

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. S. Zierz)

Carnitin-Palmitoyltransferase-Aktivität im Muskel von Patienten mit Maligner Hyperthermie

Dissertation

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

vorgelegt

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

von Annika Sarah Weyhersmüller
geboren am 22. Februar 1981 in Heidelberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Zierz
2. Prof. Dr. Reichmann (Dresden)

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 15.07.2008

Datum der Verteidigung: 04.05.2010

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine schwerwiegende, potentiell letale Komplikation der Allgemeinanästhesie mit genetischer Prädisposition. Sie tritt bei Verwendung inhalativer Narkotika in Kombination mit depolarisierenden Muskelrelaxantien auf und äußert sich durch Muskelrigidität, Hyperthermie, Rhabdomyolyse, Hyperkaliämie und Myoglobinurie mit konsekutivem Nierenversagen. Die Diagnose kann durch den In-vitro-Kontraktur-Test (IVCT) gestellt werden.

Die Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) ist Teil des Transportsystems, welches langkettige Fettsäuren in die Mitochondrien transportiert. Sie besitzt zwei Isoformen, CPT I und CPT II. Der muskuläre CPT II-Mangel führt zu belastungsabhängigen Rhabdomyolysen und Myoglobinurien. Ein solcher Mangel wird durch biochemische Analyse in Muskelbiopsien diagnostiziert.

MH-ähnliche Narkosekomplikationen wurden auch bei Patienten mit CPT-Mangel beschrieben. Ebenso wurde bei Patienten mit MH ein Mangel an CPT postuliert. Es konnte jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob der CPT-Mangel mit der Malignen Hyperthermie in Zusammenhang steht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die enzymatische Charakterisierung der CPT in Muskelbiopsien von Patienten mit durch IVCT gesicherter MH.

Es konnte gezeigt werden, dass die CPT-Aktivität im Muskel von Patienten mit Prädisposition zur MH im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht erniedrigt ist. Die Daten zeigen außerdem, dass bei Patienten mit MH keine abnorme Regulierbarkeit der CPT vorliegt.

Mittels dieser Untersuchung lässt sich ein CPT-Mangel bei Patienten mit MH mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Weyhermüller, Annika Sarah: Carnitin-Palmitoyltransferase-Aktivität im Muskel von Patienten mit Maligner Hyperthermie.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 56 Seiten, 2008.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund	1
1.2	Biochemische Grundlagen	1
1.2.1	Stoffwechsel des Skelettmuskels	1
1.2.2	Fettsäureoxidation	2
1.3	Funktion und Regulation der Muskelkontraktion	2
1.3.1	Prinzip der Muskelkontraktion	2
1.3.2	Elektromechanische Kopplung	3
1.4	Carnitin-Palmitoyltransferase	3
1.4.1	Funktion und Lokalisation der CPT	3
1.4.2	Klinik des CPT-Mangels	5
1.4.3	Genetische Grundlagen des CPT-Mangels	6
1.4.4	Diagnostik des CPT-Mangels	9
1.4.5	Inhibitoren der CPT	10
1.5	Maligne Hyperthermie	11
1.5.1	Klinik der Malignen Hyperthermie	11
1.5.2	Therapie der Malignen Hyperthermie	12
1.5.3	Genetische und pathogenetische Grundlagen der MH	12
1.5.4	Diagnostik der MH	14
1.5.5	Assoziierte Myopathien	15
2	Zielstellung	18
3	Patienten	19
3.1	Kontrollen	19
3.2	MHS, MHE und MHN-Patienten	19
3.3	Patienten mit CPT-Mangel	19
4	Material und Methoden	20
4.1	Chemikalien und Lösungen	20
4.2	Messgeräte	20
4.3	Aufarbeitung der Proben	20

4.3.1	Vorbereitung und Lagerung	20
4.3.2	Homogenisieren des Muskelgewebes	20
4.4	Enzymbestimmung	21
4.4.1	Testprinzip	21
4.4.2	Messansätze	21
4.4.3	Aktivitätsberechnung	22
4.5	Proteinbestimmung	23
4.6	IVCT	23
4.7	Auswertung und statistische Verfahren	23
4.8	Linearität der Reaktion über Zeit und Muskelmenge	24
4.9	Einfluss der Konzentration von L-Palmitoylcarnitin auf die CPT-Aktivität	26
5	Ergebnisse	28
5.1	CPT-Aktivität bei Patienten mit Maligner Hyperthermie im Vergleich zu Kontrollen	28
5.1.1	Gesamtaktivität der CPT	28
5.1.2	Restaktivität nach Hemmung durch Malonyl-CoA	30
5.1.3	Restaktivität nach Hemmung durch Triton X-100	31
5.1.4	Restaktivität nach Hemmung durch L-Palmitoyl-Carnitin	31
5.1.5	Restaktivität nach Hemmung durch Palmitoyl-CoA	32
5.2	Power-Analyse der Ergebnisse	33
5.3	Berechnung des Konfidenzintervalls	36
5.4	CPT-Aktivität bei Patienten mit bekanntem CPT-Mangel	36
6	Diskussion	38
6.1	Zusammenhang zwischen CPT-Mangel und MH	38
6.2	Vergleich der CPT-Aktivität bei MHS, MHE und MHN-Patienten mit der Aktivität bei Patienten mit CPT-Mangel	40
6.3	Mögliche Gründe für das Auftreten MH-ähnlicher Reaktionen bei CPT-Mangel	41
6.4	Weiterführende Fragen	42
7	Zusammenfassung	43

8	Literaturverzeichnis	45
9	Thesen	56

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ANOVA	Varianzanalyse
CAT	Carnitin-Acylcarnitin-Translokase
CCD	Central-Core-Disease
CK	Creatinkinase
CoA	Coenzym A
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
EMHG	European Malignant Hyperthermia Group
IVCT	In-vitro-Kontraktur-Test
KDS	King-Denborough-Syndrom
LW	Leerwert
MDD	Myoadenylatdesaminase-Defekt
MH	Maligne Hyperthermie
MHE	Malignant Hyperthermia Equivocal
MHN	Malignant Hyperthermia Negative
MHS	Malignant Hyperthermia Susceptible
nAChR	nicotinischer Acetylcholin-Rezeptor
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine seltene, jedoch lebensbedrohliche Komplikation der Allgemeinanästhesie bei Verwendung depolarisierender Muskelrelaxantien in Verbindung mit inhalativen Narkotika. Es besteht eine genetische Prädisposition.

Die Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) ist ein Enzym des Fettsäurestoffwechsels und ist am Transport der Fettsäuren zu ihrem Abbauort in den Mitochondrien beteiligt.

Ein Zusammenhang der Prädisposition zur Malignen Hyperthermie mit einem Defekt des Enzyms CPT wurde erstmals vermutet, nachdem 1988 ein solcher Narkosezwischenfall bei einem Patienten beschrieben wurde, der an einem Mangel an CPT litt [41]. Es stellte sich die Frage, ob zur MH prädisponierte Patienten generell eine Erniedrigung der Aktivität dieses Enzyms aufweisen. In einer ersten Studie hierzu gab es Hinweise darauf [79].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der enzymatischen Charakterisierung der Carnitin-Palmitoyltransferase bei Patienten mit Disposition zur Malignen Hyperthermie.

1.2 Biochemische Grundlagen

1.2.1 Stoffwechsel des Skelettmuskels

Unter Ruhebedingungen deckt der Skelettmuskel seinen Energiebedarf aus der Oxidation von Glucose und Fettsäuren. Glucose wird in Form von Glykogen, Fettsäuren in Form von Triacylglyceriden gespeichert. Im Hungerzustand können auch Ketonkörper zur Energiegewinnung verwendet werden.

Bei Muskelarbeit wird der Energiebedarf durch Glykogenolyse und Glykolyse aus gespeichertem Glykogen gedeckt. Nach Erschöpfung der Glykogenvorräte werden vermehrt freie Fettsäuren in den Muskel transportiert und dort oxidiert.

1.2.2 Fettsäureoxidation

Nahrungsfette bestehen zum größten Teil aus langkettigen Fettsäuren (16-18 C-Atome). Diese können jedoch im Gegensatz zu kurzkettigen Fettsäuren die innere Mitochondrienmembran nicht passieren und benötigen daher ein Transportsystem, um in den mitochondrialen Matrixraum zu gelangen, wo die Enzyme der Fettsäureoxidation lokalisiert sind. Dieses System besteht aus den Carnitin-Palmitoyltransferasen, der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase und Carnitin. In den Mitochondrien werden Fettsäuren durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut.

Ungefähr 17-35 % der Fettsäuren werden in den Peroxisomen oxidiert [77]. Hierbei laufen im Wesentlichen die gleichen Reaktionen ab wie bei der mitochondrialen β -Oxidation. Allerdings durchläuft die peroxisomale β -Oxidation nur 2-5 Zyklen, so dass es lediglich zu einer Verkürzung, nicht jedoch zur vollständigen Oxidation der langkettigen Fettsäuren kommt [45]. Der Transport langkettiger Fettsäuren in die Peroxisomen erfolgt Carnitin-unabhängig [49].

1.3 Funktion und Regulation der Muskelkontraktion

1.3.1 Prinzip der Muskelkontraktion

Nach der Gleitfilamenttheorie kommt die Muskelkontraktion dadurch zustande, dass Aktin- und Myosinfilamente übereinandergleiten und somit zu einer Verkürzung der Sarkomere führen. Hierbei binden Myosinköpfechen an Aktin und bilden Querbrücken. Durch Winkeländerung des Myosinköpfchens wird ein Zug auf Aktin ausgeübt und es kommt zu einer Annäherung der Aktinfilamente der rechten und linken Sarkomerhälfte. Durch Spaltung von ATP werden die Querbrücken wieder gelöst und der Zyklus kann erneut beginnen.

Die Aktivität der Querbrücken wird durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert. Bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration ($<0,1 \mu\text{M}$) verhindern die an Aktin gebundenen Regulatorproteine Troponin und Tropomyosin die feste Anheftung der Querbrücken an Aktin und hemmen damit den Querbrückenzklus. Bei intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen von $1-10 \mu\text{M}$ bindet

Ca^{2+} an Troponin und ändert dadurch dessen Konformation, so dass Querbrücken wieder gebildet werden können.

1.3.2 Elektromechanische Kopplung

Muskelfasern werden durch α -Motoneurone innerviert. An motorischen Endplatten wird Acetylcholin (ACh) präsynaptisch freigesetzt und bindet an postsynaptisch lokalisierte nicotinsche Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR), welche dadurch geöffnet werden. Durch Natriumeinstrom über diesen unspezifischen Kationenkanal wird die Membran der Muskelzelle depolarisiert. Die Depolarisation breitet sich entlang der Membran aus. Die Außenmembran der Muskelzelle stülpt sich an vielen Punkten in das Faserinnere ein, wodurch ein transversales Röhrensystem (T-Tubuli) entsteht. Über dieses System dringt die Erregung in die Tiefe der Muskelfaser und führt dort zu einer Konformationsänderung eines langsamen, spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanals, des Dihydropyridin-Rezeptors (DHPR). Dieser bewirkt eine Öffnung des Ryanodinrezeptors (RyR), eines Ca^{2+} -Kanals in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), welches ein zu den T-Tubuli senkrecht angeordnetes longitudinales (L-Tubuli) Röhrensystem bildet. Durch die Öffnung des RyR kommt es zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR, welches den intrazellulären Speicher für Ca^{2+} -Ionen darstellt. Wie oben erläutert, bindet Ca^{2+} an Troponin und löst dadurch die Muskelkontraktion aus. Die Muskelrelaxation setzt ein, sobald das Ca^{2+} aus dem Zytosol zurück ins SR gepumpt wird. Dies geschieht aktiv durch Ca^{2+} -ATPasen (SERCA).

1.4 Carnitin-Palmitoyltransferase

1.4.1 Funktion und Lokalisation der CPT

Die CPT spielt eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Fettsäureoxidation. Sie ist Teil des Transportsystems langkettiger Fettsäuren durch die innere Mitochondrienmembran (Abb. 1).

Die Carnitin-Palmitoyltransferase I katalysiert die Reaktion von Acyl-CoA mit Carnitin zu Acyl-Carnitin unter Freisetzung von Coenzym A. Das

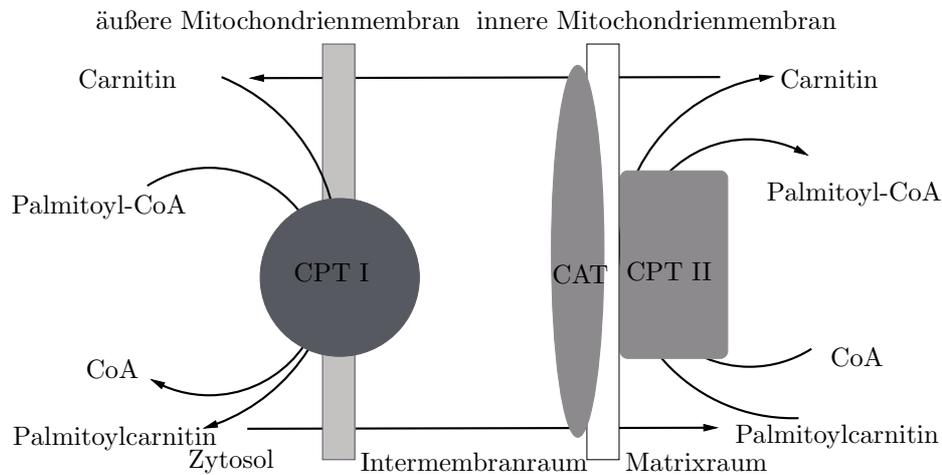
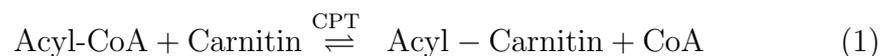


Abbildung 1: Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien; CAT: Carnitin-Acyltransferase; CPT: Carnitin-Palmitoyltransferase

entstandene Acyl-CoA kann mit Hilfe der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase die mitochondriale Innenmembran passieren. Auf der Innenseite der mitochondrialen Innenmembran wird durch die Carnitin-Palmitoyltransferase II der Acylrest des Acyl-Carnitins wieder auf Coenzym A übertragen, wodurch Acyl-CoA entsteht und Carnitin frei wird. Carnitin wird durch die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase zurück in den Intermembranraum transportiert, wo es erneut dem Transport von Fettsäuren durch die Membran zur Verfügung steht.

Durch CPT katalysierte Reaktion:



Der Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fettsäureoxidation dar. Mehrere Studien zeigten die Existenz von zwei unterschiedlichen Enzymen, CPT I und CPT II, und deren unterschiedliche Lokalisation [6, 85]. CPT I ist ein Transmembranprotein in der äußeren Mitochondrienmembran und reicht ins Zytosol [14, 39, 58]. Seine katalytische Untereinheit befindet sich an der Innenseite der äußeren Mitochondrienmembran, während die regulatorische Untereinheit an der Außenseite liegt [58]. Die CPT II dagegen ist auf der Innenseite

der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert und mit dieser nur locker assoziiert. Von der CPT I existieren drei Isoformen, die Leber (L)-CPT I, die Muskel (M)-CPT I und die Gehirn (B-)CPT I [83, 3]. Die CPT II dagegen ist ein ubiquitäres Protein und besitzt keine Isoformen [85].

