatmetabolismus, der Lipidmembran sowie Defekte der Fettsäureoxidation (*fatty acid oxidation*, FAO) als hereditäre Stoffwechselerkrankungen. Die Defekte der FAO werden durch den Mangel an spezifischen Enzymaktivitäten oder Transportproteinen verursacht, die am mitochondrialen Katabolismus von Fettsäuren (*fatty acids*, FAs) beteiligt sind (Wanders et al., 1999). FAO-Störungen treten als eine Vielzahl von klinischen Phänotypen auf und zeigen fast immer ein autosomal rezessives Vererbungsmuster. Die Inzidenz der FAO-Störungen wird auf etwa 1:10.000 geschätzt (Nsiah-Sefaa and McKenzie, 2016).

1.2. Mitochondriale Biogenese

Die mitochondriale Biogenese ist definiert als der Prozess, über den die Zellen ihre individuelle Mitochondrienmasse erhöhen (Onyango et al., 2010). Die OXPHOS benötigt eine koordinierte Expression zweier Genome: des nukleären und des mitochondrialen. Die Kontrolle der mitochondrialen Biogenese und Funktion ist daher ein äußerst komplexer Prozess, der eine Vielzahl gut orchestrierter Regulationsmechanismen erfordert (Garesse and Vallejo, 2001). Eine beträchtliche Anzahl von Proteinen, Transkriptionsfaktoren, regulatorischen

Proteinen und sekundären Mechanismen sind an der mitochondrialen Biogenese und der Stabilisierung der neuen mtDNA beteiligt. Zellen reagieren auf verschiedene physiologische, metabolische und pathologische Veränderungen durch die Regulierung der Mitochondrien mit hoher morphologischer und funktioneller Anpassungsfähigkeit. Veränderungen in der mitochondrialen Biogenese sind mit einer mitochondrialen Dysfunktion und mitochondrialem oxidativem Stress verbunden (Sanchis-Gomar et al., 2014; Touyz, 2012).

Es ist bekannt, dass Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor-Gamma-Coaktivator 1 (PGC-1) α ein zentraler Induktor der mitochondrialen Biogenese ist und die Transkription des *Nuclear Respiratory Factor* (Nrf) 1 mitaktiviert. Nrf1 spielt eine integrative Rolle bei nukleo-mitochondrialen Interaktionen und reguliert mehrere wichtige Netzwerke. Beispielsweise kodieren die Nrf1-Zielgene die Bestandteile der Respirationskomplexe, mtDNA-Transkriptions- und Replikationsmaschinerie, mitochondriale und zytosolische sowie Komponenten des mitochondrialen Proteinimports. Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (mtTFA = *Tfam*) ist auch ein Nrf1-Zielgen und aktiviert die Transkription und Replikation des mitochondrialen Genoms (Austin and St-Pierre, 2012; Kelly and Scarpulla, 2004; Scarpulla, 2002; Ventura-Clapier et al., 2008).

Resveratrol und die mitochondriale Biogenese

Resveratrol (3,4,5-Trihydroxystilben, RSV) ist eine kleine phenolische Substanz, die in Weintrauben, Nüssen, Beeren und anderen Pflanzen vorkommt (Wahab et al., 2017).

In den Jahren 2008-2010 wurde die Wirkung von RSV zur Behandlung von Patienten mit MELAS-Syndrom in einer klinischen Studie untersucht. Hierfür wurde das RSV-Analogon SRT501 (Sirtris Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA) verwendet. Im Dezember 2010 wurde allerdings die klinische Studie mit SRT501 ohne Angabe von Gründen gestoppt (Fong and Chan, 2013).

Sirtuine (SIRT) sind Enzyme der Klasse III der Histon-Deacetylase (HDAC), die evolutionär konserviert sind und eine NAD⁺-abhängige Deacetylase-Aktivität besitzen. SIRT1 ist im Zellkern lokalisiert, wandert aber bei Bedarf ins

Zytoplasma, wie es z. B. bei der Hemmung der Insulinsignalisierung der Fall ist. SIRT1 fördert die mitochondriale Biogenese durch Deacetylierung von Zielproteinen wie dem PGC-1 α . Von den sieben verschiedenen Sirtuinen sind SIRT3, SIRT4 und SIRT5 hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert. SIRT3 ist eine Protein-Deacetylase, die in den Mitochondrien lokalisiert ist und die mitochondriale Funktion reguliert (Dittenhafer-Reed et al., 2015; Li et al., 2011; Morris, 2013; Shi et al., 2005).

Seit mehr als 70 Jahren ist die Rolle der kalorischen Restriktion als die beständigste nicht-pharmakologische Intervention für die Erhöhung der Lebensdauer und für den Schutz vor Stoffwechselkrankheiten bekannt (Cantó and Auwerx, 2009). Für RSV wurde die "mimetische" Wirkung der kalorischen Restriktion bereits berichtet (Civitarese et al., 2007). Diese Wirkung soll durch Aktivierung von SIRT1 erfolgen (Howitz et al., 2003). Die Behandlung mit RSV in Mäusen verbesserte die mitochondriale Funktion und Biogenese im Skelettmuskel und in der Leber (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006). Die duale Kontrolle der mitochondrialen Biogenese durch SIRT1 und SIRT3 ist allgemein anerkannt (Brenmoehl and Hoeflich, 2013). Die aktivierende Wirkung von RSV auf die mitochondriale Biogenese über SIRT1 und SIRT3 ist jedoch umstritten. Während viele Studien über eine SIRT1- und SIRT3-Aktivierung durch RSV und ihre strukturell verwandten Verbindungen berichten (Price et al., 2012; Yang et al., 2010), bestreiten Andere hingegen die Wirkung von RSV und seiner Analoga als direkte SIRT1-Aktivatoren (Beher et al., 2009; Pacholec et al., 2010).

1.3. Defekte des Fettsäurestoffwechsels

Die Defekte mit nukleären Ursprung können außer OXPHOS auch andere Funktionen der Mitochondrien betreffen. Die Defekte im Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT)-System sind als Beispiel zu nennen (DiMauro et al., 1987).

Die mitochondriale β -Oxidation stellt die Hauptenergiequelle im Skelettmuskel dar. Da die FAO weitgehend in den Mitochondrien stattfindet, müssen diese FAs nach der Aktivierung mit Coenzym A (CoA) in die Matrix transportiert werden. Während mittel- und kurzkettige FAs nach Aktivierung durch die Acyl-CoA-Synthase in die Mitochondrien gelangen, ist die innere mitochondriale Membran für die CoA-aktivierten langkettigen Fettsäuren (*long chain fatty acids*, LCFA) nicht durchlässig. Der Transport der LCFAs erfordert ein komplexes Carnitin-abhängiges System mit den drei Enzymen CPT I, Carnitin/Acylcarnitin-Translokase (CACT) und CPT II (Abb. 1) (Demaugre et al., 1991; Eaton et al., 1996; Kerner and Hoppel, 2000; Rebouche et al., 1990).

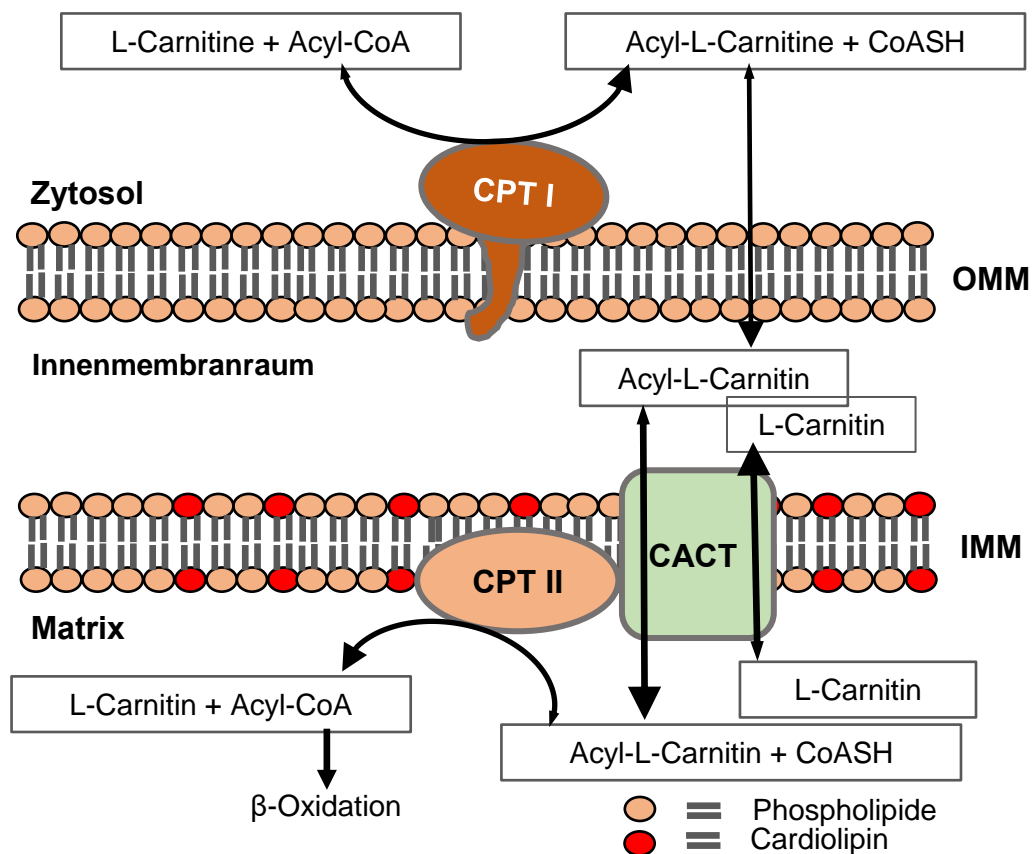


Abbildung 1. Transport von Fettsäuren durch die Mitochondrienmembranen mittels Carnitin-Palmitoyltransferase-Systems. CPT: Carnitin-Palmitoyltransferase, CACT: Carnitin/Acylcarnitin-Translokase, CoA: Coenzym A, IMM: innere mitochondriale Membran, OMM: äußere mitochondriale Membran, modifiziert nach McGarry (McGarry, 2001).

Die verschiedenen Defekte im CPT-System können Fettsäurestoffwechselstörungen verursachen.

Carnitin-Mangel

L-Carnitin (Trimethyl-hydroxybutyrobetain; (R)-(3-Carboxy-2-hydroxypropyl)-N,N,N-trimethylammoniumhydroxid) hat eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel. Zelluläres Carnitin wirkt als obligatorischer Cofaktor für die β -Oxidation von FAs, indem es den Transport von LCFAs über die innere Mitochondrienmembran als Acylcarnitinester ermöglicht. Da sowohl die Herz- als auch die Skelettmuskulatur FAs als wichtige Energiequelle nutzen, kann ein Mangel an Carnitin in diesen Geweben zu Kardiomyopathie und Muskelschwäche führen (Bremer, 1983; Nezu et al., 1999; Walter, 1996).

Carnitin-Mangel kann primär oder sekundär auftreten. Sekundärer Carnitin-Mangel ist mit einer Vielzahl von genetischen und erworbenen Krankheiten assoziiert und manifestiert sich durch verminderte Plasma- oder Gewebe-Carnitin-Konzentrationen. Bei diesen Störungen liegen die Plasma- und Gewebe-Carnitin-Spiegel im Bereich von 25% bis 50% des Normalwerts und das Verhältnis von Acylcarnitin zu freiem Carnitin ist erhöht (Kerner and Hoppel, 1998; Pons and De Vivo, 1995).

Die primären Carnitin-Mangel-Syndrome können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: eine überwiegend myopathische und eine systemische Form. Während es bei der systemischen Form zu einer starken Reduktion von Carnitin im Plasma und auch in den betroffenen Geweben kommt, ist bei der muskulären Form der niedrige Gehalt auf den Muskel beschränkt. Im Gegensatz zu einem sekundären Mangel, bringt eine orale Carnitin-Behandlung bei einigen Patienten mit primären Carnitin-Mangel Vorteile. Primärer systemischer Carnitin-Mangel (OMIM 212140) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch progressive Kardiomyopathie, Skelettmyopathie, Hypoglykämie und Hyperammonämie gekennzeichnet ist. Dieser Erkrankung liegt ein Defekt in dem *organication/carnitine-transporter* (*OCTN2*)-Gen zu Grunde, welcher den aktiven Transport von Carnitin über die Plasmamembran betrifft (DiDonato, 1994; Kerner and Hoppel, 1998; Rinaldo et al., 2002).

CACT-Mangel

CACT ist ein Bestandteil des Carnitin-Zyklus. CACT besteht aus 301 Aminosäuren und transportiert LCFAS als Fettsäurecarnitinester (Acylcarnitine) über die innere Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix, wo die β -Oxidation stattfindet. Zusätzlich zu diesem unidirektionalen Transport der Acylcarnitine katalysiert es einen 1:1-Austausch zwischen Acylcarnitinen unterschiedlicher Kettenlängen und Carnitin. Diese Funktion ist wichtig für den Erhalt der Äquilibration der Carnitin-Konzentration über die innere mitochondriale Membran. Das kodierende Gen für CACT konnte dem Chromosom 3p21.3 zugeordnet werden. Der CACT-Mangel (OMIM 212138) führt zu einem defekten intramitochondrialen Transport der von CPT I gebildeten Acylcarnitine und ist eine der schwersten Störungen der FAO (Eaton et al., 1996; Kerner and Hoppel, 1998; Rubio-Gozalbo et al., 2004).

Seit dem ersten Bericht über einen CACT-Mangel im Jahr 1992 (Stanley et al., 1992) wurden nur wenige Fälle dieser Erkrankung dokumentiert. Die meisten Patienten mit dieser sehr seltenen autosomal-rezessiven Erkrankung zeigen Anzeichen einer Multiorganbeteiligung. Die Symptome werden durch Fasten oder durch die Aufnahme von Fett ausgelöst und umfassen hypoketotische Hypoglykämie, Kardiomyopathie, Skelettmuskelschwäche und Leberdysfunktion. Ein charakteristisches Merkmal der Erkrankung ist eine anhaltende Erhöhung der langkettigen Acylcarnitine im Plasma bei sehr niedrigem freiem Carnitin. Die meisten Patienten zeigen bereits als Neugeborene die Symptome mit einer schnell fortschreitenden Verschlechterung und einer hohen Sterblichkeitsrate. Es wurden jedoch auch Fälle mit einer Manifestation im späteren Alter und einem milderem Phänotyp berichtet (Galron et al., 2004; Kerner and Hoppel, 1998; Rubio-Gozalbo et al., 2004).

CPT I-Mangel

CPT I (EC 2.3.1.21) lokalisiert an der Innenseite der äußeren Mitochondrienmembran, katalysiert den ratenlimitierenden Schritt der β -Oxidation, d. h. die Umsetzung der Acyl-CoAs und des freien Carnitins zu Acylcarnitinen und freien CoAs (Sigauke et al., 2003). Drei Gewebe-spezifische

Isoformen der CPT I existieren: Leber-Isoform (L-CPT I) (Britton et al., 1995) zusammengesetzt aus 773 Aminosäuren, Muskel-Isoform (M-CPT I) (Yamazaki et al., 1996) mit 772 Aminosäuren und Gehirn-Isoform (*Brain*, B-CPT I) (Price et al., 2002) bestehend aus 803 Aminosäuren. Die kodierenden Gene der Isoformen L-CPT I, M-CPT I und B-CPT I konnten den Chromosomen 11q13.1, 22q13.31 bzw. 19q13.33 zugeordnet werden (Bennett et al., 2000; Bonnefont et al., 2004; Britton et al., 1997).

Das CPT-System wird durch Malonyl-CoA stark reguliert (Nicot et al., 2004). Sowohl die katalytische als auch die Malonyl-CoA-Bindungsstelle der CPT I sind zum Zytosol hin exponiert, wo zunächst Acyl-CoA-Ester gebildet werden (Sigauke et al., 2003).

Störungen der CPT I sind sehr selten und CPT I-Mängel sind bis jetzt nur im Bezug der gewebsspezifischen Isoform für Leber (CPT I A oder L-CPT I) bekannt. Betroffene weisen schwere metabolische Störungen auf, wie etwa eine hypoketotische Hypoglykämie und Fettleber. Kinder mit diesem angeborenen Mangel der FAO zeigen meist einen veränderten mentalen Status und eine Hepatomegalie (Bonnefont et al., 2004; Britton et al., 1995).

CPT II-Mangel

CPT II (EC 2.3.1.21) ist ein membranassoziertes Protein bestehend aus 773 Aminosäuren in der inneren Mitochondrienmembran, das Acylcarnitine innerhalb der Mitochondrienmatrix wieder in Acyl-CoAs umsetzt und sie so für die FAO zugänglich macht. Im Gegensatz zu CPT I kommt CPT II ubiquitär vor. Das kodierende *CPT2* Gen wurde dem Chromosom 1p32 zugeordnet (Gellera et al., 1994; Kerner and Hoppel, 2000).

Der CPT II-Mangel wird als die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des Lipidstoffwechsels und die häufigste Ursache der erblichen Myoglobinurie angesehen (McGarry and Brown, 1997).

Auf den CPT II-Mangel wird im Folgenden näher eingegangen.

CPT II-Mangel-Phänotyp-Genotyp-Korrelation

Bei dem CPT II-Mangel sind drei Phänotypen zu unterscheiden: (1) eine letale neonatale Form, (2) eine schwere infantile hepatokardiomuskuläre Form und (3) eine milde myopathische Form. Die Symptome des Letzteren bestehen in der Regel aus rezidivierenden Anfällen von Myalgie und Muskelschwäche, die zu Myoglobinurie führen, was wiederum zu einem Nierenversagen führen kann. Die Anfälle werden meistens durch langanhaltende körperliche Belastung, Fasten, Fieber, Kälteeinwirkung oder Einnahme bestimmter Medikamente wie Diazepam oder Ibuprofen ausgelöst (Bonnesfont et al., 2004; McGarry and Brown, 1997; Motlagh and Zierz, 2014). Seit der Erstbeschreibung des CPT II-Mangels durch DIMAURO und DIMAURO (DiMauro and DiMauro, 1973) wurden bis jetzt über 70 krankheitsauslösende Genmodifikationen im *CPT2* Gen identifiziert. Der Austausch eines Serins gegen ein Leucin an der Aminosäureposition 113 des CPT II-Proteins, p.Ser113Leu (c.338C > T) (Taroni et al., 1993) konnte in etwa 90% der untersuchten Fälle mit einer Allelfrequenz von 60% festgestellt werden (Joshi et al., 2014). Neben dem Aminosäureaustausch S113L wird die Aminosäuresubstitution P50H mit einer Häufigkeit von 6,5% (Bonnesfont et al., 2004) auch als „*common*“-Mutation bezeichnet.

Eine genaue Genotyp-Phänotyp-Korrelation für CPT II-Mangel konnte nicht festgestellt werden (Isackson et al., 2006; Taroni et al., 1992). Einige Mutationen konnten jedoch bestimmten Phänotypen zugeordnet werden. Während einige "milde" missense Mutationen wie die S113L-Mutation mit der Muskelform assoziiert sind, führen einige "schwere" Mutationen wie die trunkierende Q413fs-F448L-Mutation zu den multisystemischen infantilen oder letalen neonatalen Formen, wenn sie im homozygoten Zustand vorhanden sind (Deschauer et al., 2005).

Für die muskuläre Form des CPT II-Mangels wird eine Prävalenz von 1:1.000.000 bis 1:100.000 angegeben. Da bei Patienten mit CPT II-Mangel häufig in Kliniken für innere Medizin bzw. Nephrologie die Diagnose einer »idiopathischen Rhabdomyolyse« (Meyer-Betz-Syndrom) gestellt wird, könnte die Häufigkeitsangabe sehr viel höher sein (Motlagh and Zierz, 2014).

1.3.1. Die Mitochondrienmembran und Cardiolipin

Phospholipide sind wichtige strukturelle und funktionelle Komponenten der Mitochondrienmembranen. Die Mitochondrien der Eukaryoten sind von zwei Membranen umgeben: Es gibt eine äußere (MOM) und eine innere Mitochondrienmembran (MIM), die sich prozentual in der Zusammensetzung ihrer Phospholipide unterscheiden. MOM und MIM besitzen unterschiedliche Funktionen. Die MOM ist hauptsächlich gekennzeichnet durch eine Vielzahl von Porinen, die für alle Moleküle von ≤ 5 kDa durchlässig sind. Die MIM hingegen ist undurchlässig und hoch spezialisiert. Sie enthält 15-20% Cardiolipin (Alberts et al., 2002; Osman et al., 2011; Ventura-Clapier et al., 2008). Cardiolipin ist ein Phospholipid, das in den Mitochondrien synthetisiert wird und sich fast ausschließlich in der MIM befindet. Cardiolipin gilt als wichtigster Teil der Lipid-Protein-Assoziation in den Mitochondrien und wurde daher auch als "das wahre mitochondriale Phospholipid" bezeichnet. Seine einzigartige Struktur enthält zwei negativ geladene Phosphatgruppen und vier hydrophobe Acylketten, die es Ionen erschweren die MIM zu überwinden (Dowhan, 1997; Hatch, 2004; Paradies et al., 2014; Schlame and Haldar, 1993).

1.4. Diagnoseverfahren der mitochondrialen Myopathien

Die mitochondriale Dysfunktion wird zunehmend als ein wichtiger Aspekt bei einer Vielzahl von neuromuskulären und neurodegenerativen Erkrankungen angesehen (Tuppen et al., 2010).

Die mitochondrialen Erkrankungen sind mit einem breiten Spektrum von klinischen Phänotypen assoziiert, die von leicht bis schwer reichen und in jedem Alter auftreten können. Die klassischen mitochondrialen Erkrankungen haben typischerweise Manifestationen im Gehirn und in der Skelettmuskulatur, weshalb sie oft als mitochondriale Enzephalomyopathien bezeichnet werden. Die Muskelbeteiligung kann isoliert und das einzige Anzeichen einer mitochondrialen Erkrankung oder Teil einer Multisystemerkrankung sein (Tuppen et al., 2010). Metabolische Myopathien umfassen eine klinisch und ätiologisch vielfältige Gruppe von Störungen, die durch Defekte der OXPHOS sowie der Glukose- und Fettsäureutilisation verursacht werden. Die Diagnose dieser Erkrankungen

erfordert eine komplexe Reihe klinischer Untersuchungen, die meistens mit histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen, enzymatischen Analysen der OXPHOS-Komplexe und genetischen Untersuchungen verbunden sind. Die Skelettmuskulatur ist bei mitochondrialen Erkrankungen häufig betroffen und ist das am häufigsten biopsierte Gewebe (Ahmed et al., 2018; Berardo et al., 2010).

1.4.1. Diagnostik der OXPHOS-Störungen

Die klinische Ausprägung mitochondrialer Erkrankungen kann begleitet sein von gut bekannten klinischen Symptomen für einen bestimmten Krankheitsphänotyp. Es gibt jedoch eine große Anzahl von Patienten mit einer Gruppe von klinischen Symptomen, die auf bestimmte mitochondriale Störungen hindeuten, aber keiner Krankheitskategorie eindeutig zugeordnet werden können (Khan et al., 2015). Die CPEO ist die häufigste Manifestation einer mitochondrialen Myopathie im Erwachsenenalter. Die CPEO stellt eine Syndrombezeichnung dar, die jedoch bei anderen klassischen Syndromen unter anderem bei Trägern der m3243A>G Mutation als Begleitsymptom auftreten kann (Bau et al., 2009).

Laborchemisch ist die Creatinkinase (CK)-Konzentration im Serum der Patienten meistens normal oder nur leicht erhöht. Die Erhöhung von Laktat im Blut oder Liquor kann einen wichtigen Hinweis für eine mögliche mitochondriale Erkrankung liefern. Eine Laktatmessung unter leichter Belastung (15-minütiges Fahrradfahren mit maximal 30 W) stellt noch sensitivere Ergebnisse als Ruhelaktat (Vorgerd and Deschauer, 2013).

Molekulargenetische Untersuchungen

Zusätzlich zu den klinischen Merkmalen kann die Familienanamnese wichtige Informationen liefern, wenn die Diagnose einer mitochondrialen Erkrankung in Betracht gezogen wird. Die maternale Vererbung findet sich nahezu ausschließlich bei Punktmutationen der mtDNA. Demgegenüber sind singuläre Deletionen nahezu immer sporadisch. Multiple Deletionen dagegen folgen einem autosomal dominanten oder rezessiven Erbgang. Es soll dabei beachtet werden,

dass die Mutationen der mtDNA sich häufig in der Heteroplasmie finden. In diesem Fall besitzt ein variabler Teil der mtDNA in der Zelle die Mutation. Der Anteil der mutierten DNA kann somit von Gewebe zu Gewebe variieren und ist in der Regel in betroffenen Organen am höchsten. Zusätzlich kann bei Verdacht auf eine kerngenetische Ursache eine gezielte DNA-Sequenzierung ausgewählter Gene durchgeführt werden. Wenn keine pathogene Mutation identifiziert wird, werden heute üblicherweise *Whole-Genome-* und *Whole-Exome-Screenings* zur Suche nach pathogenen Veränderungen in der DNA/potenziellen genetischen Diagnosen eingesetzt (Ahmed et al., 2018; Liang et al., 2014; Vorgerd and Deschauer, 2013).

Histologische Untersuchungen

Häufig findet man bei Patienten mit mitochondrialen Enzephalomyopathien eine Beeinträchtigung des Komplex IV der Atmungskette (Cytochrom-C-Oxidase, COX). Die Aktivitätsminderung der COX lässt sich histochemisch durch COX-negative Fasern nachweisen. Die kombinierte sequentielle COX/SDH-Färbung beruht auf der gleichzeitigen Aktivität von Komplex II (Succinat-Dehydrogenase, SDH) und COX in Mitochondrien (Abb. 2A).

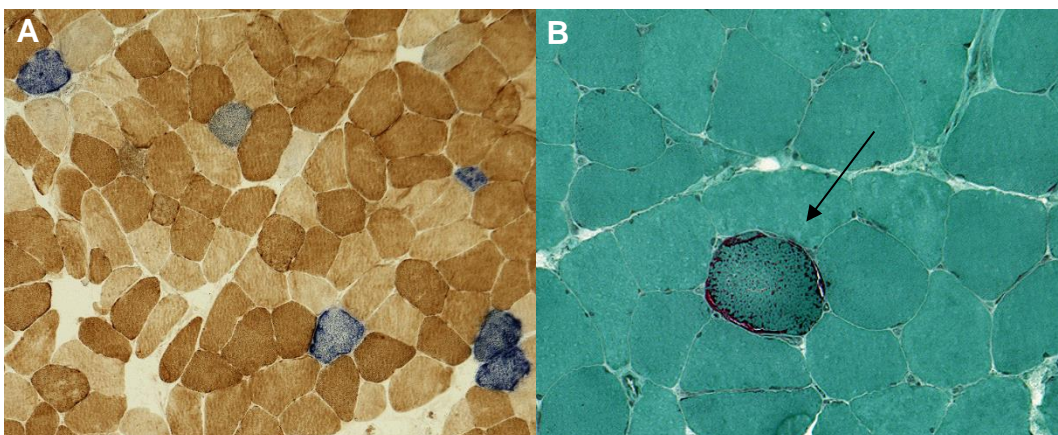


Abbildung 2. Photogene Merkmale im Muskelgewebe eines Patienten mit MELAS-Syndrom. Lichtmikroskopische Aufnahme von Kryoschnitten nach A) COX/SDH Färbung mit Cytochrom-c-Oxidase (COX)-positiven (braun) und COX-negativen Faser (blau) bei 10-fache Vergrößerung und B) Gomori-Trichrom-Färbung mit "ragged red fiber" (schwarzer Pfeil) bei 20-fache Vergrößerung.

Die SDH ist vollständig von Kern-DNA kodiert, und ihre Aktivität ist in der Regel nicht durch eine Störung der mtDNA betroffen (Deschauer, 2003; Filosto et al., 2007).

Histologisch sind die mitochondrialen Myopathien durch die Degeneration einzelner Muskelfasern gekennzeichnet, die mit einer Ansammlung abnormaler Mitochondrien im Subsarkolemm der Faser einhergehen können. Die Proliferation abnormaler Mitochondrien stellt eine kompensatorische Reaktion der Zelle auf den bioenergetischen Mangel dar. Histochemische Untersuchungen zeigen manchmal, dass solche Aggregate abnormaler Mitochondrien rote subsarkolemmale Flecken bilden (Abb. 2B), was ihnen den pathognomonischen Namen *ragged red fibers* (RRFs) gibt (Adkison, 2011).

1.4.2. Diagnostik des CPT II-Mangels

Bei Verdacht auf einen CPT II-Mangel ist angesichts der Häufigkeit der S113L- und P50H-Mutationen eine direkte Suche nach diesen Mutationen in peripheren Blutzellen das am besten geeignete Verfahren (Motlagh and Zierz, 2014).

Die biochemische Analyse erfolgt im Muskelhomogenat mit Hilfe des Isotopen-Forward-Assays. Dabei werden bei der Messung der Gesamtaktivität der CPT (CPT I + CPT II) unter optimalen Testbedingungen häufig normale enzymatische Aktivitäten detektiert. Entscheidend ist die Durchführung des Assays zusätzlich in Gegenwart von Malonyl-CoA und/oder Triton X-100. Während die *in vitro* Zugabe von Malonyl-CoA oder Triton X-100 zu einer fast vollständigen Hemmung der Aktivität in Patientenproben führt, kommt es bei den Kontrollen nur zu einer ca. 60% bzw. 40%iger Reduktion der CPT-Aktivität (Zierz and Engel, 1985; Zierz et al., 1993).

Die charakteristische Erhöhung der (C16 + C18:1)/C2-Ratio bei der massenspektrometrischen Analyse des Acylcarnitinprofils im Serum der Patienten könnte ein Hinweis auf einen CPT II-Mangel liefern (Gempel et al., 2002). Die massenspektrometrische Methode wird bei Neugeborenen-Screenings für die Früherkennung des genetisch bedingten CPT II-Mangels anhand der Trockenblut-Karte verwendet (Nennstiel et al., 2020). Die Analyse

des Acylcarnitinprofils aus Trockenblut kann jedoch zumindest für den muskulären CPT II-Mangel falsch-negative Werte liefern und die Diagnosesicherung erfordert den biochemischen oder molekulargenetischen Nachweis (Illsinger et al., 2008).

1.4.3. *Fibroblast growth factor 21* als potentieller Biomarker für mitochondriale Erkrankungen

Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) wurde erstmals 2011 als Biomarker für die Diagnose von mitochondrialen Erkrankungen vorgestellt. Diese Idee wurde anschließend in verschiedenen anderen Studien bestätigt (Davis et al., 2013; Koene et al., 2014; Motlagh Scholle et al., 2018a; Suomalainen, 2011; Suomalainen et al., 2011). Die erhöhte Expression von FGF-21 bei mitochondrialen Erkrankungen wird als kompensatorische Reaktion auf Atmungskette-Defekte angesehen (Ji et al., 2015). Eine starke Erhöhung der FGF-21 *messenger*-RNA (mRNA) und der Proteinspiegel im Skelettmuskel wurde bei Patienten mit MELAS beobachtet (Ji et al., 2015).

Bei einigen anderen Stoffwechselkrankheiten ohne mitochondrialen Störungen, wie bei Patienten mit Adipositas und Typ 2-Diabetes, wurde ebenfalls von erhöhten Serum- oder Plasmaspiegeln von FGF-21 berichtet (Mraz et al., 2009).

1.5. Zielstellung

In dieser kumulativen Habilitationsschrift wurden folgende Themenkomplexe bezüglich biochemischer Konsequenzen der als Beispiel dargestellten mitochondrialen Defekte behandelt:

I) Störungen der OXPHOS

A) An Myoblasten von 5 m.3243A>G Mutationsträgern im Vergleich zu Kontrollmyoblasten wurde:

- der Effekt der m.3243A>G Mutation auf die mitochondriale Atmung anhand eines Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzers (Agilent Biotechnologies) mittels eines Stressmodells untersucht.

- untersucht, ob die m.3243A>G Mutation als eine mitochondriale Dysfunktion, die auf einem mtDNA-Defekt bei Patienten beruht, zelluläre Signale auslösen kann, die kompensatorische Anpassungen provozieren. Dabei wurde die Regulation der mitochondrialen Biogenese durch die PGC-1 α -Kaskade und deren beteiligten Genen bei Normalen und in einer als „gestresst“ definierte Situation analysiert.

- die Notwendigkeit für die Funktionalität der Mitochondrien für die Wirkungen von Resveratrol (RSV) untersucht. Weiterhin wurde überprüft, ob RSV die physiologischen Effekte der kalorischen Restriktion hauptsächlich über den SIRT1-abhängigen Weg in Kontrollen und besonders bei Patienten stimuliert und zu einer erhöhten mitochondrialen Biogenese führt.

- bei Untersuchung der β -Oxidation überprüft, ob Palmitat als langkettige gesättigte Fettsäure lipotoxische Effekte in den Trägern der m.3243A>G Mutation zeigt und damit eventuell als Ursache für die Insulinresistenz in Skelettmuskel und Leber dieser Patienten eine besondere Rolle spielt.

B) In 30 verschiedenen postmortalen Gewebeproben einer 46-jährigen Trägerin der m.3243A>G Mutation wurde die Korrelation zwischen der Anzahl der mtDNA-Kopien und dem Heteroplasmiegrad untersucht. Weiterhin wurden diese Ergebnisse im Hinblick auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation mit 15 gut charakterisierten Fällen aus der Literatur verglichen.

II) CPT II-Mangel

A) Für die Charakterisierung des CPT II-Mangels wurden das humane Wildtyp-Enzym und dessen Variante mit der S113L-Mutation rekombinant hergestellt. Diese rekombinant hergestellten Proteine wurden untersucht hinsichtlich:

- enzymatischer Aktivität
- Thermostabilität
- Rolle der natürlichen Substrate als Effektoren
- Malonyl-CoA- Hemmbarkeit
- Effekt des Phospholipids Cardiolipin als wichtiger Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran

B) Die FGF-21-Serumkonzentration wurde als ein Biomarker für mitochondriale Erkrankungen in Proben von 13 Patienten mit muskulärer Form des CPT II-Mangels untersucht.

2. Diskussion

Als Diskussionsbasis der Abschnitte 2.1. und 2.2. liegen eigene Originalarbeiten zu Grunde, welche sich im Anhang befinden und die ausgewiesenen Abbildungen beinhalten:

2.1. Biochemische Charakterisierung der mitochondrialen Myopathie in Trägern der m.3243A>G Mutation

2.1.1. Analyse der mitochondrialen Aktivität anhand eines extrazellulären XF96 Flux-Analysators

Anlage: **Motlagh Scholle, L.**, Schieffers, H., Al-Robaiy, S., Thaele, A., Dehghani, F., Lehmann Urban, D., and Zierz, S. (2020a). The Effect of Resveratrol on Mitochondrial Function in Myoblasts of Patients with the Common m. 3243A> G Mutation. *Biomolecules* 10, 1103.

Es wurde über eine verminderte ATP-gebundene Atmung, maximale Respiration (MR) und insgesamt eine Abnahme der mitochondrialen Funktion in Fibroblasten von MELAS-Patienten berichtet (Lin et al., 2017). In der hier vorgestellten Originalarbeit (Motlagh Scholle et al., 2020a) wurde die mitochondriale Aktivität anhand eines Seahorse XF96 Analyzers (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA) in primären Muskelzellen (Myoblasten) von fünf Trägern der m.3243A>G Mutation, sowie von Kontrollen unter normaler und einer als „*Restricted*“ definierten Situation untersucht.

Anhand des Seahorse Analyzers wurden die *oxygen consumption rate* (OCR)-Werte nach sequentiellen Injektionen verschiedener Inhibitoren der mitochondrialen OXPHOS gemessen (Abb. 3). Zusammengefasst wurde zuerst der ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin in die Wells injiziert, um die OCR in Abwesenheit der oxidativen Phosphorylierung zu messen. Danach wurde die Atmungskette durch die Zugabe von Protonophor Carbonylcyanid 4-(Trifluormethoxy) phenylhydrazon (FCCP) entkoppelt und das mitochondriale Membranpotential brach zusammen. Dies induziert die maximale Aktivität der Atmungskette und führt zu einem rapiden Energie- und Sauerstoffverbrauch ohne ATP-Bildung. Im letzten Schritt wurde eine Kombination aus Rotenon, einem Inhibitor des Komplex I und Antimycin A, einem Inhibitor des Komplex III

der Atmungskette injiziert. Dies hat die komplette Hemmung der mitochondrialen Atmung bzw. der ATP-Produktion zur Folge. Die dadurch resultierende OCR stellt die nicht-mitochondriale Zellatmung dar.

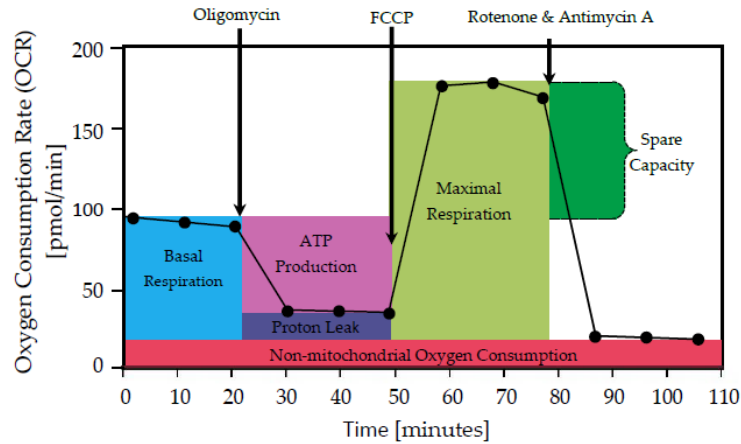


Abbildung 3. Schematische Darstellung des Seahorse XF96 Mito-Stress-Tests.

Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) im Mito-Stress-Test nach sequenzieller Injektion von Oligomycin, Protonophor Carbonylcyanid 4-(Trifluormethoxy) phenylhydrazon (FCCP) und Rotenon/Antimycin A Mix. Der Mito-Stress-Test ermöglicht die *in situ* Echtzeit Untersuchung der mitochondrialen Atmung in verschiedenen Zelllinien. OCR: oxygen consumption rate (Quelle: <https://www.agilent.com>).

Dabei wurden die Zellen entweder „Normal“ (N) oder im „limitierten Medium“ (*Restricted*: R) kultiviert. In der R-Gruppe wurde das Medium durch ein substratlimitiertes Medium ersetzt (DMEM mit 0,5 mM Glukose, 1,0 mM Glutamin und 1% FBS) (Motlagh Scholle et al., 2020a). Außerdem wurde die kontrovers diskutierte kalorische Restriktion (*caloric restriction*, CR) stimulierende Wirkung von RSV auf die mitochondriale Atmung in Myoblasten der Patienten und Kontrollen untersucht. Dabei wurden anhand der oben beschriebenen Messungen mit dem „Mito-Stress-Test“ die Schlüsselparameter der mitochondrialen Funktion wie Basalatmung (BR), ATP-gebundene Atmung (ATP-R), maximale Atmung (MR) und Reserveatmungskapazität (SRC) analysiert.

Unter normalen (N) Bedingungen waren BR, MR und ATP-R bei den Kontrollen im Vergleich zu den Patienten signifikant höher (Abb. 2) (Motlagh Scholle et al., 2020a).

Unter R-Bedingungen wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in den oben genannten Faktoren zwischen Patienten und Kontrollen mit oder ohne RSV festgestellt. In der R-Gruppe wurde das Medium nur auf minimalen zellulären Grundbedürfnissen umgestellt. Dabei waren die Zellen sowohl durch Kalorienrestriktion, als auch durch das Fehlen verschiedener anderer Faktoren (z.B. Insulin) beeinträchtigt. Diese Einschränkungen führten generell unabhängig von der Abwesenheit oder dem Vorhandensein von RSV zu einer Abnahme der Atemwerte sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen im Vergleich zu normalen Bedingungen (Abb. 2) (Motlagh Scholle et al., 2020a). Die vorgestellten Ergebnisse stehen teilweise im Gegensatz zu Daten aus früheren Studien, die über einen Anstieg der mitochondrialen ATP-Syntheseleistung und des oxidativen Stoffwechsels unter CR-Bedingungen berichteten. Als möglicher Grund für diese Abweichungen könnten die unterschiedlichen Versuchsbedingungen oder verschiedene Spezies in Betracht kommen (Barazzoni et al., 2005; Cerletti et al., 2012; Elkalaf et al., 2013). Darüber hinaus liegen den Ergebnissen der vorliegenden Studie in den R-Gruppen nicht nur eine Reduktion der Glukose zur Grunde, sondern auch der anderen Zusatzstoffe im Vergleich zum normalen Medium bei der N-Gruppe (Motlagh Scholle et al., 2020a).

Die positive Wirkung von RSV auf die mitochondriale Funktion wird kontrovers diskutiert. Während manche Studien eine Verbesserung der mitochondrialen respiratorischen Funktion beobachtet haben (Lagouge et al., 2006; Lopes Costa et al., 2014), gab es Berichte über keinen oder einen geringen positiven Effekt von RSV diesbezüglich (Douiev et al., 2016; Higashida et al., 2013). In der hier vorgestellten Originalarbeit (Motlagh Scholle et al., 2020a) konnte der positive Effekt von RSV nach der Behandlung der Myoblasten mit RSV unter normalen Bedingungen (N) bei Patienten oder Kontrollen nicht bestätigt werden. Bei den R-Bedingungen jedoch, wurde eine Verbesserung der OXPHOS-Werte sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen in Gegenwart von RSV beobachtet. Unter diesen Versuchsbedingungen waren die wichtigen respiratorischen Faktoren im Allgemeinen bei Patienten und Kontrollen ähnlich (Abb. 2 und Tabelle 3) (Motlagh Scholle et al., 2020a).

2.1.2. Regulation der mitochondrialen Biogenese durch die PGC-1 α -Kaskade

Anlage: **Motlagh Scholle, L.**, Schieffers, H., Al-Robaiy, S., Thaele, A., Dehghani, F., Lehmann Urban, D., and Zierz, S. (2020a). The Effect of Resveratrol on Mitochondrial Function in Myoblasts of Patients with the Common m. 3243A> G Mutation. *Biomolecules* 10, 1103.

Die duale Kontrolle der mitochondrialen Biogenese durch SIRT1 und SIRT3 ist weitgehend anerkannt (Brenmoehl and Hoeflich, 2013). SIRT1 aktiviert die PGC-1 α -vermittelte Transkription von nukleären und mitochondrialen Genen. PGC-1 α ist bekanntlich ein zentraler Induktor der mitochondrialen Biogenese (Austin and St-Pierre, 2012). Der regulatorische Effekt von SIRT1 auf die PGC-1 α -Aktivität und seine Rolle in der mitochondrialen Biogenese wird jedoch kontrovers diskutiert (Tang, 2016). Einige Gruppen berichteten über eine Induktion der Gene für die OXPHOS und mitochondriale Biogenese und eine Erhöhung der PGC-1 α -Aktivität durch SIRT1 (Lagouge et al., 2006). Andererseits widersprachen andere der obligaten regulatorischen Rolle von SIRT1 für die PGC-1 α -vermittelte mitochondriale Biogenese im Muskel. Sie zeigten die Herunterregulation von *PGC1 α* und *Tfam*, die aus der Überexpression von *SIRT1* im Muskel resultiert, und die verminderten Spiegel von *SIRT1* durch Hochregulierung von *PGC1 α* in diesem Gewebe (Gurd et al., 2009). SIRT3 aktiviert direkt wichtige Proteine für die OXPHOS, den Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus und die FAO, und beeinflusst indirekt PGC-1 α und Adenosinmonophosphat (AMP)-aktivierte Proteinkinase (AMPK) (Austin and St-Pierre, 2012).

