

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

Der Einfluss von Cardiolipin auf die Aktivität des Wildtyps und der  
Mutante S113L der Carnitin-Palmitoyl-Transferase II

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Annemarie Thäle (geb. Heller)

geboren am 21.02.1991 in Dresden

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. Stephan Zierz
2. Prof. Dr. Faramarz Dehghani
3. Prof. Dr. Matthias Vorgerd (Bochum)

03.04.2018

26.03.2019

## Referat

Die Carnitin-Palmitoyl-Transferase II (CPT-II) ist mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert und am Transport langkettiger Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix beteiligt, wo diese der  $\beta$ -Oxidation zugeführt werden. Bei der muskulären Form des CPT-II-Mangels aufgrund der häufigen S113L Mutation im CPT-II-Gen kommt es zu einer abnormen Regulierbarkeit sowie zu einer extrem erhöhten Thermolabilität des Enzyms. Dies manifestiert sich klinisch durch Attacken mit Myalgien, Rhabdomyolysen und Muskelschwäche, wenn der Patient besonderen Belastungen wie Fieber, Fasten oder körperlichen Belastungen ausgesetzt ist. Cardiolipin (CLP) hat den größten Anteil an den Phospholipiden in der humanen inneren Mitochondrienmembran. Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von CLP die Aktivität des Wildtyps sowohl im Muskelhomogenat als auch in rekombinanter Ratten-CPT-II wesentlich gesteigert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgereinigtes CPT-II-Enzym (Wildtyp und Mutante S113L) untersucht. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte photometrisch. Sowohl die Enzymaktivität des Wildtyps als auch der Mutante S113L wurden nach Präinkubation jeweils ohne oder mit Zugabe von 0,25 mM oder 0,5 mM CLP bei 30 °C, 37 °C, 40 °C und 42 °C nach 15 min, 30 min, 45 min und 60 min Präinkubationszeit bestimmt.

Für die Wildtyp-CPT-II ließ sich bei den Temperaturen 30 °C und 37 °C durch Präinkubation mit CLP eine ausgeprägte Aktivitätssteigerung erzielen. Nach Präinkubation mit CLP bei 40 °C und 42 °C zeigte der Wildtyp einen starken Abfall der Enzymaktivität, wohingegen sie ohne Zugabe von CLP relativ stabil blieb. Auf die Variante S113L hatte die Präinkubation mit CLP bei 30 °C kaum einen Effekt, nach Präinkubation mit CLP bei 37 °C, 40 °C und 42 °C kam es zu einem massiven bis vollständigen Aktivitätsverlust. Die Effekte von CLP auf den Wildtyp und die Variante S113L waren bei Präinkubation mit 0,25 mM CLP jeweils geringer als bei 0,5 mM. Die fehlende Stimulation der Variante im Unterschied zum Wildtyp durch CLP deutet darauf hin, dass die bekannte abnorme Regulation der Variante auch die Interaktion mit der Phospholipidumgebung des Enzyms umfasst. Der CLP-induzierte Aktivitätsverlust bei Wildtyp und Variante unter höheren Temperaturen beruht möglicherweise auf einer temperatur-induzierten toxisch wirkenden Veränderung der Interaktion zwischen CLP und dem CPT-II-Enzym.

Thäle, Annemarie: Der Einfluss von Cardiolipin auf die Aktivität des Wildtyps und der Mutante S113L der Carnitin-Palmitoyl-Transferase II, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 56 Seiten, Erscheinungsjahr 2018

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Fettsäurestoffwechsel im Mitochondrium	1
1.2	Der mitochondriale Fettsäuretransport	2
1.2.1	CPT-I	4
1.2.2	Carnitin-Acylcarnitin-Transporter	5
1.2.3	CPT-II	5
1.2.4	Die Mitochondrienmembran und Cardiolipin	6
1.3	CPT II – Mangel	8
1.3.1	Phänotypen	8
1.3.2	Assoziierte Mutationen	9
1.3.3	Diagnostik	9
1.3.4	Therapie	10
1.3.5	Differenzialdiagnosen	10
2	Zielsetzung der Arbeit	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Materialien	12
3.1.1	Chemikalien, Substrate, Enzyme	12
3.1.2	Lösungen und Puffer	13
3.1.3	Geräte & Software	13
3.2	Methoden	14
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	14
3.2.2	Aktivitätstest	15
3.2.3	Cardiolipin	16
3.2.4	Vorversuch: Überprüfung der Ausfällung der CPT-II im Ansatz durch Cardiolipin	16
3.2.5	Statistische Methoden	18
4	Ergebnisse	19
4.1	Aktivitätsanalysen	19
4.1.1	Keine Präinkubation	19
4.1.2	Präinkubation bei 30 °C	19
4.1.3	Präinkubation bei 37 °C	20
4.1.4	Präinkubation bei 40 °C	22
4.1.5	Präinkubation bei 42 °C	23
4.1.6	Korrelation der Aktivität mit der Cardiolipinkonzentration	24
5	Diskussion	25
5.1	Der Effekt von Cardiolipin auf die Aktivität des Wildtyps der CPT-II	25

5.2	Der Effekt von Cardiolipin auf die Mutante S113L	27
5.3	Der toxische Effekt des Cardiolipins	28
5.4	Korrelation der Aktivität mit der Cardiolipinkonzentration	30
6	Zusammenfassung und Ausblick	31
7	Literaturverzeichnis	32
	Thesen	39
	Anlagen	40

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Fettsäuretransport über die Mitochondrienmembran	4
Abb. 2: Struktur des Cardiolipins	7
Abb. 3: Aktivitäten nach Präinkubation mit 0,5 mM CLP und Zentrifugation	17
Abb. 4: Aktivitätsanalysen nach Inkubation bei 30 °C	20
Abb. 5: Aktivitätsanalysen nach Inkubation bei 37 °C	21
Abb. 6: Aktivitätsanalysen nach Inkubation bei 40 °C	22
Abb. 7: Aktivitätsanalysen nach Inkubation bei 42 °C	23
Abb. 8: Korrelation von Aktivität und Cardiolipinkonzentration	24
Abb. 9: Mögliche Aktivitätenverteilung bei WESTHAUSEN	26
Abb. 10: Membranassoziation der CPT-II	28
Abb. 11: CPT-II-assoziierten Mutationen	28

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Zusammensetzung der Mitochondrienmembran im Schweineherz	6
Tab. 2: Zusammensetzung des Probenansatzes für den Aktivitätsnachweis	15

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
CACT	Carnitin-Acylcarnitin-Transporter
CLP	Cardiolipin
CoA	Coenzym-A
CPT-I	Carnitin-Palmitoyl-Transferase I
CPT-II	Carnitin-Palmitoyl-Transferase II
DTNB	Ellmans-Reagenz, 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD <sup>+</sup> /FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAT	Fettsäuretranslokase
FATP	Fettsäuretransportprotein
g	g-Kraft, Vielfaches der Erdbeschleunigung (1 g = 9,81 m/s <sup>2</sup> )
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
L-LDH	L-Lactat-Dehydrogenase
MIM	Innere Mitochondrienmembran
mM	Millimolar
MOM	Äußere Mitochondrienmembran
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TBST	TRIS buffered Tween
(V)LCFA	(Very) long chain fatty acid

# 1 Einleitung

Triacylglyceride zählen zu den wesentlichen Nahrungsbestandteilen. In der westlichen Welt werden mehr als 40 % der mit der Nahrung zugeführten Energie durch Lipide gedeckt. Zu den Lipiden gehören allerdings nicht nur die zur Energiegewinnung genutzten Triacylglyceride, sondern auch Phospholipide, Sphingolipide sowie Cholesterin und seine Ester.

Die Triacylglyceride stellen mengenmäßig den bedeutendsten Energiespeicher des menschlichen Körpers dar. Seine Zellen können geringe Mengen an Triacylglyceriden speichern, damit diese zur schnellen Energiegewinnung genutzt werden können. Den weitaus größeren Teil an Triacylglyceriden enthält jedoch das Fettgewebe, welches etwa 10-15 % des Körpergewichtes einer normalgewichtigen Person ausmacht (Löffler 2014).

## 1.1 Der Fettsäurestoffwechsel im Mitochondrium

Fettsäuren, vor allem langkettige Fettsäuren, stellen unter lang andauernder Belastung bzw. langfristig erhöhtem Energieumsatz sowie in Fastenzeiten die Energiehauptlieferanten im Muskel dar. Der gesteigerte Energiebedarf wird hierbei durch den Abbau von Fettsäuren in Mitochondrien gedeckt (Fehlig und Wahren 1975).

Diese sogenannte  $\beta$ -Oxidation dient dem Herz- und Skelettmuskel zur Energiegewinnung, indem sie die nötigen Reaktanten für den Citratzyklus und die Atmungskette liefert. Sie findet aber auch in den Hepatozyten statt. Dort dient sie allerdings vornehmlich der Gewinnung von Ketonkörpern, welche vor allem dem Gehirn in Zeiten niedriger Blutglukose lebenswichtige Energie bereitstellen (Eaton et al. 1996).

In der  $\beta$ -Oxidation wird Acyl-CoA unter Gewinn von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) und reduziertem Flavin-Adenin-Dinukleotid ( $\text{FADH}_2$ ) in vier Reaktionen zu Acetyl-CoA und einem um zwei Kohlenstoffatome verkürztem Acyl-CoA umgesetzt.  $\text{FADH}_2$  und  $\text{NADH} + \text{H}^+$  können der Atmungskette zugeführt werden, wodurch sich 1,4 bzw. 2,3 Adenosintriphosphat-Moleküle (ATP) gewinnen lassen. Über den Citratzyklus lassen sich wiederum aus Acetyl-CoA zehn ATP gewinnen. Das hervorgehende Acyl-CoA kann erneut in die  $\beta$ -Oxidation eingeführt werden (Zierz und Deschauer, Lipidspeichermyopathien 2014, Löffler 2014). Beispielhaft kann man den Abbau der langkettigen aktivierten Fettsäure Stearyl-CoA betrachten: Bei ihrem vollständigen Abbau durchläuft sie den Zyklus der  $\beta$ -Oxidation acht Mal. Dabei entstehen also acht  $\text{FADH}_2$  und acht  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , welche wiederum zur Herstellung von insgesamt 34,4 ATP genutzt werden können und neun Acetyl-CoA-Moleküle, aus welchen sich insgesamt 87,3 ATP gewinnen lassen. Wenn man diese Ausbeute an ATP aus

1 mol Stearyl-CoA nun mit derjenigen vergleicht, die durch den Abbau von drei Glucose-Molekülen (ebenfalls 18 C-Atome) erreicht werden kann (102,6 ATP), erkennt man, wie wichtig und effektiv die Verwertung von Fettsäuren für den Körper ist (Löffler 2014).

## 1.2 Der mitochondriale Fettsäuretransport

Fette liegen im Körper entweder als Triacylglycerine gespeichert intrazellulär oder in Transportform in Chylomikronen und Very Low Density Lipoproteins (VLDL) im Extrazellulärraum vor. Da Zellen keine Triacylglycerine sondern nur Fettsäuren aufnehmen können, müssen diese zunächst aus den Triacylglycerinen gewonnen werden. Bei intrazellulär vorliegenden Triacylglycerinen werden deshalb deren drei Esterbindungen durch drei verschiedene Enzyme (Adipozyten-Triacylglycerin-Lipase, hormonsensitive Lipase, Monoacylglycerinlipase) gespalten. Bei extrazellulär vorliegenden Triacylglyceriden erfolgt diese Spaltung durch die Lipoproteinlipase, eine Lipase breiter Spezifität. Bei beiden Vorgängen entstehen drei Fettsäuren, die nun gebunden an Albumin im Blut transportiert werden können, und ein Glycerin-Molekül, welches in der Leber verwertet werden kann (Löffler 2014).

Damit Fettsäuren der  $\beta$ -Oxidation zugeführt werden können, müssen sie zunächst in die Zellen und Mitochondrien gelangen. Der Übertritt über die Zellmembran erfolgt sowohl passiv durch Diffusion, was vor allem bei hohen extrazellulären Fettsäurekonzentrationen wichtig ist, als auch carriervermittelt über das Fettsäuretransportprotein (FATP) sowie die Fettsäure-Translokase (FAT) (Hamilton und Kamp 1999, Koonena et al. 2005, Löffler 2014).

Das FATP ist außerdem mit Acyl-CoA-Synthetaseaktivität assoziiert, so dass davon ausgegangen wird, dass dieses Protein nicht nur am Transport der Fettsäuren über die Zellmembran, sondern auch an deren Aktivierung zu Acyl-CoA beteiligt ist (Jia et al. 2007, Löffler 2014). Die FAT, auch als CD36 bezeichnet, weil sie ursprünglich als Oberflächenprotein auf Thrombozyten entdeckt worden ist, ist indes ein integrales Membranprotein, das sich vor allem auf Herz- und Skelettmuskelzellen, im Fettgewebe und im Gastrointestinaltrakt finden lässt (Löffler 2014, Kim und Dyck 2016).

Bevor Fettsäuren die äußere Mitochondrienmembran überqueren können, müssen sie zunächst zu Acyl-CoA aktiviert werden. Dies geschieht mittels Acyl-CoA-Synthetasen in einer ATP-abhängigen Reaktion. Es ist bekannt, dass mehrere Isoformen dieser Acyl-CoA-Synthetase existieren, welche sich in ihrer Substratspezifität hinsichtlich der Kettenlänge der zu aktivierenden Fettsäure unterscheiden. Die langkettenspezifische Acyl-CoA-Synthetase, die

Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 10-18 C-Atomen aktiviert, befindet sich in der äußeren Mitochondrienmembran (Norum et al. 1966).

Die entstandenen Thioester können nun entweder über die Mitochondrienmembran weiter ins Innere der Mitochondrien transportiert werden oder im Sarkoplasma zu Triglyceriden verestert und dadurch gespeichert werden (Zierz und Deschauer, Lipidspeichermyopathien 2014).