1.4.2 Klinik des CPT-Mangels

Seit der Erstbeschreibung 1973 durch Di Mauro und Di Mauro [20] wurden Defekte der CPT weltweit bei mehr als 250 Patienten beschrieben. Man unterscheidet verschiedene Unterformen des CPT-Mangels:

CPT I-Mangel. Alle bisher beschriebenen Fälle des CPT I-Mangels betreffen die L-CPT I [3]. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. Als erstes Symptom eines L-CPT I-Mangels zeigt sich innerhalb der ersten 18 Monate eine hypoketotische Hypoglykämie, häufig ausgelöst durch Fasten oder virale Infektionen, oder eine Hepatomegalie, die zu einem akuten Leberversagen führen kann. Im akuten Anfall sind Leberenzyme, Ammoniak und Creatinkinase (CK) im Plasma erhöht. Eine renale tubuläre Azidose wurde in einigen Fällen beschrieben [64]. Carnitin ist in fast allen Fällen erhöht [3, 68]. Die Anfälle kehren bis zum 5. Lebensjahr häufig wieder. Eine symptomatische Therapie ist meist erfolgreich.

Defekte der Muskel- und Gehirn-Isoform der CPT I sind nicht bekannt. Möglicherweise sind diese mit dem Leben nicht vereinbar [3].

CPT II-Mangel. Meist betrifft der CPT-Mangel die CPT II. Nach dem Manifestationsalter unterscheidet man drei Formen.

Die *neonatale Form* manifestiert sich innerhalb der ersten 4 Tage nach der Geburt durch Hypoglykämie, Hepatomegalie, Kardiomegalie mit Rhythmusstörungen, metabolische Azidose und Hyperammoniämie. Assoziationen mit Dysmorphien, zystischen Nierenfehlbildungen und neuronalen Migrationsstörungen wurden beschrieben. Die Patienten versterben innerhalb weniger Tage nach der Geburt [3, 80, 64].

Die *infantile Form* beginnt im Alter von 6 Monaten bis 2 Jahren. Bisher wurden 15 Fälle beschrieben [3]. Beide Geschlechter sind gleich häufig

betroffen. In Verbindung mit Fasten oder fieberhaften Infekten kommt es zu rezidivierenden Attacken von akutem Leberversagen mit hypoketotischer Hypoglykämie, die zu Krampfanfällen und Koma führen kann. Bei Blutuntersuchungen zeigt sich eine metabolische Azidose und eine Hyperglykämie sowie ein erniedrigter Carnitinspiegel. Eine Herzbeteiligung in Form von Arrhythmien oder Kardiomyopathien ist bei der Hälfte der Fälle vorhanden [3, 64].

Die *adulte (muskuläre) Form* ist mit über 200 beschriebenen Fällen am häufigsten und manifestiert sich trotz autosomal rezessiver Vererbung überwiegend bei Männern [19, 3], was möglicherweise auf einen protektiven Effekt weiblicher Hormone zurückzuführen ist [61]. Sie manifestiert sich meist zwischen dem 6. und 20. Lebensjahr. Symptome sind rezidivierende Attacken von Myalgien, Muskelsteifigkeit, Muskelschwäche, Rhabdomyolyse und Myoglobinurie, die für Stunden bis Wochen anhalten. Durch die Rhabdomyolyse kann es zur Hyperkaliämie und dadurch zu kardialen Arrhythmien kommen. Die Myoglobinurie kann zu akutem Nierenversagen führen. Auslösende Faktoren sind mehrstündige körperliche Belastung und Fasten, seltener fettreiche Mahlzeiten, Kälte, Infekte, Fieber, emotionaler Stress oder Medikamente [19, 3]. Die Symptome sind auf die Skelettmuskulatur beschränkt. Eine Herz- oder Leberbeteiligung ist nicht bekannt [3]. Die CK ist während der Attacken stark erhöht, im Intervall normal [3]. In 10-20% der Fälle besteht eine Hyperlipidämie. Nach Fasten kommt es zu einer verminderten Ketonkörperbildung.

Eine kausale Therapie ist bisher nicht möglich. Die Häufigkeit der Attacken kann durch fettarme, kohlenhydratreiche Mahlzeiten und durch Vermeiden von Fasten und lang andauernder körperlicher Belastung reduziert werden.

1.4.3 Genetische Grundlagen des CPT-Mangels

Das CPT II-Gen wurde 1990 erstmals aus der Ratte kloniert und sequenziert [84], kurz darauf auch beim Menschen [25]. Inzwischen sind die Genloci der unterschiedlichen Isoformen der CPT bekannt. Das Gen für die L-CPT I

befindet sich auf Chromosom 11q13.1-q13.5, für die M-CPT I auf Chromosom 22q13.31-q13.32, für die B-CPT I auf Chromosom 19q13.33, und für die CPT II auf Chromosom 1p32. Da die Gene dieser mitochondrialen Enzyme auf der Kern-DNA lokalisiert sind, folgt der CPT-Mangel nicht dem mitochondrialen maternalen Erbgang, sondern wird autosomal rezessiv vererbt.

Bisher sind 24 Mutationen der CPT I und 40 Mutationen der CPT II bekannt (Tabelle 1). Die häufigste Mutation im CPT II Gen ist die S113L Mutation [36, 42], die 1993 von Taroni et al. beschrieben wurde [72]. Sie betrifft ca. 65% aller Allele und 95% aller Patienten [19]. Der klinische Ausprägungsgrad kann auch bei gleicher Mutation variieren [36].

Tabelle 1: Identifizierte CPT II-Mutationen nach Bonnefont et al.[3] und Deschauer et al.[19]

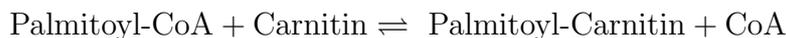
Exon	Nukleotidveränderung	Aminosäure	Erstbeschreiber
1	109 Ins GC		Martin et al. (2000) [51]
1	112-113 Ins GC	S38	Martin et al. (2000) [51]
1	149C→A	P50H	Verderio et al. (1995) [78]
2	216G→C/T	L72F	Ijlst et al. (1998)[38]
3	338C→T	S113L	Taroni et al. (1993) [72]
3	IVS3+5G→A	179-113del	Deschauer et al. (2003) [17]
4	359A→G	Y120C	Martin et al. (1999, 2000) [51, 50]
4	370C→T	R124X	Yang et al. (1998) [88]
4	371G→A	R124Q	Thuillier et al. (2003) [74]
4	437A→C	N146T	Thuillier et al. (2003) [74]
4	452G→A	R151Q	Yang et al. (1998)[89]
4	481C→T	R161W	Thuillier et al. (2003)[74]
4	490A→T	K164X	Ijlst et al. (1998) [38]
4	520G→A	E174K	Yamamoto et al. (1996) [87]
4	533-534insT; 534-558del	L178 F; 179-186del	Yang et al. (1998) [89]
4	628T→G	Y210D	Ijlst et al. (1998) [38]
4	641T→C	M214T	Wieser et al. (2003) [82]
4	680C→T	P227L	Taroni et al. (1994) [71]
4	821A→T	K274M	Ijlst et al. (1998) [38]
4	890C→A/G	Y290X	Ijlst et al. (1998) [38]
4	906C→T	R296X	Ijlst et al. (1998) [38]
4	907G→A	R296Q	Ijlst et al. (1998) [38]
4	907-918ins	L302	Gellera et al. (1994) [31]
4	983A→G	D328G	Thuillier et al. (2003) [74]
4	1148T→A	F383Y	Yamamoto et al. (1996) [87]
4	1238-1239delAG	Q413	Taggart et al. (1999) [70]
4	1342T→C	F448L	Wieser et al. (2003) [82]
4	1436A→T	Y479F	Wieser et al. (2003) [82]
4	1459G→A	E487K	Bruno et al. (2000) [9]
4	1507C→T	R503C	Taggart et al. (1999) [70]
4	1543-1546delGCCT	515del4	Deschauer et al. (2002) [18]
4	1646G→A	G549D	Taggart et al. (1999) [70]
5	1649A→G	Q550R	Yang et al. (1998) [89]
5	1657G→A	D553N	Verderio et al. (1995) [78]
5	1798G→A	G600R	Ijlst et al. (1998) [38]
5	1810C→T	P604S	Yang et al. (1998) [89]
5	1823G→C	D608H	Thuillier et al. (2003) [74]
5	1883A→C	Y628S	Bonnefont et al. (1996) [4]
5	1891C→T	R631C	Taroni et al. (1992) [73]

1.4.4 Diagnostik des CPT-Mangels

Molekulargenetische Methoden. Molekulargenetische Untersuchungen sind bisher nicht zur Routinediagnostik geeignet, da einerseits das klinische Bild bei gleicher Mutation stark variieren kann und andererseits bei manchen Patienten eine noch nicht identifizierte Mutation vorliegt. Da sich aber die häufigste Mutation S113L bei vielen Patienten durch Analyse von Blutzellen nachweisen lässt, könnte hierdurch in einigen Fällen die zur biochemischen Diagnostik notwendige Muskelbiopsie vermieden werden [42].

Muskelbiopsie. Eine Muskelbiopsie zeigt keine pathognomonischen histologischen Veränderungen [19] und ist daher nur zur biochemischen Diagnostik gerechtfertigt.

Biochemische Diagnostik. Die biochemische Diagnostik wird an durch Biopsie gewonnenem Muskelgewebe durchgeführt und stellt die derzeit beste Methode zur Diagnosesicherung eines CPT-Mangels dar. Verschiedene spektrometrische und radiochemische Verfahren werden angewandt. Alle Verfahren beruhen auf der Reaktion:



Bei der Vorwärtsreaktion wird ^{14}C -Carnitin in Palmitoylcarnitin eingebaut. Die Rückreaktion beruht auf der Bildung von ^3H -Carnitin aus Palmitoyl- ^3H -Carnitin. Bei der Isotopenaustauschreaktion kommt es zur Inkorporation von ^{14}C -Carnitin in den Palmitoylcarnitin-Pool.

Die Gesamtaktivität der CPT ist bei Patienten mit CPT II-Mangel nicht vermindert. Erst nach Hemmung der CPT I durch Malonyl-CoA, Palmitoyl-CoA oder Palmitoylcarnitin oder nach Behandlung mit Detergenzien wie Triton X-100 zeigt sich eine im Vergleich zu Kontrollen verminderte Aktivität [90, 91, 82].

1.4.5 Inhibitoren der CPT

Malonyl-CoA. Malonyl-CoA, ein Zwischenprodukt der Fettsäuresynthese, hemmt die Aktivität der CPT I, während CPT II nicht durch Malonyl-CoA beeinflusst wird [54]. Der inhibitorische Effekt von Malonyl-CoA beruht teilweise auf einer kompetitiven Hemmung gegenüber dem Substrat Palmitoyl-CoA durch Bindung an das katalytische Zentrum [23, 54] und teilweise auf einer allosterischen Hemmung, die durch Bindung an das regulatorische Zentrum im N-terminalen Bereich zustande kommt [14, 39, 58]. Die Regulation durch Malonyl-CoA wird als physiologisch angesehen, da hierdurch eine Kontrolle über die β -Oxidation möglich ist. Unterschiedliche physiologische und pathologische Zustände wie körperliche Aktivität, Hunger und Diabetes mellitus beeinflussen die Sensitivität der CPT I gegenüber Malonyl-CoA und können dadurch die Geschwindigkeit der β -Oxidation den Bedürfnissen anpassen. [54, 62, 69, 11, 13, 12].

Die Hemmung durch Malonyl-CoA ist bei Patienten mit CPT-Defekt stärker ausgeprägt als bei Gesunden [90, 91].

Triton X-100. Das Detergenz Triton X-100 löst die CPT aus der Membran heraus. CPT I, welche nur in ihrer Membranumgebung aktiv ist, wird hierdurch inaktiviert, CPT II hingegen bleibt auch in gelöster Form aktiv [85, 3]. Die Aktivität wird bei Patienten mit CPT-Mangel stärker beeinträchtigt als bei Gesunden [90, 91].

Woltje et al. fanden nach Behandlung mit diesem Detergenz eine geringere als die theoretisch errechnete Aktivität der CPT, so dass sie eine zusätzliche Hemmung der CPT durch Triton annahmen, die unabhängig von ihrer Wirkung als Detergenz sei [85].

L-Palmitoylcarnitin. Das Reaktionsprodukt L-Palmitoylcarnitin hemmt die Aktivität der CPT sowohl bei Patienten mit CPT-Defekt als auch bei Kontrollen, der Effekt ist jedoch bei den CPT-Mangel-Patienten signifikant größer [90]. Der inhibitorische Effekt von L-Palmitoyl-Carnitin ist stärker als der Effekt des D-Enantiomers und des Racemats [90].

Dieser Effekt zeigt sich auch bei Untersuchung der Aktivität anhand der Rückreaktion, weil hier die Konzentration von L-Palmitoylcarnitin sehr hoch ist.

Palmitoyl-CoA. Palmitoyl-CoA ist einerseits Substrat der CPT, wirkt aber andererseits auch als kompetitiver Inhibitor im Bezug auf das Zweitsubstrat Carnitin. Es werden zwei unterschiedliche Bindungsstellen angenommen [5]. Bei Patienten mit CPT-Mangel ist die Hemmung stärker ausgeprägt als bei Gesunden [90].

1.5 Maligne Hyperthermie

Die Maligne Hyperthermie ist eine lebensbedrohliche Komplikation der Allgemeinanästhesie mit einer Inzidenz von 1:15000 Anästhesien bei Kindern und 1:50000 bei Erwachsenen [40]. Sie wurde erstmals 1960 von Denborough et. al beschrieben [16].

1.5.1 Klinik der Malignen Hyperthermie

Nach Narkoseeinleitung mit depolarisierenden Muskelrelaxantien wie Succinylcholin und inhalativen Narkotika wie Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran kann sich die Maligne Hyperthermie bei genetisch prädisponierten Personen in drei verschiedenen Formen manifestieren [35]:

Muskelsteifigkeit. Als milde Form kann eine isolierte Muskelsteifigkeit, meist in Form von Masseterspasmen auftreten.

Klassische Maligne Hyperthermie. Erste Symptome sind CO₂-Anstieg, Tachypnoe, Tachykardie und Masseterspasmen. Anschließend entwickelt sich eine generalisierte Muskelsteifigkeit und die Körpertemperatur steigt um bis zu 1°C in 5 min an. Durch Anstieg von Laktat und CO₂ entwickelt sich eine kombinierte metabolische und respiratorische Azidose. Durch die Überlastung der Muskulatur kommt es zur Rhabdomyolyse, welche ihrerseits zu Hyperkaliämie, CK-Anstieg, Myoglobinämie und Myoglobinurie führt. Durch

die Hyperkaliämie können kardiale Arrhythmien auftreten, die Myoglobinurie führt zu Nierenschäden bis hin zum akuten Nierenversagen. Die Hyperkapnie kann zerebrale Schäden verursachen.

Postoperative Rhabdomyolyse. In manchen Fällen kommt es ohne vorangehende intraoperative Komplikationen postoperativ zu einer Rhabdomyolyse mit Myoglobinurie und konsekutiver Nierenschädigung. Ob es sich hierbei um Manifestationen einer Malignen Hyperthermie oder um Narkosekomplikationen anderer Ätiologie handelt, ist jedoch nicht abschließend geklärt.

