

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. Stephan Zierz



Untersuchung der Substratspezifität der Carnitin Palmityltransferase 1 und 2 im
menschlichen Skelettmuskel für geradzahlige Fettsäuren
mit 8 bis 18 Kohlenstoffatomen.

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Titels
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Mario Zerbaum
geboren am 14.12.1981 in Lutherstadt Wittenberg

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 13.11.2007

Datum der Verteidigung: 03.06.2008

Gutachter: Prof. Horstkorte

Prof. Reichmann

urn:nbn:de:gbv:3-000013774

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013774>]

Die Carnitin Palmityltransferasen 1 und 2 stellen zwei wichtige Enzyme in der Verstoffwechslung von Fettsäure-CoA Estern dar. Es sind zwei verschiedene Proteine, welche auf unterschiedlichen Genen lokalisiert sind. Während die CPT 1 durch mehrere transmembranale Domänen fest in die Mitochondrienmembran integriert ist, zeigt die CPT 2 lediglich eine lockere Assoziation mit dieser.

Störungen im CPT-Enzymsystem sind Erkrankungen, welche sich klinisch vielfältig präsentieren können. Während einige Patienten nur eine sehr milde Symptomatik z.B. belastungsabhängige Muskelschmerzen ausprägen, treten bei anderen hypoketotische Hypoglykämien, Rhabdomyolysen, Kardiomyopathien u.a. Symptome auf, die zum Tode führen können.

Bisherige Arbeiten über das CPT-Enzymsystem untersuchten dessen Funktion nur selten in menschlicher Skelettmuskulatur und häufig auch nur für wenige in Frage kommende Substrate.

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der jeweiligen maximalen enzymatischen Aktivität, der Affinität und des Hemmverhaltens der CPT 1 und 2 für Fettsäuren mit 8 bis 18 Kohlenstoffatomen. Hierfür wurden beide Proteine zunächst von anderen Acyltransferasen und anschließend durch Ultrazentrifugation und Detergenzienbehandlung voneinander getrennt.

Unter in vitro Bedingungen konnten sowohl in der Sediment- (CPT 1) als auch in der Überstandfraktion (CPT 2) die höchsten enzymatischen Aktivitäten für kurz- und mittelkettige Fettsäuren bestimmt werden, allerdings waren hierfür teilweise unphysiologisch hohe Substratkonzentrationen erforderlich.

Die stärksten Affinitäten konnten für längerkettige Fettsäuren bestimmt werden, wobei hier der K_m -Wert in der Überstandfraktion (CPT2) für das C-12 Substrat Lauryl-CoA eine auffällige Abweichung von dieser Tendenz darstellt. Handelt es sich hierbei vielleicht um eine, durch Detergenzienbehandlung und Ultrazentrifugation freigesetzte bzw. aktivierte eigenständige C-12 Transferaseaktivität?

Hinsichtlich der Hemmbarkeit der Enzyme durch die eingesetzten Fettsäuren in Konzentrationen über dem jeweiligen Substratoptimum konnten deutliche Unterschiede sowohl zwischen den Fraktionen als auch zwischen den jeweiligen Substraten beobachtet werden. Langkettige Fettsäuren hemmen die Aktivitäten von Acyl-CoA Transferasen bei niedrigeren Konzentrationen als kurzkettige Acyl-CoA Ester.

Zerbaum, Mario: Untersuchung der Substratspezifitäten von CPT 1 und 2 in menschlichem Skelettmuskel für geradzahlige Fettsäuren mit 8 bis 18 Kohlenstoffatomen.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2007

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|--|--------------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Stoffwechsel und β -Oxidation | 1 |
| 1.2 Das mitochondriale Carnitin-Acyltransferasen-System | 2 |
| 1.2.1 Carnitin Palmitoyltransferase 1 (CPT 1) | 3 |
| 1.2.2 Carnitin Palmitoyltransferase 2 (CPT 2) | 4 |
| 1.3 Acyltransferaseaktivitäten in extramitochondrialen Kompartimenten | 5 |
| 1.4 Bedeutung der Malonyl-CoA/CPT1 Interaktion in nicht-hepatischen Geweben | 7 |
| 1.5 Zusammenspiel von AMP-activated protein kinase (AMPK), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und Palmitoyl-CoA in der Regulation der Fettsäureoxidation | 9 |
| 1.6 Interaktion der CPT 1 mit Proteasen und Inhibitoren | 10 |
| 1.7 Störungen des Carnitin Palmitoyltransferase Systems | 11 |
| 1.7.1 Erkrankungen der Carnitin Palmitoyltransferase 1 | 12 |
| 1.7.2 Erkrankungen der Carnitin Palmitoyltransferase 2 | 13 |
| 1.7.2.1 Benigne myopathische Form des CPT 2-Mangels | 13 |
| 1.7.2.2 Infantiler Carnitin Palmitoyltransferase 2 Mangel (hepatokardiomuskuläre Form) | 14 |
| 1.7.2.3 Neonataler CPT 2-Mangel | 15 |
| 1.7.3 Defekt der Carnitin Acylcarnitin Translokase (CACT-Defekt) | 15 |
| 2. THEMENSTELLUNG | 16 |
| 3. MATERIALIEN UND METHODEN | 18 |
| 3.1 Reagenzien | 18 |
| 3.2 Aufarbeitung des Muskelgewebes | 19 |
| 3.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten | 20 |
| 3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration | 23 |
| 3.4.1 Durchführung der Proteinbestimmung | 24 |
| 3.4.2 Beeinflussung der Proteinbestimmung durch Detergenzien | 24 |
| 3.5 Grundlagen der Enzymkinetik | 25 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.6 | Statistische Auswertung | 27 |
| 4. | ERGEBNISSE | 28 |
| 4.1 | Differenzierung der CPT-Fraktionen durch den Inhibitor Malonyl-CoA | 28 |
| 4.2 | Substratspezifitäten der CPT-Enzyme | 30 |
| 4.2.1 | Substratspezifische Aktivitäten, Substratbindungs- (K_m) und Sättigungsverhalten (K_i) der Carnitin Palmityltransferase 1 und 2 | 30 |
| 4.2.1.1 | Substrat Oktanyl-CoA (C-8) | 31 |
| 4.2.1.2 | Substrat Decanyl-CoA (C-10) | 32 |
| 4.2.1.3 | Substrat Lauryl-CoA (C-12) | 33 |
| 4.2.1.4 | Substrat Myristyl-CoA (C-14) | 35 |
| 4.2.1.5 | Substrat Palmityl-CoA (C-16) | 36 |
| 4.2.1.6 | Substrat Stearyl-CoA (C-18) | 37 |
| 4.3 | Katalytische Effizienzen der CPT-Enzyme | 41 |
| 5. | DISKUSSION | 42 |
| 5.1 | Spezifische Substratprofile der CPT-Enzyme | 42 |
| 5.2 | Substratinhibition der CPT-Enzyme (I_{50}) | 51 |
| 5.3 | Existenz einer spezifischen C12-Transferaseaktivität in menschlichem Skelettmuskel? | 54 |
| 5.4 | Implikationen zur Therapie der CPT-Defekte | 58 |
| 5.5 | Differenzierung der CPT1- und 2-Aktivitäten | 59 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 60 |
| 7. | LITERATUR | 61 |
| 8. | VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN | 73 |
| 9. | THESEN | 74 |

1. EINLEITUNG

1.1 Stoffwechsel und β -Oxidation

Jedes Gewebe ist zur Erfüllung seiner spezifischen Leistung auf die hinreichende Versorgung mit Energie angewiesen. Dabei sind die meisten, mit Ausnahme des Gehirns, welches im Allgemeinen auf Glukose angewiesen ist, in der Lage ihren Energiebedarf aus Glukose, Glykogen und Fettsäuren zu decken. Ist der Blutglukosespiegel unmittelbar nach Nahrungsaufnahme erhöht, dient diese Glukose zur Energieversorgung, so dass sich der Blutzuckerspiegel wieder normalisiert. Postresorptiv werden vorwiegend Fettsäuren (FS) als energiereiche Substrate herangezogen. Die Glykogenspeicher des Organismus werden in Situationen, in denen plötzlich eine erhöhte Leistung erbracht werden muss angegriffen z.B. bei stark gesteigerter motorischer Aktivität der Skelettmuskulatur. In besonders langen Postresorptionsphasen z.B. während Hungerperioden ist die Muskulatur des Weiteren in der Lage, Ketonkörper zu Gewährleistung einer hinreichenden Leistungsfähigkeit metabolisch umzusetzen.

Da unter körperlicher Beanspruchung die Glukose bereits nach wenigen Sekunden bzw. Minuten und die Glykogenreserven nach etwa 30 Minuten aufgebraucht sind, stellen die Fettsäuren bei Ausdauerbelastungen die wichtigste Energiequelle dar. Hierbei müssen diese zunächst im Fettgewebe mobilisiert und über das Blut zur arbeitenden Muskulatur transportiert werden.

Der unmittelbare Abbau der Fettsäuren in für die betreffenden Gewebe verwertbare Energie findet im Mitochondrium im Rahmen der β -Oxidation der Fettsäuren statt. Hier befindet sich die dafür erforderliche enzymatische Ausstattung im Bereich der inneren mitochondrialen Membran, quasi in unmittelbarer Nähe zu den Enzymen der Atmungskette. Es ist somit zwingend erforderlich, dass die Fettsäuren zunächst in die Zelle und später ins Mitochondrium gelangen. Zuvor werden diese im Cytosol aktiviert. Dieser Prozess wird durch eine Acyl-CoA-Synthetase realisiert. Hierbei entstehen Acyl-CoA-Derivate mit energiereichen Thioesterbindungen (s. Abb.1).

Die innere Mitochondrienmembran ist jedoch für Acyl-CoA Verbindungen nicht permeabel, so dass ein nach intramitochondrial gerichteter Transport nur unter Beteiligung eines spezifischen Shuttlesystems, dem Carnitin-Acylcarnitin-Transferasesystem möglich ist, welches die aktivierten Fettsäuren unter Kopplung an Carnitin ins Mitochondrium bewegt.

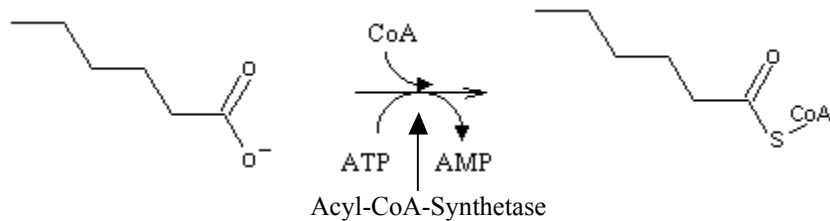


Abb.1: Aktivierung der Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Synthetase zu energiereichen Thioestern.

Der Prozess der β -Oxidation stellt einen Zyklus mit drei aufeinander folgenden Reaktionsschritten dar, ähnlich dem letzten Teil des Zitronensäurezyklus. Hierbei handelt es sich um die Abfolge von Dehydrogenierung, Hydrierung und abschließender Oxidation.

Vom Reaktionsprodukt wird schließlich durch die Thiolase ein Acetyl-CoA Molekül abgespalten, so dass am Ende des Zyklus ein um zwei C-Atome verkürztes Acyl-CoA Molekül vorliegt. Das entstandene Acetyl-CoA wird im Zitronensäurezyklus zu Wasser und CO_2 oxidiert und die durch Dehydrogenierung und Hydrierung reduzierten Elektronencarrier NADH_2 sowie FADH_2 geben ihre Elektronen an die mitochondriale Atmungskette ab, an deren Ende der Aufbau von energiereichen Phosphaten steht.

1.2 Das mitochondriale Carnitin-Acyltransferase-System

Der Transport von Fettsäuren vom Zytosol in die mitochondriale Matrix, dem Ort der β -Oxidation, wird durch verschiedene Carnitin-Acyltransferasen, der Acyl-CoA-Synthase sowie der Carnitin/Acylcarnitin-Translokase katalysiert.

Nach bisherigem Verständnis existieren drei verschiedene Carnitin-Acyltransferasen mit unterschiedlichen Spezifitäten für unterschiedliche Kettenlängen der Substrate. Im Einzelnen sind dies die Carnitin-Acetyltransferase (CAT), die Carnitin-Oktanyltransferase (COT) und die Carnitin-Palmityltransferase (CPT) [9;14;62]. Im Gegensatz zur CPT-Fraktion sind die CAT und COT vollständig löslich.

Das Carnitin-Palmityltransferasesystem besteht aus zwei, immunologisch gegeneinander abgrenzbaren, auf unterschiedlichen Genen kodierten Komponenten. Der Carnitin-Palmityltransferase 1 (CPT 1; EC 2.3.1.21) und der Carnitin-Palmityltransferase 2 (CPT 2). Während die CPT 2 als einzelnes Protein dem Genlocus 1p32 zugeordnet wurde, existieren für die Isoformen der CPT 1 jeweils eigene Gene, so dass die L-CPT 1 auf Chromosom 11q13 und die Muskelisoform (M-CPT 1) auf Chromosom 22q13.3 codiert ist [16;36].

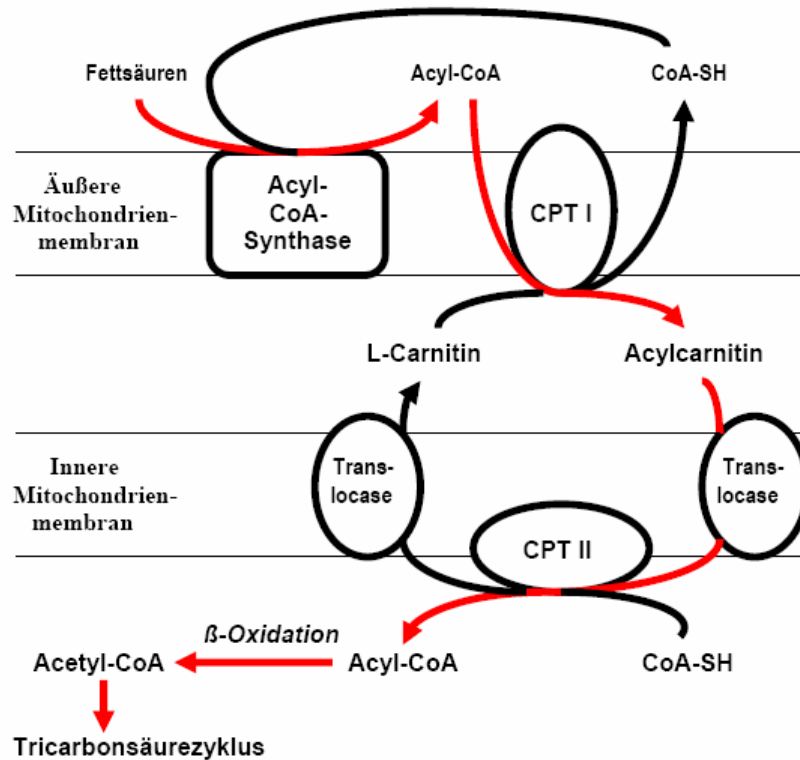


Abb.2: Schematische Darstellung des Transports von Fettsäuren über die mitochondrialen Membranen aus dem Zytoplasma in die Mitochondrienmatrix und deren anschließende metabolische Verwertung im Rahmen von β -Oxidation und Tricarbonsäurezyklus (CoA-SH: freies Coenzym A) [50].

1.2.1 Carnitin Palmitoyltransferase 1 (CPT 1)

Dieses Enzym katalysiert die Kopplung der Acyl-CoA Thioester an L-Carnitin. Hierbei entsteht Acyl-Carnitin unter Freisetzung von Coenzym A.

Bei der CPT 1 handelt es sich um ein, durch den Inhibitor Malonyl-CoA hemmbares, durch Detergenzien inaktivierbares, integrales Protein welches auf der inneren Oberfläche der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist [52;57].

Während die CPT 2 ein ubiquitär vorkommendes Protein darstellt, wurden von der CPT 1 gewebespezifische Isoformen beschrieben [105]. Demnach wird in eine Leber-Isoform (L-CPT 1) und in eine Herz-/Muskel-Isoform (M-CPT 1) unterschieden. Beide Formen zeigen eine zu etwa 62% homologe Aminosäuresequenz.

Während im Herz und adulten Testis beide Varianten nachgewiesen werden konnten, gilt als gesichert, dass im menschlichen Skelettmuskel nur die M-Isoform der CPT 1 vorhanden ist [4;105].

Die CPT 1-Isoformen zeigen unterschiedliches Verhalten hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA und ihrem jeweiligen K_m -Wert für das Substrat Carnitin. Hierbei besitzt die M-CPT 1 eine höhere Sensitivität gegenüber dem Inhibitor Malonyl-CoA und einen höheren K_m -Wert für Carnitin [17;103].

Die Tatsache, dass die Herauslösung der CPT 1 aus ihrer Membranumgebung das Enzym inaktiviert, eine Reaktivierung durch Rekonstitution in Gegenwart von Phospholipiden jedoch möglich ist, legt die Vermutung nahe, dass eine spezifische membranale Umgebung für eine katalytisch arbeitende CPT 1 von essentieller Bedeutung ist [101].

Die L- und M-CPT 1 Enzymproteine bestehen aus jeweils 773 bzw. 772 Aminosäuren. Der Proteinkörper der CPT 2 ist etwas kleiner. Er setzt sich aus 658 Aminosäuren zusammen. Diese Größendifferenz zwischen beiden Carnitin Palmitoyltransferaseformen beruht auf einem spezifischen N-terminalen Anhang, welcher nur bei der CPT 1 zu finden ist. Diese N-terminale Domäne zeigt zwei membrandurchdringende Regionen, welche zum einen die stärkere Membranassoziation der CPT 1, zum anderen ihre charakteristische Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA erklären könnte.

1.2.2 Carnitin Palmitoyltransferase 2 (CPT 2)

Die CPT 2 katalysiert die Rückreaktion des Acyl-Carnitins unter Verbrauch von Coenzym A. Somit stehen in der mitochondrialen Matrix Acyl-CoA Ester zur Verfügung während das freiwerdende Carnitin wieder zurück in extramitochondriale Kompartimente gelangt.

Dieses Protein ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und etwa 70kDa schwer. Im Gegensatz zur CPT 1 ist die CPT 2 nicht durch Malonyl-CoA hemmbar, verliert nicht ihre katalytische Aktivität nachdem sie durch milde Detergenzien z.B. Tween 20 1% aus ihrer Membranumgebung herausgelöst wurde und ist lediglich locker an diese gebunden [100]. Durch membranzerstörende Verfahren wie zum Beispiel Detergenzien- oder Ultraschallbehandlung lässt sich dieses Enzym leicht aus der Mitochondrienmembran herauslösen.

Die Tatsache, dass die CPT 2-mRNA in unterschiedlichen Geweben die gleiche Größe (~2,5kb) besitzt und ihr Produkt in diesen verschiedenen Geweben immunologisch nicht zu unterscheiden ist, legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein Protein handelt, welches auf ein und demselben Gen kodiert ist [56;100].

Tab1. : Zusammenfassung der Eigenschaften humaner mitochondrialer CPT-Enzyme.
(IC₅₀: Inhibitorkonzentration, bei der die Aktivität des Enzyms noch 50% der Maximalaktivität beträgt; Km: Michaelis-Menten-Konstante).

| | L-CPT 1 | M-CPT 1 | CPT 2 |
|------------------------------------|---------|---------|---------|
| <i>Molekulare Masse</i> | ~88 kDa | ~88 kDa | ~70 kDa |
| <i>Malonyl-CoA IC₅₀</i> | ~2,5 µM | ~0,03µM | - |
| <i>K_m Carnitin</i> | ~30 µM | ~500µM | ~120 µM |
| <i>Genlocus</i> | 11q13 | 22q13.3 | 1p32 |

1.3 Acyltransferaseaktivitäten in extramitochondrialen Zellkompartimenten

Lange Zeit wurde angenommen, Carnitin-Acyltransferaseaktivitäten wären ausschließlich in Mitochondrien zu finden. Doch in mehreren Arbeiten konnte die Existenz weiterer solcher Acyltransferase-Enzymsysteme in extramitochondrialen Kompartimenten nachgewiesen werden.

So besitzen mindestens noch Mikro- und Peroxisomen eine derartige enzymatische Ausstattung [65;69;77;86].

Murthy und Kollegen (1992; 1994) konnten nachweisen, dass Mikrosomen sowohl eine Malonyl-CoA empfindliche, membranassoziierte, als auch eine Malonyl-CoA unempfindliche, intraluminal lokalisierte Acyltransferaseaktivität besitzen.

Miyazawa et al. (1983) und Farrell (1983) fanden eine Carnitine Oktanyltransferase in Mausleberperoxisomen [32;62].

In den Peroxisomen findet die Oxidation langkettiger Fettsäuren zu mittel- und kurzkettigen Fettsäuren statt. Diese werden dann durch die peroxisomale COT in Carnitiner umgewandelt und letztendlich der mitochondrialen β-Oxidation zugeführt [33;78].

Verglichen mit mikrosomalen Acyl-CoA Transferasen arbeiten mitochondriale und peroxisomale Transferaseaktivitäten mit etwa 8-fach höheren Umsatzgeschwindigkeiten [86].

Ramsay und Mitarbeiter (1988) wiesen eine weitere lösliche Acyltransferaseaktivität in Peroxisomen nach [77]. Hierbei konnte auf Grund der erreichten substratspezifischen maximalen Umsatzgeschwindigkeiten dieses lösliche Enzym zunächst von der peroxisomalen

Carnitin Oktanyltransferase abgegrenzt werden. Diese zeigt eine maximale Umsatzgeschwindigkeit für Fettsäuren mit 6 Kohlenstoffatomen, während die von Ramsay beschriebene lösliche Transferase besonders mit C-16 Fettsäuren hohe Umsatzzraten erreicht [62;77].

Gestützt auf Ergebnisse aus Experimenten mit Antikörpern gegen peroxisomale Carnitin Oktanyltransferase und mitochondriale CPT postulierten Ramsay und Kollegen (1988), dass es sich bei der löslichen peroxisomalen Transferaseaktivität und der peroxisomalen COT um teilweise das gleiche Protein handeln könnte, welches jedoch in bestimmten Situationen unterschiedlich reguliert wird und somit differente kinetischen Eigenschaften vorweist.

All diese Untersuchungen sind in einem bestimmten Punkt nicht mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar: Die Messungen wurden nicht an humanem Muskelgewebe durchgeführt, stattdessen an Rinder- Ratten- oder Geflügelzellen- bzw. Geweben [62;77;86].

Hierbei existieren beträchtliche Unterschiede in der Substratspezifität der Acyltransferasen verschiedener Säugetierspezies, was nachfolgend am Beispiel der peroxisomalen löslichen Acyltransferase dargestellt werden soll.

Beim Rind beträgt das Verhältnis der maximalen Enzymaktivität für Palmityl-CoA (C-16) zur maximalen Enzymaktivität für Oktanyl-CoA (C-8) ($V_{\max [C16]}/V_{\max [C8]}$) 1,13. Bei der Ratte bzw. Maus dagegen nur noch 0,3 bzw. 0,1 [31;62;77].

Hieraus könnte geschlossen werden, dass die verschiedenen Gattungen anscheinend Fettsäuren mit unterschiedlichen Kettenlängen als Hauptenergieträger nutzen.

Auffällig bei dieser Betrachtung ist die indirekte Proportionalität zwischen den Verhältnissen der enzymatischen Maximalaktivitäten ($V_{\max [C16]}/V_{\max [C8]}$) und der Größe des Gesamtorganismus des untersuchten Organismus.

Tab.2: Bisher bekannte Acyl-CoA Transferaseaktivitäten, deren Lokalisation und ausgewählte Merkmale. Abkürzungen: Mito.=Mitochondrium; Perox.=Peroxisom; Mikros.=Mikrosom.

| Zellkompartim. | Enzym | Substratspez. | Untersuchtes Gewebe | Mal-CoA hemmbar | Membrangebunden/assoziiert | löslich | Referenz |
|----------------|------------------------------|------------------|---------------------|-----------------|----------------------------|----------------|---------------------|
| Mito. | CAT | C4-C8 | humane Muskulatur | - | - | + ^b | + ^b [22] |
| | COT ^a | C6-C10 | Leber Rind | | | | [87] |
| | CPT 1 | C16 | humane Muskulatur | + | + | - | - [9] |
| | CPT 2 | C16 | humane Muskulatur | - | - | + | - [9] |
| Perox. | CAT | C4-C8 | Leber Maus | | | + | [10;31] |
| | COT | C6 ^c | Leber Maus | - | | + | [86] |
| | lösliche Acyltransferase | C16 ^c | Leber Rind | + | | + | [77] |
| Mikros. | Acyltransferase ^d | | Leber Ratte | + | | + | [65;69] |
| | Acyltransferase ^d | | Leber Ratte | - | | - | [65;69] |

^a: Existenz bisher nicht gesichert

^b: keine einheitlichen Literaturangaben

^c: (wahrscheinlich) speziesabhängig

^d: bisher keine einheitliche Nomenklatur

1.4 Bedeutung der Malonyl-CoA/CPT 1 Interaktion in nicht-hepatischen Geweben

Der inhibierende Einfluss des Malonyl-CoA auf die Funktion der Carnitin Palmityltransferase 1 stellt einen Schlüsselpunkt in der reziproken Kontrolle zweier entgegengerichteter Stoffwechselwege, der Neosynthese und der β -Oxidation der Fettsäuren (FS) dar.