Dennoch ist die aktivierende Wirkung von RSV auf SIRT1 und SIRT3 umstritten. Viele Studien berichteten über die Aktivierung von SIRT1 und SIRT3 durch RSV und ihre strukturell verwandten Verbindungen (Price et al., 2012; Yang et al., 2010). Andere hingegen lehnten RSV und seine Analoga als direkte SIRT1-Aktivatoren ab (Pacholec et al., 2010). In einem Zebrafisch-Modell zeigte RSV keinen Einfluss auf den mRNA-Spiegel von SIRT1 und PGC-1 α und verringerte sogar die Expression der *SIRT3*- und *SIRT4*-Genen (Schirmer et al., 2012).

Mit diesem Hintergrund ist es bedeutsam zu evaluieren, ob die Expression der Schlüsselgene für den Energiestoffwechsel und die mitochondriale Funktion, *SIRT1*, *SIRT3*, *PGC-1 α* , *Nrf1* und *Tfam* durch die gestörte OXPHOS bei

Patienten beeinflusst werden. Während eine Studie eine vergleichbare Expression von *Nrf1* und *Tfam* und eine Hochregulierung von *PGC1 α* und *SIRT3* bei MELAS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen zeigte (Lin et al., 2017), berichtete eine andere Studie über ähnliche Expressionsraten von *PGC1 α* und eine Hochregulierung von *Tfam* bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen (Joseph et al., 2004). Die Auswirkung der gestörten OXPHOS bei Patienten auf die mitochondriale Biogenese bei der PGC-1 α -Kaskade wurde in der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh Scholle et al., 2020a) ebenfalls, wie in Abschnitt 2.1.1. beschrieben, unter Normal- und Stresssituation bei Patienten und Kontrollen untersucht. Dabei wurden die Expression von *SIRT1*, *SIRT3*, *Nrf1*, *PGC1 α* und *Tfam* anhand quantitativer *Real-Time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) auch in Gegenwart von RSV evaluiert (Motlagh Scholle et al., 2020a). Zwischen Patienten und Kontrollen gab es ohne RSV keinen signifikanten Unterschied in der Expression der oben genannten Gene, sowohl unter Normal- als auch unter R-Bedingungen. Jedoch war die Expression von *PGC1 α* bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen unter eingeschränkten Bedingungen mit oder ohne RSV signifikant geringer (Abb.3) (Motlagh Scholle et al., 2020a). Unter R-Bedingungen war die Expression aller obengenannten Gene ohne oder mit RSV im Vergleich zu normalen Kulturbedingungen sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Patienten tendenziell erhöht (Abb. 3) (Motlagh Scholle et al., 2020a). Die erhöhte Expression der untersuchten Gene beim eingeschränkten Zustand könnte auf eine Stimulation der mitochondrialen Biogenese hinweisen. Andererseits waren die respiratorischen Schlüsselparameter unter R-Bedingungen vermindert (Abschnitt 2.1.1.). Die geringere Maximalkapazität könnte entweder aus einer verminderten Substratverfügbarkeit, einer reduzierten mitochondrialen Masse/Integrität oder einem mitophagischen Umsatz unter Stresssituationen resultieren, um eine Akkumulation von zusätzlichen Schäden zu verhindern.

2.1.3. Untersuchung der Effekte von FAs auf die OXPHOS in Myoblasten der Träger der m.3243A>G Mutation

Anlage: **Motlagh Scholle, L.**, Schieffers, H., Al-Robaiy, S., Thaele, A., Lehmann Urban, D., and Zierz, S. (2020b). Palmitate but Not Oleate Exerts a Negative Effect on Oxygen Utilization in Myoblasts of Patients with the m. 3243A> G Mutation: A Pilot Study. *Life* 10, 204

Es ist bekannt, dass die FAO als die Hauptenergiequelle für die Skelettmuskulatur in Situationen, die eine gleichzeitige Einsparung von Glukose und eine größere Energieversorgung erfordern, wie z. B. längeres Fasten oder Sport eine wichtige Rolle spielen. Die Anhäufung von überschüssigen FAs in verschiedenen Geweben, wie der Bauchspeicheldrüse, der Leber und dem Skelettmuskel kann jedoch zu einer zellulären Dysfunktion in diesen Geweben und zum apoptotischen Zelltod führen. Dieser Prozess wird im allgemeinen als "Lipotoxizität" bezeichnet (Henique et al., 2010; Turpin et al., 2006). Die toxischen Wirkungen von FAs scheinen von ihrer Kettenlänge und ihrem Sättigungsgrad abhängig zu sein. Die langkettigen gesättigten FAs, Palmitat (C16:0) und Stearat (C18:0), sind als die am stärksten lipotoxischen bekannt. Im Gegensatz dazu schützen einfach ungesättigte FAs, wie z. B. Oleat (C18:1), vor den oben erwähnten gesättigten FAs-induzierten Toxizität (Coll et al., 2008; Henique et al., 2010). Außerdem verschlimmerten gesättigte FAs die Insulinresistenz, während einfach und mehrfach ungesättigte FAs die Insulinresistenz verbesserten (Riccardi et al., 2004).

Es wurde gezeigt, dass die Erhöhung der Temperatur von 35°C auf 40°C die Entkopplung der Substratoxidation von der Adenosindiphosphat (ADP)-Phosphorylierung induzierte und die Effizienz der Mitochondrien zur Produktion von ATP in Skelettmuskelfasern verringert. Dieser Entkopplungseffekt war für FAs stärker ausgeprägt als für Kohlenhydrate (Tardo-Dino et al., 2019).

In der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh Scholle et al., 2020b) wurde die Auswirkung des Überschusses an freien FAs auf die oxidative Phosphorylierungskapazität in Myoblasten von Patienten mit der m.3243A>G Mutation unter Verwendung eines Seahorse XF96-Analysegerätes untersucht. Zunächst wurde die β -Oxidation als der Hauptweg des Fettsäurekatabolismus in den Mitochondrien von Myoblasten der Kontrollen und Patienten analysiert. Bei

diesen Experimenten wurde Palmitat als Standardsubstrat für die FAO-Messungen und Oleat als Vergleichssubstrat herangezogen. Außerdem wurde die Wirkung einer fiebersimulierenden Temperatur (40°C) auf die β -Oxidation in Zellen mit m.3243A>G Mutation und Kontrollen untersucht. Dabei zeigten die Daten generell ähnliche β -Oxidationsraten bei m.3243A>G-Patienten und Kontrollen. Sowohl Patienten als auch Kontrollen zeigten verminderte Parameter in diesem Stoffwechselweg bei 40°C im Vergleich zu 37°C. ATP-R war bei 40°C im Vergleich zu 37°C sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen auf etwa 35-45% reduziert (Abb. 2)(Motlagh Scholle et al., 2020b). Im nächsten Schritt wurde die mitochondriale Respiration mit einem „Mito-Stress-Test“ bestimmt. Der Unterschied zu den Versuchen vom Abschnitt 2.1.1. war die Behandlung der Zellen mit *bovine serum albumin* (BSA)-konjugierter Palmitat- oder Oleat 16 Stunden vor den Messungen (Verhältnis freie FAs: BSA = 6:1). In einer anderen Studie wurde berichtet, dass die Behandlung von Fibroblasten aus gesunden Kontrollen mit Palmitinsäure für 16 Stunden vor der Messung der Sauerstoff-Verbrauchsrate (*oxygen consumption rate*, OCR)- zu einer signifikanten Erhöhung der MR und SRC um etwa 20% bzw. 45% führt. Ölsäure zeigte in der obenerwähnten Studie keinen Einfluss auf die OCR (Theunissen et al., 2017). In der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh Scholle et al., 2020b) zeigte Oleat im Allgemeinen positive Effekte auf die OXPHOS-Werte. Palmitat dagegen, beeinträchtigte die OCR-Werte negativ. Betrachtet man die Werte, die in Anwesenheit von FA-Überschuss erhalten wurden, schien Oleat einen leicht positiven Effekt auf die respiratorischen Faktoren bei Patienten zu zeigen. Nach Zugabe von Oleat war ATP-R bei den Kontrollen um ca. 30% höher als bei den Werten mit Palmitat. Im Gegensatz dazu war der negative Effekt des Palmitat-Überschusses bei den Patienten signifikant (Abb. 2) (Motlagh Scholle et al., 2020b). Die Anwesenheit von Oleat und Palmitat führt dabei zu unterschiedlichen Effekten bei der Messung von OXPHOS (Mito-Stress-Test) und β -Oxidation. Dieser Unterschied konnte wie folgt erklärt werden: Vor der Durchführung der FAO-Messungen werden die Zellen für 16 Stunden in einem nährstoffarmen Medium kultiviert. Somit sind die Zellen gezwungen, die FAs als einziges vorhandenes Substrat umzusetzen, um überleben zu können. Beim Mito-Stress-Test hingegen haben die Zellen ausreichend Nährstoffe und die zugesetzten FAs (Oleat und Palmitat) gelten als überschüssige Substrate. FAs sind die

Hauptenergiequellen für den Skelettmuskel. Allerdings sollte das Gleichgewicht zwischen Energiebedarf, Aufnahme und Oxidation von FAs reguliert werden. Ein Ungleichgewicht zwischen Fettsäureaufnahme und -oxidation kann zu einer Insulinresistenz führen. Die erhöhten Lipidspiegel könnte die Fähigkeit der Zelle, FAs zu speichern oder zu verwerten, übersteigen und damit zu einer lipotoxischen Reaktion führen, die wiederum die Apoptose-*pathways* aktivieren. Für die β -Oxidation in den Mitochondrien werden sowohl gesättigte als auch ungesättigte LCFAs als Substrat verwendet. Jedoch dienen nur langkettige gesättigte Fettsäure-Acyl-CoAs als Substrate für die *de novo* Ceramid-Synthese, die an der Initiierung der Apoptose beteiligt ist (Brookheart et al., 2009; Zhang et al., 2010). Die Daten bestätigten den berichteten negativen Effekt von Palmitat auf die Atmungsfunktion der Zellen.

Eine Verringerung der Palmitinsäure-, aber nicht der Ölsäureoxidation wurde in Myotuben von Patienten mit Diabetes Typ 2 im Vergleich zu Kontrollen berichtet. Es wurde gezeigt, dass einfach ungesättigte FAs, wie z. B. Ölsäure, metabolisiert und dann in Form von gering toxischem Triacylglycerin (TAG) akkumuliert werden. Eine große Menge an Palmitat hemmt jedoch die TAG-Synthese in der Diacylglycerin (DAG)-Stufe, was zu einer Anhäufung von DAG in der Zelle führt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine Substitution von Palmitat und anderen gesättigten oder ungesättigten freien FAs bei Patienten mit Diabetes Typ 2 empfohlen, um die Akkumulation von DAG und TAG zu reduzieren und keine Insulinresistenz zu fördern (Gaster et al., 2005; Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019; Montell et al., 2001). In der vorliegenden Originalarbeit (Motlagh Scholle et al., 2020b) war der negative Effekt von Palmitat stärker bei m.3243A>G-Patienten ausgeprägt, was zu einer ca. 30%igen Reduktion der ATP-Produktion führte. Die Kontrollen schienen etwas mehr als die Patienten von dem positiven Effekt von Oleat zu profitieren (Motlagh Scholle et al., 2020b), das den Überschuss an gesättigten FAs durch Erhöhung der FA-Oxidation beseitigen und damit einer Entzündung und Insulinresistenz im Skelettmuskel entgegenwirken könnte (Lim et al., 2013).

2.1.4. Korrelation zwischen mtDNA-Kopienzahl und Heteroplasmiegrad mit Phänotyp

Anlage: **Motlagh Scholle, L.**, Zierz, S., Mawrin, C., Wickenhauser, C., and Urban, D.L. (2020c). Heteroplasmy and Copy Number in the Common m. 3243A> G Mutation—A Post-Mortem Genotype–Phenotype Analysis. *Genes* 11, 212.

Mitochondriale Erkrankungen zeigten eine große Variabilität in der phänotypischen Präsentation. Die zugrundeliegende genetische Ursache, die zu einer enormen klinischen Heterogenität im Zusammenhang mit m.3243A>G-assoziierten mitochondrialen Erkrankungen führt, ist wenig geklärt. Die Evaluierung der Abundanz von mtDNA-Molekülen, die Wildtyp- oder pathogene Mutationen tragen, ist wichtig, um den Krankheitsverlauf mitochondrialer Erkrankungen zu verstehen (Grady et al., 2014; Pickett et al., 2018).

Um eine mögliche Korrelation zwischen diesen Aspekten zu finden, wurde in einer Post-Mortem-Analyse das Verhältnis von mtDNA/nukleare DNA (nDNA)-Zahl zu Heteroplasmiegrad in 30 Gewebeproben einer 46-jährigen Frau (Nicht-MELAS-Phänotyp), darunter 14 Proben des Zentralnervensystems untersucht. Dabei kam die PCR/Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse auf allelspezifischem Restriktionsverdau für die quantitative Mutationsanalyse zur Anwendung. Außerdem wurden die relative mtDNA-Kopienzahl durch qPCR unter Verwendung von Singleplex-Taqman-Assays bestimmt, die auf das mitochondriale MT-ND1-Gen (Hs02596873) und auf ein einzelnes Housekeeping Gen (18 S ribosomale-5-RNA (18S5, Hs03928990)) genormt wurden (Motlagh Scholle et al., 2020c). Des Weiteren wurden die gewonnenen Ergebnisse zusammen mit Daten aus weiteren 15 Fällen mit m.3243A>G Mutation aus der Literatur hinsichtlich Genotyp-Phänotyp verglichen.

Bei der in dieser Studie vorgestellten Patientin korrelierten höhere Heteroplasmiegrade mit niedrigeren mtDNA-Kopienzahlen (Abb. 4), signifikant ($p < 0,05$) jedoch nur in Proben des Zentralnervensystems (Abb. 1) (Motlagh Scholle et al., 2020c). Die absoluten Konzentrationen an Wildtyp-mtDNA wurden als wichtiger Indikator für pathologische Manifestationen genannt (Filograna et al., 2019). Basierend auf dieser Annahme wurde eine selektive Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl durch Gen- oder pharmakologische Therapie als mögliche

Behandlungsmethode für menschliche mtDNA-Mutationskrankheiten vorgeschlagen.

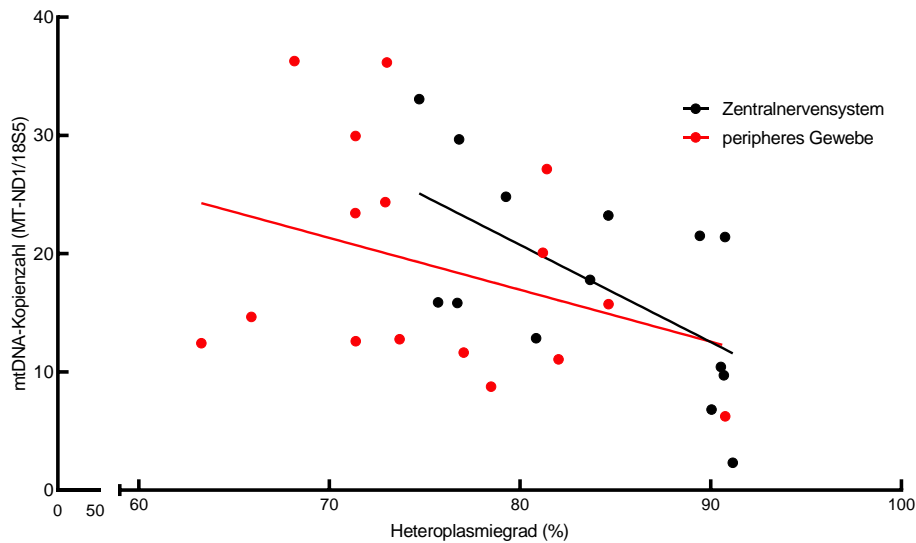


Abbildung 4. Korrelation der Heteroplasmiegrade (%) und der mtDNA-Kopienzahl (MT-ND1/18S5). Sowohl in den Proben des zentralen Nervensystems als auch in den peripheren Geweben des Fallberichtspatienten korrelierte ein höherer Heteroplasmiegrad mit einer niedrigeren mtDNA-Kopienzahl, jedoch nur signifikant in den Proben des zentralen Nervensystems ($p < 0,05$).

Interessanterweise wurden bei der vorgestellten Patientin in allen analysierten Proben des Zentralnervensystems $>75\%$ Heteroplasmaspiegel festgestellt, ohne dass ein MELAS-Phänotyp auftrat. Dies zeigt, dass hohe Heteroplasmiawerte in Geweben nicht automatisch zu einem bestimmten Phänotyp führen. Außerdem zeigte die Korrelation der Heteroplasmiegrade (%) von Herz, Gehirn und Skelett bei klinisch erkrankten und nicht erkrankten Patienten keinen signifikanten Unterschied der Heteroplasmiegrade (Abb. 4) (Motlagh Scholle et al., 2020c). Fehlende signifikante Differenzen der Heteroplasmiawerte bei symptomatischen und nichtsymptomatischen Patienten in der vorgestellten Arbeit geben einen Hinweis auf zusätzliche Faktoren neben der Anzahl der mtDNA-Kopien und nukleären Faktoren, die den Schweregrad der Erkrankung beeinflussen können (Grady et al., 2018; Pickett et al., 2018).

2.2. Biochemische Charakterisierung der Variante S113L des humanen CPT II-Enzyms

2.2.1. Aktivität und Thermostabilität der CPT II-Enzyme

Anlage: **Motlagh, L.**, Golbik, R., Sippl, W., and Zierz, S. (2016b). Stabilization of the thermolabile variant S113L of carnitine palmitoyltransferase II. *Neurol Genet* 2, e53.

Die milde adulte muskuläre Form des CPT II-Mangels gilt als der häufigste Defekt des Lipidstoffwechsels im Skelettmuskel. Die S113L-Mutation wurde bei etwa 90% dieser Patienten auf mindestens einem Allel mit einer Allelfrequenz von ca. 75% gefunden. Die Symptome der Patienten mit S113L-Mutation bestehen in der Regel aus wiederkehrenden Anfällen von Myalgie und Muskelschwäche, die zu Myoglobinurie führen, was wiederum zu Nierenversagen führen kann. Anfälle von Myoglobinurie bei CPT II-Mangel werden in der Regel durch Fieber, Infektionen, Fasten, anhaltende körperliche Belastung und Kälteeinwirkung provoziert (Joshi et al., 2014; McGarry and Brown, 1997). In früheren Studien variierte die CPT-Aktivität in Muskeln von Patienten mit CPT II-Mangel von nicht nachweisbar (Bank et al., 1975; DiMauro and DiMauro, 1973; Patten et al., 1979) über reduziert (Angelini et al., 1981; Hostetler et al., 1978; Taroni et al., 1992) bis hin zu normal (Vladutiu et al., 1992; Zierz and Engel, 1985).

Obwohl die reduzierte Enzymaktivität als Ursache für die Probleme der Patienten mit CPT II-Mangel vorgeschlagen wurde (Fanin et al., 2012; Olpin et al., 2003), zeigen die Patienten zwischen den Attacken jedoch keine Myalgien und Muskelschwäche (Motlagh and Zierz, 2014). Dies kann gegen den Verdacht eines permanenten Enzymmangels sprechen. Daher wurde in der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh et al., 2016b) die Aktivität und die kinetische Stabilität der humanen CPT II in der Wildtyp-Form (His₆-N-*h*CPT2) und in der Variante S113L (His₆-N-*h*CPT2/S113L) der rekombinant hergestellten Enzyme untersucht (Motlagh et al., 2016b). Zu diesem Zweck wurde die CPT II-Aktivität spektrophotometrisch nach Rufer et al. (Rufer et al., 2006) mit einigen Modifikationen bei 25°C bestimmt. Der Assay basiert auf der Reduktion von 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure, DTNB) durch CoA-SH und der anschließenden Bildung von 5-Mercapto-2-Nitrobenzoesäure, die bei 410 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 13.600 M⁻¹ cm⁻¹ absorbiert. Die Bildung von CoA-SH

wurde durch Zugabe von CPT II zum Reaktionsansatz, der L-Carnitin und Palmitoyl-CoA enthält, ausgelöst. Dabei waren die enzymatischen Aktivitäten des rekombinanten Wildtyps und der Variante S113L ähnlich. Dies zeigt, dass die Hypothese einer reduzierten Enzymaktivität (Defizient) hervorgerufen durch die S113L Aminosäuresubstitution nicht mehr aufrechterhalten werden kann.

Eine geringere Temperaturbeständigkeit des mutierten CPT II in kultivierten Fibroblasten wurde berichtet (Olpin et al., 2003). Die Thermoinstabilität der Variante S113L konnte ebenfalls in der vorliegenden Originalarbeit (Motlagh et al., 2016b) bestätigt werden (Abb. 5). Während beide Enzyme bei 30°C die gleiche thermische Stabilität aufwiesen; führte die Inkubation der Enzyme bei 40°C und bei 45°C jeweils zu einer deutlich schnelleren Inaktivierung des mutierten Enzyms im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2) (Motlagh et al., 2016b).

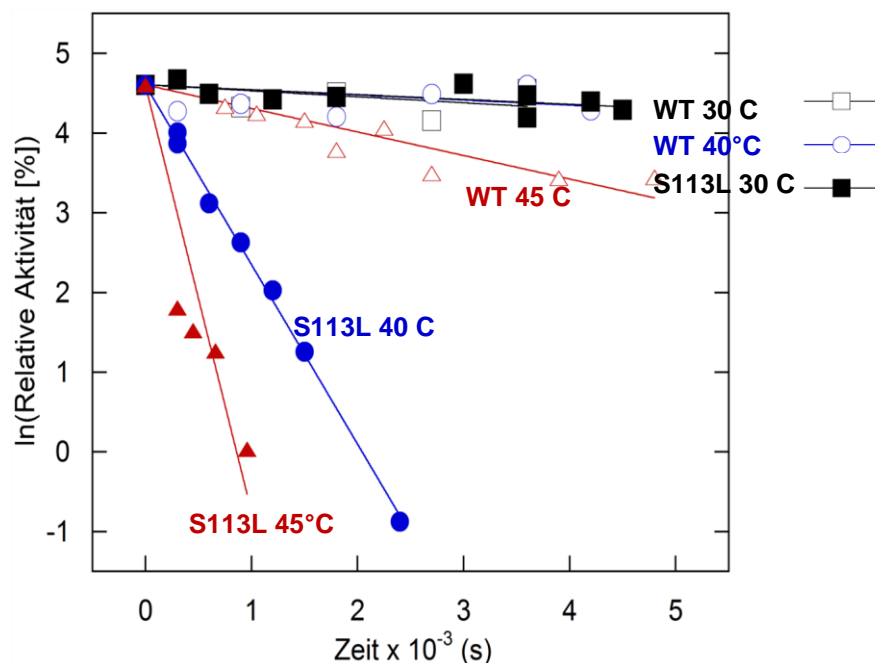


Abbildung 5. Logarithmische Darstellung der zeitabhängigen Veränderung der relativen Aktivität der CPT II-Enzyme bei verschiedenen Temperaturen. Schwarze Quadrate, blaue Kreise und rote Dreiecke repräsentieren Werte bei 30°C, 40°C bzw. 45°C. Offene Symbole repräsentieren den rekombinanten CPT II-Wildtyp (WT) und die geschlossenen zeigen die Variante (S113L).

Der Stabilitätsunterschied zwischen Wildtyp und der Variante bei höheren Temperaturen könnte eine Erklärung für das klinische Bild der Patienten sein. Es ist dabei zu beachten, dass alle die obengenannten Auslösefaktoren für Attacken

in Patienten mit CPT II-Mangel außer Fasten in irgendeiner Weise mit einer veränderten thermischen Stabilität des mutierten Enzyms zusammenhängen. Es könnte sogar spekuliert werden, dass auch die Exposition gegenüber Kälte Symptome provozieren könnte, wahrscheinlich wegen der erhöhten intramuskulären Temperatur aufgrund der kompensatorischen mitochondrialen Wärmeproduktion. Dies basiert auf der Beobachtung, dass Kälteexposition die Thermogenese durch erhöhte mitochondriale Stoffwechselrate und erhöhten Gesamtenergieverbrauch nicht nur im braunen Fettgewebe, sondern auch im Skelettmuskel von Nagetieren und Menschen sowie im Vogelplasma stimuliert (Lim et al., 2012; Stier et al., 2014; van den Berg et al., 2011).

Die thermische Instabilität der Variante S113L konnte ebenfalls anhand molekulardynamischer (MD)-Simulationen bestätigt werden. Diese Untersuchungen wurden unter Verwendung des generierten Homologie-Modells der humanem CPT II bei 4°C (277 K), 20°C (293 K), und 40°C (313 K) durchgeführt. Zum Erstellen eines Homologie-Modells der humanen CPT II wurde die bereits bekannte Kristallstruktur der Ratten-CPT II (PDB-Code 2DEB) (Rufer et al., 2006) als Vorlage benutzt. Die Berechnungen in diesen Studien für die S113L-Variante haben bei 40°C eine deutlich höhere Fluktuation für die benachbarten Reste der Mutationsstelle gezeigt im Vergleich zu 4°C. Dabei war der Unterschied zwischen 4°C und 20°C geringer. Hingegen zeigten die Ergebnisse für den Wildtyp keine nennenswerten Unterschiede bei den 3 untersuchten Temperaturen (Abb. 3A) (Motlagh et al., 2016b). Die Hydroxylgruppe von S113 kann mehrere H-Bindungs-Wechselwirkungen ausbilden. Dazu gehören eine wasservermittelte H-Bindung mit R498, wie sie im Homologie-Modell gefunden wurde, oder eine H-Bindungswechselwirkung mit der Rückgrat-Carbonylgruppe von H496 (Abb. 3B) (Motlagh et al., 2016b). Der Grund für die Instabilität der Variante S113L könnte die fehlende Möglichkeit für L113 sein, diese H-Bindungen zu bilden. Dies könnte wiederum insbesondere an den Resten, die der Mutationsstelle benachbart sind, die Konformationsänderungen induzieren.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden der normalen Aktivität und Stabilität der Variante bei Körpertemperatur. Der auf den Muskel beschränkte Phänotyp der S113L-Mutation ohne Beteiligung anderer Organe

zeigt, dass ein mutiertes Enzym *in vivo* in verschiedenen Geweben unterschiedlich vertreten sein und funktionieren kann.

2.2.2. Der Effekt von natürlichen Substraten auf Stabilität des Enzyms

Anlage: **Motlagh, L.**, Golbik, R., Sippl, W., and Zierz, S. (2016b). Stabilization of the thermolabile variant S113L of carnitine palmitoyltransferase II. *Neurol Genet* 2, e53.

Die natürlichen Substrate der CPT II zeigten unterschiedliche Effekte auf die Enzymstabilität. Während die Präinkubation der Enzyme mit L-Carnitin und Acyl-L-Carnitinen mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen in der Acylseitenkette das mutierte Enzym gegen thermische Inaktivierung stabilisierte, destabilisierte Palmitoyl-CoA beide Enzyme. Die Präinkubation der Enzyme mit dem nativen Substrat Palmitoyl-CoA bei 40°C vor der Zugabe von L-Carnitin erhöhte die thermische Inaktivierungsrate von CPT II. Diese Inaktivierung war für die Variante stärker ausgeprägt als für den Wildtyp (Abb. 4) (Motlagh Scholle et al., 2020a). Der Mechanismus dieses destabilisierenden Effekts und seine pathophysiologischen Auswirkungen bleiben ungeklärt.

Sowohl der Wildtyp als auch das mutierte rekombinante Enzym zeigten eine deutlich höhere kinetische Stabilität bei Vorinkubation mit L-Carnitin bei 45°C. Die mittelkettigen Acyl-L-Carnitine C10, C12 und C14 sowie das langkettige C16 stabilisierten das mutierte Enzym auf dem Niveau des Wildtyps bei 45°C. Die Inaktivierungsrate der Variante wurde dabei um einen Faktor von 150 kleiner. Bei 40°C verringerten die Acyl-L-Carnitine C10, C12, C14 und C16 die Inaktivierungsratenkonstante der Variante und des Wildtyps um einen Faktor von etwa 1.000 bzw. 25. Dabei zeigte das mutierte Enzym bei 40°C eine sehr ähnliche kinetische Stabilität wie der Wildtyp in Gegenwart dieser Acyl-L-Carnitine. (Abb. 4) (Motlagh et al., 2016b). MD-Studien an CPT II im Komplex mit Palmitoyl-L-Carnitin (C16) zeigten ein ähnliches Verhalten des Wildtyps und der Variante S113L in Bezug auf die Temperatur. Bei diesen Untersuchungen konnte bei höherer Temperatur (313 K, 40°C) in Verbindung zu C16 kein Anstieg des B-Faktors (als Indikator der Flexibilität des Rückgrats) für die Reste der Mutante, die die Mutationsstelle umgeben, festgestellt werden (Abb. 3C) (Motlagh et al., 2016b). Generell war bei 40°C die Flexibilität des gesamten Proteins (Abb. e-1)

(Motlagh et al., 2016b) für den Komplex der Variante S113L mit Palmitoyl-L-Carnitin geringer als für das Protein ohne Substrat. Eine mögliche Erklärung für diese Stabilisierung durch Acyl-L-Carnitine könnte die Bildung eines stabilisierten binären Komplexes nach Präinkubation mit diesen nativen Substraten sein. Es wurde gezeigt, dass die Verabreichung eines Bolus mittelkettiger FAs kurz vor intensivem Training Anfälle von Myoglobinurie bei CPT II-Mangel verhindern kann (Tucci et al., 2010). Erhöhte mittelkettige Acyl-CoA-Spiegel könnten zu einem Anstieg der mittelkettigen Acyl-L-Carnitine führen. Unter Berücksichtigung der Daten der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh et al., 2016b) trägt dies nicht nur zur Bereitstellung der benötigten Energie bei, sondern auch zur Stabilisierung dieses essentiellen Enzyms gegen Inaktivierung.

Interessanterweise zeigte Palmitoyl-L-Carnitin nicht nur eine stabilisierende Wirkung auf CPT II-Aktivität, sondern auch eine progressiv hemmende Wirkung darauf. Im Gegensatz zu der Stabilisierung durch Präinkubation des Enzyms mit Acyl (Palmitoyl)-L-Carnitin, wurde dieser hemmende Effekt nur dann beobachtet, wenn das Enzym gleichzeitig den Substraten Palmitoyl-CoA, Palmitoyl-L-Carnitin und L-Carnitin ausgesetzt war (Motlagh et al., 2016b). Die Bildung eines stabilisierten binären Komplexes des Apoenzyms von CPT II mit Acyl (Palmitoyl)-L-Carnitin könnte durch diese gleichzeitige Exposition verhindert werden. Unter dieser Bedingung, beeinträchtigt Acyl (Palmitoyl)-L-Carnitin den enzymatischen Umsatz durch Produkthemmung. Beide Effekte (Hemmung und Stabilisierung des Enzyms) durch Palmitoyl-L-Carnitin waren bei der S113L-Variante ausgeprägter als für den Wildtyp.

Fasten ist ein weiterer Triggerfaktor für Attacken bei CPT II-Patienten. Es ist durch eine Abnahme des freien L-Carnitins und einen Anstieg des Acyl-L-Carnitin-Spiegels im Plasma gekennzeichnet (Frohlich et al., 1978; Hoppel and Genuth, 1980). In der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh et al., 2016b) konnte die gleichzeitige Zugabe von Palmitoyl-L-Carnitin zum Assay diesen Effekt imitieren. Die Präinkubation von mittel- und langkettigen Acyl-L-Carnitinen vor dem Start des Assays führte jedoch zu einer Stabilisierung des Enzyms gegen thermische Inaktivierung. Acyl-L-Carnitine können also *in vitro* beide Effekte (Stabilisierung und Hemmung) ausüben. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass *in vivo* das Zeitprofil der Änderungen der Substratkonzentration

bestimmen könnte, welcher der beiden Effekte überwiegt. Im Serum von CPT II-defizienten Patienten ist die Konzentration der langkettigen Acyl-L-Carnitine auch zwischen den Anfällen persistent erhöht. Dies kann als Marker für die Diagnose dieser Enzymstörung verwendet werden (Gempel et al., 2002). Allerdings könnte dies auch den stabilisierenden Effekt in den meisten physiologisch relevanten Situationen ausüben. So könnten die Attacken nur dann auftreten, wenn dieser Mechanismus in Extremsituationen, wie z. B. bei starkem Fieber oder unter extremen Ernährungsbedingungen mit raschem Anstieg der Palmitoyl-L-Carnitin-Konzentration (Inhibitionseffekt) entgegengewirkt wird. Beide Aspekte könnten das seltene Auftreten von Attacken erklären, die bei Patienten mit S113L-Mutation im *CPT2*-Gen auftreten.

2.2.3. Der Regulierung von CPT II durch Malonyl-CoA

Anlage: **Motlagh, L., Golbik, R., Sippl, W., and Zierz, S. (2016a)**. Malonyl-CoA inhibits the S113L variant of carnitine-palmitoyltransferase II. *Biochim Biophys Acta* 1861, 34-40.

Der Transport von FAs durch CPT-System wird stark durch Malonyl-CoA reguliert. Im Gegensatz zu CPT I gilt CPT II als unempfindlich gegenüber Malonyl-CoA. In der klinischen Praxis wird die Diagnose eines CPT II-Mangels im Muskel durch Messung der Gesamt-CPT-Aktivität (d. h. CPT I + CPT II) im Muskelhomogenat mit und ohne gleichzeitige Inkubation von Malonyl-CoA im Assay gestellt. Während die erfasste Gesamtaktivität bei Patienten mit CPT II-Mangel im Normbereich liegt, zeigen die Patienten in Gegenwart von Malonyl-CoA in der Regel einen fast vollständigen Verlust der Gesamt-CPT-Aktivität (Motlagh and Zierz, 2014). Dieses Ergebnis wurde als Verlust von enzymatisch aktivem und Malonyl-CoA-unempfindlichem CPT II interpretiert (Demaugre et al., 1988; Taroni et al., 1992). Alternativ wurde postuliert, dass ein Verlust der Gesamt-CPT-Aktivität in Anwesenheit von Malonyl-CoA auf eine abnorme Hemmung der CPT II-Variante durch den Metaboliten zurückzuführen sein könnte (Zierz and Engel, 1985). In der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh et al., 2016a) wurde die hemmende Wirkung von Malonyl-CoA und Malonsäure (Malonat) auf CPT II für die rekombinanten Enzyme His₆-N-*hCPT2* (Wildtyp) und His₆-N-*hCPT2/S113L* (Variante) untersucht. Sowohl der Wildtyp als auch die

Variante S113L der CPT II zeigten keinen signifikanten Aktivitätsverlust bei gleichzeitiger Inkubation mit den nativen Substraten und Malonyl-CoA in unterschiedlichen Konzentrationen. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine zeitabhängige Hemmung der Enzyme durch Malonyl-CoA bzw. Malonsäure stattfindet. Zu diesem Zweck wurden den rekombinanten Enzymen vor der Aktivitätsmessung verschiedene Konzentrationen von Malonyl-CoA oder Malonsäure (Malonat) zugesetzt und bei 30°C inkubiert. Die Präinkubation der Enzyme mit Malonyl-CoA führte zu einer inhibitorischen Wirkung des Metaboliten. Während der Wildtyp im Gegenwart von Malonyl-CoA eine restliche Endaktivität von etwa 70% aufwies, sank diese bei der Variante S113L auf 40% oder 5% im Gegenwart von Malonyl-CoA bzw. Malonsäure (Malonat) (Abb. 1A-B) (Motlagh et al., 2016a). Außerdem verlief die Hemmung der Variante durch Inhibitoren etwas schneller als beim Wildtyp.

Um die Reversibilität der inhibitorischen Wirkung von Malonyl-CoA oder Malonsäure (Malonat) zu beurteilen, wurden die rekombinanten Enzyme zunächst wie oben beschrieben mit den Effektoren Malonyl-CoA oder Malonsäure (Malonat) präinkubiert. In einem zusätzlichen modifizierten Assay wurde jedoch Palmitoyl-CoA als natives Substrat ca. 60 Sekunden nach der Initiierung (Post-Inkubation) separat zugegeben. Die Kontrollmessungen wurden mit dem modifizierten Assay (Post-Inkubation) in Abwesenheit von Effektoren durchgeführt. Dabei konnte die Aktivität der Wildtyp-CPT II durch Palmitoyl-CoA als natives Substrat wiederhergestellt wurde, was auf einen Substratschutz-Effekt hinweist. Die enzymatische Aktivität der Variante S113L konnte hingegen nicht wiederhergestellt werden.

Es gibt mindestens drei gewebespezifische Isoformen von CPT I, nämlich die Muskel-Isoform (M-CPT I), die Leber-Isoform (L-CPT I) und die Gehirn-Isoform (B-CPT I). Im Vergleich zu den beiden anderen Isoformen ist M-CPT I empfindlicher gegenüber der Hemmung durch Malonyl-CoA (Lavrentyev et al., 2004; McGARRY et al., 1983). Der Grund für diesen Unterschied ist unklar. Die Kristallstruktur von CPT I ist noch unbekannt. Mit Hilfe eines Strukturmodells von L-CPT I wurden zwei Malonyl-CoA-Bindungsstellen gefunden. Diese beiden Stellen teilen sich die Carnitin-Bindungsstelle (López-Viñas et al., 2007). Die Ergebnisse der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh et al., 2016a) zeigt ähnliche

Bindungsstellen auch für CPT II. Ähnlich wie bei CPT I (Zammit, 1984) wurden beide CPT II Enzyme (Wildtyp und die Variante S113L) eine zeitabhängige Hemmung durch Malonyl-CoA identifiziert. Dies könnte erklären, warum Assays, die innerhalb einer kurzen Reaktionszeit (2 min) mit gleichzeitiger Zugabe von Malonyl-CoA und den nativen Substraten ablaufen, keine Hemmung zeigten, während eine Präinkubation mit Malonyl-CoA CPT II hemmte (Motlagh et al., 2016a).

Anschließend wurde versucht, die Wirkung der Inhibitoren auf die CPT II-Enzyme anhand molekularen Dockingstudien zu erklären. Dafür wurde das humane CPT II-Homologie-Modell für molekulare Dockingstudien verwendet. Ein Modell der Bindung von Malonyl-CoA und Malonat an humane CPT II wurde durch Dockingstudien vorgeschlagen. Sowohl das Homologie-Modell der humanem CPT II (Abb. 2) (Motlagh et al., 2016a) als auch die Röntgen Struktur von Ratten-CPT II (Rufer et al., 2006) zeigen einen Y-förmigen Tunnel, bestehend aus Bindungsstellen für die Acyl-, L-Carnitin- und CoA-Einheit. Malonyl-CoA konnte an zwei Stellen; Acyl-L-Carnitin-Stelle (I) und CoA-Stelle (II) andockt werden (Abb. 3A-C) (Motlagh et al., 2016a). In beiden Komplexen zeigte die Carboxylatgruppe günstige Wechselwirkungen mit polaren Resten der Bindungstasche. Bei einer Bindung von Malonyl-CoA an die CoA-Stelle konnte L-Carnitin immer noch an seine ursprüngliche Bindungsstelle binden (Abb. 3C) (Motlagh et al., 2016a). Die Bindung von Malonyl-CoA an eine dieser inhibitorischen Stellen, oder an beide, könnte die Bindung von L-Carnitin verhindern und damit das Enzym hemmen.

Die Aminosäure S113 befindet sich am Aminoterminus der α -Helix in der Nähe der Interface-Domäne (Isackson et al., 2006; Rufer et al., 2006), die etwa 12 Å von der Bindungsstelle von L-Carnitin entfernt ist (Abb. 3A-C) (Motlagh et al., 2016a). Somit ist ein direkter Effekt der Mutation S113L auf die Architektur der Bindungstasche unwahrscheinlich. Die Mutation von S113 zu der hydrophoberen Aminosäure Leucin verändert die Interaktion mit der benachbarten F117. Diese Änderung kann sich auch auf die Lage und Position der katalytisch wichtigen Reste, wie W116, Y486 und S488, auswirken. W116 bildet zusammen mit Y486, S488 und einem konservierten Wassermolekül ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk in der L-Carnitin-Bindungstasche. Die Wechselwirkung mit der

Carboxylat Gruppe von Malonyl-CoA und Malonsäure (Malonat) mit Y486, S488 und Wasser 88 (w88) ist stark und wird durch den S113L-Aminosäureaustausch nicht beeinträchtigt. Die Affinität für die nativen Substrate L-Carnitin und Acyl-L-Carnitine könnte jedoch aufgrund von Konformationsänderungen dieser Reste vermindert sein. Infolgedessen kann L-Carnitin nicht vollständig Malonyl-CoA oder Malonsäure (Malonat) ersetzen. Auf diese Weise können Malonyl-CoA bzw. Malonsäure (Malonat) das mutierte Enzym stärker als den Wildtyp hemmen. Die unvollständige Wiederherstellung der Aktivität der gehemmten Variante S113L im Gegensatz zum Wildtyp durch Nachinkubation von Palmitoyl-CoA könnte ebenfalls auf diese Weise erklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Originalarbeit (Motlagh et al., 2016a) zeigen deutlich, dass nicht nur CPT I sondern auch CPT II durch Malonyl-CoA gehemmt wird. Diese Hemmung ist jedoch für die Variante S113L der CPT II deutlich stärker ausgeprägt als für die des Wildtyps. Dies ist konsistent mit der zuvor vorgeschlagenen Hypothese (Zierz and Engel, 1985; Zierz and Engel, 1987) bezüglich der abnormen Empfindlichkeit der Enzymvariante durch Malonyl-CoA.

2.2.4. Der Einfluss von Cardiolipin auf Aktivität der CPT II-Enzyme

Motlagh Scholle, L., Thaele, A., Beckers, M., Meinhardt, B., and Zierz, S. (2018). Lack of activation of the S113L variant of carnitine palmitoyltransferase II by cardiolipin. *J Bioenerg Biomembr* 50, 461-466.

Es wurde über einen starken Zusammenhang zwischen Cardiolipin und anderen mitochondrialen Membranphospholipiden mit CPT II berichtet (Kashfi et al., 2011). Es wurde vorgeschlagen, dass eine hydrophobe Stelle von CPT für die Verankerung des Enzyms in der mitochondrialen Membran und seine Bindung von Phospholipiden und Palmitoyl-CoA wichtig sein könnte (Woldegiorgis et al., 1985). Über einen Aktivierungseffekt von Cardiolipin auf CPT I und CPT II wird allerdings diskutiert. Es wurde gezeigt, dass das an die innere Membran gebundene rekombinante CPT II Rattenenzym durch die Zugabe von Cardiolipin fast 4-fach aktiviert wird (Kashfi et al., 2011). Der Cardiolipin-Anteil in Schweineherz-Mitochondrien wurde mit 25,4% in der inneren Membran, aber nur mit 0,4% in der äußeren Membran angegeben (Comte et al., 1976). Dennoch wird das mit der Außenmembran assoziierte CPT I auch in isolierten

Rattenmitochondrien durch Cardiolipin 4-fach aktiviert. Allerdings gibt es auch Berichte über nur einen sehr geringen positiven Effekt von Cardiolipin auf die CPT I-Aktivität (Mynatt et al., 1994). Dies könnte durch die Lokalisation von CPT I an Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Membran erklärt werden (Fraser et al., 2001). Es wurde ebenfalls über eine Erhöhung der Hemmung von CPT durch Malonyl-CoA Mitochondrien von Ratte und Schwein in Gegenwart von Cardiolipin berichtet (Mynatt et al., 1994).