1.5.2 Therapie der Malignen Hyperthermie

Die Maligne Hyperthermie bedarf einer sofortigen Diagnose und Therapie. Unbehandelt verläuft sie in 70% der Fälle tödlich, durch sofortige Therapie lässt sich die Letalität auf 10% senken [40].

Die Therapie besteht in einer sofortigen Unterbrechung der Zufuhr auslösender Narkotika, einer externen oder internen (durch gekühlte Infusionen vermittelten) Kühlung, Hyperventilation mit 100% Sauerstoff, intravenöser Gabe von Dantrolen (2,5 mg/kg KG) zur Muskelrelaxation, Bicarbonat zur Azidosebehandlung, Insulin-Dextrose zur Behandlung der Hyperkaliämie und Mannitol als Diuretikum zum Schutz der Nieren. Die Wirkung von Dantrolen beruht auf einer Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR.

Auslösende Substanzen müssen bei nachfolgenden Anästhesien unbedingt vermieden werden. Als unbedenklich gelten Lokalanästhetika, Ketamin, Benzodiazepine, Propofol, Xenon, nicht depolarisierende Muskelrelaxantien und Opioid-Analgetika [35, 40].

1.5.3 Genetische und pathogenetische Grundlagen der MH

Die MH wird autosomal-dominant vererbt. Der Gendefekt wurde 1990 von McCarthy und Mitarbeitern auf Chromosom 19 lokalisiert [52]. Diese Region kodiert für den Ryanodin-Rezeptor. Wie bereits beschrieben, setzt dieser nach Aktivierung durch den Dihydropyridin-Rezeptor Ca^{2+} aus dem SR frei und spielt daher eine wichtige Rolle bei der elektromechanischen Kopplung.

61 verschiedene Mutationen dieser Region sind bekannt, von denen 20 nur mit MH und 10 mit MH und Central Core Disease (CCD) assoziiert sind [21]. Auf Grund der Lokalisation dieser Mutationen in N-terminalen und zentralen Domänen des Rezeptors postulieren Yamamoto und Mitarbeiter ein gestörte Interaktion dieser Regionen, welche zur Überaktivierung des RyR führt [86]. Diese Mutationen führen zu einer Hyperreagibilität des RyR und dadurch zu einer verstärkten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR als Reaktion auf Triggersubstanzen. Die Hyperreagibilität beruht vermutlich auf einer gestörten Interaktion zwischen RyR und DHPR, die zu einer erhöhten Sensibilität des RyR für Alterationen durch den DHPR führt [48]. Bei der reinen MH ohne begleitende Myopathie ist diese gering ausgeprägt, kann jedoch durch Substanzen wie Koffein und Narkotika getriggert werden. Als Reaktion auf diese Triggersubstanzen wird vermehrt Ca^{2+} freigesetzt [75]. Mutationen, die mit der CCD assoziiert sind, führen zu einer stärkeren Hyperreagibilität des RyR sowie zu einer erhöhten basalen Öffnungsrate und dadurch zu einer ständigen Erhöhung der zytosolischen und Verminderung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration [21]. Daher nimmt die Amplitude der Ca^{2+} -Freisetzung auf Erregung ab, wodurch die elektromechanische Kopplung abgeschwächt und die Symptome hervorgerufen werden [2]. Im In-Vitro-Kontraktur-Test (IVCT) zeigen die Biopsien der Patienten, welche an MH und CCD leiden, eine stärkere Reaktion als die der allein an MH leidenden Patienten [63].

Es existieren Hinweise auf eine genetische Heterogenität. Eine Co-Segregation von MH und CCD mit Chromosom-19-Markern konnte nicht in allen Familien nachgewiesen werden [15]. Pirone und Mitarbeiter fanden eine Mutation in der $\alpha 1$ -Untereinheit des DHPRs, welche mit dem RyR interagiert. Diese war in einer Familie mit MH assoziiert (unpublizierte Daten, persönliche Korrespondenz). Auch in einem weiteren Fall wurde über eine Mutationen im DHPR als Auslöser einer Maligner Hyperthermie berichtet [56].

Die Penetranz und das klinische Bild sind bei gleicher Mutation variabel, was eine Beeinflussung durch modulierende Faktoren wahrscheinlich macht [28].

1.5.4 Diagnostik der MH

In-vitro-Kontraktur-Test. Nach Auftreten eines MH-verdächtigen Nar-kosezwischenfalls muss die Diagnose durch den In-vitro-Kontraktur-Test (IVCT) gesichert werden. Hierzu hat die European Malignant Hyperthermia Group (EMHG) Richtlinien herausgegeben [22].

Muskelfasern werden ansteigenden Konzentrationen von Halothan (0,5-4%) und Koffein (0,5-32 mmol/l) ausgesetzt und die Kraft ihrer Kontraktion gemessen. Als pathologisch gelten Werte größer 2 mN bei 2% Halothan oder 2mmol/l Koffein. Bei einem pathologischen Testergebnis für beide Substanzen werden die Patienten als MH-Susceptible (MHS), bei einem pathologischen Testergebnis für eine der Substanzen als MH-Equivocal (MHE) und bei normalen Testergebnissen für beide Substanzen als MH-Negative (MHN) klassifiziert. Die Sensitivität dieses Test beträgt 99%, die Spezifität 93,6% [40].

Molekulargenetische Methoden. Da der IVCT relativ große Mengen Muskelgewebe erfordert, wäre es wünschenswert, die Diagnose anhand eines weniger invasiven Tests sichern oder ausschließen zu können. Auf Grund der genetischen und phänotypischen Heterogenität sind molekulargenetische Methoden bisher nicht zur Routinediagnostik geeignet [28]. Außerdem sind bisher nicht alle Mutationen identifiziert worden, so dass ein negatives Testergebnis die Diagnose nicht ausschließt. Lediglich bei Verwandten eines MHS-Patienten mit bekannter Mutation kommt eine molekulargenetische Diagnostik in Frage. Auch hier kann jedoch die Diagnose MHS durch ein negatives Testergebnis nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden [76].

Metabolische Tests. Anetseder et. al stellten 2002 eine weniger invasive Methode zur Diagnose der Malignen Hyperthermie vor [1]. Durch Injektion von Koffein in die Muskulatur konnten sie bei MHS-Patienten einen CO₂-Anstieg provozieren, nicht jedoch bei MH-negativen Kontrollen. Um den diagnostischen Stellenwert dieser Methode zu beurteilen, insbesondere hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität des Tests, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

1.5.5 Assoziierte Myopathien

Narkosekomplikationen und MH-ähnliche Episoden wurden bei einer Reihe von Myopathien beschrieben [44]. Es stellt sich daher die Frage, welche Myopathien in einem kausalen Zusammenhang mit der MH stehen. Die Beantwortung dieser Frage ist besonders für die Prävention solcher potentiell letalen Zwischenfälle von Bedeutung. Patienten mit hohem Risiko für eine MH sollten vor einer geplanten Anästhesie mit Hilfe des IVCT auf MHS getestet werden.

Duchenne-Muskeldystrophie. Es wurden einzelne Fälle von MH-ähnlichen Narkosekomplikationen bei Patienten mit einer progressiven Muskeldystrophie vom Typ Duchenne beschrieben [81, 67]. Ein pathogenetischer Zusammenhang konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Obwohl in einigen Fällen die Diagnose einer MH bei diesen Patienten durch IVCT gesichert war [8], lässt die unabhängige Vererbung beider Merkmale in der untersuchten Familie auf eine zufällige Assoziation schließen [7].

Becker-Muskeldystrophie. Auch bei der Muskeldystrophie vom Typ Becker wurden Fälle von Rhabdomyolyse und Hyperkaliämie als Reaktion auf Narkotika beschrieben [10, 60]. Die Autoren merken jedoch an, dass es sich bei diesen Fällen wahrscheinlich nicht um genetisch bedingte MH-Episoden handelt, sondern lediglich um ähnliche Reaktionen.

Laminin $\alpha 2$ -Defekt. Shukry und Mitarbeiter beschrieben einen Fall einer MH-ähnlichen Episode bei einem Patienten mit Laminin $\alpha 2$ -Defekt [66]. Ein IVCT wurde jedoch von dem betroffenen Patienten abgelehnt, so dass nicht geklärt werden konnte, ob es sich um eine echte MH handelte.

Periodische Hyperkaliämische Paralyse. Moslehi und Mitarbeiter untersuchten das gemeinsame Auftreten von MH und Periodischer Hyperkaliämischer Paralyse in einer großen Familie. Sie fanden eine Assoziation mit dem Gen auf Chromosom 17, welches für einen Natriumkanal kodiert [57]. Die

Periodische Hyperkaliämische Paralyse ist eine Erkrankung eines Natriumkanals, die sich in rezidivierenden Anfällen von Muskelschwäche bei erhöhtem Serum-Kalium manifestiert. Es sind Formen mit Myotonie, Paramyotonie (kälte-induzierte Myotonie) und ohne Myotonie bekannt [29]. Die anfallsartig auftretenden Lähmungen werden durch Ruhe nach körperlicher Anstrengung, Stress, Fasten und bestimmte Nahrungsmittel ausgelöst. In mehreren betroffenen Familien ist diese Erkrankung mit dem Gen auf Chromosom 17q23-25 gekoppelt, welches für die α -Untereinheit des Natriumkanals der Skelettmuskulatur codiert. Es wurden verschiedene Mutationen dieses Gens gefunden [29]. Aus ihren Ergebnissen schlossen Moslehi und Mitarbeiter, dass einige dieser Mutationen ebenfalls zu MH führen könnten [57].

Myoadenylatdesaminasemangel und mitochondriale Myopathien.

Der Myoadenylatdesaminasedefekt (MDD) ist eine seltene Muskelerkrankung mit belastungsinduzierten Muskelkrämpfen, Steifigkeit und Schmerzen [26]. Ein gleichzeitiges Auftreten von MDD und MH wurde in einer Familie beschrieben [27]. Der unterschiedliche Vererbungsmechanismus lässt allerdings darauf schließen, dass das gemeinsame Vorkommen beider Erkrankungen in dieser Familie zufällig war [7]. Ein pathogenetischer Zusammenhang lässt sich daraus nicht ableiten.

Es wurde außerdem ein positiver IVCT bei einem Patienten beschrieben, der sowohl eine reduzierte Myoadenylatdesaminase-Aktivität aufwies, als auch einen Defekt in Komplex I der mitochondrialen Atmungskette [30]. Ob einer der beiden Defekte in kausalem Zusammenhang mit der MH steht, insbesondere welcher, war allerdings nicht geklärt.

King-Denborough-Syndrom. Das King-Denborough-Syndrom (KDS) ist eine seltene Erkrankung, die mit Skelettanomalien, fazialer Dysmorphie und Myopathie einhergeht. Sie wurde erstmals 1973 von King und Denborough beschrieben [43]. Es wurden Fälle von MH-artigen Reaktionen auf Anästhetika beschrieben [33]. Bei einigen dieser Patienten wurde die Diagnose im Anschluss an einen MH-artigen Narkosezwischenfall gestellt, so dass eine besondere Suszeptibilität dieser Patienten für MH angenommen wird [55].

Heinman-Patterson et al. beschreiben einen positiven IVCT bei einem Patienten mit KDS [37]. Ob die Erkrankung zur MH prädisponiert, ob beide Gene nahe beieinander liegen und daher gekoppelt vererbt werden oder ob die Assoziation zufällig ist, konnte jedoch nicht beantwortet werden.

Central Core Disease. Die Central Core Disease (CCD) zählt zu den kongenitalen Myopathien mit Strukturveränderungen. Sie wird dominant vererbt und ist durch ihr histologisches Bild mit zentral gelegenen, mitochondrienfreien Cores in Typ 1-Muskelfasern gekennzeichnet. Die betroffenen Patienten bleiben in der Kindheit in ihrer motorischen Entwicklung zurück und zeigen auch als Erwachsene eine nicht progrediente Muskelschwäche besonders der unteren Extremitäten [65]. In Molekulargenetischen Untersuchungen erwies sich das Ryanodin-Rezeptor-1-Gen auf Chromosom 19q als der primäre Locus sowohl für MH [52] als auch für CCD [34]. In vielen, jedoch nicht allen betroffenen Familien lässt sich eine Co-Segregation von MH, CCD und Chromosom-19-Markern nachweisen [15]. Manche Mutationen in diesem Gen führen nur zu MH, während andere zu MH und CCD führen können. Mehrere Autoren postulieren, dass die mit CCD assoziierten Mutationen zu einer schwereren Störung der Ca^{2+} -Regulation führen als solche, die allein mit MH assoziiert sind [47, 63, 21]. Fast alle Patienten mit CCD können im IVCT als MHS klassifiziert werden [53]. Der gemeinsame Locus und das häufige Auftreten von MH bei CCD-Patienten legt einen Zusammenhang der beiden Erkrankungen nahe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MH-ähnliche Narkosezwischenfälle bei verschiedenen Muskelerkrankungen beschrieben worden sind. Ein kausaler Zusammenhang mit der MH ließ sich jedoch bisher nur für die CCD nachweisen. Für das King-Denborough-Syndrom ist ein solcher Zusammenhang jedoch ebenfalls wahrscheinlich.

2 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der enzymatischen Charakterisierung der Carnitin-Palmitoyltransferase im Muskelgewebe von Patienten mit Disposition zur Malignen Hyperthermie.

Folgende Fragen sollten im Rahmen der Arbeit beantwortet werden:

1. Liegt bei Patienten mit Maligner Hyperthermie (MH) im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine Verminderung der Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) vor?
2. Ist die Gesamtaktivität der CPT bei MH im Vergleich zu Gesunden erniedrigt?
3. Ist die Aktivität einer der Unterformen (CPT I oder CPT II) erniedrigt?
4. Liegt bei Patienten mit MH eine abnorme Regulierbarkeit der CPT vor?

3 Patienten

3.1 Kontrollen

Für die Kontrollgruppe wurde Muskelgewebe von Patienten der Klinik für Orthopädie sowie der Klinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle verwendet.

Die orthopädischen Patienten befanden sich auf Grund einer Coxarthrose in stationärer Behandlung in der Klinik für Orthopädie und litten nicht an einer Myopathie. Die Probeentnahme erfolgte in Allgemeinanästhesie während der endoprothetischen Versorgung der Coxarthrose.

Bei den Patienten der Klinik für Neurologie erfolgte die Biopsie zu diagnostischen Zwecken in Lokalanästhesie. Als gesund wurden Patienten betrachtet, deren elektromyographische, myohistologische und enzymatische Untersuchungen keine pathologischen Veränderungen zeigten.

Jede der verwendeten Biopsien stammt von einem anderen Patienten.

3.2 MHS, MHE und MHN-Patienten

Das Muskelgewebe der auf maligne Hyperthermie getesteten Patienten wurde von Herrn Dr. Wieser aus der Anästhesiologischen Klinik des AKH Wien zugesandt. Die Biopsie erfolgte in Lokalanästhesie zur Bestätigung bzw. zum Ausschluss einer malignen Hyperthermie. Die Einteilung in die Gruppen MHS, MHE bzw MHN wurde von Herrn Dr. Wieser anhand des in der Einleitung beschriebenen Halothan-Koffein-Tests (IVCT) vorgenommen.