Malonyl entsteht unter dem katalytischen Einfluss der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) aus Acetyl-CoA. Diese Acetyl-CoA-Carboxylase steht ihrerseits unter dem Einfluss der 5'-AMP-Proteinkinase, durch welche sie phosphoryliert und somit aktiviert wird.

Während die Fähigkeit zur Biosynthese der Fettsäuren streng auf hepatische Gewebe beschränkt ist, können sie jedoch von verschiedensten Geweben zur Deckung des Energiebedarfs verwertet werden. Sowohl der Nachweis von Malonyl-CoA in Herz- und Skelettmuskulatur, also nicht lipogenem Gewebe, als auch die Erkenntnis der variablen Konzentration in diesen extrahepatischen Geweben in Abhängigkeit von der

Ernährungssituation war nun in sofern überraschend, als das man Malonyl-CoenzymA als erstes Intermediat der anabolen Fettsäurebiosynthese nur in hepatischen Geweben erwartet hatte [55].

Der Nachweis einer Acetyl-CoA-Carboxylase in Herz- und Skelettmuskulatur, welche eine Isoform der Leber- und Fettgewebs-Carboxylase darstellt unterstreicht die Bedeutung der Malonyl-CoA/CPT 1 Interaktion für die adaptierte Regulation von Fettsäureauf- und Abbau [8;91].

Trotz zahlreicher Untersuchungen zu diesem Thema, ist bisher die Frage, wie viel von dem in einem Gewebe gebildeten Malonyl-CoA mit der CPT 1 reagieren kann, weiterhin nur unzureichend geklärt. Theoretisch dürfte nur ein Bruchteil des Malonyl-CoA Pools für eine Inhibition der Carnitin-Palmityltransferase 1 genutzt werden, soll erstens noch ein hinreichender Aufbau von Fettsäuren stattfinden und zweitens die β -Oxidation nicht vollständig zum Erliegen kommen (s. *1.4 Zusammenspiel von AMP-activated protein kinase (AMPK), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und Palmityl-CoA in der Regulation der Fettsäureoxidation*). Eine mögliche Erklärung könnte die Existenz eines cytosolischen Bindeproteins sein, welches als eine Art Puffer gebildetes Malonyl-CoA bindet bzw. wieder freisetzt und so ein Auf- und Abbau von Fettsäuren durch alternierende Inhibition der Carnitin-Palmityltransferase 1 ermöglicht [54].

1.5 Zusammenspiel von AMP-activated protein kinase (AMPK), Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und Palmityl-CoA in der Regulation der Fettsäureoxidation

Wie schon dargestellt, katalysiert die Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) die Bildung von Malonyl-CoA, zum einen ein wichtiges Intermediat in der Synthese von Fettsäuren, zum anderen ein gewichtiger Regulator der Fettsäureoxidation [6].

Bisher konnten zwei Isoformen der ACC nachgewiesen werden. Die ACC-1 v.a. in lipogenem Gewebe und die ACC-2 in Muskel- und Herzgewebe, in welchen Fettsäuren die Hauptbetriebsstoffe darstellen, jedoch keine Denovosynthese von Fettsäuren erfolgt [8;42;47;64;90;91]. Die ACC-2 stellt hierbei das größere Protein dar (272 vs. 265kDa).

Abu-Elheiga und Kollegen (2000) konnten zeigen, dass die Acetyl-CoA Carboxylase 2 eng mit den Mitochondrien assoziiert ist [2]. Somit bestünde ein unmittelbarer Kontakt zwischen dem von ihr gebildeten Malonyl-CoA und der (Malonyl-CoA sensitiven) Carnitin Palmityltransferase 1.

Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit einer gezielten Hemmung der CPT 1 durch Malonyl-CoA ohne das hierfür seine Gesamtkonzentration innerhalb der Zelle stark verändert werden müsste.

Ingesamt konnte in diversen Untersuchungen eine gute Korrelation zwischen dem Durchsatz der Fettsäureoxidation und der Malonyl-CoA Konzentration im Muskel nachgewiesen werden [59;60;98].

Die Acetyl-CoA Carboxylase 2 steht ihrerseits unter dem regulatorischen Einfluss der 5'AMP aktivierten Proteinkinase (AMPK). Diese phosphoryliert und inaktiviert die Muskelisoform der ACC. Hierbei kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Zitrataktivierungskurve, was zu einer Desensibilisierung der ACC-2 gegenüber ihrer allosterischen Aktivierung unter physiologischen Zitratkonzentrationen führt [21;37;76;97;99]. Des Weiteren aktiviert die AMPK die Malonyl-CoA Decarboxylase.

Im Endergebnis führt also die belastungsabhängige Aktivierung der AMPK zu einem verminderten Angebot an Malonyl-CoA, woraus eine verminderte Hemmung der CPT 1 und ein gesteigerter Energiegewinn aus der Oxidation von Fettsäuren resultiert.

Die klinische Bedeutung des Funktionierens oder Nichtfunktionierens dieses Regulationspunktes konnte in Untersuchungen an transgenen Mäusen, welchen das ACC-2-Gen fehlte, dargestellt werden. Diese Tiere zeigten ein deutliches Defizit der Fettspeicherung und einen verstärkten Durchsatz in der Fettsäureoxidation. Sie waren resistent gegen Fettsucht und Diabetes [3].

Wichtig ist auch die Tatsache, dass Palmitoyl-CoA als ein Inhibitor der ACC wirkt, wobei hierfür jedoch ihr Phosphorylierungszustand das Ausmaß der Inhibierung bestimmt [73;91]. Die Aktivität der, die ACC phosphorylierenden AMPK wiederum, ist vom Aktivitätsgrad des Muskels abhängig [38;76;79;92;97].

Rubink und Kollegen (2004) konnten nachweisen, dass eine Phosphorylierung der ACC nicht nur zu einer direkten Inaktivierung des Enzyms führt, sondern auch den inhibitorischen Effekt von Palmitoyl-CoA auf die Acetyl-CoA Carboxylase verstärkt, wodurch wiederum ein hinreichender energetischer Durchsatz von Fettsäuren im Rahmen ihrer Oxidation bei Muskularbeit gewährleistet wird [81]. Unter physiologischen Zitratkonzentrationen führten schon Konzentrationen um 10 μ M Palmitoyl-CoA zu einer starken Hemmung der phosphorylierten ACC-2.

1.6 Interaktion der CPT 1 mit Proteasen und Inhibitoren

Aufgrund der zentralen Stellung der CPT 1 und ihrer Hemmung durch Malonyl-CoA in der Regulation essentieller Stoffwechselprozesse, soll im Folgenden diese Interaktion genauer betrachtet werden.

Untersuchungen an Ratten L-CPT 1 führten zu der Erkenntnis, dass es sich bei dem katalytischen Zentrum und der Bindungsstelle für etwaige Inhibitoren um zwei unterschiedliche Positionen innerhalb des Proteinmoleküls handelt [18;29]. Dagegen konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden, ob es sich im Fall des Malonyl-CoA um eine kompetitive oder allosterische Inhibition handelt. Weiterhin bestand über viele Jahre Uneinigkeit in der Frage nach der Position des aktiven Zentrums der CPT 1 bezüglich der äußeren Mitochondrienmembran [67].

Während in der Vergangenheit durch verschiedene Autoren ein kompetitives Verhalten zwischen dem Inhibitor Malonyl-CoA und dem Substrat Palmitoyl-CoA postuliert wurde, deuten neuere Ergebnisse aus Untersuchungen an Rattenlebermitochondrien bzw. neonatalen Myocyten darauf hin, dass zumindest teilweise von einer zusätzlichen allosterischen Komponente ausgegangen werden muss [13;23;52;58;61;82]. Aufschlussreiche Erkenntnisse ergaben hierbei Versuche mit Proteasen. So führt die Inkubation von Rattenlebermitochondrien mit Nagarse, Chymotrypsin oder Papain zu einer deutlichen Abnahme der Sensitivität der CPT 1 gegenüber Malonyl-CoA ohne dass auch nur annähernd ein ähnlicher Verlust ihrer katalytischen Aktivität zu beobachten wäre [34;45;51;67]. Dies zeigt, dass solche Proteasen Bereiche des Enzymmoleküls angreifen, welche für die

allosterische Inhibition von essentieller Bedeutung sind, ohne die Topologie im katalytischen Zentrum zu verändern.

Dagegen bewirkt eine Behandlung von intakten Rattenlebermitochondrien mit Trypsin eine Abnahme der katalytischen Aktivität der CPT 1 während die Inhibition des Enzyms durch entsprechende Inhibitoren kaum oder gar nicht beeinflusst wird [45;51]. Hierdurch wird deutlich, dass es eine Frage der Proteasenspezifität und Verfügbarkeit von etwaigen proteolytischen Interaktionspunkten ist, welche Eigenschaft des Enzyms beeinflusst wird – die katalytische Aktivität oder die Inhibierbarkeit durch Malonyl-CoA [46;66].

Neben dem ausführlich betrachteten Inhibitor der CPT 1 Malonyl-CoA, gibt es weitere, die jedoch nicht wie die Karbonsäureester (zumindest teilweise) an einer allosterischen Region binden, sondern mit katalytisch aktiven Enzymbereichen interagieren, z.B. DL-2-bromopalmitoyl-CoA [45] oder Etomoxir-CoA [51]. Die Wirkung der Protease Trypsin, die katalytische Aktivität der CPT 1 stark zu reduzieren (s.o.), kann durch eine vorangehende Behandlung des Enzyms mit solchen Inhibitoren verhindert werden [29;30]. Hieraus könnte man durchaus schlussfolgern, dass bestimmte Inhibitoren in Gegenwart von spezifischen Proteasen einen protektiven Effekt auf die katalytische Funktion der Carnitin Palmityltransferase 1 ausüben. Diese Annahme stützt sich im Weiteren auf die Beobachtung, dass sich erstens durch eine vorangehende Inkubation von Mitochondrien mit Malonyl-CoA eine, von verschiedenen Autoren beschriebene Verringerung der Sensitivität der CPT 1 gegenüber diesem Inhibitor durch Erwärmung auf 22°C, verhindern lässt [51;102;104] und zweitens eine bereits eingetretene Desensibilisierung des Proteins durch o.g. Erwärmung durch Zugabe von Malonyl-CoA reversibel ist [51;102;104]!

Ob hieraus geschlussfolgert werden kann, dass eine Enzym/Inhibitorinteraktion zu einer entscheidenden Konformationsänderung, mit dem Ergebnis einer verbesserten Inhibitor-(Malonyl-CoA-)bindung und verringerten Anfälligkeit für proteolytische Veränderungen führt ist bisher nicht gesichert [51;53].

1.7 Störungen des Carnitin Palmityltransferase Systems

Aufgrund der zentralen Funktion in der metabolischen Verwertung der Fettsäuren resultieren aus Defekten des CPT Enzymsystems teilweise dramatische Folgen für das betroffene Individuum, besonders in solchen Situationen, in denen eine gesteigerte Bereitstellung von Energie aus Fetten erforderlich wird.

Hierbei kann der Defekt prinzipiell beide CPT-Formen, also CPT 1 oder 2 betreffen, wobei im Falle einer erkrankten CPT 1 die spezifische Leberisoform (L-CPT 1) den Defekt zeigt.

Interessanter Weise wurden bisher keine Fälle eines M-CPT 1 Defektes beschrieben, was möglicher Weise mit der Anreicherung dieser Isoform im Herzmuskel im Zusammenhang steht, im Sinne einer nicht mit dem Leben zu vereinbarenden Störung in der Embryonalphase [17].

Im Rahmen eines CPT-Defektes ist die Carnitin Palmityltransferase 2 viel häufiger betroffen als die CPT 1, wobei die Inzidenz beider Störungen, relativ betrachtet, sehr niedrig ist.

1.7.1 Erkrankungen der Carnitin Palmityltransferase 1

Störungen der Funktion der CPT 1 sind (sehr) seltene Erkrankungen, und daher im Gegensatz zum CPT 2 Defekt weniger beschrieben und charakterisiert. Über den ersten Fall eines solchen Defektes wurde 1981 berichtet [12]. Seitdem konnte eine Erkrankung der L-CPT 1 in 13 Familien nachgewiesen werden, wobei unter den betreffenden Patienten nur zwei Mutationen (R357W bzw. L484P) im entsprechenden Gen zu beobachten waren [1;39].

Die betroffenen Individuen werden im Allgemeinen auffällig durch Hepatomegalie, hypoketotische Hypoglykämie, Krampfanfälle sowie Bewusstseinsverlust bis hin zu komatösen Zuständen, häufig im Rahmen viraler Infekte oder nach längerer Nahrungskarenz. Diese Erscheinungen sind unter entsprechender symptomatischer Therapie rückläufig und die Patienten führen ein Leben ohne besondere Einschränkungen, d.h. es zeigen sich keine chronische Muskelschwäche oder eine Kardiomyopathie, typische Symptome anderer Störungen im Abbau langkettiger Fettsäuren (s.u.) [39].

1.7.2 Erkrankungen der Carnitin Palmityltransferase 2

Störungen der CPT 2, erstmals durch DiMauro und Kollegen (1973) beschrieben, können sich auf unterschiedliche Art und Weise äußern [25]. Insgesamt differenziert man drei Phänotypen des CPT 2-Mangels: eine tödlich verlaufende neonatale Form, eine schwere hepatokardiomuskuläre infantile Form und eine, bei Kindern und Erwachsenen auftretende „benigne“ Myopathie. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen klinischem Phänotyp und noch verbleibender katalytischer Aktivität der CPT 2 in den Zellen der Patienten.

Im Folgenden soll auf Unterschiede in der klinischen Manifestation dieser drei Formen von CPT 2-Mangelzuständen näher eingegangen werden.

1.7.2.1 Benigne myopathische Form des CPT 2-Mangels

Der autosomal rezessiv vererbte myopathische CPT 2-Defekt ist die häufigste Form einer Störung des Fettsäuremetabolismus der Skelettmuskulatur [7]. Diese Form der Erkrankung der Carnitin Palmityltransferase 2 wurde seit ihrer Erstbeschreibung 1973 bisher bei ungefähr 200 Patienten nachgewiesen, wobei das männliche Geschlecht häufiger betroffen ist. Die Ursache hierfür konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden. Die Angaben über die Häufigkeitsverteilung zwischen Männern und Frauen schwanken jedoch zwischen 2 zu 1 bis 5 zu 1 [95;96]. Der Zeitpunkt für das erstmalige Auftreten klinischer Symptome reicht vom 1. bis zum 61., für den Zeitpunkt der Diagnosestellung vom 7. bis zum 62. Lebensjahr. Bei etwa 70% der betroffenen Patienten treten Symptome innerhalb der ersten zwölf Jahre nach Geburt auf [95].

Sie ist klinisch gekennzeichnet durch immer wiederkehrende Muskelschmerzen und –schwäche, sowie paroxysmale Myoglobinurie, welche in der Folge zu einem Nierenversagen führen kann. Diese Symptomatik ist bei nahezu allen Patienten belastungsabhängig bzw. –induziert, bei etwa der Hälfte der Patienten durch virale Infekte getriggert und bei etwa einem Fünftel durch Nahrungskarenz provozierbar. Insgesamt gelten solche Zustände als Triggerfaktoren, in denen der Organismus gezwungen ist, einen erhöhten Energiebedarf aus einem gesteigerten Fettsäuremetabolismus zu decken.

Die Intensität einer Belastung die zum Auftreten der o.g. Symptomatik führen kann, variiert zwischen den verschiedenen Patienten. Während bei manchen nur Langzeitbelastungen als

kritisch zu betrachten sind, führen bei anderen schon leichte Anstrengungen zu den typischen Erscheinungen.

Auch die Frequenz mit welcher Symptome auftreten ist zwischen den Patienten variabel. So treten Muskelbeschwerden bei einigen nur wenige Male im Leben, bei anderen dagegen nahezu täglich auf [95].

Bonnefont und Kollegen (1996) untersuchten den Fettsäuremetabolismus sowie die noch vorhandene enzymatische Aktivität der CPT 2 in kultivierten Fibroblasten von Patienten mit CPT 2-Mangel. Hierbei zeigte sich eine um 50% reduzierte Oxidation der [9,10-³H]Myristylsäure, sowie eine, im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Probanden, auf 26% verminderte Aktivität der Carnitin Palmityltransferase 2 [11].

Die meisten Menschen, welche von dieser Form des CPT 2-Mangels betroffen sind, zeigen insgesamt nur eine leichte Symptomatik und sind zwischen den Attacken asymptomatisch. Es besteht im Prinzip keine Einschränkung der Lebensqualität, so dass man davon ausgehen muss, dass dieses Krankheitsbild unterdiagnostiziert ist, d.h. eine milde Ausprägung der o.g. Symptome wird nicht der myopathischen Form des CPT 2-Defekts zugeordnet.

Molekulargenetisch konnte bei etwa 60% aller Patienten eine Mutation der Aminosäureposition 113, im dritten Exon des Enzymproteins nachgewiesen werden. In einigen Untersuchungen betraf dies sogar über 80% der Patienten [107]. Hierbei ist die Aminosäure Serin durch Leucin (S113L-Mutation) ersetzt [89]. Dies ist somit die häufigste Mutation mit Krankheitswert und wird auch als „common mutation“ bezeichnet. Als nächst häufigste Abweichung in der Aminosäureabfolge gilt die Q413fs Mutation [88]. Insgesamt wurden bisher etwa 60 Mutationen im CPT 2 Gen mit Krankheitswert nachgewiesen [41].

1.7.2.2 Infantiler Carnitin Palmityltransferase 2-Mangel (hepatokardiomuskuläre Form)

Diese Form des CPT 2-Defektes ist gekennzeichnet durch hypoketotische Hypoglykämie, Einschränkung der Leberfunktion bis hin zum Leberausfall, Myopathie und dilatative Kardiomyopathie, welche häufig durch Arrhythmien zum plötzlichen Versterben der jungen Patienten vor Vollendung des ersten Lebensjahres führen [11;24].

Messungen der CPT 2-Restaktivität bei diesen Patienten ergaben Werte zwischen vier und zehn Prozent der Aktivität gesunder Kontrollgruppen und die [9,10-³H]Myristylsäureoxidation betrug weniger als 10% im Vergleich zu nicht erkrankten Personen [11;24;28].

1.7.2.3 Neonataler CPT 2-Mangel

Merkmale dieser Form sind: (Stark) verminderte CPT 2 Aktivität in verschiedenen Organsystemen, vermindertes freies und totales Carnitin im Serum und erhöhte Serumwerte für Fette und langkettiges Acylcarnitin. Des Weiteren wurde bei den betreffenden Patienten über Leberinsuffizienz, hypoketotische Hypoglykämie, metabolische Azidose, Krampfanfälle, Kardiomyopathie, Herzrhythmusstörungen, dysplastische Nierenveränderungen und diverse zerebrale Fehlentwicklungen berichtet [71;85;93]. Die Patienten werden im Allgemeinen innerhalb der ersten vier Lebenstage symptomatisch. Die Fähigkeit der betroffenen Neugeborenen zur Oxidation von langkettigen Fettsäuren liegt bei etwa 2% im Vergleich zu Gesunden [27]. Die Prognose ist infaust, die Patienten sterben innerhalb von Tagen bzw. wenigen Monaten nach der Geburt.

1.7.3 Defekt der Carnitin Acylcarnitin Translokase (CACT-Defekt)

Unter den Störungen der Fettsäureoxidation ist der CACT-Mangel einer der seltensten. Bisher wurden etwa 30 Fälle beschrieben. Ein Defekt dieses Enzyms führt zu einer starken Verringerung des Transports von Fettsäuren in die Mitochondrien. Besonders bei Neugeborenen kann diese Erkrankung zu lebensbedrohlichen Zuständen führen, da sie besonders auf die Stoffwechseladaptation an Fettsäuren angewiesen sind. Eine klinische Symptomatik setzt innerhalb von Stunden nach der Geburt ein. Hierzu gehören im Besonderen Krampfanfälle und weitere neurologische Auffälligkeiten, kardiale Arrhythmie, Hypoglykämie mit fehlendem Nachweis von Ketonkörpern im Urin. Vereinzelt sind Rhabdomyolyse und Hypokalziämie beschrieben wurden. Auch über eine sekundäre Entwicklung einer Hepatomegalie sowie dilatativen Kardiomyopathie wurde berichtet [40;72;75].

2. THEMENSTELLUNG

Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der molekularen Genetik in den letzten Jahren bleibt die biochemische Untersuchung für die Diagnose einer Myopathie bei Defekten des Carnitin Palmitoyltransferasesystems bis heute unverzichtbar.

Bei dieser Form der Diagnostik wird die Aktivität der CPT-Enzyme *in vitro* bestimmt. Hierfür inkubiert man die Enzyme mit bestimmten Substraten unter optimierten Reaktionsbedingungen und weist anschließend bestimmte Reaktionsprodukte nach. Hierbei wäre es günstig, das zu untersuchende Enzym mit seinem jeweiligen spezifischen Substrat in Reaktion zu bringen, also jenes Substrat, für welches das (gesunde) Enzym die maximale Aktivität zeigt.

Leider ist bisher relativ wenig über die Substratspezifität der Carnitin Palmitoyltransferasen in menschlichem Skelettmuskel bekannt. Zwar existieren hierzu Untersuchungen, doch sollten hierbei einige ihrer Besonderheiten erwähnt werden.

So wurden zum einen die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten in kultivierten Fibroblasten und peripheren Blutzellen bestimmt [83]. Diese sind zwar für eine biochemische Diagnostik leichter zu gewinnen, allerdings findet die Energiegewinnung aus Fettsäuren in der Muskulatur statt. Da die Funktionsstörungen sich überwiegend auf die Muskulatur beschränken, sollte für dieses Gewebe ein spezifisches, bislang noch nicht publiziertes, Substratprofil des CPT-Systems erstellt werden.

Zum anderen fand bisher die Existenz der Carnitin Oktanoyltransferase (COT) wenig Beachtung, in dem Sinne, als dass diese Fraktion bei den Untersuchungen weder abgetrennt, noch spezifisch gehemmt wurde. Somit muss man davon ausgehen, dass die bisher etablierten Substratprofile der CPT 1 und 2 von Substratspezifitäten der COT überlagert sind.

In dieser Arbeit sollen erstmalig die jeweiligen Substratspezifitäten der Carnitin Palmitoyltransferase 1 und 2 nach Trennung beider Enzymtitäten durch Detergenzienbehandlung und anschließender Ultrazentrifugation unter Ausschluss der Carnitin Oktanoyltransferase in menschlichem Skelettmuskel untersucht werden. Dafür kommen Substrate mit den Kettenlängen C-8 (Octanoyl-CoA), C-10 (Decanoyl-CoA), C-12 (Lauryl-CoA), C-14 (Myristyl-CoA), C-16 (Palmitoyl-CoA) und C-18 (Stearyl-CoA) zur Anwendung.

Folgende Fragestellungen sollen näher untersucht werden:

1. Unterscheiden sich die Substratspezifitäten der CPT 1 und 2?
2. Welche Unterschiede existieren hinsichtlich der Parameter Michaelis-Menten-Konstante (K_m), Hemmkonzentrationen (I_{50}) und Katalytische Effizienz (E_{kat})?
3. Welches Substrat ist das jeweils geeignetste Substrat, in Bezug auf die beste/schnellste Bindung (kleinste K_m), größten Umsatz (höchste V_{max}) und unter Einbezug beider Parameter (E_{kat}) für CPT 1 bzw. CPT 2?
4. Wie verhält sich das Ausmaß einer möglichen Substrathemmung für die verschiedenen Substrate neben Palmityl-CoA nach Erreichen ihren jeweiligen enzymspezifischen Optimalkonzentrationen (I_{50}) [15]?
5. Sind Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12 Kohlenstoffatomen die optimalen Substrate für beide Enzyme [83]?

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Reagenzien

Die verwendeten Fettsäure-CoA Ester Oktanyl Coenzym A Lithium Salz Monohydrat (C8), Decanyl Coenzym A Monohydrat (C10), Lauryl Coenzym A Lithium Salz (C12), Myristyl Coenzym A Lithium Salz (C14), Palmityl Coenzym A Lithium Salz (C16), Stearyl Lithium Salz Coenzym A (C18) und Malonyl Coenzym A wurden von der Firma SIGMA bezogen, ebenso L-Carnitin, DL-Dithiotreitol (DTT) und Trizma Base zur Herstellung des Tris-HCL-Puffers. Das verwendete Chappel-Perry Medium setzte sich zusammen aus: 100mM KCl (Fa. SIGMA), 1mM EDTA, 5mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Fa. MERCK) und 50mM Tris-HCl (pH 7,5). Ferner wurden Tween 20 10%ig (Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat), Isobutanol, Ammoniumsulfat und bovines Serumalbumin (Fraktion 5) (BSA) von der Firma MERCK bezogen. Für die Herstellung einer radioaktiven ^{14}C -Carnitinlösung wurde L-[methyl- ^{14}C]-Carnitin der Firma NEN Life verwendet. Hiervon wurden 300 μl mit 10ml einer wässrigen 50mM L-Carnitinlösung (s.o.) gemischt, woraus eine 49mM ^{14}C -Carnitinlösung mit einer spezifischen Radioaktivität von 0,03 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ entstand. Die Lösungen für den Farbstofftest im Rahmen der Proteinmessung wurden von der Firma PIERCE geliefert. Als Szintillationsflüssigkeit fand READY SAFE (Fa. BECKMANN) Verwendung. Alle übrigen Chemikalien wurden von kommerziellen Lieferanten bezogen. Für die Herstellung der Lösungen wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser verwendet. Für die Auftrennung der Fraktionen des Muskelhomogenates kam eine Ultrazentrifuge (L7-Serie), zur Bestimmung der Radioaktivität ein Flüssigkeitsszintillationszähler der Serie LS6500, beide von der Firma BECKMAN, zum Einsatz.