In der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh Scholle et al., 2018b) wurde die Wirkung von Cardiolipin auf die Aktivität von rekombinant hergestellten humanem CPT II und seiner Variante S113L charakterisiert. Für diesen Zweck wurden die rekombinanten CPT II-Enzyme mit 0,25 mM oder 0,5 mM Cardiolipin bei 30°C, 37°C, 40°C oder 42°C präinkubiert. Dabei zeigte Cardiolipin unterschiedliche Effekte auf den Wildtyp und die Variante. Während Cardiolipin bei 30°C zu einer etwa 160%igen bzw. 175%igen Erhöhung der CPT II-Wildtyp-Aktivität führte, zeigte es bei der Variante S113L keinen Effekt. Bei 40°C und 42°C führte Cardiolipin jedoch zu einem Aktivitätsverlust des Wildtyps. Der Inaktivierungseffekt durch Cardiolipin war bei der Variante bereits ab 37°C zu messen. Cardiolipin führte dabei zu einer schnelleren und stärkeren Inaktivierung der Variante S113 L als des Wildtyps (Abb. 1) (Motlagh Scholle et al., 2018b). Es könnte spekuliert werden, dass die temperaturabhängige Wirkung von Cardiolipin auf CPT II mit der temperaturinduzierten erhöhten Membranfluidität zusammenhängen könnte.

Die Konformationsänderungen des Enzyms und der Membran bei höheren Temperaturen könnten die Bindung von Cardiolipin an anderen Stellen als unter physiologischen Bedingungen erleichtern. Die Bindung von Cardiolipin im aktiven Zentrum oder anderen funktionellen Stellen, die für die Substratbindung wichtig sind, könnte die Bindung des eigentlichen Substrats Palmitoyl-CoA oder Carnitin verändern oder verhindern.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von Cardiolipin auf die Hemmung von CPT II durch Malonyl-CoA untersucht. Dafür wurde in anderen Versuchsreihen CPT II mit 0,5 mM Cardiolipin und verschiedenen Konzentrationen von Malonyl-CoA bei 30°C präinkubiert und die Enzymaktivitäten nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Die gleichzeitige Präinkubation des Wildtyps mit

0,5 mM Cardiolipin und 200 μ M Malonyl-CoA bei 30°C wirkte dem Aktivierungseffekt von Cardiolipin entgegen. Dabei wurde bei 30°C eine Verringerung des Aktivierungseffekts von Cardiolipin von 160% mit nur Cardiolipin auf etwa 110% nach der gleichzeitige Präinkubation des Wildtyps mit 0,5 mM Cardiolipin und 400 μ M Malonyl-CoA beobachtet (Abb. 3) (Motlagh Scholle et al., 2018b). Bei der Variante hingegen reduzierte Cardiolipin die Hemmung durch Malonyl-CoA. Die verbleibenden Aktivitäten der Variante nach Hemmung durch 200 μ M Malonyl-CoA betragen etwa 80% bzw. 50% der ursprünglichen Aktivität des Enzyms mit und ohne 0,5 mM Cardiolipin (Abb. 2)(Motlagh Scholle et al., 2018b). Somit scheinen sich Cardiolipin und Malonyl-CoA also gegenseitig in ihrer Wirkung auf die CPT II-Enzyme entgegenzuwirken. Malonyl-CoA wurde als ein eng bindender oder sogar irreversibler Inhibitor der Variante S113L identifiziert (Motlagh et al., 2016a). Die vorliegende Studie zeigt, dass Cardiolipin die Bindung des Inhibitors Malonyl-CoA an die Variante reduziert.

Die unterschiedlichen Effekte von Cardiolipin auf den Wildtyp CPT II und die Variante könnten darauf hinweisen, dass das mutierte Enzym nicht nur abnormal durch Substrate und Malonyl-CoA reguliert wird, sondern auch eine abnorme Interaktion mit seiner Phospholipid Umgebung aufweist.

2.2.5. FGF-21-Serumspiegel in Patienten mit CPT II-Mangel

Motlagh Scholle, L., Lehmann, D., Joshi, P.R., and Zierz, S. (2019). Normal FGF-21-Serum Levels in Patients with Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) Deficiency. *Int J Mol Sci* 20.

Eine starke Erhöhung der mRNA- und Proteinspiegel von FGF-21 in Skelettmuskeln von Patienten mit mitochondrialer Myopathie wurde berichtet (Ji et al., 2015). Die FGF-21-Konzentration im Serum der Trägern der m.3243A.G Mutation korrelierte jedoch nur leicht mit dem Schweregrad der Erkrankung und nicht mit dem Fortschreiten der Krankheit (Koene et al., 2014).

Ein signifikanter Anstieg der mtDNA-Kopienzahl nach Behandlung von C₂C₁₂-Myoblasten mit FGF-21 wurde berichtet. Zusätzlich stieg die Expression der kodierenden Gene für *CPT1A*- und *CPT2*, sowie die Aktivität der Zitratsynthese

in diesen Zellen. Die erhöhte FGF-21-Konzentration im Serum könnte eine kompensatorische Reaktion infolge der gestörten FAO sein (Ji et al., 2015; Lee et al., 2017; Vandanmagsar et al., 2016). Die erhöhte Zitratsynthase-Aktivität in den Muskeln der Patienten könnte auf ein vergrößertes mitochondriales Kompartiment hinweisen, dass die funktionelle Beeinträchtigung bei CPT II-Mangel kompensiert (Larsen et al., 2012; Lehmann and Zierz, 2014; Molina et al., 2016).

Die *CPT1* Knockout Mäuse (*Cpt1b^{m-/-}*) zeigten sowohl im gefütterten als auch im nüchternen Zustand signifikant erhöhte Konzentrationen von FGF-21 im Serum. Die mRNA-Expression von FGF-21 war in mehreren Muskeln dieser CPT I-defizienten Mäuse hochreguliert (Vandanmagsar et al., 2016).

Bei Mäusen mit leberspezifischem Knockout von *CPT2* (*Cpt2^{L-/-}*) wurden erhöhte mRNA-Expressionen der Gene *GDF15* und *FGF21* sowie erhöhte Konzentrationen von FGF-21 und *Growth/Differentiation factor* (GDF)-15 im Serum nach fettreicher Fütterung festgestellt (Lee et al., 2017; Lee et al., 2016). Bei einer anderen Gruppe von Mäusen mit einem fettspezifischen Knockout von *CPT2* (*CPT2^{A-/-}*) (Lee et al., 2015) wurde eine erhöhte Expression der mRNA von *FGF21* im braunen Fettgewebe (BAT) nach Kälteexposition gezeigt (Gonzalez-Hurtado et al., 2018). Basierend auf diesen Daten könnte auch ein höherer FGF-21-Serumspiegel bei CPT II-defizienten Patienten erwartet werden. Bisher gab es keine Studien zu FGF-21-Serumspiegeln bei CPT II-defizienten Patienten. In der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh Scholle et al., 2019) wurde die FGF-21-Serumkonzentration in Proben von 13 Patienten mit einer genetisch bestätigten Diagnose eines CPT II-Mangels und 50 gesunde Kontrollen ohne klinische oder molekulare Hinweise auf eine mitochondriale Störung mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) bestimmt. Die Proben der Patienten wurden während asymptomatischer Intervalle gewonnen (Motlagh Scholle et al., 2019). Die *Cut-off*-Konzentration von FGF-21 für normale Kontrollen wurde basierend auf den Ergebnissen des 95. Perzentils der

Kontrollen auf 190 pg/mL festgelegt. Keiner der 13 CPT II-Patienten hatte erhöhte FGF-21-Serumkonzentrationen (Abb. 1) (Motlagh Scholle et al., 2019).

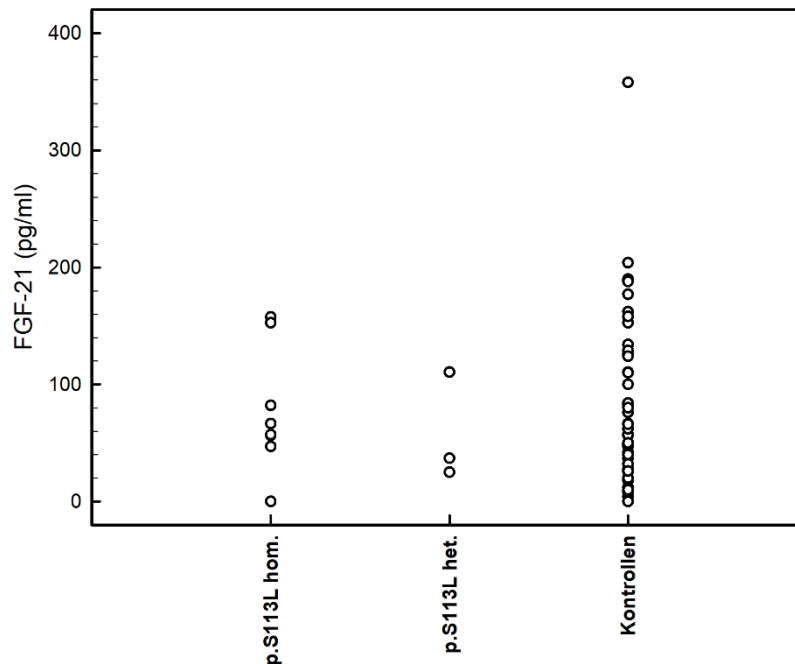


Abbildung 6. FGF-21-Serumkonzentration in Kontrollen und Patienten mit Carnitin-Palmitoyltransferase II(CPT II)-Mangel. p.S113L hom.: Patienten homozygot für die häufige S113L-Mutation; p.S113L het.: Patienten mit S113L auf einem Allel und einer anderen Mutation auf dem anderen Allel.

Bei der Interpretation der Ergebnisse (Abb. 6) ist zu beachten, dass es im Gegensatz zu Knockout-Modellen bei Patienten laut der vorgestellten Originalarbeit (Motlagh et al., 2016b) keinen Verlust der CPT II-Aktivität gibt. Es gibt ebenfalls anders als in Knockout-Modellen bei Patienten keine Reduktion der Proteinkonzentrationen von CPT I und CPT II (Lehmann and Zierz, 2014). Außerdem wurde vorgeschlagen, dass der Anstieg der FGF-21-Konzentrationen im Serum mit zunehmendem klinischen Schweregrad, dem Fortschreiten der mitochondrialen Erkrankung und der Muskelpathologie auftreten könnte (Davis et al., 2013; Koene et al., 2014; Suomalainen, 2011). Die attackenartige Beeinträchtigung der Fettsäureverwertung bei Patienten mit der muskulären Form des CPT II-Mangels (Motlagh and Zierz, 2014) könnte also zumindest in attackenfreien Intervallen nicht ausgereicht haben, um eine Erhöhung von FGF-21 zu bewirken. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass ein normales FGF-21 strukturelle Defekte des Atmungskettenkomplexes oder des

Assemblierungsfaktors nicht ausschließt (Lehtonen et al., 2016), was in der Diagnostik der mitochondriale Erkrankungen zu berücksichtigen ist.

Eine mögliche Limitierung bei der Bestimmung der FGF-21-Konzentration im Serum könnte die kleine Anzahl von 13 Patienten sein. Allerdings ist die muskuläre Form des CPT II-Mangels eine seltene Erkrankung mit sehr geringer Prävalenz. Daher ist die Anzahl von 13 eingeschlossen Patienten außergewöhnlich hoch. Eine Bestimmung der FGF-21-Konzentration in Patienten mit CPT II-Mangel während der Attacken wäre sehr interessant, um zu unterscheiden, ob die Normalbefunde eher diesem Aspekt zu Grunde liegen.

Zusammenfassung

Die mitochondrialen Myopathien stellen ein sehr heterogenes Erscheinungsbild dar. Der Mangel an Energieproduktion kann sich als Myopathie, Belastungsintoleranz oder Rhabdomyolyse bei Trägern der m.3243 Mutation und Patienten mit CPT II-Mangel zeigen. Während bei den Trägern der m.3243 Mutation die OXPHOS-Maschinerie direkt betroffen ist, kann der CPT II-Mangel ohne direkte Beteiligung der OXPHOS-Route den mitochondrialen Myopathien zugeordnet werden. Diese zwei Erkrankungen stellen daher zwei Beispiele für mitochondriale Myopathien aufgrund von Störungen der Hauptstoffwechselwege (OXPHOS und Fettsäurestoffwechsel) dar. Diese zwei Myopathien präsentieren sich als zwei total unterschiedliche Phänotypen.

Das Verständnis der biochemischen Konsequenzen der beiden untersuchten mitochondrialen Myopathien erfordert die Charakterisierung der vorhandenen Defekte *in vitro*.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich signifikant verminderte Schlüsselparameter der mitochondrialen Atmung in Myoblasten mit der m.3243A>G Mutation. Das Vorhandensein von überschüssigem Palmitat zeigte bei Myoblasten mit der m.3243A>G Mutation einen negativen Effekt auf die respiratorischen Werte.

Es konnte gezeigt werden, dass die rekombinante CPT II-Variante S113L die gleiche enzymatische Aktivität wie der rekombinante Wildtyp *in vitro* besitzt. Die Aminosäuresubstitution an der Position 113 von Serin zu Leucin führte zu einer erhöhten Thermosensitivität der rekombinanten Variante. Einige natürliche Substrate der CPT II steigerten die Thermoresistenz der Variante auf Wildtyp-Niveau. Das instabile Enzym wirkt *in vivo* höchstwahrscheinlich erst durch abnorme Reaktionen des Enzyms auf äußere Einflüsse wie z.B. Inhibitoren oder extreme Temperaturen pathogen.

Die FGF-21-Konzentration war im Serum der Patienten mit CPT II-Mangel im Gegensatz zu Patienten mit OXPHOS-Defekten normal. Dies belegt, dass es sich offenbar auch *in vivo* bei dem CPT II-Defekt nicht um eine persistente Enzymaktivitätsminderung, sondern um eine abnorm regulierte Enzymaktivität handeln könnte.

Literaturverzeichnis

Abbott, J.A., Francklyn, C.S., and Robey-Bond, S.M. (2014). Transfer RNA and human disease. *Frontiers in genetics* 5, 158.

Adkison, L.R. (2011). Elsevier's Integrated Review Genetics E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access (Elsevier Health Sciences).

Ahmed, S.T., Craven, L., Russell, O.M., Turnbull, D.M., and Vincent, A.E. (2018). Diagnosis and treatment of mitochondrial myopathies. *Neurotherapeutics* 15, 943-953.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, (Garland Science, New York, 2008). Google Scholar, 652.

Angelini, C., Freddo, L., Battistella, P., Bresolin, N., Pierobon-Bormioli, S., Armani, M., and Vergani, L. (1981). Carnitine palmityl transferase deficiency: Clinical variability, carrier detection, and autosomal-recessive inheritance. *Neurology* 31, 883-883.

Austin, S., and St-Pierre, J. (2012). PGC1 α and mitochondrial metabolism—emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of cell science* 125, 4963-4971.

Bank, W.J., DiMauro, S., Bonilla, E., Capuzzi, D.M., and Rowland, L.P. (1975). A disorder of muscle lipid metabolism and myoglobinuria: absence of carnitine palmityl transferase. *New England Journal of Medicine* 292, 443-449.

Barazzoni, R., Zanetti, M., Bosutti, A., Biolo, G., Vitali-Serdoz, L., Stebel, M., and Guarnieri, G. (2005). Moderate caloric restriction, but not physiological hyperleptinemia per se, enhances mitochondrial oxidative capacity in rat liver and skeletal muscle—tissue-specific impact on tissue triglyceride content and AKT activation. *Endocrinology* 146, 2098-2106.

Bau, V., Deschauer, M., and Zierz, S. (2009). Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie—Symptom oder Syndrom? *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 226, 822-828.

Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., and Lewis, K. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337-342.

Beher, D., Wu, J., Cumine, S., Kim, K.W., Lu, S.C., Atangan, L., and Wang, M. (2009). Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chemical biology & drug design* 74, 619-624.

Bennett, M.J., Rinaldo, P., and Strauss, A.W. (2000). Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 37, 1-44.

Berardo, A., DiMauro, S., and Hirano, M. (2010). A diagnostic algorithm for metabolic myopathies. *Current neurology and neuroscience reports* 10, 118-126.

- Bonnefont, J.P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A., and Bastin, J. (2004). Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* 25, 495-520.
- Bremer, J. (1983). Carnitine--metabolism and functions. *Physiological reviews* 63, 1420-1480.
- Brenmoehl, J., and Hoeflich, A. (2013). Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3. *Mitochondrion* 13, 755-761.
- Britton, C.H., Mackey, D.W., Esser, V., Foster, D.W., Burns, D.K., Yarnall, D.P., Froguel, P., and McGarry, J.D. (1997). Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPT1A and CPT1B). *Genomics* 40, 209-211.
- Britton, C.H., Schultz, R.A., Zhang, B., Esser, V., Foster, D.W., and McGarry, J.D. (1995). Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1984-1988.
- Brookheart, R.T., Michel, C.I., and Schaffer, J.E. (2009). As a matter of fat. *Cell metabolism* 10, 9-12.
- Cantó, C., and Auwerx, J. (2009). Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 20, 325-331.
- Cerletti, M., Jang, Y.C., Finley, L.W., Haigis, M.C., and Wagers, A.J. (2012). Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function. *Cell stem cell* 10, 515-519.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252.
- Chinnery, P., and Turnbull, D. (1999). Mitochondrial DNA and disease. *The Lancet* 354, S17-S21.
- Civitarese, A.E., Carling, S., Heilbronn, L.K., Hulver, M.H., Ukropcova, B., Deutsch, W.A., Smith, S.R., and Ravussin, E. (2007). Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS med* 4, e76.
- Coll, T., Eyre, E., Rodríguez-Calvo, R., Palomer, X., Sánchez, R.M., Merlos, M., Laguna, J.C., and Vázquez-Carrera, M. (2008). Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *Journal of biological chemistry* 283, 11107-11116.
- Comte, J., Maisterrena, B., and Gautheron, D.C. (1976). Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim Biophys Acta* 419, 271-284.
- Davis, R.L., Liang, C., Edema-Hildebrand, F., Riley, C., Needham, M., and Sue, C.M. (2013). Fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker of mitochondrial disease. *Neurology* 81, 1819-1826.

- Demaugre, F., Bonnefont, J.-P., Mitchell, G., Nguyen-Hoang, N., Pelet, A., Rimoldi, M., Di Donato, S., and Saudubray, J.-M. (1988). Hepatic and muscular presentations of carnitine palmitoyl transferase deficiency: two distinct entities. *Pediatric research* 24, 308-311.
- Demaugre, F., Bonnefont, J.P., Colonna, M., Cepanec, C., Leroux, J.P., and Saudubray, J.M. (1991). Infantile form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatomuscular symptoms and sudden death. Physiopathological approach to carnitine palmitoyltransferase II deficiencies. *J Clin Invest* 87, 859-864.
- Deschauer, M. (2003). Mitochondriale Enzephalomyopathien. *psychoneuro* 29, 108-112.
- Deschauer, M., Wieser, T., and Zierz, S. (2005). Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: clinical and molecular genetic features and diagnostic aspects. *Archives of neurology* 62, 37-41.
- DiDonato, S. (1994). Disorders of lipid metabolism affecting skeletal muscle: Carnitine deficiency syndromes, defects in the catabolic pathway, and charnarin disease. *Myology*, 2nd ed, New York, McGraw Hill 1587.
- DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Servidei, S., DeVivo, D., and Schon, E. (1987). Mitochondrial myopathies. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 10, 113-128.
- DiMauro, S., and DiMauro, P.M. (1973). Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science* 182, 929-931.
- Dittenhafer-Reed, K.E., Richards, A.L., Fan, J., Smallegan, M.J., Siahpirani, A.F., Kemmerer, Z.A., Prolla, T.A., Roy, S., Coon, J.J., and Denu, J.M. (2015). SIRT3 mediates multi-tissue coupling for metabolic fuel switching. *Cell metabolism* 21, 637-646.
- Douiev, L., Soiferman, D., Alban, C., and Saada, A. (2016). The Effects of Ascorbate, N-Acetylcysteine, and Resveratrol on Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Disorders. *J Clin Med* 6.
- Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annual review of biochemistry* 66, 199-232.
- Eaton, S., Bartlett, K., and Pourfarzam, M. (1996). Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* 320 (Pt 2), 345-357.
- El-Hattab, A.W., Adesina, A.M., Jones, J., and Scaglia, F. (2015). MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Molecular genetics and metabolism* 116, 4-12.
- El-Hattab, A.W., and Scaglia, F. (2013). Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics* 10, 186-198.

- Elkalaf, M., Anděl, M., and Trnka, J. (2013). Low glucose but not galactose enhances oxidative mitochondrial metabolism in C2C12 myoblasts and myotubes. *PLoS one* 8, e70772.
- Fanin, M., Anichini, A., Cassandrini, D., Fiorillo, C., Scapolan, S., Minetti, C., Cassanello, M., Donati, M.A., Siciliano, G., D'Amico, A., *et al.* (2012). Allelic and phenotypic heterogeneity in 49 Italian patients with the muscle form of CPT-II deficiency. *Clin Genet* 82, 232-239.
- Filograna, R., Koolmeister, C., Upadhyay, M., Pajak, A., Clemente, P., Wibom, R., Simard, M., Wredenberg, A., Freyer, C., and Stewart, J. (2019). Modulation of mtDNA copy number ameliorates the pathological consequences of a heteroplasmic mtDNA mutation in the mouse. *Science advances* 5, eaav9824.
- Filosto, M., Tomelleri, G., Tonin, P., Scarpelli, M., Vattermi, G., Rizzuto, N., Padovani, A., and Simonati, A. (2007). Neuropathology of mitochondrial diseases. *Bioscience reports* 27, 23-30.
- Fong, D., and Chan, M.M. (2013). Dietary phytochemicals target cancer stem cells for cancer chemoprevention. In *Mitochondria as Targets for Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy* (Springer), pp. 85-125.
- Fraser, F., Padovese, R., and Zammit, V.A. (2001). Distinct kinetics of carnitine palmitoyltransferase I in contact sites and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 276, 20182-20185.
- Frohlich, J., Secombe, D.W., Hahn, P., Dodek, P., and Hynie, I. (1978). Effect of fasting on free and esterified carnitine levels in human serum and urine: correlation with serum levels of free fatty acids and β -hydroxybutyrate. *Metabolism* 27, 555-561.
- Galron, D., Birk, O., Kazanovitz, A., Moses, S., and HersHKovitz, E. (2004). Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: Identification of a novel molecular defect in a Bedouin patient. *Journal of inherited metabolic disease* 27, 267-273.
- Garesse, R., and Vallejo, C.G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263, 1-16.
- Gaster, M., Rustan, A.C., and Beck-Nielsen, H. (2005). Differential utilization of saturated palmitate and unsaturated oleate: evidence from cultured myotubes. *Diabetes* 54, 648-656.
- Gellera, C., Verderio, E., and Taroni, F. (1994). Assignment of the human carnitine palmitoyltransferase II gene (CPT1) to chromosome 1p32. *Genomics* 24.
- Gempel, K., Kiechl, S., Hofmann, S., Lochmüller, H., Kiechl-Kohlendorfer, U., Willeit, J., Sperl, W., Rettinger, A., Bieger, I., and Pongratz, D. (2002). Screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency by tandem mass spectrometry. *Journal of inherited metabolic disease* 25, 17-27.

Gonzalez-Hurtado, E., Lee, J., Choi, J., and Wolfgang, M.J. (2018). Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming. *Molecular metabolism* 7, 45-56.

Gorman, G.S., Schaefer, A.M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E.L., Alston, C.L., Feeney, C., Horvath, R., Yu-Wai-Man, P., and Chinnery, P.F. (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of neurology* 77, 753-759.

Goto, Y.-i., Nonaka, I., and Horai, S. (1990). A mutation in the tRNA Leu (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348, 651-653.

Grady, J.P., Murphy, J.L., Blakely, E.L., Haller, R.G., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., and Tuppen, H.A. (2014). Accurate measurement of mitochondrial DNA deletion level and copy number differences in human skeletal muscle. *PLoS One* 9, e114462.

Grady, J.P., Pickett, S.J., Ng, Y.S., Alston, C.L., Blakely, E.L., Hardy, S.A., Feeney, C.L., Bright, A.A., Schaefer, A.M., and Gorman, G.S. (2018). mt DNA heteroplasmy level and copy number indicate disease burden in m. 3243A> G mitochondrial disease. *EMBO molecular medicine* 10, e8262.

Gurd, B.J., Yoshida, Y., Lally, J., Holloway, G.P., and Bonen, A. (2009). The deacetylase enzyme SIRT1 is not associated with oxidative capacity in rat heart and skeletal muscle and its overexpression reduces mitochondrial biogenesis. *The Journal of physiology* 587, 1817-1828.

Hatch, G.M. (2004). Cell biology of cardiac mitochondrial phospholipids. *Biochemistry and Cell Biology* 82, 99-112.

Henique, C., Mansouri, A., Fumey, G., Lenoir, V., Girard, J., Bouillaud, F., Prip-Buus, C., and Cohen, I. (2010). Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. *Journal of biological chemistry* 285, 36818-36827.

Higashida, K., Kim, S.H., Jung, S.R., Asaka, M., Holloszy, J.O., and Han, D.-H. (2013). Effects of resveratrol and SIRT1 on PGC-1 α activity and mitochondrial biogenesis: a reevaluation. *PLoS Biol* 11, e1001603.

Holt, I.J., Harding, A.E., and Morgan-Hughes, J.A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *nature* 331, 717-719.

Hoppel, C.L., and Genuth, S.M. (1980). Carnitine metabolism in normal-weight and obese human subjects during fasting. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 238, E409-E415.

Hostetler, K.Y., Hoppel, C.L., Romine, J.S., Sipe, J.C., Gross, S.R., and Higginbottom, P.A. (1978). Partial deficiency of muscle carnitine palmitoyltransferase with normal ketone production. *New England Journal of Medicine* 298, 553-557.

- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., and Zhang, L.-L. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* *425*, 191-196.
- Illsinger, S., Lücke, T., Peter, M., Ruitter, J.P., Wanders, R.J., Deschauer, M., Handig, I., Wuyts, W., and Das, A.M. (2008). Carnitine-palmitoyltransferase 2 deficiency: Novel mutations and relevance of newborn screening. *American journal of medical genetics Part A* *146*, 2925-2928.
- Isackson, P.J., Bennett, M.J., and Vladutiu, G.D. (2006). Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* *89*, 323-331.
- Ji, K., Zheng, J., Lv, J., Xu, J., Ji, X., Luo, Y.-B., Li, W., Zhao, Y., and Yan, C. (2015). Skeletal muscle increases FGF21 expression in mitochondrial disorders to compensate for energy metabolic insufficiency by activating the mTOR–YY1–PGC1 α pathway. *Free Radical Biology and Medicine* *84*, 161-170.
- Johns, D.R. (1995). Mitochondrial DNA and disease. *New England journal of medicine* *333*, 638-644.
- Joseph, A.-M., Rungi, A.A., Robinson, B.H., and Hood, D.A. (2004). Compensatory responses of protein import and transcription factor expression in mitochondrial DNA defects. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* *286*, C867-C875.
- Joshi, P.R., Deschauer, M., and Zierz, S. (2014). Carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency: genotype-phenotype analysis of 50 patients. *J Neurol Sci* *338*, 107-111.
- Kao, S.H., Liuz, C.S., Wang, S.Y., and Wei, Y.H. (1997). Ageing-associated large-scale deletions of mitochondrial DNA in human hair follicles. *IUBMB Life* *42*, 285-298.
- Kashfi, K., Mynatt, R.L., Park, E.A., and Cook, G.A. (2011). Membrane microenvironment regulation of carnitine palmitoyltransferases I and II. *Biochem Soc Trans* *39*, 833-837.
- Kelly, D.P., and Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development* *18*, 357-368.
- Kerner, J., and Hoppel, C. (1998). Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annual review of nutrition* *18*, 179-206.
- Kerner, J., and Hoppel, C. (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* *1486*, 1-17.
- Khan, N., Govindaraj, P., Meena, A., and Thangaraj, K. (2015). Mitochondrial disorders: challenges in diagnosis & treatment. *The Indian Journal of Medical Research* *141*, 13-26.

Kobayashi, Y., Ichihashi, K., Ohta, S., Nihei, K., Kagawa, Y., Yanagisawa, M., and Momoi, M. (1992). The mutant mitochondrial genes in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) were selectively amplified through generations. *Journal of inherited metabolic disease* 15, 803-808.

Koene, S., de Laat, P., van Tienoven, D.H., Vriens, D., Brandt, A.M., Sweep, F.C., Rodenburg, R.J., Donders, A.R.T., Janssen, M.C., and Smeitink, J.A. (2014). Serum FGF21 levels in adult m. 3243A> G carriers: clinical implications. *Neurology* 83, 125-133.

Korbecki, J., and Bajdak-Rusinek, K. (2019). The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflammation Research*, 1-18.

Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., and Elliott, P. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127, 1109-1122.

Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., and Dela, F. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of physiology* 590, 3349-3360.

Lavrentyev, E.N., Matta, S.G., and Cook, G.A. (2004). Expression of three carnitine palmitoyltransferase-I isoforms in 10 regions of the rat brain during feeding, fasting, and diabetes. *Biochemical and biophysical research communications* 315, 174-178.

Lee, J., Choi, J., Alpergin, E.S.S., Zhao, L., Hartung, T., Scafidi, S., Riddle, R.C., and Wolfgang, M.J. (2017). Loss of hepatic mitochondrial long-chain fatty acid oxidation confers resistance to diet-induced obesity and glucose intolerance. *Cell reports* 20, 655-667.

Lee, J., Choi, J., Scafidi, S., and Wolfgang, M.J. (2016). Hepatic fatty acid oxidation restrains systemic catabolism during starvation. *Cell reports* 16, 201-212.

Lee, J., Ellis, J.M., and Wolfgang, M.J. (2015). Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress-induced inflammation. *Cell reports* 10, 266-279.

Lehmann, D., and Zierz, S. (2014). Normal protein content but abnormally inhibited enzyme activity in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *J Neurol Sci* 339, 183-188.

Lehtonen, J.M., Forsström, S., Bottani, E., Viscomi, C., Baris, O.R., Isoniemi, H., Höckerstedt, K., Österlund, P., Hurme, M., and Jylhävä, J. (2016). FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. *Neurology* 87, 2290-2299.

- Li, L., Pan, R., Li, R., Niemann, B., Aurich, A.-C., Chen, Y., and Rohrbach, S. (2011). Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required. *Diabetes* 60, 157-167.
- Liang, C., Ahmad, K., and Sue, C.M. (2014). The broadening spectrum of mitochondrial disease: shifts in the diagnostic paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1840, 1360-1367.
- Lim, J.-H., Gerhart-Hines, Z., Dominy, J.E., Lee, Y., Kim, S., Tabata, M., Xiang, Y.K., and Puigserver, P. (2013). Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase A-dependent activation of SIRT1-PGC1 α complex. *Journal of biological chemistry* 288, 7117-7126.
- Lim, S., Honek, J., Xue, Y., Seki, T., Cao, Z., Andersson, P., Yang, X., Hosaka, K., and Cao, Y. (2012). Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nature protocols* 7, 606-615.
- Lin, D.-S., Kao, S.-H., Ho, C.-S., Wei, Y.-H., Hung, P.-L., Hsu, M.-H., Wu, T.-Y., Wang, T.-J., Jian, Y.-R., and Lee, T.-H. (2017). Inflexibility of AMPK-mediated metabolic reprogramming in mitochondrial disease. *Oncotarget* 8, 73627.
- Lopes Costa, A., Le Bachelier, C., Mathieu, L., Rotig, A., Boneh, A., De Lonlay, P., Tarnopolsky, M.A., Thorburn, D.R., Bastin, J., and Djouadi, F. (2014). Beneficial effects of resveratrol on respiratory chain defects in patients' fibroblasts involve estrogen receptor and estrogen-related receptor alpha signaling. *Hum Mol Genet* 23, 2106-2119.
- López-Viñas, E., Bentebibel, A., Gurunathan, C., Morillas, M., de Arriaga, D., Serra, D., Asins, G., Hegardt, F.G., and Gómez-Puertas, P. (2007). Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A. *Journal of Biological Chemistry* 282, 18212-18224.
- Maassen, J.A., M't Hart, L., van Essen, E., Heine, R.J., Nijpels, G., Tafrechi, R.S.J., Raap, A.K., Janssen, G.M., and Lemkes, H.H. (2004). Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes* 53, S103-S109.
- Majamaa, K., Moilanen, J.S., Uimonen, S., Remes, A.M., Salmela, P.I., Kärppä, M., Majamaa-Voltti, K.A., Rusanen, H., Sorri, M., and Peuhkurinen, K.J. (1998). Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *The American Journal of Human Genetics* 63, 447-454.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology* 16, R551-R560.
- McGarry, J. (2001). Travels with carnitine palmitoyltransferase I: from liver to germ cell with stops in between. *Biochemical Society Transactions* 29, 241-244.

McGarry, J.D., and Brown, N.F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system—from concept to molecular analysis. *European journal of biochemistry* *244*, 1-14.

McGARRY, J.D., Mills, S.E., Long, C., and Foster, D.W. (1983). Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochemical Journal* *214*, 21-28.

McInnes, J. (2013). Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress. *Nutrition & metabolism* *10*, 1-13.

Molina, A.J., Bharadwaj, M.S., Van Horn, C., Nicklas, B.J., Lyles, M.F., Eggebeen, J., Haykowsky, M.J., Brubaker, P.H., and Kitzman, D.W. (2016). Skeletal muscle mitochondrial content, oxidative capacity, and Mfn2 expression are reduced in older patients with heart failure and preserved ejection fraction and are related to exercise intolerance. *JACC: Heart Failure* *4*, 636-645.

Montell, E., Turini, M., Marotta, M., Roberts, M., Noé, V., Ciudad, C.J., Macé, K., and Gómez-Foix, A.M. (2001). DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* *280*, E229-E237.

Morris, B.J. (2013). Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine* *56*, 133-171.

Motlagh, L., Golbik, R., Sippl, W., and Zierz, S. (2016a). Malonyl-CoA inhibits the S113L variant of carnitine-palmitoyltransferase II. *Biochim Biophys Acta* *1861*, 34-40.

Motlagh, L., Golbik, R., Sippl, W., and Zierz, S. (2016b). Stabilization of the thermolabile variant S113L of carnitine palmitoyltransferase II. *Neurol Genet* *2*, e53.

Motlagh, L., and Zierz, S. (2014). Muskulärer Carnitinpalmityltransferase-II-Mangel. In *Angeborene Stoffwechselkrankheiten bei Erwachsenen* (Springer), pp. 343-348.

Motlagh Scholle, L., Lehmann, D., Deschauer, M., Kraya, T., and Zierz, S. (2018a). FGF-21 as a potential biomarker for mitochondrial diseases. *Current medicinal chemistry* *25*, 2070-2081.

Motlagh Scholle, L., Lehmann, D., Joshi, P.R., and Zierz, S. (2019). Normal FGF-21-Serum Levels in Patients with Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) Deficiency. *Int J Mol Sci* *20*.

Motlagh Scholle, L., Schieffers, H., Al-Robaiy, S., Thaele, A., Dehghani, F., Lehmann Urban, D., and Zierz, S. (2020a). The Effect of Resveratrol on Mitochondrial Function in Myoblasts of Patients with the Common m. 3243A> G Mutation. *Biomolecules* *10*, 1103.

Motlagh Scholle, L., Schieffers, H., Al-Robaiy, S., Thaele, A., Lehmann Urban, D., and Zierz, S. (2020b). Palmitate but Not Oleate Exerts a Negative Effect on Oxygen Utilization in Myoblasts of Patients with the m. 3243A> G Mutation: A Pilot Study. *Life* 10, 204.

Motlagh Scholle, L., Thaele, A., Beckers, M., Meinhardt, B., and Zierz, S. (2018b). Lack of activation of the S113L variant of carnitine palmitoyltransferase II by cardiolipin. *J Bioenerg Biomembr* 50, 461-466.

Motlagh Scholle, L., Zierz, S., Mawrin, C., Wickenhauser, C., and Urban, D.L. (2020c). Heteroplasmy and Copy Number in the Common m.3243A>G Mutation-A Post-Mortem Genotype-Phenotype Analysis. *Genes (Basel)* 11.

Mraz, M., Bartlova, M., Lacinova, Z., Michalsky, D., Kasalicky, M., Haluzikova, D., Matoulek, M., Dostalova, I., Humenanska, V., and Haluzik, M. (2009). Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clinical endocrinology* 71, 369-375.

Mynatt, R.L., Greenhaw, J.J., and Cook, G.A. (1994). Cholate extracts of mitochondrial outer membranes increase inhibition by malonyl-CoA of carnitine palmitoyltransferase-I by a mechanism involving phospholipids. *Biochem J* 299 (Pt 3), 761-767.

Nennstiel, U., Genzel-Boroviczény, O., Odenwald, B., Ensenauer, R., Rossi, R., Hoffmann, G.F., Schäfer-Graf, U., Blankenstein, O., Streffing, J., Hammermann, J., *et al.* (2020). Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen, Endokrinopathien, schwere kombinierte Immundefekte (SCID) und Mukoviszidose.

Nezu, J.-i., Tamai, I., Oku, A., Ohashi, R., Yabuuchi, H., Hashimoto, N., Nikaido, H., Sai, Y., Koizumi, A., and Shoji, Y. (1999). Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nature genetics* 21, 91-94.

Nicot, C., Napal, L., Relat, J., González, S., Llebaria, A., Woldegiorgis, G., Marrero, P.F., and Haro, D. (2004). C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components of the CPT system. *Biochemical and biophysical research communications* 325, 660-664.

Niyazov, D.M., Kahler, S.G., and Frye, R.E. (2016). Primary mitochondrial disease and secondary mitochondrial dysfunction: importance of distinction for diagnosis and treatment. *Molecular syndromology* 7, 122-137.

Nsiah-Sefaa, A., and McKenzie, M. (2016). Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid β -oxidation in mitochondrial disease. *Bioscience reports* 36.

O'Hara, R., Tedone, E., Ludlow, A., Huang, E., Arosio, B., Mari, D., and Shay, J.W. (2019). Quantitative mitochondrial DNA copy number determination using droplet digital PCR with single-cell resolution. *Genome research* 29, 1878-1888.

- Olpin, S., Afifi, A., Clark, S., Manning, N., Bonham, J., Dalton, A., Leonard, J., Land, J., Andresen, B., and Morris, A. (2003). Mutation and biochemical analysis in carnitine palmitoyltransferase type II (CPT II) deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 26, 543-557.
- Onyango, I.G., Lu, J., Rodova, M., Lezi, E., Crafter, A.B., and Swerdlow, R.H. (2010). Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1802, 228-234.
- Osman, C., Voelker, D.R., and Langer, T. (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *Journal of Cell Biology* 192, 7-16.
- Pacholec, M., Bleasdale, J.E., Chrnyk, B., Cunningham, D., Flynn, D., Garofalo, R.S., Griffith, D., Griffor, M., Loulakis, P., and Pabst, B. (2010). SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *Journal of Biological Chemistry* 285, 8340-8351.
- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F.M., and Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1837, 408-417.
- Patten, B.M., Wood, J.M., Harati, Y., Hefferan, P., and Howell, R.R. (1979). Familial recurrent rhabdomyolysis due to carnitine palmitoyl transferase deficiency. *The American journal of medicine* 67, 167-171.
- Pickett, S.J., Grady, J.P., Ng, Y.S., Gorman, G.S., Schaefer, A.M., Wilson, I.J., Cordell, H.J., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., and McFarland, R. (2018). Phenotypic heterogeneity in m. 3243A> G mitochondrial disease: the role of nuclear factors. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 5, 333-345.
- Pizzorno, J. (2014). Mitochondria—fundamental to life and health. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal* 13, 8.
- Pons, R., and De Vivo, D.C. (1995). Primary and secondary carnitine deficiency syndromes. *Journal of Child Neurology* 10, 2S8-2S24.
- Price, N., van der Leij, F., Jackson, V., Corstorphine, C., Thomson, R., Sorensen, A., and Zammit, V. (2002). A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 80, 433-442.
- Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, B.J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., and Teodoro, J.S. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell metabolism* 15, 675-690.
- Rebouche, C.J., Panagides, D.D., and Nelson, S.E. (1990). Role of carnitine in utilization of dietary medium-chain triglycerides by term infants. *Am J Clin Nutr* 52, 820-824.
- Riccardi, G., Giacco, R., and Rivellese, A. (2004). Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical nutrition* 23, 447-456.

- Rinaldo, P., Matern, D., and Bennett, M.J. (2002). Fatty acid oxidation disorders. *Annual review of physiology* 64, 477-502.
- Rouzier, C., Bannwarth, S., Chausseot, A., Chevrollier, A., Verschueren, A., Bonello-Palot, N., Fragaki, K., Cano, A., Pouget, J., and Pellissier, J.-F. (2012). The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain* 135, 23-34.
- Rubio-Gozalbo, M., Bakker, J., Waterham, H., and Wanders, R. (2004). Carnitine–acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects. *Molecular aspects of medicine* 25, 521-532.
- Rufer, A.C., Thoma, R., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., De Roo, E., Banner, D.W., Mueller, F., Chomienne, O., and Hennig, M. (2006). The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment. *Structure* 14, 713-723.
- Sallevelt, S.C., de Die-Smulders, C.E., Hendrickx, A.T., Hellebrekers, D.M., de Coo, I.F., Alston, C.L., Knowles, C., Taylor, R.W., McFarland, R., and Smeets, H.J. (2017). De novo mtDNA point mutations are common and have a low recurrence risk. *Journal of medical genetics* 54, 73-83.
- Sanchis-Gomar, F., Luis Garcia-Gimenez, J., Carmen Gomez-Cabrera, M., and V Pallardo, F. (2014). Mitochondrial biogenesis in health and disease. *Molecular and therapeutic approaches. Current pharmaceutical design* 20, 5619-5633.
- Scarpulla, R.C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-gene structure and expression* 1576, 1-14.
- Schapira, A.H. (2006). Mitochondrial disease. *The Lancet* 368, 70-82.
- Schirmer, H., Pereira, T.C.B., Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Bonan, C.D., Bogo, M.R., and Souto, A.A. (2012). Modulatory effect of resveratrol on SIRT1, SIRT3, SIRT4, PGC1 α and NAMPT gene expression profiles in wild-type adult zebrafish liver. *Molecular biology reports* 39, 3281-3289.
- Schlame, M., and Haldar, D. (1993). Cardiolipin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 268, 74-79.
- Schon, E.A., DiMauro, S., and Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature Reviews Genetics* 13, 878-890.
- Shi, T., Wang, F., Stieren, E., and Tong, Q. (2005). SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 280, 13560-13567.
- Sigauke, E., Rakheja, D., Kitson, K., and Bennett, M.J. (2003). Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical, and molecular review. *Laboratory investigation* 83, 1543-1554.

Stanley, C.A., Hale, D.E., Berry, G.T., Deleew, S., Boxer, J., and Bonnefont, J.-P. (1992). A deficiency of carnitine–acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane. *New England Journal of Medicine* 327, 19-23.

Stier, A., Masseurin, S., and Criscuolo, F. (2014). Chronic mitochondrial uncoupling treatment prevents acute cold-induced oxidative stress in birds. *Journal of Comparative Physiology B* 184, 1021-1029.

Suomalainen, A. (2011). Biomarkers for mitochondrial respiratory chain disorders. *Journal of inherited metabolic disease* 34, 277-282.

Suomalainen, A., Elo, J.M., Pietiläinen, K.H., Hakonen, A.H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S.K., Tyni, T., and Kiuru-Enari, S. (2011). FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *The Lancet Neurology* 10, 806-818.