Acyl-CoA-Moleküle mit einer Kettenlänge von über 12 C-Atomen können die innere Mitochondrienmembran nicht passieren. Da aber der Großteil der Fettsäuren, die in die  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien eingeführt werden, zu den LCFA gehört (Löffler 2014), muss ein Transportsystem existieren, welches den Transport der Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran ermöglicht. Dieses Transportsystem wird als Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT) bezeichnet und soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

Bereits 1955 konnte gezeigt werden, dass Acetylcarnitin in einer Reaktion mit Coenzym A zu Acetyl-CoA und Carnitin umgesetzt wird (Friedman und Fraenkel 1955). 1962 wurde postuliert, dass für LCFA ein Shuttle-System über die Mitochondrienmembran existiert und dass die beschriebene reversible Reaktion von Acylcarnitin und Coenzym A in diesem eine entscheidende Rolle spielt (Bremer 1962, Fritz et al. 1962, Fritz et al. 1963).

Heute weiß man, dass dieses Fettsäure-Shuttle aus drei Komponenten besteht:

In der äußeren Mitochondrienmembran findet sich die CPT-I, welche in einer Reaktion Acyl-CoA mit L-Carnitin zu Acylcarnitin und CoA-SH katalysiert. In bzw. an der inneren Mitochondrienmembran finden sich die beiden anderen Komponenten: Die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase, die einen Austausch von L-Carnitin mit Acylcarnitin über die innere Mitochondrienmembran vermittelt und die CPT-II, die Acylcarnitin mit CoA-SH zurück zu Acyl-CoA und Carnitin umwandelt (McGarry und Brown 1997, Kerner und Hoppel 2000)



Erst im Jahr 2002 beschrieben PRICE et al. eine weitere Isoform, die sich vorwiegend in Gehirn und Hoden finden lässt. Das Gen dieser B-CPT-I befindet sich auf Chromosom 19q13.33 und ist ca. 2,7 kb lang. Die Primärsequenz dieses Proteins besteht aus 798 Aminosäuren. Sein Molekulargewicht entspricht in etwa dem der L-CPT-I (Price et al. 2002, Bonnefont et al. 2004).

## 1.2.2 Carnitin-Acylcarnitin-Transporter

Der CACT ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert über diese sowohl einen L-Carnitin/Acylcarnitin- und L-Carnitin/L-Carnitin-Antiport als auch, bei Fehlen des Gegengsubstrates, einen etwa 10fach langsameren unidirektionalen Transport von L-Carnitin (Tonazzia et al. 2009). Dies geschieht im Rahmen eines Ping-Pong-Mechanismus. Das bedeutet, dass das erste Substrat, das von Membranseite a nach Membranseite b transportiert wird, sich zunächst vom Enzym lösen muss, bevor das zweite Substrat, welches genau in die entgegengesetzte Richtung über die Membran transportiert wird, am Enzym binden kann. Es existiert also nur eine Bindungsstelle, die sich abwechselnd auf der einen oder der anderen Seite der Membran befindet (Indiveri et al. 1994).

Das Gen für den humanen CACT befindet sich auf Chromosom 3p21.31 und kodiert für ein 32,9 kDa großes, 301 Aminosäuren langes Protein (Rubio-Gozalbo et al. 2004)

## 1.2.3 CPT-II

Die humane Carnitin-Palmitoyl-Transferase II ist ein 658 Aminosäuren langes, etwa 71 kDa großes Protein (Woeltje et al. 1990, Brown et al. 1991), mit einer ca. 3 kb großen mRNA (Finocchiaro et al. 1991). Ihr Gen befindet sich auf Chromosom 1p32 (Gellera et al. 1994). Mit großer Sicherheit ist die CPT-II das Produkt eines einzelnen Genes, unabhängig vom Gewebe in dem sie exprimiert wird (Sigauke et al. 2003). Dieses Gen ist ca. 20 kb groß und besteht aus fünf Exons, die durch vier Introns getrennt werden. Die Exons variieren in ihrer Länge zwischen 81 bp und 1305 bp, die Introns zwischen 1,5 kb und 8 kb (Verderio et al. 1995). In Exon 3 findet sich unter anderem die Information für Serin 113 (Wieser et al. 2003).

Die CPT-II ist mit der inneren Mitochondrienmembran (MIM) assoziiert und kann mit entsprechenden Detergenzien leicht in ihrer aktiven Form von dieser gelöst werden (Woeltje et al. 1987). Ihr katalytisches Zentrum befindet sich in der Mitochondrienmatrix (J. D. McGarry et al. 1992).

Die Kristallstruktur der CPT-II der Ratte wurde 2006 beleuchtet (Rufer et al. 2006). Unter anderem wurde die Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms näher betrachtet: Es handelt sich um einen Y-förmigen Tunnel (Nic a'Bhaird et al. 1993), der an der Domänenverbindung lokalisiert ist. Dieser dreiteilige Tunnel trägt jeweils eine Bindungsstelle für einen Acyl-, Carnitin- und CoA-Rest und öffnet sich zur Oberfläche der CPT-II. Das Serin an Position 113 gilt als eine an der Substratbindung der CPT-II beteiligte Aminosäure (Rufer et al. 2006). Jedoch scheint es nicht direkt an einer Verankerung der CPT-II in der MIM beteiligt zu sein (Wieser et al. 2003).

#### 1.2.4 Die Mitochondrienmembran und Cardiolipin

Die mitochondriale Membran unterscheidet sich in ihrem Aufbau grundlegend von der eukaryotischen Zellmembran. Es existieren eine äußere (MOM) und eine innere mitochondriale Membran (MIM), die sich prozentual in der Zusammensetzung ihrer Phospholipide unterscheiden (siehe Tab. 1.). Dabei ähnelt die äußere Membran in ihrem Lipid-Protein-Verhältnis der eukaryotischen Zellmembran.

Tab. 1: Zusammensetzung der Mitochondrienmembran im Schweineherz (Comte et al. 1976).

Äußere Membran:	Anteil in %:	Innere Membran:	Anteil in %:
Phosphatidylcholin	56,3 ± 2,1	Phosphatidylethanolamin	37,9 ± 0,4
Phosphatidylethanolamin	28,0 ± 2,1	Phosphatidylcholin	26,5 ± 2,3
Phosphatidylinositol	9,3 ± 3,1	<b>Cardiolipin</b>	<b>25,4 ± 1,6</b>
Sphingomyelin	4,5 ± 2,1	Phosphatidylinositol	3,4 ± 0,1
Lysophosphatidylcholin	1,3 ± 0,7	Lysophosphatidylcholin	0,6 ± 0,2
<b>Cardiolipin</b>	<b>0,4 ± 0,2</b>	Sphingomyelin	0,5 ± 0,2

MOM und MIM besitzen unterschiedliche Funktionen. Die MOM ist vor allem durch eine Vielzahl an Porinen gekennzeichnet, welche eine Art Sieb darstellen, das für alle Moleküle mit einer Größe von 5 kDa oder kleiner permeabel ist. Die MIM hingegen ist impermeabel und hochspezialisiert. Sie enthält große Anteile an Cardiolipin, welches aufgrund seiner vier Fettsäureketten für Ionen schwierig zu überwinden ist. Diese Membran trägt allerdings Transportproteine, die es ermöglichen, Moleküle, die für den mitochondrialen Stoffwechsel

notwendig sind, in die Mitochondrienmatrix zu transportieren. Außerdem sind die Enzyme der Atmungskette mit der MIM assoziiert (Alberts et al. 2002).

Cardiolipin, genauer 1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol, ist ein anionisches Phospholipid, das ausschließlich in bakteriellen Membranen sowie in der inneren Mitochondrienmembran zu finden ist. Es besteht aus vier Acyl-Ketten, drei Glycerolgruppen und zwei Phosphaten. Cardiolipin spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation apoptotischer Zellvorgänge (Horvath und Daum 2013).

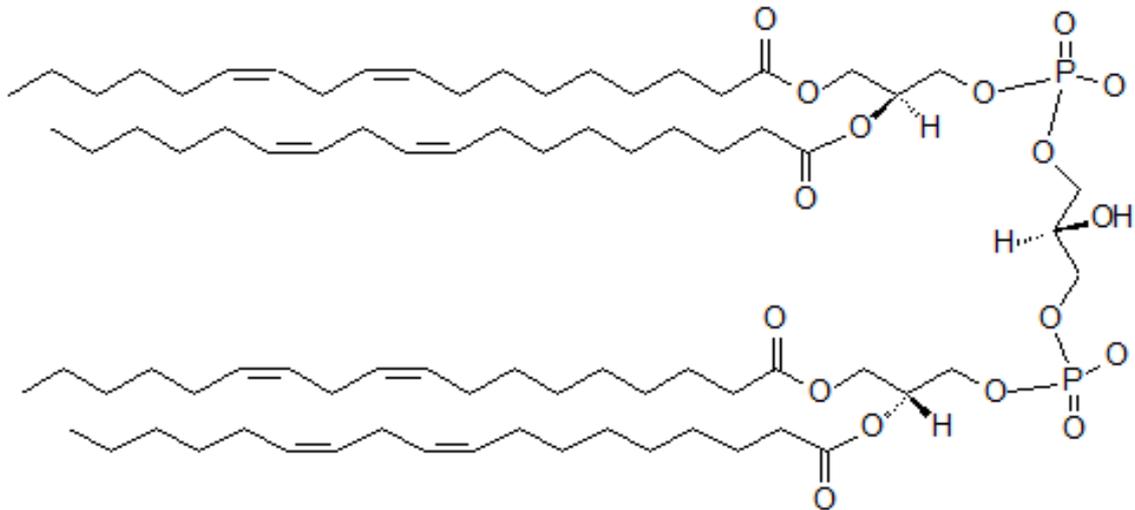


Abb. 2: Struktur des Cardiolipins (Christie 2018)

Mehrfach konnte inzwischen gezeigt werden, dass die mitochondriale Membran einen wichtigen Beitrag zur Stabilität und Funktionsfähigkeit der CPT leistet (Westhausen 1993, Kashfi et al. 2011). So ließ sich beispielsweise die CPT-Gesamtaktivität durch Inkubation mit 0,5 mM Cardiolipin- bzw. Phosphatidylcholinliposomen um 65,9 % bzw. 63,5 % steigern (Westhausen 1993). Die Aktivität der Ratten-CPT-I und -II konnte mittels Cardiolipin sogar um etwa das Vierfache der Ausgangsaktivität gesteigert werden und es konnte gezeigt werden, dass Cardiolipin von den mitochondrialen Phospholipiden die größte Auswirkung auf die CPT-Aktivität besitzt (Kashfi et al. 2011). Weiterhin wurde in dieser Arbeit postuliert, dass alle vier Enzyme, die am Transport von langkettigen Fettsäuren in das Innere des Mitochondriums beteiligt sind, durch Cardiolipin als ein Enzymkomplex zusammengehalten werden. Die eigentliche Aufgabe des Cardiolipins wäre dabei, die Enzyme in ihrer aktiven Form zwischen der MIM und MOM zu stabilisieren. Aufgrund seiner besonderen Konfiguration mit vier Fettsäureketten, wäre Cardiolipin besonders geeignet, um eine Membraninteraktion zu vermitteln und hätte deshalb möglicherweise den größten aktivitätssteigernden Effekt aller verwendeten Phospholipide. Begründet wurde diese Vermutung über die Rolle des Cardiolipins unter anderem darin, dass zunächst noch lösliche rekombinante CPT-II durch die Zugabe von

Cardiolipin mit diesem präzipitiert. Dies könnte zeigen, dass Cardiolipin ein artifizielles Membransystem bildet, in welchem die CPT-II gebunden wird (Kashfi et al. 2011).

### 1.3 CPT-II-Mangel

Der CPT-II-Mangel zählt zu den Lipidstoffwechselmyopathien. Die Erstbeschreibung der Erkrankung erfolgte 1973 durch DiMauro (DiMauro und DiMauro 1973). Heutzutage wird die Erkrankung als häufigste autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des Lipidstoffwechsels angesehen (McGarry und Brown 1997).

Es wird davon ausgegangen, dass der CPT-II-Mangel auf einer abnormen Regulierbarkeit des CPT-II-Enzyms und nicht auf einem Mangel enzymatisch aktiven Enzyms beruht. So zeigte sich einerseits, dass bei Patienten mit CPT-II-Mangel durchaus eine normale Konzentration an CPT-II im Skelettmuskel nachgewiesen werden kann (Vladutiu et al. 1992) und andererseits, dass die Aktivität der CPT-II-Mutante abnorm durch Malonyl-CoA, Carnitin, Palmitoylcarnitin und Triton X-100 gehemmt wird (Zierz und Engel 1985, Zierz et al. 1993).

Dieser ausgeprägte Aktivitätsverlust des Enzyms tritt beim Patienten vor allem dann auf, wenn die Aktivität der CPT-II am stärksten benötigt wird, also wenn Energie durch die Verwertung von Fettsäuren bereitgestellt werden muss.

#### 1.3.1 Phänotypen

Man unterscheidet zwischen einer neonatalen, infantilen bzw. juvenilen (hepatokardiomuskulären) und einer muskulären Form des CPT-II-Mangels (Bonnefont et al. 2004).

Der neonatale Phänotyp präsentiert sich als die schwerwiegendste Form der Erkrankung. Er geht neben den Symptomen der infantilen Form, nämlich hypoketotischen Hypoglykämien, Leberinsuffizienz und kardialer Beteiligung, mit Dysmorphien wie Mikrozephalie, Fehlbildungen der Nieren und des Gehirns sowie periventrikulären Verkalkungen einher (Bonnefont et al. 2004, Isackson et al. 2008). Dieser Phänotyp führt in der Regel bereits intrauterin oder innerhalb der ersten Lebensmonate zum Tod.

Der klassische muskuläre Phänotyp ist die häufigste Form des CPT-II-Mangels und manifestiert sich oftmals bereits im Kindesalter (Joshi et al. 2014). Die Symptomatik präsentiert sich in Form von rezidivierenden Episoden von Myalgien, Muskelschwäche, Myoglobininurie und Rhabdomyolyse mit oder ohne Nierenversagen, welche durch langanhaltende körperliche

Belastungen, Fasten, Kälte und Fieber provoziert werden können (DiMauro und DiMauro 1973, Joshi et al. 2014).