3.2 Aufarbeitung des Muskelgewebes

In dieser Arbeit wurde Muskelgewebe von drei Personen (2x weiblich, 1x männlich) verwendet. Diesen Individuen wurden im Rahmen der Diagnostik eines möglichen CPT-Defektes Muskelbiopsien entnommen. Alle drei Patienten konnten jedoch hinsichtlich einer Störung im Fettsäuremetabolismus nachfolgend als gesund erklärt werden.

Für die weiterführenden Untersuchungen wurde das gefrorene Muskelgewebe im Verhältnis 1:30 mit Chappel-Perry Medium in einem Glas-Glas Handhomogenisator für einen hinreichenden Aufschluss der zellulären Kompartimente etwa zehn Minuten auf Eis gepottert.

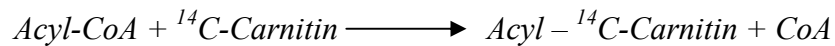
Das Chappel-Perry Medium setzte sich zusammen aus: 100mM KCl, 1mM EDTA, 5mM MgCl₂ und 50mM Tris-HCl (pH 7,5). Das so erhaltene Muskelhomogenat enthielt noch alle Bestandteile des CPT-Enzymsystems.

Für eine entsprechend weitergehende Auftrennung des Homogenates wurde es zunächst in der Ultrazentrifuge bei etwa 183000g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Hierdurch sollte die lösliche Fraktion der Carnitin Oktanyltransferase (COT) entfernt werden [70]. Diese wurde anschließend abgenommen und verworfen. Etwaige Reste des wässrigen Überstandes wurden vorsichtig mit Filterpapierstreifen abgenommen und hierbei darauf geachtet, möglichst kein Sediment zu entfernen. Schließlich wurde dieses mit Chappel-Perry Medium in das Ausgangsvolumen (1ml) solange mit diversen Pipetten resuspendiert, bis makroskopisch keine Konglomerate mehr sichtbar waren. Zur möglichst vollständigen Entfernung der COT-Fraktion wurde der gesamte Prozess einmal wiederholt, wobei die zweite Resuspendierung in Gegenwart von zehn Vol% 1%-Tween 20 durchgeführt wurde. Hierdurch sollte nun die membranassoziierte (latente) Carnitin Palmityltransferase 2 aus ihrer membranalen Umgebung herausgelöst und in eine wässrige Lösung überführt werden [67;68;100].

Nach wiederum 30-minütigem Zentrifugieren mit 183000g bei 4°C konnte schließlich die CPT 2-Fraktion als wässriger Überstand abgenommen werden. Es folgte nun die Wiederholung dieses Arbeitsschrittes, i.S. einer Waschung, wobei der erhaltene Überstand diesmal verworfen werden konnte. Letztendlich blieb eine sedimentierte Fraktion über, welche die CPT 1 repräsentierte. Auch diese wurde in ihr Ausgangsvolumen (1ml) resuspendiert.

3.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten in der Sediment- (CPT 1) und Überstandfraktion (CPT 2) erfolgte durch die sog. Isotopenvorwärtsreaktion, welche nach folgendem Prinzip arbeitet [106]:



Der Standardtestansatz enthielt 100µl Tris-HCl, 100µl bovines Serumalbumin (BSA), 25µl DTT und 100µl der ${}^{14}\text{C}$ -Carnitin Standardlösung. Hierzu wurde das jeweilige Substrat (Fettsäure) gegeben, welches in einer 10 bzw. 20µM Lösung vorlag. Für die Untersuchung des Verhaltens der untersuchten Enzyme gegenüber dem Inhibitor Malonyl-CoA erfolgte die Zugabe des Hemmstoffes in gewünschter Menge. Nachdem die Testansätze mit aqua bidest auf ein Volumen von 900µl aufgefüllt wurden, kamen 100µl des entsprechenden Muskelhomogenates hinzu und die Reaktion wurde bei einer Inkubationstemperatur von 30°C gestartet. Das endgültige Volumen eines jeden Ansatzes betrug somit 1ml.

Nach genau 10 Minuten erfolgte das Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von je 1ml Isobutanol und gesättigter Ammoniumsulfatlösung ((NH₄)₂SO₄) sowie etwa 700mg festem Ammoniumsulfat unter intensiver Durchmischung.

Proteine in Lösung bilden mit ihren exponierten polaren und geladenen Gruppen Wasserstoffbrückenbindungen mit den Wassermolekülen. Wird eine hohe Konzentration an geladenen Ionen, wie Ammoniumionen und Sulfationen der Proteinlösung zugefügt, so hydratisieren die Salzionen und entziehen den Proteinen die Hydrathülle. Dies führt zur Aggregation der Proteine durch hydrophobe Wechselwirkung. Die Löslichkeit der Proteine wird dadurch herabgesetzt, was zur Präzipitation führt und das Ende der enzymatischen Reaktion bedingt.

Die Testansätze wurden nun für 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen/Minute in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, wonach sich deutlich zwei Phasen voneinander unterscheiden ließen.

Nun wurden 800µl der oberen, alkoholischen und somit das Reaktionsprodukt Acyl – ${}^{14}\text{C}$ -Carnitin beinhaltenden Phase abgenommen. In der unteren Phase befand sich das jeweils nicht umgesetzte radioaktiv markierte Carnitin.

Zu den abgenommenen 800µl der oberen Phase wurde noch einmal des gleiche Volumen mit Isobutanol gesättigten Wassers pipettiert und diese Mischung anschließend wiederum 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt entsprach im Wesentlichen einer

Reinigung des alkohollöslichen Acyl – ^{14}C -Carnitins. Auch hierbei kam es zu einer deutlichen Phasentrennung. Abschließend wurden 500 μl der oberen Phase in ein Vial (verschließbares Reaktionsgefäß) überführt und mit 10ml Szintillationsflüssigkeit versetzt.

Nach hinreichender Durchmischung erfolgte die Messung der Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler. In diesem wurde jede Probe in zwei Zyklen je drei Minuten gemessen. Die gemessene Aktivität wurde in der Größe [Zerfallsereignisse/Minute] (Counts per minute; CPM) ausgegeben.

Bei jeder Untersuchungsreihe wurden zwei Referenzproben mitgeführt, welche als sog. Leerwerte kein Muskelhomogenat enthielten. Hierdurch war es möglich die radioaktive Hintergrundaktivität zu bestimmen.

Aus den so gewonnenen CPM-Messwerten für die Radioaktivität konnten nun unter Einbeziehung dieser Hintergrundaktivität, der jeweiligen Volumen- bzw. Muskelhomogenatverdünnung, der Aktivität der ^{14}C -Carnitin Standardlösung sowie der Inkubationszeit die enzymatische Aktivität in [nmol/min/gMuskelfeuchtgewicht] bzw. nach Bestimmung der Konzentration des Non-Kollagen-Proteins (NCP) im jeweiligen Muskelhomogenat die spezifische Aktivität in der Dimension [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$] angegeben werden (s.Abb.3).

$$\text{a) } \frac{[CPM(\text{Probe}) - CPM(\text{Leerwert})] * 2 * 490\text{nM} * 1000}{CPM(\text{Standard}) * t * a} = \text{nmol}/\text{min}/\text{gFG}$$

$$\text{b) } \frac{[CPM(\text{Probe}) - CPM(\text{Leerwert})] * 2 * 490\text{nM}}{CPM(\text{Standard}) * t * p} = \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$$

*Abb.3: Berechnung von a) unspezifischer und b) spezifischer enzymatischer Aktivität unter Einbeziehung von: $CPM(\text{Probe})/(\text{Leerwert})/(\text{Standard})$ =Mittelwert der gemessenen Radioaktivität als Counts per minute (CPM) für den Testansatz/Leerwert/ ^{14}C -Carnitin Standardlösung, 2=Volumenverdünnung (ursprüngliches Ansatzvolumen 1000ml aber Messung der Aktivität in nur 500ml), 490nM=Verdünnung der ^{14}C -Carnitin Standardlösung, t=Inkubationszeit (10 Minuten), p=Proteinwert [$\text{mg}/\text{gMuskelfeuchtgewicht}$]*0,00333 (da 100 μl eingesetztes Muskelhomogenat 0,0033g Muskel enthalten), a=Gehalt an Muskelgewebe je Messansatz (0,0033g/100 μl).*

Der Test zeigte einen linearen Verlauf für die Einflussgrößen Zeit, Temperatur und Proteinkonzentration im jeweiligen Messbereich (s. Abb. 4,5 u. 6).

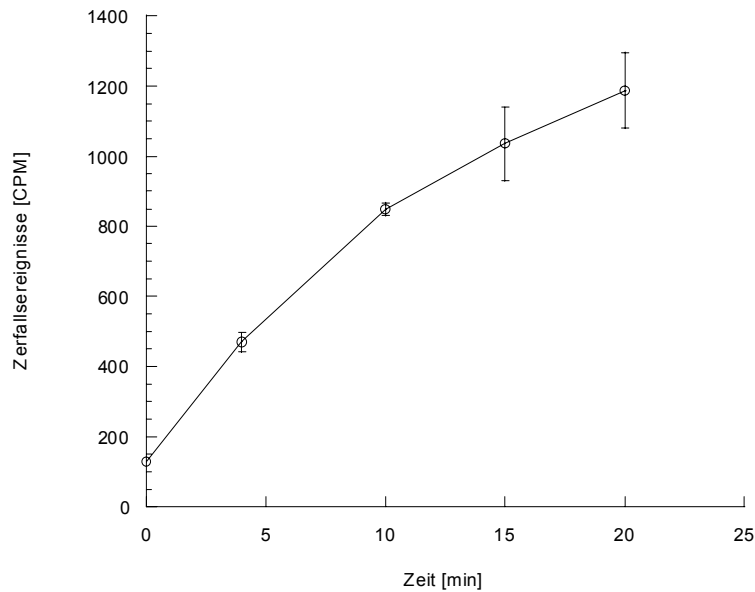


Abbildung 4: **Zeitlinearität** im Isotopentest. Als Maß für die Enzymaktivität sind die Mittelwerte der Zerfallsereignisse mit ihren Standardabweichungen des Reaktionsproduktes Acyl(^{14}C)Carnitin je Minute [CPM] dargestellt ($N=5$ Wiederholungsmessungen je Zeitmesspunkt).

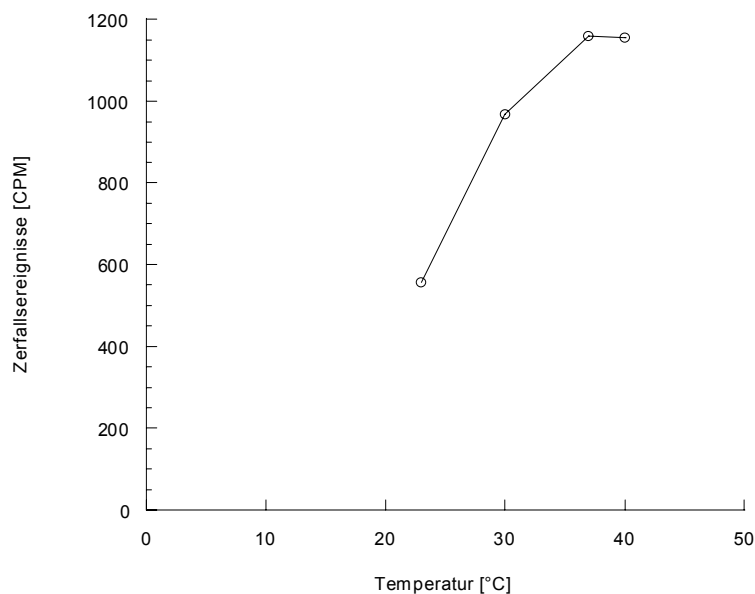


Abbildung 5: **Temperaturlinearität** im Isotopentest. Als Maß für die Enzymaktivität nach der jeweiligen Zeit sind die Mittelwerte der Zerfallsereignisse ($N=4$ Wiederholungsmessungen je Temperaturmesspunkt) des Reaktionsproduktes Acyl(^{14}C)Carnitin je Minute [CPM] dargestellt. Der Messwert bei 40°C stellt eine Abnahme der Enzymaktivität bei Überschreiten des (physiologischen) Temperaturoptimums (37°C) dar.

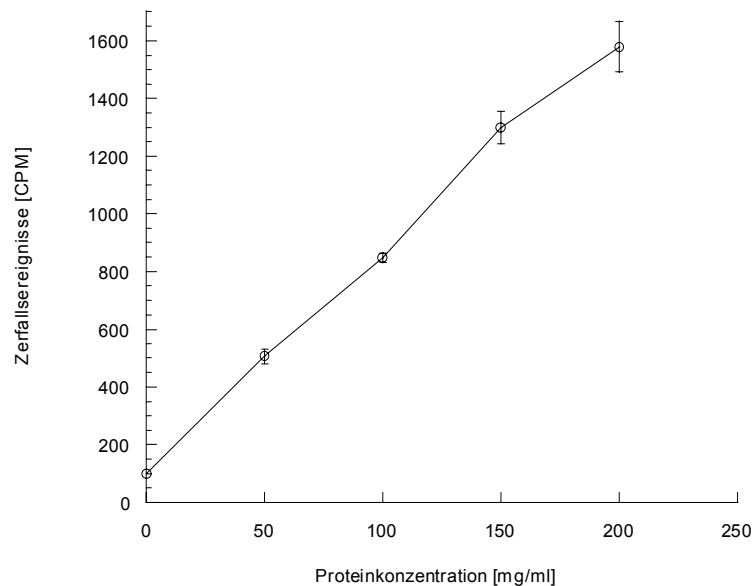


Abbildung 6: **Proteinlinearität** im Isotopentest. Als Maß für die Enzymaktivität sind die Mittelwerte der Zerfallsereignisse ($N=5$ Wiederholungsmessungen je Konzentrationsmesspunkt) des Reaktionsproduktes Acyl(^{14}C)Carnitin je Minute [CPM] dargestellt.

3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Non-Kollagen-Proteins (NCP) erfolgte nach der Methode von Lilienthal und Lowry [48;49].

Folgendes Prinzip kommt hierbei zur Anwendung: Nicht-kollagene-Proteine werden von 50mM Natriumhydroxid (NaOH) gelöst, Stützgewebsproteine und Elastin hingegen nicht. Die Messung des Gehalts an Non-Kollagen-Protein wurde in zwei Schritten durchgeführt:

1. Kupferionen bilden in alkalischer Lösung mit Peptidbindungen der nicht-kollagenen-Proteine Komplexe.
2. Reduktion von Phosphormolybdän-Phosphorwolframsäurereagenz (Folin-Ciocalteu-Phenol Reagenz) durch diese Komplexe und damit verbundener Blaufärbung der Lösung. Hierbei ist die Intensität der Färbung direkt proportional zum Gehalt an Non-Kollagen-Protein.

3.4.1 Durchführung der Proteinbestimmung

Von den erstellten Homogenaten wurden entsprechende Portionen abgenommen und jeweils 1:20 mit 50mM Natriumhydroxidlösung (NaOH) verdünnt. Es folgte eine mindestens 24-stündige Inkubationsphase.

Zur Bestimmung des jeweiligen Proteingehaltes kamen folgende Lösungen zur Anwendung: Lösung A: 2%NaCO₃ in 0,1N NaOH; Lösung B: 0,5% CuSO₄ x 5H₂O und 1,25% Na-K-Tartrat in 0,1N NaOH; Lösung C: Gemisch von Lösung A und B im Verhältnis 50:1; BSA-Standardlösungen 0,125; 0,25; 0,5 und 1mg/ml.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte auf Microtiterplatten. Hierbei wurden 10µl der Muskelhomogenatproben bzw. der Standard-BSA-Lösungen in die entsprechenden Wells pipettiert. Hinzu kamen 200µl Lösung C (s.o.). Anschließend wurde die Titerplatte verschlossen und für 45 Minuten im Thermomixer bei 60°C und 350 rpm inkubiert. Es folgte die automatisierte Messung der Extinktion im Titerplattenreader bei einer Lichtwellenlänge von 550nm gegen den jeweiligen Leerwert (Lösungsmittel der Probe).

Eine mögliche Beeinflussung der Zuverlässigkeit dieses Testprinzips durch Detergenzien, z.B. Tween 20 galt es näher zu untersuchen.

3.4.2 Beeinflussung der Proteinbestimmung durch Detergenzien

Eine mögliche Beeinflussung gängiger Methoden zur Proteinbestimmung durch verschiedene Detergenzien und Reduktionsmittel ist bekannt [43]. Da in dieser Arbeit mit dem Detergenz Tween 20 gearbeitet wurde, musste auch die hier angewandte Methode der Proteinbestimmung hinsichtlich einer möglichen Interaktion mit vorhandenem Tween 20 untersucht werden. In den getrennten Proben der Muskelhomogenate lag der Tweenanteil bei etwa 1 Vol%.

Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe des Detergenz Tween 20 mit 0; 0,1; 1; 5; 10 und 15 Vol% aus Aqua bd. erstellt. Es befand sich also ausschließlich Tween 20 und Wasser in den Gemischen. Anschließend wurden diese Proben mit der beschriebenen Methode auf das Vorhandensein von Non-Kollagen-Protein untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Es zeigte sich eine Abweichung der Ergebnisse der Proteinbestimmung nach dieser Methode in detergenzhaltigen, proteinfreien Lösungen gegenüber detergenz- und proteinfreien Ansätzen.

Die gemessenen Proteinwerte der Muskelhomogenate können somit nur als Richtwerte angesehen werden. Da allerdings diese Abweichung im Messbereich (1 Vol% Tween 20) nur gering ausgeprägt ist, werden nachfolgend die ermittelten enzymatischen Aktivitäten dennoch bezogen auf das bestimmte Non-Kollagen-Protein angegeben. Die mit der Methode nach Lowry bestimmten Proteinkonzentrationen betragen für den Überstand des Muskelhomogenates (CPT 2) 13,19 mg/ml und für sein Sediment (CPT 1) 32,59 mg/ml.

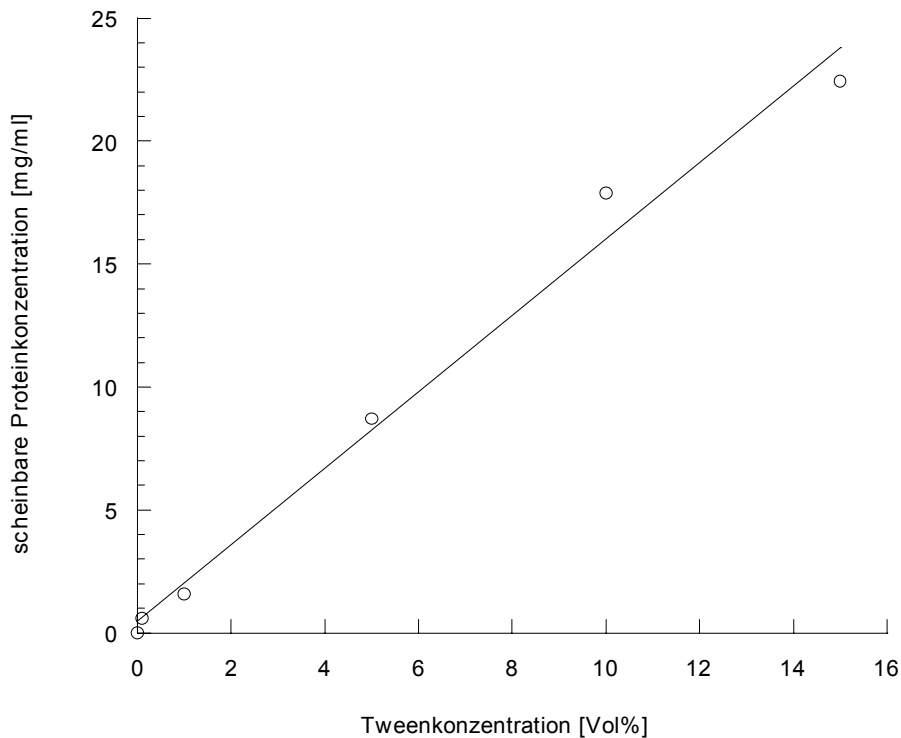


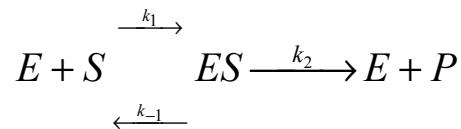
Abbildung 7: Darstellung des scheinbar gemessenen Gehalts an nicht-kollagenem-Protein einer proteinfreien, aber tweenhaltigen Lösung bei verschiedenen Vol% Tweenanteil ($R^2=0,99$).

3.5 Grundlagen der Enzymkinetik

Für ein besseres Verständnis und einfachere Interpretation der Ergebnisse sollen nachfolgend einige theoretische Prinzipien enzymatischer Reaktionen erläutert werden.

Im Gegensatz zu chemischen Reaktionen 1. Ordnung sind bei Reaktionen mit Enzymbeteiligung Reaktionsgeschwindigkeit v und Substratkonzentration $[S]$ nicht mehr direkt proportional zueinander. Bei sehr kleinen $[S]$ erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit zunächst annähernd linear. Mit steigenden Substratkonzentrationen verlangsamt sich diese Zunahme mehr und mehr, bis schließlich bei sehr hohen $[S]$ eine (annähernd) konstante Geschwindigkeit erreicht wird: die Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}). Diese Beziehung zwischen Geschwindigkeit und Substratkonzentration hat die Form einer Hyperbel.

Das Prinzip enzymatisch katalysierter Reaktionen lässt sich durch folgendes Prinzip beschreiben: (nach Michaelis und Menten 1913)



Es wird ersichtlich, dass der eigentlichen katalytischen Reaktion, nämlich der Bildung des Produktes, die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES) vorgeschaltet ist.

Die Gleichgewichtskonstante des ersten Reaktionsteils lässt sich als Verhältnis der Bildungs- und Dissoziationskonstanten des ES-Komplexes darstellen: $K = k_{-1}/k_1$. Unter der allgemeinen Annahme, dass die Enzymkonzentration um ein Vielfaches kleiner ist als die Substratkonzentration, sollte sich hier nach einer kurzen Anlaufzeit ein Gleichgewichtszustand ausbilden.

Die Geschwindigkeit v der Endproduktbildung ist abhängig von der Konzentration des ES-Komplexes und der Konstante k_2 , nachfolgend als k_{cat} bezeichnet, welche die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Bildung von P entspricht.

$$v = k_{cat} * [ES]$$

Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] entspricht je nach Substratkonzentration [S] nur teilweise der Enzymgesamtkonzentration. Diese Beziehung zwischen [ES] und [S] lässt sich beschreiben durch:

$$[ES] = \frac{[E] * [S]}{K_m + [S]}$$

Setzt man diesen Sachverhalt nun in den vorangegangenen ein erhält man:

$$v = \frac{k_{cat} * [E] * [S]}{K_m + [S]}$$

K_m stellt hier die Michaelis-Menten-Konstante dar. Sie entspricht der Substratkonzentration, bei der das Enzym zur Hälfte gesättigt ist bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist.

Die eingesetzte Enzymkonzentration $[E]$ lässt sich im vorliegenden Fall nicht bestimmen. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen gilt jedoch $[ES] = [S]$ und somit $v = k_{\text{cat}} \cdot [ES] = k_{\text{cat}} \cdot [E] = V_{\text{max}}$. Es gilt:

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Die Geschwindigkeit, mit der ein Substrat in einer enzymatisch katalysierten Reaktion zu einem Produkt umgesetzt wird ist also zum einen von der Geschwindigkeit der Bindung an das Enzym (K_m) und nachfolgend von der maximalen Arbeitsgeschwindigkeit (V_{max}) dieses Enzyms abhängig.

Es ist folglich erforderlich diese beiden kinetischen Parameter gesondert zu betrachten, da z.B. ein Enzym für ein Substrat eine besonders hohe Bindungsaffinität (kleiner Wert für K_m) besitzen, es jedoch nur sehr langsam zur Produktbildung aus dem Enzym-Substrat-Komplex kommen kann (kleiner Wert für V_{max}).

Um beide Parameter zur kinetischen Charakterisierung eines Enzyms zu erfassen, ist es möglich, dessen katalytische Effizienz, nachfolgend E_{kat} bezeichnet, zu bestimmen. Diese entspricht dem Quotienten aus Maximalgeschwindigkeit und Michaelis-Menten-Konstante:

$$E_{\text{kat}} = \frac{V_{\text{max}}}{K_m}$$

Hierbei bedeuten große Werte für E_{kat} , dass das Enzym eine hohe Affinität zu seinem Substrat besitzt (kleiner Wert für K_m) und dieses mit einer hohen Geschwindigkeit zum (End-)Produkt umsetzt. Kleine Werte für E_{kat} beschreiben das Gegenteil.

3.6 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders aufgeführt, werden bei der Darstellung und Auswertung der Ergebnisse die arithmetischen Mittelwerte herangezogen. Die Berechnungen der linearen Korrelation erfolgten nach dem Prinzip der Minimierung der Abstandsquadrate. Zur Datenerfassung, statistischen Auswertung sowie grafischen Darstellung fanden die Programme SPSS[®] 10, SigmaPlot[®] 9.0, Enzyme Kinetic Module[®] 1.2 für SigmaPlot[®] und KaleidaGraph[®] 4.0 Verwendung.