Suomalainen, A., and Kaukonen, J. (2001). Diseases caused by nuclear genes affecting mtDNA stability. *American journal of medical genetics* 106, 53-61.

Taanman, J.-W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1410, 103-123.

Tang, B.L. (2016). Sirt1 and the mitochondria. *Molecules and cells* 39, 87.

Tardo-Dino, P.-E., Touron, J., Baugé, S., Bourdon, S., Koulmann, N., and Malgoyre, A. (2019). The effect of a physiological increase in temperature on mitochondrial fatty acid oxidation in rat myofibers. *Journal of Applied Physiology* 127, 312-319.

Taroni, F., Verderio, E., Dworzak, F., Willems, P.J., Cavadini, P., and DiDonato, S. (1993). Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients. *Nat Genet* 4, 314-320.

Taroni, F., Verderio, E., Fiorucci, S., Cavadini, P., Finocchiaro, G., Uziel, G., Lamantea, E., Gellera, C., and DiDonato, S. (1992). Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8429-8433.

Theunissen, T.E.J., Gerards, M., Hellebrekers, D., van Tienen, F.H., Kamps, R., Sallevelt, S., Hartog, E., Scholte, H.R., Verdijk, R.M., Schoonderwoerd, K., *et al.* (2017). Selection and Characterization of Palmitic Acid Responsive Patients with an OXPHOS Complex I Defect. *Front Mol Neurosci* 10, 336.

Touyz, R.M. (2012). Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. In *Primer on the Autonomic Nervous System* (Elsevier), pp. 335-338.

Trifunov, S., Pyle, A., Valentino, M.L., Liguori, R., Yu-Wai-Man, P., Burté, F., Duff, J., Kleinle, S., Diebold, I., and Rugolo, M. (2018). Clonal expansion of mtDNA deletions: different disease models assessed by digital droplet PCR in single muscle cells. *Scientific reports* 8, 1-10.

- Tucci, S., Primassin, S., Ter Veld, F., and Spiekerkoetter, U. (2010). Medium-chain triglycerides impair lipid metabolism and induce hepatic steatosis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)-deficient mice. *Molecular genetics and metabolism* 101, 40-47.
- Tuppen, H.A., Blakely, E.L., Turnbull, D.M., and Taylor, R.W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1797, 113-128.
- Turpin, S.M., Lancaster, G.I., Darby, I., Febbraio, M.A., and Watt, M.J. (2006). Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 291, E1341-E1350.
- van den Berg, S.A., van Marken Lichtenbelt, W., van Dijk, K.W., and Schrauwen, P. (2011). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling, adaptive thermogenesis and energy expenditure. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 14, 243-249.
- Vandanmagsar, B., Warfel, J.D., Wicks, S.E., Ghosh, S., Salbaum, J.M., Burk, D., Dubuisson, O.S., Mendoza, T.M., Zhang, J., and Noland, R.C. (2016). Impaired mitochondrial fat oxidation induces FGF21 in muscle. *Cell reports* 15, 1686-1699.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular research* 79, 208-217.
- Vladutiu, G.D., Saponara, I., Conroy, J.M., Grier, R.E., Brady, L., and Brady, P. (1992). Immunoquantitation of carnitine palmitoyl transferase in skeletal muscle of 31 patients. *Neuromuscular Disorders* 2, 249-259.
- Vorgerd, M., and Deschauer, M. (2013). Metabolische und mitochondriale Myopathien. *Zeitschrift für Rheumatologie* 72, 242-254.
- Wahab, A., Gao, K., Jia, C., Zhang, F., Tian, G., Murtaza, G., and Chen, J. (2017). Significance of resveratrol in clinical management of chronic diseases. *Molecules* 22, 1329.
- Wallace, D.C. (1994). Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26, 241-250.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A., Elsas, L.J., and Nikoskelainen, E.K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242, 1427-1430.
- Walter, J. (1996). L-carnitine. *Archives of disease in childhood* 74, 475.
- Wanders, R., Vreken, P., Den Boer, M., Wijburg, F., Van Gennip, A., and IJlst, L. (1999). Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA β -oxidation. *Journal of inherited metabolic disease* 22, 442-487.

Woldegiorgis, G., Bremer, J., and Shrago, E. (1985). Substrate inhibition of carnitine palmitoyltransferase by palmitoyl-CoA and activation by phospholipids and proteins. *Biochim Biophys Acta* 837, 135-140.

Yamazaki, N., Shinohara, Y., Shima, A., Yamanaka, Y., and Terada, H. (1996). Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *Biochim Biophys Acta* 1307, 157-161.

Yang, J., Wang, N., Li, J., Zhang, J., and Feng, P. (2010). Effects of resveratrol on NO secretion stimulated by insulin and its dependence on SIRT1 in high glucose cultured endothelial cells. *Endocrine* 37, 365-372.

Zammit, V.A. (1984). Time-dependence of inhibition of carnitine palmitoyltransferase I by malonyl-CoA in mitochondria isolated from livers of fed or starved rats. Evidence for transition of the enzyme between states of low and high affinity for malonyl-CoA. *Biochemical Journal* 218, 379-386.

Zhang, L., Keung, W., Samokhvalov, V., Wang, W., and Lopaschuk, G.D. (2010). Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801, 1-22.

Zierz, S. (2014). *Muskelerkrankungen* (Georg Thieme Verlag).

Zierz, S., and Engel, A.G. (1985). Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle. *Eur J Biochem* 149, 207-214.

Zierz, S., and Engel, A.G. (1987). Are there two forms of carnitine palmitoyltransferase in muscle? *Neurology* 37, 1785-1785.

Zierz, S., Neumann-Schmidt, S., and Jerusalem, F. (1993). Inhibition of carnitine palmitoyltransferase in normal human skeletal muscle and in muscle of patients with carnitine palmitoyltransferase deficiency by long-and short-chain acylcarnitine and acyl-coenzyme A. *The clinical investigator* 71, 763-769.

Thesen

Die mitochondriale Atmung ist in Myoblasten der Patienten mit m.3243A>G Mutation reduziert.

Die ähnliche relative Expression mehrerer an der mitochondrialen Biogenese beteiligten Gene in Myoblasten von Patienten mit m.3243A>G Mutation verglichen zu Kontrollmyoblasten spricht gegen eine Reduzierung der mitochondrialen Biogenese in Patienten.

Die Fastensimulierende Wirkung von Resveratrol (RSV) konnte in Myoblasten der Kontrollen und der Patienten mit m.3243A>G Mutation unter normalen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Unter eingeschränkten Bedingungen führte RSV jedoch zur Verbesserung der ATP-verknüpften Atmung sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen. Die Vorteile von RSV scheinen nur in gestressten Modellen aufzutreten.

Es konnten unterschiedliche Auswirkungen von Palmitat und Oleat auf die Sauerstoffverwertung in Myoblasten von Patienten und Kontrollen nachgewiesen werden. In Gegenwart von überschüssigem Palmitat wird die mitochondriale Aktivität und die ATP-Produktionsraten in Myoblasten vor allem bei Patienten mit m.3243A>G Mutation reduziert. Der negative Effekt von Palmitat auf die mitochondriale Funktion könnte mit Diacylglycerolen (DAG) und Ceramiden (CER) vermittelten Insulinresistenz zusammenhängen und das erhöhte Risiko für Diabetes mellitus bei m.3243A>G-Mutation erklären.

Die in postmortem-Untersuchungen festgestellte >75% Heteroplasmie, ohne einen MELAS-Phänotyp unterstreicht frühere Beobachtungen, dass hohe Heteroplasmie in Geweben nicht automatisch zu einem spezifischen Phänotyp führen.

Während das CPT II-Enzym und seine häufigste Variante S113L die gleiche enzymatische Aktivität zeigen, weist das mutierte Enzym eine abnorme thermische Destabilisierung bei fiebersimulierenden Temperaturen auf. Die geringere thermodynamische Stabilität der Variante könnte erklären, warum Fieber und anhaltende Anstrengung bei CPT II-Mangel Anfälle von Myoglobinurie provozieren.

Die Stabilität der rekombinanten CPT II Enzyme gegen thermische Inaktivierung wird durch L-Carnitin und Acyl-L-Carnitine mit mehr als 10 Kohlenstoffen in der Acylseitenkette erhöht, aber durch Palmitoyl-CoA vermindert.

Malonyl-CoA hemmt sowohl CPT I als auch CPT II, jedoch ist die Hemmung unterschiedlich stark ausgeprägt. Die sensitivere Reaktion der Variante S113L im Vergleich zum Wildtyp unterstützt frühere Hypothesen bezüglich der abnormen Empfindlichkeit der Enzymvariante gegenüber Malonyl-CoA.

Cardiolipin steigert die CPT II-Aktivität des Wildtyps bei physiologischen Temperaturen (37°C), vermindert sie aber bei fiebersimulierenden Temperaturen (40°C). Für die Variante S113L tritt die inaktivierende Wirkung von Cardiolipin bei niedrigeren Temperaturen (37°C, statt 40°C bei WT) auf und könnte mit der zuvor gezeigten erhöhten Thermosensitivität der rekombinanten Variante S113L zusammenhängen.

Obwohl von einem erhöhten FGF-21-Serumspiegel bei mitochondrialen Myopathien unter anderem auch für Träger der m.3243A>G Mutation und in *CPT2* Knockout-Modellen berichtet wurde, war er im Serum der Patienten mit CPT II-Mangel normal.

Originalarbeiten



Article

The Effect of Resveratrol on Mitochondrial Function in Myoblasts of Patients with the Common m.3243A>G Mutation

Leila Motlagh Scholle ^{1,*}, Helena Schieffers ¹, Samiya Al-Robaiy ², Annemarie Thaele ¹, Faramarz Dehghani ³ , Diana Lehmann Urban ⁴ and Stephan Zierz ¹

¹ Department of Neurology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Germany; helena@schieffers.de (H.S.); annemarie.thaele@uk-halle.de (A.T.); stephan.zierz@uk-halle.de (S.Z.)

² Center for Basic Medical Research, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Germany; samiya.al-robaiy@uk-halle.de

³ Department of Anatomy and Cell Biology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, 06108 Halle, Germany; faramarz.dehghani@medizin.uni-halle.de

⁴ Department of Neurology, Ulm University, 89070 Ulm, Germany; diana.lehmann@rku.de

* Correspondence: leila.scholle@medizin.uni-halle.de; Tel.: +49-345-557-3628

Received: 23 June 2020; Accepted: 22 July 2020; Published: 24 July 2020



Abstract: Mitochondrial function is essential for ATP-supply, especially in response to different cellular stressors. Increased mitochondrial biogenesis resulting from caloric restriction (CR) has been reported. Resveratrol (RSV) is believed to mimic the physiological effects of CR mainly via a sirtuin (SIRT) 1-dependent pathway. The effect of RSV on the physiological function of mitochondrial respiratory complexes was evaluated using a Seahorse XF96. Myoblasts of five patients harboring the m.3243A>G mutation and five controls were analyzed. The relative expression of several genes involved in mitochondrial biogenesis was evaluated for a better understanding of the coherent mechanisms. Additionally, media-dependent effects of nutritional compounds and hormonal restrictions (R) on myoblasts from patients and controls in the presence or absence of RSV were investigated. Culturing of myoblasts under these conditions led to an upregulation of almost all the investigated genes compared to normal nutrition. Under normal conditions, there was no positive effect of RSV on mitochondrial respiration in patients and controls. However, under restricted conditions, the respiratory factors measured by Seahorse were improved in the presence of RSV. Further studies are necessary to clarify the involved mechanisms and elucidate the controversial effects of resveratrol on SIRT1 and SIRT3 expression.

Keywords: resveratrol; m.3243A>G mutation; SIRT1; SIRT3; OXPHOS

1. Introduction

Mitochondria are the cells' main energy sources, converting nutrients into usable energy [1]. The mitochondrial DNA (mtDNA) is a double-stranded 16.5 kb circle molecule, encoding for 13 essential subunits of the mitochondrial respiratory chain unit, two ribosomal mt-RNAs (rRNAs) and 22 mitochondrial transfer RNA (mt-tRNA)s [2,3]. Mitochondrial diseases can either be caused by mutations in the mtDNA itself or by mutations of nuclear origin and are associated with a wide range of different clinical phenotypes, from mild to severe [4]. The coexistence of mutant and wild-type mtDNA molecules within the same cell is defined as heteroplasmy [5]. It is already known that patients with higher heteroplasmy levels tend to have more severe disease burden and progression rate; however, disease burden and progression vary greatly between individuals and tissue [3]. Recently, it has been shown that heteroplasmy levels did not differ between clinically affected and unaffected

m.3243 patients [3]. The m.3243A>G point mutation in the *MT-TL1* gene (encoding mt-tRNA^{Leu(UUR)}) can be found in approximately 80% of patients with MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactate acidosis, and stroke-like episodes)-syndrome [3,6–8].

Resveratrol (3,4,5-trihydroxystilbene, RSV) is a small phenolic compound and found in grapes, nuts, berries, and various other plants [9]. During the years 2008–2010, the effect of RSV for the treatment of patients with MELAS-syndrome has been evaluated in a clinical study [10]. For this purpose, the Resveratrol analog SRT501 (Sirtris Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA) was used. RSV has been referred to as the caloric restriction “mimetic” compound [11].

The dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin (SIRT) 1 and SIRT3 is widely believed [12]. SIRT1 activates the peroxisome proliferator-activated receptor Gamma coactivator 1 α (PGC-1 α)-mediated transcription of nuclear and mitochondrial genes. PGC-1 α is known to be a central inducer of mitochondrial biogenesis [13], and co-activates the transcription of Nuclear Respiratory Factor (NRF) 1, which regulates the transcription of *Tfam*. Mitochondrial transcription factor A (TFAM) stimulates mitochondrial DNA replication and mitochondrial gene expression in the mitochondrial matrix. The regulatory effect of SIRT1 on PGC-1 α activity and its role in mitochondrial biogenesis is controversially discussed [14]. Some groups reported the induction of genes for oxidative phosphorylation and mitochondrial biogenesis and an increase of PGC-1 α activity by SIRT1 [15]. On the other hand, others opposed the obligatory regulatory role of SIRT1 for the PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis in muscle. They showed the downregulation of *PGC-1 α* and *Tfam* resulting from the overexpression of *SIRT1* in muscle and the downregulated levels of *SIRT1* by upregulation of PGC-1 α in this tissue [16]. SIRT3 directly activates important proteins for oxidative phosphorylation, tricarboxylic acid (TCA) cycle, and fatty-acid oxidation, and indirectly affects PGC-1 α and AMP-activated protein kinase (AMPK) [12].

Nevertheless, the activating effect of RSV on SIRT1 and SIRT3 is a matter of debate. Many studies reported on SIRT1 and SIRT3 activation by RSV and their structurally related compounds [17,18]. Others, however, denied RSV and its analogs as direct SIRT1-activators [19]. In a zebrafish-model, RSV did not affect the mRNA level of *SIRT1* and *PGC-1 α* and even decreased the expression of *SIRT3* and *SIRT4* genes [20].

The aim of this study was to assess the effect of RSV on oxidative phosphorylation in patients harboring the m.3243A>G mutation and in controls. The controversially discussed caloric restriction (CR) stimulating effect of RSV on mitochondrial respiratory activity and mitochondrial biogenesis was evaluated in patients and in controls under normal and restricted conditions. The investigated pathway is schematically shown in Figure 1. The potential protective effects of RSV were only investigated under restricted cultural conditions to comply with the basic cellular needs, as well.

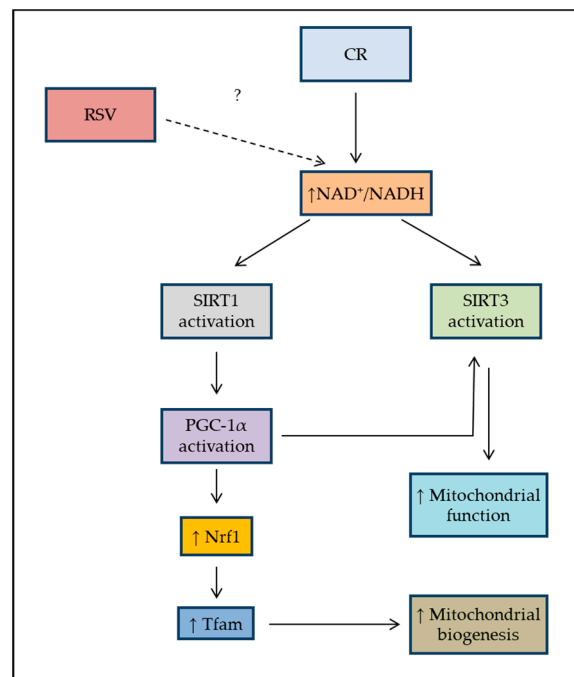


Figure 1. Schematic diagram showing the investigated pathways in the present study using RSV in patients and controls, adopted accordingly [21]. Caloric restriction (CR) activates the SIRT1 levels or NAD^+ levels leading to the activation of PGC-1 α in the nucleus, which then activates the transcription of genes that are necessary for mitochondrial function and biogenesis. CR also leads to activation of AMPK and, therefore, the activation of PGC-1 α in skeletal muscle. RSV: Resveratrol; NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide; SIRT1: sirtuin 1; SIRT3: sirtuin 3; PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 α ; Nrf1: Nuclear Respiratory Factor 1; Tfam: Mitochondrial Transcription Factor A.

2. Materials and Methods

2.1. Human Myoblasts

Muscle primary cells from five patients harboring the genetically confirmed m.3243A>G mutation and controls were provided by the Muscle Tissue Culture Collection (MTCC) from the University of Munich. The presence of a mutation was confirmed in myoblasts of all patients. Further details are given in Table 1. Five patients served as controls (two males, three females), who had muscle biopsy for the diagnosis of a suspected neuromuscular disorder. They were deemed to be ‘normal controls’ if they were ultimately found to have no muscle disease by combined clinical and histologic criteria. The age of the controls ranged from 35 to 53 years.

Table 1. Sex, age, and location of muscle biopsy of five patients with the genetically confirmed m.3243A>G mutation and five healthy controls, F: female, M: male.

	Gender	Age at Biopsy	Location of Muscle Biopsy
Patients			
P 1	M	43	biceps brachii muscle
P 2	M	42	biceps brachii muscle
P 3	F	70	quadriceps muscle
P 4	M	34	deltoideus muscle
P 5	F	40	biceps brachii muscle
Controls			
C1	F	50	biceps brachii muscle
C 2	M	53	quadriceps muscle
C 3	F	40	quadriceps muscle
C 4	M	35	biceps brachii muscle
C 5	F	49	biceps brachii muscle

Myoblast Culture Conditions

The experiments were divided into two main groups depending on the culture conditions of the myoblasts: (I) normal (N)- or, (II) substrate restricted (R)-conditions, both, either without or with 10 μ M or 20 μ M of RSV. At first, all cells were grown in skeletal muscle cell growth medium (Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), GlutaMAX-1 (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), and Supplement mix (Fetuin (bovine, 50 ng/mL), human epidermal growth factor (hEGF, 10 pg/mL), human basic fibroblast growth factor (hbFGF, 1 pg/mL), Dexamethasone (0.4 pg/mL), and human recombinant insulin (10 ng/mL), Promocell, Heidelberg, Germany). After the first 24 h, the medium was changed and the cells were cultured for another 48 h. In the R group, the medium was replaced by a substrate-limited medium (DMEM with 0.5 mM glucose, 1.0 mM glutamine, and 1% FBS) with or without 10 μ M or 20 μ M RSV. Promocell skeletal muscle cell growth medium was used either without or with 10 μ M or 20 μ M RSV in the normal group. Resveratrol (>99% purity) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All cells were maintained in 5% CO₂ at 37 °C.

2.2. The Seahorse XF96 Analysis of Metabolic Function

To evaluate the mitochondrial function and the effect of RSV in patients and controls, the Mito Stress test was performed using a Seahorse XF96 Cell Analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA), either under N or restricted R conditions according to manufacturer's recommendations. Briefly, myoblasts from patients and controls were seeded to Seahorse XF96 cell culture microplates (2.5 \times 10⁴ cells per well) in skeletal muscle cell growth medium supplemented with 10% FBS. After a 24-hour incubation at 37 °C, the medium was replaced depending on six different experimental conditions, as described in Section 2.1 (R or N cultural conditions without or either with 10 μ M or 20 μ M RSV).

Forty-eight h later the cells were washed twice with the pre-warmed assay medium (XF base medium supplemented with 10 mM glucose, 2 mM glutamine, and 1 mM sodium pyruvate; pH 7.4).

Oxygen consumption rate (OCR) values were measured following sequential injections of oligomycin (2 μ M), carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, 2 μ M), and rotenone (0.5 μ M) + antimycin A (0.5 μ M), with three OCR measurements after each injection following an injection of cell-permeable Hoechst 33342 (2 μ g/mL) dye. The key parameters of mitochondrial function such as basal respiration (BR), ATP-linked respiration, maximal respiration (MR), and spare respiratory (SRC) capacity were analyzed using the above-described measurements. The ATP linked respiration (ATP production rate, ATP-R) was derived from the difference between the OCR at baseline and respiration following oligomycin addition. Maximal OCR was determined by subtracting the OCR after antimycin A addition from the OCR induced by FCCP. The SRC was calculated by the difference between maximal and basal respiration. The data were normalized to cell numbers by

measurement of Hoechst dye staining of nuclei with excitation and emission wavelengths 355 nm and 465 nm, accordingly, using a Tecan InfiniteTM M1000 (Tecan, Groedig, Austria) and plotted as OCR (pmol/min/cell \pm SD).

2.3. Gene Expression by Quantitative Real-Time (qRT)-PCR

The cells from the six different groups, as described in Section 2.1 (N or R with or without 10 μ M or 20 μ M RSV), were harvested, shock frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until RNA extraction. RNA was extracted using a NucleoSpin RNA kit (Macherey and Nagel, Duren, Germany), according to the manufacturer's instructions. cDNA was next synthesized using the reverse transcription of 1 μ g of RNA with RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), according to the manufacturer's instructions. cDNAs were kept at -20 °C until analysis.

Quantitative Real-Time (qRT)-PCR was carried out using PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) using a QuantStudio 3 real-time PCR machine (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Foster City, CA, USA). Each 10 μ L-reaction contained 5 μ L (2 \times) SYBR Green master mix, 500 nM forward and reverse primer, 0.5 μ L cDNA, and nuclease-free water. The used primer pairs are listed in Table 2. The following thermal program was applied: a single cycle of DNA polymerase activation for 15 min at 95 °C followed by 40 amplification cycles of 15 s at 95 °C (denaturation) and 1 min at 60 °C (annealing and extension). Subsequently, a melting temperature analysis of the amplification products was performed by gradually increasing the temperature from 60 to 95 °C in 15 min. The fluorescent reporter signal was normalized against the internal reference dye (ROX) signal. The relative gene expression ($\Delta\Delta$ CT) was calculated first by correcting each gene cycle threshold (CT) by the average CT value for the housekeeping genes *HPRT1* and *β -Actin*, that were stable across groups (calculation of relative expression—reported as $2^{-\Delta\Delta$ CT and CT representing the cycle threshold). Three technical replicates were measured for each sample in three independent experiments.

Table 2. Primers used for quantitative RT-PCR.

Target Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>SIRT1</i>	AGAAGAACCCATGGAGGATG	TCATCTCCATCAGTCCCAAA
<i>SIRT3</i>	CAGCAGTACGATCTCCCGTA	GAAGCAGCCGGAGAAAGTAG
<i>PGC-1α</i>	GTCCAGGCAGGAGCTTTTAGA	AGCTTTGATTTGCTCAAGCCAT
<i>Nrf1</i>	AGGAACACGGAGTGACCCAA	TATGCTCGGTGTAAGTAGCCA
<i>Tfam</i>	ATGGCGTTTCTCCGAAGCAT	TCCGCCCTATAAGCATCTTGA
<i>HPRT1</i>	ACCAGTCAACAGGGGACATAA	CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC
<i>β-Actin</i>	GCGCCGTTCCGAAAGTTG	CGCGCCGCTGGGTTTTATAG

2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis, calculation, and visualization were performed using Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, USA). An analysis of correlation was carried out using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. The level of significance was set to $p = 0.05$. The statistical tests chosen were predetermined by the size of the study group and the numerical range of values.

2.5. Ethical Statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the local Ethics Committee of the University Halle-Wittenberg (Project identification codes 215/20.01.10/3 and 2020-019). A written informed consent was received from all patients.

3. Results

For better readability of the results, the experiments using 48 h cultures were divided between the ones conducted either under normal (N) or restricted (R) conditions.

3.1. The Seahorse XF96 Analysis of Metabolic Function

3.1.1. The Effect of Restricted Conditions

Independent of RSV-absence or presence, restriction in the culture medium led to a decrease of oxidative phosphorylation (OXPHOS) factors (Figure 2). This decrease was significant, except in one case—the decrease of ATP production in the presence of 10 μ M RSV was only significant in controls.

The mean values are presented in Supplementary Table S1 (*p* values are only shown in case of significance).

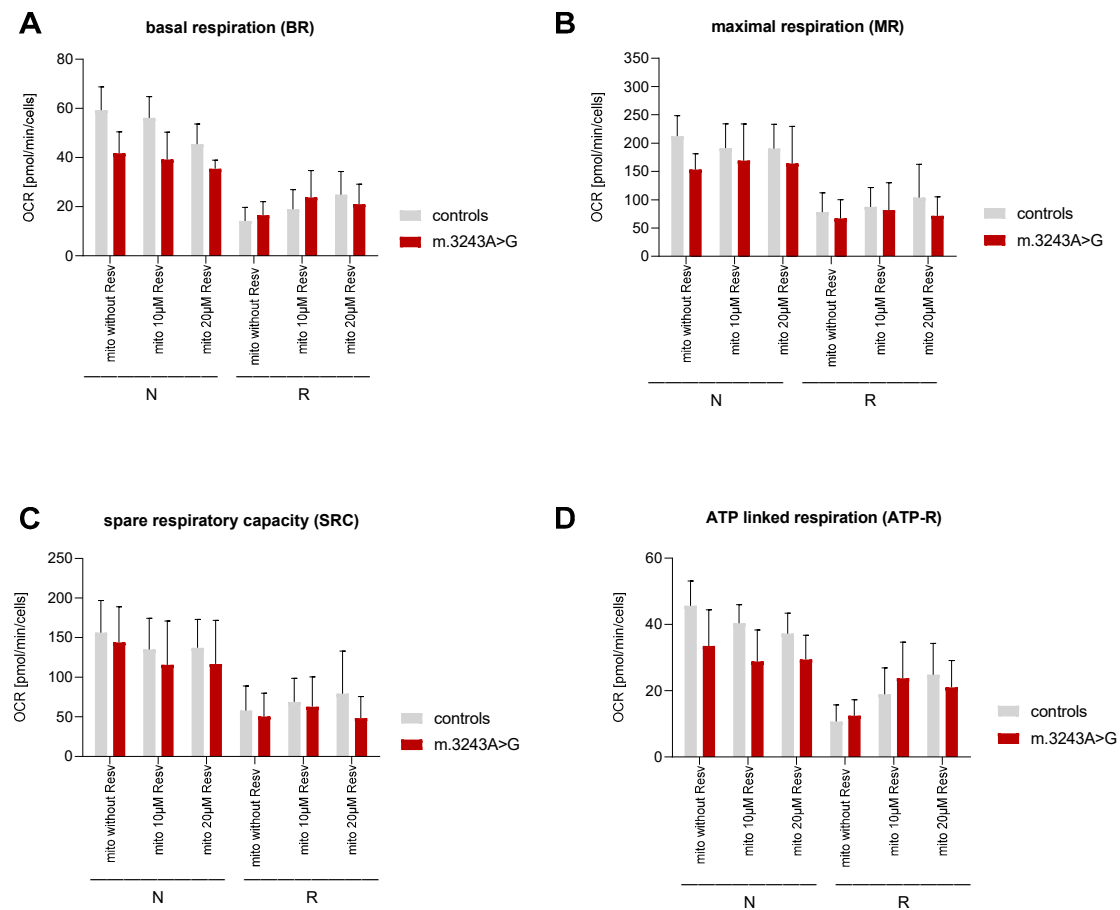


Figure 2. Evaluation of mitochondrial function using a Seahorse XF96 Cell Analyzer in myoblasts from patients ($n = 5$) and controls ($n = 5$). The key parameters of mitochondrial function such as basal respiration (BR), ATP production (ATP-R) and spare respiratory capacity (SRC) were analyzed as previously described. (A) Basal respiration (BR), (B) maximal respiration (MR), (C) spare respiratory capacity (SRC) and (D) ATP-linked respiration (ATP-R) after 48 h under normal (N) and restricted (R) conditions. The significant differences are shown in Tables 3 and 4, and Table S1.

Table 3. Comparison of the mean values of the key parameters for mitochondrial function (basal, MR, ATP production and SRC) using a Seahorse XF96 Cell Analyzer in myoblasts between patients (n = 5) and controls (n = 5) under normal (N) or restricted (R) conditions. *p* values are only shown in the case of significant differences between patients and controls. –RSV = without RSV.

	N conditions								
	–RSV			10 μM RSV			20 μM RSV		
	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value
Basal	59.24	41.71	0.0005	56.11	39.19	<0.0001	45.44	35.44	0.05
MR	212.3	153.3	0.05	191.3	169.2		190.4	164	
SRC	156.4	144.1		135.2	115.8		137.3	116.8	
ATP	45.64	33.51	0.01	40.39	28.82	0.001	37.24	29.4	0.03
	R conditions								
	–RSV			10 μM RSV			20 μM RSV		
	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value
Basal	14.19	16.52		18.91	23.8		24.84	21	
MR	78.04	66.87		87.21	81.92		103.8	71.5	
SRC	57.88	50.34		68.79	62.84		79.22	48.38	
ATP	10.67	12.45		18.9	23.8		24.84	21	

Table 4. Comparison of the effect of 10 or 20 μM RSV on basal, MR, ATP production, and SRC measured under normal (N) or restricted (R) conditions in patients (n = 5) and controls (n = 5). *p* values are only shown in the case of a significant difference between the two conditions.

	Controls									
	N					R				
	–RSV	10	<i>p</i> (10)	20	<i>p</i> (20)	–RSV	10	<i>p</i> (10)	20	<i>p</i> (20)
Basal	59.24	56.11		45.44	0.02	14.19	18.91		24.84	0.008
MR	212.3	191.3		190.4		78.04	87.21		103.8	
SRC	156.4	135.2		137.3		57.88	68.79		79.22	
ATP	45.64	40.39		37.24		10.67	18.9	0.03	24.84	<0.0001
	Patients									
	N					R				
	–RSV	10	<i>p</i> (10)	20	<i>p</i> (20)	–RSV	10	<i>p</i> (10)	20	<i>p</i> (20)
Basal	41.71	39.19		35.44		16.52	23.8	0.05	21	
MR	153.3	169.2		164		66.87	81.92		71.5	
SRC	144.1	115.8		116.8		50.34	62.84		48.38	
ATP	33.51	28.82		29.4		12.45	23.8	<0.0001	21	0.005

3.1.2. Differences between Patients Harboring the m.3243A>G Mutation and Controls

Mito Stress Test in the Absence of Resveratrol

Under normal (N) conditions, BR, MR, and ATP-R were all significantly higher in controls compared to patients without the addition of RSV (Figure 2 and Table 3). However, under R conditions, no significant differences in the above-mentioned factors were detected between patients and controls.

Mito Stress Test in RSV-treated Groups

In experiments under N conditions, BR and ATP production were significantly higher in controls than in patients in the presence of RSV. MR and SRC were similar in patients and controls (Figure 2 and Table 3).

In all R groups, all the above-mentioned values were comparable between patients and controls (Figure 2 and Table 3).

3.1.3. The Effect of RSV on OXPHOS Factors

The Effect of RSV on OXPHOS Factors under Normal Conditions

Upon treatment of myoblasts with 10 or 20 μM RSV under N condition, there was no significant difference between values resulting from either 10 or 20 μM RSV in all of the main OXPHOS factors (BR, MR, SRC, and ATP-R) with only one exception. As the only exception, BR was significantly lower in controls in the presence of 20 μM RSV (Figure 2 and Table 4).

The Effect of RSV on OXPHOS Factors under Restricted Conditions

The addition of 10 or 20 μM RSV under the R condition led to an improvement of ATP-R in controls and patients (Figure 2 and Table 4).

3.2. Gene Expression by qRT-PCR

3.2.1. The Effect of Restrictions

Under R conditions, the expression of *SIRT1*, *SIRT3*, *PGC-1 α* , *Nrf1*, and *Tfam* tended to be increased in the absence of RSV or in the presence of 20 μM RSV compared to normal cultural conditions in both, controls and patients. The expression rates in the presence of 10 μM RSV did not follow any specific pattern (Table 5 and Figure 3).

Table 5. Comparison of the relative expression rate of the genes *SIRT1*, *SIRT3*, *PGC-1 α* , *Nrf1*, and *Tfam* measured under N or R conditions in patients (n = 5) and controls (n = 5). *p* values are only shown in the case of significant differences between patients and controls. –RSV = without RSV.

	Controls								
	–RSV			10 μM RSV			20 μM RSV		
	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value
<i>SIRT1</i>	0.56	2.04		2.65	0.82		0.84	7.1	<0.0001
<i>SIRT3</i>	0.4	2.1	0.02	1.77	1.47		1.07	3.46	0.0003
<i>PGC-1α</i>	0.3	17.8	<0.0001	1.41	8.3	<0.0001	0.45	19.97	<0.0001
<i>Nrf1</i>	0.57	1.87		2.68	0.77	0.007	1.16	3.51	0.0004
<i>Tfam</i>	2.99	4.45		12.44	2.67	<0.0001	4.96	7.55	
	Patients								
	–RSV			10 μM RSV			20 μM RSV		
	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value
<i>SIRT1</i>	1.26	3.19		2.463	0.95		0.67	5.82	<0.0001
<i>SIRT3</i>	0.77	2.9	0.0009	1.49	1.36		0.57	1.45	
<i>PGC-1α</i>	0.27	4.7	0.006	0.94	3.78		0.54	4.43	0.02
<i>Nrf1</i>	0.93	2.97	0.003	1.21	0.79		0.9	3.7	<0.0001
<i>Tfam</i>	2.71	4.4		8.34	2.27	0.0003	1.53	2.7	

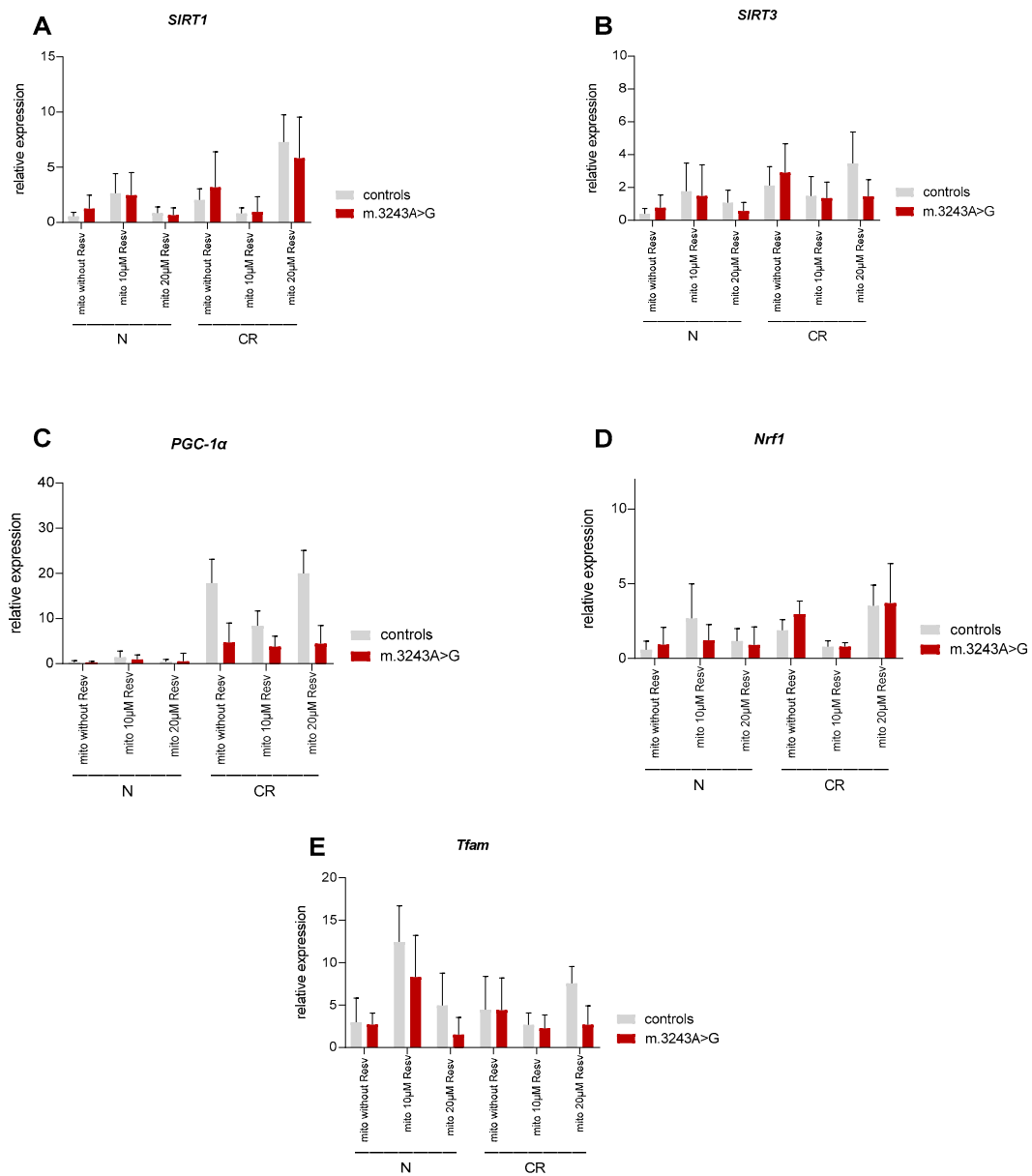


Figure 3. Evaluation of gene expression in myoblasts from patients (n = 5) and controls (n = 5), analyzed as previously described. (A) *SIRT1*, (B) *SIRT3*, (C) *PGC-1α*, (D) *Nrf1*, and (E) *Tfam* after 48 h, N vs. R conditions. The significant differences are shown in Tables 5 and 6, and Table S2.

Table 6. The effect of 10 or 20 μ M RSV on the relative expression rate of the genes *SIRT1*, *SIRT3*, *PGC-1 α* , *Nrf1*, and *Tfam* measured under normal (N) or restricted (R) conditions in patients (n = 5) and controls (n = 5). *p* values are only shown in the case of significant differences between the two conditions.

Controls										
	-RSV	N				R				
		10	<i>p</i> (10)	20	<i>p</i> (20)	-RSV	10	<i>p</i> (10)	20	<i>p</i> (20)
<i>SIRT1</i>	0.56	2.65		0.84		2.04	0.82		7.1	<0.001
<i>SIRT3</i>	0.4	1.77		1.07		2.1	1.47		3.46	
<i>PGC-1α</i>	0.3	1.41		0.45		17.8	8.3	<0.0001	19.97	
<i>Nrf1</i>	0.57	2.68	0.002	1.16		1.87	0.77		3.51	0.03
<i>Tfam</i>	2.99	12.44	<0.0001	4.96		4.45	2.67		7.55	
Patients										
	-RSV	N				R				
		10	<i>p</i> (10)	20	<i>p</i> (20)	-RSV	10	<i>p</i> (10)	20	<i>p</i> (20)
<i>SIRT1</i>	1.26	2.463		0.67		3.19	0.95		5.82	0.02
<i>SIRT3</i>	0.77	1.49		0.57		2.9	1.36		1.45	
<i>PGC-1α</i>	0.27	0.94		0.54		4.7	3.78		4.43	
<i>Nrf1</i>	0.93	1.21		0.9		2.97	0.79	0.004	3.7	
<i>Tfam</i>	2.71	8.34	0.004	1.53		4.4	2.27		2.7	

3.2.2. The Difference between Patients and Controls

Without RSV, there was no significant difference in expression of *SIRT1*, *SIRT3*, *Nrf1*, and *Tfam* between patients and controls under normal and restricted conditions. The expression of *PGC-1 α* was significantly lower in patients compared to controls only in restricted conditions in the absence or presence of RSV (Figure 3). In the majority of cases, the difference in the expression of other genes in the presence of RSV was not significant. The exceptions are shown in Supplementary Table S2.

3.2.3. The Effect of RSV

Generally, the addition of RSV under N or R conditions did not lead to a significant difference in the expressions of *SIRT1*, *SIRT3*, *PGC-1 α* , *Nrf1*, and *Tfam* in both patients and controls (Table 6 and Figure 3).

4. Discussion

Resveratrol is believed to mimic the physiological effects of CR in a mainly *SIRT1*- or *SIRT3*-dependent manner [22,23]. Functional mitochondria have been reported to be important for the effects of RSV [24]. Thus, in the present study, this potential effect of RSV was evaluated in oxidative phosphorylation capacities and transcription factors involved in mitochondrial biogenesis in myoblasts of five patients harboring the m.3243A>G point mutation and five controls. Furthermore, it was assessed whether mitochondrial dysfunction based on an mtDNA defect in patients could trigger cellular signals provoking compensatory adaptations.

Analyzing the mitochondrial activity was performed using a Seahorse XF96 Cell Analyzer. In patients, there was no effect resulting from the addition of RSV under the N condition. Under this condition (glucose as substrate), independent of RSV-absence or presence, the important respiratory factors BR and ATP-R were higher in the controls than in the patients. This is consistent with another study reporting reduced ATP-linked respiration, MR, and overall, a decrease in mitochondrial function in fibroblasts of MELAS patients. [25]. In the R group, the medium was only used in concentrations that are necessary to fulfil the cellular basic needs, including CR, as well as lacking of several other factors, including insulin. These restrictions generally led to a decrease of respiratory values in both patients and controls compared to normal conditions. The presented findings are partly in contrast to data from previous studies, which reported an increase of the mitochondrial ATP synthesis efficiency and oxidative metabolism resulting from CR conditions [26–28]. The different experimental conditions or

different species might be the reason for the contradicting results. In a study using C2C12 myoblasts, the measurements were performed in three groups; assaying oöconditions identical to culture conditions, with 1 g/L or without glucose. Considering the results upon assaying with 1 g/l glucose, they report a slightly higher basal mitochondrial respiration and ATP turnover-driven respiration in groups with glucose in culture medium compared to those with glucose depletion [26]. Other studies performed the experiments in mice and evaluated the CR effect by subsequent measurements in tissues. Their results should be considered as a reaction of several organs involved [27,28]. Moreover, in the present study, the effects seen in the R groups resulted from a reduction, not only of glucose but of other supplements as well, compared to the normal medium.

The acquired data under normal conditions did not confirm the reported positive effect of RSV on OXPHOS values [15,29]. Low doses of RSV have been reported to ameliorate the mitochondrial respiratory dysfunction in fibroblasts of patients carrying homoplasmic mtDNA mutations [30]. However, there are other studies reporting either no effect or a detrimental effect of RSV on ATP production in fibroblasts of controls or patients with mitochondrial disorders [31]. It has been suggested that the therapeutic effects of RSV for the treatment of mitochondrial disorders might depend on many factors, including the severity of the underlying defect and the administered dose. RSV might be beneficial to some patients as a supportive therapeutic supplement and as part of a multi-component therapy [32]. Under restricted conditions, OXPHOS values improved in both patients and controls in the presence of RSV (especially 10 µM). In this situation, the above-mentioned respiratory factors were in general similar in patients and controls (Figure 2 and Table 4).