3.3 Patienten mit CPT-Mangel

Für den Vergleich mit CPT-Mangel-Patienten wurden Daten von Patienten aus der Neurologischen Klinik der Martin-Luther-Universität Halle mit genetisch gesichertem CPT-Defekt ausgewertet. Die Patienten wurden zur Diagnosesicherung in Lokalanästhesie biopsiert und in unserem Labor genetisch untersucht. Alle für diesen Vergleich ausgewerteten Daten stammen von Patienten, bei denen die Mutation S113L homozygot vorlag.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Lösungen

Verwendet wurden Tris, Dithiothreitol (DTT), Palmitoyl-Coenzym A, Malonyl-Coenzym A, L-Palmitoylcarnitin-Chlorid und Carnitin von der Firma SIGMA (Deisenhofen), Isobutanollösung, Ammoniumsulfat und Bovines Serum Albumin (BSA) von der Firma MERCK (Darmstadt), Triton von der Firma FERAK (Berlin), L-[¹⁴C]-Carnitinlösung von der Firma NEN Life (Zaventem) und Szintillationsflüssigkeit Ready Safe von der Firma BECKMAN. Die Lösungen für die Proteinbestimmung wurden von der Firma PIECE (Rockford) bezogen. Die Lösungen wurden mit Aqua bidest hergestellt.

4.2 Messgeräte

Das Muskelgewebe wurde mit einem Glas-Homogenisator (Typ Elvenhjem) der Firma Wheaton (Millville, USA) homogenisiert. Die Inkubation erfolgte in einem Schüttelbad der Firma GFL (Burgwedel). Zur Zentrifugation wurde eine Zentrifuge der Firma Hettich (Tuttlingen) verwendet. Zur Szintillationsmessung wurde ein Flüssigkeitsszintillationszähler der Serie LS 6500 der Firma BECKMAN verwendet.

4.3 Aufarbeitung der Proben

4.3.1 Vorbereitung und Lagerung

Die Muskelproben wurden direkt nach der Entnahme in mit isotonischer Kochsalzlösung befeuchtete Kompressen gewickelt und während des Transports ins Labor ununterbrochen auf Eis gekühlt. Das Muskelgewebe wurde von Fettgewebe und Faszien freipräpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.3.2 Homogenisieren des Muskelgewebes

Das tiefgefrorene Muskelgewebe wurde in einer Verdünnung von 1:30 in Chappel-Perry Medium A, bestehend aus 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1

mM EDTA, 50 mM Tris-HCL (pH = 7,5), überführt und mit einem Homogenisator 10 min lang unter Kühlung auf Eis homogenisiert.

4.4 Enzymbestimmung

4.4.1 Testprinzip

Die Bestimmung der Carnitin-Palmitoyltransferase-Aktivität erfolgte nach der bei Zierz und Engel beschriebenen Isotopen-Vorwärtsreaktion [90].

Sie beruht auf folgender Reaktion:



Diese durch die CPT katalysierte Reaktion wurde durch Zugabe des Muskelhomogenats gestartet und nach der Inkubationszeit mit Isobutanol und gesättigter Ammoniumsulfatlösung gestoppt. Das radioaktive Reaktionsprodukt Palmitoyl-[¹⁴C]-Carnitin wurde nach Zentrifugation abpipettiert und mit dem Szintillationszähler gemessen.

4.4.2 Messansätze

Für alle Messansätze wurde ein Reaktionsgemisch mit der in Tabelle 2 aufgeführten Zusammensetzung hergestellt.

Zur Bestimmung der CPT-Gesamtaktivität wurden zu 900 μl dieses Reaktionsgemischs 100 μl Muskelhomogenat hinzugefügt und für genau 10 min bei 30°C im Schüttelbad inkubiert. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml konzentrierter Isobutanollösung und 1 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung sowie 700 mg festem Ammoniumsulfat gestoppt. Der Ansatz wurde 10 s gemixt und anschließend 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden 2 Phasen voneinander getrennt. Aus der Oberphase wurden 800 μl entnommen und in ein neues Reagenzglas überführt. Dazu wurden 800 μl gesättigte Isobutanollösung gegeben und 10 s lang gemixt. Anschließend wurde nochmals 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Aus der Oberphase wurden 500 μl entnommen und in ein Szintilla-

Tabelle 2: Zusammensetzung des Reaktionsgemischs zur Bestimmung der CPT-Aktivität

Substanz	Konzentration
Tris-HCl	100 mM
BSA	0,1%
DTT	1 mM
Palmitoyl-CoA	0,08 mM
[¹⁴ C]-Carnitin	5 mM
Hemmstoff	Konzentration
Malonyl-CoA	0,2 mM
L-Palmitoylcarnitin	0,4 mM
Triton X-100	0,5%
Palmitoyl-CoA	0,1 mM - 0,5 mM
Volumen (ohne Muskelhomogenat)	900 μ l

tionsgefäß gegeben, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und gemixt. Anschließend wurde der Ansatz im Szintillationszähler gemessen.

Zur Bestimmung der CPT-Aktivität nach Zugabe von Inhibitoren wurde dem oben beschriebenen Reaktionsgemisch zusätzlich einer der in Tabelle 2 aufgeführten Hemmstoffe zugefügt. Anschließend wurde mit den Ansätzen in gleicher Weise verfahren wie für die Bestimmung der Gesamtaktivität beschrieben.

Bei jeder Messreihe wurde ein Reagenzienleerwert (LW) und ein Standard, bestehend aus 10 μ l [¹⁴C]-Carnitinlösung und 10 ml Szintillationsflüssigkeit mitgeführt. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

4.4.3 Aktivitätsberechnung

Aktivität pro Gramm Feuchtgewicht (FG):

$$\text{Aktivität (nmol/min/g FG)} = \frac{(\text{Cpm}_{\text{Probe}} - \text{Cpm}_{\text{LW}}) \times n_{\text{Standard}} \times V}{\text{Cpm}_{\text{Standard}} \times t \times A \times a \times v}$$

Aktivität pro Gramm NCP:

$$\text{Aktivität (\(\mu\text{mol/min/g NCP})} = \frac{(\text{Cpm}_{\text{Probe}} - \text{Cpm}_{\text{LW}}) \times n_{\text{Standard}} \times V}{\text{Cpm}_{\text{Standard}} \times t \times p \times A \times a \times v}$$

V	=	Volumen im Testansatz (1000 μ l)
$n_{Standard}$	=	Stoffmenge in der Standardlösung (490 nmol)
t	=	Inkubationszeit (10 min)
A	=	Homogenatmenge (100 μ l)
a	=	Homogenatverdünnung (1:30)
v	=	Volumenverdünnung(1:2)
p	=	Proteinmenge (mg NCP/g FG)

4.5 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Nicht-Kollagen-Proteins (NCP) nach der BCA-Methode wurde das Muskelhomogenat mit NaOH im Verhältnis 1:10 versetzt und mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Durch die Zugabe von NaOH wurde das Nicht-Kollagen-Protein hydrolysiert [46]. Das in NaOH unlösliche Kollagen wurde bei 15000 g abzentrifugiert. Das Nicht-Kollagen-Protein aus dem Überstand wurde photometrisch bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration in mg NCP/g Feuchtgewicht (FG) wurde anhand einer mit BSA (0,1%) erstellten Eichkurve ermittelt.

4.6 IVCT

Zur Einteilung der Patienten in die Gruppen MHS, MHE und MHN wurde der IVCT von Herrn Dr. Wieser in der Anaesthesiologischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Wien nach den Richtlinien der EMHG durchgeführt[22].

4.7 Auswertung und statistische Verfahren

Für die Berechnung und Auswertung der Daten wurden die Programme „SPSS“ und „GPOWER“ verwendet. Außerdem wurden eigene Programme in der Programmiersprache „Perl“ geschrieben. Es wurden t-Test und

ANOVA sowie eine Poweranalyse zu beiden Tests durchgeführt. Zusätzlich wurden für die Mittelwertdifferenzen zwischen den Gruppen Konfidenzintervalle berechnet.

4.8 Linearität der Reaktion über Zeit und Muskelmenge

Zur Prüfung der Linearität über die Zeit wurden Inkubationszeiten von 0 min, 5 min, 10 min, 15 min und 20 min gewählt. Weiterhin wurde mit den Messansätzen verfahren wie für die Bestimmung der Gesamtaktivität beschrieben.

Zur Prüfung der Linearität über die Proteinmenge (Muskelmenge) wurden zu dem oben beschriebenen Reaktionsgemisch unterschiedliche Mengen Muskelhomogenat hinzugefügt: 0 μl (LW), 50 μl , 100 μl , 150 μl und 200 μl . Die Inkubationszeit betrug 10 min. Das weitere Verfahren entsprach dem oben beschriebenen.

Alle Messungen zur Bestimmung der Zeit- und Proteinlinearität wurden mehrfach durchgeführt, wobei Muskelgewebe unterschiedlicher Kontrollpatienten verwendet wurde.

Die Reaktion war sowohl zeitlinear über eine Inkubationszeit von 0 bis 20 min als auch proteinlinear über eine Muskelmenge von 0 bis 6,9 mg FG. Die Linearität über die Zeit ist in Abb. 2, über die Muskelmenge in Abb. 3 dargestellt. Für die anschließenden Messungen wurde eine mittlere Inkubationszeit von 10 min sowie eine Muskelmenge von 3,4 mg FG verwendet.

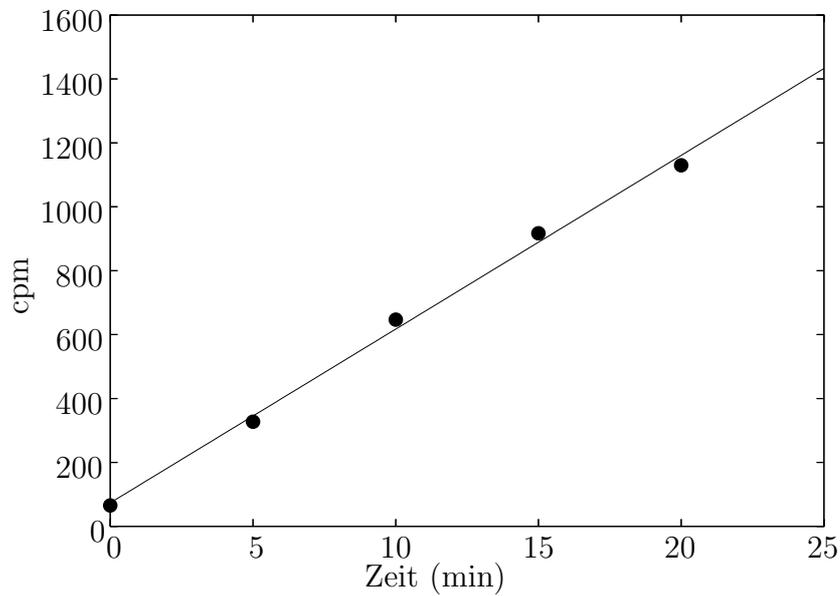


Abbildung 2: **Abhängigkeit des Signals(cpm) von der Inkubationszeit** Mittelwerte aus je 3 Messungen der CPT-Gesamtaktivität bei unterschiedlichen Inkubationszeiten; durchgezogene Linie: lineare Regression

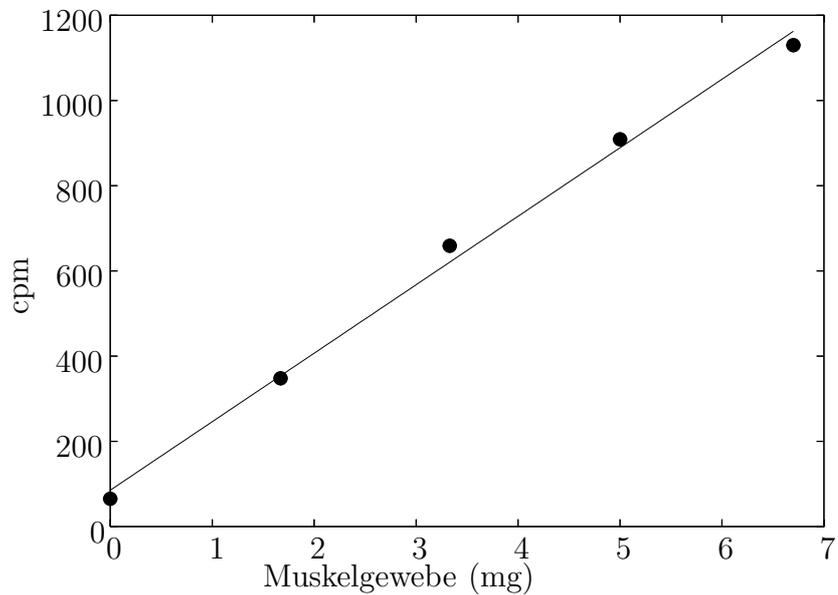


Abbildung 3: **Abhängigkeit des Signals (cpm) von der Muskelmenge** Mittelwerte aus je 3 Messungen der CPT-Gesamtaktivität mit unterschiedlichen Mengen Muskelgewebe; durchgezogene Linie: lineare Regression

4.9 Einfluss der Konzentration von L-Palmitoylcarnitin auf die CPT-Aktivität

Um den Einfluss der L-Palmitoylcarnitin-Konzentration auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wurde die Aktivität der CPT nach Zugabe von 0mM-0,5mM bestimmt. Abb. 4 zeigt die CPT-Aktivität bei MHS-Patienten und MHN-Kontrollen nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von L-Palmitoylcarnitin prozentual zur Gesamtaktivität.

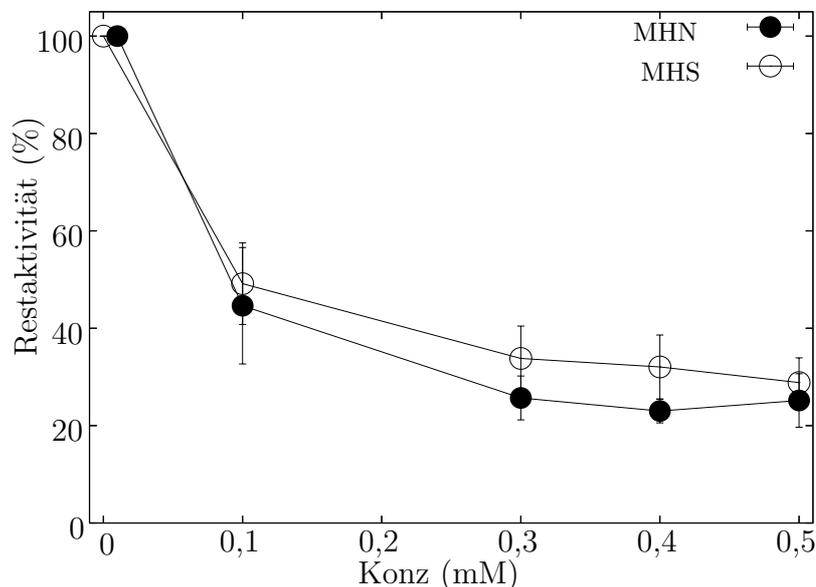


Abbildung 4: Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase in Abhängigkeit von der Konzentration des Hemmstoffs L-Palmitoylcarnitin; Messungen im Muskelhomogenat von 3 MHS-Patienten und 3 MHN-Kontrollen; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen, in % der Gesamtaktivität

Die Restaktivität nahm bei Erhöhung der Konzentrationen zuerst stark ab und näherte sich dann an einen Wert von 20% an, auf dem sie im Konzentrationsbereich von 0,3 mM - 0,5 mM konstant blieb. Dieses Verhalten der Enzymaktivität zeigte sich sowohl bei den MHS-Patienten, als auch bei den MHN-Kontrollen. Für die im Folgenden dargestellten Untersuchungen wurde eine L-Palmitoylcarnitin-Konzentration von 0,4 mM verwendet, welche

sich, wie in Abb. 4 gezeigt, im stationären Bereich befindet. Eine stärkere Hemmung der CPT wäre daher auch bei einer höheren Konzentration des Hemmstoffs nicht zu erwarten.