4. ERGEBNISSE

4.1 Differenzierung der CPT-Fractionen durch den Inhibitor Malonyl-CoA

Zur Kontrolle des Erfolges der Separation der CPT-Fractionen wurde die Malonyl-CoA Inhibition der, nach Ultrazentrifugation und Detergenzbehandlung Tween-löslichen Fraktion kontrolliert. In dieser Phase sollte sich entsprechend den Ausführungen unter Punkt *1.2 Das Carnitin Palmityltransferase System* die, durch Malonyl-CoA nicht hemmbare CPT 2 befinden.

Vergleichend wurde auch das, beide CPT-Proteine enthaltende Muskelhomogenat mit diesem Hemmstoff versetzt.

Nach Inkubation des Gesamtmuskelhomogenates mit dem Inhibitor Malonyl-CoA in den Konzentrationen 0; 10; 20; 30 und 40 μ M konnten nach Zugabe des Substrates Palmityl-CoA in einer Konzentration von 60 μ M abnehmende Aktivitäten bezogen auf die Ausgangsaktivität (0 μ M Malonyl-CoA) beobachtet werden. Bei der höchsten untersuchten Inhibitorkonzentration fand sich eine Restaktivität von 53,5% (s. Abb. 8).

Auch für die Reaktion der CPT 2 mit Malonyl-CoA wurde das Substrat Palmityl-CoA in einer Konzentration von 60 μ M eingesetzt. Für den Inhibitor wurden die Konzentrationen 1; 5; 10 und 20 μ M gewählt.

Im Gegensatz zur CPT 1 konnte hier keine Abnahme der Aktivität im Verhältnis zur Ausgangsaktivität in Gegenwart des Inhibitors Malonyl-CoA beobachtet werden (s. Abb. 9).

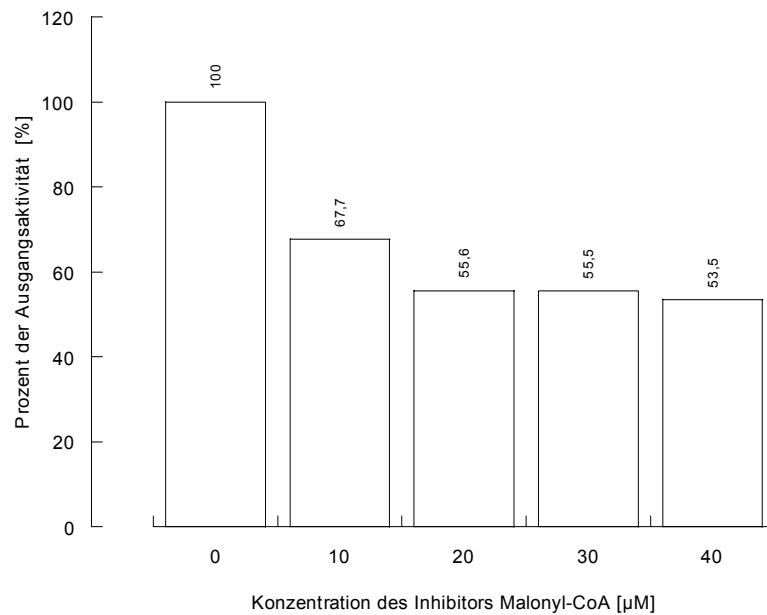


Abbildung 8: Darstellung der Restaktivitäten des nativen Muskelhomogenates in Gegenwart der jeweiligen Konzentration des Inhibitors Malonyl-CoA ($N=3$ Messwiederholungen je InhibitorKonzentration; Substrat: Palmityl-CoA $60\mu M$).

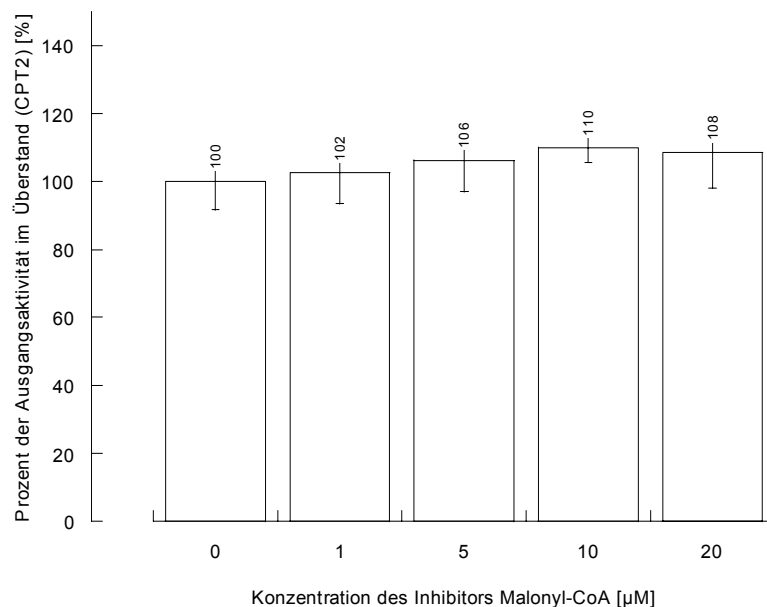


Abbildung 9: Zur Darstellung kommen die mittleren Aktivitäten \pm Standardabweichung im Überstand (CPT 2) in Prozent der Ausgangsaktivität (Malonyl-CoA= $0\mu M$) bei steigenden Malonyl-CoA Konzentrationen ($N=3$ Messwiederholungen je Malonyl-CoA Konz.; Substrat: Palmityl-CoA $60\mu M$).

4.2 Substratspezifitäten der CPT-Enzyme

Nach erfolgter Separation der Carnitin Palmitoyltransferase 1 und CPT 2 wurden die Enzymaktivitäten derselben in Gegenwart von Fettsäuren mit 8-, 10-, 12-, 14-, 16- und 18-Kohlenstoffatomen in jeweils aufsteigenden Konzentrationen nach dem unter 3.3 beschriebenen Prinzip bestimmt.

Die angegebenen Zahlenwerte verstehen sich als jeweilige Mittelwerte der enzymatischen Aktivitäten mit den jeweils zugehörigen Substratkonzentrationen in Klammern. Ferner werden für die Maximalaktivitäten die entsprechenden Standardabweichungen aufgeführt. Die Begriffe (Maximal-)Geschwindigkeit, (Maximal-)Aktivität und (Maximal-)Umsatz werden nachfolgend synonym verwendet.

4.2.1 Substratspezifische Aktivitäten, Substratbindungs- (K_m) und Hemmungsverhalten (I_{50}) der Carnitin Palmitoyltransferase 1 und 2

Die enzymatische Aktivität beschreibt den jeweiligen Umsatz einer bestimmten Menge Substrat pro Zeiteinheit durch eine bestimmte Menge an Enzymmolekülen. Da für die untersuchten Enzyme bisher keine gereinigten und aufgearbeiteten Enzymlösungen vorhanden sind, bzw. die Enzyme bisher noch nicht kristallisiert werden konnten, werden in dieser Arbeit die jeweiligen Aktivitäten auf die, in der jeweiligen Suspension (Überstand bzw. Sediment) bestimmten Menge von nicht-kollagenem-Protein (NCP) bezogen [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$].

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m beschreibt jene Substratkonzentration, bei der sich die Aktivität eines Enzyms auf halbmaximalem Niveau befindet. Sie stellt somit ein, vom Zahlenwert der Maximalgeschwindigkeit unabhängiges Maß für die Substrataffinität eines Enzyms dar (siehe 3.5 „Grundlagen der Enzymkinetik“). So bedeuten kleine Werte für K_m , dass die endgültige Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes schon bei geringen Substratkonzentrationen erreicht wird, das Enzym zu diesem Substrat also eine höhere Affinität aufweist, als zu Substraten mit einem höheren K_m -Wert.

Da die Enzyme CPT 1 und 2 bei zunehmenden Substratkonzentrationen ein Sättigungs- bzw. Substrathemmungsverhalten zeigen, worden in dieser Arbeit substratspezifische Halbaktivitäts- bzw. Hemmkonzentrationen (I_{50}) bestimmt. Dabei bezeichnet der I_{50} -Wert jene Substratkonzentration, bei der die Aktivität des Enzyms nach Erreichen des Maximums auf 50% dieser maximalen Aktivität gemindert ist.

Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass durch das oben beschriebene Hemmverhalten die beobachteten bzw. im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Enzymaktivitäten unterhalb der theoretisch erreichbaren Maximalgeschwindigkeiten liegen.

4.2.1.1 Substrat Oktanyl-CoA (C-8) (s. Abb. 10)

Das Substrat Oktanyl-CoA wurde mit der Sediment- (CPT 1) bzw. Überstandfraktion (CPT 2) in Konzentrationen von 50 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ versetzt, wobei jeweils 3 bzw. 4 Aktivitätsmessungen je Konzentration durchgeführt wurden. Es konnten Werte der Aktivität im Sediment (CPT 1) zwischen 3,3 (50 μM) und $5,77 \pm 0,061 \mu\text{mol/min/g Non-Kollagen-Protein (NCP) (600}\mu\text{M)}$ erfasst werden, wobei eine halbmaximale Aktivität (K_m) bei 55,3 μM beobachtet wurde. Der berechnete Wert für die Maximalgeschwindigkeit V_{max} lag bei 6,95 $\mu\text{mol/min/gNCP}$.

Steigende Substratkonzentrationen führten zu einer Abnahme der Aktivität. Bei der höchsten untersuchten Konzentration (1000 μM Oktanyl-CoA) betrug die Aktivität 5,31 $\mu\text{mol/min/gNCP}$, also nur noch 92% der maximal gemessenen Aktivität. Eine Minderung auf 50% der maximal beobachteten Aktivität konnte für eine Substratkonzentration (I_{50}) von 4347,5 μM berechnet werden.

Für die Überstandfraktion (CPT 2) konnten Aktivitäten zwischen 69,1 (50 μM) und $112,79 \pm 3,3 \mu\text{mol/min/gNCP}$ (300 μM) gemessen werden. Der K_m -Wert lag bei 89,2 μM und V_{max} betrug 193,5 $\mu\text{mol/min/gNCP}$.

Auch hier zeigte sich eine anschließende Abnahme der Aktivität bei weiter ansteigenden Substratkonzentrationen. Bei der höchsten untersuchten Konzentration (1000 μM Oktanyl-CoA) betrug die Aktivität 77,24 $\mu\text{mol/min/gNCP}$ (68% der gemessenen Maximalaktivität). Der I_{50} -Wert lag in diesem Fall bei 1440 μM .

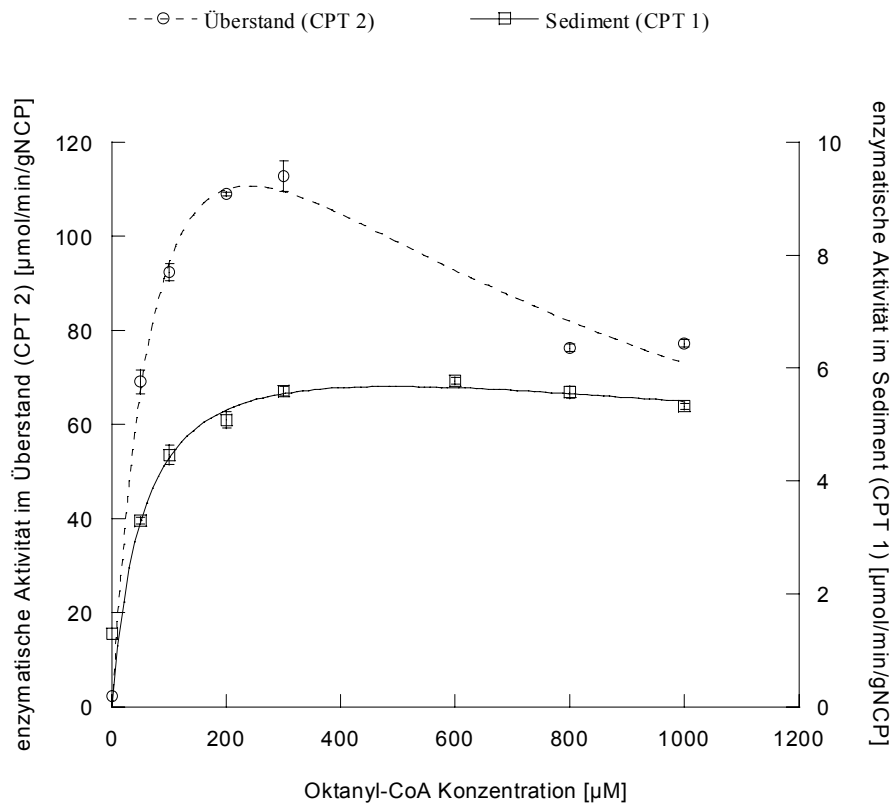


Abbildung 10: **Octanyl-CoA**: Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Aktivitäten im Sediment (CPT 1) (Quadrate und durchgezogene Linie; rechte Y-Skale) und Überstand (CPT 2) (Kreise und unterbrochene Linie; linke Y-Skale) über den verschiedenen Konzentrationen des Substrates Octanyl-CoA (C8) dargestellt ($N=3$ je Messpunkt).

4.2.1.2 Substrat Dekanyl-CoA (C-10) (s. Abb. 11)

Bei der Verwendung von Dekanyl-CoA als Substrat der CPT-Enzyme wurden Substratkonzentrationen zwischen 23 und 727 μM gewählt.

Hierbei ergaben sich in der Sedimentfraktion (CPT 1) Aktivitäten von 1,43 (23 μM) bis 3,69 \pm 0,15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ (364 μM). Die Michaelis-Menten-Konstante betrug 36,9 μM und die berechnete Maximalgeschwindigkeit lag bei 3,79 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$. Substratkonzentrationen über 364 μM führten zu einer leichten Abnahme der Aktivität bis auf 3,49 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ (727 μM), entsprechend 95% der Maximalaktivität. Eine signifikante Hemmung der Enzymaktivität i.S. einer deutlichen Reduktion des Umsatzes nach erreichtem Maximum bei weiter steigenden Substratkonzentrationen konnte nicht beobachtet werden.

Die Überstandfraktion (CPT 2) zeigte für das Substrat Dekanyl-CoA ein ähnliches Verhalten wie die CPT 1, jedoch auf einem höheren Aktivitätsniveau. Bei einer Anfangskonzentration von 23 μM betrug die Aktivität 16,03 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$.

Sie erreichte 50% ihres Maximums (K_m) bei $69,8\mu\text{M}$, ihr Maximum von $58,11 \pm 0,98 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ bei $364\mu\text{M}$ Dekanyl-CoA und fiel bei weiter ansteigender Substratkonzentration wieder bis auf $56,66 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ ($727\mu\text{M}$) ab (97% der bestimmten Maximalaktivität). Die theoretisch maximal erreichbare Geschwindigkeit der CPT 2 für dieses Substrat betrug $63,88 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$.

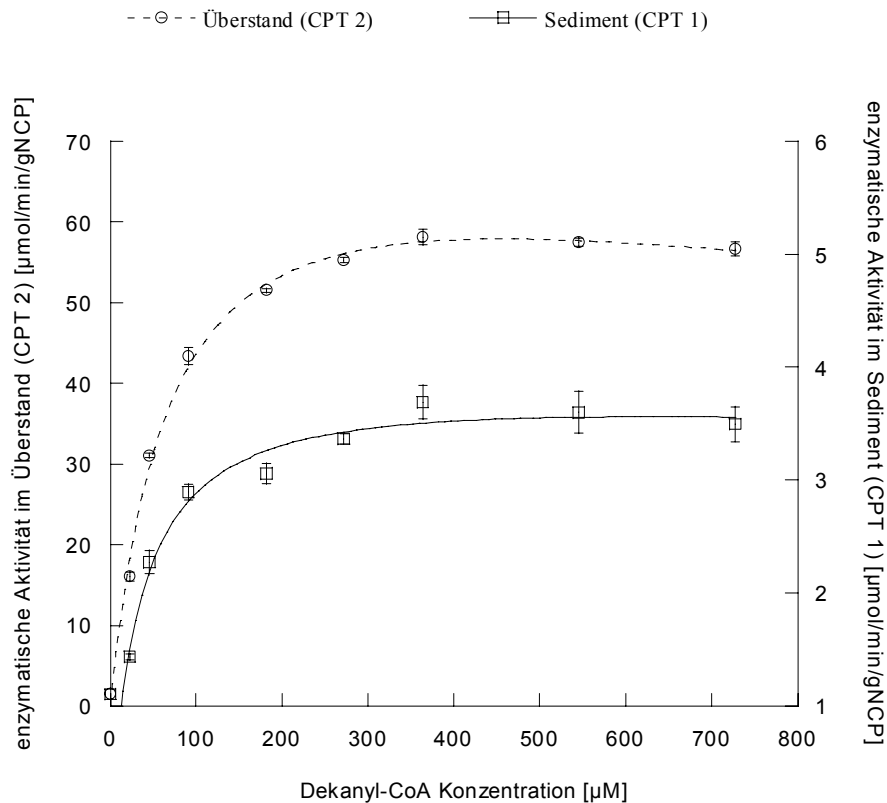


Abbildung 11: **Dekanyl-CoA:** Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Aktivitäten im Sediment (CPT 1) (Quadrate und durchgezogene Linie; rechte Y-Skale) und Überstand (CPT 2) (Kreise und unterbrochene Linie; linke Y-Skale) über einer zunehmenden Dekanylkonzentration ($N=3$ Messwiederholungen je Substratkonzentration).

4.2.1.3 Substrat Lauryl-CoA (C-12) (s. Abb. 12)

Es wurden Lauryl-CoA Konzentrationen zwischen 25 und $800\mu\text{M}$ gewählt. Hierbei zeigte das Sediment (CPT 1) Aktivitäten zwischen $0,29$ ($25\mu\text{M}$) und $0,86 \pm 0,1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ bei $200\mu\text{M}$, wobei eine halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit (K_m) bei einer Substratkonzentration von $38,8\mu\text{M}$ beobachtet wurde. Die berechneten Werte der Parameter Maximalgeschwindigkeit und I_{50} betragen $2,13 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ bzw. $938\mu\text{M}$.

In der Überstandfraktion (CPT 2) konnte eine minimale Aktivität von $14,75 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ ($25 \mu\text{M}$) bestimmt werden. Das Maximum wurde hier mit $18,07 \pm 0,26 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ bei einer Substratkonzentration von $200 \mu\text{M}$ erreicht. Die Michaelis-Menten-Konstante betrug $7,8 \mu\text{M}$. In der Berechnung zeigte sich eine maximale theoretische Reaktionsgeschwindigkeit von $18,93 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$. Bei einer Substratkonzentration von $3847 \mu\text{M}$ wäre eine halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit (I_{50}) zu beobachten.

Bei den jeweils größten untersuchten Substratkonzentration ($800 \mu\text{M}$) wurden im Sediment (CPT 1) noch $58,8\%$ bzw. im Überstand (CPT 2) $93,8\%$ der maximal beobachteten Aktivität erreicht..

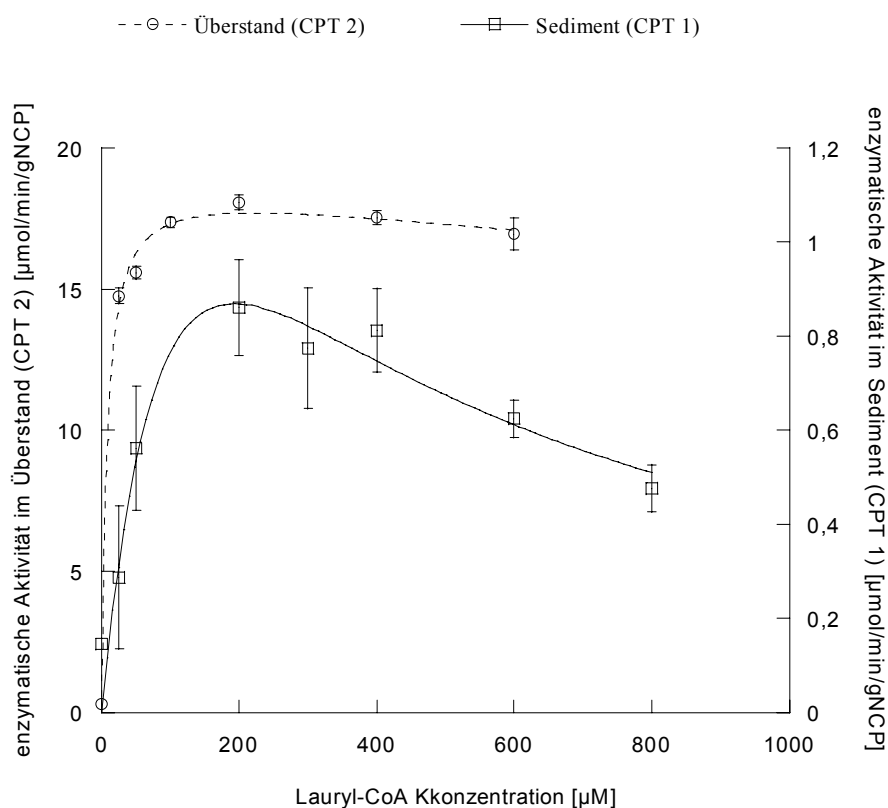


Abbildung 12: **Lauryl-CoA:** Dargestellt sind die jeweiligen Aktivitäten \pm Standardabweichung im Sediment (CPT 1) (Quadrate und durchgezogene Linie; rechte Y-Skale) und Überstand (CPT 2) (Kreise und unterbrochene Linie; linke Y-Skale) über aufsteigender Konzentration des Substrates Lauryl-CoA ($N=3$ Anzahl der Messwiederholungen je Substratkonzentration).

4.2.1.4 Substrat *Myristyl-CoA (C-14)* (s. Abb. 13)

Zur Untersuchung der Substratspezifität der Sediment- (CPT 1) und Überstandfraktion (CPT 2) für die C-14 Fettsäure Myristylsäure wurde diese in Konzentrationen zwischen 5 und 1000 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt.

Im Sediment lagen die Aktivitäten zwischen 0,25 (5 μM) und $1,01 \pm 0,03 \mu\text{mol/min/gNCP}$ (200 $\mu\text{mol/l}$). Ein Anstieg der Aktivität auf ein halbmaximales Niveau (K_m) konnte bei einer Myristyl-CoA Konzentration von 19,5 μM und ein Absinken der Aktivität auf 50% der erfassten Maximalaktivität (I_{50}) bei einer Substratkonzentration von 830 μM gefunden werden. Die theoretisch maximal erreichbare Geschwindigkeit wurde auf 1,6 $\mu\text{mol/min/gNCP}$ berechnet.

Im Überstand bewegten sich die Aktivitäten für das Substrat Myristyl-CoA zwischen 1,13 (5 μM) und $13,18 \pm 0,39 \mu\text{mol/min/gNCP}$ (400 μM). Eine Halbsättigung mit diesem Substrat (K_m) wurde bei einer Myristyl-CoA Konzentration von 21,5 μM erreicht. Der I_{50} -Wert betrug 3977 μM und eine theoretische V_{max} konnte mit 15,2 $\mu\text{mol/min/gNCP}$ berechnet werden.

Für die höchste untersuchte Myristyl-CoA Konzentration zeigte die CPT 1 eine noch verbleibende Aktivität von 53,1% und die CPT 2 von 92,9%.

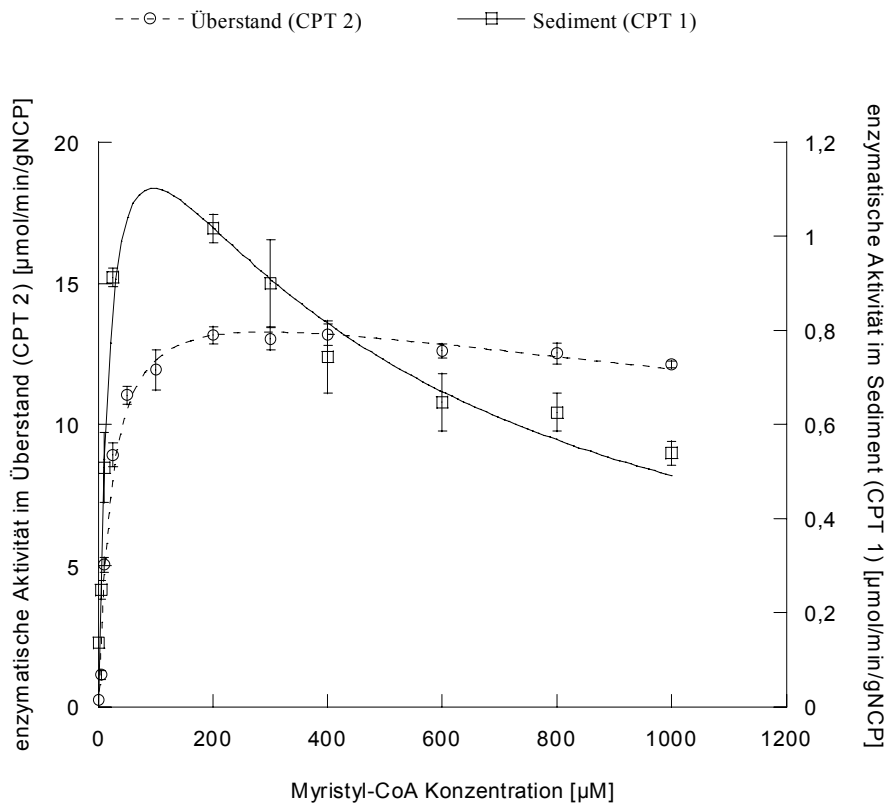


Abbildung 13: **Myristyl-CoA:** Dargestellt sind die jeweiligen Aktivitäten \pm Standardabweichung im Sediment (CPT 1) (Quadrate und durchgezogene Linie; rechte Y-Skale) und Überstand (CPT 2) (Kreise und unterbrochene Linie; linke Y-Skale) über aufsteigender Konzentration der C14-Fettsäure Myristyl-CoA (N=3 Anzahl der Messwiederholungen je Substratkonzentration).