The lacking positive effect of RSV under normal conditions is consistent with a study on C2C12 cells. The addition of RSV for 24 h at a concentration of 1 µM to 10 µM did not affect the ATP production but led to a 50% decrease in ATP concentration in the 20 µM RSV group [33].

Other studies showed an inhibitory effect of RSV on mitochondrial F0F1-ATPase activity in a concentration-dependent manner in rat brain and liver mitochondria, suggesting that RSV can also impair mitochondrial metabolic pathways [34,35]. In the present study, RSV was used at 10 µM and 20 µM because even higher concentrations of RSV have been known to be lethal to cells [33].

For the evaluation of the cellular response resulting from impaired OXPHOS in patients, the relative expression of the key genes related to energy metabolism and mitochondrial function *SIRT1*, *SIRT3*, *PGC-1α*, *Nrf1*, and *Tfam* were investigated. While one study showed comparable expression of *Nrf1* and *Tfam* and upregulation of *PGC-1α* and *SIRT3* in MELAS patients compared to controls [25], another one reported similar expression rates of *PGC-1α* and upregulation of *Tfam* in patients compared with that of controls [36]. In the present study, the expression of the above-mentioned genes was similar in patients and controls; however, the *PGC-1α* values were only higher under R conditions in controls compared to patients.

There are some tissue-specific metabolic pathways to maintain energy and nutrient homeostasis in mammals, acting as a response to environmental and nutritional conditions. Fasting induces *PGC-1α* deacetylation by *SIRT1* in skeletal muscle [37]. An increase in *SIRT3* and *SIRT1* protein level and expression in skeletal muscle of mice has been reported by fasting, correlated with an induction of *PGC-1α* as well. Resveratrol, in contrast, induced the *SIRT1* expression in mice skeletal muscle but did not affect the *SIRT3* level. The inability of resveratrol to induce *SIRT3* has been interpreted as an ineffectiveness of resveratrol to mimic CR-mediated health benefits [23,38]. In the present study, the restricted condition led to upregulation of *SIRT3*, *PGC-1α*, and *Nrf1* in both patients and controls. *PGC-1α*'s upregulation was particularly pronounced in controls under R conditions (about 60× higher than under N condition). However, *Tfam*-expression was not affected upon restricted conditions. Notably, the addition of 10 µM RSV, under restricted conditions, led to downregulation of *Tfam*-expression in both patients and controls.

The restricted condition led to an increased expression of the investigated genes, which might indicate stimulation of mitochondrial biogenesis. On the other hand, respiratory key parameters were decreased under R conditions. The lower maximal capacity might either result from decreased

substrate availability or a comprised mitochondrial mass/integrity or a mitophagic turnover under stressful situations to prevent accumulation of additional damage [39,40]. The studied genes showed slight upregulation in the presence of 10 μ M RSV under N conditions, and upregulation in the presence of 20 μ M RSV under R conditions compared to the conditions without RSV; however, not always significant (Table 6 and Figure 3).

Limitations

Due to lacking several factors in the culturing of the restricted group, the obtained results cannot be seen as a pure effect of glucose depletion, and a direct comparison of N and R groups is not easy to establish. Further studies are necessary to investigate alternative pathways and individual factors that are influenced by RSV in stressed models. Moreover, assay conditions (N or R) were similar for cells from both conditions. An adjustment to specific experimental conditions might be considered in future works. It should be noticed that mRNA quantification does not always represent the expressed amount of protein or changed modification of these proteins as deacetylation, phosphorylation, or methylation. These factors could play a role in protein translation and, subsequently the number of active proteins.

5. Conclusions

The data in the present study confirmed the reduced mitochondrial respiration in patients harboring the m.3243A>G mutation. The fasting stimulating effect of RSV in myoblasts under normal conditions was not demonstrated. Interestingly, under restricted conditions, there was an improvement in ATP-linked respiration, resulting from RSV in both patients and controls. It might show that benefits of RSV occur only in stressed models. The positive effect of RSV was not always concomitant with an increase in the expression of the investigated transcription factors involved in mitochondrial biogenesis in this study.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2218-273X/10/8/1103/s1>, Table S1: Comparison of the mean values of basal, maximal respiration (MR), ATP production, and spare respiratory capacity (SRC) measured under normal (N) or restricted (R) conditions in patients (n = 5) and controls (n = 5), Table S2: Relative expression rates of the genes *SIRT1*, *SIRT3*, *PGC-1 α* , *Nrf1*, and *Tfam* in myoblasts between patients (n = 5) and controls (n = 5) under normal (N) or restricted (R) conditions.

Author Contributions: Conceptualization, L.M.S., H.S., F.D., S.Z.; methodology, L.M.S., H.S., S.A.-R., A.T.; software, L.M.S., D.L.U., H.S., S.A.-R.; data curation, L.M.S., D.L.U., H.S., S.A.-R.; writing—original draft preparation, L.M.S., D.L.U., A.T.; writing—review and editing, L.M.S., D.L.U., F.D.; project administration, L.M.S., S.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: D.L.U. is funded by the Hertha-Nathorff-Programm (HNP) of the Medical University of Ulm, Germany.

Acknowledgments: We thank the Muscle Tissue Culture Collection MTCC at the University hospital Munich Muenchen for providing the samples and Julia Emmerich for excellent technical assistance. The Muscle Tissue Culture Collection is part of the German network on muscular dystrophies (MD-NET) and the German network for mitochondrial disorders (mito-NET, 01GM1113A) funded by the German ministry of education and research (BMBF, Bonn, Germany). The Muscle Tissue Culture Collection is a partner of Eurobiobank (www.eurobiobank.org) and TREAT-NMD (www.treat-nmd.eu). L.M.S., D.L.U. and S.Z. are members of the German mitoNET funded by the German Ministry of Education and Research. We thank the center of basic medical research (ZMG) of the medical school at the University of Halle-Wittenberg for providing the Seahorse device. We acknowledge the financial support within the funding program Open Access Publishing by the German Research Foundation (DFG).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Wallace, D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* **2005**, *39*, 359–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Schon, E.A.; DiMauro, S.; Hirano, M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 878–890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Scholle, L.M.; Zierz, S.; Mawrin, C.; Wickenhauser, C.; Urban, D.L. Heteroplasmy and Copy Number in the Common m.3243A>G Mutation—A Post-Mortem Genotype-Phenotype Analysis. *Genes* **2020**, *11*, 212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lehmann, D.; Schubert, K.; Joshi, P.R.; Baty, K.; Blakely, E.L.; Zierz, S.; Taylor, R.W.; Deschauer, M. A novel m.7539C>T point mutation in the mt-tRNA(Asp) gene associated with multisystemic mitochondrial disease. *Neuromuscul. Disord.* **2015**, *25*, 81–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Majamaa, K.; Moilanen, J.S.; Uimonen, S.; Remes, A.M.; Salmela, P.I.; Karppa, M.; Majamaa-Voltti, K.A.; Rusanen, H.; Sorri, M.; Peuhkurinen, K.J.; et al. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: Prevalence of the mutation in an adult population. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *63*, 447–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Rahman, S.; Poulton, J.; Marchington, D.; Suomalainen, A. Decrease of 3243 A→G mtDNA mutation from blood in MELAS syndrome: A longitudinal study. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *68*, 238–240. [[CrossRef](#)]
7. Kobayashi, Y.; Ichihashi, K.; Ohta, S.; Nihei, K.; Kagawa, Y.; Yanagisawa, M.; Momoi, M.Y. The mutant mitochondrial genes in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) were selectively amplified through generations. *J. Inherit. Metab. Dis.* **1992**, *15*, 803–808. [[CrossRef](#)]
8. Goto, Y.; Nonaka, I.; Horai, S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **1990**, *348*, 651–653. [[CrossRef](#)]
9. Wahab, A.; Gao, K.; Jia, C.; Zhang, F.; Tian, G.; Murtaza, G.; Chen, J. Significance of Resveratrol in Clinical Management of Chronic Diseases. *Molecules* **2017**, *22*, 1329. [[CrossRef](#)]
10. Fong, D.; Chan, M.M. Dietary phytochemicals target cancer stem cells for cancer chemoprevention. In *Mitochondria as Targets for Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 85–125.
11. Civitarese, A.E.; Carling, S.; Heilbronn, L.K.; Hulver, M.H.; Ukropcova, B.; Deutsch, W.A.; Smith, S.R.; Ravussin, E. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.* **2007**, *4*, e76.
12. Brenmoehl, J.; Hoeflich, A. Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3. *Mitochondrion* **2013**, *13*, 755–761. [[CrossRef](#)]
13. Austin, S.; St-Pierre, J. PGC1alpha and mitochondrial metabolism—emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 4963–4971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Tang, B.L. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 87–95. [[CrossRef](#)]
15. Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P.; et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **2006**, *127*, 1109–1122. [[CrossRef](#)]
16. Gurd, B.J.; Yoshida, Y.; Lally, J.; Holloway, G.P.; Bonen, A. The deacetylase enzyme SIRT1 is not associated with oxidative capacity in rat heart and skeletal muscle and its overexpression reduces mitochondrial biogenesis. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 1817–1828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Yang, J.; Wang, N.; Li, J.; Zhang, J.; Feng, P. Effects of resveratrol on NO secretion stimulated by insulin and its dependence on SIRT1 in high glucose cultured endothelial cells. *Endocrine* **2010**, *37*, 365–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Price, N.L.; Gomes, A.P.; Ling, A.J.; Duarte, F.V.; Martin-Montalvo, A.; North, B.J.; Agarwal, B.; Ye, L.; Ramadori, G.; Teodoro, J.S. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 675–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pacholec, M.; Bleasdale, J.E.; Chrunchy, B.; Cunningham, D.; Flynn, D.; Garofalo, R.S.; Griffith, D.; Griffor, M.; Loulakis, P.; Pabst, B. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 8340–8351. [[CrossRef](#)]
20. Schirmer, H.; Pereira, T.C.B.; Rico, E.P.; Rosemberg, D.B.; Bonan, C.D.; Bogo, M.R.; Souto, A.A. Modulatory effect of resveratrol on SIRT1, SIRT3, SIRT4, PGC1α and NAMPT gene expression profiles in wild-type adult zebrafish liver. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 3281–3289. [[CrossRef](#)]
21. Milton-Laskibar, I.; Aguirre, L.; Etxeberria, U.; Milagro, F.I.; Martínez, J.A.; Portillo, M.P. Do the effects of resveratrol on thermogenic and oxidative capacities in IBAT and skeletal muscle depend on feeding conditions? *Nutrients* **2018**, *10*, 1446. [[CrossRef](#)]
22. Baur, J.A. Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. *Mech. Ageing Dev.* **2010**, *131*, 261–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Palacios, O.M.; Carmona, J.J.; Michan, S.; Chen, K.Y.; Manabe, Y.; Ward III, J.L.; Goodyear, L.J.; Tong, Q. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 α in skeletal muscle. *Aging* **2009**, *1*, 771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Widlund, A.L.; Baral, K.; Dalgaard, L.T.; Vang, O. Functional Mitochondria Are Important for the Effect of Resveratrol. *Molecules* **2017**, *22*, 847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lin, D.-S.; Kao, S.-H.; Ho, C.-S.; Wei, Y.-H.; Hung, P.-L.; Hsu, M.-H.; Wu, T.-Y.; Wang, T.-J.; Jian, Y.-R.; Lee, T.-H. Inflexibility of AMPK-mediated metabolic reprogramming in mitochondrial disease. *Oncotarget* **2017**, *8*, 73627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Elkalaf, M.; Anděl, M.; Trnka, J. Low glucose but not galactose enhances oxidative mitochondrial metabolism in C2C12 myoblasts and myotubes. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Barazzoni, R.; Zanetti, M.; Bosutti, A.; Biolo, G.; Vitali-Serdoz, L.; Stebel, M.; Guarneri, G. Moderate caloric restriction, but not physiological hyperleptinemia per se, enhances mitochondrial oxidative capacity in rat liver and skeletal muscle—tissue-specific impact on tissue triglyceride content and AKT activation. *Endocrinology* **2005**, *146*, 2098–2106. [[CrossRef](#)]
28. Cerletti, M.; Jang, Y.C.; Finley, L.W.; Haigis, M.C.; Wagers, A.J. Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 515–519. [[CrossRef](#)]
29. Lopes Costa, A.; Le Bachelier, C.; Mathieu, L.; Rotig, A.; Boneh, A.; De Lonlay, P.; Tarnopolsky, M.A.; Thorburn, D.R.; Bastin, J.; Djouadi, F. Beneficial effects of resveratrol on respiratory chain defects in patients' fibroblasts involve estrogen receptor and estrogen-related receptor alpha signaling. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 2106–2119. [[CrossRef](#)]
30. Mizuguchi, Y.; Hatakeyama, H.; Sueoka, K.; Tanaka, M.; Goto, Y.-i. Low dose resveratrol ameliorates mitochondrial respiratory dysfunction and enhances cellular reprogramming. *Mitochondrion* **2017**, *34*, 43–48. [[CrossRef](#)]
31. Douiev, L.; Soiferman, D.; Alban, C.; Saada, A. The effects of ascorbate, N-acetylcysteine, and resveratrol on fibroblasts from patients with mitochondrial disorders. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 1. [[CrossRef](#)]
32. De Paepe, B.; Van Coster, R. A critical assessment of the therapeutic potential of resveratrol supplements for treating mitochondrial disorders. *Nutrients* **2017**, *9*, 1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Higashida, K.; Kim, S.H.; Jung, S.R.; Asaka, M.; Holloszy, J.O.; Han, D.-H. Effects of resveratrol and SIRT1 on PGC-1 α activity and mitochondrial biogenesis: A reevaluation. *PLoS Biol.* **2013**, *11*, e1001603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zheng, J.; Ramirez, V.D. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 1115–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zini, R.; Morin, C.; Bertelli, A.; Bertelli, A.A.; Tillement, J. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1999**, *25*, 87–97. [[PubMed](#)]
36. Joseph, A.-M.; Rungi, A.A.; Robinson, B.H.; Hood, D.A. Compensatory responses of protein import and transcription factor expression in mitochondrial DNA defects. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *286*, C867–C875. [[CrossRef](#)]
37. Gerhart-Hines, Z.; Rodgers, J.T.; Bare, O.; Lerin, C.; Kim, S.H.; Mostoslavsky, R.; Alt, F.W.; Wu, Z.; Puigserver, P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* **2007**, *26*, 1913–1923. [[CrossRef](#)]
38. Tauriainen, E.; Luostarinen, M.; Martonen, E.; Finckenberg, P.; Kovalainen, M.; Huotari, A.; Herzig, K.-H.; Lecklin, A.; Mervaala, E. Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and fatty liver formation. *J. Nutr. Metab.* **2011**, *2011*, 525094. [[CrossRef](#)]
39. Hill, B.G.; Benavides, G.A.; Lancaster, J.R., Jr.; Ballinger, S.; Dell'Italia, L.; Jianhua, Z.; Darley-Usmar, V.M. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol. Chem.* **2012**, *393*, 1485–1512. [[CrossRef](#)]
40. Abeliovich, H.; Dengjel, J. Mitophagy as a stress response in mammalian cells and in respiring *S. cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 541–545. [[CrossRef](#)]



Supplementary Materials:

The effect of resveratrol on mitochondrial function in Myoblasts of patients with the common m.3243A>G mutation

Leila Motlagh Scholle, , Helena Schieffers, SamiyaAl-Robaiy, Annemarie Thaele, Faramarz Dehghani, Diana Lehmann Urban, and Stephan Zierz

Table 1. Comparison of the mean values of basal (BR), maximal respiration (MR), ATP production and spare respiratory capacity (SRC) measured under normal (N) or restricted (R) conditions in patients (n=5) and controls (n=5). *p* values are only shown in case of significant differences between two conditions. -RSV = without RSV.

Controls									
	-RSV			10 μM RSV			20 μM RSV		
	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value
Basal	59.24	14.19	<0.0001	56.11	18.91	<0.0001	45.44	24.84	<0.0001
MR	212.3	78.04	<0.0001	191.3	87.21	<0.0001	190.4	103.8	<0.0001
SRC	156.4	57.88	<0.0001	135.2	68.79	0.0006	137.3	79.22	<0.01
ATP	45.64	10.67	<0.0001	40.39	18.9	<0.0001	37.24	24.84	0.0005

Patients									
	-RSV			10 μM RSV			20 μM RSV		
	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value	N (mean)	R (mean)	<i>p</i> value
Basal	41.71	16.52	<0.0001	39.19	23.8	<0.0001	35.44	21	0.0004
MR	153.3	66.87	<0.0001	169.2	81.92	<0.0001	164	71.5	<0.0001
SRC	144.1	50.34	<0.0001	115.8	62.84	0.02	116.8	48.38	<0.0001
ATP	33.51	12.45	<0.0001	28.82	23.8		29.4	21	0.02

Table 2. Relative expression rates of the genes *SIRT1*, *SIRT3*, *PGC-1 α* , *Nrf1* and *Tfam* in myoblasts between patients (n=5) and controls (n=5) under normal (N) or restricted (R) conditions. *p* values are only shown in case of significant difference between patients and controls. -RSV = without RSV.

N conditions									
	-RSV			10 μM RSV			20 μM RSV		
	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value
SIRT1	0.56	1.26		2.65	2.463		0.84	0.67	
SIRT3	0.4	0.77		1.77	1.49		1.07	0.57	
PGC-1 α	0.3	0.27		1.41	0.94		0.45	0.54	
Nrf1	0.57	0.93		2.68	1.21	0.04	1.16	0.9	
Tfam	2.99	2.71		12.44	8.34	0.01	4.96	1.53	0.03

R conditions									
	-RSV			10 μM RSV			20 μM RSV		
	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value	Controls (mean)	Patients (mean)	<i>p</i> value
SIRT1	2.04	3.19		0.82	0.95		7.1	5.82	
SIRT3	2.1	2.9		1.47	1.36		3.46	1.45	0.003
PGC-1 α	17.8	4.7	<0.0001	8.3	3.78	0.005	19.97	4.43	<0.0001
Nrf1	1.87	2.97		0.77	0.79		3.51	3.7	
Tfam	4.45	4.4		2.67	2.27		7.55	2.7	0.002

Article

Palmitate but Not Oleate Exerts a Negative Effect on Oxygen Utilization in Myoblasts of Patients with the m.3243A>G Mutation: A Pilot Study

Leila Motlagh Scholle ^{1,*}, Helena Schieffers ¹, Samiya Al-Robaiy ², Annemarie Thaele ¹, Diana Lehmann Urban ³ and Stephan Zierz ¹

¹ Department of Neurology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany; helena@schieffers.de (H.S.); annemarie.thaele@uk-halle.de (A.T.); stephan.zierz@medizin.uni-halle.de (S.Z.)

² Center for Basic Medical Research, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany; samiya.al-robaiy@uk-halle.de

³ Department of Neurology, Ulm University, 89070 Ulm, Germany; diana.lehmann@rku.de

* Correspondence: Leila.scholle@medizin.uni-halle.de; Tel.: +49-345-557-3628; Fax: +49-345-557-3505

Received: 5 August 2020; Accepted: 15 September 2020; Published: 16 September 2020



Abstract: It is known that exposure to excess saturated fatty acids, especially palmitate, can trigger cellular stress responses interpreted as lipotoxicity. The effect of excessive free fatty acids on oxidative phosphorylation capacity in myoblasts of patients with the m.3243A>G mutation was evaluated with the mitochondrial (Mito) stress test using a Seahorse XF96 analyzer. β -oxidation, measured with the Seahorse XF96 analyzer, was similar in patients and controls, and reduced in both patients and controls at 40 °C compared to 37 °C. Mito stress test in the absence of fatty acids showed lower values in patients compared to controls. The mitochondrial activity and ATP production rates were significantly reduced in presence of palmitate, but not of oleate in patients, showing a negative effect of excessive palmitate on mitochondrial function in patients. Diabetes mellitus is a frequent symptom in patients with m.3243A>G mutation. It can be speculated that the negative effect of palmitate on mitochondrial function might be related to diacylglycerols (DAG) and ceramides (CER) mediated insulin resistance. This might contribute to the elevated risk for diabetes mellitus in m.3243A>G patients.

Keywords: fatty acid oxidation; palmitate; oleate; m.3243A>G mutation

1. Introduction

Fatty acid oxidation (FAO) provides the major source of energy supply for skeletal muscles in situations requiring simultaneous glucose sparing, and major energy supply, such as prolonged fasting or exercise. β -oxidation is the main pathway of fatty acid catabolism in mitochondria [1]. The accumulation of oversupplied fatty acids (FAs) in different tissues, such as the pancreas, liver, and skeletal muscle, might lead to a cellular dysfunction in these tissues, and an apoptotic cell death, commonly referred to as “lipotoxicity” [2,3]. The toxic effects of FAs seem to be dependent on their chain length and degree of saturation. The two-common long-chain saturated FAs (SFA), palmitate (C16:0) and stearate (C18:0), are known to be the most lipotoxic ones. In contrast, monounsaturated FAs such as oleate (C18:1), have been reported to protect against the above-mentioned SFA-induced toxicity [2,4]. Moreover, saturated FAs have worsened the insulin-resistance, while monounsaturated and polyunsaturated ones improved it [5].

The effect of temperature on the functional properties of skeletal rat muscle mitochondria was reported in one study [6]. Increasing the assay temperature in above-mentioned study within the range of 25–42 °C increased the mitochondrial respiratory chain activities, resulting in an elevated

phosphorylation rate. They reported a temperature-induced decrease in oxidative phosphorylation (OXPHOS) efficiency as well.

It has been shown that the increase of temperature from 35 °C to 40 °C induced the uncoupling of substrate oxidation from adenosine diphosphate (ADP) phosphorylation, and decreased the efficiency of mitochondria to produce adenosine triphosphate (ATP) in skeletal myofibers. This uncoupling effect was more pronounced for FAs than for carbohydrates as substrate [7]. It is already known that a reduction in substrate oxidation, caused by mitochondrial dysfunctions, leads to a lipid accumulation, such as the deposition of lipid mediators, such as diacylglycerols (DAG) and ceramides (CER). Both, DAG and CER are reported to inhibit insulin signaling [8–10].

The m.3243A>G point mutation in the *MT-TL1* gene (encoding mt-tRNA^{Leu(UUR)}) can be found in approximately 80% of patients with mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes (MELAS)-syndrome. In these patients, the ATP production rate was significantly less than in controls [11] and the mitochondrial respiration is known to be impaired [12]. Diabetes mellitus frequently accompanies the m.3243A>G mutation [13]. Thus, the evaluation of effects of saturated free fatty acids (FFAs), which could lead to an insulin resistance, might be relevant for these patients.

The aim of the present study was to evaluate the oxidative phosphorylation and β -oxidation pathway in patients harboring the m.3243A>G mutation. It was of interest to examine whether palmitate and oleate show a toxic or protective effect on OXPHOS in myoblasts of patients with the m.3243A>G mutation. Moreover, the effect of a fever-stimulating temperature on β -oxidation was simulated in 40 °C cultured cells in both, m.3243A>G patients and controls.

2. Materials and Methods

2.1. Human Myoblasts

Muscle primary cells from five patients harboring the genetically confirmed m.3243A>G mutation and 5 controls were provided by the Muscle Tissue Culture Collection (MTCC) at the Friedrich-Baur-Institute (Department of Neurology, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany; part of the German network on muscular dystrophies, MD-NET, partner of EuroBioBank) [14].

Cells were collected and processed by MTCC in compliance with all applicable laws, rules, regulations, and other requirements of any applicable governmental authority. The cells were grown in skeletal muscle cell growth medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Further details are given in Table 1 and as described earlier [12]. As controls served 5 patients (2 males, 3 females), who had muscle biopsy for diagnosis of a suspected neuromuscular disorder. They were deemed 'normal controls' if they were ultimately found to have no muscle disease by combined clinical and histological criteria. Age of controls ranged from 35 to 53 years.

Table 1. Sex and age of five patients with genetically confirmed m.3243A>G mutation and five healthy controls as previously described [12], F: female, M: male.

	Gender	Age at Biopsy
Patients		
P 1	M	43
P 2	M	42
P 3	F	70
P 4	M	34
P 5	F	40
Controls		
C 1	F	50
C 2	M	53
C 3	F	40
C 4	M	35
C 5	F	49

2.2. Metabolic Function Measurements with the Seahorse XF96 Cell Analyzer

2.2.1. Mito Stress Test

To evaluate mitochondrial function, the Mito Stress test was performed using a Seahorse XF96 Cell Analyzer according to the manufacturer's recommendations. Briefly, myoblasts from patients and controls were seeded to Seahorse XF96 cell culture microplates (2.5×10^4 cells per well) in skeletal muscle cell growth medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). After a 24-h incubation at 37 °C, the cells were washed twice with a pre-warmed assay medium (XF base medium supplemented with 10 mM glucose, 2 mM glutamine, and 1 mM sodium pyruvate; pH 7.4).

Oxygen-consumption rate (OCR) values were simultaneously measured following sequential injections of inhibitors of mitochondrial oxidative phosphorylation: (I) oligomycin (2 μ M), an ATP synthase inhibitor; (II) carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 2 μ M), an uncoupler; (III) antimycin A (0.5 μ M) (inhibitor of complex III) and (IV) rotenone (0.5 μ M) (inhibitor of complex I), inhibiting uncoupled respiration. Key parameters of mitochondrial function such as basal respiration (BR), ATP production rate (ATP-R) and spare respiratory capacity (SRC) were analyzed using the above-described measurements. The data was normalized to cell numbers by measurement of Hoechst dye staining of nuclei with excitation and emission wavelengths 355 nm and 465 nm using a Tecan Infinite TM M1000 and plotted as OCR (pmol/min/U fluorescence/well \pm SD), accordingly.

The Effect of FFAs on the Mitochondrial Respiration

To test the effect of FFAs on the mitochondrial respiration, patient and control myoblasts were plated (as described in Section 2.2.1) 16 h prior to Mito stress test measurements, Bovine serum albumin (BSA)-conjugated palmitic acid or oleic acid (ratio FFA: BSA = 6:1) was added to the media. The final concentration of oleate or palmitate was 300 μ M. Comparable amounts of BSA were added in the untreated group.

2.2.2. Fatty Acid Oxidation

To assess the ability of myoblasts to oxidize exogenous fatty acids, the oxygen-consumption rate (OCR) was analyzed using a XF96 Cell Analyzer according to the manufacturer's protocol (Seahorse Bioscience). For this purpose, the myoblast of patients and controls were plated (as described in Section 2.1) 16-h prior to measurements, growth medium was replaced by substrate-limited medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 0.5 mM glucose, 1.0 mM glutamine, 0.5 mM carnitine, and 1% FBS) and incubated at 37 °C or 40 °C. Moreover, 45 min before the beginning of OCR measurement, the medium was changed into pre-warmed FAO Assay Medium (111 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.0 mM MgSO₄, 1.2 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM glucose, 0.5 mM carnitine, and 5 mM HEPES). Just before measurements, palmitic acid or oleic acid were added to a final concentration of 167 μ M total FA (bound in a 6:1 molar ratio to BSA) as substrate. The data were normalized to cell numbers.

All Seahorse experiments were repeated at least twice. All data shown are the means \pm SD of at least 3 different wells per group.

All chemicals used for these assays were obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

2.3. Statistical Analysis

Statistical analysis, calculation, and visualization were performed using Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Analysis of correlation was carried out using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. Significance was set at $p = 0.05$. The statistical tests chosen were predetermined by the size of the study group and the numerical range of values.

2.4. Ethical Statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the local Ethical Committee of the Medical Faculty of Martin Luther University of Halle-Wittenberg (Project identification codes 215/20.01.10/3 and 2020-019).

3. Results

3.1. Metabolic Function Measurements with the Seahorse XF96 Cell Analyzer

3.1.1. Mito Stress Test

Without any additional FAs, almost all important parameters of mitochondrial function, such as basal respiration (BR), maximal respiration (MR) and spare respiratory capacity (SRC) were significantly lower in patients compared to controls. Only the ATP linked respiration rate (ATP-R) was not significantly different in patients and controls (Figure 1, Table 2).

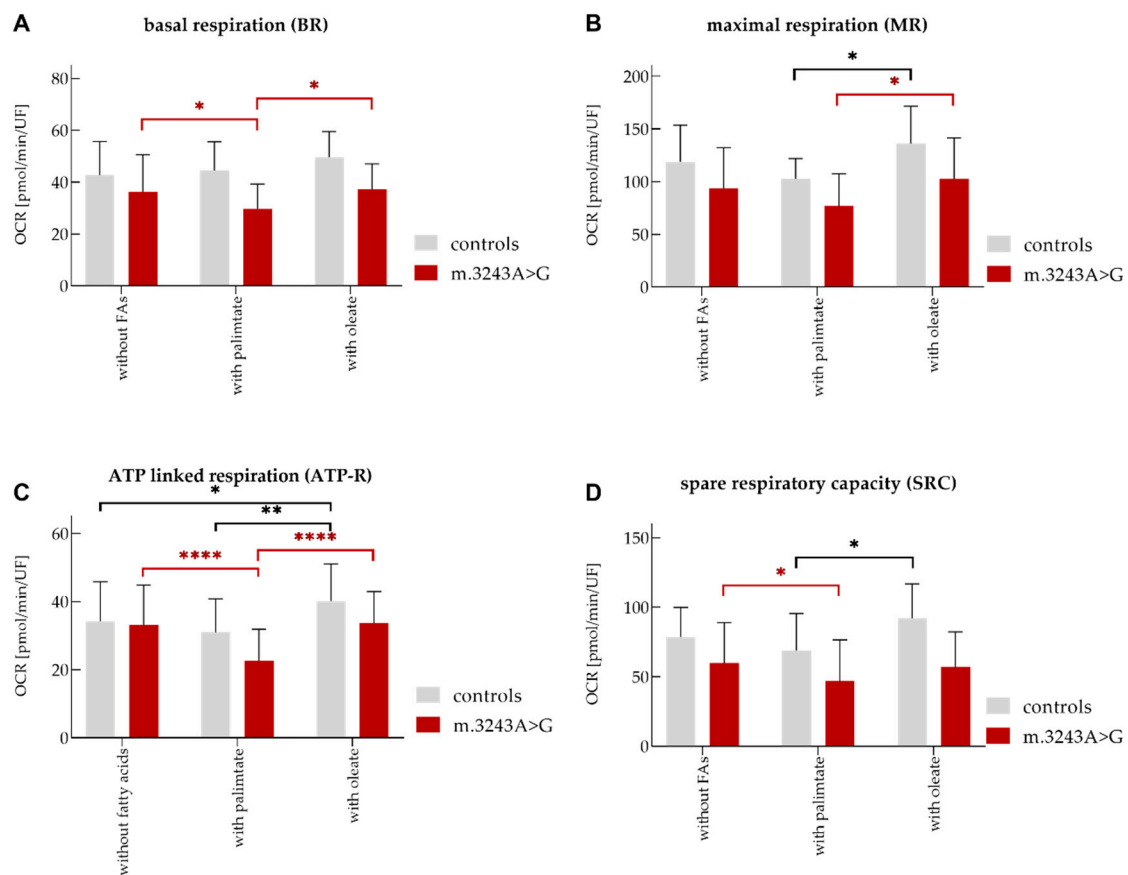


Figure 1. Evaluation of mitochondrial function using a Seahorse XF96 Cell Analyzer in myoblasts from patients ($n = 5$) and controls ($n = 5$). Key parameters of mitochondrial function were analyzed as described in methods. (A) basal respiration (BR), (B) maximal respiration (MR), (C) ATP linked respiration (ATP-R), and (D) spare respiratory capacity (SRC). In some experiments, FAs oleate or palmitate were added as excessive nutrients. The significant differences between patients and controls are presented in Table 2. The significance between values without FAs or after treatment with them is only shown if there are significant differences: * = p -values ≤ 0.05 , ** = p -values ≤ 0.01 , **** = p -values ≤ 0.0001 . OCR: oxygen consumption rate, FAs: Fatty acids, UF: unit fluorescence/well.

Table 2. Comparison of the mean values of key parameters for mitochondrial function (basal, MR, ATP production, and SRC) in myoblasts of patients ($n = 5$) and controls ($n = 5$) with or without 300 μM palmitate or oleate. Significant differences between patients and controls are shown if $p \leq 0.05$.

	Mito Stress Test								
	+Palmitate						+Oleate		
	Controls (Mean)	Patients (Mean)	<i>p</i> -Value	Controls (Mean)	Patients (Mean)	<i>p</i> -Value	Controls (Mean)	Patients (Mean)	<i>p</i> -Value
Basal	42.7	36.3	0.004	44.5	29.7	<0.0001	49.6	37.3	0.0006
MR	118.9	93.6	<0.0001	102.6	76.7		136	102.7	0.002
SRC	78.6	59.9	0.0003	68.8	46.8	0.006	92.3	56.9	<0.0001
ATP	34.2	33.2		30.9	22.6	0.009	40.2	33.7	0.04

3.1.2. The Effect of FFAs on Mitochondrial Respiration

Differences between Patients and the Controls

After treatment of myoblasts with palmitate or oleate, the key respiratory parameters BR and SRC were still significantly higher in controls compared to patients. MR was significantly higher in controls than in patients only upon addition of oleate (Table 2).

The Effect of Palmitate

The treatment of patient's myoblasts with palmitate for 16 h prior to measurement led to a significant reduction of BR, SRC, and ATP-R values compared to the values without FFAs. In contrast, controls showed similar BR, MR, SRC, and ATP-R values to those without FFAs after treatment with palmitate (Figure 1, Table 3).

Table 3. The effect of treatment of patients ($n = 5$) and controls ($n = 5$) myoblasts with 300 μM palmitate or oleate conjugated with BSA on key parameters for mitochondrial function (basal, MR, ATP production and SRC). Significant differences between values obtained with or without FFAs are presented if $p \leq 0.05$. *p*: *p*-values, -FFAs: without Fatty acids, Pa: palmitate. O: oleate.

	Controls							
	-FFAs (Mean)	Pa (Mean)	<i>p</i> . -FFAs/Pa (Mean)	O (Mean)	<i>p</i> . -FFAs/O (Mean)	Pa (Mean)	O (Mean)	<i>p</i> . Pa/O (Mean)
Basal	42.7	44.5		49.6		44.5	49.6	
MR	118.9	102.6		136		102.6	136	0.01
SRC	78.6	68.9		92.3		68.9	92.3	0.01
ATP	34.2	30.9		40.2	0.02	30.9	40.2	0.003
	Patients							
	-FFAs (Mean)	Pa (Mean)	<i>p</i> . -FFAs/Pa (Mean)	O (Mean)	<i>p</i> . -FFAs/O (Mean)	Pa (Mean)	O (Mean)	<i>p</i> . Pa/O (Mean)
Basal	36.3	29.7	0.03	37.3		29.7	37.3	0.04
MR	93.6	76.7		102.7		76.7	102.7	0.02
SRC	59.9	46.8	0.04	56.9		46.8	56.9	
ATP	33.2	22.6	<0.0001	33.7		22.6	33.7	<0.0001

The Effect of Oleate

The treatment of cells with oleate only led to a significant increase of ATP-R in controls compared to the values without FFAs. However, BR, MR, and SRC remained unchanged (Figure 1, Table 3).

BR was significantly higher in patients in presence of oleate compared to those in presence of palmitate. MR and ATP-R were higher in both patients and controls after treatment of the cells with oleate, compared to values in presence of palmitate (Table 3).

3.1.3. Fatty Acid Oxidation (FAO)

The Difference between Patients and the Controls

Independent of the applied substrate (oleate or palmitate), MR, ATP-R, and SRC were similar in patients and controls at 37 °C and 40 °C. BR was higher in controls than in patients, however, only at 37 °C and in presence of palmitate (Figure 2, Table 4). The increase of temperature from 37 °C to 40 °C led to a significant decrease in all key parameters (BR, MR, ATP-R, and SRC) in both, patients and controls (Table 5).

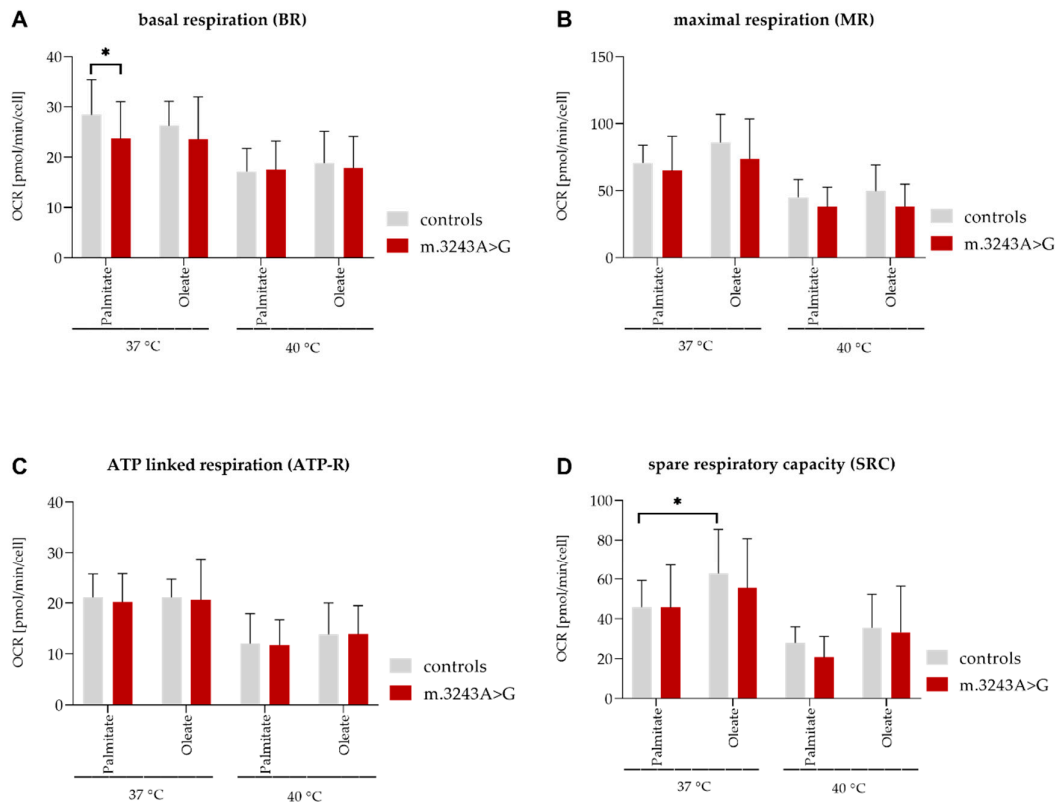


Figure 2. Evaluation of β -oxidation using a Seahorse XF96 Cell Analyzer in myoblasts from patients ($n = 5$) and controls ($n = 5$). The measurements were performed at 37 °C or 40 °C as described in methods. (A) basal respiration (BR), (B) maximal respiration (MR), (C) ATP linked respiration (ATP-R), and (D) spare respiratory capacity (SRC) by use of palmitate or oleate as substrate. BR, MR, ATP-R, and SRC (key parameters) were significantly reduced upon increased temperature from 37 °C to 40 °C in both patients and controls (significance shown in Table 5) * = p -values ≤ 0.05 . OCR: oxygen consumption rate, UF: unit fluorescence/well.

Table 4. Measurement of β -oxidation using a Seahorse XF96 Cell Analyzer in myoblasts of patients ($n = 5$) and controls ($n = 5$) with palmitate or oleate as substrate at 37 °C and 40 °C. Significance was set at $p = 0.05$. FAO: fatty acid oxidation.

FAO 37 °C						
	Palmitate as Substrate			Oleate as Substrate		
	Controls (Mean)	Patients (Mean)	p -Value	Controls (Mean)	Patients (Mean)	p -Value
Basal	28.4	23.7	0.04	26.3	23.5	
MR	70.7	64.9		85.9	73.7	
SRC	46	45.7		62.8	55.5	
ATP	21.1	20.2		21.1	20.6	

Table 4. Cont.

FAO 40 °C						
	Palmitate as Substrate			Oleate as Substrate		
	Controls (Mean)	Patients (Mean)	<i>p</i> -Value	Controls (Mean)	Patients (Mean)	<i>p</i> -Value
Basal	17.2	17.5		18.8	17.9	
MR	45.1	38		49.5	44.3	
SRC	28	20.8		35.5	33.3	
ATP	12	11.7		13.9	13.9	

Table 5. Evaluation of β -oxidation using a Seahorse XF96 Cell Analyzer in myoblasts of patients ($n = 5$) and controls ($n = 5$) with palmitate or oleate as substrate. The difference between values obtained at 37 °C and 40 °C is shown if the results were significant (p -values ≤ 0.05).

Controls						
	Palmitate as Substrate			Oleate as Substrate		
	37 °C (Mean)	40 °C (Mean)	<i>p</i> -Value	37 °C (Mean)	40 °C (Mean)	<i>p</i> -Value
Basal	28.4	17.2	<0.0001	26.3	18.8	0.005
MR	70.7	45.1	0.006	85.9	49.5	<0.0001
SRC	46	28	0.05	62.8	35.5	0.0002
ATP	21.1	12	<0.0001	21.1	13.9	0.001
Patients						
	Palmitate as Substrate			Oleate as Substrate		
	37 °C (Mean)	40 °C (Mean)	<i>p</i> -Value	37 °C (Mean)	40 °C (Mean)	<i>p</i> -Value
Basal	23.7	17.5	0.02	23.5	17.9	0.04
MR	64.9	38	0.0006	73.7	44.3	0.0003
SRC	45.7	20.8	0.0006	55.5	33.3	0.003
ATP	20.2	11.7	<0.0001	20.6	13.9	0.004

The Difference between Palmitate and Oleate

The important parameters BR, MR, ATP-R, and SRC were mostly similar with palmitate or oleate as substrate. Only SRC was higher in controls in the presence of oleate as substrate compared to the value resulted from palmitate as substrate at 37 °C (Table 6).

Table 6. Evaluation of β -oxidation using a Seahorse XF96 Cell Analyzer at 37 °C and 40 °C in myoblasts of patients ($n = 5$) and controls ($n = 5$) with palmitate or oleate as substrate. The difference between values obtained using palmitate or oleate as substrate is shown if the results were significant (p -values ≤ 0.05), Pa: palmitate. O: oleate.

FAO 37 °C						
	Controls			Patients		
	Pa (Mean)	O (Mean)	<i>p</i> -Value	Pa (Mean)	O (Mean)	<i>p</i> -Value
Basal	28.4	26.3		23.7	23.5	
MR	70.7	85.9		64.9	73.7	
SRC	46	62.8	0.04	45.7	55.5	
ATP	21.1	21.1		20.2	20.6	
FAO 40 °C						
	Controls			Patients		
	Pa (Mean)	O (Mean)	<i>p</i> -Value	Pa (Mean)	O (Mean)	<i>p</i> -Value
Basal	17.2	18.8		17.5	17.9	
MR	45.1	49.5		38	44.3	
SRC	28	35.5		20.8	33.3	
ATP	12	13.9		11.7	13.9	

4. Discussion

Mutations of the mitochondrial DNA (mtDNA) involve different organs. These genetic changes can affect the translation of mtDNA-encoded proteins, including respiratory chain complexes [15,16]. The m.3243A>G mutation has been described to be of strong diabetogenic nature [17]. Elevated FFAs are discussed to be a major cause of insulin resistance in skeletal muscle and liver [18].

It is generally accepted, that saturated FAs like palmitate induce insulin resistance, whereas the monounsaturated ones like oleate increase insulin sensitivity in diabetic patients and healthy individuals [4]. It has been shown, that oleate, but not palmitate, increased the expression of genes related to the FAO pathway in a sirtuin (Sirt)1-peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC)-1 α dependent manner. This, in turn, led to an increase in complete FA oxidation in mice skeletal muscle [19]. There are other reports about the preventive effect of oleate on saturated-fatty-acid-induced endoplasmic reticulum (ER) stress, inflammation, and insulin resistance through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK). In the above-mentioned study, oleate, in contrast to palmitate, did not increase the levels of ER stress markers, which is involved in the link between lipid-induced inflammation and insulin resistance [20].