Durch frühere Versuche in unserem Labor war bereits bekannt, dass sich die verwendeten Konzentrationen der übrigen Hemmstoffe ebenfalls im stationären Bereich befanden (nicht gezeigte Daten). Für Malonyl-CoA und Palmitoyl-CoA wurde dies außerdem bereits von Zierz und Engel beschrieben [90].

5 Ergebnisse

5.1 CPT-Aktivität bei Patienten mit Maligner Hyperthermie im Vergleich zu Kontrollen

Die CPT-Aktivitäten wurden mit der Isotopen-Vorwärtsreaktion bestimmt. Es wurden 18 MHS-Patienten, 17 MHE-Patienten, 13 MHN-Kontrollen und 30 Kontrollen ohne Myopathie aber mit unbekanntem MH-Status untersucht. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Zur statistischen Auswertung dieser Ergebnisse wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Varianzunterschiede, was darauf schließen lässt, dass sich die Gruppen hinsichtlich ihrer CPT-Aktivität nicht signifikant unterscheiden. Des Weiteren wurden je 2 der Gruppen mit Hilfe des t-Tests verglichen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ zeigte sich auch hier sowohl vor als auch nach Bonferroni-Korrektur kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Bei drei der MHS-Patienten war die Diagnose zusätzlich zum IVCT genetisch gesichert. Auch in dieser Untergruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den übrigen Gruppen.

5.1.1 Gesamtaktivität der CPT

Die Bestimmung der Gesamtaktivität der CPT erfasst CPT I und CPT II. Bezogen auf das Nicht-Kollagen-Protein (NCP) fanden sich bei den MHS-Patienten Werte von 0,44 - 2,89 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NCP}$ (Mittelwert $(1,55 \pm 0,53) \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NCP}$), bei den MHE-Patienten Werte von 1,09 - 2,90 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NCP}$ (Mittelwert $(1,75 \pm 0,58) \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NCP}$), bei den MHN-Kontrollen Werte von 0,61 - 3,54 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NCP}$ (Mittelwert $(1,85 \pm 0,93) \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NCP}$) und bei Kontrollen mit unbekanntem MH-Status 0,72 - 2,53 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NCP}$ (Mittelwert $(1,62 \pm 0,42) \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NCP}$). Abb. 5 zeigt die Gesamtaktivität in den verschiedenen Gruppen. Die Gesamtaktivität zeigte in ANOVA und t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

Tabelle 3: Vergleich der Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase bei MHS-Patienten, MHE-Patienten, MHN-Patienten, gesunden Kontrollen und Patienten mit genetisch gesichertem CPT-II-Defekt; CPT-Gesamtaktivität und Restaktivität nach Zugabe verschiedener Hemmstoffe; Mittelwerte und Standardabweichung; n.b.: nicht bestimmt

CPT-Aktivität	MHS-Patienten n = 18	MHE-Patienten n = 17	MHN-Kontrollen n = 13	Kontrollen Pat.o.Myop. n = 30	CPT-Mangel-Patienten n = 8
Gesamtaktivität μ mol/min/g NCP					
MW \pm SD	1,55 \pm 0,53	1,75 \pm 0,58	1,85 \pm 0,93	1,62 \pm 0,42	n.b.
Range	0,44 - 2,89	1,09 - 2,90	0,61 - 3,54	0,72 - 2,53	
Restaktivität %					
Malonyl-CoA (0,2 mM)					
MW \pm SD	39,5 \pm 5,7	40,3 \pm 5,5	37,9 \pm 5,7	36,0 \pm 8,1	8,2 \pm 4,8
Range	28,8 - 52,6	30,6 - 50,0	30,9 - 50,0	23,5 - 64,2	1,8 - 14,0
Triton (0,5 %)					
MW \pm SD	53,5 \pm 8,6	52,9 \pm 7,8	53,9 \pm 17,6	49,1 \pm 9,5	6,7 \pm 3,4
Range	40,4 - 68,6	39,5 - 69,4	40,0 - 107,4	32,5 - 66,2	2,1 - 13,0
L-Palmitoylcarnitin (0,4 mM)					
MW \pm SD	24,9 \pm 3,8	23,3 \pm 4,1	23,8 \pm 6,4	22,5 \pm 7,3	n.b.
Range	20,2 - 31,4	15,7 - 29,2	16,0 - 38,5	11,0 - 50,8	
Palmitoyl-CoA (0,3 mM)					
MW \pm SD	68,1 \pm 10,4	69,2 \pm 8,4	65,4 \pm 6,4	66,8 \pm 9,9	n.b.
Range	47,4 - 83,5	55,6 - 91,0	54,7 - 81,0	44,0 - 89,9	

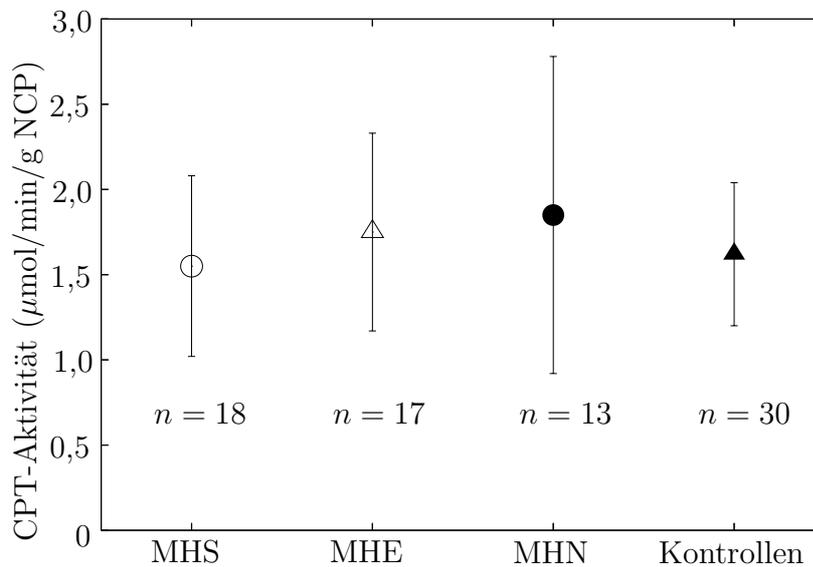


Abbildung 5: Gesamtaktivität der CPT

5.1.2 Restaktivität nach Hemmung durch Malonyl-CoA

Malonyl-CoA hemmt die CPT I. Die Restaktivität nach Hemmung durch Malonyl-CoA entspricht daher der Aktivität der CPT II. Eine Verminderung der Restaktivität nach Zugabe von Malonyl-CoA bei normaler Gesamtaktivität weist auf einen CPT II-Mangel hin.

Nach Hemmung durch 0,2 mM Malonyl-CoA betrug die Restaktivität bei MHS-Patienten 28,8 - 52,6 % (Mittelwert $(39,5 \pm 5,7)$ %), bei MHE-Patienten 30,6 - 50,0 % (Mittelwert $(40,3 \pm 5,5)$ %), bei MHN-Kontrollen 30,9 - 50,0 % (Mittelwert $(37,9 \pm 5,7)$ %), und bei Kontrollen mit unbekanntem MH-Status 23,5 - 64,2 % (Mittelwert $(36,0 \pm 8,1)$ %). Die Restaktivitäten (in Prozent der Gesamtaktivität) sind in Abb. 6 dargestellt. ANOVA und t-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Ein CPT II-Mangel lies sich also in keiner der Gruppen nachweisen.

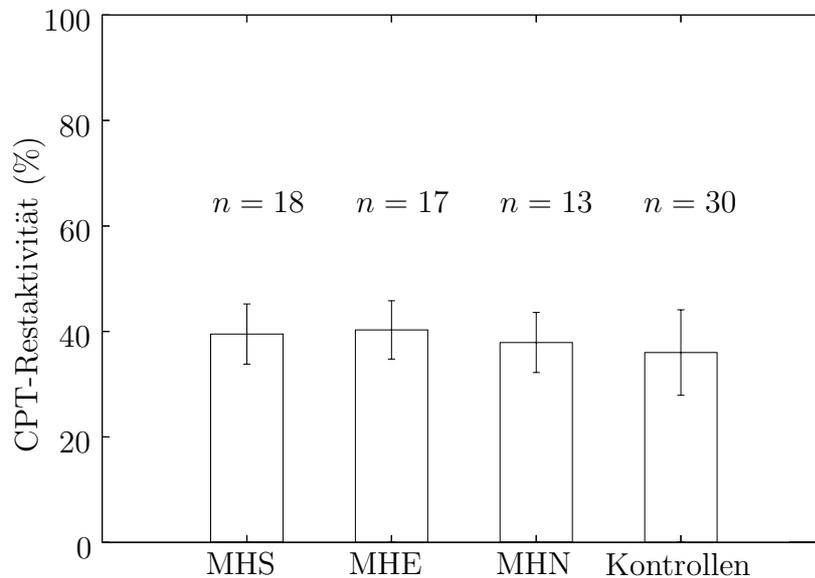


Abbildung 6: Restaktivität der CPT nach Hemmung durch Malonyl-CoA

5.1.3 Restaktivität nach Hemmung durch Triton X-100

Abb. 7 zeigt die Restaktivität nach Hemmung durch 0,5 % Triton X-100. Sie betrug bei MHS-Patienten 40,4 - 68,6 % (Mittelwert $(53,5 \pm 8,6)$ %), bei MHE-Patienten 39,5 - 69,4 % (Mittelwert $(52,9 \pm 7,8)$ %), bei MHN-Kontrollen 40,0 - 107,4% (Mittelwert $(53,9 \pm 17,6)$ %) und bei Kontrollen mit unbekanntem MH-Status 32,5 - 66,2 % (Mittelwert $(49,1 \pm 9,5)$ %). Zwischen den verschiedenen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

5.1.4 Restaktivität nach Hemmung durch L-Palmitoyl-Carnitin

Die Aktivitäten nach Zugabe von 0,4 mM des Reaktionsprodukts L- Palmitoyl-Carnitin sind in Abb. 8 zu sehen. Diese erreichten bei MHS-Patienten Werte

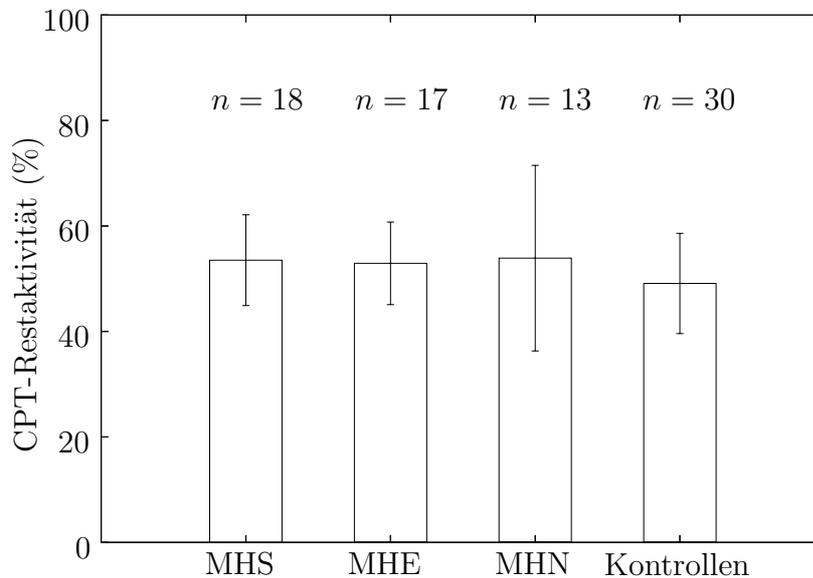


Abbildung 7: Restaktivität der CPT nach Hemmung durch 0,5 % Triton X-100

von 20,2 - 31,4 % (Mittelwert $(24,9 \pm 3,8)$ %), bei MHE-Patienten 15,7 - 29,2 % (Mittelwert $(23,3 \pm 4,1)$ %), bei MHN-Kontrollen 16,0 - 38,5 % (Mittelwert $(23,8 \pm 6,4)$ %) und bei Kontrollen mit unbekanntem MH-Status 11,0 - 50,8 % (Mittelwert $(22,5 \pm 7,3)$ %). Die Daten zeigen keine signifikanten Unterschiede in t-Test und ANOVA.

5.1.5 Restaktivität nach Hemmung durch Palmitoyl-CoA

Abb. 9 stellt die Restaktivitäten nach Hemmung durch 0,3 mM des Substrats L-Palmitoyl-CoA dar. Die Aktivität nach Zugabe von L-Palmitoyl-CoA lag bei MHS-Patienten im Bereich von 47,4 - 83,5 % (Mittelwert $(68,1 \pm 10,4)$ %), bei MHE-Patienten 55,6 - 91,0 % (Mittelwert $(69,2 \pm 8,4)$ %), bei MHN-Kontrollen 54,7 - 81,0 % (Mittelwert $(65,4 \pm 6,4)$ %) und bei Kontrollen mit unbekanntem MH-Status 44,0 - 89,9 % (Mittelwert $(66,8 \pm 9,9)$ %). Signifikante Unterschiede waren nicht vorhanden.