### 1.3.2 Assoziierte Mutationen

Die Vererbung der Erkrankung erfolgt autosomal-rezessiv. 90 % der Patienten mit dem klassischen muskulären Phänotyp sind entweder homo- oder heterozygot für die Punktmutation p.S113L im Gen für die CPT-II auf Chromosom 1 bei einer Allelfrequenz von 60-70 % (Deschauer et al. 2005, Isackson et al. 2006). Daneben sind bisher über 60 weitere krankheitsauslösende Mutationen im CPT-II-Gen bekannt (Isackson et al. 2006). Die Korrelation von Geno- und Phänotyp ist sehr heterogen (Taroni et al. 1992). Jedoch konnten einige Mutationen bestimmten Phänotypen zugeordnet werden. So ist beispielsweise die Mutation p.S113L bei homozygotem oder compound-heterozygotem Vorliegen mit dem muskulären Phänotyp des CPT-II-Mangels assoziiert, wohingegen andere Mutationen (z.B. P227L) nachweislich mit der infantilen oder neonatalen Form einhergehen (Taroni et al. 1993, Joshi et al. 2012).

### 1.3.3 Diagnostik

Das diagnostische Vorgehen berücksichtigt laborchemische, bioptische, molekulargenetische und biochemische Aspekte.

Laborchemisch lässt sich bei einem Teil der Patienten nach einem Fastenversuch eine verminderte oder verzögerte Ketonämie, eine Myoglobinurie sowie ein Anstieg der Creatinkinase (CK) im Serum feststellen. Laktat-Ischämie-Test sowie die Serum-CK im Intervall fallen normal aus. Typischerweise findet man bei Bestimmung des Acylcarnitinprofils eine Vermehrung des C16- und C18:1-Carnitins im Intervall (Gempel et al. 2002).

Die Muskelbiopsie erbringt häufig morphologisch unauffällige Befunde. Lediglich bei 10 % der Patienten findet sich im Intervall eine geringgradige Akkumulation von Lipiden. Muskelbiopsien, die kurz nach einer Rhabdomyolyseattacke entnommen werden, zeigen meist nur unspezifische myopathische Veränderungen und isolierte nekrotische Fasern (Zierz und Deschauer, Lipidspeichermyopathien 2014).

Zur Molekulargenetik siehe 1.3.2.

Die biochemische Diagnostik beinhaltet die Bestimmung der Gesamtaktivität der CPT. Da diese häufig unter optimalen Testbedingungen normale Werte erreicht, muss zusätzlich die

Hemmbarkeit des Enzyms durch Malonyl-CoA, Palmityl-CoA sowie Triton X 100 untersucht werden (Zierz und Deschauer, Lipidspeichermyopathien 2014).

### 1.3.4 Therapie

Zum heutigen Zeitpunkt existiert keine kausale Therapie des CPT-II-Mangels.

Da jedoch die Auslöser, durch welche die Krankheit symptomatisch wird, bekannt sind, muss der Patient dazu angehalten werden, diese zu vermeiden. Weiterhin empfiehlt es sich, die Ernährung dahingehend umzustellen, dass die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren reduziert und vor allem in Belastungssituationen vermehrt mittelkettige Fettsäuren und Kohlenhydrate aufgenommen werden.

Bei Auftreten von Rhabdomyolyse muss der Patient stationär überwacht werden, um etwaige Komplikationen wie ein akutes Nierenversagen zu vermeiden bzw. diese adäquat therapieren zu können (Zierz und Deschauer, Lipidspeichermyopathien 2014).

### 1.3.5 Differenzialdiagnosen

Die wichtigste Differenzialdiagnose des CPT-II-Mangels ist der Sehrangketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel, da dieser ebenfalls mit Rhabdomyolyseattacken nach lang anhaltender körperlicher Belastung und Fasten einhergeht.

Beim ebenfalls in Erwägung zu ziehenden Carnitin-Mangel, kommt es zu persistierender Muskelschwäche. Diese ist beim CPT-II-Mangel in der Regel voll reversibel.

Andere Erkrankungen des Lipidstoffwechsels oder des Kohlenhydratstoffwechsels lassen sich meist bereits anhand der anamnestischen Angaben differenzieren. Im Gegensatz zu Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels sind kurze intensive Kraftleistungen beim CPT-II-Mangel problemlos möglich (Zierz und Deschauer, Lipidspeichermyopathien 2014).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Während es Untersuchungen zum Effekt von Cardiolipin auf die Gesamt-CPT im menschlichen Muskelhomogenat sowie in aufgereinigter Ratten-CPT-I und -CPT-II gibt, existieren bisher keinerlei Daten darüber, welchen Effekt Cardiolipin auf die S113L-Mutante besitzt.

In unserer Arbeitsgruppe konnte 2014 gezeigt werden, dass sich die rekombinant hergestellte S113L-Mutante durch eine verminderte Thermostabilität sowie eine verstärkte Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA bzw. Malonat, verglichen mit dem rekombinant hergestellten Wildtypenzym, auszeichnet (Motlagh 2014).

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollten in dieser Arbeit folgende Hypothesen überprüft werden:

- (1) Der aktivitätssteigernde Effekt des Cardiolipins auf das rekombinant hergestellte Wildtypenzym der CPT-II lässt sich mit der von MOTLAGH et al. modifizierten photometrischen Aktivitätsmessung reproduzieren.
- (2) Cardiolipin zeigt einen vergleichbaren aktivitätssteigernden Effekt für die S113L-Mutante.
- (3) Cardiolipin kann die vermehrte Thermolabilität der S113L-Mutante vermindern oder aufheben.
- (4) Der aktivitätssteigernde Effekt auf den Wildtyp der CPT-II durch Cardiolipin bleibt auch bei erhöhter Temperatur erhalten und trägt zur Thermostabilität bei.
- (5) Die von KASHFI et al. beschriebene Präzipitation der CPT-II durch Zugabe von Cardiolipin lässt sich reproduzieren.
- (6) Es besteht eine Korrelation zwischen der Enzymaktivität und der eingesetzten Cardiolipinkonzentration.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien, Substrate, Enzyme

###### Chemikalien

Aqua dest.  
Cardiolipinnatriumchlorid 25mg  
DTNB  
Ethanol  
HCl  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
KCl  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
NaOH  
TRIS (Trizma base Sigma Ultra)

###### Hersteller

B. Braun Melsungen AG  
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Carl Roth GmbH Karlsruhe  
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Carl-Roth GmbH Karlsruhe  
Carl-Roth GmbH Karlsruhe  
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

###### Substrate

L-Carnitinhydrochlorid  
Palmitoyl-Coenzym A

###### Hersteller

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

###### Enzyme

Das rekombinant in *Escherichia coli* hergestellte und aufgereinigte CPT-II-Wildtyp-Enzym (His<sub>6</sub>-N-hCPT2) sowie die S113L-Mutante (His<sub>6</sub>-N-hCPT2/S113L) wurden freundlicherweise vom Muskellabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Enzyme erfolgte durch Frau Dr. Leila Scholle (vormals Motlagh). Es wurden hierzu die molekularbiologischen (Transformation in chemokompetente *E. coli*-Zellen) und proteinchemischen (Herstellung Vor- und Hauptkultur, Fermentation, Aufschluss, Aufreinigung, Aufkonzentrierung) Methoden nach dem von MOTLAGH modifizierten Protokoll von KNAPE (Knappe 2012) verwendet (Motlagh 2014). Die entstandenen Proteinlösungen wurden aliquotiert, schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.1.2 Lösungen und Puffer

#### 3.1.2.1 Puffer

KP-Puffer (pH 7,4)	1 mM EDTA
	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)
	120 mM KCl

#### 3.1.2.2 Stammlösungen:

Cardiolipinnatriumchlorid 5 mM in TRIS/HCl (pH 7,4)

Carnitin 1 M in Aqua dest.

DTNB 10 mM in EtOH (96 %)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 36,8 mM in Aqua dest.

NaOH 10 % in Aqua dest.

Palmitoyl-CoA 10 mM und 1 mM in Aqua dest.

TRIS/HCl (pH 7,4) 1 M in Aqua dest.

### 3.1.3 Geräte & Software

#### Geräte

Mastercycler gradient

Mastercycler personal

pH-Meter, Microprocessor PMX 3000

Spectrophotometer DU800

Ultraschallbad Elmasonic S

Zentrifuge 5415R

#### Hersteller

Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorf AG, Hamburg

WTW GmbH, Weilheim

Beckman Instruments Inc., USA

Elma Schmidbauer GmbH, Singen

Eppendorf AG, Hamburg

#### Software

KaleidaGraph V4.0

Microsoft office 2010

SigmaPlot 12.5

QuickCals

#### Hersteller

Synergy Software, USA

Microsoft Corporation, USA

Systat. Software Inc.

GraphPad Software

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Als Grundlage der photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration diene das Lambert-Beersche-Gesetz (Bouguer 1729, Lambert 1760, Beer 1852), welches es ermöglicht, die Proteinkonzentration in einer Probe anhand ihrer Extinktion zu berechnen:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \times c \times d$$

Formel 1: Berechnung der Extinktion.  $E_{\lambda}$ : Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$ .  $\varepsilon_{\lambda}$ : molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$ .  $c$ : Konzentration.  $d$ : Schichtdicke

Der molare Extinktionskoeffizient wurde von KNAPE (Knappe 2012) experimentell bestimmt. Die Absorption des Lichtes durch aromatische Aminosäuren, Peptidbindungen und Disulfide im ultravioletten Bereich führt zu charakteristischen Proteinspektren (Galla und Müller 1988). Da die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm haben, kann anhand nachfolgender Gleichung (Pace et al. 1995) der Extinktionskoeffizient bei dieser Wellenlänge abgeschätzt werden. Hierbei dominiert Tryptophan die Extinktionsstärke, der Anteil von Phenylalanin ( $\varepsilon_{280} = 0,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) kann hingegen bei dieser Wellenlänge vernachlässigt werden.

$$\begin{aligned} \varepsilon_{280} [\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}] &= \left( 5500 \times \sum \text{Trp} \right) + \left( 1490 \times \sum \text{Tyr} \right) \\ &+ \left( 125 \times \sum \text{Disulfid} \right) \end{aligned}$$

Formel 2: Berechnung des Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  bei einer Wellenlänge von 280 nm

Da der berechnete Extinktionskoeffizient nur gering vom experimentell ermittelten abweicht, wurde zur Berechnung der Extinktionskoeffizient von KNAPE verwendet (Motlagh 2014).

Die Extinktion wurde mit einem Beckmann UV-Vis-Spektrophotometer DU800 bei Wellenlängen im Bereich von 240-340 nm gemessen. Die Probe wurde dazu in KP-Puffer

(3.1.2.1) aufgenommen und die Extinktion durch die Proteinprobe in einer Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL® 10 mm gegen KP-Puffer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde in drei unabhängigen Messungen ermittelt.

### 3.2.2 Aktivitätstest

Die Aktivität ließ sich mit folgender Formel unter Zuhilfenahme der berechneten Proteinmenge und der photometrisch gemessenen Änderung der Extinktion bestimmen:

$$A = \frac{\Delta E}{dt \times d \times \varepsilon \times M}$$

Formel 3: Berechnung der Aktivität.  $\Delta E$ : Extinktionsänderung. dt: Zeit [s]. d: Schichtdicke [cm].  $\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient für DTNB. M: Masse [mg] des eingesetzten Enzyms

Es wurde das Protokoll von MOTLAGH (Motlagh 2014) verwendet.

Tab. 2: Zusammensetzung des Probenansatzes für den Aktivitätsnachweis

Komponenten	Testvolumen	Testkonzentration
10 mM DTNB in Ethanol ( $\geq 98\%$ )	100 $\mu$ l	1 mM
1 M Carnitin	12 $\mu$ l	12 mM
1 mM Palmitoyl-CoA in KP-Puffer	30 $\mu$ l	30 mM
11,7-34,1 $\mu$ M His <sub>6</sub> -N-hCPT2 bzw. 20 $\mu$ M His <sub>6</sub> -N-hCPT2/S113L	4,4- 12,88 $\mu$ l 7,5 $\mu$ l	15 nM
KP-Puffer (pH 7,4)	ad 1 ml	

KP-Puffer, Carnitin, Palmitoyl-CoA und DTNB wurden zusammengegeben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4,4- 12,88  $\mu$ l des rekombinanten Enzyms gestartet. Gemessen wurde in PMMA 1,5 ml Plastikküvetten. Jede Messung wurde drei- bis fünfmal wiederholt.

Bei dem verwendeten Test wurde die Zunahme der Extinktion in der Probe während einer Messzeit von 120 s photometrisch bei einer Wellenlänge von 410 nm mit einem UV-Vis-Spectrophotometer DU800 nachgewiesen. Die steigende Extinktion beruht auf der Entstehung des gelben Farbstoffs 4-Nitrothiolat. Dieser entsteht bei der Reaktion von

DTNB mit freien Thiolgruppen aus der von der CPT-II katalysierten Reaktion (1) zu einem gemischten Disulfid und 4-Nitrothiolat (Bieber et al. 1972). Als Donator bzw. Akzeptor fungieren hier Carnitin und Palmitoyl-CoA.



Der Extinktionskoeffizient von DTNB beträgt  $13600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Ellman 1959).

### 3.2.3 Cardioliipin

Ein positiver Effekt auf die Aktivität des CPT-Systems wurde bereits beschrieben. (Westhausen 1993, Kashfi et al. 2011). Um diesen Effekt einerseits für den aufgereinigten Wildtyp der CPT-II sowie für die aufgereinigte Variante S113L zu überprüfen und trotzdem Werte zu erhalten, die sich mit denen aus den zuvor beschriebenen Aktivitätsmessungen vergleichen lassen, wurde auch in diesen Versuchen auf das Verfahren (3.2.2) von MOTLAGH zurückgegriffen. Dafür wurden jeweils 4,4-12,88  $\mu\text{l}$  an His<sub>6</sub>-N-cpt2 bzw. 7,5  $\mu\text{l}$  His<sub>6</sub>-N-cpt2/S113L (Endkonzentration im Probenansatz 15 nM) mit 100  $\mu\text{l}$  oder 50  $\mu\text{l}$  an Cardioliipin (Endkonzentration in der Küvette 0,5 mM (Westhausen 1993) oder 0,25 mM) bei 30°C, 37°C, 40°C oder 42°C im PCR-Cycler präinkubiert und zum Start der Reaktion auf den Probenansatz gegeben. Die Aktivitätsmessung erfolgte jeweils nach 0 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min Präinkubationszeit. Jede Messung wurde drei- bis fünfmal wiederholt. Das verwendete Cardioliipin wurde durch 20 minütige Behandlung im Ultraschallbad bei 50 W und Raumtemperatur in 1 M TRIS/HCl-Puffer (pH 7,4) gelöst.

