

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



Carnitin-Palmityltransferase und Carnitin-Oktanyltransferase:
Substratspezifität der Carnitin-Acyltransferasen im nativen menschlichen
Skelettmuskelhomogenat und nach Trennung durch Ultrazentrifugation.

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

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

Von Franziska Zerbaum
Geboren am 14.05.1982 in Merseburg

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 13.11.2007
Datum der Verteidigung: 03.06.2008

Gutachter: Prof. Horstkorte
Prof. Reichmann

urn:nbn:de:gbv:3-000013787

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013787>]

Im menschlichen Skelettmuskel wird der Transport von Fettsäureestern zwischen den Kompartimenten und dem Zytoplasma durch verschiedene Carnitin-Acyltransferasen katalysiert. Im Mittelpunkt des Transports von langkettigen Fettsäureestern steht die Carnitin-Palmityltransferase, die auf Grund ihrer Spezifität für Palmityl-CoA diesen Namen erhielt. Des Weiteren existiert eine Carnitin-Oktanyltransferase, die den Transfer von mittellangkettigen Fettsäuren durch die Peroxisomen und Mikrosomen katalysiert. Wird die Aktivität der Acyltransferasen am menschlichen Skelettmuskel in vivo mittels Isotopen-Vorwärts-Reaktion bestimmt, so setzt sich die gemessene enzymatische Aktivität anteilig aus verschiedenen Transferaseaktivitäten zusammen.

Ziel dieser Arbeit war die Substratspezifitäten der verschiedenen Carnitin-Acyltransferasen des Skelettmuskels in vivo zu beschreiben und herauszufinden inwieweit sich die Aktivitäten der Transferasen überlappen. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen, in der diagnostischen Praxis der Bestimmung des CPT II-Mangels gegebenen, um die erhaltenen Ergebnisse in Verbesserungen der Diagnostik einfließen zu lassen. Es sollte das Substrat mit der größten Spezifität für die beiden Transferasen (CPT und COT) bestimmt werden, da nach einer Arbeit von Schaefer et al. die CPT die größte enzymatische Aktivität für Lauryl-CoA (12 C-Atome) besitzen soll [85]. Die Sensitivität der Acyltransferasen für eine Inhibition durch Malonyl-CoA sollte untersucht werden, um herauszufinden welcher Anteil der Hemmung durch die CPT I beziehungsweise durch die COT ausgemacht wird.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Substratspezifitäten der COT und der CPT für Fettsäureester mit einer Kettelänge von 8-18 Kohlenstoffatomen überlappen, sodass bei der Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität am gesamten Muskelhomogenat immer beide Enzyme gemessen werden. In allen untersuchten Fraktionen zeigten die Transferasen die größte Affinität zum Substrat Palmityl-CoA. Der Anteil der CPT an der Gesamtaktivität überwiegt den der COT für dieses Substrat bei Weitem, sodass es nicht unbedingt nötig ist, die COT vor der Bestimmung abzutrennen. Sowohl die CPT als auch die COT zeigten für das Substrat Lauryl-CoA die geringste Affinität und schlechteste katalytische Effizienz. Die CPT und die COT sind Malonyl-CoA sensitiv, wobei die CPT-Aktivität um 45% gehemmt wird, während die COT-Aktivität nur zu circa 20 % hemmbar ist. Die Ergebnisse unterstützen die bisherige Annahme, dass die CPT den Fettsäureester Palmityl-CoA spezifisch umsetzt und dieser zur Untersuchung von CPT-Defekten in Patientenmuskel das Substrat der ersten Wahl ist.

Zerbaum, Franziska: Carnitin-Palmityltransferase und Carnitin-Oktanyltransferase: Substratspezifität der Carnitin-Acyltransferasen im nativen menschlichen Skelettmuskelhomogenat und nach Trennung durch Ultrazentrifugation. Halle, Univ., Med. Fak., Dissertation, 72 Seiten, 2007.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Aufnahme und Aktivierung der Fettsäuren	1
1.2 Familie der Carnitin-Acyltransferasen	3
1.3 Defekte im Carnitin-Palmityltransferasesystem	4
1.3.1 Störungen der Carnitin-Palmityltransferase I	5
1.3.2 Defekte der Carnitin-Palmityltransferase II	5
1.3.2.1 Neonataler CPT II-Mangel	5
1.3.2.2 Infantiler Carnitin Palmityltransferase II-Mangel (hepatokardiomuskulärer Typ)	6
1.3.2.3 Benigner myopathischer Typ des CPT II-Mangels	6
1.3.3 Defekt der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT-Defekte)	7
1.4 Funktion und Regulation der Carnitin-Acyltransferasen	7
1.5 Struktur der Carnitin-Acyltransferasen	9
1.5.1 CPT I	9
1.5.2 CPT II	15
1.5.3 COT	15
2. Themenstellung	18
3. Material und Methoden	20
3.1 Reagenzien	20
3.2 Geräte	20
3.3 Muskelbiopsien	20
3.4 Aufarbeitung der Muskelbiopsien	21
3.5 Messung der Enzymaktivität	21
3.6 Herstellung der Lösungen	22
3.7 Testansatz	23
3.8 Radioaktivität der Carnitinlösung	23
3.9 Durchführung	23
3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration	26
3.11 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse	27
3.12 Kinetik der Carnitin-Acyltransferasen für die verschiedenen Acyl-CoA-Ester im Gesamthomogenat, Sediment und Überstand	27
3.12.1 Oktanyl-CoenzymA	27
3.12.2 Dekanyl-CoenzymA	28

3.12.3	Lauryl-CoenzymA	28
3.12.4	Myristyl-CoenzymA	29
3.12.5	Palmityl-CoenzymA	29
3.12.6	Stearyl-CoenzymA	29
3.13	Hemmbarkeit durch Malonyl-CoenzymA	30
3.14	Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante	30
3.15	Berechnung der Hemmkonzentration I_{50}	30
3.16	Berechnung der katalytischen Effizienz des Substratumsatzes	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Oktanyl-CoenzymA	32
4.2	Dekanyl-CoenzymA	33
4.3	Lauryl-CoenzymA	34
4.4	Myristyl-CoenzymA	35
4.5	Palmityl-CoenzymA	36
4.6	Stearyl-CoenzymA	37
4.7	Hemmbarkeit durch Malonyl-CoenzymA	38
4.7.1	Lauryl-CoenzymA	38
4.7.2	Palmityl-CoenzymA	39
4.8	Michaelis-Menten-Konstante K	40
4.9	Hemmkonzentration I_{50}	40
4.10	Maximalen Umsatzgeschwindigkeit	40
4.11	Katalytischen Effizienz des Substratumsatzes	41
5.	Diskussion	42
5.1	Michaelis-Menten-Konstanten	42
5.2	Hemmkonzentration I_{50}	44
5.3	Maximale Umsatzgeschwindigkeiten	46
5.4	Katalytische Effizienzen	47
5.5	Hemmung der Carnitin-Acyltransferasen durch Malonyl-CoenzymA	50
5.6	Zusammenfassende Gegenüberstellung von Gesamthomogenat, Sediment und Überstand	52
6.	Zusammenfassung	56

7.	Literaturverzeichnis	57
8.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	71
9.	Thesen	72

1. Einleitung

Zur Aufrechterhaltung der Versorgung des Organismus mit Energie spielt die Energiegewinnung aus Fettsäuren eine wichtige Rolle. Insbesondere bei körperlicher Aktivität, bei Krankheit, Hunger oder Stress wird die Verstoffwechslung von Fettsäuren im menschlichen Skelettmuskel gesteigert. Speziell die Skelett- und Herzmuskulatur, aber auch die Leber sind dafür mit verschiedenen Enzymen ausgestattet, mit deren Hilfe die Energie der Fettsäureester optimal genutzt werden kann.

1. 1 Aufnahme und Aktivierung der Fettsäuren

Durch Lipolyse oder Aufnahme aus dem Extrazellularraum gelangen die Fettsäuren ins Zytosol, wo sie mit Hilfe einer Acyl-CoA-Synthetase verestert werden. Die Aufnahme der, meist an Albumin gebundenen Fettsäuren, aus dem Plasma erfolgt entweder mittels gewebespezifischen FABP (fatty acid transport/ binding proteins) oder durch Diffusion [39;60]. Von den FABP gibt es drei Unterformen [34]: FABP der Plasmamembran [94;95], FAT (fatty acid translocase) [40] und FATP (Fettsäure-Transport-Proteine) [93].

Die Aktivierung der Fettsäuren zu einem Acyl-CoA-Ester erfolgt durch die Acyl-CoA-Synthetase, welche in der äußeren Mitochondrienmembran [76] (siehe *Abb.1*), in Peroxisomen [89] und im Endoplasmatischen Retikulum vorhanden ist [55]. Es existieren verschiedene Isoformen der Acyl-CoA-Synthetase, die sich nach ihrer subzellulären Lokalisation, der Gewebeexpression und der Spezifität für verschiedene Fettsäuren unterscheiden [35;36;51;79;100;103;111]. Ebenso zeigen verschiedene Mitglieder der FATP-Familie eine Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität [18;41]. Coleman et al. vermuten eine weitere Acyl-CoA-Synthetase, die mit der Mitochondrienmembran assoziiert ist und für eine direkte Einschleusung der Acyl-CoA-Ester in die mitochondriale β -Oxidation verantwortlich sein könnte [43;54;56;73]. Dies könnte durch die Tatsache bestätigt werden, dass die Aktivität dieser Synthetase zwischen der inneren und der äußeren Mitochondrienmembran zusammen mit der CPT I und der CPT II lokalisiert ist [51;79]. Hoppel et al. vermuten einen FOAT (fat oxidation-activation transport) Komplex, der mit beiden mitochondrialen Membranen assoziiert ist und eine weitere Alternative für die Passage der Acyl-CoA-Ester durch die Mitochondrienmembran darstellt. [53] Nach einem Modell von Campbell et al. übernimmt die FAT langkettige Fettsäuren aus dem Zytosol von Fettsäure-bindenden Proteinen und gibt sie an die Acyl-CoA-Synthetase weiter [14]. Nach der Aktivierung erfolgt dann der Transport durch die Mitochondrienmembran mit Hilfe der CPT I, der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase und der CPT II (siehe *Abb.1*).

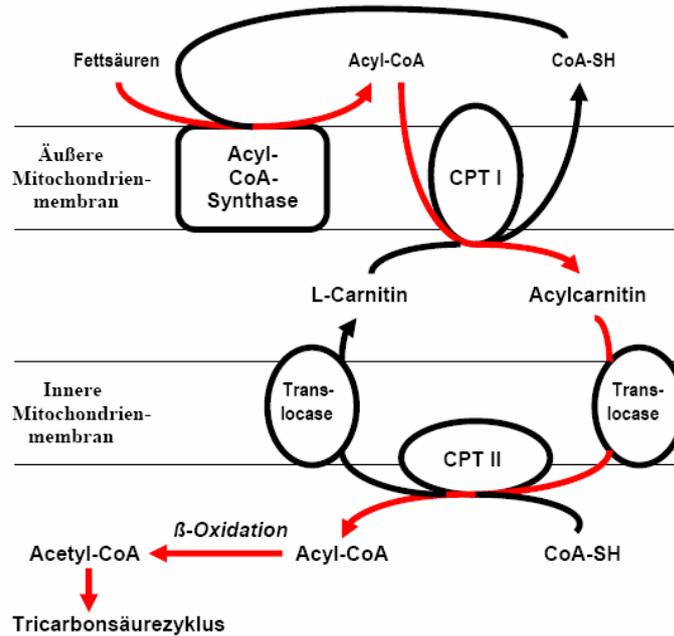


Abb.1: Schematische Darstellung des Transports von Fettsäuren über die mitochondrialen Membranen aus dem Zytoplasma in die Mitochondrienmatrix und deren anschließende metabolische Verwertung im Rahmen von β -Oxidation und Tricarbonsäurezyklus (CoA-SH: freies CoenzymA) [59].

Die Regulation der CPT I durch Malonyl-CoA, dem ersten Zwischenprodukt der Lipogenese, ist von vorrangiger Bedeutung für die Richtung des Energieflusses. Sowohl die genetische Regulation der verschlüsselnden DNA, als auch die biochemischen Eigenschaften lassen eine zentrale Rolle dieses Enzyms im Energiestoffwechsel vermuten. Im Gegensatz dazu scheint der Einfluss der CPT II eher nebensächlich zu sein. Allerdings kann die Veränderung in der Aufnahme der Fettsäuren bei gesteigertem Energiebedarf durch die CPT I allein nicht vollständig begründet werden. So zum Beispiel erklärt die Regulation der CPT I durch Malonyl-CoA nicht die Zunahme der β -Oxidation bei leichterer bis mittlerer körperlicher Anstrengung [23;77]. Auch die Abnahme der β -Oxidation bei schwerster körperlicher Tätigkeit kann nicht allein durch die Malonyl-CoA modulierte CPT I-Aktivität erklärt werden [78]. Bei der Hemmung der Fettsäure-Translokase durch den spezifischen Hemmstoff SSO (sulfo-N-succimidyl oleate) [58;99] kam es zur Abnahme der Aufnahme und Oxidation von Palmityl-CoA, während die Oxidation von Oktanyl-CoA unbeeinflusst blieb [78]. Dies zeigt, dass die FAT einen Teil der langkettigen Fettsäuren, eventuell in Verbindung mit der CPT I durch die Mitochondrienmembran schleust [14]. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Aktivierung der Fettsäuren einen regulativen Einfluss auf die β -Oxidation hat. Diese

potentielle Kontrolle erfolgt durch die Bereitstellung der Substrate und den Abtransport der Produkte. So beeinflusst das Vorhandensein von CoASH die Aktivität der Synthetase [80] und auch ein Mangel an ATP hat einen negativen Effekt auf die Enzymaktivität und den Fluss der β -Oxidation [80]. Die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase hat, wie neue Studien zeigen, ebenfalls einen Einfluss auf den Umsatz der β -Oxidation. Acylcarnitin hemmt die Aktivität der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase und hat somit ebenfalls modulierende Eigenschaften [27].

1.2 Familie der Carnitin-Acyltransferasen

Die Carnitin-Palmityltransferase, die Carnitin-Oktanyltransferase sowie die Carnitin-Acetyltransferase gehören zur Familie der Acylcarnitin-Transferasen, die im Fettstoffwechsel bei der β -Oxidation eine Schlüsselfunktion einnehmen. Von der CPT kennt man zwei Isoformen, die CPT I und die CPT II, welche auf verschiedenen Genen verschlüsselt sind [28;113]. Von der CPT I gibt es drei weitere Isoformen, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert werden und in ihrer Regulation abweichende Eigenschaften zeigen. So wird die Leberform der CPT I (L-CPT I) in Leber, Niere, Pankreas, Intestinaltrakt und im Gehirn, die Muskelform (M-CPT I) in Muskelgewebe, Herzmuskel, Hoden und braunem Fettgewebe synthetisiert [11]. Auch eine Isoform, die für das Gehirn spezifisch ist, die CPT I-c wird exprimiert [82]. Die L-CPT I besteht aus 773, die M-CPT I aus 772 Aminosäuren und auf der Ebene der Aminosäuresequenz sind sie in 63 Prozent identisch [113]. Des Weiteren könnte das m-RNA-Transskript der M-CPT I auf verschiedene Weisen gespliced werden, sodass weitere Unterformen der M-CPT I exprimiert würden [114-116]. Die CPT II befindet sich in der mitochondrialen Matrix und ist mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert [110]. Von ihr existieren keine gewebespezifischen Isoformen.

Tab.1: Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten in den verschiedenen Kompartimenten

Kompartiment	Name	Substrat (Kettenlänge)	Malonyl-CoA sensitiv	Membran- gebunden	Quellen
Mitochondrium	CPT I		+	+	[110]
	CPT II		-	+	[110]
		C16-C18			
	COT	C6-C10	+	-	[29]
	CAT	C4-C8	?	-	[4;117]
Peroxisomen	COT	C6-C10	+	+	[8]
	COT/AT	C16	-	-	[91]
	CAT	C4-C8	?	-	[4;117]
Mikrosomen	AT		+	+	[57]
	AT		-	-	[74;75]
		C16-C18			

Die COT, die sich hauptsächlich in den Peroxisomen befindet, zeigt für mittellangkettige Fettsäuren die größte Carnitin-Acyltransferase-Aktivität [29]. In den Peroxisomen findet die β -Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren bis zur Stufe von mittel- und kurzkettigen Fettsäuren statt. Diese werden dann durch die COT in Carnitinerester umgewandelt und letztendlich der mitochondrialen β -Oxidation zugeführt [30;83]. In den Peroxisomen existieren vermutlich zwei Fraktionen der Carnitin-Acyltransferasen, wobei die eine Malonyl-CoA-sensitiv und mit der peroxisomalen Membran assoziiert [8], die andere unempfindlich für die Hemmung durch Malonyl-CoA und im peroxisomalen Lumen lokalisiert ist [91].

Auch in den Mikrosomen findet sich eine an die Mikrosomenmembran gebundene Malonyl-CoA-sensitive Carnitin-Acyltransferase mit einer Aktivität für mittel- bis langkettige Fettsäuren. Diese wird sehr stark durch Malonyl-CoA gehemmt und bei hohen Konzentrationen an Palmitoyl-CoA kommt es zur Substrathemmung. Diese Substrathemmung ist stärker als die der CPT I (K_i : $11\mu\text{M}$), sodass es sich nicht um ein und dasselbe Enzym handeln kann [57].

Im Lumen der Mikrosomen wird ein Protein mit einer Masse von etwa 54 kDa vermutet, welches ebenfalls eine Carnitin-Acyltransferase-Aktivität besitzt, jedoch nicht durch Malonyl hemmbar ist [74;75].

Die Carnitin-Acetyltransferase gehört ebenfalls zur Familie der Carnitin-Acyltransferasen, sie katalysiert die Umesterung des Acetyl-CoA auf Acetylcarnitin. Die CAT der Peroxisomen dient zur Steuerung des Carnitin-Puffers, indem das in den Peroxisomen vorliegende Acetylcarnitin bei gesteigertem Bedarf in Carnitin umgewandelt wird und dieses der β -Oxidation in den Mitochondrien zugeführt wird [4;117].

Die bisher beschriebenen Transferaseaktivitäten wurden bei verschiedenen Spezies gefunden, inwieweit diese auch im menschlichen Skelettmuskel vorkommen, ist noch nicht erforscht.

1.3 Defekte im Carnitin-Palmitoyltransferasesystem

Störungen der Aufnahme von Fettsäuren ins Mitochondrium können die CPT I, CPT II und die Carnitin-Acetylcarnitin-Translokase betreffen. Am häufigsten finden sich Mutationen der CPT II, Defekte der CPT I wurden bisher nur an der Leberform dieses Enzyms beobachtet.

Diese insgesamt sehr seltenen Erkrankungen führen, besonders bei gesteigerter Lipolyse, zu schweren Symptomen.

1.3.1 Störungen der Carnitin-Palmityltransferase I

Eine seltene Störung des Fettsäuremetabolismus findet sich bei Mutationen der Leberform der CPT I, die zu einer verminderten Aktivität dieses Enzyms führen. Bei einer gestörten Aktivität der CPT I ist die Aufnahme der Fettsäuren ins Mitochondrium behindert, woraus klinisch und biochemisch eine Stress- bzw. Hungerintoleranz resultiert. Klinische Symptome können durch fieberhafte Infekte oder gastrointestinale Erkrankungen ausgelöst werden. Es können drei verschiedene Phänotypen unterschieden werden:

- Hepatische Enzephalopathie: Besonders bei Kindern auftretender Symptomenkomplex aus hypoketotischer Hypoglykämie, plötzliches Leberversagen und hepatische Enzephalopathie ausgelöst durch Fieber oder Hunger.
- Myopathie des Erwachsenenalters
- Akute Fettleber in der Schwangerschaft: Der Fetus ist hierbei homozygot für die L-CPT I Mutation

Durch Vermeidung längerer Nahrungskarenz und schnelle Behandlung von Hypoglykämien kann das Auftreten der Symptome vermieden werden. Bisher erfolgt die Behandlung des L-CPT I Defektes nur symptomatisch [3].

1.3.2 Defekte der Carnitin-Palmityltransferase II

Mutationen der CPT II können zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führen. Unterschieden werden drei Phänotypen: eine letale neonatale Form, eine infantile hepatokardiomuskuläre Form und eine benigne myopathische Form. Der neonatale CPT II Defekt wurde bisher bei 13 Familien beschrieben und der infantile hepatokardiomuskuläre Typ bei über 20 Familien. Die myopathische Form des CPT II Mangels ist mit mehr als 200 veröffentlichten Fällen der häufigste Phänotyp [102].

1.3.2.1 Neonataler CPT II-Mangel

Diese tödlich verlaufende neonatale Form des CPT II-Mangels ist gekennzeichnet durch eine reduzierte Aktivität (auf weniger als 10%) der CPT II in verschiedenen Organen, sowie niedrigen Carnitinkonzentrationen. Die Konzentration von langkettigen Acylcarnitinen und Lipiden ist hingegen erhöht. Symptome wie Leberversagen, hypoketotische Hypoglykämie, metabolische Azidose, Krampfanfälle, Kardiomyopathie, Herzrhythmusstörungen, Atemnot [90;105] und dysplastische Nierenfehlbildungen [90] treten innerhalb weniger Tage nach Geburt auf. Die Prognose ist infaust und endet nach Tagen bis Monaten letal [90;105].

1.3.2.2 Infantiler Carnitin Palmityltransferase II-Mangel (hepatokardiomuskulärer Typ)

Diese Form des CPT II-Defektes kann sich in klinischen Symptomen wie Leberversagen, Kardiomyopathie, hypoketotische Hypoglykämie, Myopathie des Skelettmuskels, aber auch durch Kopf- und Bauchschmerzattacken innerhalb des ersten Lebensjahres manifestieren. Kardiale Arrhythmien können während der Kindheit zum plötzlichen Versterben führen [7;105;112].

1.3.2.3 Benigner myopathischer Typ des CPT II-Mangels

Diese häufigste Form des CPT II-Defektes führt zu Attacken, die klinisch charakterisiert sind durch Muskelschmerzen, Muskelschwäche, Muskelkrämpfe, Paresen, Rhabdomyolyse und paroxysmale Myoglobinurien mit bräunlich verfärbtem Urin bis hin zum Nierenversagen durch interstitielle Nephritis und Tubulusnekrosen [50]. Auslösende Faktoren sind lang andauernde körperliche Anstrengungen, Infektionen, Kälteexposition, Medikamente oder Nahrungskarenz. Inwieweit die Individuen betroffen sind variiert stark, oft ist die Symptomatik nur mild und zwischen den Attacken sind die meisten Menschen asymptomatisch [24].

Das männliche Geschlecht scheint häufiger betroffen zu sein, allerdings leiden erkrankte Frauen seltener an Myoglobinurien, sodass die Erkrankung bei Frauen eventuell öfter unentdeckt bleibt [108]. Insgesamt wurden 60 verschiedene Mutationen der CPT II gefunden, die eine Erkrankung auslösen können [44]. Die häufigste Mutation zeigt einen Austausch der Aminosäure Serin 113 gegen Leucin (S113L) und ist bei 60-80% der Erkrankten zu finden [101]. Eine ebenfalls häufige Änderung der Aminosäuresequenz ist die Q413fs Mutation [98] (Abb.2).

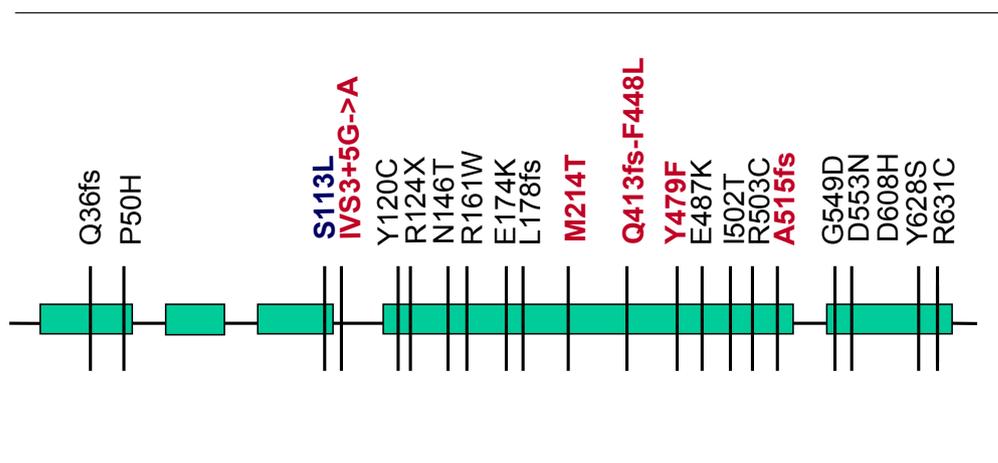


Abb.2: Mutationen des muskulären CPT II Mangels.