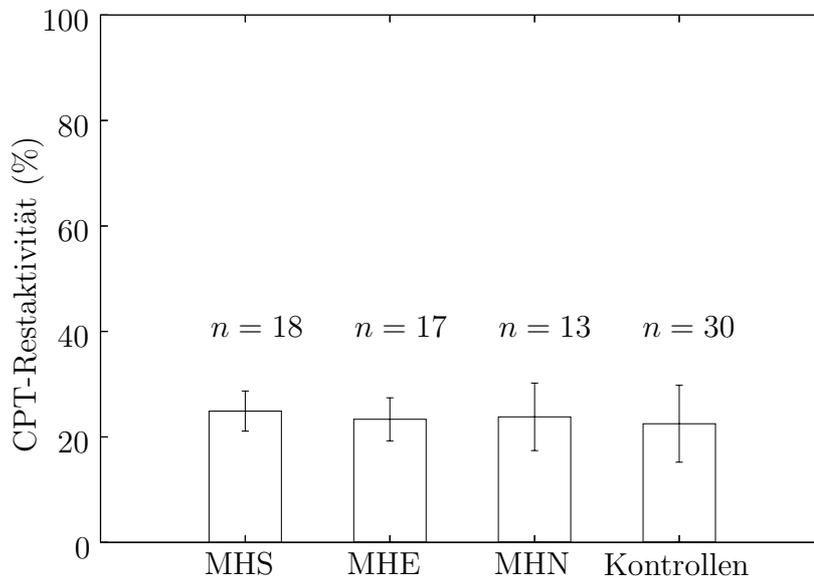


Abbildung 8: Restaktivität der CPT nach Hemmung durch L-Palmitoylcarnitin

5.2 Power-Analyse der Ergebnisse

Um die Wahrscheinlichkeit zu ermitteln, mit der ein tatsächlich vorhandener, relevanter Unterschied zwischen den Gruppen bei der untersuchten Patientenzahl als signifikant erkannt worden wäre, wurde die Power (Teststärke) berechnet. Die Ergebnisse der Poweranalyse sind in Tabelle 4 dargestellt. Als relevant wurde eine Differenz bezeichnet, die mindestens der Standardabweichung in der Gruppe der gesunden MHN-Kontrollen entspricht. Die Power betrug für den t-Test zwischen MHS-Patienten und MHN-Kontrollen für die CPT-Gesamtaktivität 96,5%, für die Restaktivität nach Hemmung durch Malonyl-CoA 85,0%, durch Triton X-100 97,4%, durch L-Palmitoylcarnitin 96,1% und durch Palmitoyl-CoA 60,3%. Für den Vergleich zwischen MHE-Patienten und MHN-Kontrollen errechnete sich eine Power von 94,9% für die Gesamtaktivität, 85,4% für die Aktivität nach Zugabe von Malonyl-

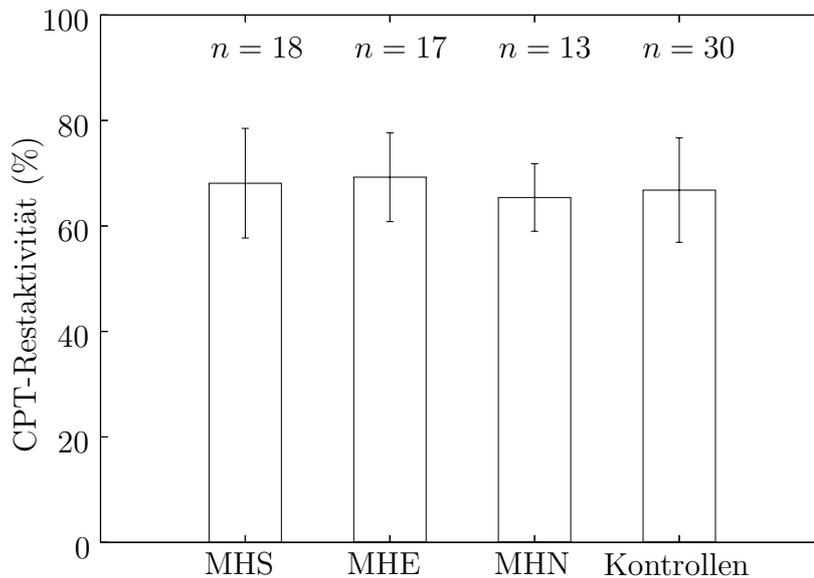


Abbildung 9: Restaktivität der CPT nach Hemmung durch Palmitoyl-CoA

CoA, 97,5% nach Zugabe von Triton X-100, 94,6% nach Zugabe von L-Palmitoylcarnitin und 71,9% nach Zugabe von Palmitoyl-CoA. Die Power für den Vergleich zwischen MHE-Patienten und MHS-Patienten errechnete sich zu 99,9% für die Gesamtaktivität, zu 90,5% nach Hemmung durch Malonyl-CoA, zu 100% nach Hemmung durch Triton X-100, zu 99,9%, für den Hemmstoff L-Palmitoylcarnitin und zu 61,6 % nach Hemmung durch Palmitoyl-CoA . Vergleicht man MHS-Patienten mit den gesunden Kontrollen, die nicht mit Hilfe des IVCT getestet wurden, erhält man eine Power von 100 % für die Gesamtaktivität, 81,2 % für die Restaktivität nach Zugabe von Malonyl-CoA, 100 % nach Zugabe von Triton X-100, 96,1 % von L-Palmitoylcarnitin und 66,9 % von Palmitoyl-CoA. Für den Vergleich zwischen MHE-Patienten und gesunden Kontrollen liegt sie bei 100 % für die Gesamtaktivität, bei 82,5 % für die Hemmung mit Malonyl-CoA, bei 100% für Triton X-100, bei 94,9 % für L-Palmitoylcarnitin und bei 71,3 % für Palmitoyl-CoA. Zwischen MHN-Patienten und nicht auf MH getesteten Kon-

trollen ergibt sich eine Power von 99,5 % für die CPT-Gesamtaktivität, 72,8 % für die Restaktivität nach Zugabe von Malonyl-CoA, 99,5 % nach Zugabe von Triton X-100, 85,3 % nach Zugabe von L-Palmitoylcarnitin und 67,7 % nach Zugabe von Palmitoyl-CoA. Die unterschiedlichen Werte der Power für die verschiedenen Gruppenkonstellationen und die einzelnen Hemmstoffe ergeben sich aus den unterschiedlichen Gruppengrößen, den Unterschieden in der gepoolten Varianz sowie durch die jeweilige Standardabweichung in der Gruppe der MHN-Kontrollen, die als Maß für die nachzuweisende Minimaldifferenz zugrundegelegt wurde.

Die Power der ANOVA wird außer durch die Gesamtzahl der Patienten auch durch deren Verteilung auf die einzelnen Gruppen beeinflusst. Bei großen Unterschieden in der Anzahl an Versuchspersonen in den verschiedenen Gruppen ist die durch konventionelle Power-Analyse-Software wie „GPower“ berechnete Power möglicherweise nicht verlässlich. Aus diesem Grund wurden nur die Gruppen MHS, MHE und MHN mit der ANOVA verglichen, die ähnliche Gruppengrößen aufweisen. Ein Vergleich mit der Gruppe der Kontrollen mit unbekanntem MH-Status ist nicht unbedingt notwendig, weil die gesunden Kontrollen bereits durch die MHN-Gruppe repräsentiert werden.

Bei einer Effektstärke von 0,4 beträgt die Power der ANOVA 66,7 %.

Tabelle 4: Power der statistischen Analysen

t-Test					
Verglichene Gruppen	Power				
	Gesamtakt. CPT	Restakt. nach Hemmung durch			
		Malonyl- CoA	Triton X-100	Palmitoyl- carnitin	Palmitoyl- CoA
MHS vs. MHN	96,5%	85,0%	97,4%	96,1%	60,3%
MHN vs. MHE	94,9%	85,4%	97,5%	94,6%	71,9%
MHE vs. MHS	99,9%	90,5%	100,0%	99,9%	61,6%
MHS vs. Kontrollen	100,0%	81,2%	100,0%	96,1%	66,9%
MHE vs. Kontrollen	100,0%	82,5%	100,0%	94,9%	71,3%
MHN vs. Kontrollen	99,5%	72,8%	99,5%	85,3%	67,7%
ANOVA					
Verglichene Gruppen	Power				
MHS-MHE-MHN	66,7				

5.3 Berechnung des Konfidenzintervalls

Das 85 %-Konfidenzintervall (Vertrauensbereich) gibt an, innerhalb welcher Spanne der wahre Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von 85 % liegt. Die Konfidenzintervalle wurden für die Mittelwertdifferenz zwischen MHS und MHN, zwischen MHS und MHE und zwischen MHE und MHN berechnet. Anschließend wurde getestet, ob die Minimaldifferenz, die noch nachgewiesen werden sollte, innerhalb dieses Bereichs liegt. Für alle durchgeführten Paarvergleiche, außer für die Hemmung durch Palmitoyl-CoA, lag die nachzuweisende Differenz außerhalb des für die Mittelwertdifferenz errechneten 85 %-Konfidenzintervalls. Dies zeigt, dass die wahre Mittelwertdifferenz mit einer Wahrscheinlichkeit von höchstens 15 % die Größe der nachzuweisenden Minimaldifferenz erreicht oder übersteigt.

5.4 CPT-Aktivität bei Patienten mit bekanntem CPT-Mangel

Es wurde die CPT-Aktivität bei MHS-Patienten und MHN-Kontrollen mit Werten von Patienten mit genetisch gesichertem CPT-Mangel verglichen, um herauszufinden, welche Werte bei einem tatsächlich vorhandenen CPT-Mangel zu erwarten wären. Hierfür wurden nur Patienten mit der am häufigsten vorkommenden Mutation S113L ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt.

Bei den CPT-Mangel-Patienten war die Restaktivität der CPT nach Hemmung durch verschiedene Hemmstoffe bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant niedriger als bei allen anderen untersuchten Gruppen. Signifikanz zeigte sich hier sowohl im t-Test, als auch in der ANOVA. Der Post-Hoc Test nach Bonferroni, welcher das Signifikanzniveau für Mehrfachvergleiche anpasst, zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den CPT-Mangel-Patienten und den anderen Gruppen.

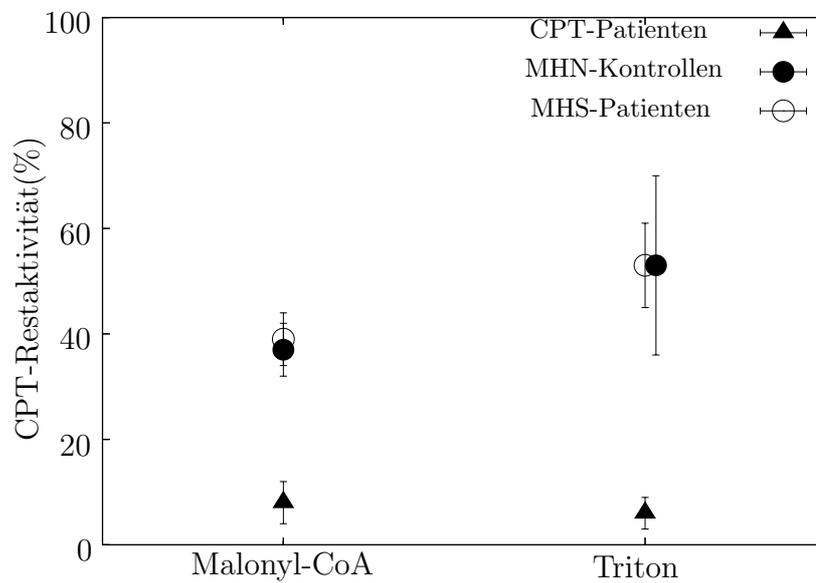


Abbildung 10: Vergleich der CPT-Aktivität bei Patienten mit CPT-Mangel, MHS-Patienten und MHN-Kontrollen; Restaktivität nach Hemmung durch Malonyl-CoA oder Triton; Mittelwert und Standardabweichung

6 Diskussion

6.1 Zusammenhang zwischen CPT-Mangel und MH

Die unter 5 dargestellten Ergebnisse geben keinen Hinweis auf einen CPT-Defekt bei MHS-Patienten. Weder die Gesamtaktivität, noch die Restaktivität der CPT nach Hemmung mit Malonyl-CoA, Triton X-100, L-Palmitoylcarnitin oder Palmitoyl-CoA zeigte signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen MHS, MHE, MHN und Kontrollen, weder im t-Test noch in der ANOVA. Die Power der statistischen Tests war mit mindestens 60,3 % bei allen Vergleichen ausreichend hoch.

Ein isolierter Defekt einer der Isoformen, CPT I oder CPT II, lag ebenfalls nicht vor, wie sich aus der Hemmbarkeit der CPT durch den CPT I-Inhibitor Malonyl-CoA und das Detergenz Triton X-100 schließen lässt. Malonyl-CoA hemmt selektiv die CPT I, Triton X-100 löst die CPT aus der Membran und inaktiviert dadurch die CPT I. Ein CPT I-Mangel würde sich daher durch eine prozentual zur Gesamtaktivität erhöhte, ein CPT II-Mangel durch eine erniedrigte Restaktivität nach Hemmung durch Malonyl-CoA bzw. Triton X-100 zeigen.

Eine abnorme Hemmbarkeit der CPT, wie sie bei Patienten mit CPT-Mangel vorliegt[90, 91, 82], lies sich bei MHS-Patienten nicht nachweisen. Die Restaktivität nach Hemmung durch Malonyl-CoA, Triton X-100, L-Palmitoylcarnitin und Palmitoyl-CoA zeigte bei MHS-Patienten keine signifikanten Unterschiede zu den anderen untersuchten Gruppen.

Vladutiu und Mitarbeiter beschrieben eine signifikante Reduktion der Gesamtaktivität der CPT bei MH, jedoch keine verstärkte Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA oder Triton [79].

Für diese unterschiedlichen Ergebnisse gibt es mehrere mögliche Ursachen. Zum einen wurden die Studien von Vladutiu und Mitarbeitern an transformierten Lymphoblasten durchgeführt, während in der vorliegenden Arbeit Muskelbiopsien verwendet wurden. Da sowohl die Maligne Hyperthermie als auch der CPT-Mangel vorwiegend die Muskulatur betreffen, ist es sinnvoll, die Enzymbestimmung an Muskelbiopsien durchzuführen. Die bio-

chemische Untersuchung transformierter Lymphoblasten ist zur Diagnostik des CPT-Mangels nicht etabliert. Das derzeit beste diagnostische Verfahren ist die radiochemische Bestimmung der CPT-Aktivität in Muskelbiopsien.

Vladutiu und Mitarbeiter untersuchten die CPT-Aktivität mit Hilfe verschiedener Verfahren. Nur bei Verwendung der Rückwärtsreaktion stellten sie Unterschiede zwischen den Gruppen fest, während alle anderen Verfahren gleiche Aktivitäten bei Gesunden und MH-Patienten ergaben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Isotopen-Vorwärtsreaktion angewandt, welche das Standardverfahren zur Diagnosesicherung eines CPT-Mangels darstellt. Der Unterschied dieser beiden Verfahren besteht vor allem in der unterschiedlichen Konzentration an L-Palmitoylcarnitin. Diese ist bei der Rückreaktion höher als bei der Vorwärtsreaktion, was zu einer Hemmung der CPT führt. Durch die Zugabe von L-Palmitoylcarnitin wird jedoch die Rückreaktion simuliert, so dass auf deren zusätzliche Durchführung verzichtet werden kann. Wie in Abb. 4 gezeigt, lag die verwendete Konzentration von 0,4 mM L-Palmitoylcarnitin bei MHS-Patienten und MHN-Kontrollen im stationären Bereich der Hemmung. Auch bei höheren Konzentrationen wäre daher keine verstärkte Hemmbarkeit der CPT zu erwarten.

Die Aussagekraft der Studie von Vladutiu und Mitarbeitern ist außerdem durch die geringen Fallzahlen von 7 MHS-Patienten und 5 Kontrollen eingeschränkt. Unsere Versuchsgruppe war mit 18 MHS, 17 MHE, 13 MHN und 30 Kontrollen wesentlich größer und erlaubt daher eine Aussage mit höherer statistischer Sicherheit. Der MH-Status der Versuchsgruppen von Vladutiu war zudem nicht eindeutig bestimmt. Zur Gruppe der MH-Patienten wurden solche gezählt, die entweder einen positiven IVCT aufwiesen (MHS), oder eine Episode einer MH überlebt hatten, jedoch nicht mit Hilfe des IVCT untersucht worden waren. Die Kontrollgruppe wurde nicht auf MH getestet. Besonders im Hinblick auf die Tatsache, dass MH-ähnliche Narkosezwischenfälle auch bei negativem IVCT beschrieben worden sind [32], lässt sich also nicht sicher beurteilen, ob alle Patienten der Versuchsgruppe von Vladutiu und Mitarbeitern wirklich MHS-Patienten und alle Kontrollen wirklich MHN-Patienten waren.