### 3.2.4 Vorversuch: Überprüfung der Ausfällung der CPT-II im Ansatz durch Cardioliipin

Es wurden jeweils 4,4-12,88  $\mu\text{l}$  an Wildtypenzym (Endkonzentration im Ansatz: 15 nM) und 100  $\mu\text{l}$  Cardioliipin (Endkonzentration im Ansatz: 0,5 mM) verwendet. Zunächst wurden nur Cardioliipin und Wildtypenzym zusammengegeben und intensiv vermischt. Dieser Ansatz wurde nun entweder sofort oder nach einer 30 minütigen Inkubation bei 30°C (im PCR-Cycler) bei 16 000 rpm für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde der

Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit der Menge an KP-Puffer gelöst, die der Menge des vorher abgenommenen Überstandes entsprach. Zur Überprüfung, ob sich das Enzym im Überstand oder im Pellet befindet, wurde die Aktivitätsmessung für gelöstes Pellet und Überstand entsprechend 3.2.2 durchgeführt.

Die im Überstand gemessene Aktivität betrug 86,99 %, die im Pellet 13,01 %. Die Differenz der Aktivitäten ist statistisch signifikant ( $p$ -Wert  $< 0,0001$ ).

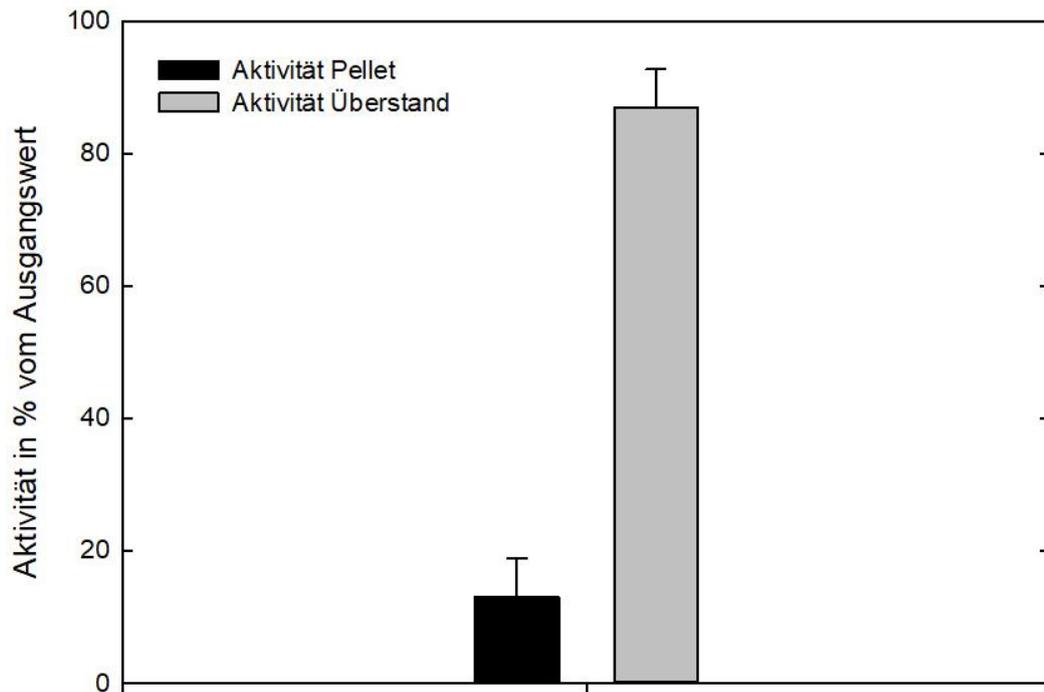


Abb. 3: Aktivitäten nach Präinkubation mit 0,5 mM CLP und Zentrifugation

Es ergab sich somit kein Hinweis, dass es unter Zugabe von Cardiolipin zu einer Präzipitation der CPT-II mit Cardiolipin kommt. Fast die gesamte Aktivität (durchschnittlich 86,99 %) war nach Präinkubation und Zentrifugation der Proben in der löslichen Fraktion zu finden und nur ein kleiner Teil (13,01 %) im Pellet.

Dies widerspricht vorliegenden Ergebnissen, welche über 90 % der Aktivität nach 20 min Inkubation mit Cardiolipin und Zentrifugation bei 100 000 g im Pellet zeigten (Kashfi et al. 2011). Allerdings gibt es zu diesem Experiment in der angesprochenen Arbeit weder Angaben zur Konzentration des Cardiolipins im Versuchsansatz noch zur verwendeten Inkubationstemperatur.

Mit den hier dargestellten Ergebnissen lässt sich die von KASHFI et al. postulierte feste Membranassoziation der CPT-II und die besondere Rolle, die Cardiolipin in der Bindung

des Enzyms spiele, in Frage stellen. Sie zeigten weiterhin, dass es sinnvoll ist, die nachfolgenden Experimente ohne Abtrennung des Pellets durchzuführen.

### 3.2.5 Statistische Methoden

Die Nullhypothese für die erhobenen Werte lautete jeweils: Es gibt eine signifikante Differenz zwischen zwei gemessenen Werten.

Zur Überprüfung der Nullhypothese wurden die p-Werte für die jeweiligen Differenzen berechnet. Wurde ein Wert mit dem festgelegten Ausgangswert von 100 % verglichen, so wurde zur Berechnung des p-Wertes ein Einstichprobentest verwendet. Wurden zwei unabhängig voneinander gemessene Werte miteinander verglichen, so wurde zur Bestimmung des p-Wertes ein unabhängiger t-Test verwendet.

Zur Durchführung der Berechnungen wurde die Quickcalcs-Software von GraphPad verwendet.

War der berechnete p-Wert kleiner als 0,05, so wurde die Nullhypothese beibehalten und damit die Differenz zwischen zwei Werten als signifikant gewertet. War der berechnete p-Wert größer als 0,05, wurde die Nullhypothese verworfen und damit die Differenz zwischen zwei Werten als nicht signifikant gewertet.

Die Korrelation zwischen der Cardiolipinkonzentration und der Aktivität wurde über die Software von Sigmaplot 12.5 bestimmt. Es wurde hierfür die Korrelation nach Pearson bestimmt, welche eine lineare Korrelation zwischen verschiedenen Variablen anzeigt. Eine Korrelation von + 1 entspricht hierbei einer perfekten positiven Korrelation (je mehr Cardiolipin, desto höher die Aktivität des Enzyms). Eine Korrelation von -1 entspricht einer perfekten negativen Korrelation (je mehr Cardiolipin, desto geringer die Aktivität des Enzyms). Ein p-Wert von größer als 0,05 zeigte eine statistisch nicht signifikante Korrelation, ein p-Wert von kleiner als 0,05 eine statistisch signifikante Korrelation an.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Aktivitätsanalysen

#### 4.1.1 Keine Präinkubation

Die gemessene Aktivität ohne Präinkubation und ohne Zugabe von Cardiolipin wurde jeweils als Referenzwert (100 % Aktivität) für die nachfolgenden Messungen herangezogen.

Die Zugabe von 0,5 mM Cardiolipin bewirkte ohne vorherige Inkubation eine signifikante Aktivitätssteigerung des Wildtypenzym auf 138,7 % des Ausgangswertes.

Demgegenüber bewirkte die Zugabe von 0,25 mM Cardiolipin ohne vorherige Inkubation eine Aktivitätssteigerung des Wildtypenzym auf 197,15 % des Ausgangswertes. Hier zeigte sich jedoch eine große Streuung der Werte.

#### 4.1.2 Präinkubation bei 30 °C

Aus Gründen der Übersicht werden hier und im Folgenden nur die durchschnittlichen Aktivitäten in % vom Ausgangswert dargestellt. Eine ausführliche Darstellung der Werte mit Median, p-Wert und Standardabweichung findet sich in der Anlage dieser Arbeit.

Ohne Zugabe von Cardiolipin zeigte sich die gemessene Aktivität des Wildtyp-Enzyms über den gesamten Inkubationszeitraum stabil und betrug nach 60 min noch 86,51 % des Ausgangswertes.

Bei Präinkubation mit 0,25 mM oder 0,5 mM Cardiolipin zeigte das Wildtyp-Enzym über den gesamten Messzeitraum eine ausgeprägte Aktivitätssteigerung. Diese erreichte ihren Maximalwert nach 60 min Präinkubation mit 0,5 mM Cardiolipin und betrug zu diesem Zeitpunkt 199,24 % des Ausgangswertes

Die Aktivitäten unterschieden sich bei Präinkubation mit 0 mM und 0,25 mM bzw.

0,5 mM signifikant (0 mM vs. 0,25 mM CLP 30-60 min:  $p = 0,0001$  bis  $0,02$ ; 0 mM vs. 0,5 mM CLP 30-45 min  $p = 0,027$  bis  $0,036$ ), wohingegen bei Präinkubation mit 0,25 mM und 0,5 mM CLP kein signifikanter Aktivitätsunterschied zu finden war ( $p_{60 \text{ min}} = 0,977$ ).

Die Mutante S113L zeigte sowohl bei Präinkubation ohne als auch bei Präinkubation mit 0,25 mM und 0,5 mM Cardiolipin eine stabile Aktivität des Enzyms über 60 min (durchschnittlich 79,13 % ohne Zugabe von Cardiolipin, 91,74 % bei Zugabe von

0,25 mM Cardiolipin und 73,54 % unter Zugabe von 0,5 mM Cardiolipin).

Die Aktivitätsunterschiede der Mutante S113L bei Präinkubation mit 0 mM, 0,25 mM und 0,5 mM waren allseits statistisch nicht signifikant (0 mM vs. 0,35 mM:  $p_{60 \text{ min}} = 0,45$ ; 0 mM vs. 0,5 mM:  $p_{60 \text{ min}} = 0,761$ ; 0,25 mM vs. 0,5 mM:  $p_{60 \text{ min}} = 0,354$ ).

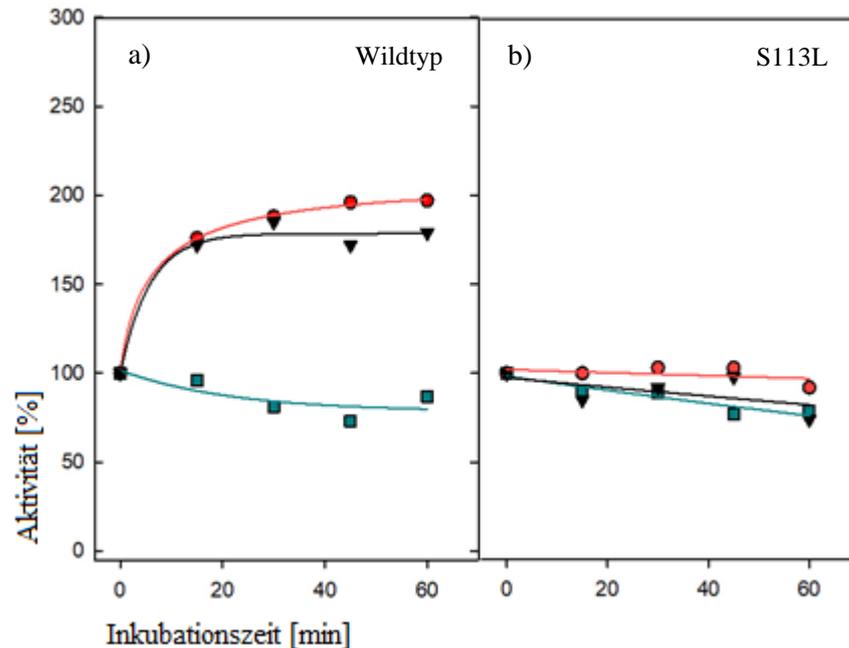


Abb. 4: Aktivitäten des Wildtyps und der Mutante S113L nach Präinkubation bei 30 °C mit 0 mM, 0,25 mM oder 0,5 mM CLP

- 0 mM Cardiolipin
- 0.25 mM Cardiolipin
- ▼ 0.5 mM Cardiolipin

#### 4.1.3 Präinkubation bei 37 °C

Ohne Zugabe von Cardiolipin erfuhr das Wildtyp-Enzym zunächst eine leichte Aktivitätssteigerung auf bis zu durchschnittlich 121,4 % und zeigte nach 60-minütiger Präinkubation eine stabile Aktivität von durchschnittlich 92,7 %.

Unter Präinkubation mit 0,25 mM Cardiolipin konnte nach 15 min eine maximale Aktivitätssteigerung auf durchschnittlich 232,5 % der Ausgangsaktivität erreicht werden.

Nach 60 min Präinkubation betrug die Aktivität noch durchschnittlich 166,5 % des Ausgangswertes.

Unter Präinkubation mit 0,5 mM Cardiolipin konnte eine maximale Aktivitätssteigerung auf durchschnittlich 221,6 % des Ausgangswertes erreicht werden. Nach 60 min Präinkubation betrug diese noch 169,1 %.

Die Aktivitätsunterschiede bei Präinkubation mit 0 mM und 0,25 mM bzw. 0,5 mM stellten sich als signifikant dar. Hingegen waren die Unterschiede der Aktivitäten bei Präinkubation mit 0,25 mM und 0,5 mM, mit Ausnahme der Werte nach 30-minütiger Präinkubation ( $p_{30 \text{ min}} = 0,016$ ), nicht signifikant.