1.3.3 Defekt der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT-Defekte)

Diese sehr selten auftretende Störung des Fettsäuretransportes durchs Mitochondrium ist eine der schwersten und meist letal endenden Erkrankungen des Fettsäurestoffwechsels. Kurz nach der Geburt kommt es zu Krampfanfällen, Arrhythmien, Hypoglykämien und Hyperammonämien [107].

1.4 Funktion und Regulation der Carnitin-Acyltransferasen

Die verschiedenen Transferasen katalysieren die An- und Abkoppelung eines Acylesters an L-Carnitin, wobei der Acylcarnitinester mit Hilfe eines weiteren Transferproteins, der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase, durch die Mitochondrienmembran geschleust wird.

Die Umesterung der Acyl-CoA-Ester auf Acylcarnitinester folgt dem Reaktionsmechanismus einer Säure-Basen-Katalyse, bei der die Carboxylgruppe des Acyl-CoA-Esters mit der Hydroxylgruppe des Carnitins reagiert und die Aminosäure Histidin als Protonendonator bzw. -akzeptor fungiert. Diese Katalyse ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der β -Oxidation und deshalb ihre Regulation von entscheidender Bedeutung für vor- und nachgeschaltete Reaktionsschritte.

Koppelung des Carnitins an eine Acylgruppe

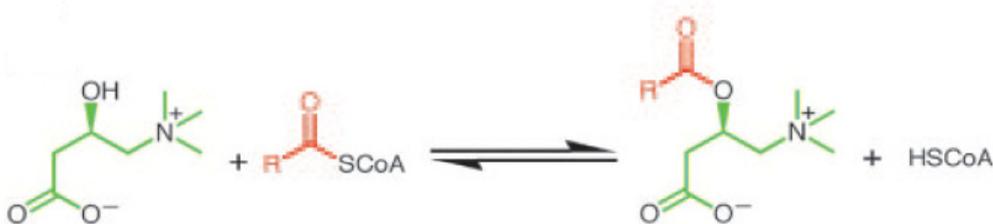


Abb.3: Dargestellt ist die Umesterung des Acyl-CoenzymA-Esters in einen Acylcarnitinester, bei der CoenzymA frei wird [48].

Der Fluss der hepatischen β -Oxidation wird durch verschiedene Effektoren reguliert, die hemmend auf die Aktivität der L-CPT I wirken. So zum Beispiel hemmt Malonyl-CoA, ein Ausgangsstoff der Fettsäurebiosynthese, die L-CPT I [65].

Um den Einfluss auf die β -Oxidation objektivieren zu können wurde der „flux control coefficient“ ermittelt [26;92]. Umsatz-limitierende Enzyme haben einen Koeffizienten von nahezu 1, umsatz-kontrollierende Enzyme zeigen einen Koeffizienten von 0,5-1. Bei Koeffizienten $<0,5$ besteht kein Einfluss auf den Umsatz.

Es konnte bei Ratten L-CPT1 ein hoher „flux control coefficient“ in Bezug auf den Umsatz

der β -Oxidation gefunden werden. Änderungen der physiologischen Bedingungen wie die Palmitylkonzentration oder der Ernährungszustand haben keinen wesentlichen Einfluss auf den „flux control coefficient“ der CPT I [92].

Die Regulation der Muskel- und Herz-CPT I wird durch körperliche Arbeit, ATP sowie durch NADH und Acetyl-CoA gewährleistet. Erstere steigern die oxidative Phosphorylierung und den Tricarbonsäure-Zyklus, NADH und Acetyl-CoA hemmen die β -Oxidation. Auch hier findet sich eine Regulation auf der Ebene der CPT I, jedoch bestehen große Unterschiede zwischen den Isoformen der CPT I.

Die M-CPT I ist wesentlich empfindlicher als die L-CPT I für eine Hemmung durch Malonyl-CoA. Der KM-Wert der M-CPT I für Carnitin ist wesentlich größer (10-15 fach) als bei der L-CPT I [61].

Die Herz-Isoform liegt mit ihren kinetischen Eigenschaften zwischen der L- und M-CPT I, da in diesem Gewebe beide Isoformen mit, sich im Verlauf der Entwicklung verändernden, Anteilen exprimiert werden [13;106].

Sowohl im Skelettmuskel, als auch im Herzmuskel finden sich enorm hohe Malonyl-CoA-Konzentrationen, sodass die Möglichkeit, dass die CPT I-Aktivität Umsatz limitierend ist, einer dennoch ablaufenden β -Oxidation kontrovers gegenüber steht. Erklärungsansätze wären eine Malonyl-CoA unempfindliche CPT I Aktivität, ein hauptsächlich intramitochondriales Vorkommen des Malonyl-CoA oder eine nicht Umsatz-limitierende CPT I im Muskel [27].

Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Verhalten der CPT I ist jedoch das Vorhandensein einer weiteren Bindungsstelle für Malonyl-CoA, die die inhibitorischen Effekte des Malonyl-CoA modifiziert und so die Veresterung der Fettsäuren auch bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen ermöglicht [66]. Langkettige Fettsäuren beeinflussen die Aktivität der CPT, indem sie die Expression der CPT I steigern. Dies geschieht wahrscheinlich über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR- α durch Fettsäuremetabolite. Weiterhin können Schilddrüsenhormone die Expression der CPT beeinflussen.

Die AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) stimuliert die CPT I und hemmt die Acetyl-CoA-Carboxylase, wodurch die Bildung von Malonyl-CoA vermindert wird. Somit aktiviert die AMPK die CPT I auf direktem und indirektem Weg [104]. Auch die Fettsäure-Translokase (FAT: fatty acid translocase / CD 36) wirkt modulierend auf den Fluss der β -Oxidation [14].

1.5 Struktur der Acylcarnitin-Transferasen

1.5.1 CPT I

Die Carnitin-Palmityltransferase I ist ein integrales Protein der äußeren Mitochondrienmembran, das durch zwei transmembranale Abschnitte, die von den ersten 130 Aminosäuren gebildet werden, verankert wird. Es ist insgesamt aus 773 Aminosäuren zusammengesetzt und zeigt sowohl mit dem N-, als auch mit dem C-Terminus zum Zytosol [33]. Von Morillas et al. (2004) wurde auf der Basis der kristallinen CAT-Struktur ein 3D-Modell der Ratten L-CPT I entwickelt. Es beinhaltet die Aminosäuren 166-772, die ersten 165 Aminosäuren konnten nicht mit erfasst werden, da diese bei der CAT nicht vorkommen. Aufgrund der ähnlichen Aminosäuresequenz zwischen CAT und CPT kann eine vermutete Sekundärstruktur erstellt werden [72].

Lokalisation und Bindung von Carnitin, CoenzymA und Palmityl

Für die Substratbindung entscheidend sind die Aminosäuren Arg655, Ser687, Thr686, His473, Asp477, Asp567 und Gly590. Die positive Ladung des Arginin 655 interagiert eventuell mit der negativen Ladung der Carboxylgruppe des Carnitins, indem sich eine Salzbrücke ausbildet. Des Weiteren findet sich in allen Carnitin-Acyltransferasen ein Ser-Thr-Ser Motiv (in der L-CPT I Ser685-Thr686-Ser687), wobei scheinbar nur die beiden letzten Aminosäuren eine Rolle spielen. Seronin 687 befindet sich in der Nähe der Hydroxylgruppe des Carnitins und bestimmt die Konformation des Enzyms während der Katalyse (Stabilisierung des Übergangszustandes) ähnlich der Funktion des entsprechenden Seronins in COT [21]. Seronin selbst wiederum wird von einem Threoninrest (Thr686) in der richtigen Konformation gehalten [72](Abb.4).

Während der Reaktion befindet sich das Palmityl-CoA in einer hydrophoben Tasche des Enzyms. Bei der Rekonstruktion des L-CPT I Modells (Aminosäuren 166-772) konnte gezeigt werden, dass sich das Substrat Palmityl so ausrichtet, dass der Palmitylrest in Richtung des hydrophoben Bereiches der Tasche zeigt, der von der α -Helix 12 und dem β -Faltblatt 14 gebildet wird (siehe Abb.5) .

Auch der Zugang zu dieser Tasche wird von einer, in L- und M-CPT I gleichen, Aminosäurenkonformation bestimmt. Es liegen sich am Eingang der Tasche die hydrophoben Reste der α -Helix 12 mit drei Glycinresten (709-711) des β -Faltblattes 14 gegenüber.

So ist es langkettigen Fettsäuren möglich in die Tasche aufgenommen zu werden. Im Gegensatz hierzu besitzt die CAT keine Glycinreste, sondern größere Aminosäuren (Val-Met-Phe), sodass die Katalyse auf kurzkettige Fettsäuren beschränkt bleibt.

Carnitin und Coenzym A umgebende Aminosäuren in der Ratten L-CPT I

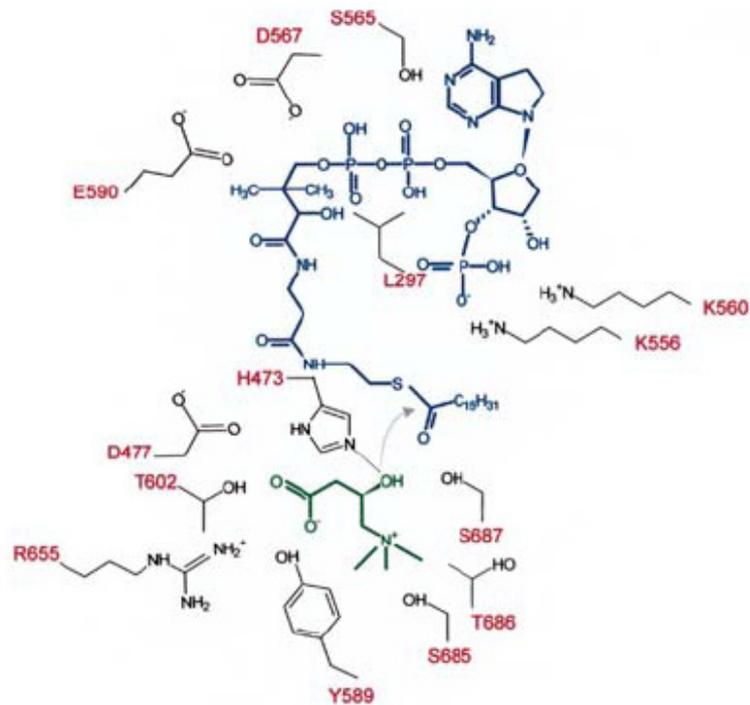


Abb.4: Dargestellt sind die Aminosäuren im Radius von 5\AA um Coenzym A und Carnitin, die wahrscheinlich an der Katalyse teilnehmen. Carnitin ist in grün und Acyl-CoA in blau gezeichnet [72].

Modell des katalytischen Zentrums der CPT I

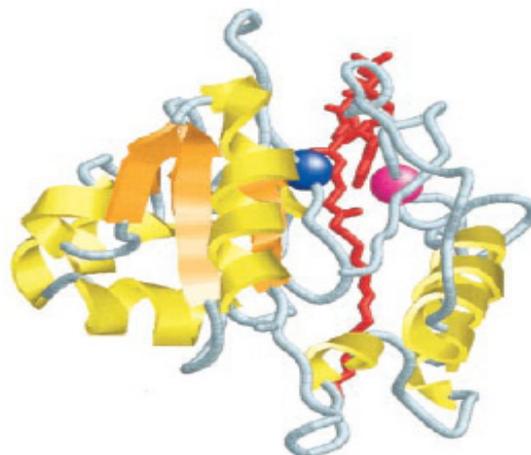


Abb.5: Abgebildet ist die Sekundärstruktur der CPT I: β -Faltblätter sind in orange, α -Helices in gelb dargestellt. In der Mitte befindet sich ein Molekül Palmitoyl-CoA, die Position der Aminosäuren His473 (blau) und Ala381 (magenta) ist ebenfalls gekennzeichnet [70]

Außerdem findet man in den Isoformen der CPT I noch eine weitere Schleife (vor dem Valinrest 706), die in der CAT auch nicht vorhanden ist.

Diese Gegebenheiten weisen darauf hin, dass bei der CPT I bevorzugt Palmityl gebunden wird und bei der CAT das wesentlich kleinere Acetyl als Substrat dient.

Katalytisch wichtige Aminosäuren

Die Säure-Basen-Katalyse wird durch die besondere Struktur der Acyltransferasen ermöglicht. Der Reaktionsmechanismus der Carnitin-Acyltransferasen ähnelt dem der Lipasen, Proteasen, Acetylcholinesterasen und anderer Gruppen übertragender Enzyme [25;86;96]. So findet man in vielen verschiedenen Hydrolasen und Transferasen die katalytische Triade der Aminosäuren Histidin, Aspartat und Seronin [25].

Der Reaktionsmechanismus ist bei den verschiedenen Acyltransferasen geringfügig unterschiedlich. Gründe hierfür könnten Länge der Kohlenstoffketten der einzelnen Acyl-CoA-Reste, die abweichende Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA und die unterschiedliche Lokalisation sein [72]. Das aktive Zentrum wird bei der CPT I von etwa 200 Aminosäuren gebildet (AS 368-567) und beinhaltet die Palmityl-CoA bindende Region, die aus 6 α -Helices und 4 β -Faltblättern gebildet wird [70]. Die Bindungsstelle des Palmityl-CoA bei der CPT I könnte sich zwischen den Aminosäureresten 381-481 befinden [22].

Besonders wichtig erscheint in der L-CPT I das Histidin 473, welches bei der Katalyse nahe dem Schwefelatom des CoenzymA A liegt [72]. Es findet sich bei allen Acylcarnitin-Transferasen und bei seiner Mutation zu Alanin erlischt die Enzymaktivität vollständig. Das His473 fungiert bei der Reaktion als Base und katalysiert die Deprotonierung der 3-Hydroxygruppe des Carnitins, nach der das His473 eine positive Ladung erhält, welche wiederum vom Asp 477 stabilisiert wird [70]. Das entstehende Oxyanion am Carnitin ermöglicht einen direkten nucleophilen Angriff an der Carboxylgruppe des Acyl-CoA-Esters [11](Abb.6).

Durch die Reaktion der aktivierten Hydroxylgruppe des Carnitins mit dem Carboxyl-Kohlenstoffatom des Acyl-CoA kann die Umesterung ohne eine Acyl-Enzym-Zwischenstufe ablaufen [21].

Des Weiteren findet sich bei allen Acyl-Carnitintransferasen, die mittel- und langkettige Fettsäuren verstoffwechseln, ein Alaninrest (Ala381 bei CPT I und Ala238 bei COT), der bei der Acetyltransferase und der Cholintransferase durch ein Glycinrest ersetzt ist.

Enzymatische Katalyse der CPT I

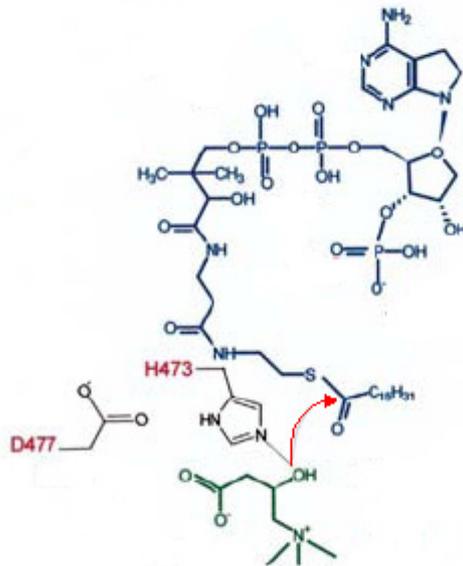


Abb.6: Deprotonierung der 3-OH-Gruppe des Carnitins und nucleophiler Angriff des entstehenden Oxyanions auf die Carboxylgruppe des Palmityl-CoA (roter Pfeil) [aus Morillas et al., geändert].

Position des Palmityls bei Interaktion mit der CPT I

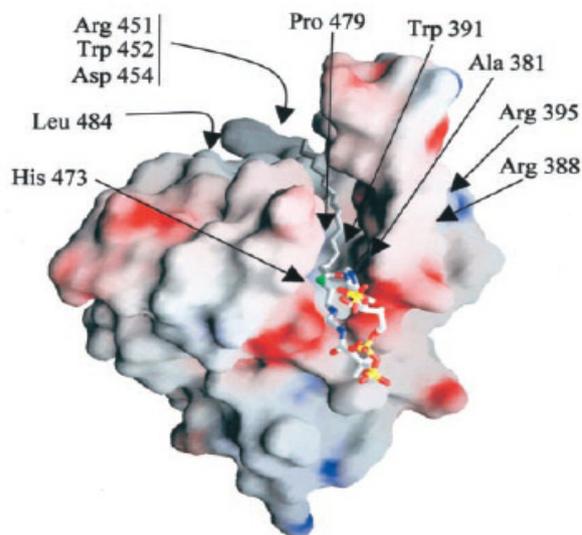


Abb.7: Dargestellt ist die schematische Struktur des aktiven Zentrums. Bei Mutation der, mit Pfeilen markierten, Aminosäuren kommt es zur Verminderung der Aktivität. Besonders hervorzuheben ist die Nähe der Aminosäuren His473 und Ala381 zum Schwefelatom des CoenzymA (grün) [70].

Obwohl dieser Alaninrest in der Aminosäuresequenz vom His473 weit entfernt liegt, ist er im Strukturmodell eng benachbart. Bei CPT- und COT-Mutanten mit der Mutation A381D (CPT I) bzw. A238D (COT) kam es zu einer veränderten Kinetik. Dabei stieg der K_m -Wert für Acyl-CoA stark an (6,8-8,4fach). Die Maximalgeschwindigkeit verringerte sich nur leicht, was auf die Bedeutung dieses Alaninrestes für die Positionierung des Substrates im katalytischen Zentrum hinweisend sein könnte. Dieser Alaninrest (Ala381) ist bei der CPT I (L- und M-Isoform), CPT II und COT konserviert und könnte auch für die Substratspezifität oder die unterschiedliche enzymatische Aktivität dieser Acyltransferasen verantwortlich sein [15;81](Abb.7).

Bindung des Malonyl-CoA

Die Sensitivität der CPT I für die Malonyl-CoA-Hemmung ist entscheidend für die Möglichkeit der Regulation des Enzyms. Die CPT II und auch die CAT zeigen diese Hemmbarkeit nicht [61], die COT hingegen ist ebenfalls für Malonyl-CoA empfindlich [69]. Es wurde gezeigt, dass Malonyl-CoA im aktiven Zentrum nicht an der gleichen Stelle wie Palmitoyl-CoA bindet, obwohl es sich um eine kompetitive Hemmung handelt [10;19;37;62;67;84]. Es werden für die Malonyl-Bindung zwei Bereiche angenommen, die mit unterschiedlicher Affinität binden [87;88]. Die Bindungsstelle niedrigerer Affinität in der Nähe des Acyl-CoA-Bindungsbereiches nimmt Einfluss auf diesen, die Hemmung ist hier allerdings auch abhängig vom Vorhandensein eines CoenzymA-Restes [1;120]. Es wird angenommen, dass an diesem Bereich auch Acyl-CoA-Ester binden können [66]. Jedoch ist diese Bindungsstelle nicht identisch mit dem katalytischen Zentrum, da bei Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums zwar die Aktivität verringert wurde, die Malonylsensitivität aber unbeeinflusst blieb [71].

Der Bereich mit hoher Affinität für Malonyl liegt getrennt von der Acyl-CoA-Bindungsstelle nahe des N-terminalen Endes und die Hemmung durch Bindung an diesen Bereich ist unabhängig von dem CoA-Rest [5;6;20;52;119]. Es wurde lange vermutet, dass die Bindung mit Malonyl-CoA nur nahe dem -COOH Ende statt findet [46;97], jedoch beeinflusst auch das NH₂- Ende die Malonylsensitivität [87;97]. Bei Interaktion des Malonyl-CoA mit der N-terminalen Bindungsstelle (mit höherer Affinität zum Malonyl-CoA) kommt es zur allosterischen Hemmung [6;20;52]. Malonyl-CoA agiert hierbei negativ modifizierend, indem die Acyl-CoA-Sättigungskurve zu höheren Konzentrationen verschoben wird. Außerdem ist die Malonyl-CoA-Sensitivität abhängig von der Konzentration des Carnitins. So konnte gezeigt werden, dass die CPT I bei hohen Carnitin-Konzentrationen stärker durch Malonyl-CoA gehemmt wurde [32]. Auch die mikrosomale Carnitin-Acyltransferase ist durch Carnitin

hemmbar, dies tritt allerdings schon bei physiologischen Konzentrationen ein, bei denen die mitochondriale CPT I noch nicht gehemmt wird. So könnte man vermuten, dass an dieser Stelle die Verteilung der Acyl-CoA-Ester zwischen den Kompartimenten stattfindet [2].

Bei Abtrennung der Aminosäuren 19-40 stieg die Hemmbarkeit durch Malonyl an, sodass davon ausgegangen werden kann, dass dieser erste Terminus (noch vor der ersten Transmembranregion) für die Modulation der Malonylhemmung entscheidend ist [46;45].

Morillas et al. (2002) definierten ein Modell für die Bindungsstelle des Malonyl-CoA an COT und CPT I, die für die Hemmung eventuell verantwortlich ist. In der CPT I gehören die Aminosäuren von Ala478 bis His483 zu diesem Bereich, der sich nahe dem katalytischen Zentrum befindet.

Das Vorhandensein des Malonyls in dieser Tasche führt zu einer Interaktion mit der CPT I, sodass das Substrat Palmitoyl-CoA nicht mehr richtig gebunden werden kann. Dem Modell nach besteht eine Konkurrenz um denselben Abschnitt am Enzym, jedoch ausgehend von zwei verschiedenen Bindungsbereichen [71](Abb.8).

Strukturmodell der CPT I

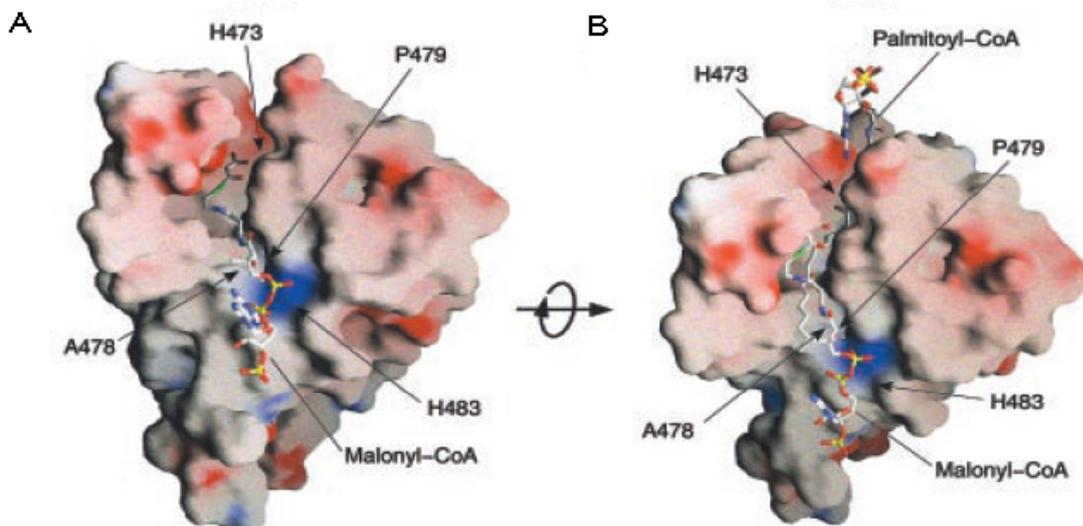


Abb.8: Dargestellt ist ein dreidimensionales Modell des katalytischen Tunnels der CPT I. In Abbildung A bindet ein Molekül Malonyl-CoA; in B ist die Interaktion zwischen Malonyl-CoA und Palmitoyl-CoA dargestellt [71].

Für die Hemmbarkeit der CPT I scheinen die Aminosäuren His277 und Ala478 eine Bedeutung zu haben. Ein entsprechender Alaninrest findet sich bei allen Carnitin-Acyltransferasen, die durch Malonyl gehemmt werden können. Bei den Malonyl unempfindlichen Acyltransferasen findet sich dieses Alanin nicht. Ala478 ist eventuell für die Bindung des Malonyl entscheidend, nicht jedoch für die katalytische Aktivität, da bei

Mutation dieses Alaninrestes sich diese nicht verändert. His277 ist wahrscheinlich für die allosterische Hemmung durch Malonyl wichtig [71].

Einen weiteren Einfluss auf die Hemmbarkeit des Enzyms hat seine Konformation, die wiederum abhängig von der Konzentration des Enzyms ist. So findet sich in der äußeren Mitochondrienmembran eine geringe CPT I-Konzentration und an der Kontaktstelle im intermembranalen Raum eine hohe CPT I-Konzentration.