4.2.1.5 Substrat Palmityl-CoA (C-16) (s. Abb. 14)

Die C-16 Fettsäure Palmityl-CoA stellt in der biochemischen Laboruntersuchung der CPT-Enzyme das Standardsubstrat dar. Es wurden Fettsäurekonzentrationen zwischen 10 und 140 μM untersucht.

Für das Sediment (CPT 1) wurden Aktivitäten zwischen $0,47$ ($10\mu\text{M}$) und $1,02 \pm 0,05$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ ($60\mu\text{M}$) registriert, wobei die halbmaximale Aktivität (K_m) bei einer Palmityl-CoA Konzentration von $17,5\mu\text{M}$ zu finden war. Die theoretisch erreichbare maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) betrug $1,27$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$. Eine Abnahme der Aktivität bis auf 50% der beobachteten Maximalgeschwindigkeit (I_{50}) konnte bei $160\mu\text{M}$ Palmityl-CoA registriert werden. Bei der maximal eingesetzten Palmityl-CoA Konzentration fand sich noch eine Aktivität von $0,47$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$, entsprechend 46% der Maximalgeschwindigkeit. Im Überstand (CPT 2) lag die minimale Aktivität bei 2 ($10\mu\text{M}$) und der höchste beobachtete Wert bei $3,92 \pm 0,3$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ ($60\mu\text{M}$). Bei einer Palmityl-

CoA Konzentration von $12\mu\text{M}$ konnten 50% dieser maximal gezeigten Aktivität (K_m) gemessen werden. Die theoretisch erreichbare maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) wurde auf $3,02\ \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ berechnet. Nach Erreichen des Aktivitätsmaximums war eine Minderung auf 50% der Maximalaktivität (I_{50}) bei einer Substratkonzentration von $170\mu\text{M}$ zu beobachten. Mit der höchsten untersuchten Palmityl-CoA Konzentration ($120\mu\text{M}$) konnten 62,9% der Maximalaktivität erfasst werden.

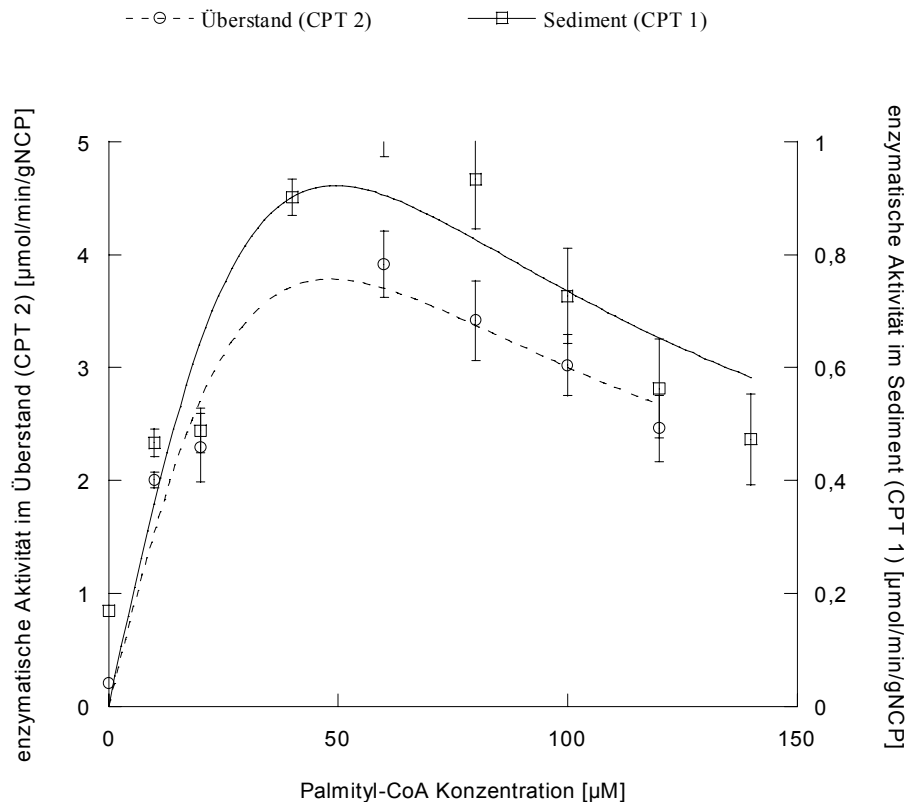


Abbildung 14: **Palmityl-CoA:** Dargestellt sind die jeweiligen Aktivitäten \pm Standardabweichung im Sediment (CPT 1) (Quadrate und durchgezogene Linie; rechte Y-Skale) und Überstand (CPT 2) (Kreise und unterbrochene Linie; linke Y-Skale) über aufsteigender Konzentration der C16-Fettsäure Palmityl-CoA ($N=3$ Anzahl der Messwiederholungen je Substratkonzentration).

4.2.1.6 Substrat Stearyl-CoA (C-18) (s. Abb. 15)

Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten für das Substrat Stearyl-CoA wurden Konzentrationen zwischen 20 und $250\mu\text{M}$ gewählt.

Für die Sedimentphase (CPT 1) konnten Aktivitäten zwischen $0,16$ ($20\mu\text{M}$) und maximal $0,65 \pm 0,13\ \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ ($60\mu\text{M}$) erfasst werden, wobei 50% der beobachteten

Maximalaktivität (K_m) bei einer Stearyl-CoA Konzentration von $20\mu\text{M}$. Die berechnete theoretische Maximalaktivität betrug $2\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ und der Wert für I_{50} $215\mu\text{M}$.

Im Fall der CPT 2 betrug hier die erfasste Minimalaktivität $1,99$ ($20\mu\text{M}$) und die Maximalaktivität $3,27 \pm 0,36\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$ ($100\mu\text{M}$). Ein Anstieg der Aktivität auf 50% dieser beobachteten Maximalaktivität (K_m) fand sich bei $26,5\mu\text{M}$, ein Absinken auf 50% nach erreichtem Maximum (I_{50}) bei $421,9\mu\text{M}$ Palmityl-CoA.

Bei einer maximalen Substratkonzentration von $250\mu\text{M}$ fanden sich 31,4% bzw. 91,3% der Maximalaktivitäten von CPT 1 bzw. CPT 2.

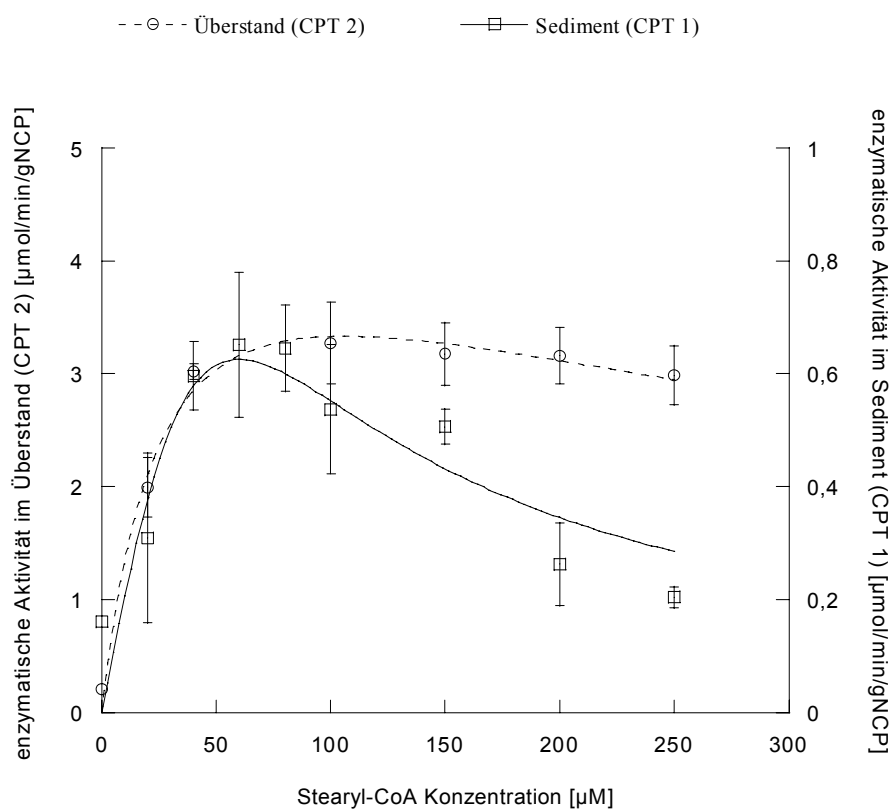


Abbildung 15: **Stearyl-CoA:** Dargestellt sind die jeweiligen Aktivitäten \pm Standardabweichung im Sediment (CPT 1) (Quadrate und durchgezogene Linie; rechte Y-Skale) und Überstand (CPT 2) (Kreise und unterbrochene Linie; linke Y-Skale) über aufsteigender Konzentration der C18-Fettsäure Stearyl-CoA ($N=3$ Anzahl der Messwiederholungen je Substratkonzentration).

Abb. 16a:

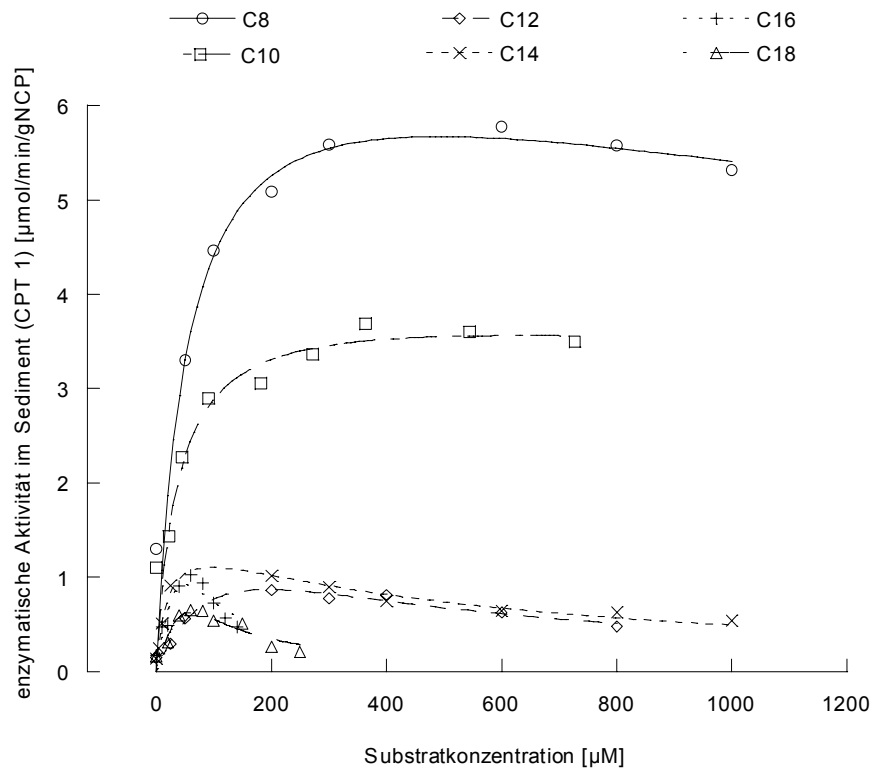


Abb. 16b:

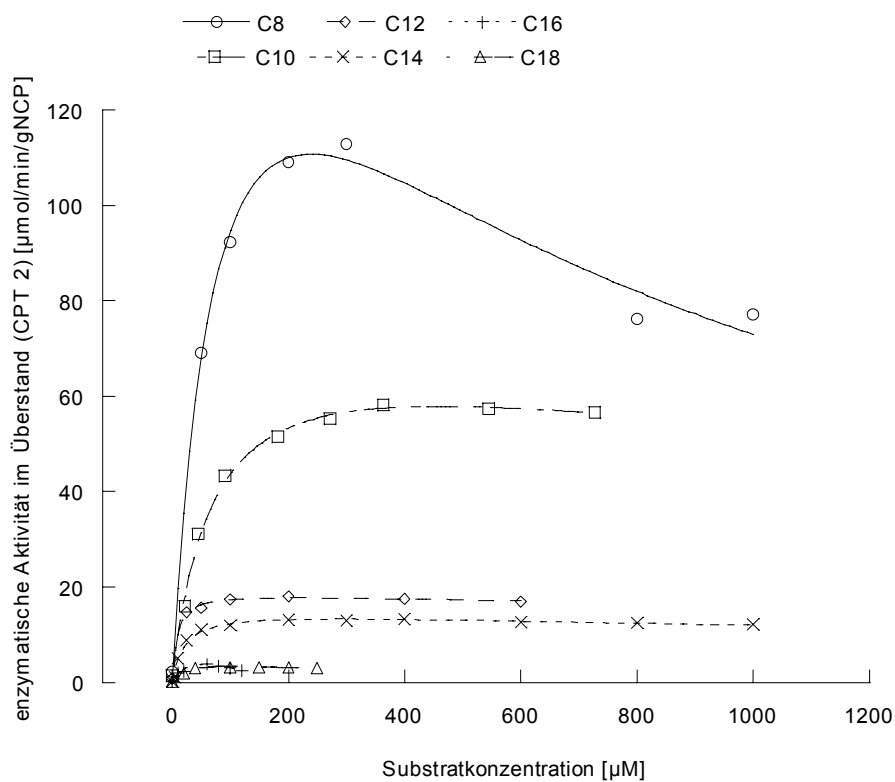


Abb. 16a und 16b: Zusammenfassende Darstellung der enzymatischen Aktivitäten in der Sediment- (CPT 1; Abb. 16a) und Überstandfraktion (CPT 2; Abb. 16b) für die untersuchten Substrate.

Tabelle 3: Zusammenfassende Darstellung der substratspezifischen Maximalaktivitäten (V_{max}), der Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) und der Hemmkonzentrationen (I_{50}) in der Sediment- (CPT 1) und Überstandphase (CPT 2) für die untersuchten Substrate.

| | Sediment (CPT 1) | | | Überstand (CPT 2) | | |
|---------------------|---|----------------------------|-------------------------------|---|----------------------------|-------------------------------|
| | V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$] | K_m [μM] | I_{50} [μM] | V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$] | K_m [μM] | I_{50} [μM] |
| <i>Oktanyl-CoA</i> | 6,95 | 55,3 | 4347,5 | 193,48 | 89,2 | 1440 |
| <i>Dekanyl-CoA</i> | 3,97 | 36,9 | --- | 75,56 | 69,8 | --- |
| <i>Lauryl-CoA</i> | 2,12 | 38,8 | 938,9 | 19,64 | 7,8 | 3847 |
| <i>Myristyl-CoA</i> | 1,55 | 19,5 | 830 | 15,23 | 21,5 | 3977 |
| <i>Palmityl-CoA</i> | 1,59 | 17,5 | 160 | 5,95 | 12 | 170 |
| <i>Stearyl-CoA</i> | 1,07 | 20 | 190 | 5,00 | 26,5 | 421,9 |

4.3 Katalytische Effizienzen der CPT-Enzyme

Wie schon unter Punkt 3.5 ausführlich dargestellt, setzt die katalytische Effizienz E_{kat} die Zahlenwerte der Geschwindigkeit (V_{max}) der (End-)Produktbildung aus dem Enzym-Substrat-Komplex und dessen Bildung (K_m) aus Substrat und Enzym ins Verhältnis.

Tabelle 4 zeigt eine Gegenüberstellung der jeweiligen katalytischen Effizienzen in der Sediment- (CPT 1) und Überstandfraktion (CPT 2) für die untersuchten Fettsäuren.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Zahlenwerte der katalytischen Effizienzen in der Sediment- (CPT 1) und Überstandfraktion (CPT 2) für die untersuchten Substrate.

| | <i>E_{kat} Sedimentfraktion (CPT 1)</i> | <i>E_{kat} Überstandfraktion (CPT 2)</i> |
|---------------------|--|---|
| <i>Oktanyl-CoA</i> | 0,126 | 2,169 |
| <i>Decanyl-CoA</i> | 0,108 | 1,082 |
| <i>Lauryl-CoA</i> | 0,054 | 2,581 |
| <i>Myristyl-CoA</i> | 0,079 | 0,708 |
| <i>Palmityl-CoA</i> | 0,091 | 0,496 |
| <i>Stearyl-CoA</i> | 0,054 | 0,189 |

5. DISKUSSION

5.1 Spezifische Substratprofile der CPT-Enzyme

In der Beurteilung der Substratspezifität bzw. Festlegung auf ein optimales Substrat für ein jeweiliges Enzym muss vorangehend definiert werden, welche(r) Parameter die Spezifität bestimmt. Hierbei sei auf die ausführlichen Erläuterungen zur Enzymkinetik unter Punkt 3.5 *Grundlagen der Enzymkinetik* verwiesen.

In früheren Arbeiten wurde zur Festlegung, welches Substrat von welchem Enzym am besten umgesetzt wird lediglich die beobachtete maximale Endproduktbildung herangezogen [83]. Dies stellt allerdings nur eine mögliche Betrachtungsweise dar und erfasst bei Weitem nicht alle Gesichtspunkte. Bei der Auswertung der Ergebnisse ist die Berücksichtigung der Substratkonzentration, bei welcher ein maximaler Umsatz erfolgt, zwingend erforderlich. Als Maß hierfür dient der K_m -Wert.

Unter *in vitro* Bedingungen lassen sich die Konzentrationen bestimmter Agenzien, in diesem Fall der Substrate, beliebig variieren. Somit ist es möglich die Substratkonzentration über ein Vielfaches der physiologischen Konzentration zu steigern, wodurch sich Umsatzraten erzielen lassen, welche in physiologischen Systemen höchstwahrscheinlich nicht erreicht werden.

Unter Punkt 4.3.1 *Substratspezifische Aktivitäten, Substratbindungs- (K_m) und Hemmverhalten (I_{50}) der Carnitin Palmityltransferase 1 und 2* sind die jeweiligen Aktivitätsverläufe im Sediment (CPT 1) und Überstand (CPT 2) für die untersuchten Substrate dargestellt.

An dieser Stelle sollen nun die Parameter Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) und Michaelis-Menten-Konstante (K_m) vergleichend für die einzelnen Substrate zusammenfassend dargestellt werden (Abb.17 und 19).

Für die enzym- und substratspezifischen Maximalaktivitäten (Abb.17) ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die Sediment- (CPT 1) als auch die Überstandpräparation (CPT 2) für mittellangkettige Fettsäure-CoA Ester (C-8) z.T. erheblich höhere Umsätze zeigen als für die nachfolgenden längerkettigen Substrate (C-10 bis C-18). Inwieweit dies dem Verhalten der Enzyme in physiologischen Systemen entspricht oder nur eine Folge der gewählten hohen Substratkonzentrationen darstellt, soll an anderer Stelle geklärt werden, da nach bisherigem Verständnis die mittellangkettigen Fettsäuren (v.a. C-8 u. C-10) durch die Carnitin Oktanyltransferase und die langkettigen Acyl-CoA Ester (v.a. C-16 u. C-18) durch die CPT-Enzyme umgesetzt werden.

Im Sediment (CPT 1) unterscheiden sich die beobachteten Maximalaktivitäten für Oktanyl-CoA und Stearyl-CoA etwa um den Faktor 6,5. Der Überstand (CPT 2) zeigt für das Substrat Oktanyl-CoA sogar eine etwa 38-fach höhere Aktivität als für die C-18 Fettsäure.

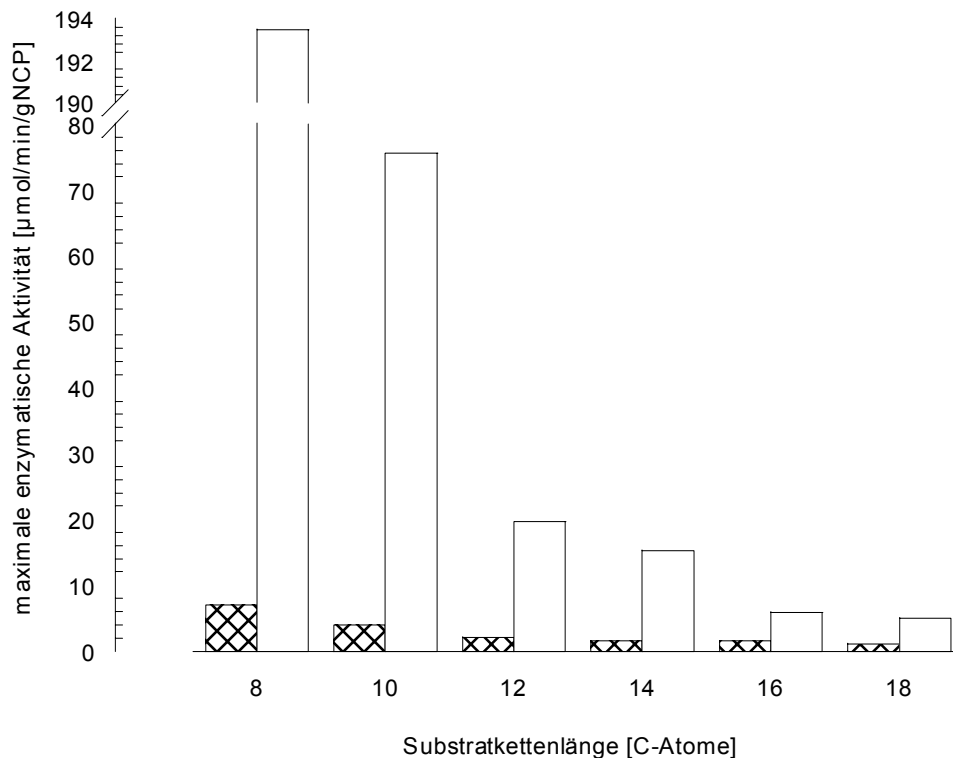


Abbildung 17: Darstellung der jeweiligen maximalen Aktivitäten im Sediment (CPT 1) (schraffierte Balken) und Überstand (CPT 2) (weiße Balken) für die untersuchten Fettsäure-CoA Ester mit 8 – 18 Kohlenstoffatomen.

Aber nicht nur für die substratspezifische Auswertung der Maximalgeschwindigkeiten des jeweiligen Enzyms ergeben sich deutliche Unterschiede. Zwar zeigen beide Fraktionen für die Fettsäure Oktanyl-CoA ihre absoluten Maximalgeschwindigkeiten, doch ist diese im Überstand etwa 27 mal größer als im Sediment (CPT 1). Dieser deutliche Unterschied relativiert sich allerdings mit zunehmender Kettenlänge der Substrate. Bei Verwendung von Stearyl-CoA beträgt die Maximalaktivität der Überstandfraktion (CPT 2) gerade noch das 5-fache der Sedimentaktivität (CPT 1). Da nach den bisherigen Modellen des Fettsäuretransports über die mitochondrialen Membranen die CPT 1 die aktivierte Fettsäure zunächst an Carnitin binden muss, ehe durch die CPT 2 nach entsprechendem Transfer über die Mitochondrienmembran die Rückreaktion katalysiert werden kann, war der z.T. beträchtliche Geschwindigkeitsvorteil der CPT 2, welche durch die Überstandfraktion repräsentiert werden sollte, nicht erwartet worden.

In der Gesamtbetrachtung der bestimmten Maximalaktivitäten stellt sich nun die Frage, ob es einen direkten (mathematisch) beschreibbaren Zusammenhang zwischen den jeweilig maximal erreichten Aktivitäten und der Kettenlänge der umgesetzten Fettsäuren gibt?

Der Verlauf der Maximalaktivitäten in Abbildung 17 lässt einen exponentialen Zusammenhang vermuten. Um dies zu bestätigen, erfolgte die Auftragung der Maximalgeschwindigkeiten der Sediment- und Überstandphase in logarithmischer Skalierung über den untersuchten Substraten (s.Abb.18).

Im Falle eines exponentiellen Zusammenhangs zwischen den untersuchten Größen müsste sich bei logarithmischer Auftragung eine lineare Abhängigkeit ergeben, wie sie auch in Abbildung 18 mit guter Korrelation erkennbar ist (CPT 1: $R^2=0,97$; CPT 2: $R^2=0,99$).

Die sich darstellende Scherenfigur verdeutlicht noch einmal das oben Erwähnte: Mit abnehmender Kettenlänge der Substrate nehmen die erreichbaren Maximalgeschwindigkeiten im Überstand (CPT 2) stärker zu als im Sediment (CPT 1).

Beide lineare Korrelationsgeraden schneiden sich etwa bei dem Substrat Stearyl-CoA, so dass, zumindest theoretisch für weiter zunehmende Substratkettenlängen im Überstand (CPT 2) nicht mehr solche hohen Umsatzraten wie in der Sedimentfraktion (CPT 1) erreicht werden sollten.