In the present study, taking palmitate as standard substrate for FAO measurements and oleate as a comparison, the data showed generally similar β -oxidation rates in m.3243A>G patients and controls. Both, patients and controls showed decreased parameters in this pathway at 40 °C compared to 37 °C. ATP-R was reduced to about 35–45% at 40 °C compared to that at 37 °C for both, patients and controls.

Using glucose as substrate for the Mito stress test, all key parameters of mitochondrial respiration were significantly lower in patients than in controls.

The long-chain FFAs are poorly soluble in aqueous solutions. Moreover, in vitro exposure to high levels of FFAs might lead to lipotoxicity and cellular dysfunction [21,22]. The FFAs used in the present study were conjugated with BSA in all experiments (ratio FFA: BSA = 6:1).

The treatment of fibroblasts from healthy controls with palmitic acid for 16 h prior to OCR measurement has been reported to significantly increase the MR and SRC for about 20% and 45%, accordingly [23]. However, oleic acid displayed no effect on OCR in the above-mentioned study. In the present study, the extra addition of FFAs oleate and palmitate affected the OCR key parameters in Mito stress test differently. While oleate generally showed positive effects on OXPHOS values, palmitate had an impaired them. Considering the values obtained in presence of FFAs excess, oleate seemed to show a slightly positive effect on respiratory factors in patients. After addition of oleate, ATP-R was about 30% higher in controls compared to the values with palmitate. In contrast, the negative effect of palmitate excess was significant in patients. MR and ATP-R were reduced about 17% and 30% in patients after addition of palmitate, accordingly.

The different effects in myoblasts in presence of oleate and palmitate could be explained as follows: before performance of FAO measurements, the cells are cultured for 16 h in a nutrient restricted medium (Section 2.2.2). Thus, the cells are forced to take the FFAs as the only present substrate to survive. On the other hand, by Mito stress test, the cells have sufficient nutrients and the added FFAs (oleate and palmitate) count as excessive substrates. FFAs are the major energy source for skeletal muscle. However, the balance between energy demand, uptake, and β -oxidation of FFAs should be regulated. An imbalance between fatty acid uptake and β -oxidation might lead to an insulin resistance [24]. The elevated lipid levels, which exceed the cell's capacity to store or utilize FFAs, can, as well, lead to a lipotoxic response to activate stress pathways and apoptosis. For β -oxidation in mitochondria, both, saturated and unsaturated long-chain FFAs are used as substrate. However, only long-chain saturated fatty acyl CoAs serve as substrates for de novo ceramide synthesis, which is involved in initiation of apoptosis [25].

A reduction in palmitic acid, but not in oleic acid oxidation, has been reported in myotubes of patients with diabetes type II compared to controls [26]. It has been shown that monounsaturated fatty acids, such as oleic acid, are metabolized and then accumulated in the form of low-toxic triacylglycerol (TAG). However, a large amount of palmitate inhibits the TAG synthesis at the DAG stage, which leads

to the accumulation of DAG in the cell [27,28]. Based on these findings, a substitution of palmitate and other saturated or unsaturated FFAs has been recommended in patients with diabetes type II to reduce the accumulation of DAG and TAG to not promote insulin resistance [26].

The data confirmed the reported negative effect of palmitate on respiratory function of cells. This negative effect was more pronounced in m.3243A>G patients, which led to approximately 30% reduction of ATP production. The controls seemed to benefit slightly more than patients from the positive effect of oleate clearing the excess of saturated FAs via increasing the FA Oxidation. This counteracts with inflammation and insulin resistance in skeletal muscle [19]. Nevertheless, this positive effect should be noticed for keeping the balance of the body weight in over nutrition or pathological states, such as mitochondrial disorders.

An induced mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in skeletal muscle cells have been reported upon supplementation of palmitate, but not of oleate. Oleate should even have a protective benefit against palmitate-induced insulin resistance and might enhance the mitochondrial function, protecting against apoptosis, and increasing insulin sensitivity [29]. The analysis of potential apoptosis and ROS production might be evaluated in upcoming projects.

5. Conclusions

The data in the present study showed different effects of palmitate and oleate on oxygen utilization in myoblasts of both m.3243A>G patients and controls. The myoblasts, indeed, showed similar β -oxidation values using palmitate or oleate as substrate. However, the presence of excessive palmitate showed a negative effect on respiratory rates of patients. This could confirm the already reported negative effect of excessive palmitate on mitochondrial function in other studies. Since saturated fatty acids increase the insulin resistance, these results might reveal why the patients harboring the m.3243A>G mutation have a higher risk for developing of diabetes type II.

Limitations: the study was performed on a small study population. In particular, in the case of the 70-year-old patient listed in the cohort, the aging might have an effect on mitochondrial dysfunction. However, it has to be noticed that mitochondrial diseases are rare diseases with a huge variety of mutations and the present study should be considered as a pilot one; it is not always responsible to perform a tissue/muscle biopsy. It is known that patients harboring the m.3243A>G mutation have a higher risk of developing diabetes mellitus. However, in the present study, only one patient is diagnosed with diabetes mellitus (Patient P1).

Author Contributions: Conceptualization, L.M.S., H.S., S.Z.; methodology, L.M.S., H.S., S.A.-R., A.T.; software, L.M.S., D.L.U., H.S., S.A.-R.; data curation, L.M.S., D.L.U., H.S., S.A.-R.; writing—original draft preparation, L.M.S., D.L.U.; writing—review and editing, L.M.S., H.S., S.A.-R., A.T.; D.L.U.; S.Z.; project administration, L.M.S., S.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: D.L.U. is funded by the Hertha-Nathorff-Programm (HNP) of the Medical University of Ulm, Germany.

Acknowledgments: We thank the Muscle Tissue Culture Collection (MTCC) at the University Hospital of Munich Muenchen for providing the samples, and Julia Emmerich for excellent technical assistance. The Muscle Tissue Culture Collection is part of the German network on muscular dystrophies (MD-NET) and the German network for mitochondrial disorders (mito-NET, 01GM1113A) funded by the German Ministry of Education and Research (BMBF, Bonn, Germany). The Muscle Tissue Culture Collection is a partner of EuroBioBank (www.eurobiobank.org) and TREAT-NMD (www.treat-nmd.eu). L.M.S., D.L.U., and S.Z. are members of the German mitoNET funded by the German Ministry of Education and Research. We thank the Center of Basic Medical Research (ZMG) of the medical school at the University of Halle-Wittenberg for providing the Seahorse device. We acknowledge the financial support within the funding program Open Access Publishing by the German Research Foundation (DFG).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bonnefont, J.P.; Demaugre, F.; Prip-Buus, C.; Saudubray, J.M.; Brivet, M.; Abadi, N.; Thuillier, L. Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol. Genet. Metab.* **1999**, *68*, 424–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Henique, C.; Mansouri, A.; Fumey, G.; Lenoir, V.; Girard, J.; Bouillaud, F.; Prip-Buus, C.; Cohen, I. Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 36818–36827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Turpin, S.M.; Lancaster, G.I.; Darby, I.; Febbraio, M.A.; Watt, M.J. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, *291*, E1341–E1350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Coll, T.; Eyre, E.; Rodríguez-Calvo, R.; Palomer, X.; Sánchez, R.M.; Merlos, M.; Laguna, J.C.; Vázquez-Carrera, M. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 11107–11116. [[CrossRef](#)]
5. Riccardi, G.; Giacco, R.; Rivellesse, A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* **2004**, *23*, 447–456. [[CrossRef](#)]
6. Jarmuszkiewicz, W.; Woyda-Ploszczyca, A.; Koziel, A.; Majerczak, J.; Zoladz, J.A. Temperature controls oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production through uncoupling in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *83*, 12–20. [[CrossRef](#)]
7. Tardo-Dino, P.-E.; Touron, J.; Baugé, S.; Bourdon, S.; Koulmann, N.; Malgoyre, A. The effect of a physiological increase in temperature on mitochondrial fatty acid oxidation in rat myofibers. *J. Appl. Physiol.* **2019**, *127*, 312–319. [[CrossRef](#)]
8. Montgomery, M.K.; Turner, N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: An update. *Endocr. Connect.* **2015**, *4*, R1–R15. [[CrossRef](#)]
9. Bruce, C.R.; Risis, S.; Babb, J.R.; Yang, C.; Kowalski, G.M.; Selathurai, A.; Lee-Young, R.S.; Weir, J.M.; Yoshioka, K.; Takuwa, Y. Overexpression of sphingosine kinase 1 prevents ceramide accumulation and ameliorates muscle insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* **2012**, *61*, 3148–3155. [[CrossRef](#)]
10. Samuel, V.T.; Petersen, K.F.; Shulman, G.I. Lipid-induced insulin resistance: Unravelling the mechanism. *Lancet* **2010**, *375*, 2267–2277. [[CrossRef](#)]
11. Lin, D.-S.; Kao, S.-H.; Ho, C.-S.; Wei, Y.-H.; Hung, P.-L.; Hsu, M.-H.; Wu, T.-Y.; Wang, T.-J.; Jian, Y.-R.; Lee, T.-H. Inflexibility of AMPK-mediated metabolic reprogramming in mitochondrial disease. *Oncotarget* **2017**, *8*, 73627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Motlagh Scholle, L.; Schieffers, H.; Al-Robaiy, S.; Thaele, A.; Dehghani, F.; Lehmann Urban, D.; Zierz, S. The Effect of Resveratrol on Mitochondrial Function in Myoblasts of Patients with the Common m. 3243A>G Mutation. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ohkubo, K.; Yamano, A.; Nagashima, M.; Mori, Y.; Anzai, K.; Akehi, Y.; Nomiyama, R.; Asano, T.; Urae, A.; Ono, J. Mitochondrial gene mutations in the tRNA^{Leu} (UUR) region and diabetes: Prevalence and clinical phenotypes in Japan. *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 1641–1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mora, M.; Angelini, C.; Bignami, F.; Bodin, A.-M.; Crimi, M.; Di Donato, J.-H.; Felice, A.; Jaeger, C.; Karcagi, V.; LeCam, Y. The EuroBioBank Network: 10 years of hands-on experience of collaborative, transnational biobanking for rare diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* **2015**, *23*, 1116–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tan, T.M.; Caputo, C.; Medici, F.; Pambakian, A.L.; Dornhorst, A.; Meeran, K.; Williams, G.R.; Khoo, B. MELAS syndrome, diabetes and thyroid disease: The role of mitochondrial oxidative stress. *Clin. Endocrinol.* **2009**, *70*, 340–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Janssen, G.M.; Hensbergen, P.J.; van Bussel, F.J.; Balog, C.I.; Maassen, J.A.; Deelder, A.M.; Raap, A.K. The A3243G tRNA^{Leu} (UUR) mutation induces mitochondrial dysfunction and variable disease expression without dominant negative acting translational defects in complex IV subunits at UUR codons. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 2472–2481. [[CrossRef](#)]
17. Maassen, J.A.; M't Hart, L.; van Essen, E.; Heine, R.J.; Nijpels, G.; Tafrechi, R.S.J.; Raap, A.K.; Janssen, G.M.; Lemkes, H.H. Mitochondrial diabetes: Molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes* **2004**, *53*, S103–S109. [[CrossRef](#)]
18. Boden, G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: Significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2003**, *111*, 121–124. [[CrossRef](#)]
19. Lim, J.-H.; Gerhart-Hines, Z.; Dominy, J.E.; Lee, Y.; Kim, S.; Tabata, M.; Xiang, Y.K.; Puigserver, P. Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase A-dependent activation of SIRT1-PGC1 α complex. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 7117–7126. [[CrossRef](#)]

20. Salvado, L.; Coll, T.; Gomez-Foix, A.; Salmeron, E.; Barroso, E.; Palomer, X.; Vazquez-Carrera, M. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* **2013**, *56*, 1372–1382. [[CrossRef](#)]
21. Oliveira, A.F.; Cunha, D.A.; Ladriere, L.; Igoillo-Esteve, M.; Bugliani, M.; Marchetti, P.; Cnop, M. In vitro use of free fatty acids bound to albumin: A comparison of protocols. *Biotechniques* **2015**, *58*, 228–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Alsabeeh, N.; Chausse, B.; Kakimoto, P.A.; Kowaltowski, A.J.; Shirihai, O. Cell culture models of fatty acid overload: Problems and solutions. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2018**, *1863*, 143–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Theunissen, T.E.J.; Gerards, M.; Hellebrekers, D.; van Tienen, F.H.; Kamps, R.; Sallevelt, S.; Hartog, E.; Scholte, H.R.; Verdijk, R.M.; Schoonderwoerd, K.; et al. Selection and characterization of palmitic acid responsive patients with an oxphos complex I defect. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 336. [[CrossRef](#)]
24. Zhang, L.; Keung, W.; Samokhvalov, V.; Wang, W.; Lopaschuk, G.D. Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2010**, *1801*, 1–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Brookheart, R.T.; Michel, C.I.; Schaffer, J.E. As a matter of fat. *Cell Metab.* **2009**, *10*, 9–12. [[CrossRef](#)]
26. Gaster, M.; Rustan, A.C.; Beck-Nielsen, H. Differential utilization of saturated palmitate and unsaturated oleate: Evidence from cultured myotubes. *Diabetes* **2005**, *54*, 648–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Montell, E.; Turini, M.; Marotta, M.; Roberts, M.; Noé, V.; Ciudad, C.J.; Macé, K.; Gómez-Foix, A.M. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2001**, *280*, E229–E237. [[CrossRef](#)]
28. Korbecki, J.; Bajdak-Rusinek, K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: An overview of molecular mechanisms. *Inflamm. Res.* **2019**, *68*, 915–932. [[CrossRef](#)]
29. Yuzefovych, L.; Wilson, G.; Rachek, L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: Role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *299*, E1096–E1105. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Heteroplasmy and Copy Number in the Common m.3243A>G Mutation—A Post-Mortem Genotype–Phenotype Analysis

Leila Motlagh Scholle ^{1,*}, Stephan Zierz ¹, Christian Mawrin ², Claudia Wickenhauser ³ and Diana Lehmann Urban ⁴

¹ Department of Neurology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany; stephan.zierz@medizin.uni-halle.de

² Institute of Neuropathology, Otto-von-Guericke University, 39120 Magdeburg, Germany; christian.mawrin@med.ovgu.de

³ Institute of Pathology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06108 Halle (Saale), Germany; claudia.wickenhauser@uk-halle.de

⁴ Department of Neurology, University of Ulm, 89081 Ulm, Germany; diana.lehmann@rku.de

* Correspondence: Leila.scholle@medizin.uni-halle.de; Tel.: +49-345-557-3628; Fax: +49-345-557-3505

Received: 24 January 2020; Accepted: 14 February 2020; Published: 18 February 2020



Abstract: Different mitochondrial DNA (mtDNA) mutations have been identified to cause mitochondrial encephalopathy, lactate acidosis and stroke-like episodes (MELAS). The underlying genetic cause leading to an enormous clinical heterogeneity associated with m.3243A>G-related mitochondrial diseases is still poorly understood. Genotype–phenotype correlation (heteroplasmy levels and clinical symptoms) was analysed in 16 patients (15 literature cases and one unreported case) harbouring the m.3243A>G mutation. mtDNA copy numbers were correlated to heteroplasmy levels in 30 different post-mortem tissue samples, including 14 brain samples of a 46-year-old female. In the central nervous system, higher levels of heteroplasmy correlated significantly with lower mtDNA copy numbers. Skeletal muscle levels of heteroplasmy correlated significantly with kidney and liver. There was no significant difference of heteroplasmy levels between clinically affected and unaffected patients. In the patient presented, we found >75% heteroplasmy levels in all central nervous system samples, without harbouring a MELAS phenotype. This underlines previous suggestions, that really high levels in tissues do not automatically lead to a specific phenotype. Missing significant differences of heteroplasmy levels between clinically affected and unaffected patients underline recent suggestions that there are additional factors such as mtDNA copy number and nuclear factors that may also influence disease severity.

Keywords: MELAS-syndrome; genotype–phenotype correlation; mtDNA heteroplasmy; m.3243A>G

1. Introduction

Mitochondria are involved in various cellular functions, including energy production, metabolic regulation, apoptosis, calcium homeostasis, cell proliferation and motility, as well as free radical generation [1]. Mostly, mitochondria are called the “powerhouse of the cell” as they provide up to 90% of a cell’s adenosine triphosphate (ATP) [2]. The human mitochondrial DNA (mtDNA) is a double-stranded 16.5 kb circle molecule. The mtDNA encodes for 13 essential subunits of the mitochondrial respiratory chain unit, 2 ribosomal mt-RNAs (rRNAs) and 22 mt-tRNAs, which are used for translation of those 13 polypeptides [2,3]. Therefore, mtDNA-mutations may cause respiratory chain (OXPHOS) deficiencies. This might affect any organ, but tissues with high energy consumption, such as brain and muscle, suffer most [4]. Mitochondrial diseases are associated with a wide spectrum

of clinical phenotypes, ranging from mild to severe [5], and can either be caused by mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA) itself or due to mutations of nuclear origin: (I) nuclear genes encoding for enzymes involved in mitochondrial nucleotide synthesis (*TK2*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B*, *DGUOK* and *TYMP*) or (II) those required for mtDNA replication (*POLG* and *TWINK*) [6].

In patients with mtDNA mutations (e.g., m.3243A>G), mutant and wild-type mtDNA molecules coexist within the same cell, which is called heteroplasmy [4]. Patients with higher heteroplasmy levels tend to have more severe disease burden and progression rate; however, disease burden and progression vary greatly between individuals, and the associated clinical spectrum is broad [7]. Furthermore, tissue segregation patterns of m.3243A>G vary widely. Post-mitotic tissues such as muscle have higher levels of mutant mtDNA, whilst levels in blood decrease significantly over time [8]. The mtDNA is present at hundreds to thousands of copies per cell in a tissue-specific manner [1]. mtDNA copy number also varies during aging and disease progression and therefore might be considered as a biomarker that mirrors alterations within the human body [1].

MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactate acidosis and stroke like episodes) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) #540000 is one of the most common neurological diseases of child or adult onset [9]. Approximately 80% of patients with MELAS carry the m.3243A>G point mutation in the *MT-TL1* gene (encoding mt-tRNA^{Leu(UUR)}) [10,11]. The complexity (heteroplasmy and mt-DNA copy number) of mitochondrial diseases explains why no clear genotype–phenotype correlation has been established yet.

Recently, it has been suggested that even nuclear genetic factors might influence the clinical outcome in m.3243A>G-related diseases [8]. A negative significant correlation of skeletal muscle mtDNA copy number with reduced total disease burden has been reported [7]. The same study demonstrated that, although a substantial amount of variation in m.3243A>G-related disease burden remains to be explained, the best correlates are skeletal muscle mtDNA copy number, heteroplasmy and age [7].

The determination of heteroplasmy and mtDNA copy number in all affected tissues of patients would be useful to further investigate a possible correlation of these factors and disease severity. However, the availability of post-mortem tissue is limited. The aim of this study was to investigate a possible correlation between mtDNA copy number and heteroplasmy levels in different tissues with regard to the clinical phenotype. In a post-mortem analysis, we determined the mtDNA/nuclear DNA (nDNA)- ratio and the level of heteroplasmy in 30 different tissue samples of a 46-year-old female (non-MELAS phenotype), including 14 samples of the central nervous system. Furthermore, we collected data from 15 literature cases for further genotype–phenotype analysis.

2. Materials and Methods

2.1. Patient

A 46-year old Caucasian woman presented with a recently diagnosed m.3243A>G mutation (60% level of heteroplasmy in the biceps brachii muscle) without harbouring a MELAS phenotype. Clinical findings included optic neuropathy, sensorineural hearing loss and diabetes mellitus type I. Stroke-like episodes were not reported. Her medical history included intermittent atrial fibrillation, ketoacidosis, pneumogenic sepsis, liver and kidney failure, cor pulmonale and tricuspid and mitral regurgitation. Family history revealed no evidence for neuromuscular disorders. Clinical examination showed pronounced sensorineural hearing loss, generalized tetra paresis (MRC 2–3/5), and muscle tendon reflexes could not be obtained. Serum creatine kinase (CK) levels were normal. Neurophysiological examinations showed evidence for critical-illness polyneuropathy without signs for acute Guillain–Baré Syndrome. Lumbar puncture and brain magnetic resonance imaging (MRI) were not performed, due to the poor general condition.

After 30 days, the patient developed distinct hypokalaemia. In case of suspected sepsis with hypotension and increasing inflammatory values, the patient was transferred to the neurological

intensive care unit. The patient developed a rapid state of shock with pronounced lactate acidosis, acute kidney and liver failure and hypothermia (33°). Thorax and abdominal CT (computed tomography) scan showed no sepsis focus. Calculated antibiotics was initiated, among the inflammatory values, and improved significantly. On haemodialysis, lactate acidosis was also declining. However, the cardiopulmonary situation worsened, and the patient became catecholamine dependent. In addition, the liver enzymes increased, and a plasmatic coagulation was no longer detectable. Echocardiography showed cardiomegaly with decreasing ejection fraction. In the further course, the patient was in need of reanimation, but could be stabilized. The patient quickly developed a pulseless electrical activity, which caused death after resuscitation. Autopsy revealed an acute right-left heart failure with multi-organ failure after re-educating pulmonary embolisms, starting from a multi-stage phlebothrombosis and a parietal thrombosis of the right atrium. Aggravating was an advanced high-grade coronary atherosclerosis with more than 90% stenosis in all main vessels and evidence of diffuse myocardial scars and multi-organ failure, as well as florid purulent bronchopneumonia.

2.2. Literature Cases

Based on a Pubmed literature search, 15 patients harbouring the m.3243A>G were included in this study according to their clinical description and post-mortem heteroplasmy levels (Table 1). All patients included were autopsied and several levels of heteroplasmy (m.3243A>G) of different tissues were analysed post-mortem (PM).

Details of PM mtDNA heteroplasmy analysis from the literature cases (L1–L15) are given in Table 1. If heteroplasmy levels from the quadriceps muscle (used as PM skeletal) were not given, heteroplasmy levels from the psoas muscle were used for further analysis. However, Hamazaki et al. (L12) [12] named the rectus abdominis muscle as skeletal muscle. Brain heteroplasmy levels were taken either from samples declared as the visual cortex or occipital cortex. Heart heteroplasmy levels were either taken from the left ventricle or, in three cases (L13–L15), from the right ventricle.

Table 1. Details of the literature cases included in this study, including sex, clinical information and methods of mitochondrial DNA (mtDNA) heteroplasmy determination; n.k. = not known.

Literature Case Number	Reference	Sex	MELAS-Phenotype	Deceased Age (Years)	Methods of mtDNA Heteroplasmy Determination
L1	Prasad et al. 2014 [13]	Male	Yes	18	PCR, restriction enzyme ApaI; quantitative densitometry
L2	Prasad et al. 2014 [13]	Female	No	65	PCR, restriction enzyme ApaI; quantitative densitometry
L3	Enter et al. 1991 [14]	Female	Yes	12	PCR, restriction endonuclease ApaI; mutation detection by PCR
L4	Fornuskova et al. 2008 [15]	Female	No	18	PCR, restriction enzyme ApaI; quantified with ImageQuant software
L5	Cardaioli et al. 1999 [16]	stillbirth	No	Miscarriage (25 weeks)	PCR, restriction enzyme ApaI; autoradiography–quantified with ultra-scan densitometer
L6	Ciafaloni et al. 1991 [17]	Male	Yes	26	PCR, restriction enzyme HaeIII, quantified with Betascope 603 blot analyser.
L7	Kobayashi et al. 1992 [10]	n.k.	Yes	20	PCR, restriction enzyme ApaI; autoradiography, quantified with Fujix bioimaging analyser (BAS2000)
L8	Macmillan et al. 1993 [18]	Female	Yes	24	PCR, restriction enzyme ApaI; quantified on a molecular dynamics series 4000 phosphorImager
L9	Obermaier-Kusser et al. 1991 [19]	Female	Yes	12	PCR, restriction enzyme ApaI; densitometry using Elscript 400 UVR scanner
L10	Shiraiwa et al. 1993 [20]	Female	Yes	27	PCR, restriction enzyme ApaI; autoradiography, quantified with Fujix bioimaging analyser (BAS2000)
L11	Shoji et al. 1993 [21]	Female	Yes	22	PCR, restriction enzyme ApaI; autoradiography, quantified with a densitometer
L12	Hamazaki et al. 1993 [12]	Female	Yes	14	PCR, restriction enzyme ApaI; quantified using laser densitometer
L13	Koga et al. 2000 [22]	Male	Yes	10.8	PCR, restriction enzyme HaeIII, quantified using a Betascope 603 blot analyser.
L14	Matthews et al. 1994 [23]	Female	No	42	PCR, restriction enzyme ApaI; analysed densitometrically from film negatives
L15	Matthews et al. 1994 [23]	n.k.	No	stillborn (24 weeks)	PCR, restriction enzyme ApaI; analysed densitometrically from film negatives

2.3. Muscle Histopathology-Patient

Cryostat sections were cut from transversely orientated muscle blocks from the quadriceps muscle and subjected to standard histological and histochemical analysis including cytochrome c oxidase (COX), succinate dehydrogenase (SDH) and COX–SDH oxidative enzyme reactions.

2.4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)-Polymerase Chain Reaction (PCR)-Patient

Total DNA was extracted from different samples using the peqGOLD tissue DNA Mini Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) according to the manufacturer's instructions. For RFLP analysis, a 330 bp PCR product spanning the mtDNA 3243 locus was amplified using a forward primer 5' GGT TCG TTT GTT CAA CGA TT 3' and a reverse 5' TGC CAT TGC GAT TAG AAT GG 3'. The PCR product was digested by ApaI (New England Biolabs GmbH (NEB) Frankfurt am Main, Germany) into two fragments of 117 and 213 bp. The digested PCR products were separated on agarose gel and stained with ethidium bromide. For analysis of signal intensity of the bands, ImageJ software was used.

2.5. Determination of mtDNA Copy Numbers-Patient

Total DNA was extracted from different tissues using the peqGOLD tissue DNA Mini Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany), following the manufacturer's instructions. The concentration and purity of the extracted DNA were determined using a plate reader (Tecan Infinite M200[®] PRO, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany). The DNA samples were diluted to 5 ng/μL.

Relative levels of mtDNA copy number were determined by real-time PCR using singleplex Taqman assays targeting the mitochondrial *MT-ND1* gene (*Hs02596873*) and to a single housekeeping nuclear gene (18 S ribosomal-5-RNA (18S5, *Hs03928990*)). On each 96-well plate, a standard dilution series for every gene to determine absolute copy numbers was amplified in parallel. For each 10-μL single-well reaction contained 5 ng of extracted DNA and 5 μL of TaqMan Universal PCR Master Mix II, No UNG (uracil-N-glycosylase), 0.5 μL TaqMan Assay on the StepOne System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The following thermal profile was used: 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, 55 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. Each reaction was performed in triplicate. The mtDNA/nDNA ratio was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

2.6. Ethical Statement

The legal guardian of the patient gave written informed consent for autopsy and inclusion before participation in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the University Halle-Wittenberg (Project identification code 215/20.01.10/3).

2.7. Statistical Analysis

Statistical analysis, calculation and visualisation were performed using Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA, USA). The analysis of a possible relationship between two variables was carried out using linear regression and the Pearson correlation. Analysis of correlation was carried out using multiple *t*-tests. The Holm-Sidak method was used to correct for multiple comparisons. The *p*-value selection was based on the FDR (False Discovery Rate). The value of α was determined at 0.05. Significance was set to $p = 0.05$. The statistical tests chosen were predetermined by the size of the study group and numeric range of values.

3. Results

3.1. Muscle Histopathology (Patient)

Muscle biopsy showed myopathic changes, with 5% COX negative fibres and scattered ragged-red-fibres (RRF).

3.2. Analysis of Heteroplasmy Levels and Copy Number (Patient)

To evaluate a possible correlation between the mtDNA copy number and the heteroplasmic grade in affected organs (14 central nervous system samples and 16 samples from peripheral tissue), the mtDNA/nDNA ratio was calculated as described previously. Heteroplasmy levels (%) and mtDNA copy number (MT-ND1/18S5) were correlated (Figure 1). In both the central nervous system samples and the peripheral tissue samples, higher levels of heteroplasmy correlated with lower mtDNA copy numbers, however only significantly ($p < 0.05$) in the central nervous system samples.

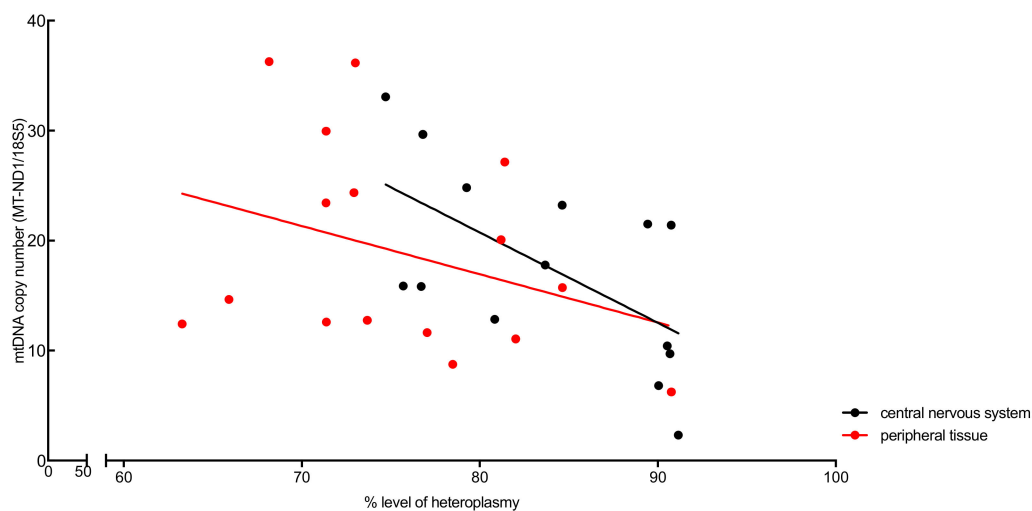


Figure 1. Correlation of heteroplasmy levels (%) and mtDNA copy number (MT-ND1/18S5) in the central nervous system tissue (black circles) and in the peripheral tissues (red circles) from the case report patient. In both the central nervous system samples and the peripheral tissues, higher levels of heteroplasmy correlated with lower mtDNA copy number, however only significantly in the central nervous system samples ($p < 0.05$).

3.3. Analysis of Clinical Phenotype and Genotype in the Patient and Literature Cases

Out of the literature cases, 10 patients were diagnosed with MELAS phenotype (L1, L3, L6–L13), and five patients did not match the MELAS phenotype (L2, L4, L5, L14, L15) (Figure 2, Table 1). In the MELAS cohort, three patients were male, six were female and in one case (L7), the gender was not stated. Deceased age ranged from 10.8 to 27 years (median: 18.58 years). In the non-MELAS cohort, four female patients were included and again, in one case (L15), the gender was not stated. Deceased age ranged from 0 to 65 years (median: 28.53 years). Two patients were stillbirths (L5 and L15).

mtDNA heteroplasmy (%) levels of all literature patients (L1–L15) and the patient (Table 2) presented in this study were analysed. Skeletal muscle heteroplasmy was correlated to either cardiac, liver, kidney or brain heteroplasmy (Figure 3). In skeletal muscle, heteroplasmy correlated significantly with kidney ($p = 0.0100$) and liver ($p = 0.0156$). There was no significant (n.s.) correlation of cardiac and brain to skeletal heteroplasmy. Skeletal muscle heteroplasmy correlated negatively with deceased age, however not significantly ($p = 0.2203$). Higher deceased age correlated with lower heteroplasmy, however only significantly in liver ($p < 0.005$) and kidney ($p < 0.05$).

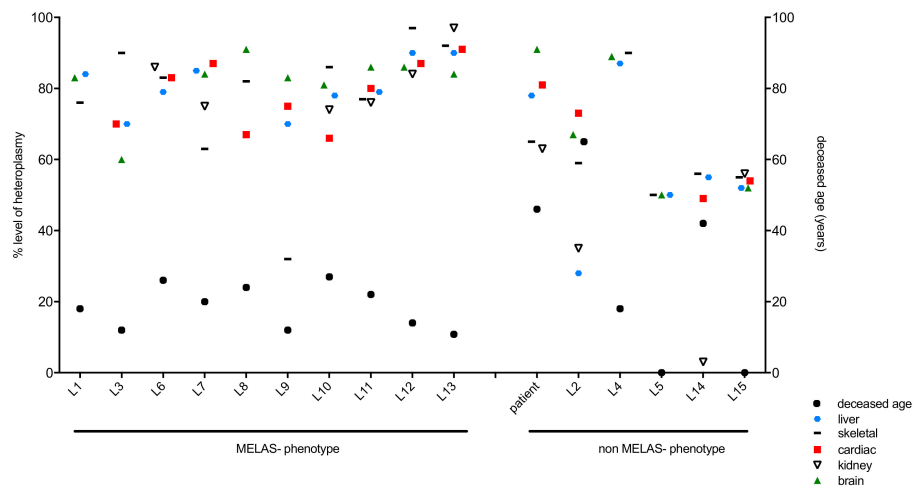


Figure 2. m.3243A>G heteroplasmy levels across literature cases with regard to tissues and clinical phenotype MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactate acidosis and stroke-like episodes) versus non-MELAS.

Table 2. Post-mortem (PM) mtDNA heteroplasmy (%) levels and mtDNA copy number of the patient presented in this study in tissue from the central nervous system (*n* = 14) and peripheral organs (*n* = 16).

Tissue Type (Origin)	Heteroplasmy Levels (%) by RFLP	mtDNA Copy Number MT-ND1/1855
<i>Central nervous system</i>		
Putamen	80.84	12.85
Caudate nucleus	79.26	24.81
Mammillary body	76.80	29.66
Hypothalamus	75.70	15.88
Thalamus	74.71	33.06
Internal capsule	76.71	15.83
Globus pallidus	84.63	23.22
Visual cortex	83.67	17.79
Pons	90.04	6.81
Medulla oblongata	90.75	21.41
White matter	90.69	9.72
Cerebellar vermis	89.43	21.51
Spinal cord	90.53	10.42
Dorsal root ganglion	91.16	2.31
<i>Peripheral organs</i>		
Liver	78.48	8.75
Bladder	82.02	11.06
M. obliquus superior	72.93	24.35
M. rectus medialis	71.37	29.95
M. rectus superior	73.02	36.17
M. rectus inferior	71.36	23.43
M. iliopsoas	68.16	36.29
M. vastus lat.	65.91	14.65
M. pectoralis	73.68	12.76
M. biceps brachii	81.20	20.08
Tongue muscle base	84.64	15.73
Heart muscle (left)	81.40	27.16
Heart muscle (right)	77.04	11.64
AV-node	71.38	12.60
Kidney	63.28	12.42
Sural nerve	90.76	6.25

RFLP: Restriction fragment length polymorphism; AV- node: Atrioventricular node.

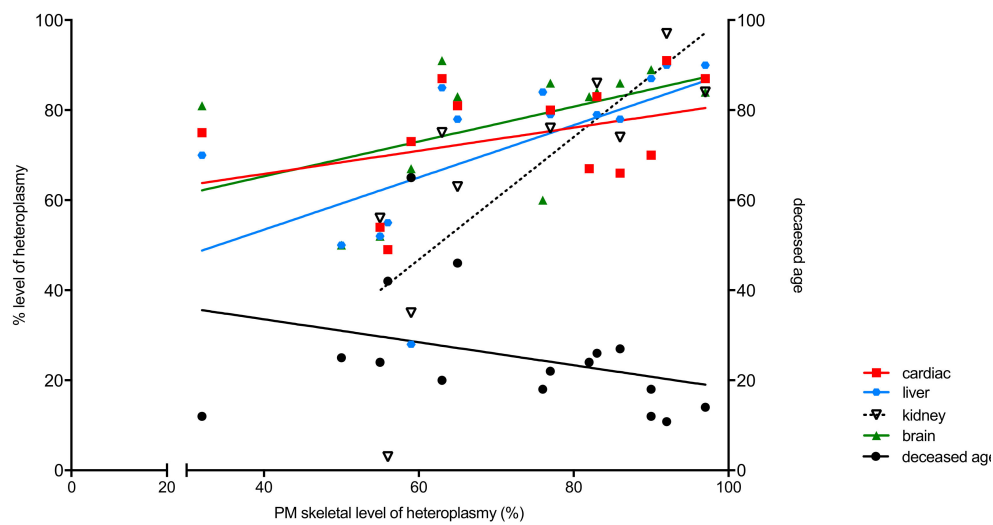


Figure 3. Correlation of heteroplasmy levels (%) in skeletal muscle to levels in cardiac ($p = \text{n.s.}$), liver ($p = 0.0156$), kidney ($p = 0.0100$) and brain ($p = \text{n.s.}$), plotted on the left y-axis. Correlation of heteroplasmy levels (%) in muscle to deceased age ($p = \text{n.s.}$) is plotted on the right y-axis. n.s.: no significant.

There was no significant difference of skeletal, cardiac and brain heteroplasmy in deceased age between MELAS (L1, L3, L6–L13) and non-MELAS phenotype (patient, L2, L4, L5, L14, L15) patients (Figure 4A and Table 1). Liver and kidney heteroplasmy levels were significantly different in MELAS and non-MELAS phenotype patients. In both liver ($p < 0.05$) and kidney ($p < 0.05$), heteroplasmy levels were significantly higher in the MELAS cohort (Figure 4A, Table 3). Correlation of heteroplasmy levels (%) of cardiac, brain and skeletal in clinically affected and unaffected patients (Figure 4B) showed no significant difference of heteroplasmy levels in clinically affected and unaffected patients.

Table 3. Statistical analysis of heteroplasmy levels (%) of PM skeletal, PM cardiac and PM brain, and deceased age of MELAS and non-MELAS phenotype patients.

	Significant	p -Value	MELAS (Mean)	Non-MELAS (Mean)
Deceased Age	No	0.266411820	18.58	28.53
Skeletal	No	0.108486887	77.8	62.5
Cardiac	No	0.059542563	78.44	64.25
Liver	Yes	0.011731624	80.56	58.33
Kidney	Yes	0.006090533	82	39.25
Brain	No	0.059855928	82.89	68.2

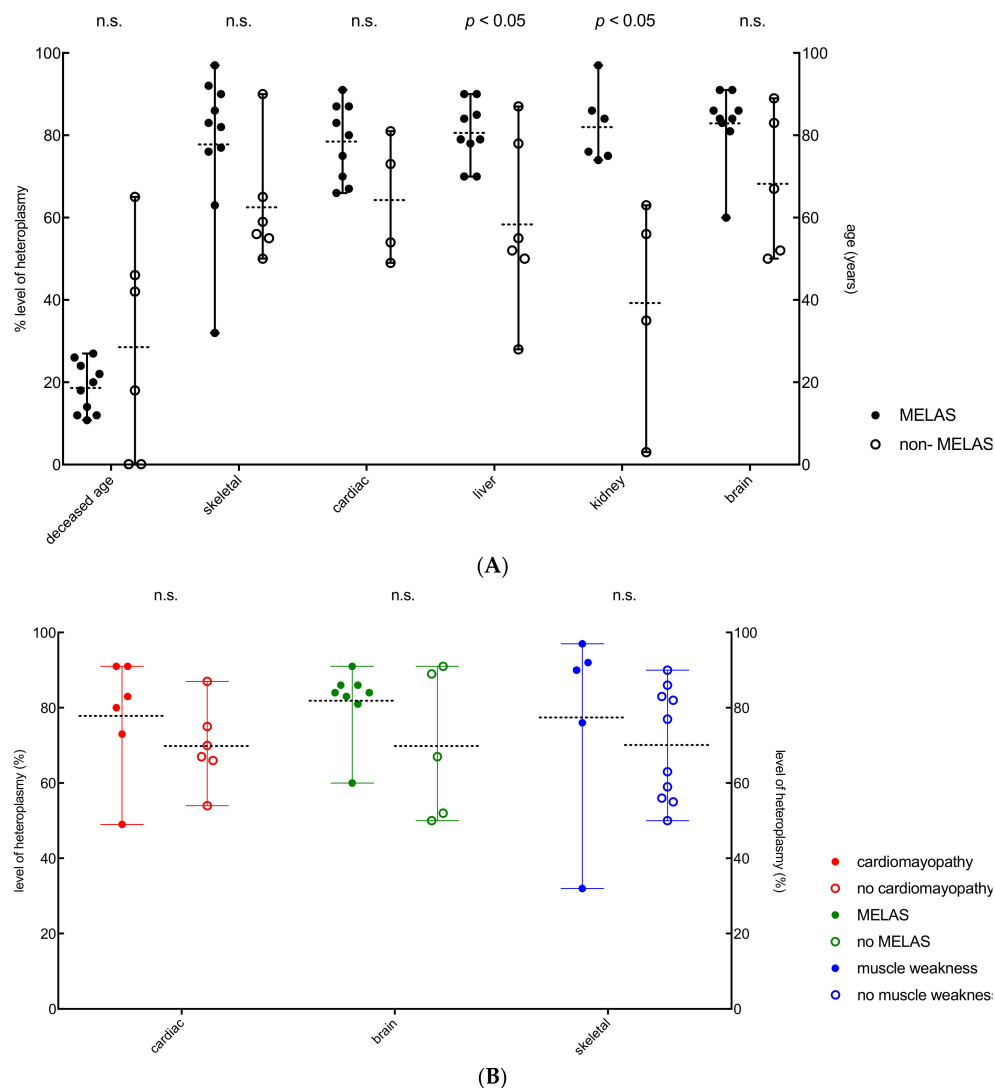


Figure 4. (A) Heteroplasmy levels (%) of skeletal, cardiac and brain between MELAS and non-MELAS phenotype patients. Liver and kidney heteroplasmy levels were significantly different in MELAS (closed circles) and non-MELAS (open circles) phenotype patients. Liver ($p < 0.05$) and kidney ($p < 0.05$) heteroplasmy levels were significantly higher in the MELAS patients. (B) Heteroplasmy levels (%) of cardiac, brain and skeletal in clinically affected (closed circles) and unaffected patients (open circles), showing no significant difference between affected and unaffected patients.

4. Discussion

Studies of mitochondrial diseases revealed a wide variability in the phenotypic presentation of mitochondrial genetic defects [24]. However, the underlying genetic cause leading to an enormous clinical heterogeneity associated with m.3243A>G-related mitochondrial diseases is still poorly understood [8]. The clinical manifestation of the genetic defect occurs when a threshold level is exceeded [24,25]. Due to heteroplasmy, mtDNA mutant levels can vary dramatically between different individuals and tissues [8]. It is already known, that postmitotic tissues, e.g., muscle, intend to have higher heteroplasmy levels, whilst levels in blood decrease significantly over time [9,11,26,27].

Quantification of the abundance of mtDNA molecules harbouring wild-type and pathogenic mutations is important to understand disease progression of mitochondrial disorders and for evaluating therapeutic approaches [3]. Reduction of muscle mtDNA copy number in patients with more severe disease might be due to lower activity levels, which may reduce the mtDNA copy number. Another

explanation for this might be a compensatory mechanism of mitochondrial biogenesis in cells harbouring the mutant mtDNA [7].