Die Hemmbarkeit der CPT I ist stark beeinflussbar durch physiologische Gegebenheiten, die wiederum mit der Zusammensetzung der Membranen korrelieren [118]. Durch hohe Enzymkonzentrationen könnte es zu Änderungen des zytosolischen, katalytisch aktiven -COOH Endes kommen, wodurch die Histidinreste für Malonyl erschwert zugänglich würden [71].

1.5.2 CPT II

CPT II besteht aus insgesamt 658 Aminosäuren [31;63] und hat keine transmembranären Domänen [109], allerdings gibt es Hinweise auf Domänen, die mit der inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran in Kontakt treten [109]. Somit ist sie mit der inneren Mitochondrienmembran nur assoziiert [64;110] und auch nicht durch Malonyl-CoA hemmbar [28]. Auf Ebene der mRNA bestehen große Unterschiede zur CPT I, so zum Beispiel besitzt die mRNA der CPT II eine Zielsequenz, die das Enzym zur Aufnahme ins Mitochondrium adressiert. Diese Zielsequenz, mit der die CPT II eine Größe von 74,119 kDa hätte, geht beim Import ins Mitochondrium verloren. Das fertige Enzym hat dann eine molare Masse von nur noch circa 70 kDa [109]. Die Aminosäuresequenz hingegen ist in vielen Bereichen bei der CPT I, CPT II und COT konserviert [28]. Man nimmt an, dass in diesen Bereichen die Bindungsstellen für Carnitin, Acylcarnitin, Acyl-CoA und CoenzymA liegen [109]. Die 25 Aminosäuren am NH₂-terminalen Ende verschieben sich während der Translokation zur inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran [12;31].

1.5.3 COT

Von Jogl et al. wurde aus kristalliner Maus-COT ein dreidimensionales Modell entwickelt. Die COT besteht aus insgesamt 612 Aminosäuren, die in der Sekundärstruktur insgesamt 20 α -Helices und 16 β -Faltblätter bilden. Es kann eine C- und eine N-Domäne unterschieden werden, wobei die Aminosäuren 102-393 zur N-Domäne und die Aminosäuren 394-612 sowie 11-101 zur C-Domäne gehören. Beide Domänen teilen sich das gleiche Grundgerüst, bestehend aus einem zentralen β -Faltblatt und verschiedenen seitlich gelegenen α -Helices [48]. Das aktive Zentrum liegt zwischen beiden Domänen und in der Nähe des Zentrums

befindet sich ein Histidinrest (His327), der dem der CPT I entspricht. Das katalytische Zentrum ist durch zwei Tunnel, die sich in der Mitte treffen, von gegenüberliegenden Seiten des Enzyms zugänglich (*Abb.9*). In einem der Tunnel kommt Carnitin, im anderen Coenzym A zu liegen. Ein dritter Tunnel erstreckt sich zum Zentrum der N-Domäne, in diesem findet die Bindung der mittelkettigen Acylester statt. Die Anwesenheit einer Acylgruppe behindert dabei nicht die Bindung des Carnitins, da die Position des Carnitins, mit oder ohne Acylgruppe, die gleiche ist.

Katalytisches Zentrum der COT

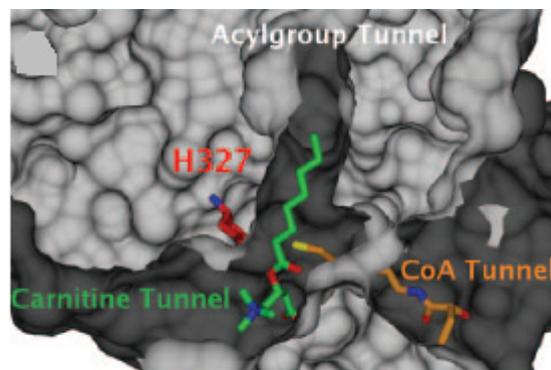


Abb.9: Abgebildet ist ein dreidimensionales Modell der drei Substrattunnel der COT (Maus), im Modell ist Oktanylecarnitin gebunden [48].

Die Bindung des Carnitins erfolgt über Wasserstoffbrücken und Ionenpaarbindungen, dabei interagiert ein extra Wassermolekül mit der Carboxylgruppe des Carnitins. Die Trimethylammoniumgruppe wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit umgebenden Aminosäuren gebunden und die positive Ladung dieser Gruppe stabilisiert eventuell den Übergangszustand des Enzyms während der Katalyse. Auch die Carboxylgruppe des Oktanylecarnitins wird mit Hilfe eines zusätzlichen Wassermoleküls gebunden, indem sich eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hauptkette des Alanin 332 ausbildet. Dieses Wassermolekül könnte die Hydrolyse der gebundenen Acylecarnitine über einen nucleophilen Angriff starten [48]. Die Oktanylecarnitine werden in einem Bereich des Enzyms gebunden, der mit hydrophoben Aminosäureresten ausgekleidet ist, sodass eine zylindrische, enge Tasche entsteht, in die die Acylgruppe gut hineinpasst. Diese Tasche ist im Oktanylecarnitin freien Zustand schon vorgeformt. Auch in der COT findet sich das konservierte Ser-Thr-Ser-Motiv, welches wahrscheinlich das entstehende Oxyanion des Carnitins im Übergangszustand stabilisiert [21;47].

Substratspezifität

Für die Substratspezifität der COT ergaben Studien, dass die Konformation des Methionin 335 und des Cystein 323 eine Rolle spielen. Es gibt zwei Möglichkeiten der Ausrichtung der Seitenketten, wobei eine Konformation des Met335 mit relativer Nähe zur Kohlenwasserstoffkette des Oktanyl einhergeht. In der anderen Konformation ist die Seitenkette des Methionins weiter entfernt, sodass eine größere Tasche für die Acylgruppenbindung entsteht (Abb.10). Bei der letzteren Variante ergibt sich also die Möglichkeit der Bindung von längererkettigen Acylestern. Bei der CPT ist dieser Methioninrest durch die kleinere Aminosäure Valin ersetzt, sodass diese Vermutung bestärkt wird. Met335 könnte also den Zugang zum aktiven Zentrum kontrollieren [48].

Bindungsbereich der Acylgruppe

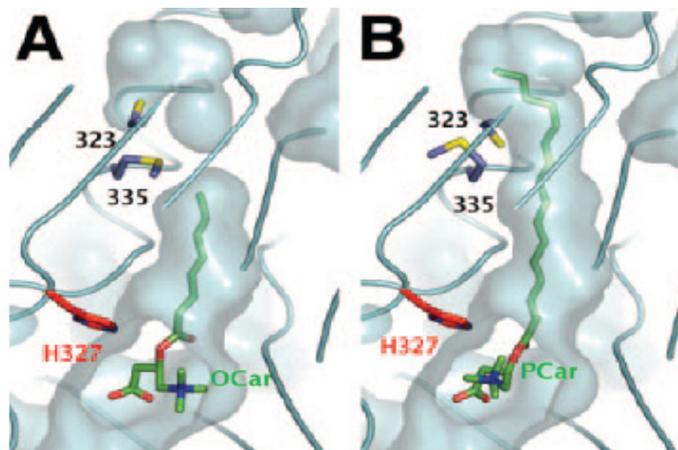


Abb.10: Dargestellt ist die Tasche für die Bindung der Acylgruppe des Oktanoylcarnitins (A) und die erweiterte Tasche für Palmitoylcarnitins (B). Das katalytisch aktive His327 ist rot markiert, das jeweilige Substrat ist grün gezeichnet [48].

Hemmung durch Malonyl-CoA

Auch bei der COT existieren zwei separate Bindungsbereiche für Malonyl-CoA [1]. Eine davon ist nahe dem katalytischen Zentrum gelegen und kompetitiert mit dem Substrat um die Bindung ähnlich der kompetitiven Hemmung durch andere Acyl-CoA-Ester. Eine weitere Bindungsstelle höherer Affinität führt bei Bindung des Malonyl-CoAs zu allosterischen Effekten. Mit dieser Stelle können andere Acyl-CoA-Ester nicht interagieren. Für die Bindung des Malonyls werden die Histidinreste 131 und 340 verantwortlich gemacht, da bei Mutation eines dieser Histidinreste keine Inhibition mehr stattfindet. Morillas et al. fanden heraus, dass dieser Bereich der Malonyl-Bindung an der COT mit dem der CPT I identisch ist [69].

2. Themenstellung

Die Messung der Enzymaktivität des Carnitin-Palmitoyltransferasesystems ist in der neurologischen Diagnostik des CPT II-Mangels von entscheidender Bedeutung, da die myopathologische Untersuchung von Skelettmuskelbiopsien nicht aussagekräftig ist. Bisherige Enzymtest wurden bevorzugt mit der, in der Nahrung quantitativ am häufigsten vertretenen Fettsäure, Palmitoyl durchgeführt, da man diese als spezifisches Substrat der CPT vermutete. Jedoch wurde in der Arbeit von Schäfer et al. (1997) diese Annahme in Frage gestellt. Schaefer et al. untersuchten die Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase I und II in Fibroblasten und peripheren Blutzellen und fanden eine maximale enzymatische Aktivität für das Substrat Lauryl-CoenzymA (Fettsäureester mit 12 Kohlenstoffatomen). Inwieweit dieses Ergebnis auch auf den Skelettmuskel übertragbar ist, ist noch offen [85].

Wird die Enzymaktivität der Carnitin-Acyltransferasen im menschlichen Skelettmuskel gemessen, so muss man davon ausgehen, dass neben der CPT noch andere Transferasen, wie zum Beispiel die Carnitin-Oktanyltransferase, die den Transfer von mittellangkettigen Fettsäuren durch die Peroxisomen und Mikrosomen katalysiert, vorhanden sind.

Ziel dieser Arbeit war, ein Profil der Substratspezifitäten der Carnitin-Acyltransferasen des menschlichen Skelettmuskels zu erstellen. Dies sollte unter den gleichen Versuchsbedingungen wie auch bei der Diagnostik des CPT II-Mangels erfolgen. Durch Ultrazentrifugation wurden die löslichen Transferasen, so auch COT, abgetrennt und gesondert auf ihre Substratspezifität untersucht.

Außerdem sollte die Sensitivität der Acyltransferasen für eine Inhibition durch Malonyl-CoA untersucht werden, um herauszufinden welcher Anteil der Hemmbarkeit der Transferasen im Skelettmuskel der CPT I beziehungsweise der COT zuzuschreiben ist.

Insgesamt liegt der Schwerpunkt der Arbeit bei folgenden Fragenstellungen:

1. Überschneidet sich die Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase mit der der Carnitin-Oktanyltransferase?
2. Wie verhält sich die Substratspezifität der Acyltransferasen im gesamten Homogenat?

3. Welches Substrat ist am ehesten geeignet, um die Enzymaktivität der Carnitin-Acyltransferasen oder speziell die Aktivität der Carnitin-Palmityltransferase sicher zu messen?
4. Ist die Acyltransferase-Aktivität für Lauryl-CoA größer als für die anderen Substrate?
5. Wie verhalten sich K_m -Werte, Maximalgeschwindigkeiten, die katalytische Effizienz sowie die Malonyl-CoA-Sensitivität der CPT und COT?

3. Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Es wurde Tris-HCL-Puffer (pH 7,6), Dithiotreitol, L-Carnitin sowie die Fettsäureester Oktanoyl Coenzym A Lithium Salz Monohydrat, Decanoyl Coenzym A Monohydrat, Lauroyl Coenzym A Lithium Salz, Myristoyl Coenzym A Lithium Salz, Palmitoyl Coenzym A Lithium Salz, Stearoyl Lithium Salz Coenzym A und Malonyl Coenzym A von der Firma SIGMA bestellt. Weiterhin von der Firma MERCK bovines Serumalbumin (Albuminfraktion 5), Isobutanol und Ammoniumsulfat. Für die Herstellung von Chappel-Perry Medium A wurden Kaliumchlorid von der Firma SIGMA und Magnesiumchlorid-Hexahydrat von der Firma MERCK sowie EDTA eingesetzt. L-[mehtyl-14C]-Carnitin wurde von der Firma NEN Life bezogen und Ready Safe von der Firma BECKMANN wurde als Szintillationslösung verwandt.

3.2 Geräte

Die Muskelbiopsien wurden auf einer Laborwaage von der Firma SARTORIUS abgewogen und in einem 7 ml Glas/Glas-Handhomogenisator (Typ Elvehjem) homogenisiert. Die Trennung in Sediment und Überstand erfolgte mittels einer Ultrazentrifuge (L7-Serie) von BECKMANN mit einem feststehenden Rotor. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler der Serie LS 6500, ebenfalls von der Firma BECKMANN. Von der Firma HETTICH wurde für die Aufbereitung der Proben eine Tischzentrifuge genutzt.

3.3 Muskelbiopsien

Alle Enzymmessungen erfolgten an Muskelhomogenaten aus menschlichen Muskelbiopsien, die zur Diagnostik eines CPT II-Mangels entnommen wurden, jedoch nach der Klinik, elektrophysiologischen und zytopathologischen Untersuchungen keinen Anhalt für eine Muskelerkrankung zeigten. In jedem Fall wurden offene Biopsien aus dem M. quadriceps femoris entnommen. Nach der Entnahme wurde der gewonnene Muskel mit isotoner Natriumchloridlösung gespült, von Fett- und Bindegewebe frei präpariert und bis zur weiteren Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff gefroren.

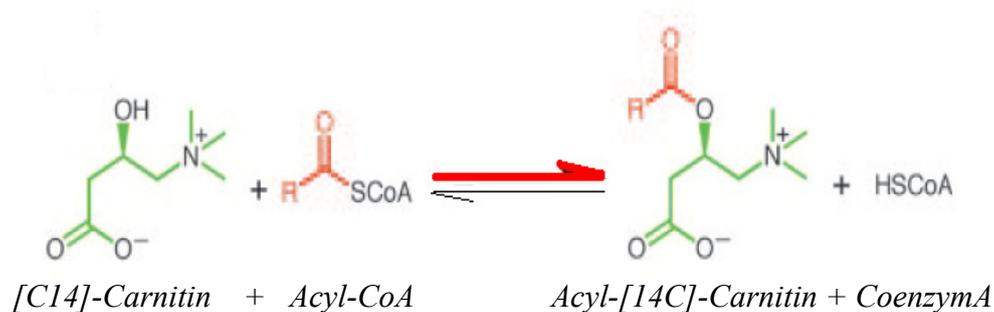
3.4 Aufarbeitung der Muskelbiopsien

Zur Herstellung des Homogenates wurde der Muskel tiefgefroren abgewogen und mit dem 29fachen Volumen CHAPPEL-PERRY Medium 8 Minuten im Homogenisator auf Eis zerrieben. Das CHAPPEL-PERRY Medium enthielt 100mM Kaliumchloridlösung, 5mM Magnesiumchloridlösung, 1mM EDTA-Lösung und 50mM Tris-HCL (pH 7,5). Das fertige Homogenat wurde in 1mL Portionen in flüssigem Stickstoff aliquoliert. Für die Messungen der Enzymaktivitäten im Sediment und Überstand wurde das Muskelhomogenat durch 30minütige Zentrifugation bei 183960g (entsprechen 50.000 Umdrehungen pro Minute) und 4°C in der Ultrazentrifuge aufgetrennt. Es wurde der Überstand abpipettiert und für die Messungen der COT-Aktivität aufgehoben. Das Sediment wurde mit CHAPPEL-PERRY Medium auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt, resuspendiert und erneut bei 183960g 30 Minuten zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde verworfen und das Sediment wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und zur Messung der CPT-Aktivität gesammelt.

3.5 Messung der Enzymaktivität

Prinzip der Enzymmessung

Die CPT bewirkt in einer Säure-Basen-Katalyse die Koppelung eines Acyl-CoA-Esters an radioaktiv markiertes Carnitin, dabei wird Coenzym A frei und es entsteht Acylcarnitin. Ausgangsstoffe und Endprodukte befinden sich im biochemischen Gleichgewicht, weshalb man durch Überschuss eines Reaktionspartners die gewünschte Reaktionsrichtung erzwingen kann.



Die Reaktion entspricht der Isotopen-Vorwärtsreaktion, beschrieben von Zierz & Engel 1985. Durch die Zugabe von Muskelhomogenat wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurde durch die Zugabe von Isobutanol und Ammoniumsulfat die Enzymaktivität gestoppt. Durch einen Überschuss an $[^{14}\text{C}]\text{-Carnitin}$ lag das Gleichgewicht zu Gunsten der Hinreaktion, sodass die Rückreaktion vernachlässigt werden konnte. Das radioaktive Acyl- $[^{14}\text{C}]\text{-Carnitin}$ wurde in die fettige Phase extrahiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

3.6 Herstellung der Lösungen

Tab.2: Übersicht über die eingesetzten Chemikalien, deren Konzentration und die eingesetzten Volumina.

Lösungen	Menge der Substanzen	Volumen Aqua bidest	Molarität	pH	Bestellnummer
Carnitinlösung	98,8mg L-Carnitin + 300µl [C14]- Carnitinlösung	10 ml	50mM 49mM		Sigma:C-0283
Tris-HCL-Puffer	60,57 g Trizma Base	500 ml	1M	7,6	Sigma:T-6791
Rinderserum- Albumin	200 mg BSA Albumin Fraktion 5	20 ml	1%		Merck: 1.12018.0100
Dithiotreitollösung	30,8 mg DTT	5 ml	40 mM		Sigma:D-0632
Palmitoyl-CoA-Lösung	10,31 mg Palmitoyl- CoA Lithium Salz	10 ml	1 mM		Sigma:P-6716
Octanoyl-CoA-Lösung	9,18 mg Octanoyl-CoA Lithium Salz	10 ml / 5 ml	1 mM 2 mM		Sigma: O-6877
Decanoyl-CoA- Lösung	9,4 mg Decanoyl-CoA Monohydrat	10 ml / 5 ml	1mM 2mM		Sigma: D-5269
Lauroyl-CoA-Lösung	9,56 mg Lauroyl-CoA Lithiumsalz	10 ml / 5 ml	1mM 2mM		Sigma:L-2659
Myristol-CoA-Lösung	9,78 mg Myristol-CoA Lithiumsalz	10 ml / 5 ml	1 mM 2 mM		Sigma:M-4414
Stearoyl-CoA-Lösung	10,34 mg Stearoyl- CoA Lithiumsalz	10ml / 5 ml	1 mM 2 mM		Sigma:S-0802
Malonyl-CoA	17,1 mg Malonyl-CoA	2 ml	10 mM		Sigma:M-4263

3.7 Testansatz

Tab.3: Pipettierschema für einen Testansatz. Dabei wurden die Volumina der eingesetzten Acyl-CoA-Ester je nach gewünschter Endkonzentration variiert.

	Testkonzentration	Volumen
Tris-HCL-Puffer, pH 7,6	10mM	100µl
BSA	0,1%	100µl
Dithioeitol	1mM	25µl
Acyl-CoA	10/20µM	5-800µl
[14C]-Carnitin	5mM	100µl
Homogenat		100µl
Malonyl-CoA	10mM	20/40µl
Aqua bidest	ad	1000µl

3.8 Radioaktivität der Carnitinlösung

Aus 98,8 mg L-Carnitin und 10 ml Aquadest. wurde eine 50 mM L-Carnitin-Lösung hergestellt, zu der dann 300µl L-[methyl-14C]-Carnitin pipettiert wurden. Die so erstellte 49 µM [14C]-Carnitinlösung hatte eine spezifische Radioaktivität von 0,03 µCi/µmol.

3.9 Durchführung

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Substanzen des Testansatzes zusammenpipettiert, dabei wurden verschiedene Mengen der Acylester verwendet und mit Aqua bidest auf 1000 µl aufpipettiert. Bei Acylesterkonzentrationen größer als 500µM mussten 2mM Acylesterlösungen verwendet werden, damit das Volumen des Testansatzes nicht größer als 1000 µl wurde. Für kleinere Konzentrationen wurden die 1mM Acylesterlösungen verwendet. Durch Zugabe des Muskelhomogenates wurde die Reaktion gestartet, der Testansatz wurde bei 30 °C für 10 Minuten im Wasserbad belassen. Mit 1 ml konzentriertem Isobutanol, 1 ml gesättigter Natriumsulfatlösung und etwa 0,5 g Natriumsulfat wurde die Reaktion gestoppt. Das Gemisch wurde etwa 10 Sekunden gemixt und für zehn Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Dabei erfolgte die Auftrennung in fettige obere und wässrige untere Phase. Es wurden 800µl der fettigen Phase, in der sich auch die Acylcarnitinester gelöst befanden, abpipettiert und mit gleichem Volumen an mit Isobutanol gesättigtem Wasser vermischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 5000 rpm wurden 500µl

abgenommen und in Vials gefüllt. Zur Messung der Radioaktivität wurden 10 ml Szintillationslösung zugegeben und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Ansätze für die Bestimmungen der Leerwerte wurden ohne Muskelhomogenat pipettiert. Bei den Bestimmungen der Hemmung wurden je nach Ansatz 20 oder 40 µl Aquadest durch 10mM Malonyl-CoA ersetzt.

Sowohl für die Proteinkonzentration (*Abb.11*), als auch für die Zeit (*Abb.12*) und Temperatur (*Abb.13*) wurden Eichkurven erstellt um die Linearität der einzelnen Parameter im Messbereich nachzuweisen. Bei allen drei Parametern konnte innerhalb des Messbereiches eine lineare positive Korrelation mit der Aktivität (CPM) nachgewiesen werden. Im Falle der Temperatur-Eichkurve verhielt sich die Enzymaktivität oberhalb des Messbereiches (>37°C) nicht mehr linear, es kam zum Abfall der Aktivität.

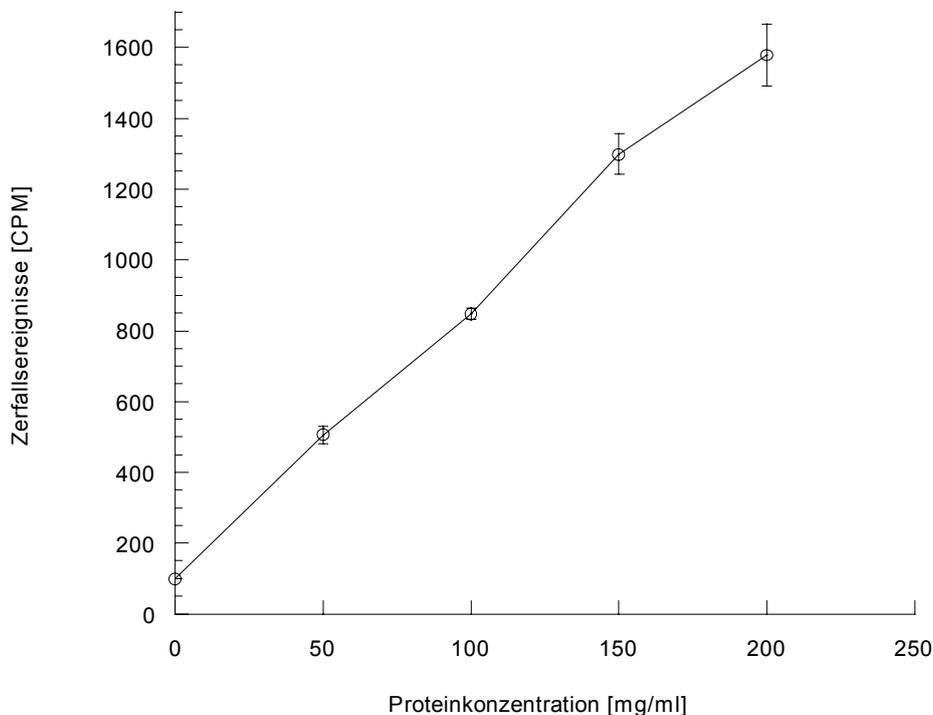


Abb.11: Dargestellt ist die Aktivität [CPM] in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge (Korrelationskoeffizient 0,99, n=3). Die Homogenatverdünnung betrug 1:30 (pro µl Homogenat ca. 0,033 mg Muskel).