Ein CPT-Defekt beruht vorwiegend auf einer abnormen Regulation, nicht

auf einer Reduktion der Gesamtaktivität [90, 82]. Diese würde sich durch eine verminderte Restaktivität nach Hemmung durch Malonyl-CoA, Triton, L-Palmitoylcarnitin oder Palmitoyl-CoA bemerkbar machen [90, 82, 19]. Vladutiu und Mitarbeiter verwendeten die Hemmstoffe Malonyl-CoA und Triton und fanden keine Verminderung der Restaktivität bei MH-Patienten. Dies spricht eher gegen einen CPT-Mangel bei den von Vladutiu untersuchten Patienten.

6.2 Vergleich der CPT-Aktivität bei MHS, MHE und MHN-Patienten mit der Aktivität bei Patienten mit CPT-Mangel

Die Ergebnisse aus unseren Messungen verglichen wir mit Werten von 8 Patienten mit CPT-Mangel, um zu ermitteln, in welchem Bereich die Werte bei einem genetisch gesicherten CPT-Mangel liegen. Insbesondere die Restaktivität nach Hemmung durch Malonyl-CoA bzw. Triton erreichte bei den CPT-Mangel-Patienten deutlich niedrigere Werte als in allen anderen Gruppen. Die ermittelten Werte waren vergleichbar zu den von Wieser und Mitarbeitern beschriebenen Werten bei CPT-Mangel [82]. Trotz der kleinen Fallzahl in dieser Gruppe waren die Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ signifikant. Läge bei MHS-Patienten ein CPT-Mangel ähnlich dem bei Patienten mit genetisch gesichertem CPT-Defekt vor, wäre auch hier eine signifikante Erniedrigung der Werte im Vergleich zu MHN-Kontrollen zu erwarten. Auf Grund der größeren Fallzahl würde hier sogar ein geringerer Unterschied Signifikanz erreichen. Da dies jedoch nicht der Fall war, kann darauf geschlossen werden, dass bei MHS-Patienten keine Reduktion der CPT-Aktivität auf Werte ähnlich denen bei genetisch bedingtem CPT-Defekt vorliegt.

Drei Patienten mit genetisch gesichertem CPT-Defekt wurden außerdem von Zierz und Mitarbeitern mit dem IVCT auf MH getestet und als negativ (MHN) klassifiziert (nicht publizierte Daten). Auch wurde bisher keine größere Anzahl positiver IVCTs bei CPT-Mangel beschrieben. Obwohl dies nicht in einer größeren Studie untersucht wurde und daher nicht mit Sicherheit

ausgeschlossen werden kann, gibt es keine Hinweise darauf, dass die Maligne Hyperthermie oder der MHS-Status im IVCT bei CPT-Mangel signifikant häufiger auftritt als in der Normalbevölkerung.

6.3 Mögliche Gründe für das Auftreten MH-ähnlicher Reaktionen bei CPT-Mangel

Nachdem, wie oben gezeigt, kein CPT-Mangel bei Patienten mit MH festgestellt werden konnte, stellt sich die Frage, wie die beschriebenen Fälle von MH bei CPT-Mangel [41] zu erklären sind. Hierfür gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Zum einen könnte die Assoziation zufällig sein. Trotz der Seltenheit beider Erkrankungen ist es nicht ausgeschlossen, dass ein Patient sowohl an CPT-Mangel als auch an MH leidet, obwohl beide Erkrankungen unabhängig voneinander sind und auf unterschiedlichen Defekten beruhen. Zum anderen handelte es sich möglicherweise bei den beschriebenen Patienten gar nicht um eine echte MH, sondern um eine MH-ähnliche Reaktion, die durch den CPT-Mangel bedingt war. Beschrieben wurden lediglich Rhabdomyolyse, Myoglobinurie und akutes Nierenversagen. Diese treten jedoch auch bei CPT-Mangel-Attacken auf [3, 50, 19]. Solche Attacken werden durch körperliche und psychische Überanstrengung getriggert. Auch Fasten wurde als auslösender Faktor beschrieben [19]. Eine Operation in Kombination mit der präoperativen Nahrungskarenz könnte durchaus einen solchen Auslöser darstellen.

MH-ähnliche Reaktionen wurden auch bei MHN-Patienten beschrieben [32]. Solche Fälle zeigen, dass eine Narkosereaktion mit den beschriebenen Symptomen nicht immer mit dem MHS-Status im IVCT einhergeht. Auf Grund der hohen Sensitivität dieses Tests kann man davon ausgehen, dass es sich bei solchen Fällen nicht um eine MH, sondern um andere Narkosekomplikationen handelt, denen möglicherweise eine andere Muskelerkrankung zugrunde liegt.

Auch für andere Myopathien wurden Narkosekomplikationen beschrieben, die MH-Attacken ähneln, unter anderem für die Duchenne-Muskeldystrophie [81, 67], die Becker-Muskeldystrophie [10, 60], die Myotonia congenita [24],

den Laminin- α 2-Defekt [66] und den CPT I-Defekt [59]. Wie schon unter 1.5.5 beschrieben, sind all diese Erkrankungen jedoch nicht mit der MH assoziiert. Bei den beschriebenen Narkosezwischenfällen handelt es sich um MH-ähnliche Reaktionen, denen jedoch eine andere Ursache, möglicherweise die Myopathie, zugrundeliegt. Da alle von Katsuya und Mitarbeitern beschriebenen Symptome auch bei CPT-Mangel-Attacken vorkommen und da außerdem die Operation oder operationsbegleitende Umstände als Auslöser einer solchen Attacke in Betracht kommen, liegt die Vermutung nahe, dass auch in diesem Fall eine MH-ähnliche Narkosekomplikation vorliegt, deren Ursache der CPT-Mangel darstellt.

6.4 Weiterführende Fragen

Einige Muskelerkrankungen gehen, auch wenn sie nicht mit der MH im Zusammenhang stehen, mit einem erhöhten Narkoserisiko einher [44]. Die beschriebenen Narkosekomplikationen [59, 41] weisen darauf hin, dass dies auch bei CPT-Mangel zutreffen könnte. Die Beantwortung dieser Frage wäre von großer Bedeutung für die perioperative Versorgung der CPT-Mangel-Patienten.

7 Zusammenfassung

Maligne Hyperthermie ist eine lebensbedrohliche Narkosekomplikation bei genetisch prädisponierten Patienten. Sie tritt bei Verwendung von Succinylcholin in Verbindung mit Inhalationsnarkotika auf und äußert sich in Form von Muskelsteifigkeit, Temperaturanstieg und Rhabdomyolyse mit konsekutivem Nierenversagen. Die Diagnose wird durch den IVCT gestellt, anhand dessen die Patienten in die Gruppen MHS, MHE und MHN eingeteilt werden können.

Die Carnitin-Palmitoyltransferase ist ein Enzym des Fettstoffwechsels, welches die Bindung langkettiger Fettsäuren an Carnitin katalysiert, wodurch der Transport der Fettsäuren in die Mitochondrien ermöglicht wird. Es existieren zwei Isoenzyme, CPT I und CPT II. Ein Mangel an CPT II führt zu belastungsinduzierten Muskelschmerzen und Rhabdomyolysen.

Nachdem 1988 erstmals eine MH-ähnliche Narkosekomplikation bei einem Patienten mit CPT-Mangel beschrieben wurde, stellte sich die Frage nach einem Zusammenhang zwischen MH und CPT-Mangel. In einer ersten Studie hierzu wurde die CPT-Aktivität in Lymphoblasten von Patienten mit MH untersucht. Hierbei wurde eine signifikante Reduktion der CPT-Aktivität bei Patienten mit MH gefunden. Allerdings umfasste die Versuchsgruppe nur eine sehr kleine Patientenzahl, die Diagnose „Maligne Hyperthermie“ wurde anhand uneinheitlicher Kriterien gestellt und die verschiedenen angewandten Untersuchungsmethoden führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Frage nach einer generellen Erniedrigung der CPT-Aktivität bei MH blieb daher unbeantwortet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die CPT-Aktivität in Muskelbiopsien von Patienten mit gesicherter MH zu bestimmen und mit der CPT-Aktivität in Biopsien nicht betroffener Kontrollpersonen zu vergleichen, um herauszufinden, ob die Aktivität dieses Enzyms bei Betroffenen im Vergleich zu Gesunden erniedrigt ist. Es wurde ebenfalls untersucht, ob bei Patienten mit MH die Regulation des Enzyms CPT gestört ist.

Die Patienten wurden anhand des IVCT in die drei Gruppen MHS, MHE und MHN eingeteilt. Eine weitere Gruppe umfasste klinisch gesunde Patienten mit unauffälliger Muskelbiopsie, die nicht durch IVCT getestet wor-

den waren. In den Muskelbiopsien dieser Patienten wurde radiochemisch die Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase vor und nach Hemmung durch Inhibitoren bestimmt, deren Einsatz in der Diagnostik eines CPT-Mangels etabliert ist. Mit dem t-Test wurden die Gruppen paarweise, mit der ANOVA alle Gruppen insgesamt miteinander verglichen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und ausreichender Power zeigten sich in keinem der Tests signifikante Unterschiede.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass ein genereller CPT-Mangel sowie eine Regulationsstörung der CPT bei MH unwahrscheinlich ist. Beschriebene Fälle von MH-ähnlichen Reaktionen bei CPT-Mangel könnten Ausdruck eines von der MH unabhängig erhöhten Narkoserisikos bei dieser Erkrankung sein.

Literatur

- [1] Anetseder M, Hager M, Müller CR, Roewer N: Diagnosis of susceptibility to malignant hyperthermia by use of a metabolic test . *Lancet* 359 (2002) 1579–1580
- [2] Avila G.: Intracellular Ca_{2+} dynamics in malignant hyperthermia and central core disease: established concepts, new cellular mechanisms involved. *Cell Calcium* 37 (2005) 121–127
- [3] Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J: Review: Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: Biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* 25 (2004) 495–520
- [4] Bonnefont JP, Taroni 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) 971–978
- [5] Bremer J, Norum K: The mechanism of substrate inhibition of palmitoyl coenzyme A: carnitine palmitoyltransferase by palmitoyl coenzyme A. *J Biol Chem* 242 (1967) 1744–1748
- [6] Brosnan JT, Kopec B, Fritz IB: The localisation of carnitine palmitoyltransferase on the inner membrane of bovine liver mitochondria. *J Biol Chem* 248 (1973) 4075–4082
- [7] Brownell AKW: Malignant hyperthermia: relationship to other diseases. *Br J Anaesth* 60 (1988) 303–308
- [8] Brownell AKW, Paasuke RT, Elash A, Fowlow SB, Seagram CGF, RJ Diewold, M Friesen C: Malignant hyperthermia in Duchenne muscular dystrophy. *Anaesthesiology* 58 (1983) 180–182
- [9] Bruno C, Bado M, Minetti C, Cordone G, DiMauro S: Novel mutation in the CPT II gene in a child with periodic febrile myalgia and myoglobinuria. *J Child Neurol* 15 (2000) 390–393

- [10] Bush A, Dubowitz V: Fatal rhabdomyolysis complicating general anaesthesia in a child with Becker muscular dystrophy, *Neuromuscul Disord* 1 (1991) 201–204
- [11] Chien D, Dean D, Saha AK, Flatt JP, Ruderma NB: Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am J Physiol* 279 (2000) E259–E265
- [12] Cook GA: 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) 12030–12033
- [13] Cook GA, Gamble MS: Regulation of carnitine palmitoyltransferase by insulin results in decreased activity and decreased apparent K_i values for malonyl-CoA. *J Biol Chem* 262 (1987) 2050–2055
- [14] Cook GA, Mynatt RL, Kashfi K: Yonetani-Theorell analysis of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I inhibition indicates two distinct inhibitory binding sites. *J Biol Chem* 269 (1994) 8803–8807
- [15] Curran JL, Hall WJ, Halsall PJ, Hopkins PM, Iles DE, Markham AF, McCall SH, Robinson RL, West SP, Bridges LR, Ellis FR: Segregation of malignant hyperthermia, central core disease and chromosome 19 markers. *Br J Anaesth* 83 (1999) 217–222
- [16] Denborough MA, Forster JFA, Lovell RRH, Maplestone PA, Villiers JD: Anaesthetic deaths in a family. *Br J Anaesth* 34 (1962) 395–396
- [17] Deschauer M, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Biekman E, Pourfarzam M, Taylor RW, Turnbull DM, Zierz S: A splice junction mutation in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* 79 (2003) 124–128
- [18] Deschauer M, Wieser T, Schroder R, Zierz S: A novel nonsense mutation (515del4) in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* 75 (2002) 181–185

- [19] Deschauer M, Wieser T, Zierz S: Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: clinical and molecular genetic features and diagnostic aspects. *Arch Neurol* 62 (2005) 37–41
- [20] DiMauro S, Melis-DiMauro P: Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science* 182 (1973) 929–930
- [21] Dirksen RT, Avila G: Distinct effects on Ca^{2+} handling caused by malignant hyperthermia and central core disease mutations in RyR1. *Biophys J* 87 (2004) 3193–3204
- [22] EMHG: A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anaesth* 56 (1984) 1267–1269
- [23] Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD: Cloning, sequencing, and expression of cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I direct evidence that a single polypeptide is involved in catalytic function and inhibitor interaction. *J Biol Chem* 268 (1993) 5817–5822
- [24] Farbu E, Softeland E, Bindoff LA: Anaesthetic complications associated with myotonia congenita: case study and comparison with other myotonic disorders. *Acta Anaesthesiol Scand* 47 (2003) 630–634
- [25] Finocchiaro G, Taroni F, Rocchi M, Martin AL, Colombo I, Tarelli GT, Didonato S: cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 661–665
- [26] Fishbein WN, Armbrustmacher VW, Griffin JL: Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science* 200 (1978) 545–548
- [27] Fishbein WN, Muldoon SM, PA Deuster, Armbrustmacher VW: Myoadenylate deaminase deficiency and malignant hyperthermia susceptibility: is there a relationship? *Biochem Med* 34 (1985) 344–354

- [28] Fletcher JE, Tripolitis L, Hubert M, Vita GM, Levitt RC, Rosenberg H: Genotype and phenotype relationships for mutations in the ryanodine receptor in patients referred for diagnosis of malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 75 (1995) 310–317
- [29] Fontaine B, Khurana TS, Hoffman EP, Bruns GA, Haines JL, Trofatter JA, Hanson MP, Rich J, McFarlane H, Yasek DM, Romano D, Guesella JF, Brown RH: Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel α -subunit gene. *Science* 250 (1990) 1000–1002
- [30] Fricker R, Raffelsberger T, Rauch-Shorny S, Finsterer J, Müller-Reible C, Gilly H, Bittner R: Positive malignant hyperthermia susceptibility in vitro test in a patient with mitochondrial myopathy and myoadenylate deaminase deficiency. *Anesthesiology* 97 (2002) 1635–1637
- [31] Gellera C, Verderio E, Floridia G, Finocchiaro G, Montermini L, Cavadini P, Zuffardi O, Taroni F: Assignment of the human carnitine palmitoyltransferase II gene (CPT II) to chromosome 1p32. *Genomics* 24 (1994) 195–197
- [32] Gibbs JM: A case of rhabdomyolysis associated with suxamethonium. *Anaesth Intensive Care* 6 (1978) 141–142
- [33] Graham GE, Silver K, Arlet V, der Kaloustian VM: King Syndrome: further clinical variability and review of the literature. *Am J Med Genet* 78 (1998) 254–259
- [34] Haan EA, Freemantle CJ, McCure JA, Friend KL, Mulley JC: Assignment of the gene for central core disease to chromosome 19. *Hum Genet* 86 (1990) 187–190
- [35] Halsall J, Hopkins P: Malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 3 (2003) 5–9
- [36] Handig I, Dams E, Taroni F, van Laere S, de Barys T, Willems PJ: Inheritance of the S113L mutation within an inbred family with carnitine palmitoyltransferase enzyme deficiency. *Hum Genet* 97 (1996) 291–293