The mtDNA/nDNA ratio of the presented patient was calculated to correlate the mtDNA copy number with the heteroplasmic grade in affected organs. It has been reported that patients with identical heteroplasmy levels can exhibit very different symptoms, and some patients with high heteroplasmy levels are relatively asymptomatic [8]. In the patient presented in this study, higher levels of heteroplasmy correlated with lower mtDNA copy numbers, however only significantly in central nervous system samples ($p < 0.05$). The absolute levels of wild-type (WT) mtDNA have been mentioned as an important indicator for pathological manifestations. [28]. Based on this assumption, selective increase of mtDNA copy number by gene or pharmacological therapy have been suggested as potential treatments for human mtDNA mutation diseases. Interestingly, the patient presented had >75% heteroplasmy levels in all central nervous system samples analysed, without harbouring a MELAS phenotype. This underlines previous suggestions, that really high levels in tissues do not automatically lead to a specific phenotype.

Recently, it has been evaluated as to which commonly assayed tissue (blood, urine, skeletal muscle) represents the m.3243A>G mutation load and mtDNA copy number most strongly associated with disease burden and progression [7]. Out of this data, it has been suggested that age-corrected blood heteroplasmy is the most convenient and reliable measure for routine clinical assessment in m.3243A>G patients. Interestingly, we found that liver and kidney heteroplasmy correlated significantly with heteroplasmy levels in muscle, however the presented results arose from post-mortem tissue analysis. Furthermore, we did not find a significant difference of heteroplasmy levels in clinically affected and unaffected patients. This underlines recent findings, suggesting that there are additional factors such as mtDNA copy number and nuclear factors that may also influence disease severity [7,8]. The effect of continuous changes of mtDNA heteroplasmy on remodelling of nuclear DNA and mtDNA gene expression profiles has been reported. This effect might be a result of alterations in signal transduction as well as epigenetic regulatory processes. Hence, in contrast to the rules of Mendelian genetics, the heteroplasmy level of a single mtDNA gene could lead to a multiplicity of cellular phenotypes [29,30].

In conclusion, our data highlights previous suggestions, that really high levels in tissues do not automatically lead to a specific phenotype. Missing significant differences of heteroplasmy levels in clinically affected and unaffected patients, underline the assumption that there are additional factors such as mtDNA copy number and nuclear factors that may influence disease severity in an underestimated way.

5. Limitations

We are aware that the present study has its limitations. The different sample size (MELAS versus non-MELAS cohort) may influence the statistical impact, especially the wide range of deceased age in the non-MELAS cohort. It must also be noted that the levels of heteroplasmy were analysed in different laboratories. An equal standard of the techniques used cannot be granted. However, the access to post-mortem tissue in a rare mitochondrial disease is limited. Moreover, it needs to be stated that mtDNA copy number was not measured in the literature cases. Due to this, comparison and correlation of heteroplasmy in different tissues is limited and may as well be caused by different cell types or mtDNA copy number.

Author Contributions: Investigation: L.M.S., C.M., C.W. and D.L.U.; writing—original draft preparation: L.M.S. and D.L.U.; writing—review and editing: L.M.S., S.Z., C.M., C.W. and D.L.U.; visualization: D.L.U.; supervision: S.Z. and D.L.U. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: L.M.S., S.Z. and D.L.U. are members of the German mitoNET funded by the German Ministry of Education and Research. D.L.U. is funded by the Hertha-Nathorff-Programm (HNP) of the Ulm Medical University, Germany.

Acknowledgments: We acknowledge the financial support within the funding programme Open Access Publishing by the German Research Foundation (DFG).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- O'Hara, R.; Tedone, E.; Ludlow, A.; Huang, E.; Arosio, B.; Mari, D.; Shay, J.W. Quantitative mitochondrial DNA copy number determination using droplet digital PCR with single-cell resolution. *Genome Res.* **2019**, *29*, 1878–1888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schon, E.A.; DiMauro, S.; Hirano, M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 878–890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grady, J.P.; Murphy, J.L.; Blakely, E.L.; Haller, R.G.; Taylor, R.W.; Turnbull, D.M.; Tuppen, H.A. Accurate measurement of mitochondrial DNA deletion level and copy number differences in human skeletal muscle. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Majamaa, K.; Moilanen, J.S.; Uimonen, S.; Remes, A.M.; Salmela, P.I.; Karppa, M.; Majamaa-Voltti, K.A.; Rusanen, H.; Sorri, M.; Peuhkurinen, K.J.; et al. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: Prevalence of the mutation in an adult population. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *63*, 447–454. [[CrossRef](#)]
- Lehmann, D.; Schubert, K.; Joshi, P.R.; Baty, K.; Blakely, E.L.; Zierz, S.; Taylor, R.W.; Deschauer, M. A novel m.7539C>T point mutation in the mt-tRNA^{Asp} gene associated with multisystemic mitochondrial disease. *Neuromuscul. Disord. NMD* **2015**, *25*, 81–84. [[CrossRef](#)]
- El-Hattab, A.W.; Scaglia, F. Mitochondrial DNA depletion syndromes: Review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics* **2013**, *10*, 186–198. [[CrossRef](#)]
- Grady, J.P.; Pickett, S.J.; Ng, Y.S.; Alston, C.L.; Blakely, E.L.; Hardy, S.A.; Feeney, C.L.; Bright, A.A.; Schaefer, A.M.; Gorman, G.S.; et al. mtDNA heteroplasmy level and copy number indicate disease burden in m.3243A>G mitochondrial disease. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)]
- Pickett, S.J.; Grady, J.P.; Ng, Y.S.; Gorman, G.S.; Schaefer, A.M.; Wilson, I.J.; Cordell, H.J.; Turnbull, D.M.; Taylor, R.W.; McFarland, R. Phenotypic heterogeneity in m.3243A>G mitochondrial disease: The role of nuclear factors. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2018**, *5*, 333–345. [[CrossRef](#)]
- Rahman, S.; Poulton, J.; Marchington, D.; Suomalainen, A. Decrease of 3243 A→G mtDNA mutation from blood in MELAS syndrome: A longitudinal study. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *68*, 238–240. [[CrossRef](#)]
- Kobayashi, Y.; Ichihashi, K.; Ohta, S.; Nihei, K.; Kagawa, Y.; Yanagisawa, M.; Momoi, M.Y. The mutant mitochondrial genes in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) were selectively amplified through generations. *J. Inherit. Metab. Dis.* **1992**, *15*, 803–808. [[CrossRef](#)]
- Goto, Y.; Nonaka, I.; Horai, S. A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **1990**, *348*, 651–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hamazaki, S.; Koshihara, M.; Sugiyama, T. Organ distribution of mutant mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in a MELAS patient. *Acta Pathol. Jpn.* **1993**, *43*, 187–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Prasad, M.; Narayan, B.; Prasad, A.N.; Rupal, C.A.; Levin, S.; Kronick, J.; Ramsay, D.; Tay, K.Y.; Prasad, C. MELAS: A multigenerational impact of the *MTTL1* A3243G MELAS mutation. *Can. J. Neurol. Sci.* **2014**, *41*, 210–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Enter, C.; Muller-Hocker, J.; Zierz, S.; Kurlemann, G.; Pongratz, D.; Forster, C.; Obermaier-Kusser, B.; Gerbitz, K.D. A specific point mutation in the mitochondrial genome of Caucasians with MELAS. *Hum. Genet.* **1991**, *88*, 233–236. [[CrossRef](#)]
- Fornuskova, D.; Brantova, O.; Tesarova, M.; Stiburek, L.; Honzik, T.; Wenchich, L.; Tietzeova, E.; Hansikova, H.; Zeman, J. The impact of mitochondrial tRNA mutations on the amount of ATP synthase differs in the brain compared to other tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1782*, 317–325. [[CrossRef](#)]
- Cardaioli, E.; Dotti, M.T.; Hayek, G.; Zappella, M.; Federico, A. Studies on mitochondrial pathogenesis of Rett syndrome: Ultrastructural data from skin and muscle biopsies and mutational analysis at mtDNA nucleotides 10463 and 2835. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **1999**, *31*, 301–304.
- Ciafaloni, E.; Ricci, E.; Servidei, S.; Shanske, S.; Silvestri, G.; Manfredi, G.; Schon, E.A.; DiMauro, S. Widespread tissue distribution of a tRNA^{Leu(UUR)} mutation in the mitochondrial DNA of a patient with MELAS syndrome. *Neurology* **1991**, *41*, 1663–1664. [[CrossRef](#)]

18. Macmillan, C.; Lach, B.; Shoubridge, E.A. Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNA^{Leu}[3243]) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: The role of mitotic segregation. *Neurology* **1993**, *43*, 1586–1590. [[CrossRef](#)]
19. Obermaier-Kusser, B.; Paetzke-Brunner, I.; Enter, C.; Muller-Hocker, J.; Zierz, S.; Ruitenbeek, W.; Gerbitz, K.D. Respiratory chain activity in tissues from patients (MELAS) with a point mutation of the mitochondrial genome [tRNA^{Leu}(UUR)]. *FEBS Lett.* **1991**, *286*, 67–70. [[CrossRef](#)]
20. Shiraiwa, N.; Ishii, A.; Iwamoto, H.; Mizusawa, H.; Kagawa, Y.; Ohta, S. Content of mutant mitochondrial DNA and organ dysfunction in a patient with a MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *J. Neurol. Sci.* **1993**, *120*, 174–179. [[CrossRef](#)]
21. Shoji, Y.; Sato, W.; Hayasaka, K.; Takada, G. Tissue distribution of mutant mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *J. Inherit. Metab. Dis.* **1993**, *16*, 27–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Koga, Y.; Akita, Y.; Takane, N.; Sato, Y.; Kato, H. Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene. *Arch. Dis. Child.* **2000**, *82*, 407–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Matthews, P.M.; Hopkin, J.; Brown, R.M.; Stephenson, J.B.; Hilton-Jones, D.; Brown, G.K. Comparison of the relative levels of the 3243 (A→G) mtDNA mutation in heteroplasmic adult and fetal tissues. *J. Med. Genet.* **1994**, *31*, 41–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rossignol, R.; Faustin, B.; Rocher, C.; Malgat, M.; Mazat, J.P.; Letellier, T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 751–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wai, T.; Teoli, D.; Shoubridge, E.A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 1484–1488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rajasimha, H.K.; Chinnery, P.F.; Samuels, D.C. Selection against pathogenic mtDNA mutations in a stem cell population leads to the loss of the 3243A→G mutation in blood. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *82*, 333–343. [[CrossRef](#)]
27. Sue, C.M.; Quigley, A.; Katsabanis, S.; Kapsa, R.; Crimmins, D.S.; Byrne, E.; Morris, J.G. Detection of MELAS A3243G point mutation in muscle, blood and hair follicles. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *161*, 36–39. [[CrossRef](#)]
28. Filograna, R.; Koolmeister, C.; Upadhyay, M.; Pajak, A.; Clemente, P.; Wibom, R.; Simard, M.L.; Wredenberg, A.; Freyer, C.; Stewart, J.B.; et al. Modulation of mtDNA copy number ameliorates the pathological consequences of a heteroplasmic mtDNA mutation in the mouse. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaav9824. [[CrossRef](#)]
29. Picard, M.; Zhang, J.; Hancock, S.; Derbeneva, O.; Golhar, R.; Golik, P.; O’Hearn, S.; Levy, S.; Potluri, P.; Lvova, M.; et al. Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E4033–E4042. [[CrossRef](#)]
30. Wallace, D.C.; Fan, W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion* **2010**, *10*, 12–31. [[CrossRef](#)]



Stabilization of the thermolabile variant S113L of carnitine palmitoyltransferase II

OPEN

Leila Motlagh, PhD
Ralph Golbik, PhD
Wolfgang Sippl, PhD
Stephan Zierz, MD

Correspondence to
Dr. Motlagh:
leila.motlagh@medizin.uni-halle.de

ABSTRACT

Objective: Muscle carnitine palmitoyltransferase (CPT) II deficiency, the most common defect of lipid metabolism in muscle, is characterized by attacks of myoglobinuria without persistent muscle weakness.

Methods: His₆-N-hCPT2 (wild-type) and His₆-N-hCPT2/S113L (variant) were produced recombinantly in prokaryotic host and characterized according to their functional and regulatory properties.

Results: The wild-type and the variant S113L showed the same enzymatic activity and thermostability at 30°C. The mutated enzyme, however, revealed an abnormal thermal destabilization at 40°C and 45°C. This was consistent with an increased flexibility (B-factor) of the variant at 40°C compared with that of the wild-type shown by molecular dynamics analysis. Preincubation of the enzymes with L-carnitine and acyl-L-carnitines containing more than 10 carbons in the acyl side-chain stabilized the mutated enzyme against thermal inactivation. In contrast, palmitoyl-CoA destabilized both enzymes.

Conclusions: The problems in CPT II deficiency originating from the S113L mutation are not caused by the loss of catalytically active enzyme. They might be at least partially related to an impaired thermal stability of the protein. The lower thermodynamic stability of the variant might explain why fever and prolonged exertion provoke attacks of myoglobinuria in CPT II deficiency. The stabilization by acyl-L-carnitines might provide the basis for possible preventive therapy of CPT II deficiency. *Neurol Genet* 2016;2:e53; doi: 10.1212/NXG.000000000000053

GLOSSARY

CPT = carnitine palmitoyltransferase; **LB-medium** = LURIA-BERTANI medium; **MD** = molecular dynamics; **RMSD** = root-mean-square deviation.

Carnitine palmitoyltransferase (CPT) II deficiency is regarded as the most common defect of lipid metabolism in skeletal muscle.¹ There are 3 phenotypes of CPT II deficiency: (1) a lethal neonatal form, (2) a severe infantile hepatocardiomyopathy form, and (3) a mild myopathic form.² The symptoms of the latter usually consist of recurrent attacks of myalgia and muscle weakness leading to myoglobinuria, which might result in kidney failure. The attacks are provoked by prolonged exercise, fasting, fever, or exposure to cold.³

The mutation S113L has been found on at least 1 allele in about 90% of patients with muscle CPT II deficiency (allele frequency about 75%).³

Biochemical consequences of the mutation S113L are still controversial and comprise the following hypotheses:

1. Reduced enzyme activity with normal or reduced protein content.^{4,5}
2. Abnormally regulated enzyme rather than a reduced catalytic activity.⁶⁻⁸
3. Decreased protein stability leading to a marked reduction in the steady-state level of the enzyme.^{9,10}
4. Decreased thermal stability.⁴

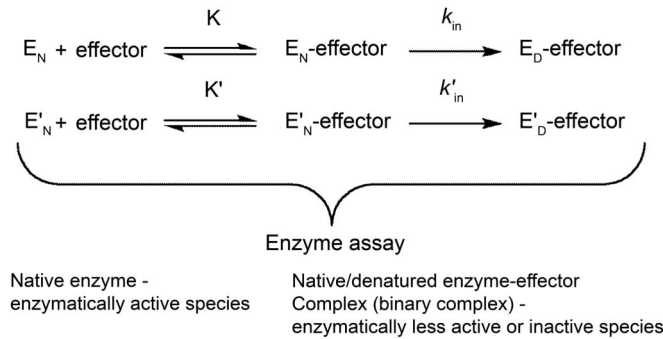
Supplemental data
at Neurology.org/ng

From the Department of Neurology (L.M., S.Z.), Institute of Biochemistry and Biotechnology (R.G.), and Institute of Pharmacy (W.S.), Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany.

Funding information and disclosures are provided at the end of the article. Go to Neurology.org/ng for full disclosure forms. The Article Processing Charge was paid by the authors.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.

Figure 1 Effector-mediated thermal inactivation of carnitine palmitoyltransferase II (considering only 1 binding site of the effector)



E represents the wild-type, E' the variant S113L, N the native state, D the denatured state, K the equilibrium constant of the initial enzyme-effector binary complex, and k_{in} the microscopic first-order rate constant of the inactivation. The apostrophe indicates the parameters of the variant.

All previous studies dealing with CPT II are based on experiments using vertebrate enzyme or human cell lysate. The present work on the recombinant enzymes His₆-N-*h*CPT2 and His₆-N-*h*CPT2/S113L evaluates their thermal stability.

METHODS Recombinant production and purification of human CPT II (wild-type and variant S113L).

The genes coding for wild-type enzyme (His₆-N-*h*CPT2) and the most prominent variant of CPT II deficiency, S113L (His₆-N-*h*CPT2/S113L), were created by site-directed mutagenesis from the gene coding for the triple variant (His₆-N-*h*CPT2/S113L/V368I/M647V). The genes were then cloned into (pET28a (+)). The plasmids were transformed into chemo-competent *Escherichia coli* BL21Gold DE3 cells, and the recombinant protein was realized by heterologous gene expression in the prokaryotic host. Cells carrying the plasmids were grown in LURIA-BERTANI medium (LB-medium) supplemented with kanamycin (30 µg/mL) in a preculture overnight at 37°C. After centrifugation (30 minutes at 6,000 rpm at 10°C), cells were resuspended in fresh LB-medium for inoculation of 5-L sterile LB-medium supplemented with kanamycin (30 µg/mL) in a Biostat C-DCU 3 fermenter (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany). Cells were grown at oxygen content of 25–30% and feeding control (yeast extract, glycerol) for 10 hours. Gene expression was induced by adding isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (1 mM), and recombinant protein was produced for about 12–14 hours. Cells were then harvested by centrifugation (30 minutes at 6,000 rpm and 10°C) and shock frozen in liquid nitrogen. One hundred grams of frozen cells were thawed in suspension buffer (50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid [HEPES], 150 mM NaCl, 3 mM tris (2-chloroethyl) phosphate [TCEP], 10 mM MgCl₂, 3 mM benzamidine, 1 µg/mL leupeptine, 0.7 µg/mL pepstatin A, pH 8.0) and lysed by adding lysozyme (50 µg/mL) using a French Press at 1,200 bar. Nucleic acids were digested by incubation of DNase I. After centrifugation of the lysed cells (45 minutes at 45,000 rpm and 4°C, using a 45Ti rotor in a Beckman L8-60M ultracentrifuge [Beckman Instruments Inc., Brea, CA]), the supernatant was directly applied to a Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) affinity chromatography column

(3 × 5 mL His-Trap columns). The bound target protein carrying a His-tag was eluted using an imidazole gradient. Recombinant CPT II was further purified by gel filtration on Superdex S 200 (26/60) and finally by ion-exchange chromatography on Q-Sepharose HP (10/16) according to supplier's recommendations. The purification was verified by SDS-PAGE and protein identity was confirmed by mass spectrometry.

Enzyme assay of CPT II. CPT II activity was determined spectroscopically according to Rufer et al.¹¹ with some modifications. The assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) by CoA-SH and subsequent formation of 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid, which absorbs at 410 nm with a molar extinction coefficient of 13,600/M/cm.¹² The formation of CoA-SH was monitored by addition of CPT II to a solution containing L-carnitine and palmitoyl-CoA. The 1-mL reaction volume contained 50 mM potassium phosphate, 120 mM KCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), 30 µM palmitoyl-CoA, and 12 mM L-carnitine (pH 7.4). After temperature equilibration, the reaction was initiated by the addition of recombinant enzyme to a final concentration of 15 nM and monitored for 120 seconds. Activity measurements were conducted at 25°C.

Thermal and effector-mediated inactivation of CPT II.

The temperature transitions (melting curves) of recombinant CPT II wild-type and the variant S113L were measured by circular dichroism at 210 nm in 25 mM phosphate buffer (pH 8.0) containing 50 mM NaCl and 2 mM TCEP.

Data of effector-mediated and temperature-induced inactivation of CPT II were investigated according to the reaction scheme depicted in figure 1 considering a negligible reactivation of the inactivated enzyme only.

The decrease of the enzymatic activity was analyzed according to a single-exponential first-order reaction using equation 1, yielding the apparent rate constant of inactivation:

$$A = A_0 \cdot \exp(-k_{app} \cdot t) \quad (1)$$

$$k_{app} = k_{in} + k_{re}$$

$$\lim(k_{re}) \rightarrow 0$$

where A is the residual activity of the enzyme measured at time t of inactivation, A₀ is the initial activity of the enzyme, k_{in} is the first-order rate constant of inactivation, k_{re} is the first-order rate constant of reactivation, and k_{app} is the apparent first-order rate constant of inactivation. The apparent rate constants of inactivation were determined by fitting the time course of the change of the enzymatic activities according to equation 1 using the program Kaleidagraph. For better data investigation and comparison, the activity changes were evaluated as a percentage of total initial activity (relative activities). Fitting parameters are presented with mean square errors.

Simultaneous incubation with palmitoyl-L-carnitine. To evaluate the stabilizing effect of palmitoyl-L-carnitine on CPT II, the activities of His₆-N-*h*CPT2 and His₆-N-*h*CPT2/S113L were measured in the presence of 25 µM palmitoyl-L-carnitine in the reaction mixture.

Preincubation with acyl-CoA and acyl-L-carnitine derivatives. To evaluate a putative substrate protection effect on the kinetic stability of the enzymes before activity measurements, His₆-N-*h*CPT2 and His₆-N-*h*CPT2/S113L were preincubated with the indicated amounts of L-carnitine or palmitoyl-CoA at 30°C, 40°C, and 45°C in different series of experiments. Acyl-L-carnitines (C2, C4, C5, C6, C8, C10, C12, C14, and C16) at a concentration of 25 µM were preincubated with the wild-type or the mutated enzyme at 40°C and 45°C, respectively. Activity measurements were performed after different incubation times.

Computational methods. Homology modeling. A homology model of human CPT II was built using the crystal structure of rat CPT II (PDB code 2DEB)¹¹ as a template. Sequence alignment of both proteins (aa 32–658 showing 95.2% sequence identity) was performed using the molecular modeling package Molecular Operating Environment (Chemical Computing Group, Montreal, Quebec, Canada).¹³ The program MODELER9v11¹⁴ was used to generate the homology model and the model of the variant S113L.

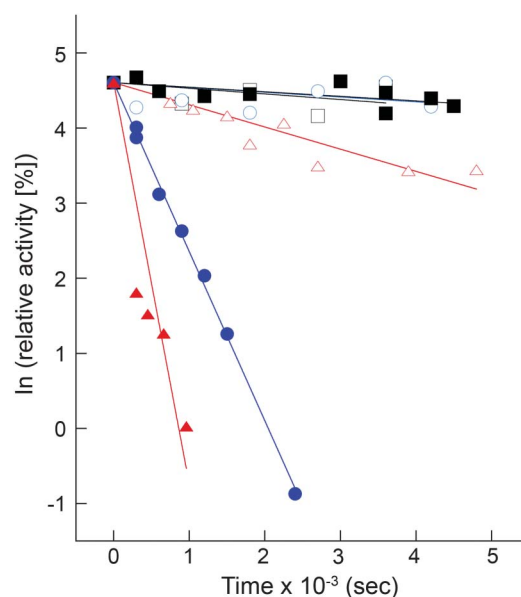
Molecular dynamics. The sander module in AMBER12¹⁵ was applied for the energy minimization steps, whereas Particle-Mesh-Ewald molecular dynamics (MD) was used for the MD simulation. Particle-Mesh-Ewald method was used to treat electrostatic interactions, and a cut-off radius of 10 Å was set for nonbonded interactions. Preparation of the input files was conducted as follows. The General Amber Force Field with AM1-BCC charges was applied to assign atom types to the ligands (palmitoyl-L-carnitine), whereas Amber03 force field was used for the protein. The protein or protein-acyl-L-carnitine complexes were solvated in an octahedral box of TIP3P water with 13 Å between the complex surface and the box boundary, and counterions were added to neutralize the system. The solvated system was then subjected to 3 steps of energy minimization: a 1,600-step minimization (800 cycles of steepest descent followed by 800 cycles of conjugate gradient) while keeping the solute fixed by a force of 10 kcal/mol/Å; 1,600 cycles of minimization using 800-step steepest descent and subsequent 800-step conjugate gradient while keeping the solute fixed by a force of 2 kcal/mol/Å; and a 2,000-step minimization (1,000-step steepest descent and 1,000-step conjugate gradient). The system was gradually heated to the studied temperature (277 K, 299 K, and 313 K) over 100 picoseconds, and then a 22-nanosecond MD simulation was performed in the NPT ensemble (pressure 1.0 bar and temperature 300 K). During MD, all covalent bonds involving H-atoms were constrained using the SHAKE procedure, and the time step was set to 2 femtoseconds. The root-mean-square deviation (RMSD) of the backbone atoms of the protein was calculated using the input structure as reference. The B-factor for the backbone of the protein residues was calculated using the program *ptraj* from AMBER12 over the 22-nanosecond MD simulation.

Docking studies. The human CPT II homology model was used for molecular docking studies. First, we tested whether the docking program GOLD¹⁶ was able to redock the cocrystallized ligands in the CPT II and carnitine acetyltransferase crystal structures taken from the Protein Database (2RCU, 4EP9, 1TQ7). Good agreement between experimental and docking structures with RMSD values below 1.5 Å was obtained.

RESULTS Activities of recombinant CPT II. The expression of recombinantly produced human CPT II wild-type and its variant S113L was confirmed by mass spectrometry and their structural integrity was proven by enzymatic assays. At 30°C, both the wild-type and the variant S113L displayed similar specific activities of at least 39 and 33 U/mg, respectively.

Thermal inactivation of CPT II. At 30°C, both enzymes exhibited the same thermal stability; however, the incubation of the enzymes at 40°C and at 45°C (figure 2) resulted in a considerably faster inactivation of the mutated enzyme compared with the wild-type at both temperatures.

Figure 2 Thermal inactivation of His₆-N-hCPT2 and His₆-N-hCPT2/S113L at different temperatures



Black squares, blue circles, and red triangles represent values at 30°C, 40°C, and 45°C, respectively. Open symbols show the wild-type recombinant carnitine palmitoyltransferase II and the closed symbols show His₆-N-hCPT2/S113L. Data are presented as time-dependent changes of natural-log-transformed relative activities. The experiments were performed as explained in the Methods section.

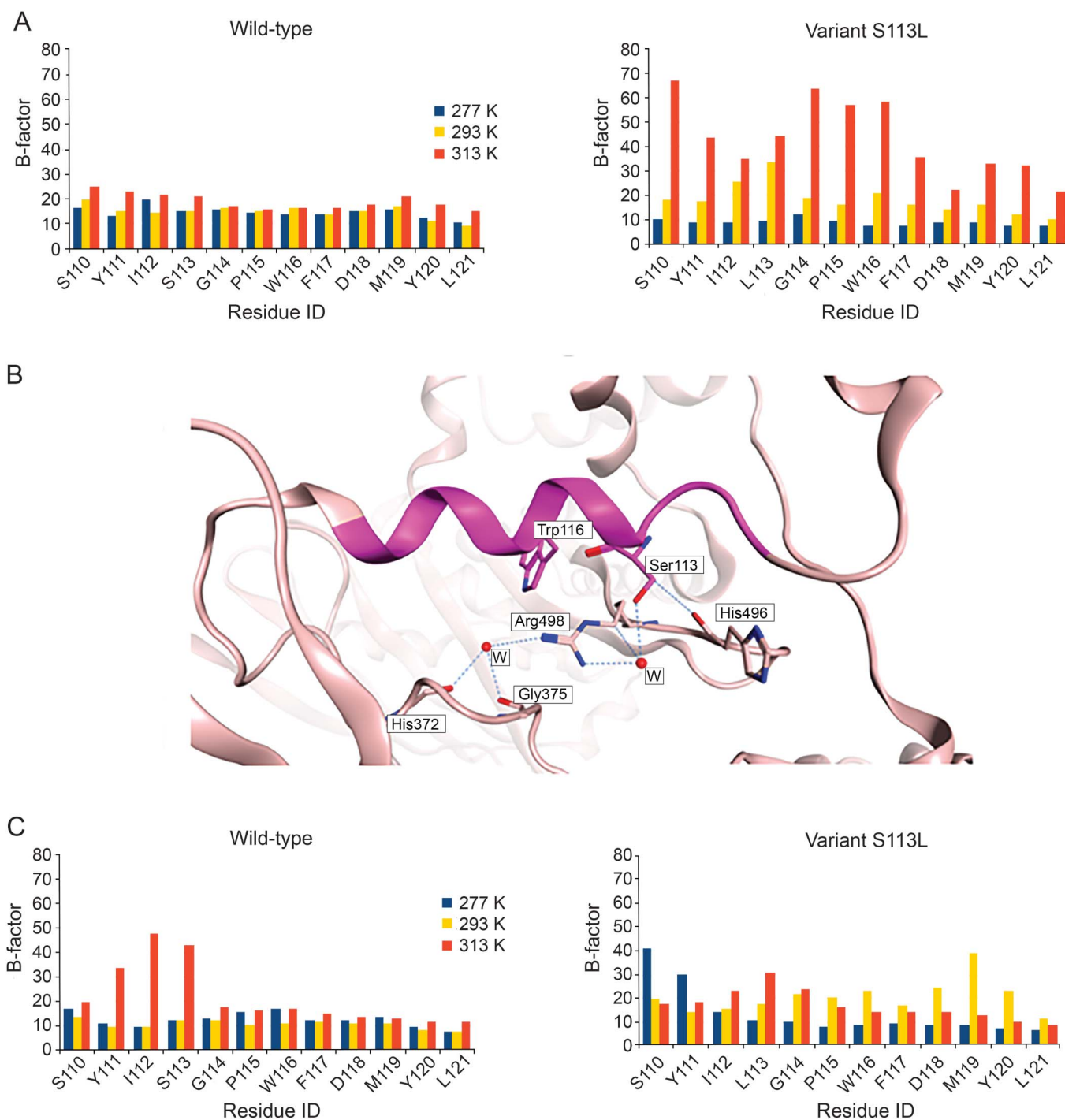
The thermal denaturation of the proteins turned out to be irreversible. Hence, with the transition midpoint dependent on the protein concentration, no thermodynamic parameters of thermal equilibrium unfolding could be determined. During thermal unfolding, no aggregation and precipitation of the proteins occurred in the unfolded state at elevated temperatures, which was indicated by the photomultiplier voltage of the dichrograph and by light scattering (data not shown).

MD simulations were performed to study the stability of the wild-type and the variant S113L at 3 different temperatures: 4°C (277 K), 20°C (293 K), and 40°C (313 K). For this purpose, the generated homology model of human CPT II was used. To assess the thermal stability of the enzyme, the RMSD of the protein backbone (figure e-1 at Neurology.org/ng) and the B-factor (indicating the flexibility of the backbone) over the length of the MD simulation were measured. MD simulations showed that the calculated B-factor for the residues neighboring the mutation site (S110-L121) reveal in a considerably higher fluctuation for the mutant's residues at 313 K (40°C) compared with 277 K (4°C) and to a lesser extent with 293 K (20°C). This could be indicative of the lower thermal stability of the mutated enzyme at 40°C. Conversely,

the calculated B-factor for the wild-type did not show any noticeable differences at the 3 temperatures studied (figure 3A). The hydroxyl group of S113 can form several H-bond interactions. These include a water-mediated H-bond with R498 as found in the homology model or an H-bond

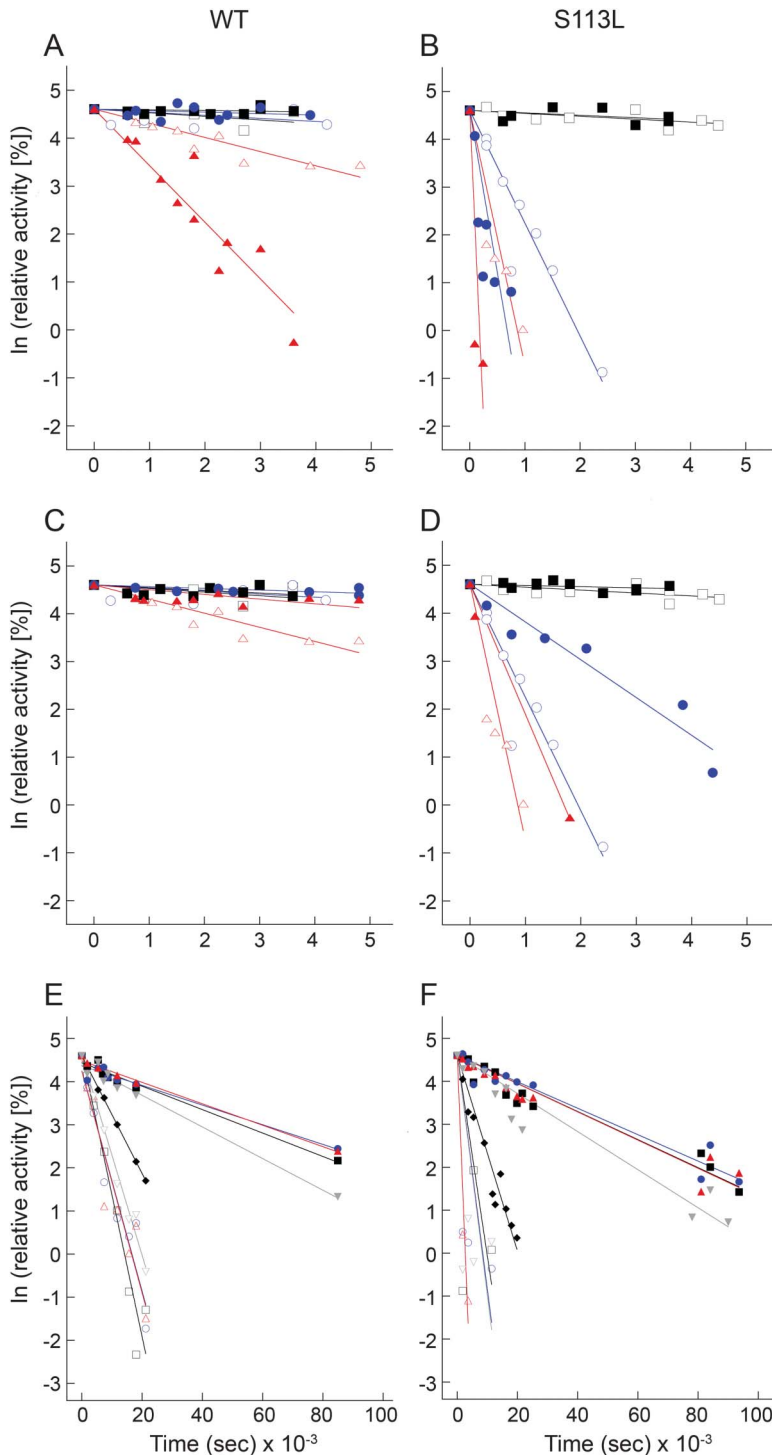
interaction with the backbone carbonyl group of H496 (figure 3B). The reason behind the instability of the variant S113L might be the inability of L113 to form these H-bonds, which would induce conformational changes, especially at the residues neighboring the mutation site.

Figure 3 Flexibility of carnitine palmitoyltransferase (CPT) II studied by molecular dynamics simulation



(A) B-factors of residues S110-L121 of CPT II calculated over 22 nanoseconds of MD simulation of wild-type (left) and the variant S113L (right) at 277 K, 293 K, and 313 K. (B) S113 (magenta) forms H-bond interactions with neighboring residues as seen in the generated homology model of human CPT II. The α -helix-bearing residue S113 is shown as magenta ribbon, and the rest of the enzyme is shown as pink ribbon. H-bond interactions are shown as blue dotted lines. Water molecules are depicted as red balls. (C) B-factors of residues S110-L121 of CPT II were calculated over 22 nanoseconds of MD simulation for the wild-type (left) and the variant S113L (right) in complex with palmitoyl-L-carnitine at 277 K, 293 K, and 313 K.

Figure 4 Effect of substrates on kinetic stability of recombinant carnitine palmitoyltransferase (CPT) II enzymes



A and B show the heat inactivation of His₆-N-hCPT2 and His₆-N-hCPT2/S113L, respectively, at different temperatures supported by palmitoyl-CoA. C and D show the heat inactivation of His₆-N-hCPT2 and His₆-N-hCPT2/S113L, respectively, at different temperatures suppressed by L-carnitine. Black squares, blue circles, and red triangles represent values at 30°C, 40°C, and 45°C, respectively. Open and closed symbols show the results of experiments performed in the absence or in the presence of palmitoyl-CoA or L-carnitine, respectively. E and F present the stabilization of His₆-N-hCPT2 and His₆-N-hCPT2/S113L, respectively, against heat inactivation by preincubation with acyl-L-carnitines at 45°C. Black open squares, blue open circles, red open triangles, gray open inverted triangles, black closed diamonds, black closed squares, blue closed circles, red closed triangles, and gray closed inverted triangles represent acetyl-L-carnitine (C2), isobutyryl-L-carnitine (C4), valeryl-L-

Effects of substrates on thermal inactivation of CPT II.

The kinetic stability of the enzymes was measured after their preincubation with various substrates at different temperatures.

Destabilization by palmitoyl-CoA. Preincubation of His₆-N-hCPT2 and His₆-N-hCPT2/S113L with the native substrate palmitoyl-CoA before the addition of L-carnitine generally increased the rate constants of thermal inactivation at 40°C and 45°C and revealed no substrate protection. At both temperatures, the thermal inactivation was faster in the variant than in wild-type (figure 4, A and B; table).

Effects of L-carnitine and acyl-L-carnitines. Simultaneous addition of palmitoyl-L-carnitine. The presence of additional palmitoyl-L-carnitine at 25 μM in the assay mixture had no effect on the enzyme activity. The simultaneous addition of higher concentrations of palmitoyl-L-carnitine as 1 product of the forward CPT II assay reaction progressively inhibited both enzymes. This inhibition, however, was much stronger for the variant S113L than for the wild-type. The residual activity of the variant S113L in the presence of 200 μM palmitoyl-L-carnitine was only 60% that of the wild-type under the same conditions.

Preincubation with L-carnitine and acyl-L-carnitines. Both the wild-type and the mutated recombinant enzyme displayed a much higher kinetic stability on preincubation with L-carnitine at 45°C (figure 4, C and D; table).

The short-chain acyl-L-carnitines C2, C4, C5, and C6 showed a slight stabilizing effect on His₆-N-hCPT2 and His₆-N-hCPT2/S113L at 45°C (figure 4, E and F; table). The middle-chain acyl-L-carnitines C10, C12, and C14 and the long-chain C16 stabilized the mutated enzyme to the level of the wild-type. Thus, the inactivation rate constants of His₆-N-hCPT2/S113L were smaller by a factor of about 150 at 45°C. Octanoyl-L-carnitine (C8) displayed an intermediate stabilizing effect on both enzymes against thermal inactivation (figure 4, E and F; table).

The acyl-L-carnitines with the most pronounced stabilizing effect on the enzymes were also tested at 40°C. Here, the acyl-L-carnitines C10, C12, C14, and C16 decreased the inactivation rate constant of His₆-N-hCPT2/S113L and His₆-N-hCPT2 by a

carnitine (C5), hexanoyl-L-carnitine (C6), octanoyl-L-carnitine (C8), decanoyl-L-carnitine (C10), lauroyl-L-carnitine (C12), myristoyl-L-carnitine (C14), and palmitoyl-L-carnitine (C16), respectively. Data are presented as time-dependent changes of natural-log-transformed relative activities. The experiments were performed as explained in the Methods section. S113L = the variant S113L; WT = wild-type.

Table Apparent rate constants of inactivation of recombinant hCPT2 proteins in the presence of substrates at different temperatures

Effector			His ₆ -N-hCPT2		His ₆ -N-hCPT2/S113L	
Name	No. of carbon atoms in acyl chain	Concentration, μ M	$k_{app} 10^{-5} (s^{-1})$ at 40°C	$k_{app} 10^{-5} (s^{-1})$ at 45°C	$k_{app} 10^{-5} (s^{-1})$ at 40°C	$k_{app} 10^{-5} (s^{-1})$ at 45°C
No effector			6.4 \pm 3.3	29.5 \pm 2.4	225.2 \pm 2.7	534.9 \pm 58.1
Palmitoyl-L-CoA	16	30	3.1 \pm 1.9	118.1 \pm 7.9	680.1 \pm 113.2	>700
L-Carnitine	No acyl residue	12,000	3.6 \pm 0.7	9.9 \pm 2.2	78.7 \pm 5.9	271.5 \pm 16.5
Acetyl-L-carnitine	2	25	ND	32.6 \pm 1.7	ND	46.8 \pm 21.4
Isobutyryl-L-carnitine	4	25	ND	27.9 \pm 1.8	ND	54.5 \pm 19.7
Valeryl-L-carnitine	5	25	ND	28.1 \pm 2.0	ND	173.2 \pm 20.7
Hexanoyl-L-carnitine	6	25	ND	23.2 \pm 0.7	ND	56.0 \pm 19.4
Octanoyl-L-carnitine	8	25	ND	13.7 \pm 0.1	ND	22.8 \pm 0.9
Decanoyl-L-carnitine	10	25	0.29 \pm 0.02	3.0 \pm 0.2	0.24 \pm 0.02	3.3 \pm 0.2
Lauroyl-L-carnitine	12	25	0.26 \pm 0.02	2.7 \pm 0.3	0.18 \pm 0.02	3.1 \pm 0.2
Myristoyl-L-carnitine	14	25	0.24 \pm 0.02	2.7 \pm 0.2	0.24 \pm 0.01	3.3 \pm 0.2
Palmitoyl-L-carnitine	16	25	0.27 \pm 0.02	4.0 \pm 0.3	0.23 \pm 0.01	4.4 \pm 0.3

Abbreviation: ND = not determined.

Enzymes were preincubated with the respective substrate at the indicated temperatures. The rate constants of inactivation were determined from fitting of the time-dependent decrease of the enzymatic activity as described in the Methods section.

factor of about 1,000 and 25, respectively. At 40°C, the mutated enzyme showed a very similar kinetic stability as the wild-type in the presence of these acyl-L-carnitines (table).

MD studies on CPT II in complex with palmitoyl-L-carnitine showed similar behavior of the wild-type and the variant S113L with respect to temperature. The B-factor of the residues of the mutant surrounding the mutation site did not show any increase at higher temperature (313 K, 40°C) (figure 3C). Generally, the flexibility of the mutation site (S110-L121) of the acyl-L-carnitine-binding site (figures e-2 and e-3) and of the whole protein (figure e-1) was lower for the complex of the variant S113L with palmitoyl-L-carnitine than for the protein without substrate at 313 K.

DISCUSSION The enzymatic activities of the recombinant wild-type CPT II and its variant S113L were similar. This shows that the hypothesis of reduced enzyme activity (deficiency) of the S113L variant can no longer be maintained. This is consistent with the clinical observation that patients harboring the S113L mutation show only attacks of muscle weakness and myoglobinuria but no persistent or progressive muscle weakness (in contrast to L-carnitine-deficient patients). This is also consistent with recent findings of normal protein concentrations of the CPT II variant in skeletal muscle,⁷ indicating that there is no decreased steady-state level of the protein, as previously suggested.⁹ The phenotype of the S113L mutation restricted to muscle without any other organ

involvement indicates that a mutant enzyme can be variously represented and function in vivo in various tissues.

Between the attacks, the patients have no symptoms of myalgia and muscle weakness. This is consistent with the findings of the normal activity and stability of the variant at body temperature. Attacks of myoglobinuria in CPT II deficiency are usually provoked by fever, infections, fasting, prolonged physical stress, and exposure to cold. All of these trigger factors except fasting might in some way be related to a changed thermal stability of the mutated enzyme. It could be speculated that even exposure to cold might provoke symptoms, probably because of increased intramuscular temperature due to compensatory mitochondrial heat production. This is based on the observation that exposure to cold stimulates thermogenesis by increased mitochondrial metabolic rate and increased total energy expenditure not only in brown adipose tissue but also in rodent and human skeletal muscle and in bird plasma.¹⁷⁻¹⁹

The data reveal that the S113L mutation impairs the kinetic stability of human CPT II at increased temperatures. This is consistent with the lower heat resistance of the mutated enzyme in cultured fibroblasts.⁴ The results are also consistent with the MD simulations of the S113L variant, which show an increase in the flexibility of some residues at 40°C, especially the residues in the vicinity of the mutation site. This in turn might cause a change in the conformational state of the mutated enzyme, resulting in a decreased thermal stability.