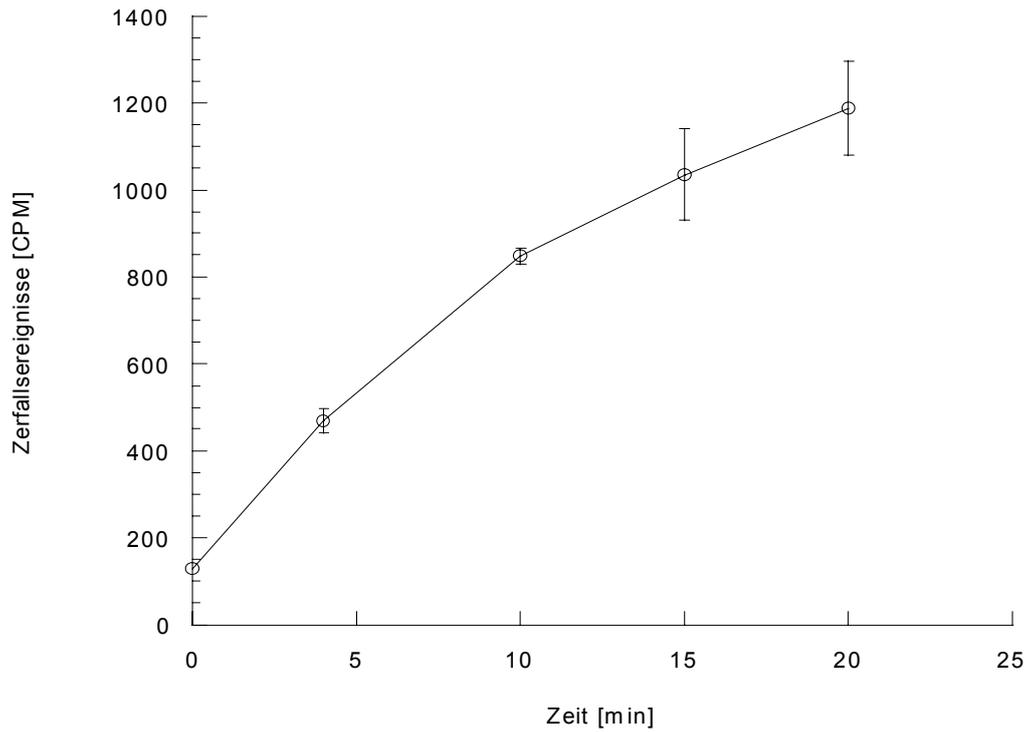


Abb.12: Dargestellt ist die Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit ($R=0,94$, $n=3$).

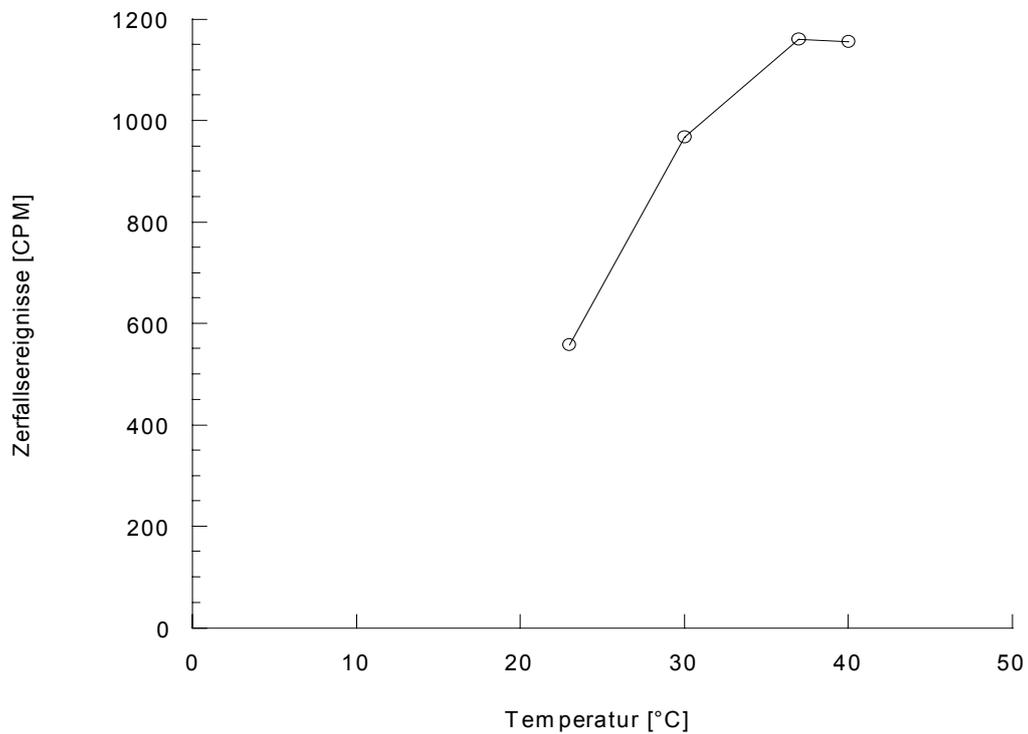


Abb.13: Dargestellt ist die Abhängigkeit der Temperatur von der gemessenen Aktivität zwischen 25°C und 37°C . Der Korrelationskoeffizient beträgt hierbei $0,95$ ($n=3$).

Berechnung der Aktivität

a) Aktivität bezogen auf das Feuchtgewicht:

$$\frac{\{(CPM_{(Probe)} - CPM_{(Leerwert)}) * n_{(Carnitinlösung)} * V1\}}{(CPM_{(Standart)} * V2 * t * a)} = \frac{\text{nmol}}{(\text{min} * \text{gFG})}$$

b) Aktivität bezogen auf enthaltenes nicht kollagenes Protein:

$$\frac{\{(CPM_{(Probe)} - CPM_{(Leerwert)}) * n_{(Carnitinlösung)} * V1\}}{(CPM_{(Standart)} * V2 * t * p)} = \frac{\text{nmol}}{(\text{min} * \text{mgNCP})}$$

V1 Volumen des Testansatzes (1000 µl)

V2 Volumen des Ansatzes im Vial (500 µl)

t Inkubationszeit (10 min)

a eingesetzte Menge an Muskelgewebe (ca. 3,33 mg pro 100 µl Muskelhomogenat)

p eingesetzte Proteinmenge (mg NCP)

3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Vom Muskelhomogenat wurden 20µl abpipettiert und mit 180µl einer 50mM Natriumhydroxidlösung versetzt. Bei Raumtemperatur kommt es zur Hydrolyse des Nicht-Kollagen-Proteins. Zur Abtrennung des Kollagen-Proteins wurden die Proben fünf Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert. Zur Proteinbestimmung wurden 10µl des vorbereiteten Homogenates eingesetzt und mit 200µl BCA-Lösung C versetzt. Zur Eichung der Messung wurde für jede Bestimmung eine Eichkurve mit Hilfe einer BSA-Standardlösung erstellt. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Titerplattenreader bei einer Wellenlänge von 550nm, der Proteingehalt wurde aus der Eichgeraden abgelesen und auf die eingesetzte Menge an Muskelgewebe bezogen [mg NCP/ g Feuchtgewicht].

Zusammensetzung der Lösungen

BCA-Lösung C: 50 Teile BCA-Lösung A + 1 Teil BCA-Lösung B

BSA-Standardlösung: 0,125; 0,25; 0,5 und 1,0 mg/ml

BCA-Lösung A: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA-Reagens und Natriumtartrat in 0,2 normaler Natriumhydroxidlösung

BCA-Lösung B: 4%ige Kupfersulfat-Lösung

3.11 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse

Die Bearbeitung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel und Microsoft Word. Zur Berechnung der Km-Werte und der Maximalgeschwindigkeiten, sowie zur graphischen Darstellung der Michaelis-Menten-Enzym-Kinetik wurden die Programme SigmaPlot und KaleidaGraph, für die statistischen Berechnungen SPSS verwendet.

3.12 Kinetik der Carnitin-Acyltransferasen für die verschiedenen Acyl-CoA-Ester im Gesamthomogenat, Sediment und Überstand

Zur Beurteilung der Kinetik der Enzym-Substrat-Interaktion wurde für die jeweiligen Substrate die Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration bestimmt. Dafür wurden verschiedene Substratkonzentrationen bei konstanter Konzentration von Carnitin mit 5 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Die unspezifische Aktivität ergab sich aus dem Quotient der erhaltenen CPM-Werte und des eingesetzten Feuchtgewichtes.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde der Proteinwert des Muskelhomogenates gemessen und die CPM-Werte auf die jeweiligen Konzentrationen des Non Kollagen Protein der entsprechenden Fraktionen bezogen.

Im Muskelhomogenat befindet sich neben der mitochondrialen Carnitin-Acyltransferase-Aktivität, die als Carnitin-Palmityltransferase beschrieben wird und nicht löslich ist, noch eine weitere lösliche Transferaseaktivität, die als Carnitin-Oktanyltransferase bezeichnet wird. Diese ist sowohl im Zytoplasma, als auch in den Peroxisomen und Mikrosomen lokalisiert. Die Messung der Aktivität der Acyltransferasen im gesamten Homogenat beinhaltet immer beide Enzyme, die für die verschiedenen Substrate unterschiedliche Aktivitäten aufweisen. Jedoch kommt es immer auch zur Überlappung der Aktivitäten beider Enzyme und somit ist eine eindeutige Zuordnung der Spezifität für ein Substrat nicht möglich.

Durch Ultrazentrifugation wurde die nicht lösliche, an die Mitochondrienmembran gebundene, von der löslichen Fraktion getrennt und die vorhandenen Aktivitäten mittels Isotopen-Vorwärts-Reaktion untersucht. Für die erhaltenen Km-Kurven wurde mit dem Programm Kaleidagraph eine Regression nach der Michaelis-Menten-Kinetik berechnet. Zeigte sich eine Substrathemmung wurde eine Regression nach einer Substrathemmungskinetik durch die Messpunkte gelegt.

3.12.1 Oktanyl-CoenzymA

Vom Substrat Oktanyl-CoenzymA wurden im Gesamthomogenat Konzentrationen von 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800,

900, 1000 μM bei einer konstanten Konzentration des C^{14} -Carnitins von 5 mM im Enzymtest mittels Isotopen-Vorwärtsreaktion gemessen. Für aussagekräftige Substratkonzentrationen, die für den Verlauf der Kurve wichtig sind, wurden die Messungen zwischen 4 und 7-mal wiederholt. In den beiden nach Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen wurden zur Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität Substratkonzentrationen von 5, 50, 100, 200-800 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Die Carnitin-Konzentration war konstant bei 5 μM . Die angegebenen Werte (*Abb.14*) sind Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten.

3.12.2 Dekanyl-CoenzymA

Zur Bestimmung der Carnitin-Transferaseaktivität des Gesamthomogenates für Dekanyl-CoenzymA wurden Substratkonzentrationen von 5, 10, 20, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 und 800 $\mu\text{mol/l}$ des Fettsäure-CoA-Esters eingesetzt (*Abb.15*) Die Konzentration von Carnitin war in allen Experimenten konstant bei 5 $\mu\text{mol/l}$. Die Messungen wurden entsprechend der Wertigkeit des Messpunktes zwischen 3- und 5-mal wiederholt. Orientierende Messpunkte wurden in die Berechnungen nicht mit einbezogen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm der berechneten Standardabweichung (SD). Sowohl im Sediment, als auch im Überstand wurden die Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten bei Substratkonzentrationen von 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 600 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt. (*Abb.15*)

3.12.3 Lauryl-CoenzymA

Die Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität des Gesamthomogenates für Lauryl-CoA erfolgte mit Konzentrationen von 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 180, 200, 300, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800 $\mu\text{mol/l}$ (*Abb.16*). Für den Verlauf der Kurve aussagekräftige Konzentrationen waren 5, 20, 50, 100-700 μM des Fettsäureesters, die in mindestens drei und maximal fünf Experimenten ermittelt wurden. Die Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität für das Substrat Lauryl-CoenzymA in der löslichen und nicht löslichen Fraktion erfolgte mittels Aktivitätsbestimmung bei Substratkonzentrationen von 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 600 μM im Sediment und Konzentrationen von 50, 100, 200- 600 und 800 μM im Überstand. Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurden die mittleren CPM-Werte auf die Konzentration an Non Kollagen Protein in der entsprechenden Fraktion bezogen.

3.12.4 Myristyl-CoenzymA

Die Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen im Homogenat wurde für Myristyl-CoenzymA - Konzentrationen von 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 140, 160, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 und 800 $\mu\text{mol/l}$ gemessen (*Abb.17*). Wobei die Messungen mit 50, 100, 200, 300-700 μM insgesamt mindestens viermal durchgeführt wurden. Die Carnitin-Konzentration war bei allen Messungen konstant bei 5 μM . Weiterhin wurden die Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten der löslichen, im Überstand enthaltenen und der nicht löslichen, an die Mitochondrienmembran gebundenen Fraktion für das Substrat Myristyl-CoenzymA bestimmt. Dazu wurden im Sediment Konzentrationen von 10, 20, 40, 50, 100, 200-700 $\mu\text{mol/l}$ Myristyl-CoA und im Überstand 50, 100, 200-800 μM bei konstanter Carnitin-Konzentration (5 μM) eingesetzt. Die Messungen wurden drei Mal durchgeführt.

3.12.5 Palmityl-CoenzymA

Für die Erstellung der Km-Kurve für das Substrat Palmityl-CoenzymA wurden Konzentrationen von 5, 10, 20, 40 -100, 120, 160 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt (*Abb.18*). Die einzelnen Messungen wurden 2-7-mal durchgeführt. Aus den ermittelten durchschnittlichen CPM-Werten wurden die spezifischen und unspezifischen Aktivitäten für die jeweiligen Konzentrationen bestimmt (s.o.). Die Konzentration an Carnitin lag konstant bei 5 μM . Die Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten im Sediment und Überstand für das Substrat Palmityl-CoenzymA erfolgte mit Substratkonzentrationen von 10, 20, 40, 60, 80, 100 und 120 μM . Die Messungen wurden mindestens vier Mal durchgeführt und aus den Mittelwerten die spezifische und unspezifische Aktivität berechnet.

3.12.6 Stearyl-CoenzymA

Für die Bestimmung der Acyltransferase-Aktivität im Homogenat für das Substrat Stearyl-CoenzymA wurden Konzentrationen von 5, 10, 40, 50, 80, 100, 150, 200 und 250 $\mu\text{mol/l}$ gewählt (*Abb.19*). Die Messungen wurden ab einer Konzentration von 10 μM bis 200 μM vier Mal durchgeführt und jeweils der Mittelwert zur Berechnung der Aktivitäten herangezogen.

Die Acyltransferase-Aktivität wurde im Sediment mit Stearyl-CoA Konzentrationen von 10, 40, 50, 80, 100, 140 und 150 μM und im Überstand mit zusätzlich 200 und 250 μM gemessen. Die Experimente wurden insgesamt drei Mal durchgeführt.

3.13 Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA

Nach der Trennung des Muskelhomogenates in ein lösliches Sediment und einen nicht löslichen Überstand wurde die Hemmbarkeit der erhaltenen Acyltransferase-Fraktionen durch Malonyl-CoA getestet. Zum Vergleich wurden Gesamthomogenat, Sediment und Überstand mit je 20 μ M und 40 μ M Malonyl-CoA versetzt (Abb.20). Es wurden die Substrate Lauryl-CoA und Palmityl-CoA den Acyltransferasen der verschiedenen Fraktionen im suboptimalen Bereich angeboten. Damit sollte eine zusätzliche Substrathemmung durch die Acyl-CoA-Ester selbst umgangen werden. Die Carnitin-Konzentration lag konstant bei 5 μ M, der Proteinwert im Gesamthomogenat lag bei 93,7mg/ml, im Sediment bei 58,9mg/ml und im Überstand bei 44,2mg/ml. Die Messungen wurden für jedes Substrat, jede Fraktion und jede Inhibitor-Konzentration jeweils vier Mal durchgeführt und aus den Mittelwerten die unspezifischen und spezifischen Aktivitäten berechnet.

Die Hemmbarkeit wurde für Lauryl-CoA im Gesamthomogenat mit einer Substratkonzentration von 600 μ M, im Sediment von 200 μ M und im Überstand von 400 μ M gemessen.

Für das Substrat Palmityl-CoA wurde die Hemmbarkeit der Acyltransferase-Aktivität im Gesamthomogenat mit einer Substratkonzentration von 60 μ M, im Sediment mit 40 μ M und Überstand mit 120 μ M gemessen.

3.14 Berechnung der Michaelis-Menten-Konstanten

Mit dem Programm KaleidaGraph wurde aus den erstellten Umsatz-Konzentrations-Kurven die Konzentration des jeweiligen Substrates bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit bestimmt (Michaelis-Menten-Konstante). Dieses erfolgte für das Gesamthomogenat und für die, durch Ultrazentrifugation erhaltenen, Fraktionen Sediment und Überstand. Dabei wurden die Kurvenverläufe, die eine Substratsättigung zeigten, zur Berechnung der einzelnen Parameter nach der Substrathemmungs-Kinetik (entsprechend dem mathematischen Zusammenhang aus Abschnitt 3.15) ausgewertet. Zeigte sich keine Substrathemmung, so erfolgte die Regression nach der Michaelis-Menten-Kinetik.

3.15 Berechnung der Hemmkonzentration I_{50}

Für die Fettsäureester, bei denen die Acyltransferasen der verschiedenen Fraktionen eine Substrathemmung zeigten, wurde die Hemmkonzentration I_{50} berechnet. Dies erfolgte aus den Substrat-Umsatz-Kurven mit Hilfe des Programms KaleidaGraph.

Dabei wurde eine Regression nach folgendem mathematischen Zusammenhang durchgeführt:

$$V = \frac{V_{max}}{(1 + K_m / [S] + [S] / I_{50})}$$

V	Umsatzgeschwindigkeit	[nmol/(min*gFG)]
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit	[nmol/(min*gNCP)]
K _m	Michaelis-Menten-Konstante	[μmol/l]
[S]	Acyl-CoA Konzentration	[μmol/l]
I ₅₀	Hemmkonzentration	[μmol/l]

3.16 Berechnung der katalytischen Effizienz des Substratumsatzes

Aus dem Verhältnis der Maximalgeschwindigkeit und der Michaelis-Menten-Konstante [K_m] wurde die katalytische Effizienz der Carnitin-Acyltransferasen des Muskelhomogenates berechnet. So ist nicht nur eine Aussage über die Bindungsfähigkeit des Enzyms für ein Substrat und die Geschwindigkeit der ablaufenden Reaktion zu treffen, sondern auch die Effektivität des Umsatzes kann bestimmt werden.

$$K_{katalytische\ Effizienz} = \frac{K_{kat}}{K_m} \qquad K_{kat} = \frac{V_{max}}{n}$$

Da die Konzentration des Enzyms im Muskelhomogenat unbekannt ist, wurde die katalytische Effizienz vereinfachend angenommen als Verhältnis der Maximalgeschwindigkeit zur Michaelis-Menten-Konstante.

$$K_{katalytische\ Effizienz} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

K _{kat}	katalytische Konstante	[nmol/(min*mol)]
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit	[nmol/(min*gFG)]
K _m	Michaelis-Menten-Konstante	[μmol/l]
n	Stoffmenge der Transferase	[mol]

4. Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Messungen wurden an menschlichen Skelettmuskelhomogenaten durchgeführt. Man geht davon aus, dass sich im Gesamthomogenat die CPT I, CPT II, COT und weitere Acyltransferasen befinden. Nach Ultrazentrifugation erfolgte die Auftrennung der Transferasen in eine lösliche Fraktion, als Überstand bezeichnet und in eine nicht lösliche Fraktion, als Sediment bezeichnet. Es wird angenommen, dass sich die membrangebundenen Carnitin-Acyltransferasen (CPT I und CPT II) im Sediment befinden, während alle nicht membrangebundenen Transferasen (COT) im Überstand löslich sind.

4.1 Oktanyl-CoenzymA

Die spezifischen Aktivitäten ergaben Werte von $0,3 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei $5 \mu\text{M}$ Oktanyl bis hin zu $60,78 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 2,5 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei einer Substratkonzentration von $800 \mu\text{M}$. Es ergaben sich unspezifische Aktivitäten von maximal $5592,4 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm \text{SD}$ ($\text{SD}=230,1$) bei Konzentrationen von $1000 \mu\text{M}$ Oktanyl-CoA. Aus dem Verlauf konnte nicht auf eine Substratsättigung geschlossen werden. Der Proteinwert betrug 92mg/ml . (Abb.14)

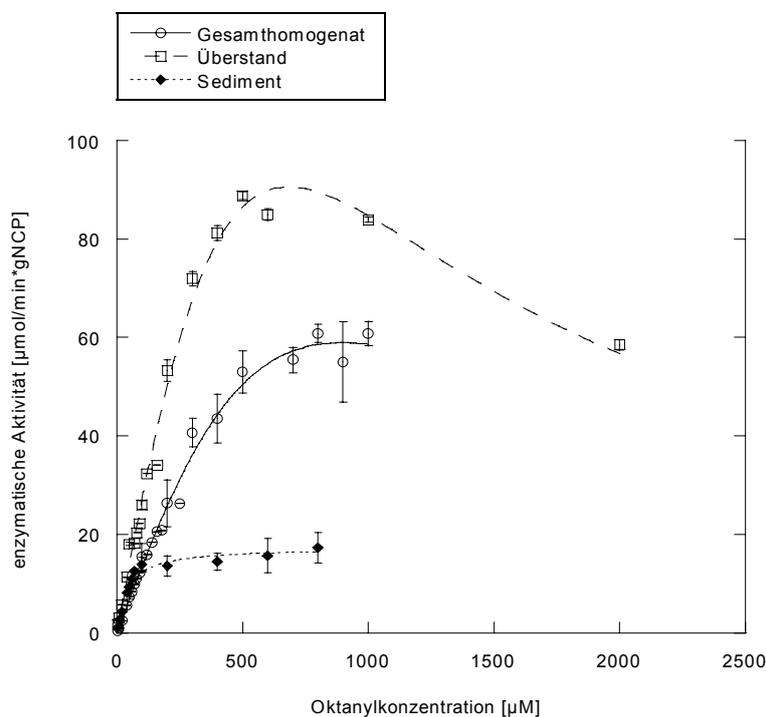


Abb.14: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Oktanyl-CoA (C8-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

Die maximale spezifische Aktivität im Sediment betrug für Oktanyl-CoA $17,28\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 3\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei einer Konzentration von $800\mu\text{M}$ und einem Proteinwert von $58,35\text{mg}/\text{ml}$. Die unspezifische Aktivität hatte ein Minimum von $68,2\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ und ein Maximum von $1008,7\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 175,5\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei $800\mu\text{M}$. Im Überstand lag die spezifische Aktivität bei maximal $88,8\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,78\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei $500\mu\text{M}$ und einem Proteinwert von $43,7\text{mg}/\text{ml}$.

Die unspezifische Aktivität betrug im Überstand maximal $3880,7\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 34,1\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei $500\mu\text{M}$, danach kam es zum Abfall der Aktivität. In dieser Fraktion konnte eine Substratsättigung nicht beobachtet werden.

4.2 Dekanyl-CoenzymA

Für die spezifischen Aktivitäten ergaben sich im Gesamthomogenat bei einem Proteinwert von $92\text{mg}/\text{ml}$ Werte von $0,56\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bis $30,7\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 2,7\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei einer Dekanyl-CoA-Konzentration von $400\mu\text{M}$.

Die unspezifischen Aktivitäten reichten von $52,3\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei $5\mu\text{M}$ bis maximal $2833,2\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 248,3\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei $400\mu\text{M}$ Dekanyl-CoA. Bei höheren Konzentrationen fiel die Aktivität stetig ab (*Abbildung 15*).

Die spezifischen Aktivitäten im Sediment ergaben Werte zwischen $7,28\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ (bei $50\mu\text{M}$) und $11,41\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 1,65\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei einer Substratkonzentration von $400\mu\text{M}$. Die unspezifischen Aktivitäten von minimal $422,5\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei $50\mu\text{M}$ bis maximal $661,9\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 96,1\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei $300\mu\text{M}$.

Die maximale spezifische Aktivität im Überstand lag bei $63,81\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 2,34\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei $400\mu\text{M}$. Der Proteinwert lag im Sediment bei $58\text{mg}/\text{ml}$ und im Überstand bei $43\text{mg}/\text{ml}$. Die unspezifische Aktivität zeigte ein Minimum von $625,9\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei Substratkonzentrationen von $50\mu\text{M}$ und ein Maximum von $2743,9\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 102,6\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei $400\mu\text{M}$.

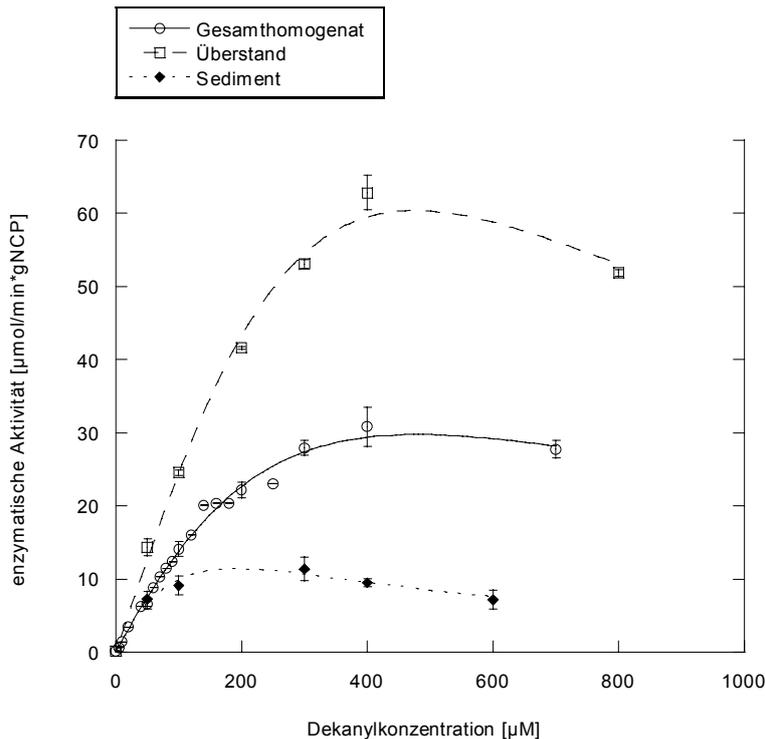


Abb.15: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Dekanyl-CoA (C10-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

4.3 Lauryl-CoenzymA

Die spezifische Aktivität ergab im Gesamthomogenat einen maximalen Wert von $7,8 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,21 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei einem Proteinwert von 92mg/ml und einer Lauryl-CoA Konzentration von $600 \mu\text{M}$.