Während die Mutante S113L bei Präinkubation ohne Zugabe von Cardiolipin relativ stabil blieb und über 60 min lediglich einen Aktivitätsverlust von durchschnittlich 32,6 % zu verzeichnen hatte, kam es bei Präinkubation mit 0,25 mM oder 0,5 mM Cardiolipin zu einem raschen und massiven Aktivitätsverlust. Nach 60 min betrug die Restaktivität hier durchschnittlich nur noch 3,7 % bzw. 1,78 %.

Die Aktivitätsunterschiede nach Zugabe von 0 mM und 0,25 mM oder 0,5 mM waren statistisch signifikant. Die Aktivitäten nach Zugabe von 0,25 mM und 0,5 mM zeigten, mit Ausnahme der Aktivitäten nach 15-minütiger Präinkubation ( $p_{15 \text{ min}} = 0,015$ ; siehe dazu auch 4.1.6), keinen statistisch signifikanten Unterschied.

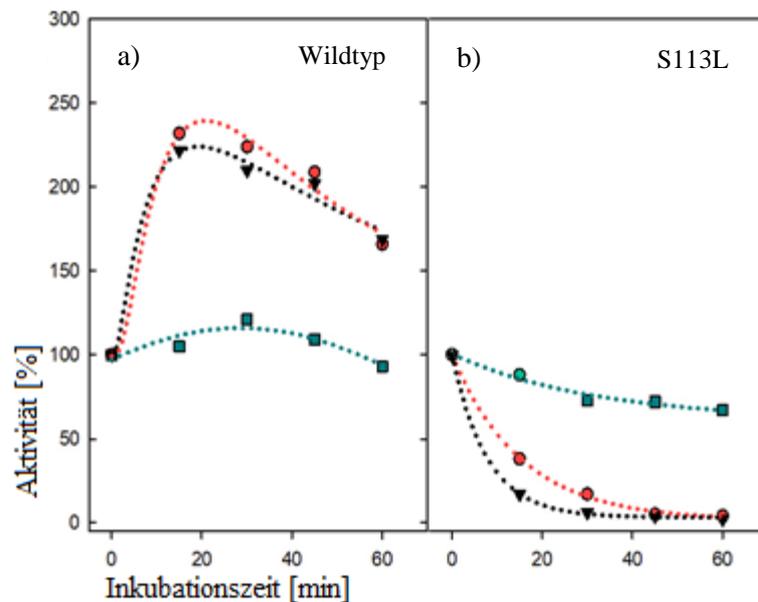


Abb. 5: Aktivitäten des Wildtyps und der Mutante S113L nach Präinkubation bei 37 °C mit 0 mM, 0,25 mM oder 0,5 mM CLP

■ 0 mM Cardiolipin  
● 0.25 mM Cardiolipin  
▼ 0.5 mM Cardiolipin

#### 4.1.4 Präinkubation bei 40 °C

Bei Präinkubation mit 0 mM Cardiolipin zeigte sich die Aktivität des Enzyms über 60 min relativ stabil. Nach 60 min Präinkubation bestand noch eine durchschnittliche Restaktivität von 74,6 %.

Bei Präinkubation mit 0,25 mM und 0,5 mM kam es hingegen über 60 min zu einem kontinuierlichen Aktivitätsverlust bis auf eine durchschnittliche Restaktivität von 54,8 % bzw. 34,4 %.

Bei Präinkubation der Mutante S113L bei 40 °C kam es unter Zugabe von 0 mM Cardiolipin zu einem ausgesprochen schnellen Aktivitätsverlust des Enzyms um 84 % in den ersten 45 min.

Unter Zugabe von 0,25 mM und 0,5 mM zeigte sich bereits bei der ersten Messung nach 15 min ein fast vollständiger Aktivitätsverlust des Enzyms.

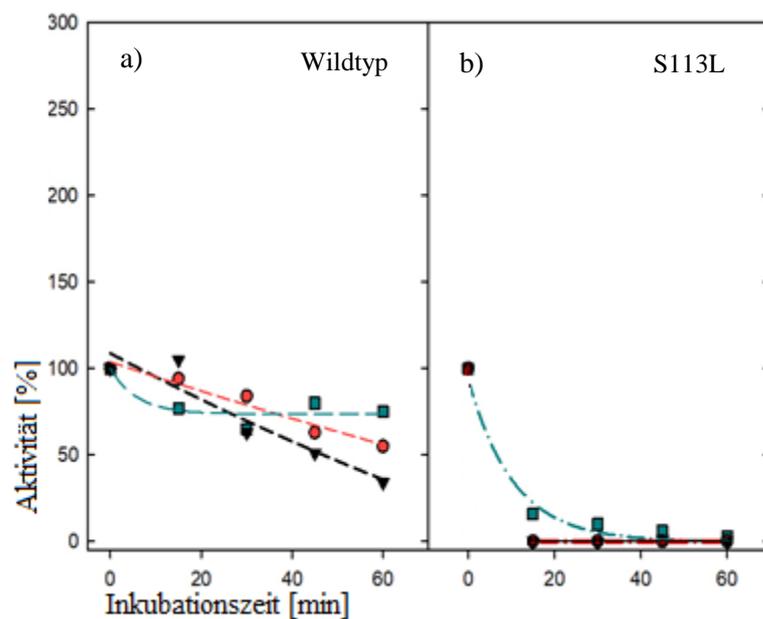
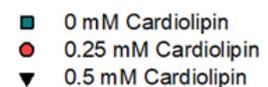


Abb. 6: Aktivitäten des Wildtyps und der Mutante S113L nach Präinkubation bei 40 °C mit 0 mM, 0,25 mM oder 0,5 mM CLP



#### 4.1.5 Präinkubation bei 42 °C

Bei Präinkubation mit 0 mM Cardiolipin kam es beim Wildtyp über 60 min zu einem Aktivitätsverlust auf durchschnittlich 43,6 % der Ausgangsaktivität.

Bei Präinkubation mit 0,25 mM und 0,5 mM zeigte sich ein signifikanter Aktivitätsverlust mit einer Abnahme der Aktivitäten auf 18,14 % bzw. 11,56 % der Ausgangsaktivität innerhalb von 60 min. Der Vergleich der Aktivitäten nach 60 min Präinkubation zeigte einen signifikant höheren Aktivitätsverlust bei Präinkubation mit 0,5 mM als nach Präinkubation mit 0 mM oder 0,25 mM (0 mM vs. 0,5 mM:  $p_{60 \text{ min}} = 0,035$ ; 0,25 mM vs. 0,5 mM:  $p_{60 \text{ min}} = 0,049$ ).

Bei Präinkubation der Mutante S113L bei 42 °C ohne Zugabe von Cardiolipin kam es zu einer raschen Aktivitätsminderung des Enzyms auf durchschnittlich 5,16 % bereits nach 15 min. Nach 60 min Präinkubation war der Aktivitätsverlust fast vollständig mit einer geringen Restaktivität von durchschnittlich 0,3 %.

Unter Zugabe von 0,25 mM und 0,5 mM konnte bereits nach 15 min Präinkubation in jeder Messung ein vollständiger Aktivitätsverlust beobachtet werden.

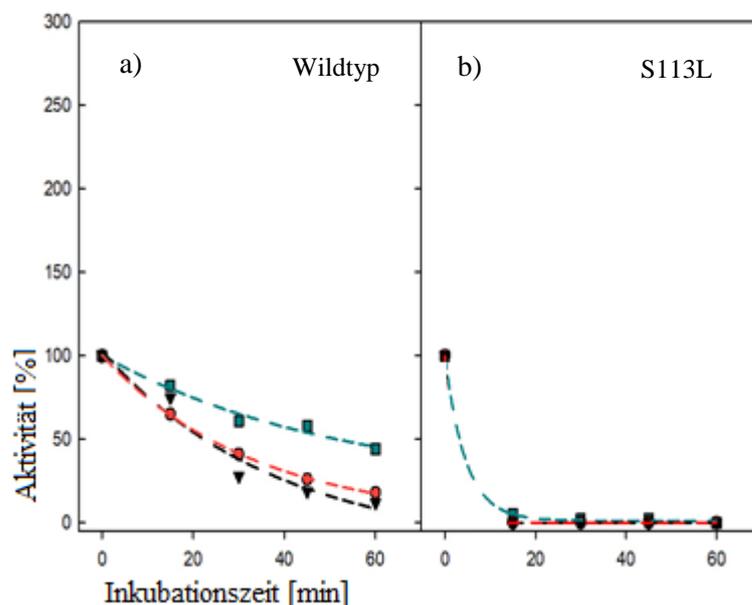


Abb. 7: Aktivitäten des Wildtyps und der Mutante S113L nach Präinkubation bei 42 °C mit 0 mM, 0,25 mM oder 0,5 mM CLP

■ 0 mM Cardiolipin  
● 0.25 mM Cardiolipin  
▼ 0.5 mM Cardiolipin

#### 4.1.6 Korrelation der Aktivität mit der Cardiolipinkonzentration

Eine Konzentrationsabhängigkeit der Aktivität ließ sich nur bei einzelnen Temperaturen und Inkubationszeiten nachweisen. Bei den meisten Temperaturen konnte jedoch keine direkte Abhängigkeit der Aktivität von der Cardiolipinkonzentration festgestellt werden.

Für den Wildtyp zeigte sich eine negative Korrelation der Aktivität mit der Cardiolipinkonzentration bei 40 °C nach 60-minütiger Inkubation ( $r = -0,54$ ,  $p = 0,13$ ).

Weiterhin zeigte sich für den Wildtyp eine statistisch signifikante negative Korrelation ( $r = -0,653$ ,  $p = 0,016$ ) bei 42 °C nach 60 min Inkubation.

Für die Mutante fand sich eine negative Korrelation von  $r = -0,95$  bei 37 °C nach 15-minütiger Inkubation. Diese Korrelation war statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Dies entspricht einer fast perfekten negativen Korrelation zwischen der gemessenen Aktivität der Mutante und der Cardiolipinkonzentration.

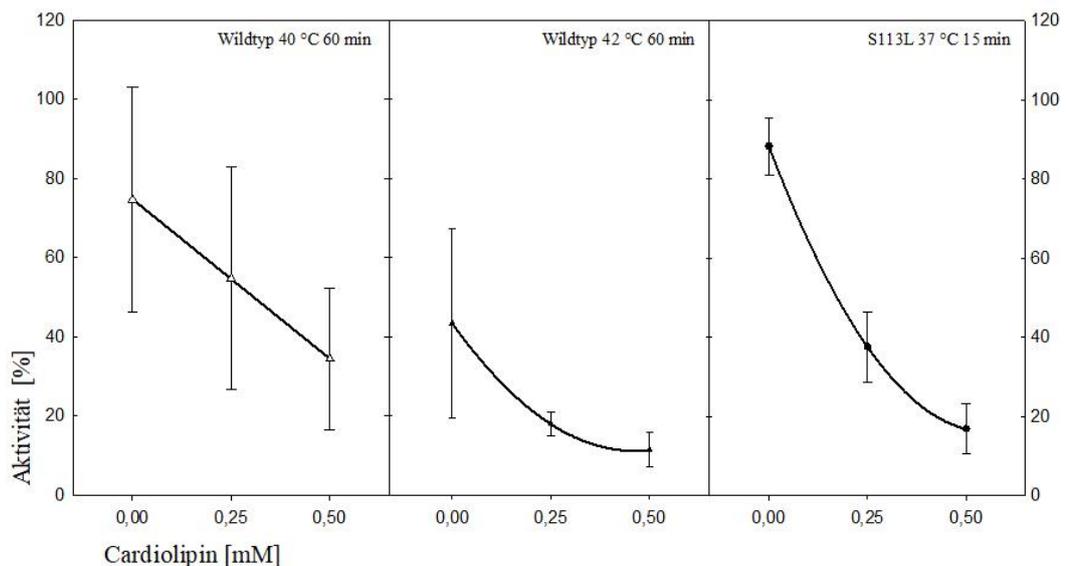


Abb. 8: Korrelation von Aktivität und Cardiolipinkonzentration zu ausgewählten Messpunkten. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung sowie die Regressionskurven 1. bzw. 2. Ordnung.

## 5 Diskussion

### 5.1 Der Effekt von Cardiolipin auf die Aktivität des Wildtyps der CPT-II

Unter Verwendung des von MOTLAGH modifizierten photometrischen Aktivitätstests ließ sich eine maximale Aktivitätssteigerung auf durchschnittlich 232,5 % des Ausgangswertes erzielen. Dieser Wert wurde bei 37 °C nach 15 min Präinkubation mit 0,25 mM Cardiolipin erreicht. Die höchsten Aktivitäten wurden stets nach Inkubation bei 37 °C und unter Zugabe von 0,25 mM Cardiolipin erreicht.

Die maximal gemessene Aktivität unter Zugabe von Cardiolipin ist geringer als die von anderen Arbeitsgruppen (Kashfi, L., et al. 2011) beschriebene Aktivitätssteigerung auf etwa das Vierfache der Ausgangsaktivität, aber größer als die von WESTHAUSEN (Westhausen 1993) beobachtete Steigerung der CPT-Gesamtaktivität um 65,9 %. WESTHAUSEN arbeitete mit Muskelhomogenat aus Muskelbiopsien von Patienten ohne CPT-II-Mangel, die aufgrund eines Verdachtes auf eine neuromuskuläre Erkrankung untersucht wurden. WESTHAUSENs Messung der Enzymaktivität erfolgte nach ZIERZ und ENGEL (Zierz und Engel 1985). Weiterhin differenzierte WESTHAUSEN nicht zwischen einer CPT-I- und CPT-II- Aktivität, sondern bestimmte eine CPT-Gesamtaktivität. Diese Punkte, vor allem die Verwendung von Muskelhomogenat und nicht von aufgereinigtem Enzym sowie die Bestimmung der CPT-Gesamtaktivität anstatt einer isolierten Analyse der Aktivität der CPT-II, machen es schwierig, die Ergebnisse jener Arbeit mit den eigenen Ergebnissen zu vergleichen. Allerdings könnte dies eine Erklärung für den Unterschied der maximal gemessenen Aktivitäten darstellen. Möglicherweise kam es bei WESTHAUSEN zu einer Steigerung der CPT-II-Aktivität bei gleichbleibender CPT-I-Aktivität. Dies hätte zur Folge, dass die gemessene Aktivitätssteigerung geringer ist, als es bei isolierter Messung der CPT-II-Aktivität der Fall gewesen wäre.