- [37] Heinman-Patterson TD, Rosenberg HR, Binning CP, Tahmash AJ: King-Denborough syndrome: contracture testing and literature review. *Pediatr Neurol* (1986) 175–177
- [38] Ijlst L, Mandel H, Oostheim W, Ruiten JP, Gutman A, Wanders RJ: Molecular basis of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency. *J Clin Invest* 102 (1998) 527–531
- [39] Jackson VN, Price NT, , Zammit VA: Specificity of the interactions between Glu-3, Ser-24 and Gln-30 within the N-terminal segment of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase (L-CPT I) in determining the malonyl-CoA sensitivity of the enzyme. *Biochemistry* 40 (2001) 14629–14634
- [40] Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F: Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 23 (2000) 4–17
- [41] Katsuya H, Misumi M, Ohtani Y, Miike T: Postanesthetic acute renal failure due to carnitine palmitoyl transferase deficiency. *Anesthesiology* 68 (1988) 945–948
- [42] Kaufmann P, El-Schahawi M, DiMauro S: Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: diagnosis by molecular analysis of blood. *Mol Cell Biochem* 174 (1997) 237239
- [43] King JO, Denborough MA: Anesthetic-induced malignant hyperpyrexia in children. *J Pediatr* 83 (1973) 37–40
- [44] Klingler W, Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K: Complications of anaesthesia in neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord* 15 (2005) 195–206
- [45] Lazarow PB, DeDuve C: A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 (1976) 2043–2046

- [46] Lilienthal JL, Zierler KL, Folk BP, Buka R, Riley MJ: A reference base and system for analysis of muscle constituents. *J Biol Chem* 182 (1950) 501–508
- [47] Loke J, MacLennan DH: Malignant hyperthermia and central core disease: disorders of Ca²⁺ release channels. *J Med* (1998) 470–486
- [48] Louis CF, Balog EM, Fruen BR: Malignant hyperthermia: an inherited disorder of skeletal muscle Ca²⁺ regulation. *Bioscience Reports* 21 (2001) 155–168
- [49] Mannaerts GP, Debeer LJ, Thomas J, De Schepper PJ: Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats. *J Biol Chem* 254 (1979) 4585–4595
- [50] Martin MA, Rubio JC, De Bustos F, Del Hoyo P, Campos Y, Garcia A, Bornstein B, Cabello A, Arenas J: Molecular analysis in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Muscle Nerve* 22 (1999) 941–943
- [51] Martin MA, Rubio JC, del Hoyo P, Garcia A, Bustos F, Campos Y, Cabello A, Culebras JM, Arenas J: Identification of novel mutations in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Mutat* 15 (2000) 579–580
- [52] McCarthy TV, Healy JMS., Heffron JJA: Localisation of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature* 343 (1990) 562–564
- [53] McCarthy TV, Quane KA, Lynch PJ: Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat* 15 (2000) 410–417
- [54] McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW: Carnitine palmitoyltransferase I the site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA *J Biol Chem* 253 (1978) 4128–4136

- [55] Millar S, Deballi P, Muir HA: Anesthetic management of a ventilator-dependent parturient with the King-Denborough syndrome. *Can J Anesth* 50 (2003) 589–592
- [56] Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, Lunardi J: Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the $\alpha 1$ -subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 60 (1997) 1316–1325
- [57] Moslehi R, Langlois S, Yam I, Friedman JM: Linkage of malignant hyperthermia and hyperkalemic periodic paralysis to the adult skeletal muscle sodium channel (SCN4A) gene in a large pedigree. *Am J Med Genet* 76 (1998) 2127
- [58] Murthy MSR, Pande SV: Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987) 378–382
- [59] Neuvonen PT, van den Berg AA: Postoperative coma in a child with carnitine palmitoyltransferase I deficiency. *Anesth Analg* 92 (2001) 646–647
- [60] Ohkoshi N, Yoshizawa T, Mizusawa H, Shoji S, Toyama M, Iida K, Sugishita Y, Hamano K, Takagi A, Goto K, Arahata K: Malignant hyperthermia in a patient with Becker muscular dystrophy: dystrophin analysis and caffeine contracture study. *Neuromuscul Disord* 5 (1994) 53–58
- [61] Olpin SE, Afifi A, Clark S, Manning NJ, Bonham JR, Dalton A, Leonard JV, Land JM, Andresen BS, Morris AA, Muntoni F, Turnbull D, Pourfarzam M, Rahman S, Pollitt RJ: Mutation and biochemical analysis in carnitine palmitoyltransferase type II (CPT II) deficiency. *J Inherit Metab Dis* 26 (2003) 543–557

- [62] Park Edwards A, Cook George A: Differential regulation in the heart of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I muscle and liver isoform. *Mol Cell Biochem* 180 (1998) 27–32
- [63] Robinson RL, Brooks C, Brown SL, Ellis FR, Halsall PJ, Quinnell RJ, Shaw MA, Hopkins PM: RYR1 mutations causing Central Core Disease are associated with more severe malignant hyperthermia in vitro contracture test phenotypes. *Hum Mutat* 20 (2002) 88–97
- [64] Saudubray JM, Martin D, DELonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Jouvét P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C, Bonnefont J P, Rabier D, Kamoun P, Brivet M: Recognition and management of fatty acid oxidation defects : a series of 107 patients. *J Inher Metab Dis* 22 (1999) 488–502
- [65] Shuaib A, Paasuke RT, Brownell KW: Central core disease. clinical features in 13 patients. *Medicine* 66 (1987) 389–396
- [66] Shukry M, Guruli Z, Ramadhyani U: Suspected malignant hyperthermia in a child with laminin $\alpha 2$ (merosin) deficiency in the absence of a triggering agent. *Pediatr Anaesth* 16 (2006) 462–465
- [67] Smith CL, Bush GH: Anaesthesia and progressive muscular dystrophy. *Br J Anaesth* 57 (1985) 1113–1118
- [68] Stanley CA, Sunaryo F, Hale DE, Bonnefont JP, Demaugre F, Saudubray JM: Elevated plasma carnitine in the hepatic form of carnitine palmitoyltransferase-1 deficiency. *J Inher Metab Dis* 15 (1992) 785–789
- [69] Starritt EC, Howlett RA, Heigenhauser GJF, Spriet LL: Sensitivity of CPT I to malonyl-coa in trained and untrained human skeletal muscle. *Am J Physiol* 278 (2000) E462–E468
- [70] Taggart R, Smail D, Apolito C, Vladutiu GD: Novel mutations associated with carnitine palmitoyl transferase II deficiency. *Hum Mutat* 13 (1999) 210–220

- [71] Taroni F, Gellera C, Cavadini P, Baratta S, Lamantea E, Dethlefs S, DiDonato S, Reik RA, Benke PJ: Lethal carnitine palmitoyltransferase (CPT) deficiency in newborns: a molecular genetic study. *Hum Genet* 55
- [72] Taroni F, Verderio E, Dworzak F, Willems PJ, Cavadini P, Di Donato S: Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients. *Nature Genet* 4 (1993) 314–319
- [73] Taroni F, Verderio E, Fiorucci S, Cavadini P, Finocchiaro G, Uziel G, Lamantea E, Gellera C, DiDonato S: Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 8429–8433
- [74] Thuillier L, H Rostane, Droin V, Demaugre F, Brivet M, Kadhom N, Prip-Buus C, Gobin S, Saudubray JM, Bonnefont JP: Correlation between genotype, metabolic data, and clinical presentation in carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) deficiency. *Hum Mutat* 21 (2003) 493–501
- [75] Tong J, Oyamada H, Demaurex N, Grinstein S, McCarthy TV, MacLennan DH: Caffeine and halothane sensitivity of intracellular Ca^{2+} release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J Biol Chem* 272 (1997) 26332–26339
- [76] Urwyler A, Deufel T, McCarthy T, West S: Guidelines for molecular genetic detection of malignant hyperthermia susceptibility. *Br J Anaesth* 86 (2001) 283–287
- [77] Veerkamp JH, van Moerkerk HTB: Peroxisomal fatty acid oxidation in rat and human tissues. effect of nutritional state, clofibrate treatment and postnatal development in the rat. *Biochim Biophys Acta* 875 (1986) 301–310

- [78] Verderio E, Cavadini P, Montermini L, Wang H, Lamantea E, Finocchiaro G, DiDonato S, Gellera C, Taroni F: Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: structure of the gene and characterisation of two novel disease-causing mutations. *Hum Mol Genet* 4 (1995) 19–29
- [79] Vladutiu GD, Hogan K, Saponara I, Tassini L, Conroy J: Carnitine palmitoyl transferase deficiency in malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 16 (1993) 485–491
- [80] Vladutiu GD, Quackenbush EJ, 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
- [81] Wang JM, Stanley TH: Duchenne muscular dystrophy and malignant hyperthermia—two case reports. *Can Anaesth Soc J* (1986) 492–497
- [82] Wieser T, Deschauer M, Olek K, Hermann T, Zierz S: Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: molecular and biochemical analysis of 32 patients. *Neurology* 60 (2003) 1351–1353
- [83] Woeltje KF, Esser V, Weis BC, Cox WF, Schroeder JG, Liao ST, Foster DW, McGarry JD: Inter-tissue and inter-species characteristics of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. *J Biol Chem* 265 (1990) 10714–10719
- [84] Woeltje KF, Essert V, Weis BC, Sen A, Cox WF, McPhaul MJ, Slaughter CA, Foster DW, McGarry JD: Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem* 265 (1990) 10720–10725
- [85] Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW, McGarry JD: Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. use of detergents and antibodies. *J Biol Chem* 262

- [86] Yamamoto, El-Hayek R, Ikemoto N: Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in Ca^{2+} channel regulation. *J Biol Chem* 275 (2000) 11618–11625
- [87] Yamamoto S, Abe H, Kongo T, Ogawa A, Ohtake A, Hayashibe H, Sakuraba H, Suzuki Y, Aramaki S, Tagavanagi 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) 116–118
- [88] Yang BZ, Ding JH, Roe D, Dewese T, Day DW, Roe DW: A novel mutation identified in carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* 63 (1998) 110–115
- [89] Yang BZ, Ding JH, Roe D, He G, Wilkinson J, Day DW, Demaugre F, Rabier D, Brivet M, Roe C: Identification of four novel mutations in patients with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* 64 (1998) 229–236
- [90] Zierz S, Engel A: Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle. *Eur J Biochem* 149 (1985) 207–214
- [91] Zierz S, Engel A: Different sites of inhibition of carnitine palmitoyltransferase by malonyl-CoA, and by acetyl-CoA and CoA, in human skeletal muscle. *Biochem J* 245 (1987) 205–209

9 Thesen

1. Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine lebensbedrohliche Komplikation der Allgemeinanästhesie bei genetisch prädisponierten Patienten. Die Diagnose wird durch den In-Vitro-Kontraktur-Test gesichert.
2. Die Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) ist ein Enzym des Fettstoffwechsels. CPT I und II bilden zusammen mit der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase ein Transportsystem für langkettige Fettsäuren in die Mitochondrien.
3. Der muskuläre CPT II-Mangel äußert sich durch rezidivierende Rhabdomyolysen. Das derzeit beste Verfahren in der Diagnostik eines CPT-Mangel ist die biochemische Untersuchung in Muskelbiopsien.
4. Malonyl-CoA, Triton, L-Palmitoylcarnitin und Palmitoyl-CoA sind Inhibitoren der CPT. Eine Regulationsstörung der CPT äußert sich als eine verstärkte Hemmbarkeit durch diese Substanzen.
5. Ein Zusammenhang zwischen MH und CPT-Mangel wird seit längerer Zeit postuliert.
6. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der CPT in Muskelbiopsien von Patienten mit MH im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht. Mittels Inhibitoren wurde die Regulierbarkeit der CPT bei MH-Patienten und Kontrollen untersucht.
7. Es konnte gezeigt werden, dass sich die CPT-Aktivitäten von Gesunden und von Patienten mit MH nicht signifikant unterscheiden. Die Daten zeigen außerdem, dass bei Patienten mit MH keine abnorme Regulierbarkeit der CPT vorliegt.
8. Auf Grund dieser Daten kann ein CPT-Mangel bei Patienten mit MH mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Annika Sarah Weyhersmüller
Geburtsdatum	22. Februar 1981
Geburtsort	Heidelberg
Eltern	Waldemar Weyhersmüller und Ulla Weyhersmüller, geb. Plag

Ausbildung

1987-1991	Grundschule Hirschberg
1991-2000	Werner-Heisenberg-Gymnasium Weinheim, Abitur
08/1996-12/1996	O’Gorman High School, Sioux Falls, South Dakota, USA
09/1997-11/1997	Lycée Ismael Dauphin, Cavaillon, Frankreich
2000-2007	Studium der Humanmedizin Martin-Luther Universität Halle
11.05.2007	Ärztliche Prüfung
25.5.2007	Approbation als Ärztin

Beruf

seit 2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Carl-Ludwig-Institut für Physiologie, Universität Leipzig (Prof. Dr. M. Heckmann)
-----------	--

6. Mai 2008

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass ich an keiner anderen Fakultät oder Universität einen Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens gestellt habe.

Halle, 6. Mai 2008

Hinweis auf Publikationen

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde von Herrn Dr. Wieser, der die Patientenbiopsien zur Verfügung stellte, im folgenden Beitrag publiziert:

Wieser T, Kraft B, Kress HG: No carnitine palmitoyltransferase deficiency in skeletal muscle in 18 malignant hyperthermia susceptible individuals. *Neuromuscul Disord* (2008), doi:10.1016/j.nmd.2008.03.007

Dies geschah ohne Wissen und Einverständnis von mir oder Herrn Prof. Zierz.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. S. Zierz danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und für die wertvollen Anregungen bei der Anfertigung der Dissertation.

Frau Dr. K. Traufeller möchte ich herzlich für die Hilfe bei der Durchführung der Arbeit danken.

Für die Unterstützung im Labor danke ich allen technischen Assistenten des Muskellabors der Neurologischen Klinik Halle, insbesondere Frau Scholz.

Herrn Prof. Dr. W. Hein und seinem Team danke ich für die Kooperationsbereitschaft und das Anvertrauen der Muskelproben.

Mit Herrn Dr. T. Wieser aus dem Allgemeinen Krankenhaus Wien bestand eine Kooperation. Für die zur Verfügung gestellten Muskelbiopsien möchte ich Herrn Dr. Wieser danken. Im Gegenzug wurden ihm die Ergebnisse vorab vertrauensvoll mitgeteilt.

Meiner Familie und meinem Partner Daniel Rings danke ich herzlich für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Ermutigungen.