Die gemessenen unspezifischen Aktivitäten im Gesamthomogenat reichten von $35,1 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei $5 \mu\text{M}$ bis $720,7 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 19,9 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei einer Konzentration von $600 \mu\text{M}$.

Im Sediment zeigten sich spezifische Aktivitäten von $2,78 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei $50 \mu\text{M}$ und maximal $4 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,78 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei einer Substratkonzentration von $300 \mu\text{M}$. Dies entsprach unspezifischen Aktivitäten von minimal $162,6 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei $50 \mu\text{M}$ und maximal $236,2 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 45,6 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei $300 \mu\text{M}$ (Abb. 16).

Die spezifische Aktivität erreichte im Überstand ein Maximum von $9,6 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,33 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$. Im Überstand lag das Minimum der unspezifischen Aktivität bei $102,1 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei $50 \mu\text{M}$ und das Maximum bei $422,8 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 14,5 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei $600 \mu\text{M}$. In beiden Fraktionen zeigte sich eine Substratsättigung. Die

Proteinkonzentration lag im Sediment bei durchschnittlich 58,35mg/ml und im Überstand bei durchschnittlich 43,7mg/ml.

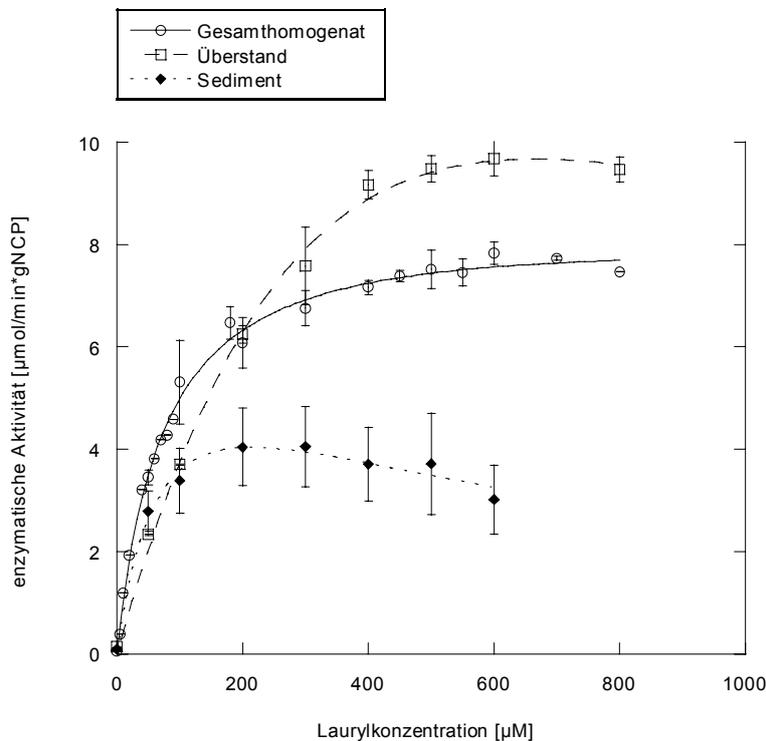


Abb.16: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Lauryl-CoA (C12-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

4.4 Myristyl-CoenzymA

Die maximale spezifische Aktivität im Gesamthomogenat lag bei $6,71 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,22 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$. Die maximale unspezifische Aktivität erreichte $617,3 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 20,6 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$ Myristyl-CoA. Bei weiterer Steigerung der Konzentration fiel die Aktivität wieder ab (Abb.17).

Die spezifische Aktivität betrug im Sediment minimal $1,83 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei $10 \mu\text{M}$ Myristyl-CoA und maximal $5,8 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,12 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei $400 \mu\text{M}$ (Proteinwert: 58,35mg/ml). Die unspezifische Aktivität im Sediment reichte von $107,2 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei $10 \mu\text{M}$ bis maximal $342,3 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 7,3 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei einer Substratkonzentration von $100 \mu\text{M}$.

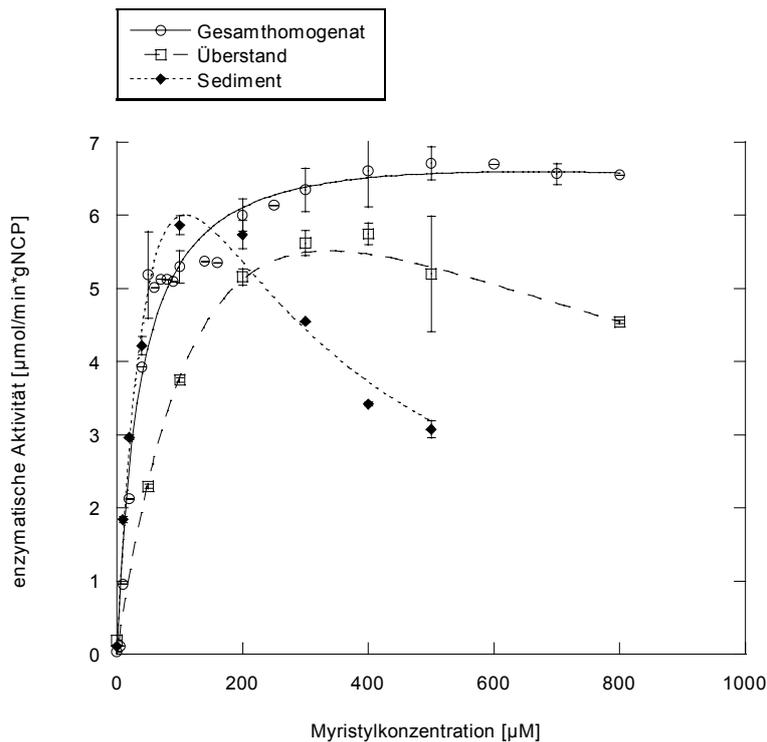


Abb.17: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Myristyl-CoA (C14-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

Die spezifische Aktivität erreichte im Überstand Werte von $2,29 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei $50 \mu\text{M}$ bis maximal $5,74 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,15 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei einer Myristyl-CoA Konzentration von $400 \mu\text{M}$ und einem Proteinwert von $43,7 \text{mg/ml}$.

Die maximale unspezifische Aktivität lag bei einer Substratkonzentration von $400 \mu\text{M}$ mit $251,0 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 6,6 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$.

4.5 Palmityl-CoenzymA

Die spezifische Aktivität im Gesamthomogenat ergab einen maximalen mittleren Wert von $4,11 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,31 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ bei $80 \mu\text{M}$ bei einem Proteinwert von 92mg/ml . Die mittleren unspezifischen Aktivitäten im Homogenat reichten bis maximal $378,4 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 29,1 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ bei $80 \mu\text{M}$. Bei Konzentrationen über $80 \mu\text{M}$ fiel die Aktivität stark ab (bei $120 \mu\text{M}$: $334,7 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$), sodass von einer Substrathemmung ausgegangen werden konnte (Abb.18).

Die maximale spezifische Aktivität erreichte im Sediment $4,32 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm$

0,8 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei 100 μM . Die unspezifische Aktivität betrug im Sediment maximal 252,5 $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 46,2 \text{ nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei 100 μM .

Die maximale spezifische Aktivität erreichte im Überstand Werte von 0,6 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,03\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei einer Substratkonzentration von 80 μM . Es wurden maximale unspezifischen Aktivitäten bei einer Konzentration von 80 μM mit 28,9 $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 1,6\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ gemessen. Die Proteinwerte betragen 58,35 mg/ml im Sediment und 43,7 mg/ml im Überstand.

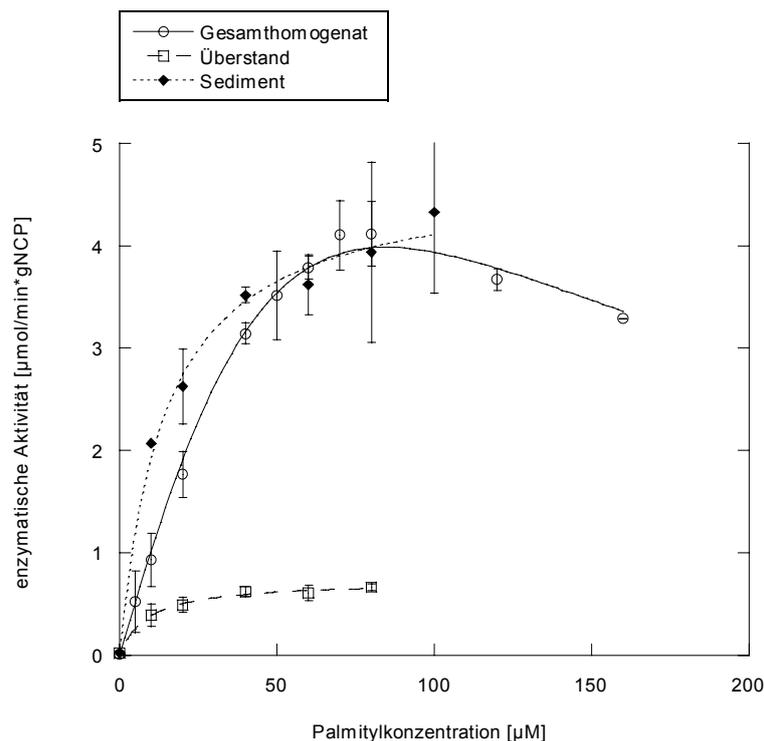


Abb.18: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Palmityl-CoA (C16-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

4.6 Stearyl-CoenzymA

Die spezifische Aktivität betrug im Gesamthomogenat maximal 3,3 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,76\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei einer Substratkonzentration von 80 μM . (Proteinwert: 92 mg/ml).

Die maximale unspezifische Aktivität fand sich bei einer Konzentration von 80 μM mit 302,4 $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 70,0\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ und fiel bei höheren Konzentrationen wieder ab, sodass von einer Substratsättigung ausgegangen werden konnte (Abb.19).

Im Sediment war spezifische Aktivität bei 3,4 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,3\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei

einer Substratkonzentration von 80 μM am größten (Proteinwert: 58,35mg/ml).

Es ergab sich eine mittlere maximale unspezifische Aktivität von $198,8\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 20,9\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ bei einer Konzentration von $80\mu\text{M}$.

Im Überstand war die spezifische Aktivität maximal $3,2\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,1\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei $140\mu\text{M}$ (Proteinwert: 43,7mg/ml). Die maximale unspezifische Aktivität lag bei $140\mu\text{M}$ mit $21,2\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 4,4\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$.

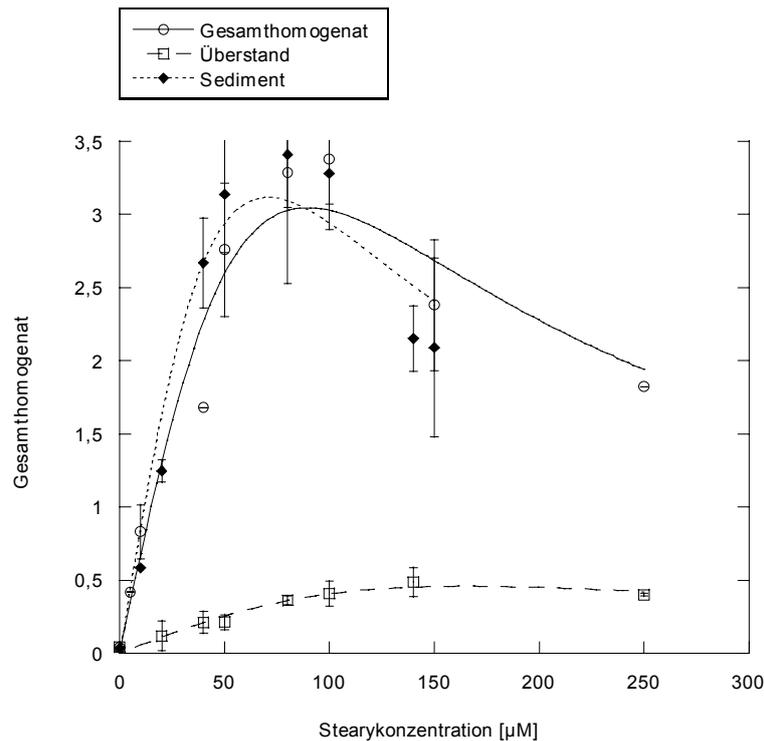


Abb.19: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Stearyl-CoA (C18-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

4.7 Hemmbarkeit durch Malonyl-CoenzymA

4.7.1 Lauryl-CoA

Im Gesamthomogenat wurde bei einer Substratkonzentration von $600\mu\text{M}$ eine enzymatische Aktivität von $7,2\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ bei einer Malonyl-CoA Konzentration von $20\mu\text{M}$ gemessen. Diese Aktivität fiel bei einer Inhibitor-Konzentration von $40\mu\text{M}$ auf $6,81\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$.

Im Sediment lag die enzymatische Aktivität bei einer Substratkonzentration von $200\mu\text{M}$ und

einer Inhibitor-Konzentration von 20 μ M bei 4,0 μ mol/(min*gNCP) und bei 40 μ M bei 3,73 μ mol/(min*gNCP). Im Überstand wurde bei einer Substratkonzentration von 400 μ M Lauryl-CoA gemessen. Dabei zeigte sich bei einer Malonyl-CoA Konzentration von 20 μ M eine enzymatische Aktivität von 7,95 μ mol/(min*gNCP) und bei 40 μ M Malonyl-CoA fiel die Aktivität auf 7,66 μ mol/(min*gNCP)(siehe *Abb.20*).

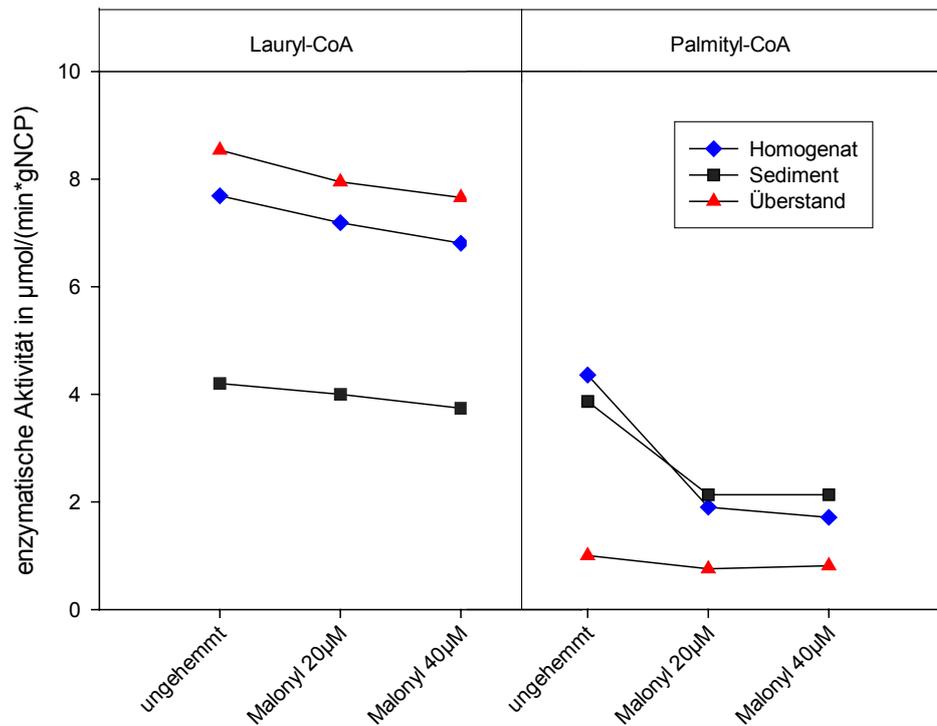


Abb.20: Dargestellt ist die Hemmung der unspezifischen Aktivitäten der Carnitin-Acyltransferasen mit 20 μ M und 40 μ M Malonyl-CoA für die Substrate Lauryl-CoA und Palmityl-CoA. Die Hemmung wurde im Muskelhomogenat, sowie in den durch Ultrazentrifugation getrennten Fraktionen Sediment und Überstand durchgeführt. Es sind die Mittelwerte aus vier Messungen abgebildet.

4.7.2 Palmityl-CoA

Im gesamten Homogenat zeigten die mit 20 μ M Malonyl-CoA gehemmten Acyltransferasen eine enzymatische Aktivität von 1,71 μ mol/(min*gNCP). Bei Steigerung der Inhibitor-Konzentration auf 40 μ M fiel die enzymatische Aktivität auf 1,54 μ mol/(min*gNCP).

Im Sediment ergab die Hemmung mit 20 μ M Malonyl-CoA eine Aktivität von 1,92 μ mol/(min*gNCP). Die Steigerung auf 40 μ M Malonyl-CoA zeigte keine weitere Abnahme der Transferaseaktivitäten. Im Überstand lagen die enzymatischen Aktivitäten nach Zugabe von 20 μ M Malonyl-CoA bei 0,68 μ mol/(min*gNCP) und nach Zugabe von 40 μ M Malonyl-CoA bei 0,73 μ mol/(min*gNCP) (*Abb.20*).

4.8 Michaelis-Menten-Konstanten

Tab.4: Km-Werte [μM] der Carnitin-Acyltransferasen in den verschiedenen Fraktionen.

	Michaelis-Menten-Konstanten in $\mu\text{mol/l}$		
	<u>Gesamthomogenat</u>	<u>Sediment</u>	<u>Überstand</u>
Oktanyl-CoA	569	41	175
Dekanyl-CoA	108	37	131
Lauryl-CoA	70	76	212
Myristyl-CoA	37	22	66
Palmityl-CoA	23	14	9
Stearyl-CoA	28	20	47

4.9 Hemmkonzentration I_{50}

Tab.5: Hemmkonzentrationen [μM] in den verschiedenen Fraktionen.

	Hemmkonzentration I_{50} in $\mu\text{mol/l}$		
	<u>Gesamthomogenat</u>	<u>Sediment</u>	<u>Überstand</u>
Oktanyl-CoA			2459
Dekanyl-CoA	1950	927	1512
Lauryl-CoA		607	1420
Myristyl-CoA	11747	533	1338
Palmityl-CoA	264		
Stearyl-CoA	295	230	531

4.10 Maximale Umsatzgeschwindigkeiten

Entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik steigt die Umsatzgeschwindigkeit bei steigender Substratkonzentration an. Im Verlauf der Kurve erfolgen dann eine Enzymsättigung und eine asymptotische Näherung des Umsatzes an eine Maximalgeschwindigkeit. Im Falle der Carnitin-Acyltransferasen im Muskelhomogenat kam es bei den Substraten Dekanyl-CoA, Myristyl-CoA, Palmityl-CoA und Stearyl-CoA nach dem Erreichen einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit zu einer Substratsättigung und danach zur Substrathemmung, sodass in diesen Fällen von einer Substrathemmungs-Kinetik ausgegangen werden kann. Im Falle der Substrate Oktanyl-CoA und Lauryl-CoA fand sich im Gesamthomogenat keine Substrathemmung. Die Maximalgeschwindigkeiten wurden aus den spezifischen Aktivitäten errechnet.

Tab.6: Maximale Umsatzgeschwindigkeiten [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$].

	Maximale Umsatzgeschwindigkeit in $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$		
	<u>Gesamthomogenat</u>	<u>Sediment</u>	<u>Überstand</u>
Oktanyl-CoA	99,5	17,3	138,9
Dekanyl-CoA	43,6	16,2	96,3
Lauryl-CoA	8,5	6,9	12,9
Myristyl-CoA	7,3	8,4	8,3
Palmityl-CoA	6,5	4,7	0,73
Stearyl-CoA	5,4	5,1	0,75

4.11 Katalytische Effizienzen des Substratumsatzes

Tab.7: Katalytische Effizienzen der Acyltransferasen der einzelnen Fraktionen.

	Effizienz des Enzym-Substrat-Umsatzes V_{max}/K_m		
	<u>Gesamthomogenat</u>	<u>Sediment</u>	<u>Überstand</u>
Oktanyl-CoA	0,17	0,42	0,79
Dekanyl-CoA	0,4	0,44	0,74
Lauryl-CoA	0,12	0,09	0,06
Myristyl-CoA	0,2	0,38	0,13
Palmityl-CoA	0,28	0,33	0,08
Stearyl-CoA	0,19	0,26	0,02

5. Diskussion

Die im menschlichen Skelettmuskel befindlichen Carnitin-Acyltransferasen tragen in ihrer Gesamtheit zur Aktivität des Fettstoffwechsels bei. Die gemessenen Ergebnisse sowie die berechneten Parameter (K_m , I_{50} , V_{max} und die katalytische Effizienz) sind dem zufolge nicht einer einzigen Carnitin-Acyltransferase zuzuordnen. Durch Trennung in lösliche und nicht lösliche Fraktionen wurde eine Unterscheidung von membrangebundenen und zytoplasmatischen Enzymen angestrebt, eine Auftrennung zwischen COT und CPT direkt war unter den gegebenen Versuchsbedingungen (in vitro) nicht möglich, sodass dies bei der Interpretation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden muss. Mögliche Erklärungen der gemessenen Ergebnisse sollen anhand der Enzymstruktur sowie dem Zusammenspiel verschiedener Transferaseaktivitäten im nativen Muskel aufgezeigt werden.

5.1 Michaelis-Menten-Konstanten

Betrachtet man das Gesamthomogenat so fällt auf, dass der K_m -Wert mit zunehmender Kettenlänge der Fettsäureester stetig abfällt und lediglich bei Stearyl-CoA wieder leicht ansteigt (Abb.21).

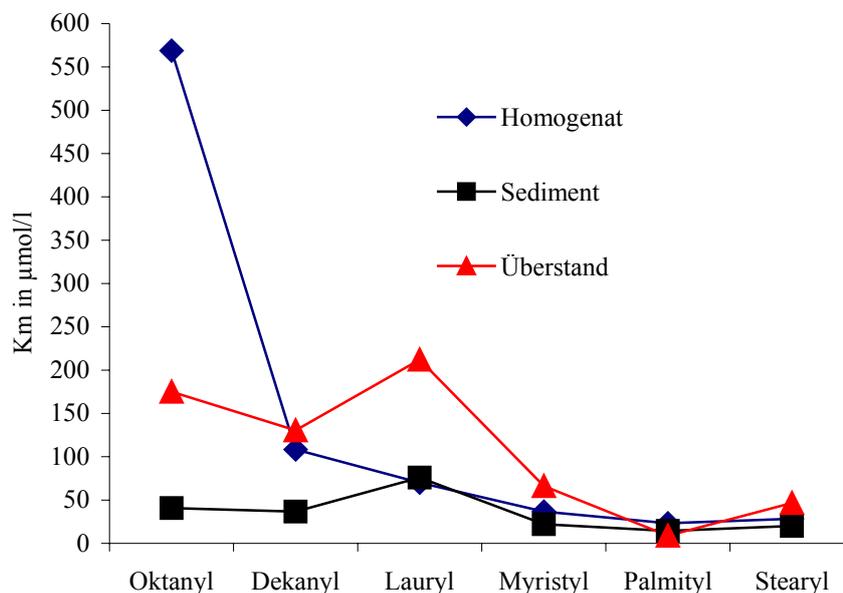


Abb.21: Dargestellt sind die Michaelis-Menten-Konstanten [μM] der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität im Gesamthomogenat und in den, durch Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen, Sediment und Überstand für die Fettsäure-CoA-Ester mit einer Kettenlänge von 8, 10, 12, 14, 16 und 18 Kohlenstoffatomen.

Der niedrigste K_m -Wert findet sich bei Palmityl-CoA, woraus man schließen könnte, dass das spezifischste Substrat für das Carnitin-Acyltransferasen-System des menschlichen Skelettmuskels Palmityl-CoA ist. Schon bei sehr niedrigen (also auch physiologischen) Konzentrationen wird dieses Substrat bevorzugt gebunden.