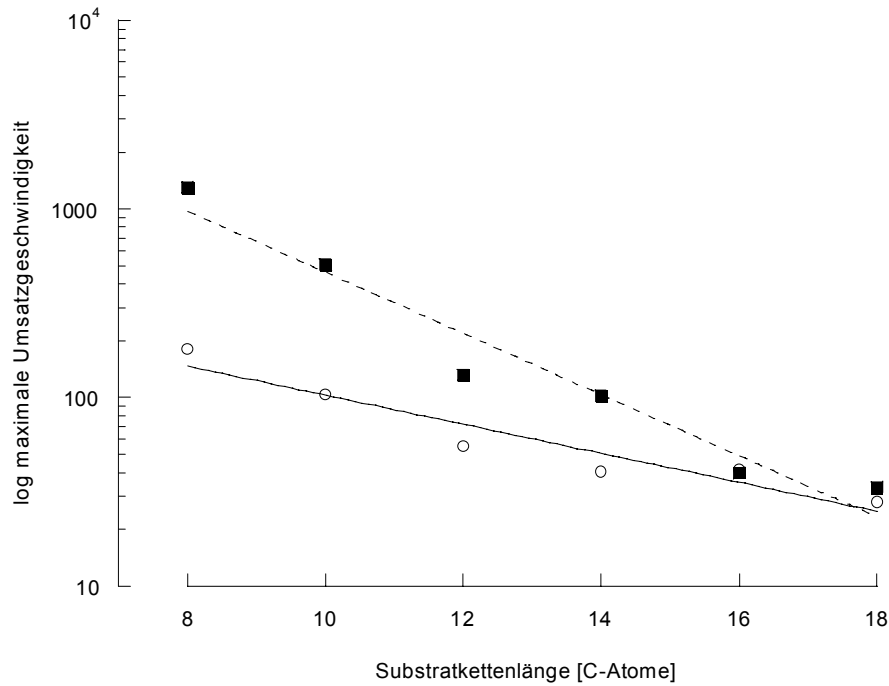


Abbildung 18: Darstellung der Maximalgeschwindigkeiten im Sediment (CPT 1, leere Kreise) und Überstand (CPT 2, schwarze Quadrate) über den untersuchten Substraten, sowie die zugehörigen exponentiellen Korrelationsfunktionen (CPT 1: durchgezogene Linie; CPT 2: unterbrochene Linie). Zu beachten ist die logarithmische Skalierung der Y-Achse.

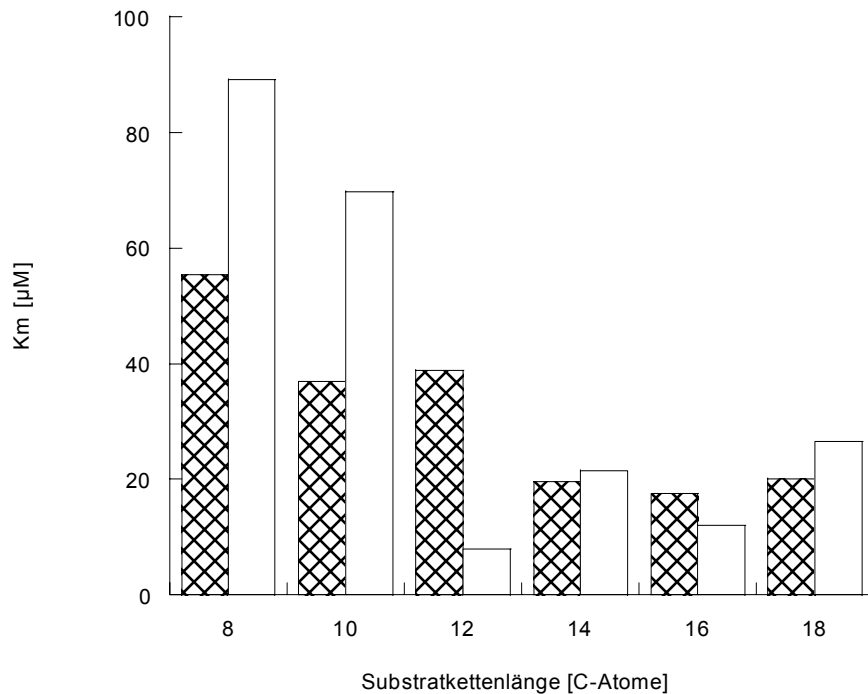


Abbildung 19: Darstellung der K_m -Werte (Sediment [CPT 1]: schraffierte Säulen; Überstand [CPT 2]: leere Säulen) für die untersuchten Fettsäure-CoA Ester.

Des Weiteren sollten in dieser Untersuchung auch die erforderlichen Substratkonzentrationen betrachtet werden, welche zum Erreichen der jeweiligen maximalen Umsatzraten durch die Enzyme benötigt werden (s. Abb. 19).

Ähnlich den Maximalgeschwindigkeiten der CPT-Enzyme ist auch hier eine, zumindest angedeutete Tendenz indirekt proportionalen Verlaufs der K_m -Werte erkennbar: Ausgehend von höheren Werten für K_m bei Substraten mit weniger Kohlenstoffatomen hin zu insgesamt niedrigeren Werten der Michaelis-Menten-Konstanten für länger-kettige Fettsäuren, wobei ab der C-18 Fettsäure Stearyl-CoA wieder ein leichter Anstieg zu beobachten ist.

Wenn man zunächst bei dieser tendenziellen Betrachtungsweise bleibt, fällt die Abweichung der C12-Fettsäure Lauryl-CoA auf. Für dieses Substrat zeigt der Überstand (CPT 2) einen sehr niedrigen Wert für K_m .

Die enzymvergleichende Auswertung zeigt, dass die Sedimentphase (CPT 1) für 4 der 6 untersuchten Substrate kleinere K_m -Werte zeigt als der Überstand (CPT 2). Nur für die C-16 und C-12 Fettsäure (Palmityl- bzw. Lauryl-CoA) erreicht das Sediment (CPT 1) erst bei höheren Substratkonzentrationen die halbmaximale Aktivität. Hierdurch könnte der obige scheinbare Widerspruch, dass die Überstandfraktion (CPT 2) beträchtlich höhere Umsatzgeschwindigkeiten erreicht als die sedimentierte Phase (CPT 1) aufgelöst werden: Unter physiologischen Bedingungen, also in Gegenwart kleinerer Substratkonzentrationen wäre die Sedimentfraktion (CPT 1) mit ihren höheren Substrataffinitäten (kleinere K_m) im Vorteil.

Für die getrennten Fraktionen der CPT-Enzyme zeigt die Überstandfraktion (CPT 2) für das Substrat Lauryl-CoA (C-12) mit $7,8\mu\text{M}$ den kleinsten Wert für K_m und somit die höchste Bindungsaffinität.

Für das Substrat Palmityl-CoA wurden zusätzlich die Aktivitäten des ungetrennten CPT-Pools (nach Abtrennung der Carnitin Oktanyltransferase) bestimmt (Daten nicht dargestellt). Hierbei zeigte sich bezüglich der Maximalaktivität ein höherer Umsatz und hinsichtlich des K_m -Wertes eine stärkere Affinität als bei der Untersuchung der getrennten Enzymtitäten. Der K_m -Wert nahm von $17,5$ (CPT 1) bzw. $12\mu\text{M}$ (CPT 2) auf $9,7\mu\text{M}$ (ungetrennte CPT-Enzyme) ab.

Am ehesten besteht zwischen den K_m -Werten und der Kettenlänge der Substrate eine polynome Abhängigkeit 2. Ordnung, was am Beispiel der Überstandfraktion (CPT 2) in Abbildung 20 dargestellt ist. Hierbei wird eine maximale Bindungsaffinität für die C-16 Fettsäure Palmityl-CoA besonders deutlich.

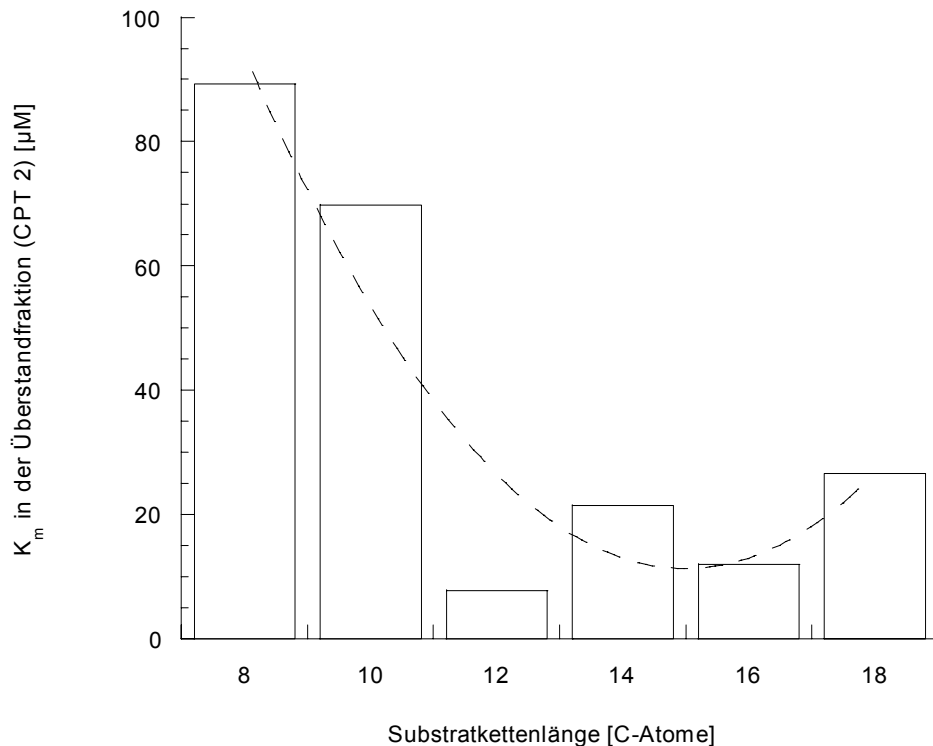


Abbildung 20: Es sind die Michaelis-Menten-Konstanten im Überstand (CPT 2), sowie deren hypothetische Abhängigkeit von der Kettenlänge der eingesetzten Substrate in Form einer polynomen Funktion 2. Ordnung (unterbrochener Kurvenverlauf) dargestellt ($R^2=0,94$).

Nach der bisherigen Auswertung der Substratspezifität der Sediment- und Überstandfraktion bezüglich der Parameter Maximalgeschwindigkeit und K_m -Wert kann man folgendes feststellen: Betrachtet man nur die (*in vitro*) maximal erreichbare Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme, sind mittellangkettige Fettsäuren, besonders Oktanyl- und Dekanyl-CoA, ideale Substrate, da sich mit ihnen, insbesondere in der Überstandfraktion (CPT 2) überdurchschnittlich hohe Umsatzraten erzielen lassen. Aus Sicht einer optimalen Substratbindung, also höchsten Affinität sind eher längerkettige Fettsäuren (C-14, C-16 und C-18) zu bevorzugen, wobei insgesamt im Überstand (CPT 2) für die C-12 Fettsäure Lauryl-CoA die höchste Affinität gefunden wurde.

Die Ergebnisse von Schaefer und Kollegen, nach welchen die C-12 Fettsäure Lauryl-CoA das optimale Substrat sowohl der CPT 1 als auch der CPT 2 darstellt, können mit den Erkenntnissen dieser Arbeit somit nicht vollständig bestätigt werden [83]. Für die laborchemische Diagnostik von etwaigen Defekten der CPT-Enzyme sollte, dies zeigen die dargestellten Ergebnisse, weiterhin die C-16 Fettsäure Palmityl-CoA zur Anwendung kommen.

Insgesamt gesehen, lässt sich nach bisherigen Kriterien kein Substrat definieren, welches für ein Enzym die 1. Wahl darstellt.

Dies wird möglich wenn man die entsprechende katalytische Effizienz betrachtet, welche das Verhältnis zwischen Maximalgeschwindigkeit und Michaelis-Menten-Konstante repräsentiert: $E_{\text{kät}} = V_{\text{max}}/K_m$ (s. 3.5 Grundlagen der Enzymkinetik und 4.5 Katalytische Effizienzen der CPT-Enzyme) (s.Abb.21).

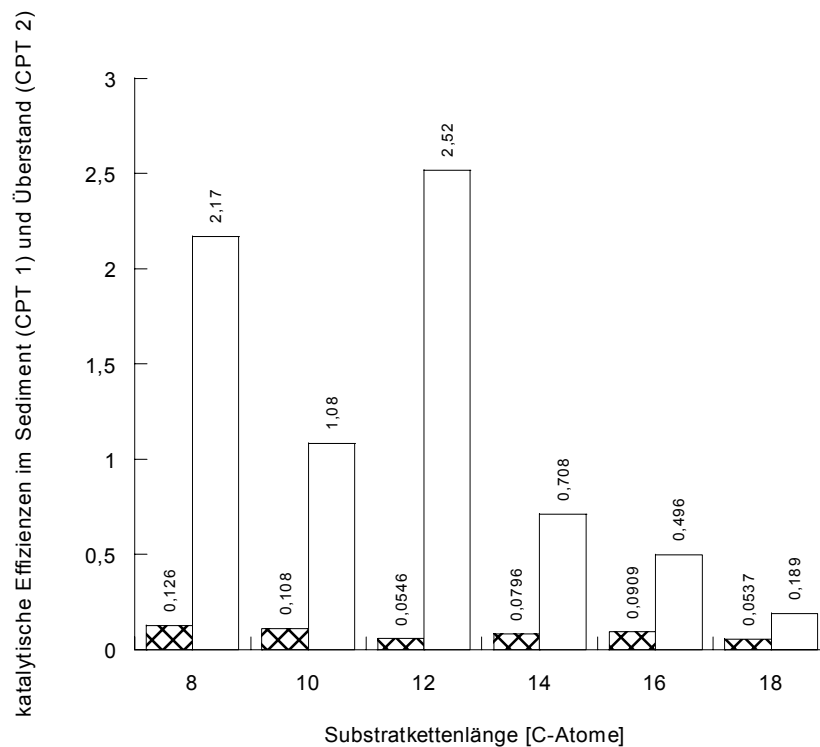


Abbildung 21: Es sind die katalytischen Effizienzen der Sediment- (CPT 1, schraffierte Säulen) und Überstandfraktion (CPT 2, leere Säulen) für die untersuchten Substrate dargestellt.

Auch in Abbildung 21 fällt zunächst auf, dass sich die Werte der katalytischen Effizienz mit relativ hohen Werten für mittellangkettige Fettsäuren tendenziell in Richtung niedrigere Werte für länger-kettige Substrate entwickeln, wobei die Überstandfraktion (CPT 2) durchgehend höhere Werte zeigt.

Insgesamt sind im Überstand (CPT 2) augenscheinlich zwei Maxima im Verlauf der katalytischen Effizienz zu erkennen, wobei diese mit den Substraten Oktanyl-CoA (C-8) und Lauryl-CoA (C12) erreicht werden.

Möglicherweise lässt diese Beobachtung auf die Existenz mindestens einer weiteren Transferaseaktivität schließen, welche u.U. durch das, zur Trennung von CPT 1 und 2 eingesetzte Detergenz entweder aus anderen Zellkompartimenten freigesetzt oder aber durch z.B. detergenzbedingte Proteinmodifikationen aktiviert wurde.

Für die Sedimentfraktion (CPT 1) stellt sich ein deutlich homogenerer Verlauf dar, mit einer maximalen katalytischen Effizienz von 0,126 für Oktanyl-CoA. Dieser Wert und die minimale ermittelte katalytische Effizienz von 0,0537 für das Substrat Stearyl-CoA unterscheiden sich hier lediglich um den Faktor 2,3 während sich im Überstand (CPT 2) Minimum und Maximum etwa um das 13-fache unterscheiden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Überstandfraktion (CPT 2) die untersuchten Substrate effektiver umsetzen kann als die sedimentierte Fraktion (CPT 1), wobei ein absolutes Maximum der katalytischen Effektivität im Überstand für das Substrat Lauryl-CoA (C-12) beobachtet werden konnte. Hiefür ist v.a. der sehr kleine K_m -Wert von $7,8\mu\text{M}$ (Abb.19) entscheidend, da die hier für das Substrat Lauryl-CoA erreichte Maximalgeschwindigkeit vergleichsweise gering ist (Abb.17).

Dies konnte für die Sedimentfraktion (CPT 1) nicht nachvollzogen werden. Diese zeigte für das C-12 Substrat katalytische Effizienzen, welche sich etwa im Bereich des Minimums bei Stearyl-CoA bewegten.

Es konnte somit demonstriert werden, dass die getrennten Entitäten des Carnitin Palmityltransferasesystems, unter Einbezug der maximalen Umsatzgeschwindigkeit und der K_m -Werte, unterschiedliche Substratoptima zeigen. Während im Sediment (CPT 1) die untersuchten Substrate, mit leichten Präferenzen für mittellangkettige Acyl-CoA Ester, annähernd mit ähnlicher Effektivität umgesetzt werden, zeigt der Überstand (CPT 2) eine besonders hohe katalytische Effizienz für die C-12 Fettsäure Lauryl.

Unter Punkt 1.2 *Das Carnitin-Acyltransferasen-System* wurde über die Existenz dreier bisher beschriebener Fettsäure-CoA Ester Transferasesysteme berichtet, welche jeweils den Transport von kurzkettigen (Acetyltransferase), mittelkettigen (Oktanyltransferase) und langkettigen (Palmityltransferase) Fettsäuren über die mitochondrialen Membranen katalysieren [9]. Da in dieser Arbeit das Carnitin Palmityltransferasesystem untersucht und von den beiden übrigen, vollständig löslichen Transferasesystemen getrennt wurde, wurden Aktivitätsmaxima im Sinne hoher Maximalgeschwindigkeiten für eher längerkettige Substrate erwartet.

Das die hier dargestellten Ergebnisse diese Vermutung nicht bestätigen können, soll nachfolgend diskutiert werden.

Am wahrscheinlichsten sind hierfür die gewählten Substratkonzentrationen verantwortlich. Wie schon erwähnt, lassen sich in einem *in vitro* System alle Substrate in beliebigen Dimensionen variieren, was derart unter physiologischen Bedingungen nicht möglich ist. Um einen entsprechenden Realitätsbezug herstellen zu können, muss man die *in vivo* vorhandenen Konzentrationen der entsprechenden Substrate betrachten.

In diversen Arbeiten wurden hierfür die Konzentrationen von freien Fettsäuren, Acyl-CoA und Acyl-Carnitin Estern für die Muskulatur verschiedener Organismen bestimmt, wobei Untersuchungen an humanem Gewebe deutlich unterrepräsentiert sind.

Morgan und Kollegen (1969) untersuchten die Konzentration freier Fettsäuren in menschlichem Muskel und fanden im Mittel $4,0 \pm 0,83 \mu\text{Eq/gFG}$ [63].

Die Messungen von Carroll (1984) in humaner Muskulatur ergaben eine Konzentration von etwa $7,7 \text{ nMol/gFG}$ langkettiger CoA-Ester [19]. Für langkettige Carnitin-Ester konnte eine Konzentration von $48 \pm 21 \text{ nMol/gFG}$ ermittelt werden.

Wie schon angeführt, nehmen wir mit einer ausgeglichenen Ernährung v.a. längerkettige Fettsäuren auf, wobei Palmitylsäure (C-16) einen besonders großen Anteil einnimmt (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft DGF). Man muss also davon ausgehen, dass die oben genannten Konzentrationen für längerkettige Fettsäuren und deren Ester in der menschlichen Skelettmuskulatur noch um einiges größer sind als die Konzentrationen der kurz- und mittelkettigen Fette.

Insgesamt liegen diese physiologischen Konzentrationen der Fettsäuren teilweise beträchtlich unter denen, die unter *in vitro* Bedingungen zur biochemischen Untersuchung der Acyl-CoA Transferasen zur Anwendung kommen. Die unter den gewählten Versuchsbedingungen erfassten hohen Umsatzgeschwindigkeiten, besonders in der Überstandfraktion (CPT2), könnten somit unter physiologischen Bedingungen unerreichbar sein.

Da beide Fraktionen die höchsten Affinitäten für eher längerkettige Substrate zeigen (s.Abb.19), sollten durch die CPT 1 und 2 *in vivo* auch mit diesen Fettsäuren die höchsten Aktivitäten erzielt werden.

In der Folge des Trennungsprozesses der untersuchten Enzyme wurde das Detergenz Tween 20 eingesetzt. Dies ist in der Lage Proteine aus ihrer membranären Umgebung zu lösen bzw. einen Membrankomplex in mehrere Teile aufzutrennen. Die CPT 2, welche *in vivo* locker mit der mitochondrialen Membran assoziiert ist, sollte nach der Tweenbehandlung vollständig, als eigenständiges Protein in Lösung gegangen sein.

Da die Carnitin Palmitoyltransferase 1 durch ihre transmembranalen Domänen fest in die mitochondriale Membran integriert ist, ist hier ein vollständiges Herauslösen aus dieser durch ein mildes Detergenz wie Tween 20 eher unwahrscheinlich. Dies war auch nicht beabsichtigt, da eine katalytisch aktive CPT 1 zwingend die spezifische membranale Umgebung erfordert [101]. Es ist davon auszugehen, dass durch die Tweenbehandlung verschieden große Membranbruchstücke mit integrierter CPT 1 entstehen.

Beide Enzymproteine sind nach der Detergenzbehandlung mobiler. Möglicherweise ergeben sich hierdurch neue Angriffspunkte i.S. neuer bzw. modifizierten Zugänge zum katalytischen Zentrum für die Substrate, wovon besonders die kurzkettigen Fettsäuren profitieren.

Weiterhin ist es vorstellbar, dass durch den Aufschluss anderer Zellkompartimente Proteasen bzw. proteolytisch aktive Substanzen freigesetzt wurden, welche ebenfalls zu einer Modifikation der untersuchten Enzyme führten. Grundlage für diese Vermutung bilden die Ausführungen unter Punkt *1.5 Interaktion der CPT 1 mit Proteasen und Inhibitoren*. Auch dort wurde schon darauf verwiesen, dass es nicht nur eine Frage der Spezifität einer Protease ist, inwieweit sie ein Protein zu modifizieren vermag, sondern auch entscheidend davon abhängig ist, welche Angriffspunkte dieser zugänglich sind.

Da bekannt ist, dass neben den Mitochondrien weitere Zellkompartimente mit spezifischen Fettsäuretransportsystemen ausgestattet sind, wäre es weiterhin vorstellbar, dass neben solchen proteolytisch aktiven Substanzen auch Substanzen mit einer eigenen Transferaseaktivität freigesetzt wurden [86].

5.2 Substratinhibition der CPT-Enzyme (I₅₀)

Schon Mitte der 60-er Jahre des vergangenen Jahrhunderts beschrieben Fritz und Marquis sowie Bremer und Norum, dass Palmitoyl-CoA die Carnitin Palmitoyltransferase hemmen kann [15;35].

Bedeutsam hierbei ist, dass die Fettsäure als Detergenz wirkt und ein solch detergenzartiger Effekt der Acyl-CoA Ester auf die CPT-Enzyme von der Albuminkonzentration im Testansatz (bzw. im Organismus) abhängig ist [80].

Das Ausmaß einer solchen Hemmung bzw. die Klärung der Frage in wieweit auch die anderen Fettsäure-CoA Ester zu einer solchen Hemmung führen, ist gerade im Hinblick auf etwaige Therapieansätze, aber auch im Rahmen einer optimierten biochemischen Diagnostik von Interesse.

Im Gegensatz zur Größe K_i , welche substratkonzentrationsunabhängig die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation eines Enzym-Inhibitor-Komplexes darstellt, beschreibt die Konstante I_{50} jene Inhibitorkonzentration, bei der die enzymatische Aktivität noch 50% des Maximums beträgt (Cook G.A. 1983).

Zierz und Engel (1985) erkannten die abnorme Regulierbarkeit mutierter Carnitin Palmityltransferase, welche sich in einer intensiveren Hemmung dieses Enzyms durch Palmityl-CoA bzw. Palmitylcarnitin darstellte [106]. Dies bedeutet, dass bei Patienten mit einer Erkrankung des CPT-Systems (s. Punkt 1.7 *Störungen des Carnitin Palmityltransferase Systems*) erhöhte Konzentrationen von Fettsäuren z.B. im Rahmen intensivierter körperlicher Belastung oder unter Nahrungskarenz, zu einer stärkeren Hemmung der Aktivitäten der CPT-Enzyme führen, als dies bei gesunden Individuen zu erwarten wäre.

Neben diesen regulatorischen Unterschieden konnten Vladutiu und Kollegen (1992) zeigen, dass auch strukturelle Unterschiede zwischen CPT gesunder Kontrollen und Patienten mit CPT Defekt existieren, welche zu einer reduzierten Aktivität führen [94].

Therapeutisch besteht die Möglichkeit die Belastungstoleranz von Patienten mit CPT 2 Defekt durch die intravenöse Gabe von Glukose zu erhöhen, während bei einer oralen Applikation keine positiven Effekte beobachtet werden konnten [74]. Des Weiteren gab es Bemühungen im Rahmen der Behandlung mitochondrialer Störungen der Fettsäureoxidation mittellangkettige Acyl-CoA Ester einzusetzen [26;44;84].

Hierbei ist es besonders wichtig das Hemmverhalten von CPT 1 und 2 gegenüber den jeweiligen Substraten genau zu kennen, denn es wäre fatal Fettsäuren mit einer, schon für intakte CPT niedrigen Hemmkonzentration zu verabreichen, obgleich für diese besonders hohe Umsatzraten nachgewiesen werden konnten. In diesem Fall könnte eine, durch strukturelle Defekte bedingte, ohnehin schon erniedrigte Aktivität durch die oben beschriebene intensivere Hemmbarkeit des defekten Enzyms, noch weiter gemindert werden.

Der physiologische Sinn der Substrathemmung von CPT 1 und 2 ist wahrscheinlich darin begründet, die Mitochondrien vor einer Überflutung mit den entsprechenden Substraten zu schützen.