Preincubation of the enzymes with the native substrate palmitoyl-CoA at 40°C before the addition of L-carnitine further increased the thermal inactivation rate of CPT II, which was more pronounced for the variant than for the wild-type. The mechanism of this destabilizing effect and its pathophysiologic impact remain enigmatic.

Acyl-L-carnitines with more than 10 carbons in the acyl side-chain stabilized the variant S113L against the temperature-induced inactivation. The stabilizing effect occurred only when the enzyme was preincubated with acyl-L-carnitine before starting the assay. A possible explanation for this stabilization is the formation of a stabilized binary complex after preincubation of the apoenzyme of CPT II with acyl (palmitoyl)-L-carnitine.

It has been shown that administration of a bolus of middle-chain fatty acids just before intensive exercise might prevent attacks of myoglobinuria in CPT II deficiency.²⁰ Increased middle-chain acyl-CoA levels might lead to an increase of middle-chain acyl-L-carnitines. This will help not only to provide the required energy but also to stabilize this essential enzyme against inactivation.

However, there is not only a stabilizing effect by long-chain acyl-L-carnitine but also a progressively inhibiting effect on CPT II activity. In contrast to the stabilization by preincubation of the enzyme with acyl(palmitoyl)-L-carnitine, this inhibitory effect was observed only when the enzyme was simultaneously exposed to the substrates palmitoyl-CoA, palmitoyl-L-carnitine, and L-carnitine. The formation of a stabilized binary complex of the apoenzyme of CPT II with acyl(palmitoyl)-L-carnitine might be prevented by this simultaneous exposure. Under this condition, acyl(palmitoyl)-L-carnitine will impair the enzymatic turnover by product inhibition.

Both effects (inhibition and stabilization of the enzyme) by palmitoyl-L-carnitine were more pronounced for the S113L variant than for the wild-type, which further supports the view of an abnormal regulation of the mutated enzyme.²¹

Fasting is another trigger factor for attacks in CPT II-deficient patients. It is characterized by a decrease of free L-carnitine and an increase in acyl-L-carnitine level in plasma.^{22,23} In the present study, the simultaneous addition of palmitoyl-L-carnitine to the assay might mimic this effect. The preincubation of middle- and long-chain acyl-L-carnitines before starting the assay, however, led to stabilization of the enzyme against thermal inactivation. Thus, acyl-L-carnitines can exert both effects (stabilization and inhibition) in vitro. It can be hypothesized that in vivo the time profile of changes in substrate concentration might determine which of these effects will prevail. In serum of CPT

II-deficient patients, the concentration of long-chain acyl-L-carnitines is persistently elevated, even between the attacks. This can be used as a marker for diagnosis of this enzyme disorder.²⁴ However, this might also exert the stabilizing effect in most physiologically relevant situations. Thus, the attacks might occur only when this mechanism is counteracted in extreme situations, such as by severe fever or under extreme dietary conditions with rapid increase of palmitoyl-L-carnitine concentrations (inhibition effect). Both aspects might explain the rare occurrence of attacks caused by the S113L variant of CPT II deficiency. The biochemical consequences of other CPT II mutations have to be characterized in separate future studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L. Motlagh designed and performed the experiments and wrote the manuscript. R. Golbik designed and performed the experiments and wrote the manuscript. W. Sippl designed and performed the experiments and wrote the manuscript. S. Zierz designed the experiments and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. Dina Robaa for carrying out molecular dynamics from the Institute of Pharmacy, Martin Luther University Halle-Wittenberg. We also thank Prof. Dr. Sven-Erik Behrens from the Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin Luther University Halle-Wittenberg; Prof. Dr. Marcus Deschauer and Dr. Pushpa Raj Joshi from the Department of Neurology, Martin Luther University Halle-Wittenberg; and Prof. Dr. Reinhard Neubert from the Institute of Pharmacy, Martin Luther University Halle-Wittenberg for providing excellent discussion and support.

STUDY FUNDING

No targeted funding reported.

DISCLOSURE

Dr. L. Motlagh and Dr. R. Golbik report no disclosures. Prof. W. Sippl has served on the scientific advisory board of the *Journal of Computer Aided Molecular Design* and has received research support from EU FP7 ("A-PARADISE" EC-GA no. 602080) DFG Germany. Prof. S. Zierz has received speaker honoraria from Genzyme, Germany. Go to Neurology.org/ng for full disclosure forms.

Received April 15, 2015. Accepted in final form January 4, 2016.

REFERENCES

1. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997;244:1–14.
2. Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* 2004;25:495–520.
3. Joshi PR, Deschauer M, Zierz S. Carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency: genotype-phenotype analysis of 50 patients. *J Neurol Sci* 2014;338:107–111.
4. Olpin SE, Afifi A, Clark S, et al. Mutation and biochemical analysis in carnitine palmitoyltransferase type II (CPT II) deficiency. *J Inher Metab Dis* 2003;26:543–557.
5. Fanin M, Anichini A, Cassandrini D, et al. Allelic and phenotypic heterogeneity in 49 Italian patients with the

- muscle form of CPT-II deficiency. *Clin Genet* 2012;82:232–239.
6. Zierz S. Limited trypsin proteolysis renders carnitine palmitoyltransferase insensitive to inhibition by malonyl-CoA in patients with muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Clin Investig* 1994;72:957–960.
 7. Lehmann D, Zierz S. Normal protein content but abnormally inhibited enzyme activity in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *J Neurol Sci* 2014;339:183–188.
 8. Motlagh L, Golbik R, Sippl W, Zierz S. Malony-CoA inhibits the S113L variant of carnitine-palmitoyltransferase II. *Biochim Biophys Acta* 2016;1861:34–40.
 9. Taroni F, Verderio E, Dworzak F, Willems PJ, Cavadini P, DiDonato S. Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients. *Nat Genet* 1993;4:314–320.
 10. Verderio E, Cavadini P, Montermini L, et al. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: structure of the gene and characterization of two novel disease-causing mutations. *Hum Mol Genet* 1995;4:19–29.
 11. Rufer AC, Thoma R, Benz J, et al. The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment. *Structure* 2006;14:713–723.
 12. Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* 1958;74:443–450.
 13. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08. Montreal: Chemical Computing Group Inc.; 2015.
 14. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993;234:779–815.
 15. Case D, Darden T, Cheatham TE III, et al. AMBER 12. San Francisco: University of California; 2012.
 16. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 1997;267:727–748.
 17. Stier A, Massemmin S, Criscuolo F. Chronic mitochondrial uncoupling treatment prevents acute cold-induced oxidative stress in birds. *J Comp Physiol B* 2014;184:1021–1029.
 18. Lim S, Honek J, Xue Y, et al. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nat Protoc* 2012;7:606–615.
 19. van den Berg SA, van Marken Lichtenbelt W, van Dijk KW, Schrauwen P. Skeletal muscle mitochondrial uncoupling, adaptive thermogenesis and energy expenditure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;14:243–249.
 20. Tucci S, Primassin S, Ter Veld F, Spiekerkoetter U. Medium-chain triglycerides impair lipid metabolism and induce hepatic steatosis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)-deficient mice. *Mol Genet Metab* 2010;101:40–47.
 21. Zierz S, Engel AG. Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1985;149:207–214.
 22. Frohlich J, Seccombe DW, Hahn P, Dodek P, Hynie I. Effect of fasting on free and esterified carnitine levels in human serum and urine: correlation with serum levels of free fatty acids and beta-hydroxybutyrate. *Metabolism* 1978;27:555–561.
 23. Hoppel CL, Genuth SM. Carnitine metabolism in normal-weight and obese human subjects during fasting. *Am J Physiol* 1980;238:E409–E415.
 24. Gempel K, Kiechl S, Hofmann S, et al. Screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency by tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* 2002;25:17–27.

Supplementary Materials:

Stabilization of the thermolabile variant S113L of carnitine palmitoyltransferase II

Motlagh, L., Golbik, R., Sippl, W., and Zierz, S.

Figure e-1

RMSD of the protein backbone atoms ($C\alpha$, N , C) at different temperatures with respect to the input structure.

(A) CPT II wild type. (B) The variant S113L of CPT II. (C) CPT II wild type in complex with palmitoyl-L-carnitine. (D) The variant S113L of CPT II in complex with palmitoyl-L-carnitine.

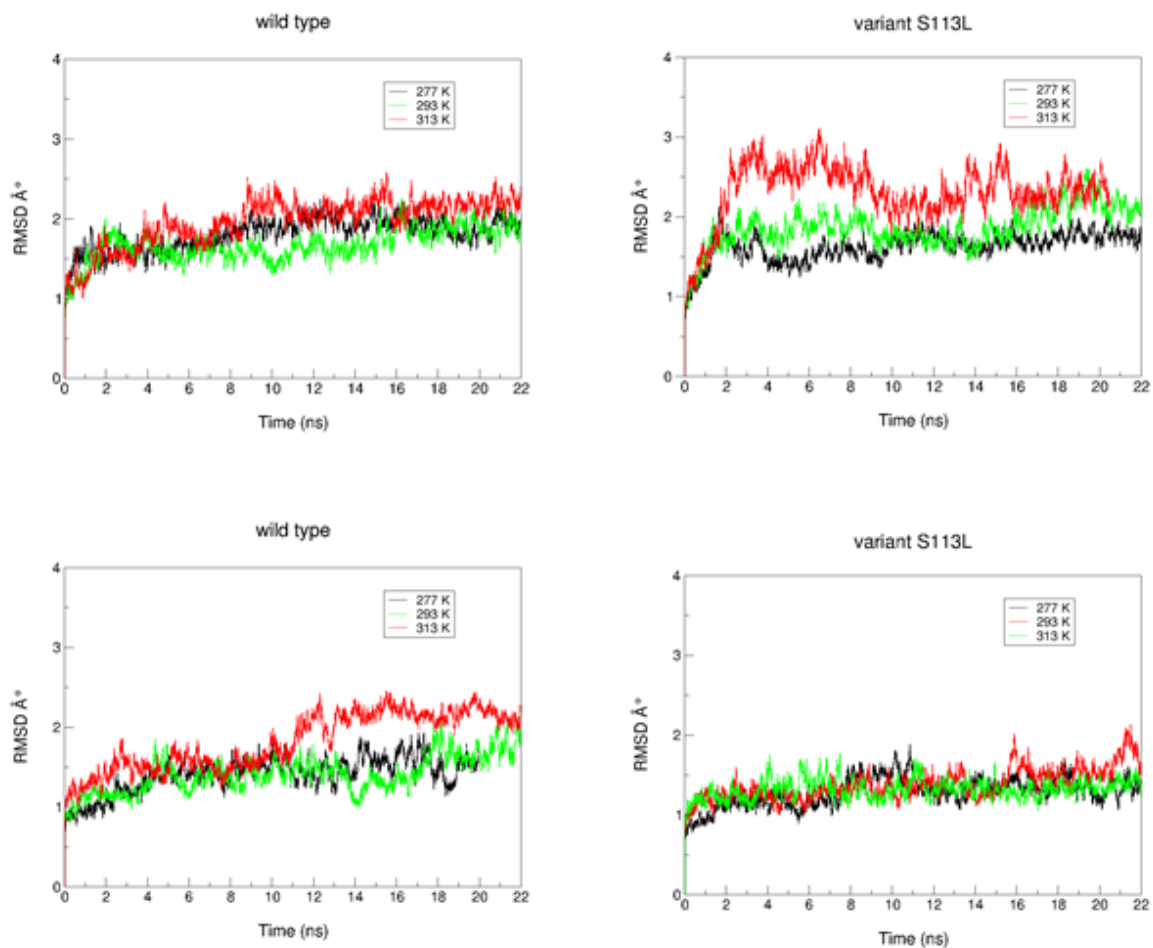


Figure e-2

B-factors of CPT II calculated by molecular dynamics simulation.

The *B*-factor was calculated over 22 ns MD simulation of wild type (upper chart) and the variant S113L (lower chart) in complex with palmitoyl-L-carnitine at 277 K, 293 K and 313 K.

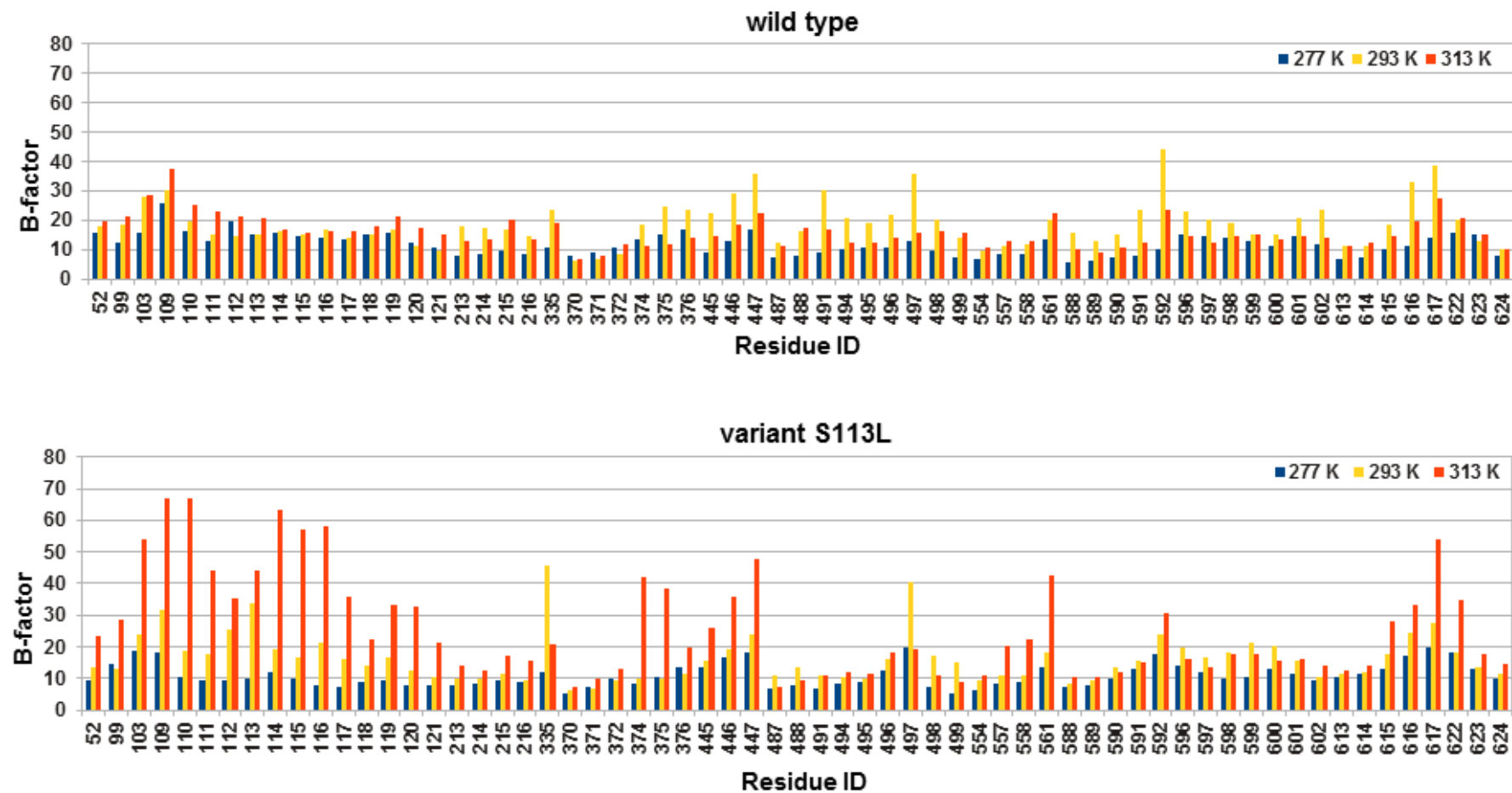
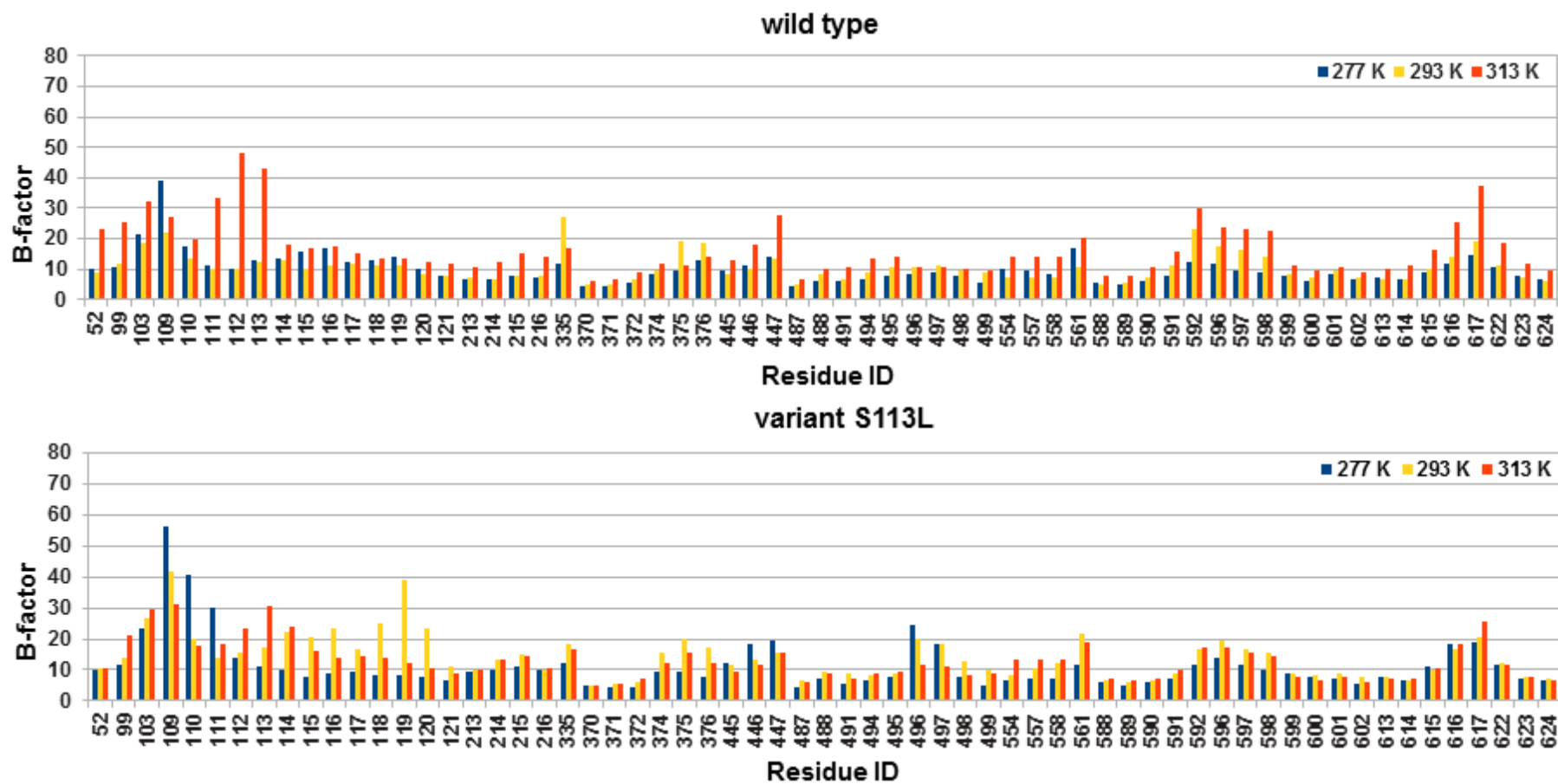


Figure e-3

B-factor of residues lining the palmitoyl-L-carnitine binding site and the residues within 8 Å of the mutation site S113L of CPT II. The B-factor was calculated over 22 ns MD simulation of wild type (upper chart) and the variant S113L (lower chart) in complex with palmitoyl-L-carnitine at 277 K, 293 K and 313 K.



Malonyl-CoA inhibits the S113L variant of carnitine-palmitoyltransferase II



Leila Motlagh ^a, Ralph Golbik ^b, Wolfgang Sippl ^c, Stephan Zierz ^a

^a Department of Neurology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Ernst-Grube-Str. 40, 06120 Halle, Germany

^b Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle (Saale), Germany

^c Institute of Pharmacy, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, 06120 Halle (Saale), Germany

article info

Article history:

Received 27 April 2015

Received in revised form 5 October 2015

Accepted 14 October 2015 Available online

23 October 2015

abstract

Carnitine palmitoyltransferases (CPT), located both in the outer (CPT I) and inner membrane (CPT II) of mitochondria, are the key players for an efficient transport of long chain fatty acids into this cell compartment. The metabolite malonyl-CoA is known to inhibit CPT I, but not CPT II. His₆-N-hCPT2 (wild type) and His₆-N-hCPT2/S113L (variant) were produced recombinantly in prokaryotic host, purified and characterized according to their functional and regulatory properties. The wild type and the variant showed the same enzymatic activity and were both inhibited by malonyl-CoA and malonate in a time-dependent manner. The inhibition was, however, significantly more pronounced in the mutated enzyme. The residual activities were 40% and 5% at temperatures of 4 °C and 30 °C, respectively. The inhibitory effect proceeded irreversibly with no recovery after post-incubation of palmitoyl-CoA (Pal-CoA) as native substrate. A model of malonyl-CoA and malonate binding to human CPT II was suggested by docking studies to explain the action of the inhibitors regarding to the effect of the mutation on the protein conformation. Results indicated that not only CPT I, but also CPT II can be inhibited by malonyl-CoA. Thus, the complete inhibition of total CPT (i.e. CPT I and CPT II) in muscle homogenates by an established assay is not due to a lack of enzymatically active CPT II, but rather due to an abnormal regulation of the enzyme.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Biochimica et Biophysica Acta 1861 (2016) 34–40

DOI: 10.1016/j.bbaliip.2015.10.005



Lack of activation of the S113L variant of carnitine palmitoyltransferase II by cardiolipin

Leila Motlagh Scholle¹ & Annemarie Thaele¹ & Marie Beckers¹ & Beate Meinhardt¹ & Stephan Zierz¹

Received: 27 September 2018 / Accepted: 27 November 2018 / Published online: 3 January 2019
Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The phospholipid environment of the mitochondrial inner membrane, which contains large amounts of cardiolipin, could play a key role in transport of the long chain fatty acids. In the present study, the pre-incubation of cardiolipin with the wild type carnitine palmitoyltransferase (CPT) II led to a more than 1.5-fold increase of enzyme activity at physiological temperatures. At higher temperatures, however, there was a pronounced loss of activity. The most frequent variant S113L showed even at 37 °C a great activity loss. Pre-incubation of the wild type with both malonyl-CoA and cardiolipin counteracted the positive effect of cardiolipin. Malonyl-CoA, however, showed no inhibition effect on the variant in presence of cardiolipin. The activity loss in presence of cardiolipin at fever simulating situations was more pronounced for the variant comparing to the wild type. The reason might be a disturbed membrane association or a blockage of the active center of the mutated enzyme.

Journal of Bioenergetics and Biomembranes (2018) 50:461–466

<https://doi.org/10.1007/s10863-018-9781-9>



Article

Normal FGF-21-Serum Levels in Patients with Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) Deficiency

Leila Motlagh Scholle *, Diana Lehmann, Pushpa Raj Joshi and Stephan Zierz

Department of Neurology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Ernst-Grube-Str. 40, 06120 Halle (Saale), Germany; diana.lehmann@rku.de (D.L.); pushpa.joshi@medizin.uni-halle.de (P.R.J.); stephan.zierz@uk-halle.de (S.Z.)

* Correspondence: leila.scholle@medizin.uni-halle.de; Tel.: +49-345-557-3628; Fax: +49-345-557-3505

Received: 8 February 2019; Accepted: 18 March 2019; Published: 20 March 2019



Abstract: Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) is known to be a biomarker for mitochondrial disorders. An upregulation of FGF-21 in serum and muscle of carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) and carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) knock-out mice has been reported. In human CPT II deficiency, enzyme activity and protein content are normal, but the enzyme is abnormally regulated by malonyl-CoA and is abnormally thermolabile. Citrate synthase (CS) activity is increased in patients with CPT II deficiency. This may indicate a compensatory response to an impaired function of CPT II. In this study, FGF-21 serum levels in patients with CPT II deficiency during attack free intervals and in healthy controls were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The data showed no significant difference between FGF-21 concentration in the serum of patients with CPT II deficiency and that in the healthy controls. The results of the present work support the hypothesis that in muscle CPT II deficiency, in contrast to the mouse knockout model, mitochondrial fatty acid utilization is not persistently reduced. Thus, FGF-21 does not seem to be a useful biomarker in the diagnosis of CPT II deficiency.

Keywords: FGF-21; mitochondrial diseases; carnitine palmitoyltransferase II deficiency; biomarker

1. Introduction

FGF-21 was first introduced in 2011 as a biomarker for the diagnosis of mitochondrial diseases [1]. This idea has subsequently been confirmed in various other studies [2–6]. The increased expression of FGF-21 in mitochondrial disorders is believed to be a compensatory response to respiratory chain deficiency [7]. In some metabolic diseases other than mitochondrial disorders, like in patients with obesity and type 2 diabetes, the serum or plasma levels of FGF-21 have been reported to be elevated [8].

The β -oxidation of activated fatty acids occurs in the mitochondrial matrix [9,10]. For transport of long chain fatty acids through the mitochondrial inner membrane, a special transport system is needed, including CPT I and CPT II. CPT II deficiency is regarded as the most common defect of lipid metabolism in skeletal muscle. CPT II is a ubiquitous protein without tissue specificity [10,11].

FGF-21 knockout mice ($Fgf21^{-/-}$) have been shown to not be able to mobilize and utilize lipids out of a ketogenic diet [12]. The $Fgf21^{-/-}$ mice showed significantly increased levels of FGF-21 in serum in both fed and fasted states. The mRNA expression of FGF-21 was upregulated in several muscles of these CPT I deficient mice [13].

Mice with liver-specific knockout of CPT II ($Cpt2^{L-/-}$) have been shown to have elevated mRNA expressions of *gdf15* and *fgf21* genes and increased serum FGF-21 and Growth/Differentiation factor (GDF)-15 concentrations following high-fat-feeding [14,15]. Another group of mice with an adipose-specific knockout of CPT II ($CPT2^{A-/-}$) [16] was shown to have an increased expression of mRNA of *fgf21* in brown adipose tissue (BAT) following cold exposure [17].

The human muscle form of CPT II-deficiency is characterized by attacks of myalgia and myoglobinuria provoked by prolonged exercise, fasting, fever, or exposure to cold [11,18]. In about 90% of patients a p.S113L mutation can be found with an allele frequency of 60–70% [19]. More than 60 other mutations have been identified in patients with CPT II-deficiency [20].

Until now, there have been no studies performed on FGF-21 serum levels in CPT II deficient patients. Our data showed that in contrast to the knockout mouse model, FGF-21 serum levels in patients with CPT II deficiency were not different from those in healthy controls.

2. Results

The cut-off concentration of FGF-21 for normal controls was set at 190 pg/mL based on the results of the 95th percentile of controls. None of the 13 CPT II patients had elevated FGF-21 serum concentrations (Table 1). For the whole group of patients, FGF-21 serum concentrations were not significantly different from those of the controls. None of the patients showed an FGF-21 concentration above the cut-off value (Figure 1). Spearman rank correlation coefficient testing showed no significant correlation between FGF-21 concentration and body mass index (BMI) (Spearman correlation ($r_s = 0.46$, $p = 0.11$)). There was also no significant correlation between the FGF-21 concentration and the frequency of attacks within one year ($r_s = 0.15$, $p = 0.62$).

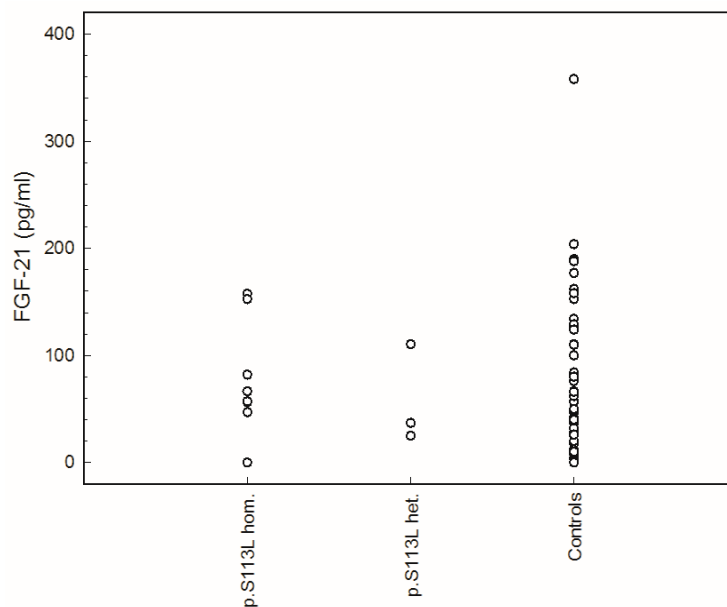


Figure 1. Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) serum concentration in controls and patients with carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency (p.S113L hom.: patients homozygous for the common p.S113L mutation; p.S113L het.: Patients with p.S113L on one allele and another mutation on other allele. The detailed genotype of all patients is illustrated in Table 1).

Table 1. Epidemiological data of patients.

Patients	Gender	Age at Diagnosis (yrs.)	Age of First Attack (yrs.)	Attacks Per Year (<i>n</i>)	Intensity of Pain*	BMI	Genotype	FGF-21 (pg/mL)
1	F	19	6	5	3	23.9	p.Ser113Leu/p.Ser113Leu	47.0
2	F	34	6	1	4	25.9	p.Ser113Leu/p.Ser113Leu	66.5
3	M	33	8	1	4	26.6	p.Ser113Leu/p.Ser113Leu	152.5
4	M	53	8	7	7	27.1	p.Ser113Leu/p.Ser113Leu	82.0
5	M	21	10	7	4	24.2	p.Ser113Leu/p.Ser113Leu	57.0
6	M	54	5	1	7	24.2	p.Ser113Leu/c.1238delAG	37.0
7	M	25	4	85	4	30.7	p.Ser113Leu/c.340 + 1G > A	110.5
8	M	24	9	10	7	26.6	p.Ser113Leu/c.340 + 5G > A	25.5
9	M	45	10	1	4	30.0	p.Ser113Leu/c.182_203del22	56.5
10	M	22	10	1	4	26.4	p.Arg231Trp/p.Glu487Lys	12.0
11	M	57	17	11	5	24.9	p.Ser113Leu/p.Ser113Leu	0
12	F	53	18	50	4	27.9	p.Ser113Leu/p.Arg151Gln	57.5
13	F	39	15	6	5	20.4	p.Ser113Leu/p.Pro50His	57.0
Mean				8.8		26.3		66.2
Range (CI)				6.1–11.5		25.0–27.7		36.8–95.6
Controls (FGF-21)							Range (CI)	Mean
All (<i>n</i> = 50)							46.4–90.6	68.5
M (<i>n</i> = 23)							52.8–108.9	80.9
F (<i>n</i> = 27)							23.4–92.4	57.9

F: female, M: male; BMI: body mass index; *: intensity of pain on a visual analogue scale (VAS) (0: no pain at all, 10: unbearable severe pain) during an attack; CI: 95% confidence interval.

3. Discussion

In mouse models with liver- and adipose-specific knockout of CPT II (Cpt2^{L-/-}) (CPT2^{A-/-}), an increase in mRNA expression of Fgf21 genes has been found following high-fat-feeding or exposure to cold [15–17]. A significant increase in mtDNA copy number after treatment of C2C12 myoblasts with FGF-21 has been reported. Additionally, the expression of CPT1A, CPT II genes, and citrate synthase activity also increased (1.5 times) [7]. These data suggest an adopting role of FGF-21 in response to a loss of mitochondrial fatty acid oxidation, which has been interpreted as a compensatory process in order to maintain the energy supply in affected tissues [13,15].

Based on these findings, a higher FGF-21 serum level could also be expected in CPT II deficient patients. However, in the present study no significant difference was found in FGF-21 serum concentration between CPT II deficient patients and the controls. This outcome can be explained by the following differences between the knock out models and human muscle CPT II deficiency: (i) in contrast to knockout models, there is no loss of CPT II activity in patients [19,21] and (ii) unlike in knockout models there is no reduction of protein concentrations of CPT I and CPT II in patients [22]. The genotypes of the patients are typical for human muscle deficiency. In the mouse model, however, the whole gene is knocked out. Thus, the genotypes are not comparable.

The increased citrate synthase activity in the muscles of patients might indicate the increased mitochondrial compartment compensating for the functional impairment in CPT II deficiency [22–24].

It has been suggested that the increase in FGF-21 concentrations in serum might occur with increasing clinical severity, progression of mitochondrial disease, and muscle pathology [1,3,4].

The human muscle form of CPT II deficiency is characterized by attacks of myalgia and myoglobinuria, provoked by prolonged exercise, fasting, fever, or exposure to cold [11,18].

One possible limitation of our study might be the small number of 13 patients. However, human muscle CPT II deficiency is a rare disease with very low prevalence. Thus the number of 13 patients included in our study is exceptionally high compared to other biochemical and molecular studies on CPT II deficiencies.

It should be noted that the serum samples from our patients were collected during attack-free intervals. Hence, the only attack-like impairment of fatty acid utilization in patients with the muscle form of CPT II deficiency might not have been sufficient to cause an increased FGF-21, at least during attack-free intervals. This is consistent with the notion that in human muscle CPT II deficiency there is no permanent lack of the enzymatic active enzyme but rather an abnormal regulation and thermoinstability of the mutant enzyme [25,26].

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Controls

Thirteen patients with a genetically confirmed diagnosis of CPT II deficiency (four females and nine males) were included in the study (Table 1), with their ages at the time of analysis ranging 28–80 years (mean: 46.9 years). The clinical and molecular data of all patients have previously been reported in detail [16].

Fifty healthy individuals (27 females and 23 males) with no clinical or molecular evidence of mitochondrial disorder served as controls. The ages of the controls ranged 21–73 years (mean: 41 years).

The study was performed in accordance with the Helsinki Declaration. The study was approved by the ethics committee of the Medical Faculty of the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg on 8 September 2012. Written informed consent was received from all patients.

4.2. Measurement of FGF-21 Serum Concentration

FGF-21 serum concentration was measured in duplicate samples using ELISA (BioVendor, Brno, Czech Republic) according to the manufacturer's instructions. A standard curve was created as

described in the manual of the company BioVendor. The absolute concentration of FGF-21 in all samples was determined according to a linear standard curve.

The samples from patients were obtained during asymptomatic intervals. All samples were stored at -80°C until analysis. The undetectable level was set as 0 pg/mL.

Author Contributions: L.M.S. designed and performed the experiments and wrote the manuscript. P.R.J. and D.L. performed the experiments and wrote the manuscript. S.Z. designed the experiments and wrote the manuscript.

Funding: This work was funded by the Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. (www.dgm.org). The APC was also funded by the German Research Foundation (DFG) in the funding program Open Access Publishing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Suomalainen, A. Biomarkers for mitochondrial respiratory chain disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2011**, *34*, 277–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Scholle, L.M.; Lehmann, D.; Deschauer, M.; Kraya, T.; Zierz, S. FGF-21 as a Potential Biomarker for Mitochondrial Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 2070–2081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Davis, R.L.; Liang, C.; Edema-Hildebrand, F.; Riley, C.; Needham, M.; Sue, C.M. Fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker of mitochondrial disease. *Neurology* **2013**, *81*, 1819–1826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Koene, S.; de Laat, P.; van Tienoven, D.H.; Vriens, D.; Brandt, A.M.; Sweep, F.C.; Rodenburg, R.J.; Donders, A.R.; Janssen, M.C.; Smeitink, J.A. Serum FGF21 levels in adult m.3243A>G carriers: Clinical implications. *Neurology* **2014**, *83*, 125–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Morovat, A.; Weerasinghe, G.; Nesbitt, V.; Hofer, M.; Agnew, T.; Quaghebeur, G.; Sergeant, K.; Fratter, C.; Guha, N.; Mirzazadeh, M. Use of FGF-21 as a Biomarker of Mitochondrial Disease in Clinical Practice. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 80. [[CrossRef](#)]
6. Suomalainen, A.; Elo, J.M.; Pietilainen, K.H.; Hakonen, A.H.; Sevastianova, K.; Korpela, M.; Isohanni, P.; Marjavaara, S.K.; Tyni, T.; Kiuru-Enari, S.; et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: A diagnostic study. *Lancet Neurol.* **2011**, *10*, 806–818. [[CrossRef](#)]
7. Ji, K.; Zheng, J.; Lv, J.; Xu, J.; Ji, X.; Luo, Y.B.; Li, W.; Zhao, Y.; Yan, C. Skeletal muscle increases FGF21 expression in mitochondrial disorders to compensate for energy metabolic insufficiency by activating the mTOR-YY1-PGC1 α pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *84*, 161–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Mraz, M.; Bartlova, M.; Lacinova, Z.; Michalsky, D.; Kasalicky, M.; Haluzikova, D.; Matoulek, M.; Dostalova, I.; Humenanska, V.; Haluzik, M. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clin. Endocrinol.* **2009**, *71*, 369–375. [[CrossRef](#)]
9. Eaton, S.; Bartlett, K.; Pourfarzam, M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem. J.* **1996**, *320 Pt 2*, 345–357. [[CrossRef](#)]
10. Kerner, J.; Hoppel, C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids* **2000**, *1486*, 1–17. [[CrossRef](#)]
11. McGarry, J.D.; Brown, N.F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *244*, 1–14. [[CrossRef](#)]
12. Badman, M.K.; Koester, A.; Flier, J.S.; Kharitonov, A.; Maratos-Flier, E. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology* **2009**, *150*, 4931–4940. [[CrossRef](#)]
13. Vandanmagsar, B.; Warfel, J.D.; Wicks, S.E.; Ghosh, S.; Salbaum, J.M.; Burk, D.; Dubuisson, O.S.; Mendoza, T.M.; Zhang, J.; Noland, R.C.; et al. Impaired Mitochondrial Fat Oxidation Induces FGF21 in Muscle. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 1686–1699. [[CrossRef](#)]
14. Lee, J.; Choi, J.; Scafidi, S.; Wolfgang, M.J. Hepatic Fatty Acid Oxidation Restrains Systemic Catabolism during Starvation. *Cell Rep.* **2016**, *16*, 201–212. [[CrossRef](#)]
15. Lee, J.; Choi, J.; Selen Alpergin, E.S.; Zhao, L.; Hartung, T.; Scafidi, S.; Riddle, R.C.; Wolfgang, M.J. Loss of Hepatic Mitochondrial Long-Chain Fatty Acid Oxidation Confers Resistance to Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 655–667. [[CrossRef](#)]

16. Lee, J.; Ellis, J.M.; Wolfgang, M.J. Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress-induced inflammation. *Cell Rep.* **2015**, *10*, 266–279. [[CrossRef](#)]
17. Gonzalez-Hurtado, E.; Lee, J.; Choi, J.; Wolfgang, M.J. Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming. *Mol. Metab.* **2018**, *7*, 45–56. [[CrossRef](#)]
18. Joshi, P.R.; Deschauer, M.; Zierz, S. Phenotype of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency: A questionnaire-based survey. *J. Clin. Neurosci.* **2019**, *59*, 32–36. [[CrossRef](#)]
19. Deschauer, M.; Wieser, T.; Zierz, S. Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: Clinical and molecular genetic features and diagnostic aspects. *Arch. Neurol.* **2005**, *62*, 37–41. [[CrossRef](#)]
20. Isackson, P.J.; Bennett, M.J.; Vladutiu, G.D. Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **2006**, *89*, 323–331. [[CrossRef](#)]
21. Zierz, S.; Engel, A.G. Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **1985**, *149*, 207–214. [[CrossRef](#)]
22. Lehmann, D.; Zierz, S. Normal protein content but abnormally inhibited enzyme activity in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *J. Neurol. Sci.* **2014**, *339*, 183–188. [[CrossRef](#)]
23. Larsen, S.; Nielsen, J.; Hansen, C.N.; Nielsen, L.B.; Wibrand, F.; Stride, N.; Schroder, H.D.; Boushel, R.; Helge, J.W.; Dela, F.; et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* **2012**, *590*, 3349–3360. [[CrossRef](#)]
24. Molina, A.J.; Bharadwaj, M.S.; Van Horn, C.; Nicklas, B.J.; Lyles, M.F.; Eggebeen, J.; Haykowsky, M.J.; Brubaker, P.H.; Kitzman, D.W. Skeletal Muscle Mitochondrial Content, Oxidative Capacity, and Mfn2 Expression Are Reduced in Older Patients with Heart Failure and Preserved Ejection Fraction and Are Related to Exercise Intolerance. *JACC Heart Fail.* **2016**, *4*, 636–645. [[CrossRef](#)]
25. Motlagh, L.; Golbik, R.; Sippl, W.; Zierz, S. Malonyl-CoA inhibits the S113L variant of carnitine-palmitoyltransferase II. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1861*, 34–40. [[CrossRef](#)]
26. Motlagh, L.; Golbik, R.; Sippl, W.; Zierz, S. Stabilization of the thermolabile variant S113L of carnitine palmitoyltransferase II. *Neurol. Genet.* **2016**, *2*, e53. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Habilitationsschrift selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Halle, den 15.03.2021

Dr. Leila Scholle

Erklärung über frühere Habilitationsversuche

Ich erkläre, dass frühere Habilitationsversuche nicht stattfanden, und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Habilitationsverfahren im Gange ist.

Halle, den 15.03.2021

Dr. Leila Scholle

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Leila Scholle; geb. Motlagh
Geburtsdatum, -ort: 19.09.1978, in Teheran/Iran

Hochschulausbildung

09/1996 – 04/2002 Abgeschlossenes Zahnmedizinstudium an der Universität für medizinische Wissenschaften Babol (Babol/Iran) mit anschließender Promotion

10/2008 – 11/2010 Masterstudiengang „*Pharmaceutical Biotechnology*“ an der Martin-Luther -Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie

02/2011 – 06/2014 Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie

Beruflicher Werdegang

04/2002 – 11/2003 Beschäftigung als Zahnärztin in medizinischem Zentrum für Gesundheit Polsefid/Iran

11/2003 – 03/2006 Beschäftigung als Zahnärztin in verschiedenen zahnärztlichen Praxen und Kliniken in Teheran

seit 02/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Muskellabor des neurologischen Universitätsklinikums Halle

seit 03/2013 Leiterin des Muskellabors des neurologischen Universitätsklinikums Halle

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stephan Zierz, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie Halle herzlich für das Ermöglichen dieser Arbeit bedanken. Ich danke ihm für seine großzügige und motivierende Unterstützung bei der Durchführung meiner Projekte sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und akademische Betreuung.

Mein Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Halle. Mein besonderer Dank geht insbesondere an die Mitarbeiter des Muskellabors der Neurologischen Universitätsklinik Halle für die freundliche Arbeitsatmosphäre und tatkräftige Unterstützung.

Der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM) danke ich für die finanzielle Förderung einiger Teile meiner Forschungsprojekte.

Mein herzliches Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Faramarz Dehghani aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, der mir mit neuen Ideen und guten Ratschlägen sowie seiner konstruktiven Kritik zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Samiya Al-Robaiy aus dem Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Uni Halle, Dr. Joana Heinzelmann aus der Universitätsklinik für Augenheilkunde Halle, Beate Meinhardt aus der Universitätsklinik für Neurologie Halle und Dr. Diana Urban aus der Neurologischen Universitätsklinik Ulm für die zahlreichen freundschaftlichen Anregungen, konstruktiven Diskussionen und motivierenden liebevollen Gespräche.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir immer zur Seite gestanden und mich mit ihrem liebevollen Verständnis begleitet hat.