Am unspezifischsten wird im Gesamthomogenat das mittellangkettige Oktanyl-CoA gebunden, für eine effektive Bindung zwischen Substrat und Enzym sind hier unphysiologisch hohe Konzentrationen nötig. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte die Kettenlänge (8 C-Atome) dieses Substrates bieten. Da Oktanyl-CoA kleiner ist als die anderen untersuchten Fettsäureester, könnte es leichter Zugang zu den katalytischen Zentren der verschiedenen Acyltransferasen bekommen, wäre jedoch für eine spezifische Bindung zu klein. Da der Zugang zum katalytischen Zentrum nicht allein für die Veresterung wichtig ist, sondern auch die Konformation, würden so verhältnismäßig höhere Konzentrationen an Oktanyl-CoA benötigt um denselben Anteil an gebundenem Substrat zu erlangen.

Auch für die Carnitin-Acyltransferasen im Sediment und Überstand zeigte sich der niedrigste K_m -Wert bei Palmityl-CoA. Dies wurde insoweit nicht vermutet, da im Überstand hauptsächlich die COT angenommen wird und für diese nur eine geringe Spezifität für die Bindung von Palmityl-CoA erwartet wurde. Eine mögliche Erklärung könnte die Anwesenheit löslicher Acyltransferasen mit Aktivität für langkettige Acyl-CoA-Ester sein. So wird sowohl in den Peroxisomen als auch in den Mikrosomen eine Acyltransferase-Aktivität für langkettige Fettsäureester angenommen[74;75;91]. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die COT mit Palmityl-CoA eine spezifische Bindung eingeht, dabei würde durch eine Konformationsänderung die Struktur des katalytischen Zentrums so verändert, dass eine größere Bindungstasche entsteht. (siehe *Abb. 10 B*) Die Transferasen im Überstand zeigen im Vergleich zu den Transferasen des Sedimentes für fast alle Fettsäureester höhere K_m -Werte, binden somit insgesamt unspezifischer. Dies ist eventuell auch eine Folge der Fähigkeit zur Konformationsänderung, die eine vielseitige Bindung nur auf Kosten der Spezifität ermöglicht. Außer im Gesamthomogenat zeigten sich, sowohl bei den löslichen, als auch bei den nicht löslichen Transferasen, die geringsten Affinitäten für das Substrat Lauryl-CoA. Auch hier könnte man Ursachen in der Kettenlänge vermuten, wobei die COT in keiner Konformation einen Acylester mit 12 Kohlenstoffatomen spezifisch binden kann.

Insgesamt deuten die erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass sich die löslichen und nicht löslichen Carnitin-Acyltransferasen in ihrer Bindungsspezifität für verschieden langkettige Substrate überschneiden. Somit kann man keine klare Trennung zwischen den Carnitin-Acyltransferasen in Bezug auf ihre Substrate vornehmen. Die nicht löslichen Acyltransferasen

zeigen einen durchweg niedrigen K_m -Wert und somit die Fähigkeit verschiedene Fettsäureester spezifisch zu binden.

5.2 Hemmkonzentrationen (I_{50})

Bei der Mehrzahl der Fettsäure-CoA-Ester kam es bei steigenden Konzentrationen nicht nur zu einer Sättigung des Enzyms mit dem Substrat, sondern auch zu einer Hemmung und damit zum Abfall der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (*siehe Abb.22*). Um der Kinetik der Enzym-Substrat Reaktion gerecht zu werden, musste von einer Substrathemmung ausgegangen werden.

Dabei könnte der Acyl-CoA-Ester ein kompetitiver Inhibitor zu dem zweiten Substrat Carnitin sein und so nicht nur an der eigenen Bindungsstelle angreifen, sondern auch die des Carnitins blockieren [9].

Bei der verwandten Acetyltransferase kommt es durch Palmityl-CoA zur kompetitiven Hemmung der Reaktion. Allerdings agiert hierbei Palmityl-CoA als ein reiner Inhibitor und nicht als Substrat[16;17].

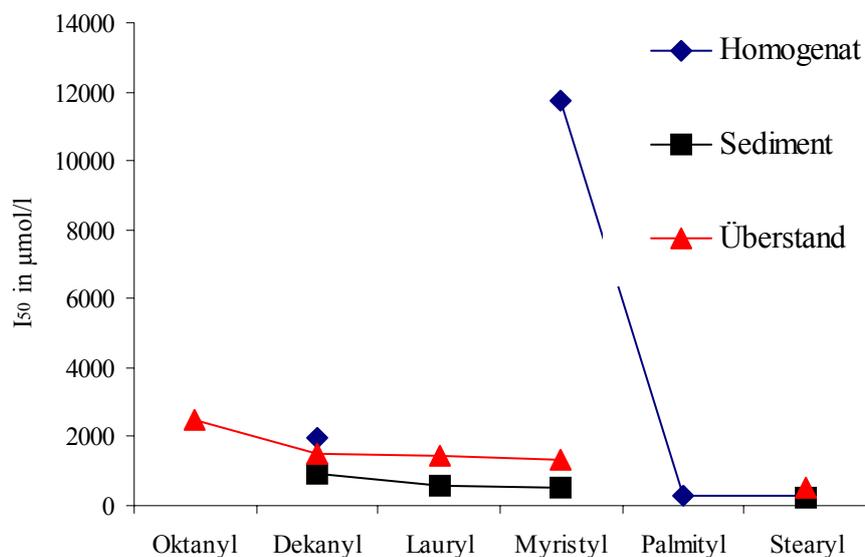


Abb.22: Dargestellt sind die Hemmkonzentrationen I_{50} [μM] der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität im Gesamthomogenat und in den, durch Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen, Sediment und Überstand für die Fettsäure-CoA-Ester mit einer Kettenlänge von 8, 10, 12, 14, 16 und 18 Kohlenstoffatomen. Bei den fehlenden Säulen konnte keine Hemmkonzentration bestimmt werden, da es sich um eine reine Michaelis-Menten-Kinetik handelte und keine Substrathemmung vorlag.

Auch eine weitere Bindungsstelle des Acyl-CoA-Esters an der Carnitin-Palmityltransferase, welche durch die Bindung eines Acyl-CoA Moleküls die Konformation der Carnitin-Bindungsstelle verändert und so zu einer Aktivitätsminderung führt, wurde schon lange postuliert [9].

Bei der CPT I fand man heraus, dass die Malonyl-Bindungsstelle nahe des katalytischen Zentrums liegt und die Bindung des Malonyls zu einer kompetitiven Hemmung am katalytischen Zentrum führt, obwohl die Bindungsstelle eine andere ist (siehe *Abb.8*) [71]. Es wäre also auch denkbar, dass diese Bindungsstelle von einem anderen Acylrest besetzt würde und ähnlich dem Malonyl eine Konformationsänderung des katalytischen Zentrums bewirken könnte.

Im Gesamthomogenat ergab sich der niedrigste I_{50} -Wert für das Substrat Palmityl-CoA ($264\mu\text{M}$) gefolgt von Stearyl-CoA ($295\mu\text{M}$). Dies geht konform mit den beobachteten K_m -Werten, sodass Palmityl-CoA sowohl beim Substratumsatz, als auch bei der Substrathemmung der Carnitin-Acyltransferasen eine Sonderstellung einnimmt. Der niedrige I_{50} -Wert spricht dafür, dass die Substrathemmung an der gleichen Stelle, an der auch Malonyl-CoA binden kann, angreift.

Dabei könnte es sich um die Malonyl-CoA Bindungsstelle mit niedriger Affinität für Malonyl-CoA handeln, die in der Nähe des katalytischen Zentrums liegt. Hier käme es zur kompetitiven Inhibition, indem die Bindung des Palmityl-CoA in diesem Bereich die Konformation des katalytischen Zentrums verändert (siehe *Abbildung 8B*).

Auch bei den löslichen und nicht löslichen Carnitin-Acyltransferasen zeigen sich die niedrigeren I_{50} -Werte für Substrate mit höherer Kettenlänge. So ist im Sediment und im Überstand der I_{50} -Wert für Stearyl-CoA am niedrigsten. Dies spricht dafür, dass auch bei der COT die Substrathemmung an einem korrespondierenden (äquivalent zur CPT I) Bereich stattfindet. So konnten Morillas et al. 2000 zeigen, dass auch die COT zwei Bindungsbereiche für Malonyl-CoA besitzt und der nahe dem katalytischen Zentrum liegende ebenfalls verschiedene Acyl-CoA-Ester binden kann [69].

Da also für alle Fraktionen der Carnitin-Acyltransferasen die niedrigsten I_{50} -Werte für Palmityl-CoA (bzw. Stearyl-CoA) gefunden wurden, könnte man davon ausgehen, dass die Substrathemmung immer an der gleichen Stelle der Enzyme abläuft und es sich bei dieser um die Malonyl-CoA-Bindungsstelle nahe des katalytischen Zentrums handelt.

5.3 Maximale Umsatzgeschwindigkeiten

In allen drei Fraktionen sinkt mit steigender Kettenlänge die maximale Umsatzgeschwindigkeit der Carnitin-Acyltransferasen. Dabei ist dieses Verhalten im Gesamthomogenat und im Überstand am stärksten ausgeprägt (Abb.23).

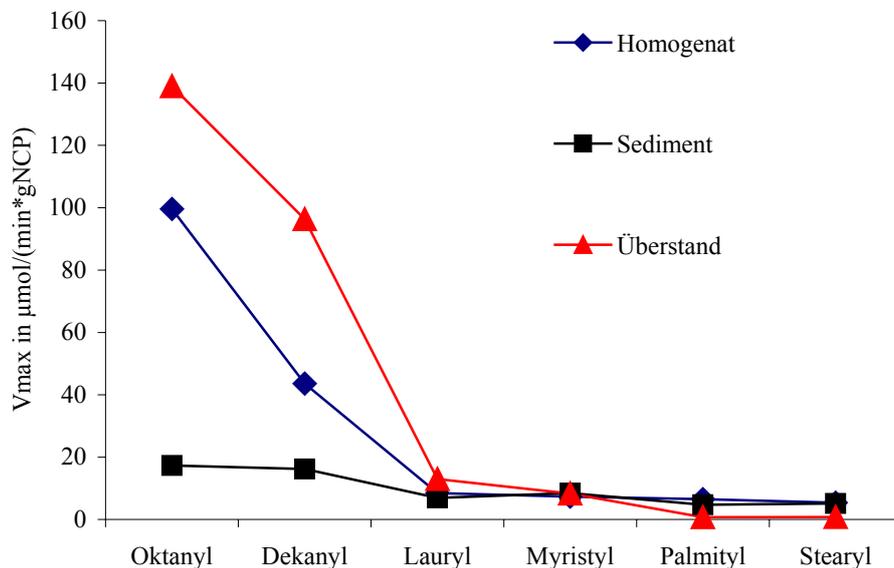


Abb.23: Dargestellt sind die maximalen spezifischen Umsatzgeschwindigkeiten in $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ der Carnitin-Acyltransferasen im Gesamthomogenat, Sediment und Überstand für die Fettsäure-CoA-Ester (C8-CoA bis C18-CoA).

Man könnte daraus schließen, dass sich die Aktivitäten der löslichen und nicht löslichen Transferasen nicht gleichmäßig überlappen. So scheint die enorm hohe maximale Umsatzgeschwindigkeit der COT nur bei mittellangkettigen Estern erreicht zu werden, während die CPT im gesamten Bereich der getesteten Fettsäureester ähnlich hohe Umsatzgeschwindigkeiten erreicht. Im Überstand ist nach Dekanyl-CoA ein großer Abfall der Umsatzgeschwindigkeit zu erkennen, sodass die löslichen Transferasen kaum eine Aktivität für Palmityl-CoA und Stearyl-CoA zeigen. Die noch vorhandene Aktivität der Transferasen im Überstand für langkettige Fettsäureester kann einerseits durch mögliche Konformationsänderungen der COT und damit einhergehende Aktivitäten erklärt werden. Andererseits könnten für die gemessenen Aktivitäten lösliche Acyltransferasen der Mikrosomen oder Peroxisomen (siehe Tab.1) verantwortlich sein.

Im Sediment hingegen ist der Abfall der Umsatzgeschwindigkeiten dezenter ausgeprägt. Eindeutig erscheint, dass auch die nicht löslichen Transferasen eine Aktivität für mittellangkettige Substrate zeigen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass nicht die

maximalen Aktivitäten die Effizienz des Enzyms ausdrücken, sondern diese immer noch abhängig von dem K_m -Wert ist. So kann zwar die maximale Umsatzgeschwindigkeit höher sein, doch auch erst bei sehr viel höheren Substratkonzentrationen, während bei gleichen Bedingungen ein anderes Enzym schneller arbeitet (siehe Abschnitt 5.4).

Auch die Tatsache, dass im Überstand bis zum Substrat Lauryl-CoA durchweg höhere Umsatzgeschwindigkeiten erreicht werden als im Sediment, spricht nicht für geringere Effizienzen der Transferasen im Sediment. Dies zeigt lediglich, dass die löslichen Transferasen in ihrer Gesamtheit ihre maximalen Umsatzgeschwindigkeiten bei mittellangkettigen Fettsäureestern erreichen. Diese gemessenen Aktivitäten wurden jedoch erst bei sehr hohen Substratkonzentrationen erreicht und lassen keinesfalls Rückschlüsse auf die Situation im Skelettmuskel unter physiologische Bedingungen zu. Es ist bisher noch nicht bekannt, wie viel Mol an Transferasen sich im Homogenat befinden und welcher Anteil davon löslich ist. So ist es durchaus möglich, dass das Verhältnis von COT zu CPT zu Gunsten der COT verschoben ist. Um darüber konkrete Aussagen zu machen, müssten Untersuchungen zum Transferasengehalt im Muskel durchgeführt werden. Dies könnte Inhalt weiterführender Studien sein, würde aber den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

5.4 Katalytische Effizienzen

Die katalytische Effizienz beschreibt die Fähigkeit eines Enzyms ein Substrat spezifisch umzusetzen. Die berechneten Ergebnisse stellen sowohl die Fähigkeit der Transferasen zur spezifischen Substratbindung, als auch zum Umsatz des Substrates dar.

Im Gesamthomogenat zeigt sich für die katalytischen Effizienzen ein zweigipfliger Verlauf mit dem ersten Maximum für Dekanyl-CoA und einem zweiten Maximum für Palmityl-CoA. Dies zeigt das Nebeneinander von Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten für mittellangkettige und für langkettige Fettsäureester. Dabei kommt es zur Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten der CPT und der COT, sowie weiterer im Skelettmuskel vorhandener Acyltransferase-Aktivitäten. Dekanyl-CoA ist das spezifische Substrat für die COT und Palmityl-CoA für die CPT (*Abb. 25*). Diese gemessenen Maxima setzen sich wahrscheinlich aus den Aktivitäten mehrerer Acyltransferasen zusammen, sodass abweichende Maxima nach Auftrennung in lösliche und nicht lösliche Fraktionen durchaus erklärbar sind (Vgl. *Abb. 25 und 26*). So wurde bei den löslichen Transferasen zwar ebenfalls ein Maximum für langkettige Fettsäureester gefunden, dieses lag allerdings bei Myristyl-CoA. Geht man davon aus, dass lösliche Acyltransferasen mit einer Aktivität für langkettige Fettsäuren existieren [74;75;91], so läge deren Maximum bei einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen.

Nach Auftrennung zeigen sich Oktanyl-CoA und Dekanyl-CoA als die spezifischen Substrate

für die löslichen Transferasen (*Abb.27*). In der Arbeit von Miyazawa et al. (1983) wurde für das Substrat Dekanyl-CoA eine 7fach höhere Aktivität der COT im Vergleich mit dem Substrat Palmityl-CoA gefunden [68]. Dies unterstützt das hier beobachtete Verhältnis der katalytischen Effizienzen der COT für Dekanyl-CoA: Palmityl-CoA von 9:1. Für das Substrat Lauryl-CoA wurde von Miyazawa et al. (1983) eine 4fach höhere Aktivität der COT im Vergleich zu Palmityl-CoA beschrieben, dies differiert mit dem hier berechneten Verhältnis von 3:4. Allerdings wurden die genannten Ergebnisse an isolierten Hepatozyten gefunden [68]. Im Sediment zeigt sich ebenfalls ein zweigipfliger Verlauf an mit Maxima bei Dekanyl-CoA und Myristyl-CoA/Palmityl-CoA (*Abb.26*). Eine Vermutung für das erste Maximum ist die Anwesenheit von membrangebundenen Acyltransferasen mit einer Aktivität für mittellangkettige Fettsäuren, dies ist jedoch rein spekulativ. Eventuell sind auch bei der CPT Konformationsänderungen möglich die dieses Enzym zum spezifischen Umsatz von mittellangkettigen Fettsäureestern befähigen. Eindeutig scheint der schlechte Umsatz des Substrates Lauryl-CoA zu sein. Im Vergleich der katalytischen Effizienzen zeigte sich im Gesamthomogenat und im Sediment die geringste katalytische Effizienz für das Substrat Lauryl-CoA, lediglich im Überstand war sie für Stearyl-CoA noch niedriger (*Abb. 25, 26,27*). Im Vergleich der getrennten Fraktionen wird deutlich, dass nur für die Substrate Oktanyl-CoA und Dekanyl-CoA die Transferasen des Überstandes eine höhere katalytische Effizienz haben und ab dem Substrat Lauryl-CoA sich dieses Verhältnis umdreht. Das Verhältnis der katalytischen Effizienzen von membrangebundenen zu löslichen Transferasen verschiebt sich mit zunehmender Kettenlänge des Acyl-CoA-Esters immer mehr in Richtung der membrangebundenen Transferasen (*Abb. 24*).

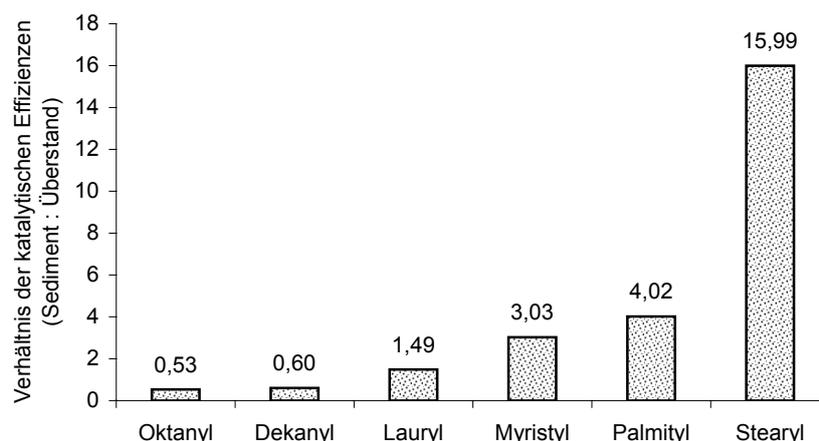


Abb.24: Dargestellt sind die Verhältnisse der katalytischen Effizienzen der löslichen zu den nicht löslichen Carnitin-Acyltransferasen.

Abb.25:

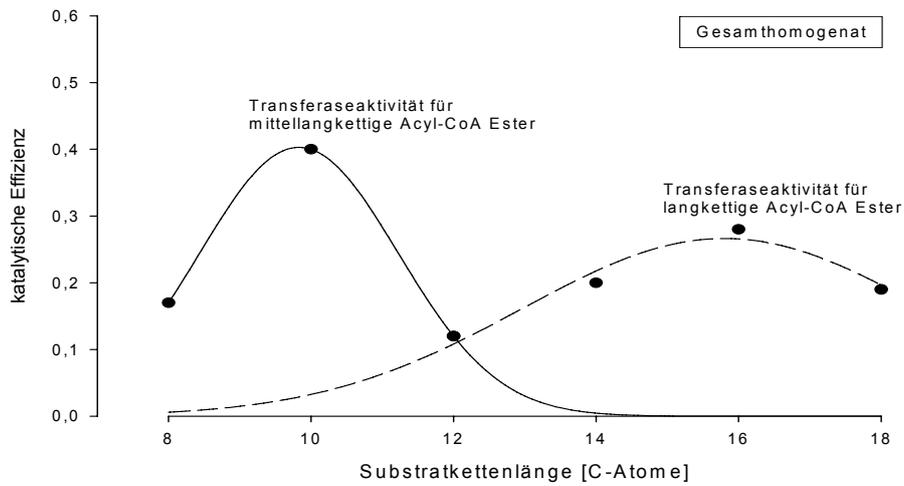


Abb.26:

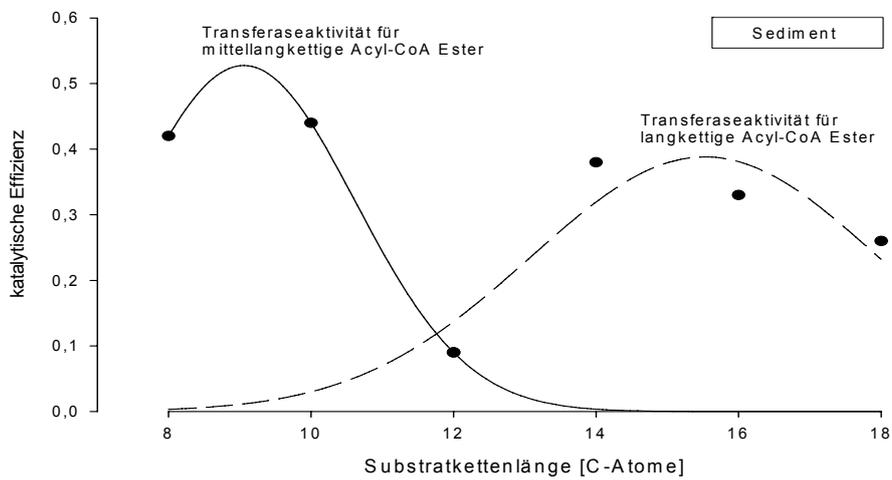


Abb.27:

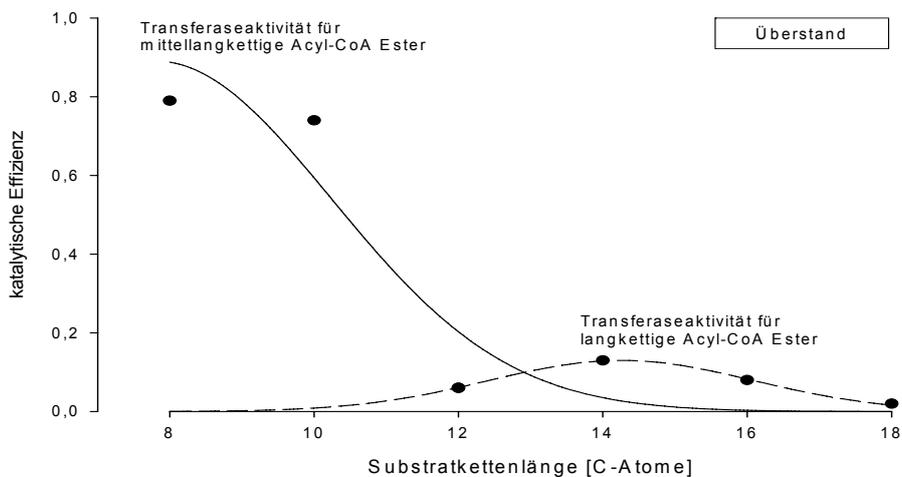


Abb.25,26,27: Katalytische Effizienzen der Gesamtheit (Abb.25) sowie der membrangebundenen (Abb.26) und löslichen (Abb.27) Transferasen des menschlichen Skelettmuskels. Hypothetische Darstellung zweier sich überlappender Acyltransferase-Aktivitäten.

5.5 Hemmung der Carnitin-Acyltransferasen durch Malonyl-CoA

Ein wichtiger Regulator im Fettstoffwechsel ist das Malonyl-CoA, welches als Ausgangspunkt der Fettsäuresynthese die entgegen gerichtete β -Oxidation unterdrückt. So gilt es als wichtiger Inhibitor der Carnitin-Palmityltransferase. Außerdem ist die Aktivität der Carnitin-Oktanyltransferase durch Malonyl-CoA hemmbar [8]. Bei Zugabe von Malonyl-CoA zum gesamten Muskelhomogenat kommt es nicht nur zur Aktivitätsminderung der CPT, sondern auch der COT und eventuell noch weiterer Malonyl-CoA sensitiver Carnitin-Acyltransferasen. In bisherigen Studien zur Hemmbarkeit der CPT wurde die COT nicht mit berücksichtigt [42]. Ein Ziel der Arbeit war es, herauszufinden in wieweit sich die Hemmbarkeit der Acyltransferase-Aktivitäten in den, durch Ultrazentrifugation getrennten, Fraktionen unterscheidet.

Geht man davon aus, dass sich im Sediment, die an die Mitochondrienmembran gebundene CPT I und CPT II befindet, so würde die Aktivität nach bisherigen Erkenntnissen um circa zwei Drittel gehemmt werden [42]. Wenn die COT auch Malonyl-CoA sensitiv ist, dann würde man bei Abtrennung dieser ein anderes Verhältnis von Malonyl-CoA sensitiver zu nicht sensitiver CPT erwarten.