Eine Sättigung des Enzyms, mit resultierender Stagnation des Zuwachses der Aktivität bei weiter zunehmender Substratkonzentration konnte für beide CPT-Enzyme bis auf den C-10 Fettsäureester Dekanyl-CoA für alle anderen Substrate mit hinreichender Signifikanz gezeigt werden. Im Fall des Dekanyl-CoA wurde entweder keine Abnahme des Umsatzes nach Erreichen des Aktivitätsmaximums beobachtet (CPT 1, s. Abb.11) oder diese Abnahme war so gering ausgeprägt, dass eine regressive Abschätzung des Verlaufs bis zur entsprechenden I_{50} -Konzentration nicht mit hinreichender Genauigkeit möglich war.

Die Konzentrationen (I_{50}) der einzelnen Substrate bei denen die Umsatzgeschwindigkeit auf 50% der zuvor erreichten maximalen Geschwindigkeit abgesunken war, unterschieden sich zum Teil deutlich (s.Abb.22).

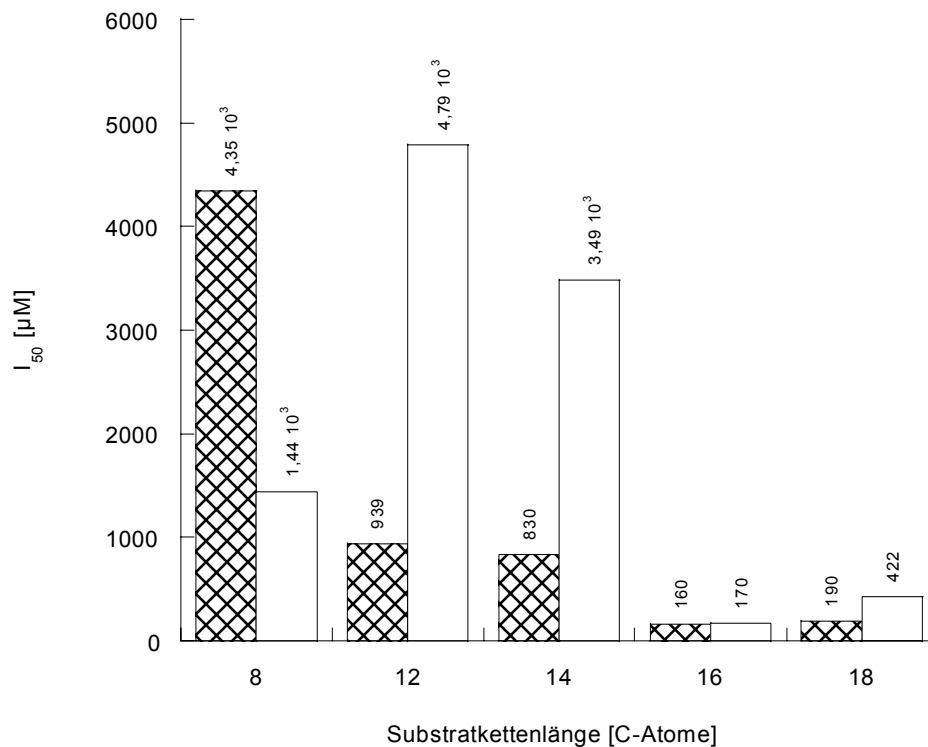


Abbildung 22: Darstellung der I_{50} -Konzentrationen der untersuchten Substrate im Sediment (CPT 1, schraffierte Säulen) und Überstand (CPT 2, leere Säulen).

Die ausgeprägten Unterschiede in der Hemmung der untersuchten Präparationen durch die verschiedenen Substrate, werden auch innerhalb der Fraktionen und für ein Substrat deutlich.

Die Sedimentfraktion (CPT 1) ist mit Abstand am wenigsten durch Oktanyl-CoA (C-8) hemmbar. Mit weiterer Zunahme der Kettenlänge, werden immer geringere Substratkonzentrationen benötigt, um eine 50%-ige Hemmung herbeizuführen.

Die Überstandfraktion (CPT 2) kann mit besonders hohen Konzentrationen des C-12 CoA Esters Lauryl inkubiert werden, ehe sie mit einer 50%-igen Hemmung reagiert.

Die niedrigsten I_{50} -Werte konnten sowohl für im Sediment (CPT 1) als auch im Überstand (CPT 2) für die C-16 und C-18 Fettsäuren Palmityl-CoA und Stearyl-CoA bestimmt werden.

Möglicherweise ist dies dadurch erklärbar, dass die im Rahmen einer durchschnittlichen Ernährung besonders häufig aufgenommenen längerkettigen Fettsäuren v.a. Palmitylsäure gegenüber den kurz- und mittelkettigen Substraten eine zunehmend detergenzartige Wirkung entfalten, so dass die früh einsetzende Hemmung der entsprechenden Transportsysteme (CPT) eine übermäßige Anreicherung derartiger Substrate im Mitochondrium verhindert.

5.3 Existenz einer spezifischen C12-Transferaseaktivität im menschlichen Skelettmuskel?

Im Kapitel 1.3 *Acyltransferaseaktivitäten in extramitochondrialen Zellkompartimenten* wurden verschiedene Acyl-CoA Transferaseaktivitäten außerhalb des Mitochondriums beschrieben. Bislang gibt es keine systematischen Untersuchungen über Acyl-CoA Transferasen, sowohl mitochondrial als auch extramitochondrial, in menschlichem Skelettmuskel.

Obwohl die Trennung von CPT 1 und 2 durch Detergenzbehandlung sowie Ultrazentrifugation ein anerkanntes Verfahren zur Separation der beiden Enzyme darstellt und hierbei die vollständig lösliche Carnitin Oktanyltransferase entfernt werden kann, ist es dennoch möglich, dass, in Analogie zu Untersuchungen an Rattenleber (s.u.) die gemessenen Größen (V_{max} , K_m und I_{50}) durch den Einfluss bislang nicht beschriebener Acyl-CoA Transferasen überlagert werden.

So postulierten Singh und Mitarbeiter (1996) die Existenz einer extramitochondrialen Dekanyltransferaseaktivität in Peroxisomen der Rattenleber [86]. Sie fanden für dieses Enzym einen K_m -Wert für die C-10 Fettsäure Dekanyl-CoA von $7,7\mu\text{M}$ und eine enzymatische Aktivität in der Größenordnung um $10\ \mu\text{mol}/\text{min}/\text{gNCP}$.

Im vorangehenden Kapitel wurde auf die scheinbare Ausreißerposition des K_m -Wertes in der Überstandfraktion (CPT 2) für die C12-Fettsäure Lauryl-CoA hingewiesen (s. Abb. 19).

Die Möglichkeit, dass es sich hierbei um einen Messfehler handelt kann weitgehend ausgeschlossen werden, da zum Einen dieser Wert keine Einzelmessung, sondern einen Mittelwert aus 3 Messreihen repräsentiert, zum Anderen hierbei der Standardfehler lediglich $\pm 2,04\mu\text{M}$ beträgt.

Neben diesem K_m -Wert ist weiterhin die sehr große Hemmkonzentration der C-12 Fettsäure in der Überstandfraktion (CPT 2) auffällig (s. Abb. 22). Auch in diesem Fall kann ein Messfehler weitgehend ausgeschlossen werden.

Dieser große I_{50} -Wert könnte ein Hinweis darauf sein, dass mögliche, weitere in der Überstandfraktion enthaltende Transferaseaktivitäten teilweise erst bei sehr hohen Laurylkonzentrationen mit einer 50%-igen Hemmung ihrer Aktivität reagieren.

Abbildung 23 zeigt schematisch eine hypothetische Aufteilung und Überlappung der katalytischen Effizienzen von Acyl-CoA Transferasen in der Überstandfraktion bei zunehmender Kettenlänge der umgesetzten Substrate.

Unter Zugrundelegung des klassischen Modells der Verteilung von CPT 1 und 2 zwischen der Sediment- bzw. Überstandfraktion waren die Gipfel der katalytischen Effizienz bei C-8 und C12 in der Überstand- und bei C-8 in der Sedimentfraktion (Abb. 24) überraschend, wurde

doch ein Maximum für E_{kat} in beiden Fraktionen ausschließlich für eher langkettige Fettsäuren erwartet.

Des Weiteren ist es auffällig, dass die Maxima der katalytischen Effizienz bei C-12 und bei C-16 in der Überstandfraktion mit den zwei kleinsten bestimmten K_m -Werten zusammenfallen.

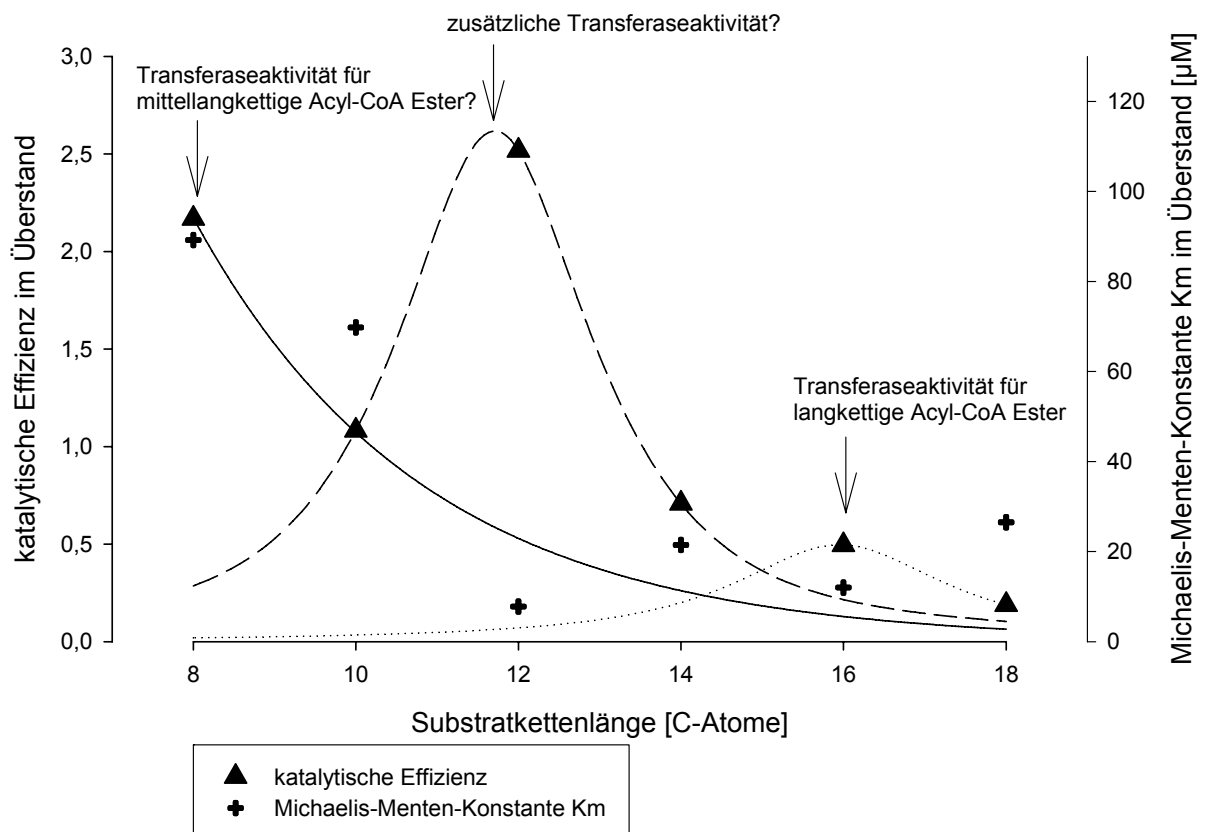


Abb. 23: **Überstandfraktion:** Katalytische Effizienzen (Dreiecke, linke Y-Skale) und Michaelis-Menten-Konstante (Kreuze; rechte Y-Skale) in der Überstandfraktion für Fettsäuren mit 8 bis 18 Kohlenstoffatomen. Für die katalytischen Effizienzen ist schematisch und hypothetisch deren Verteilung auf drei separate Transferaseaktivitäten mit unterschiedlichen Präferenzen für die umgesetzten Substrate dargestellt.

Kleine K_m -Werte bei gleichzeitig hohen katalytischen Effizienzen, sowie großen I_{50} -Werten eines Enzyms für ein bestimmtes Substrat deuten auf eine Spezifität des Enzyms für das jeweilige Substrat hin.

Nach eingehendem Studium der vorliegenden Daten halten wir es daher für wahrscheinlich, dass das in der Überstandfraktion gefundene Maximum der katalytischen Effizienz für die C-

12 Fettsäure Lauryl-CoA eine laurylspezifische Acyl-CoA Transferaseaktivität repräsentieren könnte: Die Carnitin Lauryl-CoA Transferase (CLT).

In der Zusammenfassung sprechen folgende Sachverhalte für unsere Hypothese der Existenz einer, wahrscheinlich Lauryl-CoA spezifischen, bisher nicht beschriebenen Acyl-CoA Transferaseaktivität im menschlichen Skelettmuskel:

1. Der besonders niedrige K_m -Wert für das Substrat Lauryl-CoA (C-12) in der Überstandfraktion demonstriert eine besonders große Affinität einer bestimmten Struktur zu dieser Fettsäure.
2. Ein hoher I_{50} -Wert für Lauryl-CoA (C-12) in der Überstandfraktion beschreibt eine hohe Toleranz dieser Struktur gegenüber hohen Konzentrationen dieses Substrates, was wiederum ein Spezifitätsmerkmal darstellt.
3. Im Überstand lässt sich neben einem Maximum der katalytischen Aktivität bei C-16 auch eines für die C-12 Fettsäure Lauryl-CoA beobachten (Abb. 23).
4. Da dieser Gipfel in der Sedimentfraktion nicht nachgewiesen werden konnte und sich die katalytische Effizienz hier bei Lauryl-CoA (C-12) sogar auf einem Minimum befand (Abb. 24), zeigt dies, dass es sich um einen spezifischen Effekt handelt.
5. Untersuchungen an Rattenleber fanden extramitochondriale Dekanyl-CoA Transferaseaktivitäten, deren kinetische Parameter K_m und V_{max} denen der von uns vermuteten humanen laurylspezifischen Acyl-CoA Transferaseaktivität sehr nahe kommen [86].

Für das Auftreten der Gipfel der katalytischen Effizienz für die Fettsäure Oktanyl-CoA (C-8) in der Überstand- *und* Sedimentfraktion könnte es unserer Meinung nach unterschiedliche Erklärungsansätze geben.

Zum Einen könnte dies eine Folge der unphysiologisch hohen eingesetzten Substratkonzentrationen sein, da auch die zugehörigen relativ hohen K_m -Werte nicht auf eine Substratspezifität hindeuten.

Zweitens wäre es vorstellbar, dass durch den Einsatz des Detergenz Tween 20 im Rahmen des Trennungsprozesses der CPT-Enzyme diese dahingehend strukturelle Veränderungen erfahren haben, dass nach erfolgter Trennung bestimmte Substrate erleichterten Zugang zum jeweiligen katalytischen Zentrum erhalten, wovon in diesem speziellen Fall besonders die Fettsäure Oktanyl-CoA (C-8) profitiert.

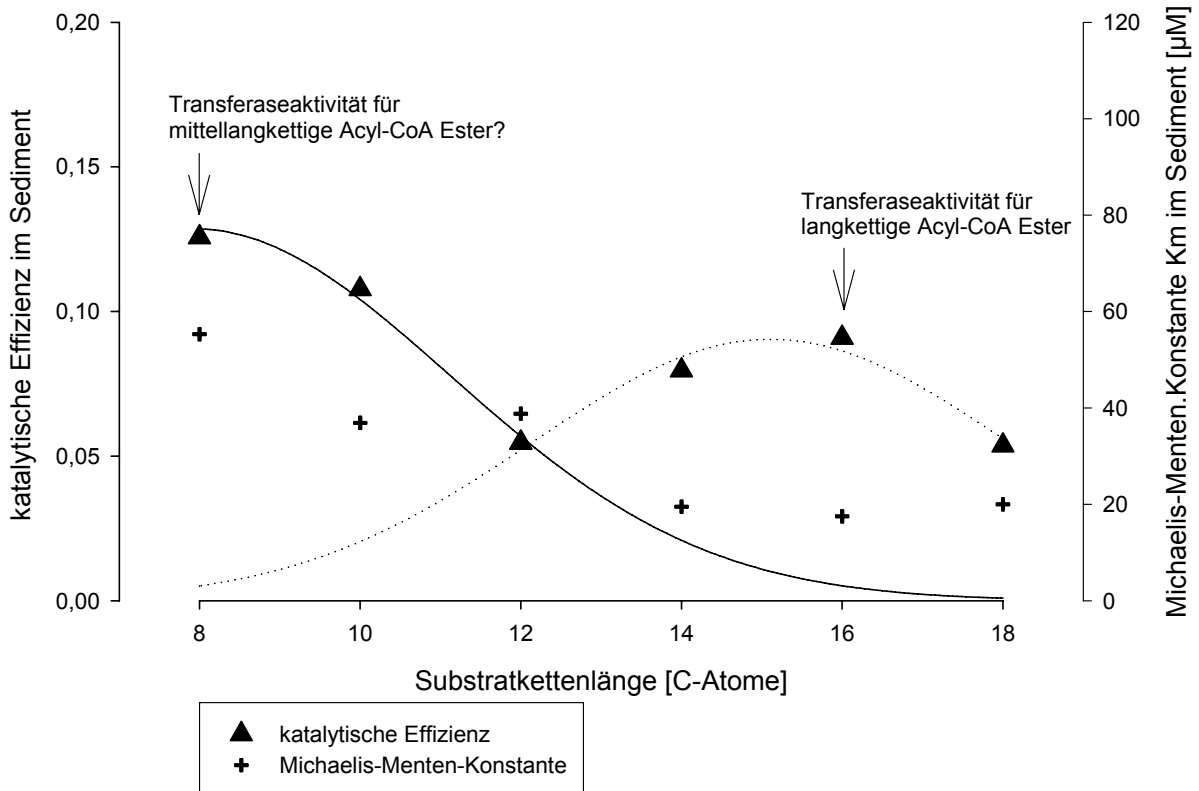


Abb. 24: **Sedimentfraktion:** Katalytische Effizienzen (Dreiecke, linke Y-Skale) und Michaelis-Menten-Konstante (Kreuze; rechte Y-Skale) in der Sedimentfraktion für Fettsäuren mit 8 bis 18 Kohlenstoffatomen. Für die katalytischen Effizienzen ist schematisch und hypothetisch deren Verteilung auf zwei Transferaseaktivitäten mit unterschiedlicher Präferenz für die umgesetzten Substrate dargestellt.

Drittens könnte es sich unserer Meinung nach hierbei um die Aktivität einer mitochondrialen Carnitin Oktanyltransferase handeln. Die Existenz einer solchen Transferaseaktivität gilt bisher als nicht gesichert. Teilweise wurde diskutiert, ob nicht ein Großteil der angenommenen mitochondrialen COT Aktivität aus einer Überlappung von Carnitin Acetyl- und Carnitin Palmityltransferase Aktivität resultieren könne [22]. Die Isolierung einer COT gelang bisher nur aus Peroxisomen von Maus und Ratte [31; 32]. Hierbei handelte es sich um ein leicht lösliches, sich in der peroxisomalen Matrix befindliches Protein. Dieses Enzym zeigte eine breite Substratspezifität für Fettsäure-CoA Ester in einem Kettenlängenbereich von 2 bis 20 Kohlenstoffatomen, mit einem Aktivitätsmaximum bei Hexanyl-CoA (C-6).

Die von uns gefundenen Gipfel der katalytischen Effizienz für die C-8 Fettsäure Oktanyl-CoA in der Überstand- und Sedimentfraktion könnten ein Hinweis auf das Vorhandensein einer mitochondrialen Carnitin Oktanyltransferase darstellen, welche möglicherweise sowohl membranassoziiert als auch membrangebunden vorliegen könnte.

5.4 Implikationen zur Therapie der CPT-Defekte

Schon im vorangegangenen Abschnitt 5.2 *Substratinhibition der CPT-Enzyme (I_{50})* wurde auf etwaige Therapiemöglichkeiten und –ansätze des CPT-Defektes eingegangen.

Schaefer und Kollegen favorisierten im Rahmen einer symptomorientierten Therapie von CPT-Defekten den Einsatz der Fettsäure Lauryl-CoA [83]. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit könnte diese Therapieoption erweitert werden.

Nach unserer Auffassung wäre die Anwendung von weiteren mittellangkettigen Fettsäuren, also Oktanyl und Dekanyl, eventuell ergänzend zur Applikation der C-12 Fettsäure Lauryl, zur symptomatischen Therapie von CPT-Defekten aus 2 Gründen vorteilhaft:

1. Durch den Einsatz der mittellangkettigen Fettsäuren lassen sich überdurchschnittlich hohe Umsatzraten in der Sediment- und Überstandfraktion erzielen, welche möglicherweise die, durch spezifische Defekte bedingte, verminderte Aktivität einzelner Enzyme (teilweise) kompensieren könnten.
2. Die C-8 und C-10 Fettsäuren zeigen sowohl in der Sediment-, als auch in der Überstandfraktion ein relativ niedriges Hemmpotential (hohes I_{50}). Hierbei werden die Acyl-CoA Transferaseaktivitäten erst bei vergleichsweise hohen Substratkonzentrationen gehemmt, wodurch sich das Risiko, die verbleibende enzymatische Aktivität durch zu hohe Substratkonzentrationen noch weiter zu reduzieren, vermindern lassen könnte.

5.5 Differenzierung der CPT 1- und 2-Aktivitäten

Schon unter Punkt 1.2 *Das Carnitin-Acyltransferasen-System* wurde auf die unterschiedliche Sensitivität der Carnitin Palmityltransferase 1 und 2 gegenüber dem Inhibitor Malonyl-CoA hingewiesen. Während die CPT 1 in Gegenwart dieser Substanz mit einer Hemmung ihrer Aktivität reagiert, ist die CPT 2 nicht Malonyl sensitiv.

Für das nicht getrennte Muskelhomogenat zeigte sich in Gegenwart von Malonyl-CoA eine Abnahme des enzymatischen Umsatzes, welcher bei steigender Malonyl-CoA Konzentration plateauartig etwa 53% der Ausgangsaktivität erreichte (s. Abb.8).

Die Untersuchung zur Inhibierbarkeit der Tween-löslichen Fraktion erbrachte bei zunehmender Malonyl-CoA Konzentration hingegen keine Abnahme der enzymatischen Aktivität (s.Abb.9).

Die Ergebnisse zeigen, dass, in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen, homogenisierte Muskulatur durch Ultrazentrifugation und Detergenzbehandlung in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion auftrennbar ist.

In der Zusammenschau mit den Ergebnissen der Malonyl-CoA Hemmbarkeit ist davon auszugehen, dass sich die CPT 1 in der unlöslichen Sediment- und die CPT 2 in der löslichen Überstandfraktion befindet.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die umfassende Erstellung spezifischer Substratprofile für die Carnitin Palmityltransferase 1 und 2. Da diese Enzymtitäten im nativen Muskelhomogenat nur gemeinsam mit noch anderen, löslichen Acyl-CoA Transferasen vorhanden sind, erfolgte die Trennung der zu untersuchenden Enzyme. Hierfür wurden zunächst die löslichen Acyl-CoA Transferaseaktivitäten (COT) mittels Ultrazentrifugation abgetrennt. Anschließend konnten die nicht löslichen Carnitin Palmityltransferasen 1 und 2 durch den Einsatz des Detergenz Tween 20 und erneuter Ultrazentrifugation separiert werden.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter kamen Fettsäure-CoA Ester mit einer Kettenlänge zwischen 8 und 18 Kohlenstoffatomen zum Einsatz.

Betrachtet man nur die maximalen enzymatischen Umsatzgeschwindigkeiten (V_{max}), finden sich in der Sediment- (CPT 1) und Überstandfraktion (CPT 2) die höchsten Aktivitäten für die C-8 Fettsäure Oktanyl-CoA. Mit zunehmender Substratkettenlänge nahmen die enzymatischen Aktivitäten ab, wobei die Überstandfraktion (CPT 2) für alle untersuchten Substrate höhere Aktivitäten aufwies. Im Gegensatz dazu konnten die höchsten Bindungsaffinitäten (K_m) neben Lauryl-CoA für eher langkettige Fettsäure-CoA Ester bestimmt werden. Im Vergleich der katalytischen Effizienzen (E_{kat}), als Verhältnis von maximalem Umsatz (V_{max}) und Substrataffinität (K_m), wurde wiederum eine deutliche Überlegenheit im effektiven Umsatz der Substrate in der Überstandfraktion (CPT 2) deutlich, welche je ein Maximum für Oktanyl (C-8), Lauryl (C-12) und Palmityl-CoA (C-16) bildet. Dagegen wies die Sedimentfraktion (CPT 1) einen homogeneren Verlauf der katalytischen Effizienz, mit einer Abnahme der Werte, ausgehend von mittellang-, hin zu langkettigen Fettsäure-CoA Estern auf. Die insgesamt höchste katalytische Effizienz wurde in der Überstandfraktion für das Substrat Lauryl-CoA (C-12) gefunden. Zusammen mit den hierfür gemessenen K_m -Werten und unter Einbeziehung weiterer Erkenntnisse, könnte dies auf die Existenz einer bisher noch nicht beschriebenen, Lauryl-CoA spezifischen Transferaseaktivität im menschlichen Skelettmuskel hindeuten.