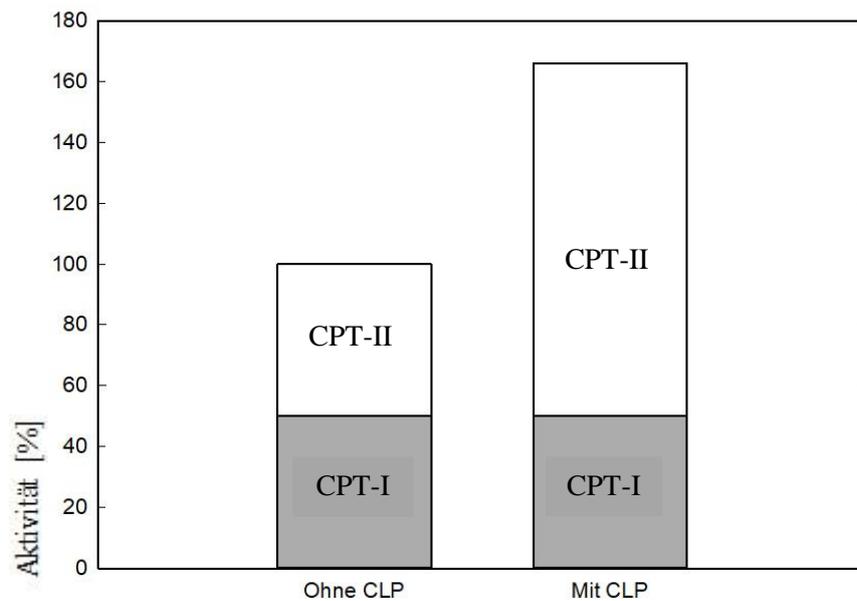


Abb. 9: Mögliche Aktivitätenverteilung bei WESTHAUSEN (Westhausen 1993). Die Verteilung der Ausgangsaktivitäten wurde in Anlehnung der Ergebnisse von LEHMANN angenommen (Lehmann 2014).

Bestandteile des Muskelhomogenats, die im hier verwendeten Protokoll nicht im Versuchsansatz zu finden sind, könnten außerdem zu einer Verminderung der Cardiolipinwirkung geführt haben.

Weiterhin führte WESTHAUSEN die Präinkubation mit Cardiolipin auf Eis durch, wohingegen in dieser Arbeit bei 30 - 42 °C inkubiert wurde.

KASHFI et al. (Kashfi et al. 2011) arbeiteten mit rekombinant hergestellter Ratten-CPT-II, wohingegen in dieser Arbeit mit rekombinant hergestellter humaner CPT-II gearbeitet wurde. Die CPT-II-Sequenz der Ratte zeigt zur humanen CPT-II-Sequenz eine 83 % Übereinstimmung (Hsiao et al. 2006, Rufer et al. 2006). Daher kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die Ratten-CPT-II in gleicher Weise wie die humane CPT-II durch Cardiolipin beeinflusst wird oder ob es dahingehend solche Unterschiede gibt, die die Differenz der maximalen Aktivitäten nach Zugabe von Cardiolipin erklären. Aus der Arbeit von KASHFI et al. ist nicht ersichtlich, unter Verwendung welcher Methode die Aktivitätsmessungen durchgeführt wurden. Außerdem findet sich keine Angabe über die Konzentration an Cardiolipin, die im Probenansatz verwendet wurde und unter welcher Temperatur sowie in welchem Zeitrahmen eine Präinkubation mit Cardiolipin durchgeführt wurde, so dass es auch hier schwierig sein dürfte, die in jener Arbeit mit denen in dieser Arbeit gemessenen Werten zu vergleichen.

Unabhängig von diesen methodischen Unterschieden zeigen jedoch alle Arbeiten eine deutliche Steigerung der Ausgangsaktivität unter Zugabe von Cardiolipin. Die photometrische

Aktivitätsmessung nach dem von MOTLAGH (Motlagh 2014) modifizierten Protokoll eignet sich also, um den aktivitätssteigernden Effekt des Cardiolipins auf das Wildtypenzym der CPT-II zu reproduzieren.

## **5.2 Der Effekt von Cardiolipin auf die Mutante S113L**

Nachdem etabliert werden konnte, dass ein aktivitätssteigernder Effekt von Cardiolipin auf das Wildtypenzym der CPT-II unter Anwendung des von MOTLAGH (Motlagh 2014) modifizierten Protokolls zu verzeichnen ist, stellte sich die Frage, ob ein ähnlicher aktivitätssteigernder Effekt auch bei seiner Mutante S113L beobachtet werden kann.

Zu dieser Fragestellung existierten bis dato keinerlei Untersuchungen.

Durch Präinkubation bei 30 °C zeigten sich keine statistisch signifikanten Aktivitätsunterschiede bei der Verwendung von 0 mM, 0,25 mM und 0,5 mM. Es konnte also bei dieser Temperatur kein wesentlicher Effekt des Cardiolipins auf die Mutante beobachtet werden. Das Verhalten des Enzyms bei 37 °C soll unter 5.3 diskutiert werden.

Die fehlende Stimulation der Variante durch Cardiolipin im Unterschied zum Wildtyp deutet auf eine gestörte Interaktion der Mutante mit der Phospholipid-Umgebung des Enzyms hin. Es wäre denkbar, dass es durch den Austausch von Serin zu Leucin zu einer Konformationsänderung des Enzyms kommt. Es wurde bereits postuliert, dass die Mutation zu einer Konformationsänderung führt, die das aktive Zentrum des Enzyms beeinflusst und dadurch zu einer abnormen Bindung von Substraten führt, die die Hemmung des Enzyms vermitteln (Motlagh et al. 2016). Es lässt sich vermuten, dass auch Anteile des Enzyms, die die Interaktion mit der MIM vermitteln, von einer Konformationsänderung betroffen sein könnten. Auch wenn es starke Hinweise dafür gibt, dass die Assoziation des Enzyms mit der MIM über zwei gegenläufige Helices vermittelt wird, ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt, wie die CPT-II mit der MIM kommuniziert und ob es lediglich um eine lose Assoziation oder eine feste Verankerung handelt (Wieser et al. 2003, Rufer et al. 2006).

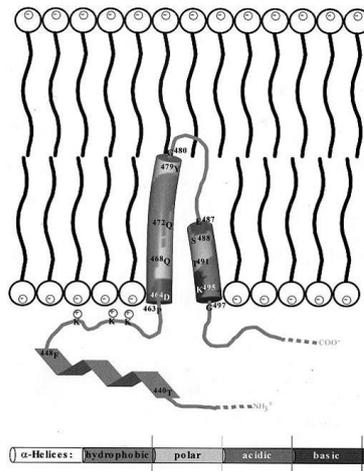


Abb. 10: Membranassoziation der CPT-II (Wieser et al. 2003)

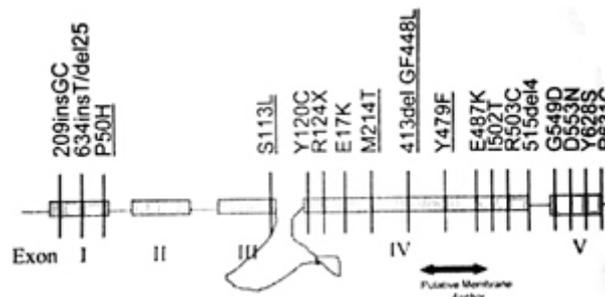


Abb. 11: CPT-II-assoziierte Mutationen. Pfeil: vermuteter Membrananker (Wieser et al. 2003)

### 5.3 Der toxische Effekt des Cardiolipins

MOTLAGH zeigte einen raschen Aktivitätsverlust der Mutante S113L unter Erwärmung auf Temperaturen von 40 °C oder mehr bei nahezu konstant bleibender Aktivität des Wildtyp-Enzyms unter gleichen Bedingungen (Motlagh 2014). In der hier vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse reproduziert werden. Der Aktivitätsverlust der Mutante verlief deutlich schneller und ausgeprägter als der des Wildtyps. Der Effekt konnte beim Wildtyp ab einer Inkubationstemperatur von 40 °C, bei der Mutante bereits bei 37 °C beobachtet werden.

Da bei 30 °C und 37 °C unter Zugabe von Cardiolipin für den Wildtyp ausgeprägte Aktivitätssteigerungen erzielt werden konnten, sollte geprüft werden, ob in der simulierten Fiebersituation bei 40 °C bzw. 42 °C die Zugabe von Cardiolipin einen protektiven Effekt auf das Enzym hat und dadurch zumindest der Aktivitätsverlust von 25,36 % bzw. 54,4 % ausgeglichen werden kann. Der aktivitätssteigernde Effekt des Cardiolipins kehrte sich jedoch bei Erhöhung der

Inkubationstemperatur über die physiologische Körpertemperatur ins Gegenteil um und führte zu einer weiteren Minderung der Aktivität des Enzyms. Das Wildtypenzym zeigte unter Zugabe von Cardiolipin bei 40 °C einen Aktivitätsverlust um bis zu 82 %. Dieser Effekt war abhängig von der Cardiolipinkonzentration.

Ähnlich verhielt es sich bei Inkubation bei 42 °C. Hier kam es zu einer Minderung der Aktivität um bis zu 96 %. Auch dieser Aktivitätsverlust war abhängig von der Cardiolipinkonzentration.

Die Differenz der Aktivitäten bei Zugabe und fehlender Zugabe von Cardiolipin war am stärksten bei der Mutante nach Präinkubation bei 37 °C ausgeprägt. Hierbei zeigte das Enzym bei Präinkubation mit 0,25 mM bzw. 0,5 mM Cardiolipin bis zu 68,74 % bzw. 71,37 % geringere Aktivitäten als ohne Zugabe von Cardiolipin. Diese Ergebnisse sind statistisch extrem signifikant. In der simulierten Fiebersituation führt die Präinkubation mit Cardiolipin bei sowohl 40 °C als auch 42 °C in beiden Konzentrationen gleichermaßen bereits nach 15 min Präinkubationszeit zum vollständigen Aktivitätsverlust. Diese Werte zeigen, dass es unter Zugabe von Cardiolipin schneller zur Inaktivierung des Enzyms kommt, als es ohne Cardiolipin der Fall wäre.

Die Zugabe von Cardiolipin verliert also einerseits ihren aktivitätssteigernden Effekt auf den Wildtyp wenn die Inkubationstemperatur auf 40 °C oder mehr angehoben wird. Andererseits hat sie, bezüglich der Thermolabilität, keinerlei protektiven Effekt auf den Wildtyp oder die Mutante S113L der CPT-II. Außerdem erfährt die Mutante bereits bei Körpertemperatur einen ausgeprägten Aktivitätsverlust durch Zugabe von Cardiolipin.

Nun stellt sich die Frage, warum Cardiolipin zwar einerseits bei physiologischer Körpertemperatur eine so ausgeprägte aktivitätssteigernde Wirkung am Wildtyp hat, andererseits aber in der simulierten Fiebersituation diese Wirkung verliert und zu einer Verminderung der Aktivität führt.

Denkbar ist, dass es durch Zunahme der Membranfluidität bei Erwärmung zu einer gestörten Membranassoziation des Enzyms kommt. Dies könnte erklären, warum der aktivitätssteigernde Effekt auf den Wildtyp bei Temperatursteigerungen über die physiologische Körpertemperatur entfällt. Weiterhin lässt sich vermuten, dass es zu temperaturinduzierten Konformationsänderungen des Cardiolipins kommt, welche unter Umständen toxisch auf das Enzym wirken. So ist es beispielsweise vorstellbar, dass es zur Bindung einer Fettsäurekette des Cardiolipins am aktiven Zentrum der CPT-II kommt und somit die Bindungsstelle für den eigentlich umzusetzenden Acyl-Rest blockiert wird. Begünstigend würde in diesem Fall sicherlich das Vorhandensein von freiem Cardiolipin sein. Ob es durch Zunahme der Membranfluidität bei erhöhten Temperaturen auch zu einer Freisetzung von Cardiolipin aus der Membran kommt,

bleibt spekulativ. Diese Theorie wäre jedoch gut mit der Zeitabhängigkeit der Aktivitätsminderung vereinbar: Je länger das Enzym mit Cardiolipin inkubiert wird, desto ausgeprägter ist bei 40 °C (Wildtyp) bzw. 37 °C (S113L) der Aktivitätsverlust. Geht man von einer Interaktion der Acyl-Reste des Cardiolipins mit der Acyl-Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms aus, so ist vorstellbar, dass mit Zunahme der Inkubationszeit immer mehr freie Bindungsstellen im aktiven Zentrum durch Acyl-Reste des Cardiolipins blockiert werden und somit nicht mehr zum Umsatz der eigentlichen Fettsäuren bereitstehen. Möglicherweise lässt sich dies bereits in abgemilderter Form in der Messung des Wildtyps bei 37 °C erklären: Hier zeigt sich nach 15-minütiger Präinkubation mit Cardiolipin ein Aktivitätspeak von ca. 220 % der Ausgangsaktivität. Im Verlauf nahm die Aktivität jedoch wieder kontinuierlich ab, bis nach 60-minütiger Präinkubation mit Cardiolipin nur noch Werte von ca. 170 % der Ausgangsaktivität gemessen werden konnten.

#### **5.4 Korrelation der Aktivität mit der Cardiolipinkonzentration**

Der Grund der nicht nachweisbaren direkten Korrelation zwischen der Aktivität und der Cardiolipinkonzentration ist das rasche Erreichen einer maximalen Aktivität des Wildtyps bei aktivierenden Temperaturen (30 °C und 37 °C) bzw. der sehr starke Aktivitätsverlust der Mutante bei höheren Temperaturen (40 °C und 42 °C). In zwei Messungen (Wildtyp bei 42 °C nach 60 min Inkubation und Mutante S113L bei 37 °C nach 15 min Inkubation, 4.1.6) ließ sich dennoch eine statistisch signifikante Korrelation nachweisen.