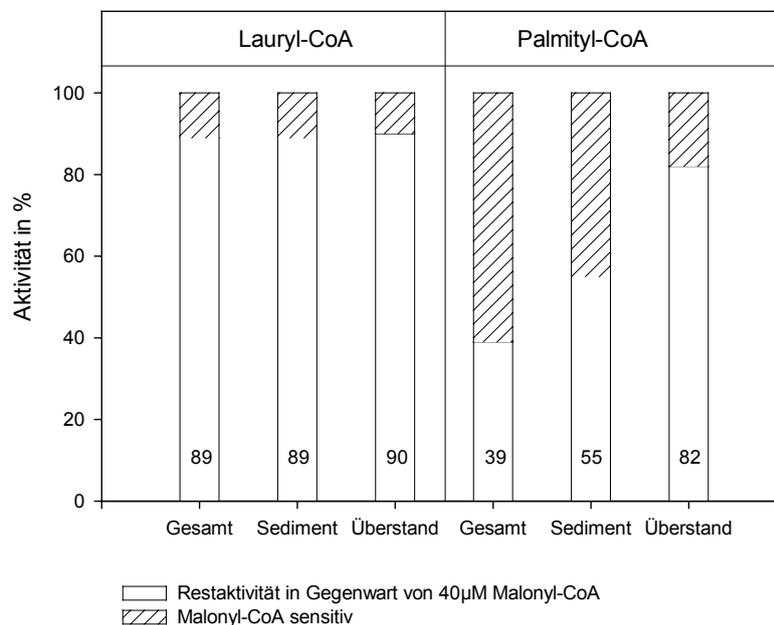


Abb.28: Restaktivität der Carnitin-Acyltransferasen für die Substrate Lauryl-CoA und Palmityl-CoA bei Hemmung mit 40 μM Malonyl-CoA (angegeben in Prozent in den Säulen). Verglichen wurden die Transferaseaktivitäten des Gesamthomogenats mit der löslichen und unlöslichen Fraktion.

Wie in *Abbildung 28* dargestellt, kam es im gesamten Muskelhomogenat zu einem stärkeren Abfall der Carnitin-Transferaseaktivität für Palmityl-CoA, als dies im Sediment der Fall war. Daraus könnte man schlussfolgern, dass die, im Gesamthomogenat befindliche, Malonyl-CoA sensitive Transferaseaktivität sich aus der CPT (I) und der COT zusammensetzt. Allerdings bestünde auch die Möglichkeit einer weiteren Malonyl-CoA sensitiven Transferaseaktivität, die sich nach Zentrifugation ebenfalls im Überstand befindet. So wurde zum Beispiel eine an die Mikrosomenmembran gebundene Malonyl-CoA sensitive Transferaseaktivität postuliert [89]. Aber auch am rauen und glatten endoplasmatischen Retikulum wird eine Malonyl-CoA sensitive Carnitin-Acyltransferase vermutet [57]. Diese ist weder mit der CPT noch mit der COT identisch und stellt so eine weitere Acyltransferase-Aktivität für mittel bis langkettige Fettsäureester dar. Lilly et al. konnten zeigen, dass diese mikrosomale Transferase stark hemmbar durch Malonyl-CoA ist. So wurde die Aktivität mit dem Substrat Dekanyl-CoA bei einer Konzentration von $17\mu\text{M}$ Malonyl-CoA vollständig gehemmt [57].

Somit ist der hemmbare Anteil der CPT nicht wie bisher vermutet zwei Drittel, sondern nur circa 45 Prozent. Geht man also davon aus, dass im Sediment nur die CPT I Malonyl-CoA sensitiv ist, könnte man vermuten, dass sich die gesamte CPT-Aktivität etwa 1:1 aus CPT I und CPT II zusammensetzt.

Auch die Rolle der Acyl-CoA-Synthetase, der eine Transferaseaktivität zugeschrieben wird, könnte auf die gegebene Konstellation einen Einfluss haben [73]. Die Hemmbarkeit der Transferaseaktivität durch Malonyl-CoA ist im Gesamthomogenat und auch im Sediment für das Substrat Palmityl-CoA am stärksten ausgeprägt, sodass man daraus schließen könnte, dass es sich bei dieser um die CPT handelt.

Zur genaueren Untersuchung der Malonyl-CoA Sensitivität der Acyltransferasen wurde das Substrat Lauryl-CoA dem Enzym angeboten. Für dieses Substrat ist die Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) im Gesamthomogenat etwas höher als für Palmityl, allerdings ist die katalytische Effizienz wesentlich geringer.

Der inhibitorische Effekt des Malonyl-CoA fiel für das Substrat Lauryl-CoA sowohl im Gesamthomogenat, als auch im Überstand und Sediment wesentlich geringer aus. Außerdem könnte man erwarten, dass sich im Sediment für Lauryl ein ähnliches Verhältnis von sensitiver zu nicht sensitiver Transferaseaktivität zeigt. In der Fraktion der löslichen Transferasen ist die Aktivitätsminderung mit $40\mu\text{M}$ Malonyl-CoA für Lauryl-CoA fast genau so stark ausgeprägt wie bei dem Substrat Palmityl-CoA. Dieser vergleichbar hohe Aktivitätsverlust des Überstandes bei Lauryl und Palmityl lässt sich durch eine ähnliche katalytische Effizienz der löslichen Acyltransferase für diese Substrate erklären. Hingegen ist

die katalytische Effizienz der nicht löslichen CPT für Palmityl-CoA wesentlich höher als für Lauryl-CoA. Damit konform geht die Beobachtung, dass sich die im Sediment befindliche CPT bei der Umsetzung des Substrates Lauryl-CoA nur zu 11% durch Malonyl-CoA hemmen lässt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich im Sediment außer der CPT noch weitere Acyltransferasen befinden, die Lauryl verestern und wenig Malonyl-CoA sensitiv sind. Dennoch deuten die Ergebnisse eher darauf hin, dass Lauryl-CoA hauptsächlich von der löslichen Acyltransferase-Aktivität umgesetzt wird und diese nur zu circa 10 % Malonyl-CoA sensitiv ist.

Insgesamt lassen sich folgende Schlüsse in Bezug auf die Malonyl-CoA-Sensitivität zusammenfassen:

1. Sowohl die nicht lösliche, als auch die lösliche Transferaseaktivität besitzen einen Malonyl-CoA sensitiven und einen nicht sensitiven Anteil.
2. Die Malonyl-CoA Sensitivität ist bei der nicht löslichen Transferase stärker ausgeprägt.
3. Die Hemmbarkeit der Transferasen ist im gesamten Homogenat und im Sediment am stärksten für das Substrat Palmityl-CoA.
4. Im Überstand sind die hemmbaren Anteile bei beiden Substrate vergleichbar.
5. Die Malonyl-CoA sensitive Transferase wird hauptsächlich durch die CPT repräsentiert.
6. Auch die COT ist Malonyl-CoA sensitiv, allerdings in geringerem Maße als die CPT.

5.6 Zusammenfassende Gegenüberstellung von Gesamthomogenat, Sediment und Überstand

Im zusammenfassenden Vergleich der Substrate zeigen sich eine stetig abnehmende maximale Aktivität und ein abnehmender Km-Wert bei zunehmender Kettenlänge (*Abb. 29*). Am wahrscheinlichsten tragen zu den beobachteten Aktivitäten die CPT I und II der Mitochondrien, die COT der Peroxisomen und eine Carnitin-Acyltransferase der Mikrosomen und des endoplasmatischen Retikulums (die weder mit der COT noch mit der mitochondrialen CPT identisch ist) bei [57]. Nach einer Studie von Guzman und Geelen (1992) soll sich die Gesamtaktivität zu 75 Prozent aus mitochondrialer CPT-Aktivität und zu 25 Prozent aus peroxisomaler Transferaseaktivität zusammensetzen [38]. Allerdings wurden in genannter Arbeit die beiden Aktivitäten nach Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA und TDGA getrennt

(als CPT I wurde eine Malonyl-CoA und TDGA sensitive Transferaseaktivität und als COT eine Malonyl-CoA sensitive und TDGA insensitive Aktivität angenommen). Die Rolle der Acyltransferasen der Mikrosomen wurde nicht berücksichtigt. Des Weiteren fanden Abo-Hashema et al. (1999) heraus, dass die mikrosomale Acyltransferase schon bei physiologischen Malonyl-CoA-Konzentrationen gehemmt wird und so die Acylester bevorzugt durch die mitochondriale CPT verstoffwechselt werden [2]. Wird diese jedoch spezifisch gehemmt oder ist mit Substraten überladen, wird die peroxisomale β -Oxidation induziert [49]. So arbeiten die verschiedenen Carnitin-Acyltransferasen Hand in Hand und ihre Regulation erscheint als ein komplexer Zusammenhang aus Induktion und Hemmung durch die verschiedenen Substrate.

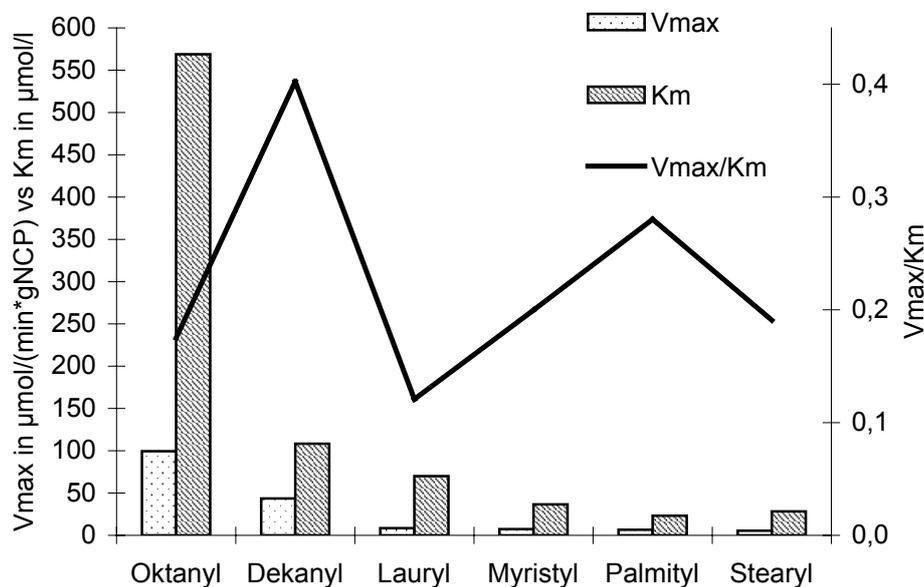


Abb.29: Michaelis-Menten-Konstante, Maximalgeschwindigkeiten und katalytische Effizienzen als Quotient aus beiden (V_{max}/K_m) für die verschiedenen Substrate der Carnitin-Acyltransferasen im Gesamthomogenat.

Der Anteil der Transferaseaktivität der Peroxisomen ist höchst wahrscheinlich nicht statisch, sondern sehr variabel und abhängig von den verschiedenen Versuchsbedingungen.

In den *Abbildungen 30 und 31* sind die Enzymkinetikparameter nach Auftrennung in lösliche und nicht lösliche Fraktion dargestellt. Es ist nicht zu beweisen, ob sich durch diese Auftrennung die Aktivität in den Peroxisomen oder Mitochondrien ändert, da die gegenseitigen Einflüsse der Carnitin-Acyltransferasen dadurch wegfallen.

Abb.: 30

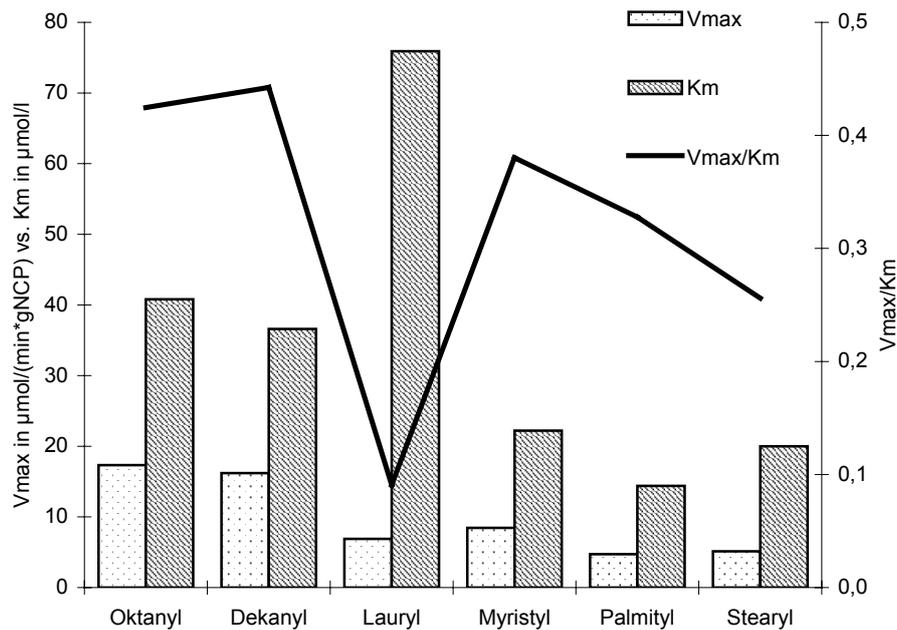


Abb.31:

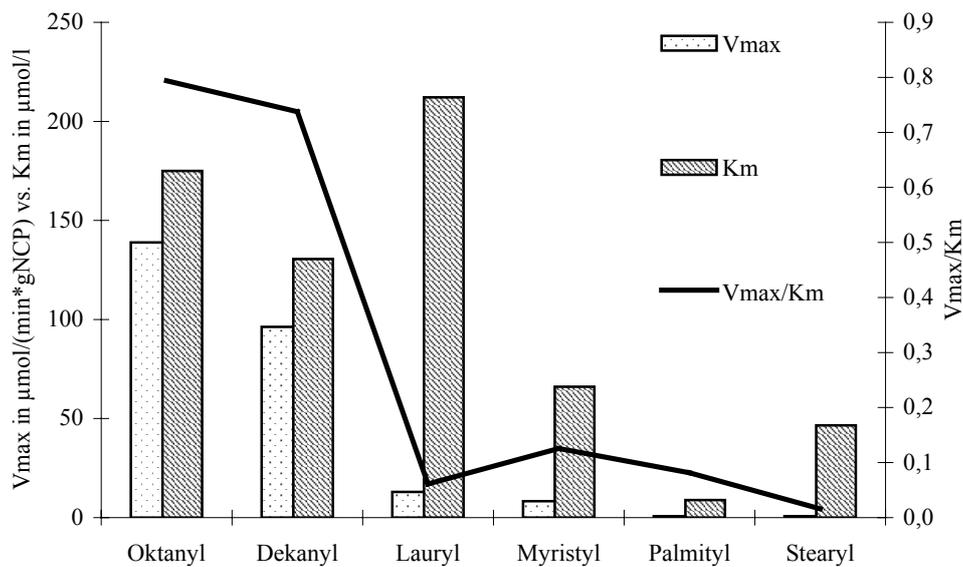


Abb.30 und 31: Dargestellt sind die Michaelis-Menten-Konstante, die Maximalgeschwindigkeit und die katalytischen Effizienz als Quotient aus beiden (V_{max}/K_m) für die verschiedenen Substrate der nicht löslichen Carnitin-Acyltransferase im Sediment (Abb. 30) und der löslichen Carnitin-Acyltransferase im Überstand (Abb. 31).

Durchgängig nachzuweisen war die schlechte katalytische Effizienz für das Substrat Lauryl-CoA. Auch die Affinität der Carnitin-Acyltransferasen aller Fraktionen war für dieses Substrat am geringsten (siehe die hohen K_m -Werte). Eventuell trägt die Kettenlänge von 12

Kohlenstoffatomen, die weder Palmitoyl-CoA (16 C-Atome) noch Oktanoyl-CoA (8 C-Atome) nahe kommt zu dieser schlechten Affinität bei. Diese Ergebnisse widersprechen deutlich den Beobachtungen von Schäfer et al. (1997), die mit peripheren Blutzellen und Fibroblasten gemacht wurden [85]. In allen untersuchten Fraktionen ist die Aktivität und die katalytische Effizienz der Transferasen für Oktanoyl-CoA und Dekanoyl-CoA am höchsten.

Dies könnte bei der COT durch die Größe der Tasche, in der das Substrat gebunden wird, erklärt werden, denn bei Substraten die längerkettig sind fällt die maximale Umsatzgeschwindigkeit ab. Wahrscheinlich muss das Enzym erst seine Konformation ändern, damit auch langkettige Fettsäuren gebunden werden können (siehe Abschnitt 1.5.3).

Im Falle der membrangebundenen Transferasen wird die schlechte Spezifität der Enzyme für die mittellangkettigen Fettsäureester durch eine höhere maximale Umsatzgeschwindigkeit ausgeglichen. Eine mögliche Erklärung für die hohen beobachteten Umsatzgeschwindigkeiten bei der CPT wäre der leichtere Zugang des relativ kleinen Substrates Oktanoyl-CoA zum katalytischen Zentrum.

6. Zusammenfassung

Die Aktivitätsbestimmung der Carnitin-Acyltransferasen aus menschlichem Skelettmuskel erfolgt zur Diagnostik eines CPT-Mangels routinemäßig mit dem Substrat Palmityl-CoA. Im menschlichen Skelettmuskel befindet sich neben der CPT auch die COT, die eine Aktivität für mittellangkettige Fettsäuren besitzen soll. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Aktivitäten der CPT und COT überlappen und für welches Substrat ihre Aktivität maximal ist. Dazu wurden Fettsäuren mit Kettenlängen von 8 bis 18 Kohlenstoffatomen in steigenden Konzentrationen bis hin zu einer Sättigung/Hemmung den Transferasen angeboten und mittels Isotopen-Vorwärts-Reaktion die Bildung der Carnitin[C14]-Acylester im Szintillationscounter gemessen. Da die CPT membrangebunden vorliegt, während die COT löslich ist, war eine getrennte Untersuchung beider Enzyme nach Zentrifugation des Muskelhomogenats bei 182000g möglich. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm KaleidaGraph, es wurden die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten, die Michaelis-Menten-Konstanten und die katalytischen Effizienzen berechnet. Sofern eine Substrathemmung erfolgte, wurden auch Hemmkonzentrationen berechnet. Im Gesamthomogenat fielen mit steigender Kettenlänge der Fettsäuren die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten. Der Km-Wert war für das Substrat Palmityl-CoA (C16-CoA) stets am geringsten und für das Substrat Lauryl-CoA (C12-CoA) in Sediment und Überstand am höchsten. Die katalytische Effizienz zeigte im Gesamthomogenat für das Substrat Dekanyl-CoA ein Maximum, ein weiteres Maximum war für Palmityl-CoA zu beobachten. In den getrennten Fraktionen blieb das erste Maximum bei Oktanyl-CoA und Dekanyl-CoA, während sich das zweite von C16-CoA auf C14-CoA verlagerte. Die berechneten Hemmkonzentrationen waren im Verlauf unübersichtlich, sodass daraus in dieser Arbeit keine Schlüsse gezogen werden sollen. Die Umsatzgeschwindigkeiten sind bei den mittellangkettigen Acyl-CoA-Estern bei beiden Transferasen maximal, wobei die löslichen Transferasen die nicht löslichen bei Weitem übertreffen. Dies ändert sich ab einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen, hier überwiegt die Aktivität der nicht löslichen Transferasen. Somit zeigen die COT und die CPT überlappende Aktivitäten mit ihren Maxima bei mittellangkettigen (COT: C8-CoA, C10-CoA) und langkettigen Fettsäuren (CPT: C14-CoA, C16-CoA). Palmityl-CoA nimmt von den untersuchten Substraten eine Sonderstellung ein, da die verschiedenen Carnitin-Acyltransferasen zu diesem Substrat die höchste Affinität haben und ein effektiver Umsatz auch bei physiologischen Konzentrationen anzunehmen ist. Palmityl-CoA ist zur Diagnostik eines CPT-Defektes das optimale Substrat mit dem man spezifisch die Aktivität der CPT erfassen kann.

7. Literaturverzeichnis

- [1] A'bhaird N. and Ramsay R.R.: "Malonyl-CoA inhibition of peroxisomal carnitine octanoyltransferase." *Biochem. J.* (1992) pp. 637-640
- [2] Abo-Hashema K.A., Cake, M.H., Lukas, M.A., Kudsens,J.: "Evaluation of the affinity and turnover number of both hepatic mitochondrial and microsomal carnitine acyltransferases: relevance to intracellular partitioning of acyl-CoAs." *J.Biochemistry* 48 (1999) pp 15840-15847
- [3] Benett M.J. and Narayan S.B.: "Carnitine Palmitoyltransferase 1A Deficiency" www.genetests.org (2005)
- [4] Bieber L.L.: "Carnitine." *Annu. Rev. Biochem.* , 57 (1988) pp 261-283
- [5] Bird M.I., Munday L.A., Saggerson E.D., et al.: "Carnitine acyltransferase activities in rat brain mitochondria. Bimodal distribution, kinetic constants, regulation by malonyl-CoA and developmental pattern." *Biochem. J.* , 226 (1985) pp 323-330
- [6] Bird M.I. and Saggerson E.D.: "Binding of malonyl-CoA to isolated mitochondria. Evidence for high- and low-affinity sites in liver and heart and relationship to inhibition of carnitine palmitoyltransferase activity." *Biochem. J.*, 222 (1984) pp 639-647
- [7] Bonnefont Jp T.F., Cavadini P, Capanec C, Brivet M, Saudubray Jm, Leroux Jp, Demaugre F: "Molecular analysis of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatocardiomyocardial expression." *Am J Hum Genet* 58 (1996) pp. 971-978
- [8] Brady P.S., Ramsay,R.R., Brady, L.J.: "Regulation of the long chain carnitine acyltransferases." *FASEB, J.* 7 (1993) pp 1039-1044
- [9] Bremer J., Norum, R.: "The Mechanism of Substrate Inhibition of Palmitoyl Coenzyme A: Carnitine Palmitoyltransferase by Palmitoyl Coenzyme A" *J. Biol. Chem.* , 8 (1967) pp. 1744-1748

- [10] Bremer J., Woldegiorgis G., Schalinske K., et al.: "Carnitine palmitoyltransferase. Activation by palmitoyl-CoA and inactivation by malonyl-CoA." *Biochim. Biophys. Acta* , 833 (1985) pp 9-16
- [11] Brown N.F., Anderson R.C., Caplan S.L., et al.: "Catalytically important domains of rat carnitine palmitoyltransferase II as determined by site-directed mutagenesis and chemical modification. Evidence for a critical histidine residue." *J. Biol. Chem.* , 269 (1994) pp 19157-19162
- [12] Brown N.F., Esser V., Gonzalez A.D., et al.: "Mitochondrial import and processing of rat liver carnitine palmitoyltransferase II defines the amino terminus of the mature protein. Possibility of differential modification of the rat and human isoforms." *J. Biol. Chem.* 266 (1991) pp 15446-15449
- [13] Brown N.F., Weis B.C., Husti J., et al.: "Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart." *J Biol Chem.*, 270 (1995) pp. 8952-8957
- [14] Campbell S.E., Tandon N.N., Woldegiorgis G., et al.: "A Novel Function for Fatty Acid Translocase (FAT)/ CD 36" *J. Biol. Chem.* , 279 (2004) pp 36235-36241
- [15] Casari G., Sander C. and Valencia A.: "A method to predict functional residues in proteins." *Nat. Struct. Biol.* , 2 (1995) pp 171-178
- [16] Chase J.F. and Tubbs P.K.: "Some kinetic studies on the mechanism of action of carnitine acetyltransferase" *Biochem J* 1 (1966) pp. 32-40
- [17] Chase J.F.A.: "The substrate specificity of carnitine acetyltransferase." *Biochem J.* 104 (1967) pp. 510-518
- [18] Coe N.R. and A.J. Smith B.I.F., P.A. Watkins and D.A. Bernlohr": "The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase." *J Biol Chem.* 274 (1999) pp. 36300-36304

- [19] Cook G.A.: "Differences in the sensitivity of carnitine palmitoyltransferase to inhibition by malonyl-CoA are due to differences in K_i values." *J. Biol. Chem.* , 259 (1984) pp 12030-12033
- [20] Cook G.A., Mynatt, R. L., and Kashfi, K.: "Yonetani-Theorell analysis of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I inhibition indicates two distinct inhibitory binding sites." *J. Biol. Chem.* , 269 (1994) pp 8803-8807
- [21] Cronin C.N.: "The conserved serine-threonine-serine motif of the carnitine acyltransferases is involved in carnitine binding and transition-state stabilization: a site-directed mutagenesis study." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 238 (1997) pp 784-789
- [22] Dai J., Zhu, H., Shi, J., Woldegiorgis, G.: "Identification by mutagenesis of conserved arginine and tryptophan residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I important for catalytic activity." *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 22020-22024
- [23] Dean D., Daugaard, J. R., Young, M. E., Saha, A., Vavvas, D., Asp, S., Kiens, B., Kim, K. H., Witters, L., Richter, E. A., and Ruderman, N.: "Exercise diminishes the activity of acetyl-CoA carboxylase in human muscle." *Diabetes* 49, (2000) pp. 1295-1300
- [24] Deschauer M W.T., Zierz S: " Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: clinical and molecular genetic features and diagnostic aspects." *Arch Neurol* 62 (2005) pp. 37-41
- [25] Dodson G., Wlodawer, A.: "Catalytic triads and their relatives." *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998) pp. 347-352
- [26] Drynan L. and Zammit P.A.Q.A.V.A.: "Flux control exerted by mitochondrial outer membrane carnitine palmitoyltransferase over beta-oxidation, ketogenesis and tricarboxylic acid cycle activity in hepatocytes isolated from rats in different metabolic states." *Biochem. J.*, 317 (1996) pp. 791-795
- [27] Eaton S.: "Control of mitochondrial β -oxidation flux." *Prog. Lipid. Res.* pp 97-239 (2002)