Hinsichtlich einer Hemmung der Acyl-CoA Transferaseaktivitäten durch die eingesetzten Substrate wurde deutlich, dass die langkettigen Fettsäuren die enzymatischen Aktivitäten schon bei viel geringeren Konzentrationen hemmen als die mittellangkettigen Substrate.

Insgesamt stellen mittellangkettige Fettsäuren in den untersuchten Präparationen scheinbar die geeigneteren Substrate dar. Allerdings bleibt es unbestimmt, welcher Anteil der enzymatischen Aktivität auf die CPT-Enzyme oder etwaige andere Acyl-CoA Transferaseaktivitäten entfällt.

7. LITERATUR

- [1] Abadi N., Thuillier L., Prasad C., et al.: "Molecular resolution of carnitine palmitoyltransferase I deficiency in a Hutterite family." *Am J Hum Genet* 65 (1999) 230
- [2] Abu-Elheiga L., Brinkley W.R., Zhong L., et al.: "The subcellular localization of acetyl-Coa carboxylase2." *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 1444-1449
- [3] Abu-Elheiga L., Matzuk M.M., Abo-Hashema K.A.H., et al.: "Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2." *Science* 291 (2001) 2613-2616
- [4] Adams S.H., Brown N.F., Ing N.H., et al.: "Expression and possible role of muscle-type carnitine palmitoyltransferase I during sperm development in the rat." *Biol. Reprod.* 59 (1998) 1399-1405
- [5] Adibi S.A., Krazysik A., Morse E.L., et al.: "Oxidative energy metabolism in skeletal muscle: Biochemical and ultrastructural evidence for adaptive changes." *J Lab Clin Med* 83 (1974) 548-562
- [6] Alam N. and Saggerson E.D.: "Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle." *Biochem J* 334 (1998) 233-241
- [7] Angelini C., Freddo L., Battistella P., et al.: "Carnitine palmitoyltransferase deficiency: Clinical variability, carrier detection and autosomal recessive inheritance." *Neurology* 31 (1981) 883-886
- [8] Bianchi A., Evans J.L., Iverson A.J., et al.: "Identification of an isoenzymic form of acetyl-CoA Carboxylase." *J Biol Chem* 265 (1990) 1502-1509
- [9] Bieber L.L.: "Carnitine." *Ann Rev Biochem* 57 (1988) 261-283
- [10] Bieber L.L. and Farrell S.: "Carnitine acyltransferases." *Enzymes* 16 (1983) 627-644

- [11] Bonnefont J.P., Taroni F., Cavadini P., et al.: "Molecular analysis of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatocardiomyopathic expression." *Am J Hum Genet* 58 (1996) 971-978
- [12] Bougneres P F., Saudubray J M., C. M., et al.: "Fasting hypoglycemia resulting from hepatic carnitine palmitoyl transferase deficiency." *J Pediatr.* 98 (1981) 742-746
- [13] Bremer J.: "The effect of fasting on the activity of liver carnitine palmitoyltransferase and its inhibition by Malonyl-CoA." *Biochem Biophys Acta* 665 (1981) 628-631
- [14] Bremer J.: "Carnitine - metabolism and functions." *Physiol Rev* 63 (1983) 1420-1480
- [15] Bremer J. and Norum K.R.: "The Mechanism of Substrate Inhibition of Palmityl CoenzymeA:Carnitine Palmityltransferase by Palmityl Coenzyme A." *Biochem J* 242 (1966) 1744-1748
- [16] Britton C., Mackey D.W., Esser V., et al.: "Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPT1A, CPT1B)." *Genomics* 40 (1997) 209-211
- [17] Brown F.N., Mullur R.S., Subramanian I., et al.: "Molecular characterization of L-CPT I deficiency in six patients: insights into function of the native enzyme." *J Lip Res* 42 (2001) 1134-1142
- [18] Brown N.F., Esser V., Foster D.W., et al.: "Expression of a cDNA for rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 in yeast establishes that catalytic activity and Malonyl-CoA sensitivity reside in a single polypeptide." *J Biol Chem* 269 (1994) 26438-26442
- [19] Carroll J.E., Norris B.J., Villadiego A., et al.: "Brominated vegetable oil myopathie: inhibition at multiple sites." *Muscle Nerve* 8 (1984) 642-646
- [20] Carroll J.E., Villadiego A. and Morse D.P.: "Fatty acid oxidation intermediates and the effect of fasting on oxidation in red and white skeletal muscle." *Muscle Nerve* 6 (1983) 367-373

- [21] Chen Z.P., Mcconell G.K., Michell B.J., et al.: "AMPK signalling in contraction human skeletal muscle : acetyl-CoA carboxylase and NO synthetase phosphorylation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279 (2000) 1202-1206
- [22] Clarke P.R.H. and Bieber L.L.: "Isolation and purification of mitochondrial carnitine octanoyltransferase activities from beef heart." *J Biol Chem* 256 (1981) 9861-9868
- [23] Cook G.A., Mynatt R.L. and Kashfi A.: "Yonetani-Theorell analysis of hepatic carnitine palmitoyltransferase-1 inhibition indicates two distinct inhibitory binding sites." *Biol Chem* 269 (1994) 8803-8807
- [24] Demaugre F., Bonnefont J.P., Colonna M., et al.: "Infantile form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatomuscular symptoms and sudden death. Physiopathological approach to carnitine palmitoyltransferase II deficiencies." *J Clin Invest* 87 (1991) 859-864
- [25] Dimauro S. and Dimauro P.M.M.: "Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria." *Science* 182 (1973) 929-931
- [26] Duran M., Wander R.J.A. and Dejager J.P.: "3-Hydroxydicarboxylic aciduria due to long-chain 3-hydroxyacylcoenzyme A dehydrogenase deficiency associated with neonatal death: protective effect of medium-chain triglyceride treatment." *Eur J Pediatr* 150 (1991) 190-195
- [27] Elpeleg O.N., Hammerman C., Saada A., et al.: "Antenatal presentation of carnitine palmitoyltransferase II deficiency." *Am J Med Genet* 102 (2001) 183-187
- [28] Elpeleg O.N., Joseph A., Branski D., et al.: "Recurrent metabolic decompensation in profound carnitine palmitoyltransferase II deficiency." *J Pediatr* 122 (1993) 917-919
- [29] Esser V., Britton C.H., Weis B.C., et al.: "Cloning, sequencing and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase 1: direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function." *J Biol Chem* 268 (1993) 5817-5822

- [30] Esser V. K.M., Britton C.H., Krishnan K., Foster D.W., McGarry J.D.: "Inhibitors of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1 limit the action of proteases on the enzyme: isolation and partial amino acid analysis of a truncated form of the rat liver isozyme." *J Biol Chem* (1993) 5810-5816
- [31] Farrell S.O., Fiol C.F. and Reddy J.K.B.L.L.: "Properties of purified carnitine acyltransferases of mouse liver peroxisomes." *J Biol Chem* 259 (1984) 13089-13095
- [32] Farrell S.O. and Bieber L.L.: "Carnitine octanoyltransferase of mouse liver peroxisomes: properties and effect of hypolipidemic drugs." *Arch Biochem Biophys* 222 (1983) 123-132
- [33] Ferdinandusse S., Mulders J., Ijlst L., et al.: "Molecular cloning and expression of human carnitine octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal beta-oxidation of branched-chain fatty acids." *J Biochem Biophys* 263 (1999) 213-218
- [34] Fraser F., Corstorphine C.G. and Zammit V.A.: "Evidence that both the acyl-CoA and Malonyl-CoA binding sites of mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase (CPT1) are exposed on the cytosolic face of the outer membrane." *Biochem Soc Trans* 24 (1996) 184
- [35] Fritz I.B. and Marquis N.R.: "The role of acylcarnitine esters and carnitine palmitoyltransferase in the transport of fatty acyl groups across mitochondrial membranes." *Proc Natl Acad Sci USA* 54 (1965) 1226-1233
- [36] Gallera C., Verderio E., Floridia G., et al.: "Assignment of the human CPT2 gene to chromosome 1p32." *Genomics* 24 (1994) 195-197
- [37] Hardie D.G. and Carling D.: "The AMP-activated protein kinase. Fuel gauge of the mammalian cell?" *Eur J Biochem* 246 (1997) 259-273
- [38] Hutber C.A., Hardie D.G. and Winder W.W.: "Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 272 (1997) 262-266

- [39] Ijlst, L, Mandel, et al.: "Molecular basis of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency." *J Clin Invest* 102 (1998) 527-531
- [40] Invernizzi F., Burlina A.B., Donadio A., et al.: "Lethal neonatal presentation of carnitine palmitoyltransferase I deficiency." *J Inherit Metab Dis* 5 (2001) 601-602
- [41] Isackson P.J., Bennett M.J. and Vladutiu G.D.: "Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency." *Mol Genet Metab* 4 (2006) 323-331
- [42] Iverson A.J., Bianchi A., Nordlund A.C., et al.: "Immunological analysis of acetyl-CoA carboxylase mass, tissue distribution and subunit association." *Biochem J* 269 (1990) 365-371
- [43] J.M. W (1996). *The Protein Protocols Handbook*. New York, Humana Press.
- [44] Jackson S., Bartlett K., Land J., et al.: "Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency." *Pediatr Res* 29 (1991) 406-411
- [45] Kashfi K. and Cook G.A.: "Proteinase treatment of intact hepatic mitochondria has differential effects on inhibition of carnitine palmitoyltransferase by different inhibitors." *Biochem J* 282 (1992) 909-914
- [46] Kashfi K., Mynatt R.L. and Cook G.A.: "Hepatic carnitine palmitoyltransferase-1 has two independent inhibitory binding sites for regulation of fatty acid oxidation." *Biochem Biophys Acta* 1212 (1994) 245-252
- [47] Kim K.H.: "Regulation of mammalian acetyl-CoA Carboxylase." *Annu Rev Nutr* 17 (1997) 77-99
- [48] Lilienthal J.L., Zierler K.L., Folk B.P., et al.: "A reference base and system for analysis of muscle constituents." *Biochem J* 182 (1950) 501-508

- [49] Lowry O.H., Rosebrough A.L., Farr A.L., et al.: "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *Biochem J* 193 (1951) 265-275
- [50] Luppia D.: "Contribution of L-Carnitine in the Regulation of Metabolism of Lipids and Carbohydrates." *KCS* 5 (2004) 25-34
- [51] Insights into the topography of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase gained from the use of proteases McGarry J.D. B.N.F., Inthanousay P.P., Park D.L., Cook B.A., Foster D.W. 1992 *New developments in fatty acid oxidation* Coates P.M., Tanaka K. Wiley-Liss, Inc. New York
- [52] McGarry J.D. L.G.F., Foster D.W.: "Carnitine palmitoyltransferase 1. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by Malonyl-CoA." *J Biol Chem* 253 (1978) 4128-4136
- [53] Biochemical, molecular biological and topographical features of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system McGarry J.D. S.A., Brown N.F., Esser V., Weis B.C., Foster D.W. *Current concepts in carnitine research*. Carter, A.L. CRC Press, Inc. Boca Raton
- [54] McGarry J.D. and Brown F.N.: "The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis." *Eur J Biochem* 244 (1997) 1-14
- [55] McGarry J.D., Mills S.E., Long C.S., et al.: "Observations on the affinity for carnitine and malonyl-CoA sensitivity of carnitine palmitoyltransferase 1 in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat." *Biochem J* 214 (1983) 21-28
- [56] McGarry J.D., Sen A., Esser V., et al.: "New insights into the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system." *Biochemie* 73 (1991) 77-84
- [57] McGary J.D. and Brown N.F.: "Reconstitution of purified, active and Malonyl-CoA-sensitive rat liver carnitine-palmitoyltransferase 1: relationship between membrane environment and Malonyl-CoA sensitivity." *Biochem J* 1 (2000) 179-187

- [58] Mcmillin J.B., Wang D., Witters L.A., et al.: "Kinetic properties of carnitine palmitoyltransferase 1 in cultured neonatal rat cardiac myocytes." *Arch Biochem Biophys* 312 (1994) 375-384
- [59] Merrill G.F., Kurth E.J., Rasmussen B.B., et al.: "Influence of malonyl-CoA and palmitate concentration on rate of palmitate oxidation in rat muscle." *J Appl Physiol* 85 (1998) 1909-1914
- [60] Merrill G.F., Kurth E.J.H.D.G. and Winder W.W.: "AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation and glucose uptake in rat muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273 (1997) E1107-E11112
- [61] Mills S.E., Foster D.W. and Mcgary J.D.: "Interaction of Malonyl-CoA and related compounds with mitochondria from different rat tissues. Relationship between ligand binding and inhibition of carnitine palmitoyltransferase 1." *Biochem J* 214 (1983) 83-91
- [62] Miyazawa S., Ozasa H., Osumi T., et al.: "Purification and properties of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase from rat liver." *J Biochem* 94 (1983) 529-542
- [63] Morgan T.E., Short F.A. and Cobb L.A.: "Effect of long-term exercise on skeletal muscle lipid composition." *Am J Physiol* 1 (1969) 82-86
- [64] Munday M.R.: "Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase." *Biochem Soc Trans* 30 (1997) 1059-1064
- [65] Murthy M.S.R. and Bieber L.L.: "Purification of the medium chain / long chain (COT/CPT) carnitine acyltransferase of rat liver microsomes." *Protein Exp Purif* 3 (1992) 75-79
- [66] Murthy M.S.R. and Pande S.V.: "Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane." *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987) 378-382

- [67] Murthy M.S.R. and Pande V.S.: "Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membrane." *Biochem J* 248 (1987) 727-732
- [68] Murthy M.S.R. and Pande V.S.: "Characterization of solubilized malonyl-CoA-sensitive carnitine palmitoyltransferase from the mitochondrial outer membrane as a protein distinct from the malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase from the mitochondrial inner membrane." *Biochem J* 258 (1990) 599-604
- [69] Murthy M.S.R. and Pande V.S.: "Malonyl-CoA-sensitive and -insensitive carnitine palmitoyltransferase activities of microsomes are due to different proteins." *J Biol Chem* 269 (1994) 18283-18286
- [70] Neumann-Schmidt S. and Zierz S.: "Carnitine Acyltransferas in normal human skeletal muscle and in muscle of patients with carnitine palmitoyltransferase deficiency." *Neurom Dis* 1 (1991) 253-260
- [71] North K.N., Hoppel C.L., De G.U., et al.: "Lethal neonatal deficiency of carnitine palmitoyltransferase II associated with dysgenesis of the brain and kidneys." *J Pediatr* (1995) 127 414-420
- [72] Nuoffer J.M., De Lonlay P., Costa C., et al.: "Familial neonatal SIDS revealing carnitine-acylcarnitine translocase deficiency." *Eur J Pediatr* 1-2 (2000) 82-85
- [73] Ogiwara H., Taube T., Nikaea J., et al.: "Ihibition of rat liver acetyl-coenzyme A carboxylase by palmitoyl-coenzyme A." *Eur J Biochem* 89 (1978) 33-41
- [74] Orngreen M.C., Olsen D.B. and Vissing J.: "Exercise tolerance in carnitine palmitoyltransferase II deficiency with IV and oral glucose." *Neurology* 59 (2002) 1046-1051
- [75] Pande S.V., Brivet M., Slama A., et al.: "Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency with severe hypoglycemia and auriculo ventricular block. Translocase assay in permeabilized fibroblasts." *J Clin Invest* 3 (1993) 1247-1252

- [76] Park S.H., Gammon S.R., Knippers J.D., et al.: "Phosphorylation-activity relationships between AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle." *J Appl Physiol* 92 (2002) 2475-2482
- [77] Ramsay R.: "The soluble carnitin palmitoyltransferase from bovine liver. A comparison with the enzymes from peroxisomes and from the mitochondrial inner membrane." *Biochem J* 249 (1988) 239-245
- [78] Ramsay R.: "The role of the carnitine system in peroxisomal fatty acid oxidation." *Am J Med Sci* 318 (1999) 28-35
- [79] Rasmussen B.B., Nancock C.R. and Winder W.W.: "Post-exercise recovery of skeletal muscle malonyl-CoA, acetyl-CoA carboxylase and AMP-activated protein kinase." *J Appl Physiol* 85 (1998) 1629-1634
- [80] Richards E.W., Hamm M.W., Fletcher J.E., et al.: "The binding of palmitoyl to bovine serum albumin." *Biochem Biophys Acta* 1044 (1990) 103-109
- [81] Rubink D.S. and Winder W.W.: "Effect of phosphorylation by AMP-activated protein kinase on palmitoyl-CoA inhibition of skeletal muscle acetyl-CoA Carboxylase." *J Appl Physiol* 98 (2004) 1221-1227
- [82] Saggerson E.D. and Carpenter C.A.: "Effects of fasting and Malonyl-CoA on the kinetics of carnitine palmitoyltransferase and carnitine octanoyltransferase in intact rat liver mitochondria." *FEBS Lett.* 132 (1981) 166-168
- [83] Schaefer J., Jackson S., Taroni F., et al.: "Characterisation of carnitine palmitoyltransferases in patients with a carnitine palmitoyltransferase deficiency: implications for diagnosis and therapy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62 (1997) 169-176
- [84] Scott T.T., Virella-Lopes M. and Malone M.J.: "Hypertriglyceridaemia in carnitine palmitoyltransferase deficiency: lipid profile and treatment with medium-chain triglycerides." *Muscle Nerve* (1991) 676-677

- [85] Sigauke E., Rakheja D., Kitson K., et al.: "Carnitin palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical and molecular review." *Lab Invest* 83 (2003) 1543-1556
- [86] Singh H., Beckman K. and Poulus A.: "Evidence of two catalytically active carnitine medium/long chain acyltransferases in rat liver peroxisomes." *J Lipid Res* 37 (1996) 2616-2626
- [87] Solberg H.E.: "Acyl group specificity of mitochondrial pools of carnitine acyltransferases." *Biochem Biophys Acta* 360 (1974) 101-112
- [88] Taggart R.T., Smail D., Apolito C., et al.: "Novel mutations associated with carnitine palmitoyltransferase II deficiency." *Hum Mutat* 13 (1999) 210-220
- [89] Taroni F., Verderio E., Dworzak F., et al.: "Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients." *Nature genetics* 4 (1993) 314-320
- [90] Thampy K.G.: "Formation of malonyl coenzyme A in rat heart." *J Biol Chem* 264 (1989) 17631-17664
- [91] Trumble G.E., Smith M.A. and Winder W.W.: "Purification and characterization of rat skeletal muscle acetyl-CoA Carboxylase." *Eur J Biochem* 231 (1995) 192-198
- [92] Vavvas D., Apazidis A., Saha A.K., et al.: "Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'AMP-activated protein kinase in skeletal muscle." *J Biol Chem* 272 (1997) 13256-13261
- [93] Vladutiu G.D., Quackenbush E.J., Hainline B.E., et al.: "Lethal neonatal and severe infantile forms of carnitine palmitoyltransferase II deficiency associated with compound heterozygosity for different protein truncation mutations." *J Pediatr* 141 (2002) 734-736
- [94] Vladutiu G.D., Saponara I., Conroy J.M., et al.: "Immunoquantitation of carnitine palmitoyltransferase in skeletal muscle of 31 patients." *Neuromusc Disord* 2 (1992) 249-259

- [95] Wieser T. (2004): "Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency." Gene Reviews.
- [96] Wieser T., Deschauer M., Olek K., et al.: "Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: molecular and biochemical analysis of 32 patients." *Neurology* 8 (2003) 1351-1353
- [97] Winder W.W. and Hardie D.G.: "Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270 (1996) 299-304
- [98] Winder W.W. and Holmes B.F.: "Insulin stimulation of glucose uptake fails to decrease palmitate oxidation in muscle if AMPK is activated." *J Appl Physiol* 89 (2000) 2430-2437
- [99] Winder W.W., Wilson H.A., Hardie D.G., et al.: "Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A." *J Appl Physiol* 82 (1997) 219-225
- [100] Woeltje K.F., Esser V., Weis B.C., et al.: "Inter-tissue and inter-species characteristics of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system." *J Biol Chem* 265 (1990) 10714-10719
- [101] Woldeiorgis G., Shi J., Zhu H., et al.: "Functional characterization of mammalian mitochondrial carnitine-palmitoyltransferase I and II expressed in the yeast *Pichia pastoris*." *Journ. of Nutri.* 130 (2000) 310-314
- [102] Zammit V.A.: "Carnitine acyltransferase in the physiological setting." *Biochem Soc Trans* 14 (1986) 676-679
- [103] Zammit V.A.: "Role of Insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts." *Biochem J* 314 (1996) 1-14

- [104] Zammit V.A., Cortopline C.G. and Gray S.R.: "Changes in the ability of Malonyl-CoA to inhibit carnitine palmitoyltransferase 1 activity and to bind to rat liver mitochondria during incubation in vivo: differences in binding at 0°C and 37°C with a fixed concentration of Malonyl-CoA." *J Biochem* 222 (1984) 335-342
- [105] Zhu H., Shi J., De V.Y., et al.: "Functional studies of yeast expressed human heart muscle carnitin palmitoyltransferase I." *Arch. Biochem. Biophys.* 347 (1997) 53-61
- [106] Zierz S. and Engel A.G.: "Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle." *Eur J Biochem* 149 (1985) 207-214
- [107] Zierz S., Engel A.G. and Olek K.: "The Ser113Leu mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in patients with muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency." *Muscle Nerve* 17 (1994) 129

8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|------------------------------|------------------------------|
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CoA | CoenzymA |
| cpm | counts pro Minute |
| CPT | Carnitin Palmityltransferase |
| COT | Carnitin Oktanyltransferase |
| CAT | Carnitin Acyltransferase |
| FG | Feuchtgewicht |
| NCP | nicht-kollagen-Protein |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Ammoniumsulfat |
| K_m | Michaelis-Menten-Konstante |
| I_{50} | Hemmkonzentration |
| RPM | Umdrehungen pro Minute |
| SD | Standardabweichung |

9. Thesen

1. Durch Inkubation des nativen Muskelhomogenates mit dem milden Detergenz Tween 20 und anschließender Ultrazentrifugation bei etwa 183000g ist eine Separation in eine Malonyl-CoA sensitive (Sediment) und eine Malonyl-CoA insensitive (Überstand) Fraktion möglich.
2. In der Untersuchung der, in der Sediment- (CPT 1) und Überstandfraktion (CPT 2) maximal erreichbaren Umsatzgeschwindigkeiten (V_{max}), zeigen sich ausgehend von den höchsten Geschwindigkeiten für die mittellangkettigen Acyl-CoA Ester abnehmende Werte hin zu den langkettigen Fettsäuren.
3. Die zum Erreichen dieser beobachteten maximalen Umsatzgeschwindigkeiten erforderlichen Substratkonzentrationen liegen über den physiologisch verfügbaren Substratkonzentrationen.
4. Vor allem für langkettige Substrate weisen die CPT 1 und 2 niedrige K_m -Werte auf, so dass unter physiologischen Bedingungen besonders mit diesen Fettsäuren hohe Umsatzraten erzielt werden könnten.
Zusätzlich besteht in der Überstandfraktion eine besonders hohe Affinität zu der C-12 Fettsäure Lauryl-CoA.
5. Im Vergleich zu den mittellangkettigen Substraten, sind besonders die langkettigen Fettsäure-CoA Ester Palmityl- und Stearyl-CoA in der Lage, die Aktivitäten der untersuchten Enzyme schon in niedrigen Konzentrationen zu hemmen.
6. In beiden Fraktionen werden mit mittellangkettigen Fettsäure-CoA Estern höhere katalytische Effizienzen als mit langkettigen Fettsäuren erreicht. Besonders hohe Werte für E_{kat} werden in der Überstandfraktion (CPT 2) für die Substrate Oktanyl- und Lauryl-CoA erreicht.
7. Im ungetrennten Zustand hat der CPT-Enzymkomplex eine höhere maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}), eine höhere Affinität (kleinerer K_m -Wert) zum Substrat und schließlich eine größere katalytische Effizienz (E_{kat}) als die jeweils getrennten Entitäten.

8. Die C-12 Fettsäure Lauryl-CoA stellt nicht das geeignetste Substrat, im Sinne größter enzymatischer Umsatzraten (V_{\max}), für beide CPT-Enzyme dar.

9. Möglicherweise profitieren symptomatische Patienten mit einem Defekt im CPT-System vom Einsatz mittellangkettiger Fettsäure-CoA Ester.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und/oder Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Fakultät vorgelegt.

Merseburg, Juli 2007

Lebenslauf

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| Name | Zerbaum |
| Vorname | Mario |
| Geburtsdatum | 14.12.1981 |
| Geburtsort | Wittenberg |
| Wohnhaft | Mühle 14, 06862 Serno OT Grochewitz |
| Familienstand | verheiratet |

Ausbildungsgang

| | |
|-------------|--|
| 1992 – 2000 | Goethe-Gymnasium in Rosslau / Elbe (Abschluss „sehr gut“) |
| 2001 | Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter |
| 2001 – 2003 | Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden |
| 2003 – 2007 | Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 11/2007 | Staatsexamen Medizin und Approbation als Arzt |

Merseburg, Juli 2007

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Zierz für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas. Ferner danke ich ihm für die allzeitliche Unterstützung meiner Arbeit und die konstruktiven Anregungen bei der Erstellung dieser Dissertation

Frau Dr.med. K. Traufeller möchte ich für die gewährte Hilfe bei der Bearbeitung des Dissertationsthemas danken.

Den Medizinisch Technischen Assistentinnen des neurologischen Muskellabors danke ich für die Durchführung der Proteinbestimmungen.

Schließlich gilt mein Dank meiner Frau für die hilfreichen konstruktiven Diskussionen.