Es kann daher von einer Korrelation zwischen der Cardiolipinkonzentration und der gemessenen Aktivität ausgegangen werden.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Für den Wildtyp zeigte sich eine deutliche Aktivitätssteigerung bei 30 °C und 37 °C unter Präinkubation mit Cardiolipin, jedoch ein ausgeprägter Aktivitätsverlust bei 40 °C und 42 °C unter Präinkubation mit Cardiolipin.

Für die Variante S113L der CPT-II ließ sich bei 30 °C kein Effekt auf die Aktivität durch Präinkubation mit CLP beobachten. Es kam jedoch zu einer massiven Steigerung der bereits bekannten Thermoinstabilität der Variante S113L in Gegenwart von Cardiolipin ab 37 °C.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Spektrum der abnormen Enzymeigenschaften der Mutante S113L der CPT-II auf eine abnorme Regulierbarkeit durch das Phospholipid Cardiolipin erweitert werden. Dies unterstützt auch die bereits 1985 postulierte Annahme der abnormen Interaktion mit der Phospholipidumgebung des Enzyms (Zierz und Engel 1985).

Bei höheren Temperaturen (simulierte Fiebersituation) zeigte sich der toxische Effekt des Cardiolipins auch auf den Wildtyp. Möglicherweise kommt es dabei zu einer Blockierung der Acylbindungsstelle der CPT-II durch Bindung eines Acyl-Restes des Cardiolipins und damit zu einer Verhinderung des Transportes langkettiger Fettsäuren. Dieser Effekt ist für die Mutante ausgeprägter als für das Wildtypenzym.

Es ist von einer Korrelation der Cardiolipinkonzentration und der Enzymaktivität auszugehen.

Pathophysiologische Relevanz:

Es kann spekuliert werden, dass es bei langandauernder körperlicher Belastung oder Fieber zu einer Freisetzung von Cardiolipin aus der Mitochondrienmembran kommt, welches dann an das außerhalb der Membran gelegene katalytische Zentrum der CPT-II bindet und dieses blockiert.

Es bleibt zu überprüfen, ob der hier gemessene Aktivitätsverlust durch Cardiolipin-bindende Substanzen wie zum Beispiel Adriamycin (Westhausen 1993) aufgehoben werden kann.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Reff M, Roberts K, Walter P: The Mitochondrion. In: Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Garland Science, New York, 2002.
- Beer A (1852) Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik* 162:78-88.
- Bieber LL, Abraham T, Helmrath T (1972) A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem.* 50:509-18.
- Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J (2004) Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 25:495-520.
- Bouguer P. Essai d'optique, sur la gradation de la lumiere. Paris, 1729.
- Bremer J. (1962) Carnitine in Intermediary Metabolism - The metabolism of fatty acid esters of carnitine by mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 237:3628-3632
- Britton CH, Mackey DW, Esser V, Foster DW, Burns DK, Yarnall DP, Froguel P, McGarry JD (1997) Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 40:209-211.
- Brown NF, Esser V, Gonzalez AD, Evans CT, Slaughter CA, Foster DW, McGarry JD (1991) Mitochondrial import and processing of rat liver carnitine palmitoyltransferase II defines the amino terminus of the mature protein: possibility of differential modification of the rat and human isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 266:15446- 15449.
- Comte J, Maisterrena B, Gautheron DC (1976) Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 419:271-284.
- Christie WW (2018). <http://www.lipidhome.co.uk/lipids/complex/dpg/index.htm>
- Deschauer M, Wieser T, Zierz S (2005) Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: Clinical and molecular genetic features and diagnostic aspects. *Archives of Neurology* 62:37-41.

- DiMauro S, DiMauro PM (1973) Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science* 182:929-931.
- Drynan L, Quant PA, Zammit VA (1996) The role of changes in the sensitivity of hepatic mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase in determining the onset of the ketosis of starvation in the rat. *Biochemical Journal* 318:767-770.
- Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M (1996) Mammalian mitochondrial Beta-oxidation. *Biochemical Journal* 320:345-357.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82:70-77.
- Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry DJ (1996) Expression of a cDNA Isolated from Rat Brown Adipose Tissue and Heart Identifies the Product as the Muscle Isoform of Carnitine Palmitoyltransferase I (M-CPT I). *The Journal of Biological Chemistry* 271:6972-6977.
- Fehlig P, Wahren J (1975) Fuel Homeostasis in Exercise. *New England Journal of Medicine* 293:1078-1084.
- Finocchiaro G, Taroni F, Rocchi M, Martin AL, Colombo I, Tarelli GT, DiDonato S (1991) cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88:661 -665.
- Friedman S Fraenkel G (1955) Reversible enzymatic acetylation of carnitine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 59:491-501.
- Fritz, IB, Kaplan E, Yue KTN (1962) Specificity of carnitine action on fatty acid oxidation by heart muscle. *American Journal of Physiology* 202:117-21.
- Fritz IB, Schultz SK, Srere PA (1963) Properties of partially purified carnitine acetyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 238:2509-2517.
- Galla HJ, Müller HJ: *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 1988
- Gellera C, Verderio E, Floridia G, Finocchiaro G, Montermini L, Cavadini P, Zuffardi O, Taroni F (1994) Assignment of the human carnitine palmitoyltransferase II gene (CPT I) to chromosome 1p32. *Genomics* 24:195-197.

- Gempel K, Kiechl S, Hofmann S, Lochmüller H, Kiechl-Kohlendorfer U, Willeit J, Sperl W, Rettinger A, Bieger I, Pongratz D, Gerbitz KD, Bauer MF (2002) Screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency by tandem mass spectrometry. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 25:17-27.
- Hamilton JA, Kamp F (1999) How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 48:2255-2269.
- Horvath SE, Daum G (2013) Lipids of Mitochondria. *Progress in Lipid Research* 52:590-614.
- Hsiao YS, Jogl G, Esser V, Tong L (2006) Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT II). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346:974-980.
- Indiveri C, Tonazzi A, Palmieri F (1994) The reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria: evidence for a transport mechanism different from that of the other mitochondrial translocators. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1189:65-73.
- Isackson PJ, Bennett MJ, Lichter-Konecki U, Willis M, Nyhan WL, Sutton VR, Tein I, Vladutiu GD (2008) CPT2 gene mutations resulting in lethal neonatal or severe infantile carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 94:422-427.
- Isackson PJ, Bennett MJ, Vladutiu GD (2006) Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 89:323–331.
- Jia Z, Pei Z, Maignel D, Toomer CJ, Watkins PA (2007) The fatty acid transport protein (FATP) family: very long chain acyl-CoA synthetases or solute carriers? *Journal of Molecular Neuroscience* 33:25-31.
- Joshi P, Deschauer M, Zierz S. (2014) Carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency: Genotype-phenotype analysis of 50 patients. *Journal of the Neurological Sciences* 338:107–111.
- Joshi P, Deschauer M, Zierz S (2012) Clinically symptomatic heterozygous carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *Wiener Klinische Wochenschrift* 124:851-854.
- Kashfi K, Mynatt RL, Park EA, Cook GA (2011) Membrane microenvironment regulation of carnitine palmitoyltransferases I and II. *Biochemical Society Transactions*. 39:833-837

- Kerner J, Hoppel C (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1486:1-17.
- Kim TT, Dyck JRB (2016) The role of CD36 in the regulation of myocardial lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861:1450-1460.
- Knape M. 2012. In vitro- und in vivo-Charakterisierung der humanen Carnitin-Palmitoyltransferase 2 [Dissertation]. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität.
- Koonena DPY, Glatza JFC, Bonenb A, Luiken JJFP (2005) Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1736:163-180.
- Lambert JH. *Photometria: sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*. 1760.
- Lehmann, D. 2014. Biochemische Charakterisierung der Carnitin Palmitoyltransferase II bei muskulärem CPT II- Mangel 2 [Dissertation]. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität
- Löffler G: Lipogenese und Lipolyse - Bildung und Verwertung der Fettspeicher. In: Peter C. Heinrich PC, Müller M, Graeve L (Hrsg.): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014, S. 257-278.
- McGarry JD, Brown NF, Inthanousay PP, Park DI, Cook BA, Foster DW: Insights into the topography of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase gained from the use of proteases. In: Coates PM, Tanka K (Hrsg.): *New developments in fatty acid oxidation*, New York: Wiley-Liss Inc., 1992, S. 47-61.
- McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW (1983) Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochemical Journal* 214:21-28.
- McGarry JD, Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. *European Journal of Biochemistry* 244:1-14.
- Motlagh L. 2014. Thermostabilität der Variante S113L der humanen Carnitin-Palmitoyltransferase II und ihre Regulierung durch Malonyl-CoA [Dissertation]. Halle (Saale): Martin-Luther-Universität.

- Motlagh L, Golbik R, Sippel W, Zierz S (2016) Malony-CoA inhibits the S113L variant of carnitine-palmitoyltransferase II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1861: 34-40.
- Nic a'Bhaird N, Kumaravel G, Gandour RD, Krueger MJ, Ramsay RR (1993) Comparison of the active sites of the purified carnitine acyltransferases from peroxisomes and mitochondria by using a reaction-intermediate analogue. *Biochemical Journal* 294: 645-651.
- Norum KR., Farstad M, Bremer J (1966) The submitochondrial distribution of acid:CoA ligase (AMP) and palmitoyl-CoA:carnitine palmitoyltransferase in rat liver mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* 22:797-804.
- Pace N, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption. *Protein Science* 4:2411-2423.
- Price NT, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V (2002) A Novel Brain-Expressed Protein Related to Carnitine Palmitoyltransferase I. *Genomics* 80:433-442.
- Rubio-Gozalbo ME, Bakker AJ, Waterham HR, Wanders RJ (2004) Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 25:521-532.
- Rufer AC, Thoma R, Benz J, Stihle M, Gsell B, De Roo E, Banner DW, Mueller F, Chomienne O, Hennig M (2006) The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment. *Structure* 14:713-723.
- Sigauke E, Rakheja D, Kitson K, Bennett MJ (2003) Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical and molecular review. *Laboratory Investigation*. 83: S. 1543-1554.
- Taroni F, Verderio E, Dworzak F, Willems PJ, Cavadini P, DiDonato S (1993) Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients. *Nature Genetics* 4:314-320.
- Taroni F, Verderio E, Fiorucci S, Cavadini P, Finocchiaro G, Uziel G, Lamantea E, Gellera C, DiDonato S (1992) Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89:8429-8433.

- Tonazzia A, Giangregorio N, Indiveric C, Palmieria F (2009) Site-directed mutagenesis of the His residues of the rat mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: Implications for the role of His-29 in the transport pathway. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1787, 8:1009-1015.
- Verderio, E, Cavadini P, Montermini L, Wang H, Lamantea E, Finocchiaro G, DiDonato S, Gellera C, Taroni F (1995) Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: structure of the gene and characterization of two novel disease-causing mutations. *Human Molecular Genetics* 4:19-29.
- Vladutiu GD, Saponara I, Conroy JM, Grier RE, Brady L, Brady P (1992) Immunoquantitation of carnitine palmitoyl transferase in skeletal muscle of 31 patients. *Neuromuscular Disorder* 2:249–259.
- Westhausen O. 1993. Beeinflussung der Carnitin Palmitoyltransferase-Aktivität in menschlichem Skelettmuskel durch Adriamycin und Cardiolipin [Dissertation]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
- Wieser T, Deschauer M, Olek K, Hermann T, Zierz S (2003) Carnitine palmitoyltransferase II deficiency - Molecular and biochemical analysis of 32 patients. *Neurology* 60:1351-1353
- Woeltje KF, Esser V, Weis BC, McGarry JD (1990) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase II. *Journal of Biological Chemistry* 265:10720-10725.
- Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW, McGarry JD (1987) Characterization of the mitochondrial carnitine palmipalmitoyltransferase II Use of detergents and antibodies. *Journal of Biological Chemistry* 262:9822-9827.
- Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Yamanaka Y, Terada H (1996) Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1307:157-161.
- Zheng G, Dai J, Woldegiorgis G (2002) Identification by mutagenesis of a conserved glutamate (Glu487) residue important for catalytic activity in rat liver carnitine palmitoyltransferase II. *Journal of Biological Chemistry* 277:42219-42223.
- Zierz S, Jerusalem F, Neumann-Schmidt S (1993) Inhibition of carnitine palmitoyltransferase in normal human skeletal muscle and in muscle of patients with carnitine

palmitoyltransferase deficiency by long- and short-chain acylcarnitine and acyl-coenzyme A. *Clinical Investigation* 71:763–769.

Zierz S, Engel AG (1985) Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry* 149:207–214.

Zierz S, Deschauer M.: Lipidspeichermyopathien. In: Zierz S, Jerusalem F (Hrsg.): *Muskelerkrankungen*. Georg Thieme Verlag, 2014, S. 255-266.

## **Thesen**

- (1) Das aufgereinigte Wildtypenzym der CPT-II erfährt durch Präinkubation mit dem Phospholipid Cardiolipin eine massive Aktivitätssteigerung bei 30 °C und 37 °C.
- (2) Eine Präinkubation mit Cardiolipin hat bei 30 °C keinerlei Effekt auf die S113L-Mutante der CPT-II.
- (3) Bei Erhöhung der Präinkubationstemperatur über Körpertemperatur führt die Präinkubation des Wildtypenzyms mit Cardiolipin zu einem ausgeprägten Aktivitätsverlust des Enzyms.
- (4) Der unter (3) beschriebene Effekt tritt an der S113L-Mutante bereits bei 37 °C auf.
- (5) Es besteht eine negative Korrelation zwischen der Aktivität des Wildtypenzyms bzw. der Mutante S113L und der Cardiolipinkonzentration.
- (6) Cardiolipin hat keinen protektiven sondern einen toxischen Effekt auf die Mutante S113L der CPT-II.
- (7) Die bereits in den 80er Jahren aufgestellte These, dass es sich beim CPT-II-Mangel nicht um einen quantitativen Mangel sondern um eine abnorme Regulation handelt, konnte bestärkt werden (Zierz und Engel 1985, Vladutiu et al. 1992, Zierz et al. 1993).
- (8) Vermutlich liegt eine gestörte Interaktion des Enzyms mit der Phospholipidmembran vor, wie dies bereits 1985 postuliert worden ist (Zierz und Engel 1985).