- [28] Esser V.B., C.H., Weis, B.C., Foster, D.W., McGarry, J.D.: "Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function." *J. Biol.Chem.*, 268 (1993) pp 5817-5822
- [29] Farrell S.O., Fiol, C.J., Reddy, J.K., Bieber, L.L.: "Properties of purified carnitine acyltransferases of mouse liver peroxisomes." *J.Biol.Chem.*, 259 (1984) pp13089-13095
- [30] Ferdinandusse S., Mulders, J., Ijlst, L., Denis, S., Dacremont, G., Waterham, H.R., Wanders, R.J.A.: "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.Res.Comm.* 263 (1999) pp.213-218
- [31] Finocchiaro G., Taroni, F., Rocchii, M., Martin, A.L., Colombo, I., Tarelli, G.T., Didonato, S.: "cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 88 (1991) pp 661-665
- [32] Fiol C.J., Kerner, J., Bieber, L.L.: "Effect of malonyl-CoA on the kinetics and substrate cooperativity of membrane-bound carnitine palmitoyltransferase of rat heart mitochondria." *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1987) pp 482-492
- [33] Fraser F., Corstorphine, C. G., and Zammit, V. A: "Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane" *Biochem. J.*, 323 (1997) pp 711-718
- [34] Frohnert B.I.A.D.A.B.: "Regulation of fatty acid transporters in mammalian cells." *Prog Lipid Res.* 39 (2000) pp. 83-107
- [35] Fujino T. and K. Manjong H.M., H. Suzuki and T.T. Yamamoto: "Alternative translation initiation generates acyl-CoA synthetase 3 isoforms with heterogeneous amino termini." *J Biochem.* 122 (1997) pp. 212-216
- [36] Fujino T. and M.J. Kang H.S., H. Iijima and T. Yamamoto: "Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3." *J Biol Chem.*, 271 (1996) pp. 16748-16752

- [37] Grantham B.D., and Zammit, V. A.: "Binding of [14C]malonyl-CoA to rat liver mitochondria after blocking of the active site of carnitine palmitoyltransferase I. Displacement of low-affinity binding by palmitoyl-CoA." *Biochem. J.*, 233 (1986) pp 589-593
- [38] Guzman M., Geelen, M.J.: "Activity of carnitine palmitoyltransferase in mitochondrial outer membranes and peroxisomes in digitonin-permeabilized hepatocytes. Selective modulation of mitochondrial enzyme activity by okadaic acid." *J Biochem.* 287 (1992) pp 487-492
- [39] Hamilton J.A.A.F.K.: "How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?" *Diabetes* 48 (1999) pp. 2255-2269
- [40] Harmon C.M. and P. Luce A.H.B.A.N.A.A.: "Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport." *J Membr Biol.* , 121 (1991) pp. 261-268
- [41] Herrmann T. and F. Buchkremer I.G., A.M. Hall, D.A. Bernlohr and W. Stremmel: "Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase." *Gene*, 270 (2001) pp. 31-40
- [42] Hertel K.: "Differenzierung von CPT I und CPT II in menschlichen Skelettmuskelbiopsien durch L-Aminocarnitin und Malonyl-CoA" *Aktuelle Neurologie* (1998)
- [43] Igal R.A. and Coleman P.W.A.R.A.: "Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA." *Biochem. J.* 324 (1997) pp. 529-534
- [44] Isackson Pj B.M., Vladutiu Gd: "Identification of 16 new diseasecausing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency." *Mol Genet Metab* 89 (2006) pp. 323-331

- [45] Jackson V.N., Price, N. T., and Zammit, V. A.: "Specificity of the interactions between Glu-3, Ser-24, and Gln-30 within the N-terminal segment of rat liver mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase (L-CPT I) in determining the malonyl-CoA sensitivity of the enzyme." *Biochemistry* 40 (2001) pp. 14629-11463
- [46] Jackson V.N., Zammit, V. A., and Price, N. T.: "Identification of positive and negative determinants of malonyl-CoA sensitivity and carnitine affinity within the amino termini of rat liver- and muscle-type carnitine palmitoyltransferase I." *J. Biol. Chem.* 275, (2000) pp. 38410-38416
- [47] Jogl G., Tong, L.: "Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport." *Cell* , 112 (2003) pp 113-122
- [48] Jogl G., Hsiao, Y., Tong, L.: "Crystal Structure of Mouse Carnitine Octanoyltransferase and Molecular Determinants of Substrate Selectivity" *J.Biol.Chem.* , 280 (2004) pp 738-744
- [49] Kaikaus R.M., Sui, Z., Lysenko, N., Nan Yan Wu, Ortiz De Montellano, P.R., Ockner, R.K., Bass, N.M.: "Regulation of Pathways of Extramitochondrial Fatty Acid Oxidation and Liver Fatty Acid-binding Protein by Long-chain Monocarboxylic Fatty Acids in Hepatocytes." *J.Biol. Chem.* , 36 (1993) pp 26866-26871
- [50] Kaneoka H U.N., Moriguchi a, Hirose S, Takayanagi M, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Yasuno and T S.Y., Saito T: "Carnitine palmitoyltransferase II deficiency due to a novel gene variant in a patient with rhabdomyolysis and ARF." *Am J Kidney Dis* 45 (2005) pp. 596-602
- [51] Kang M.J. and T. Fujino H.S., H. Minekura, N. Yabuki, H. Nagura, H. Iijima and T.T. Yamamoto: "A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis." *Proc Natl Acad Sci.*, 94 (1997) pp. 2880-2884
- [52] Kashfi K., Mynatt, R. L., and Cook, G. A.: "Hepatic carnitine palmitoyltransferase-I has two independent inhibitory binding sites for regulation of fatty acid oxidation." *Biochim. Biophys. Acta* , 1212 (1994) pp 245-252
- [53] Kerner J. and Hoppel C.: "Fatty Acid Import into Mitochondria." *Biochem. Biophys. Acta* 1486 (2000) pp. 1-17

- [54] Kim J.H. and Coleman T.M.L.A.R.A.: "Expression and characterization of recombinant rat Acyl-CoA synthetases 1, 4, and 5. Selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones." *J Biol Chem.*, 276 (2001) pp. 24667-24673
- [55] Kornberg A.A.W.E.P.: "Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty acids." *J Biol Chem.*, 204 (1953) pp. 329-343
- [56] Lewin T.M. and J.H. Kim D.A.G., J.E. Vance and R.A. Coleman: "Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently." *J Biol Chem.*, 276 (2001) pp. 24674-24679
- [57] Lilly K., Bugaisky, G.E., Umeda, P.K., Bieber, L.L.: "The medium-chain carnitine acyltransferase activity associated with rat liver microsomes is malonyl-CoA sensitive." *Arch. Biochem. Biophys.* , 1 (1990) pp 167-174
- [58] Luiken J.J., Turcotte, L. P., and Bonen, A.: "Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles." *J. Lipid Res.* 40, (1999) pp. 1007-1016
- [59] Lupp D.: "Contribution of L-Carnitine in the Regulation of Metabolism of Lipids and Carbohydrates" *KCS* 5 (2004) pp. 25-34
- [60] McArthur M.J. and B.P. Atshaves A.F., W.D. Foxworth, A.B. Kier and F. Schroeder: "Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids." *J Lipid Res.* , 40 (1999) pp. 1371-1383
- [61] McGarry J.D., and Brown, N. F.: "The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis." *Eur. J. Biochem.*, 244 (1997) pp 1-14
- [62] McGarry J.D., Leatherman, G. F., and Foster, D. W.: "Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA." *J. Biol. Chem.* , 253 (1978) pp. 4128-4136

- [63] McGarry J.D., Sen, A., Brown, N.F., Esser, V., Weis, B.C., Foster, D.W.: "Current Concepts in Carnitine Research (Carter, A.L. ed)" CRC Press, Boca Raton, FL (1992) pp. 137-151
- [64] McGarry J.D., Woeltje, K.F., Kuwajima, M., and Foster, D. W.: "Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase." *Diabetes Metab Rev.* , 5 (1989) pp 271-284
- [65] McGarry J.D.A.F., D.W.: "Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production." *Ann.Rev.Biochem.* , 49 (1980) pp. 395-420
- [66] Mcmillin J.B., Wang, D., Witter, L.A., Buja, L.M.: "Kinetic properties of carnitine palmitoyltransferase I in cultured neonatal rat cardiac myocytes." *Arch Biochem Biophys.* 312(2) (1994) pp. 375-384
- [67] Mills S.E., Foster, D. W., and McGarry, J. D.: "Effects of pH on the interaction of substrates and malonyl-CoA with mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I." *Biochem. J.* 219, (1984) pp 601-608
- [68] Miyazawa S., Ozasa H., Furuta S., et al.: "Purification and properties of carnitine acetyltransferase from rat liver" *J Biochem (Tokyo)* 2 (1983) pp. 439-451
- [69] Morillas M., Clotet, J., Rubi, B., Serra, D., Arino, J., Hegardt, F., G., Asins, G.: "Inhibition by etomoxir of rat liver carnitine octanoyltransferase is produced through the co-ordinate interaction with two histidine residues." *Biochem.J.* 351 (2000) pp 495-502
- [70] Morillas M., Gomez-Puertas, P., Roca, S., Serra, D., Asins, G, R., Valencia, A., Hegardt, F.G . "Structural Model of Catalytic Core of Carnitine Palmitoyltransferase I and Carnitine Octanoyltransferase (COT)" *J. Biol. Chem.* , 276 (2001) pp 45001-45008
- [71] Morillas M., Gomez-Puertas, Rubi, B., Clotet, J., Arino, J., Valencia, Alfonso, Hegardt, F.G . Serra, D., Asins, G, R.: "Structural Model of a Malonyl-CoA-binding Site of Carnitine Octanoyltransferase and Carnitine Palmitoyltransferase I" *J. Biol. Chem.* , 277 (2002) pp 11473-11480

- [72] Morillas M., Lopez-Vinas, E., Valencia, A., Serra, D., Gomez-Puertas, P., Hegardt, F.G., Asins, G.: "Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal." *Biochem J.* , 379 (2004) pp 777-784
- [73] Muoio D.M. and T.M. Lewin P.W.A.R.A.C.: "Acyl-CoAs are functionally channeled in liver: potential role of acyl-CoA synthetase." *Am. J. Physiol.*, 279 (2000) pp. E1366-E1373
- [74] Murthy M.S.R., Bieber, L.L.: "Purification of the medium chain/ long chain (COT/CPT) carnitine acyltransferase of rat liver microsomes." *Protein Exp. Purif.* , 3 (1992) pp 75-79
- [75] Murthy M.S.R., Pande, S.V.: "Malonyl-CoA sensitive and -insensitive carnitine palmitoyltransferase activities of microsomes are due to two different proteins." *J. Biol. Chem.* , 269 (1994) pp 26443-26448
- [76] Norum K.R. and Bremer M.F.A.J.: "The submitochondrial distribution of acid:CoA ligase (AMP) and palmityl-CoA:carnitine palmityltransferase in rat liver mitochondria." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22 (1966) pp. 797-804
- [77] Odland L.M., Heigenhauser, G. J., Lopaschuk, G. D., and Spriet, L. L.: "Human skeletal muscle malonyl-CoA at rest and during prolonged submaximal exercise." *Am. J. Physiol.*, 270 (1996) pp E541-E544
- [78] Odland L.M., Heigenhauser, G. J., Wong, D., Hollidge-Horvat, M. G., and Spriet, L. L.: "Effects of increased fat availability on fat-carbohydrate interaction during prolonged exercise in men." *Am. J. Physiol.* 274 (1998) R894-R902
- [79] Oikawa E. and H. Iijima T.S., H. Sasano, H. Sato, A. Kamataki, H. Nagura, M.J. Kang, T. Fujino, H. Suzuki and T.T. Yamamoto: "A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes." *J Biochem.*, 124 (1998) pp. 679-685
- [80] Oram J.F. and Neely J.I.W.A.J.R.: "Regulation of long chain fatty acid activation in heart muscle." *J Biol Chem.* , 250 (1975) pp. 73-78

- [81] Pazos F., Sanchez-Pulido,L., Garcia-Ranea, J.A., Andrade, M.A., Atrian, S., Valencia, A. In Biocomputing and Emergent Computation (Lundh, D., Olsson, B., Narayanan, A.): "Biocomputing and Emergent Computation" World Scientific, Singapore (1997) pp.132-145
- [82] Price N.T., Van Der Leij, F.R., Jackson, V.N., Corstorphine, C.G., Thomson, R., Sorensen A., Zammit, V.A.: "A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I." *Genomics*, 80 (2002) pp 433-442
- [83] Ramsay R.R.: "The role of the carnitine system in peroxisomal fatty acid oxidation." *Am.J.Med.Sci.*, 318 (1999) pp 28-35
- [84] 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) pp.166-168
- [85] Schaefer J., Jackson, S., Taroni, F., Swift,P., Turnbull,D.M.: "Characterisation of carnitine palmitoyltransferases in patients with a carnitine palmitoyltransferase deficiency: implications for diagnosis and therapy" *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 62 (1997) pp 169-176
- [86] Schrag J.D., Li, Y.G., Wu,S., Cygler,M.: "Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*." *Nature (London)* , 351 (1991) pp 761-764
- [87] Shi J., Zhu, H., Arvidson, D. N., and Woldegiorgis, G.: "A single amino acid change (substitution of glutamate 3 with alanine) in the N-terminal region of rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA inhibition and high affinity binding." *J. Biol. Chem.* , 274 (1999) pp 9421-9426
- [88] Shi J., Zhu, H., Arvidson, D. N., and Woldegiorgis, G.: "The first 28 N-terminal amino acid residues of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I are essential for malonyl CoA sensitivity and high-affinity binding." *Biochemistry*, 39 (2000) pp 712-717
- [89] Shindo Y.A.T.H.: "Acyl-Coenzyme A synthetase and fatty acid oxidation in rat liver peroxisomes." *J Biochem.* , 84 (1978) pp. 1177-1181

- [90] Sigauke E R.D., Kitson K, Bennett Mj: "Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical, and molecular review." *Lab Invest* 83 (2003) 1543-1554
- [91] Singh H., Beckman, K., Poulos, A.: "Evidenz of two catalytically acitve medium/long chaine carnitine acyltransferases in rat liver peroxisomes" *J.Lipid Res.* , 37 (1996) pp 2616-2626
- [92] Spurway T.D., Sherratt, H.S.A., Pogson, C.I., Agius, L.: "The flux control coefficient of carnitine palmitoyltransferase I on palmitate á-oxidation in rat hepatocate cultures" *J. Biochem.* , 323 (1997) pp 119-122
- [93] Stahl A., R.E. Gimeno, L.A. Tartaglia and H.F. Lodish: "Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family." *Trends Endocrinol Metab* , 12 (2001) pp. 266-273
- [94] Stremmel W. and G. Lotz G.S.A.P.D.B.: "Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes." *J Clin Invest.*, 75 (1985) pp. 1068-1076
- [95] Stremmel W. and G. Strohmeyer F.B., S. Kochwa and P.D. Berk: "Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes." *Proc Natl Acad Sci.*, 82 (1985) pp. 4-8
- [96] Sussmann J.L., Harel,M., Frolow,F., Oefner, C., Goldmann,A., Toker, L., Silman, I.: "Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein." *Siience* , 253 (1991) pp 872-879
- [97] Swanson S.T., Foster, D. W., MCGarry, J. D., and Brown, N. F.: "Roles of the N- and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues." *Biochem. J.* , 335 (1998) pp 513-519
- [98] Taggart Rt S.D., Apolito C, Vladutiu Gd: "Novel mutations associated with carnitine palmitoyltransferase II deficiency." *Hum Mutat* 13 (1999) 210-220

- [99] Tanaka T., and Kawamura, K.: "Isolation of myocardial membrane long-chain fatty acid-binding protein: homology with a rat membrane protein implicated in the binding or transport of long-chain fatty acids." *J. Mol. Cell Cardiol.*, 27 (1995) pp 1613-1622
- [100] Tang P.Z. and Dufau C.H.T.-M.A.M.L.: "Cloning and characterization of a hormonally regulated rat long chain acyl-CoA synthetase." *Proc Natl Acad Sci.* , 98 (2001) pp. 6581-6586
- [101] Taroni F., Verderio E. and Al. E.: "Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients." *Nature genetics* 4 (1993) pp. 314-320
- [102] Thuillier L R.H., Droin V, Demaugre F, Brivet M, Kadhom N, Prip-Buus C, Gobin S, and Saudubray Jm B.J.: " Correlation between genotype, metabolic data, and clinical presentation in carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) deficiency." *Hum Mutat* 21 (2003) pp. 493-501
- [103] Uchiyama A., T. Aoyama, K. Kamijo, Y. Uchida, N. Kondo, T. Orii and T. Hashimoto: "Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase." *J Biol Chem.* , 271 (1996) pp. 30360-30365
- [104] Valesco G., Gomez, D.P., Carling, D., Guzman, M.: "Evidenz that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components." *FEBS. Lett.* , 439 (1998) pp 317-320
- [105] Vladutiu Gd Q.E., Hainline Be, Albers S, Smail Ds, Bennett Mj: "Lethal neonatal and severe late infantile forms of carnitine palmitoyltransferase II deficiency associated with compound heterozygosity for different protein truncation mutations." *J Pediatr* 141 (2002) 734-736
- [106] Weis B.C. and V. Esser D.W.F.A.J.D.M.: "Rat heart expresses two forms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. The minor component is identical to the liver enzyme." *J Biol Chem.* , 269 (1994) pp. 18712-18715
- [107] Wieser T.: "Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency" www.genetests.org (2004)

- [108] Wieser T D.M., Olek K, Hermann T, Zierz S: "Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: molecular and biochemical analysis of 32 patients." *Neurology* 60 (2003) pp. 1351-1353
- [109] Woeltje K.F., Esser,V.,Weis, B.C.,Sen, A .,Cox, W.F.,Mcphaul, M.J.,Slaughter, C.A., Foster, D.W., McGarry, J.D.: "Cloning, Sequencing, and Expression of a cDNA encoding Rat Liver Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase II" *J. Biol.Chem.* , 265 (1990) pp 10720-10725
- [110] Woeltje K.F., Kuwajima M., Foster, D.W., McGarry, J.D.: "Characterization of the Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase Enzyme System." *J. Biol. Chem.* , 262 (1986) pp 9822-9827
- [111] Yamamoto F.A.T.: "Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain." *J Biochem.*, 111 (1992) pp. 197-203
- [112] Yamamoto S A.H., Kohgo T, Ogawa a, Ohtake a, Hayashibe H, Sakuraba H, Suzuki Y, Aramaki and S T.M., Hasegawa S, Niimi H: "Two novel gene mutations (Glu174-->Lys, Phe383-->Tyr) causing the "hepatic" form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency." *Hum Genet* 98 (1996) pp. 116-118
- [113] Yamazaki N., Shinohara, Y., Shima, A., Terada, H.: "High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone." *FEBS Lett.* , 363 (1995) pp 41-45
- [114] Yu G.-S., Lu, Y.-C., Gulick, T.: "Co-regulation of tissue specific alternative human carnitine palmitoyltransferase 1 β gene promoters by fatty acid enzyme substrate." *J.Biol. Chem.* , 273 (1998) pp 32901-32909
- [115] Yu G.-S., Lu, Y.-C., Gulick, T.: "Expression of novel isoforms of carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) generated by alternative splicing of the CPT I ? gene." *J. Biochem* , 334 (1998) pp 225-231
- [116] Yu G.-S., Lu, Y.-C., Gulick, T.: "Rat carnitine palmitoyltransferase 1? mRNA splicing isoforms." *Biochem. Biophys. Acta* , 1393 (1998) pp 166-172

- [117] Zammit V.A.: "Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology." *Prog.Lipid. Res.* , 38 (1999) pp 199-224
- [118] Zammit V.A.: "The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function." *Biochem. J.* , 343 (1999) pp 505-515
- [119] Zammit V.A., Corstorphine, C. G., and Gray, S. R: "Changes in the ability of malonyl-CoA to inhibit carnitine palmitoyltransferase I activity and to bind to rat liver mitochondria during incubation in vitro. Differences in binding at 0 degree C and 37 degrees C with a fixed concentration of malonyl-CoA." *Biochem. J.* 222, (1984) pp 335-342
- [120] Zierz S., and Engel, A. G.: "Different sites of inhibition of carnitine palmitoyltransferase by malonyl-CoA, and by acetyl-CoA and CoA, in human skeletal muscle." *Biochem. J.* , 245 (1987) pp 205-209

8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
CoA	CoenzymA
Cpm	Counts pro Minute
CPT	Carnitin-Palmityltransferase
COT	Carnitin-Oktanyltransferase
CAT	Carnitin-Acyltransferase
AT	Acyltransferase
FG	Feuchtgewicht
NCP	Nichtkollagen-Protein
NaOH	Natriumhydroxid
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
Km	Michaelis-Menten-Konstante
I ₅₀	Hemmkonzentration
RPM	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung

9. Thesen

1. Wird Muskelhomogenat aus menschlichem Skelettmuskel durch Ultrazentrifugation in Sediment und Überstand aufgetrennt so findet sich für die Carnitin-Acyltransferasen der löslichen und nicht löslichen Fraktion eine deutliche Überlappung ihrer Aktivität und Spezifität für die Fettsäure-CoA-Ester mit Kettenlängen von 8 – 18 Kohlenstoffatomen.
2. Die katalytische Effizienz der Acyltransferasen des Muskelhomogenates zeigt zwei Maxima, das erste für Dekanyl-CoA und das zweite für Palmityl-CoA. Die Maxima repräsentieren die Substratspezifitäten der Carnitin-Acyltransferase für mittellangkettige Fettsäuren (COT) und der Carnitin-Acyltransferase für langkettige Fettsäuren (CPT).
3. Die Carnitin-Acyltransferasen des menschlichen Skelettmuskels zeigen für das Substrat Lauryl-CoA die geringste Substratspezifität und die geringste Affinität.
4. Für das Substrat Palmityl-CoA ist die Affinität der Gesamtheit der Carnitin-Acyltransferasen am größten.
5. Palmityl-CoA ist zur Bestimmung der Enzymaktivität der Carnitin-Palmityltransferase das Substrat der ersten Wahl, da man mit diesem Substrat spezifisch die Aktivität der CPT erfasst. Die Aktivität der Carnitin-Oktanyltransferase kann für dieses Substrat vernachlässigt werden.
6. Sowohl die lösliche, als auch die nicht lösliche Carnitin-Acyltransferase sind für den Inhibitor Malonyl-CoA sensitiv, dabei zeigt die nicht lösliche Transferase den größeren Aktivitätsverlust.

Eidesstattliche Erklärung

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

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

Merseburg, Juli 2007

Lebenslauf

Name	Zerbaum, geb. Spindler
Vorname	Franziska
Geburtsdatum	14.05.1982
Geburtsort	Merseburg
Wohnhaft	Mühle 14, 06862 Grochewitz
Familienstand	verheiratet
Eltern	Renate Spindler, geb. 19.01.1944 Lothar Spindler, geb. 10.02.1943

Ausbildungsgang

1992-2000	Domgymnasium Merseburg (Abschluss „sehr gut“)
1999-2000	Häckelstipendium des Domgymnasium Merseburg
01-10/2001	Ausbildung bei der Bundeswehr zum Sanitätsoffizier-Anwärter
seit 10/2001	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
12/2007	Staatsexamen Medizin und Approbation als Ärztin

Danksagung

Herrn Prof. Dr. S. Zierz gilt mein Dank für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas. Überdies danke ich ihm für die großzügige Unterstützung meiner Arbeit und die wertvollen Anregungen bei der Erstellung der Dissertation.

Frau Dr. K. Traufeller möchte ich für die jederzeit gewährte Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit danken.

Den Medizinisch Technischen Assistentinnen des Muskellabors der neurologischen Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für Durchführung der Proteinbestimmungen.

Weiterhin danke ich meinem Mann M. Zerbaum der mich oft durch Rat und Tat voran gebracht hat.