## Anlagen

Ergebnisübersicht mit Angabe von Median, Standardabweichung und p-Wert.

Die folgenden Werte beziehen sich auf den Vergleich zwischen Ausgangsaktivität und gemessener Aktivität bei der jeweiligen Temperatur und Cardiolipinkonzentration.

### 1. Wildtyp ohne Präinkubation mit CLP

30 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	120,41 77,98 90,04	78,05 78,25 86,92	79,79 49,52 90,68	95,96 91,28 72,30
Mittelwert in %	96,14	81,07	73,33	86,51
Median in %	90,04	78,25	79,77	91,28
n	3	3	3	3
Standardabweichung	17,85	4,13	17,41	10,23
p-Wert	0,6548	0,0155	0,1175	0,1496

37 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	108,03	113,08	150,18	116,50
	73,87	79,76	53,30	75,38
	125,58	121,61	61,57	103,65
	87,61	114,62	128,49	64,05
	131,72	177,86	152,51	103,80
Mittelwert in %	105,36	121,39	109,21	92,67
Median in %	108,03	114,62	128,49	103,65
n	5	5	5	5
Standardabweichung	21,99	31,74	43,17	19,65
p-Wert	0,6143	0,2064	0,6582	0,4513
<hr/>				
40 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	98,20	63,91	54,99	68,45
	80,42	75,18	141,06	112,23
	51,76	55,99	44,62	43,25
Mittelwert in %	76,79	65,02	80,22	74,64
Median in %	80,42	63,91	54,99	68,45
n	3	3	3	3
Standardabweichung	19,13	7,97	43,23	28,5
p-Wert	0,1704	0,0165	0,5112	0,2632

42 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	88,78	92,67	37,43	77,11
	107,71	62,70	48,85	20,52
	57,18	59,24	58,62	53,38
	70,15	58,06	20,44	54,65
	87	30,76		12,35
Mittelwert in %	82,16	60,69	41,34	43,6
Median in %	87	59,24	43,14	53,38
n	5	5	4	5
Standardabweichung	17,25	19,66	14,2	23,87
p-Wert	0,0818	0,0111	0,0037	0,0062

## 2. Wildtyp nach Präinkubation mit 0,25 mM CLP

30 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	300,33	181,04	216,54	266,92
	116,48	194,17	152,39	153,54
	109,97	189,38	219,27	171,45
Mittelwert in %	175,59	188,2	196,07	197,3
Median in %	116,48	181,04	216,54	171,30
n	3	3	3	3
Standardabweichung	88,24	5,42	30,9	49,77
p-Wert	0,2761	0,0013	0,0328	0,0772

37 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	243,27	164,87	245,80	171,71
	258,78	274,52	158,59	138,61
	288,14	240,56	151,32	196,53
	203,31	215,37	280,53	159,05
	168,96			
Mittelwert in %	232,49	223,83	209,06	166,48
Median in %	243,27	227,97	202,2	149,55
n	5	4	4	4
Standardabweichung	41,93	39,99	55,54	20,99
p-Wert	0,0021	0,0085	0,0294	0,0088

40 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	80,83	52,91	35,76	26,62
	98,23	69,10	55,23	44,47
	101,70	128,67	99,17	93,15
Mittelwert in %	93,59	83,56	63,39	54,75
Median in %	98,22	69,1	55,23	44,47
n	3	3	3	3
Standardabweichung	9,13	32,58	26,52	28,12
p-Wert	0,3478	0,4743	0,1393	0,1082

42 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	85,20	46,83	37,70	22,73
	90,97	60,11	26,60	18,05
	24,15	20,45	18,14	17,35
	60,02	35,56	22,69	14,41
Mittelwert in %	65,08	40,74	26,28	18,14
Median in %	72,61	41,2	24,64	17,70
n	4	4	4	4
Standardabweichung	26,35	14,58	7,24	2,98
p-Wert	0,0769	0,0039	0,0003	0,0001

### 3. Wildtyp nach Präinkubation mit 0,5 mM CLP

30 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	303,81	275,34	246,11	337,32
	126,78	149,60	133,01	123,59
	125,60	149,19	136,93	136,8
		165,22		
Mittelwert in %	185,4	184,84	172,02	199,24
Median in %	126,78	157,41	136,93	136,8
n	3	4	3	3
Standardabweichung	83,73	52,65	52,41	97,79
p-Wert	0,1516	0,0733	0,1403	0,2209

37 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % der Ausgangsaktivität	165,26	154,77	201,59	149,55
	229,29	186,15	162,08	161,68
	149,79	160,92	264,01	187,14
	290,03	128,43	180,95	158,59
	273,64	171,34		188,66
Mittelwert in %	221,6	160,32	202,16	169,12
Median in %	229,29	160,92	191,27	161,68
n	5	5	4	5
Standardabweichung	56,18	19,17	38,35	15,85
p-Wert	0,0084	0,0022	0,0129	0,0006

40 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messwerte in % vom Ausgangswert	98,26	43,13	29,70	15,84
	60,78	56,88	46,40	28,56
	152,72	89,85	75,91	58,70
Mittelwert in %	103,92	63,28	50,67	34,37
Median in %	98,26	56,88	46,4	28,57
n	3	3	3	3
Standardabweichung	37,75	19,6	19,1	17,97
p-Wert	0,8738	0,0833	0,0465	0,0241

42 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	103,57	43,49	27,57	16,70
	114,88	27,61	22,32	15,14
	38,27	18,41	12,29	7,17
	43,60	21,31	12,25	7,23
Mittelwert in %	75,08	27,7	18,61	11,56
Median in %	73,59	24,46	17,31	11,18
n	4	4	4	4
Standardabweichung	34,43	9,7	6,6	4,4
p-Wert	0,2436	0,0007	0,0001	0,0001

#### 4. S113L ohne Präinkubation mit CLP

30 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	42,91	84,48	74,23	56,12
	87,90	88,52	97,37	109,04
	41,60	95,84	56,90	62,48
		88,55	78,01	88,9
Mittelwert in %	57,47	89,35	76,63	21,19
Median in %	42,91	88,53	76,12	75,69
n	3	4	4	4
Standardabweichung	21,52	4,1	14,38	22,86
p-Wert	0,0289	0,0138	0,0475	0,1436

37 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	99,47	78,20	86,31	72,6
	79,95	71,78	58,33	68,1
	84,33	67,03	75,7	61,73
	89,14			
Mittelwert in %	88,22	72,34	73,44	67,45
Median in %	86,74	71,78	75,7	68,01
n	4	3	3	3
Standardabweichung	7,26	4,58	11,53	4,45
p-Wert	0,0477	0,009	0,0575	0,0062
<hr/>				
40 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	5,01	8,1	1,41	3,71
	15,6	8	5,94	1,15
	27,16	13,22	10,48	4,02
Mittelwert in %	15,92	9,77	5,94	2,96
Median in %	15,6	8,1	5,94	3,71
n	3	3	3	3
Standardabweichung	9,05	2,44	4,53	1,29
p-Wert	0,0038	0,0002	0,0008	0,0001

42 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	13,19	4,70	0,02	0,95
	0	0	0	0
	6,54	1,44	0,91	0
	0,92	0,04	5,9	0,24
Mittelwert in %	5,16	1,54	1,71	0,3
Median in %	3,73	0,74	0,46	0,12
n	4	4	4	4
Standardabweichung	5,27	1,91	2,45	0,39
p-Wert	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

#### 5. S113L nach Präinkubation mit 0,25 mM CLP

30 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	97,77	92,86	95,47	86,77
	80,77	79,72	120,54	67,83
	119,97	114,79	77,27	129,39
	102,26	123,94	119,67	82,95
Mittelwert in %	100,19	102,82	103,24	91,74
Median in %	100,01	103,82	107,57	84,86
n	4	4	4	4
Standardabweichung	13,95	17,48	18,06	22,86
p-Wert	0,9797	0,7676	0,7437	0,5220

37 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
	38,39	10,63	1,96	2,50
	48,08	33,91	9,74	7,73
	26,22	7,12	2,39	0,88
Mittelwert in %	37,56	17,22	4,7	3,71
Median in %	38,39	10,63	2,39	2,5
n	3	3	3	3
Standardabweichung	8,94	11,89	3,57	2,92
p-Wert	0,0021	0,0085	0,0294	0,0088

40 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	0	1,39	0	0
	1,08	0	0	0
	3,05	3,03	5,27	5,01
	0	0	0	0
Mittelwert in %	1,03	1,11	1,32	1,25
Median in %	0,54	0,69	0	0
n	4	4	4	4
Standardabweichung	1,23	1,25	2,22	2,17
p-Wert	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

42 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	0	0	0	0
Mittelwert in %	0	0	0	0
Median in %	0	0	0	0
n	3	3	3	3
Standardabweichung	0	0	0	0
p-Wert	-	-	-	-

#### 6. S113L nach Präinkubation mit 0,5 mM CLP

30 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	51,12	72,61	79,08	46,74
	91,01	77,97	47,11	45,58
	140,49	119,45	124,30	109,99
	56,22	97,44	142,51	91,84
Mittelwert in %	84,7	91,87	98,25	73,54
Median in %	73,62	87,71	101,69	69,29
n	4	4	4	4
Standardabweichung	35,67	18,41	37,48	28,12
p-Wert	0.4543	0,4421	0,9315	0,1564

37 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	11,73	10,61	3,87	3,39
	24,79	10,11	0,01	1,83
	21,39	2,78	10,29	1,92
	9,49	0,89	2,03	0
Mittelwert in %	16,85	6,1	2,95	1,87
Median in %	16,56	6,45	2,95	1,87
n	4	4	4	4
Standardabweichung	6,4	4,33	3,85	1,2
p-Wert	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

40 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	0,3454	0	0	0
	0	0	2,5	0
	0	0	0	0
Mittelwert in %	0,12	0	0,83	0
Median in %	0	0	0	0
n	3	3	3	3
Standardabweichung	0,16	0	1,18	0
p-Wert	0,0001	-	0,0001	-

42 °C	15 min	30 min	45 min	60 min
Messewerte in % vom Ausgangswert	0	0	0	0
Mittelwert in %	0	0	0	0
Median in %	0	0	0	0
n	3	3	3	3
Standardabweichung	0	0	0	0
p-Wert	-	-	-	-

Die folgenden Werte beziehen sich auf den Vergleich der Aktivitäten bei Präinkubation mit 0 mM CLP und 0,25 mM bzw. 0,5 mM CLP sowie 0,25 mM und 0,5 mM nach jeweils 15 min, 30 min, 45 min und 60 min. Die Angabe des Aktivitätsunterschiedes erfolgt in %.

#### 1. Wildtyp: Präinkubation bei 30 °C

0 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,25 mM	Aktivitätsunterschied	79,45	107,12	122,74	110,79
	p-Wert	0,2011	0,0001	0,0039	0,0195
0,5 mM	Aktivitätsunterschied	89,25	103,77	98,69	112,72
	p-Wert	0,1453	0,0272	0,0364	0,1180

0,25 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,5 mM	p-Wert	0,8958	0,9008	0,5312	0,9771

## 2. Wildtyp: Präinkubation bei 37 °C

0 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,25 mM	Aktivitätsunterschied	127,13	102,45	99,85	73,80
	p-Wert	0,0003	0,0036	0,0187	0,0010
0,5 mM	Aktivitätsunterschied	89,25	103,77	98,69	112,72
	p-Wert	0,0026	0,0468	0,0120	0,0001

0,25 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,5 mM	p-Wert	0,7373	0,0158	0,8446	0,8349

## 3. Wildtyp: Präinkubation bei 40 °C

0 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,25 mM	Aktivitätsunterschied	16,79	18,45	16,84	19,9
	p-Wert	0,2420	0,3924	0,5961	0,4379
0,5 mM	Aktivitätsunterschied	27,13	1,74	29,56	40,78
	p-Wert	0,3292	0,8934	0,3397	0,1068

0,25 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,5 mM	p-Wert	0,6688	0,4079	0,5373	0,3498

#### 4. Wildtyp: Präinkubation bei 42 °C

0 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,25 mM	Aktivitätsunterschied	17,08	19,95	15,06	25,46
	p-Wert	0,2775	0,1361	0,1078	0,0748
0,5 mM	Aktivitätsunterschied	7,08	32,99	22,73	32,04
	p-Wert	0,6973	0,0188	0,0273	0,0347

0,25 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,5 mM	p-Wert	0,6609	0,1872	0,1686	0,0478

#### 1. S113L: Präinkubation bei 30 °C

0 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,25 mM	Aktivitätsunterschied	42,72	13,48	26,61	12,60
	p-Wert	0,0235	0,1839	0,0607	0,4496
0,5 mM	Aktivitätsunterschied	27,24	2,52	21,62	5,6
	p-Wert	0,2992	0,7979	0,3228	0,7613

0,25 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,5 mM	p-Wert	0,4497	0,4212	0,8185	0,3540

## 2. S113L: Präinkubation bei 37 °C

0 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,25 mM	Aktivitätsunterschied	50,66	55,11	68,75	63,74
	p-Wert	0,0001	0,0017	0,0006	0,0001
0,5 mM	Aktivitätsunterschied	71,37	66,24	69,39	65,66
	p-Wert	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

0,25 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,5 mM	p-Wert	0,0154	0,1371	0,8299	0,2775

## 3. S113L: Präinkubation bei 40 °C

0 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,25 mM	Aktivitätsunterschied	14,89	8,67	4,62	1,71
	p-Wert	0,0202	0,0016	0,1320	0,1751
0,5 mM	Aktivitätsunterschied	15,81	9,77	5,11	2,96
	p-Wert	0,0390	0,0023	0,1317	0,0051

0,25 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,5 mM	p-Wert	0,2711	0,1952	0,7539	0,3738

4. S113L: Präinkubation bei 42 °C

0 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,25 mM	Aktivitätsunterschied	5,16	1,54	1,71	0,3
	p-Wert	0,1587	0,2299	0,2919	0,2529
0,5 mM					
	Aktivitätsunterschied	5,16	1,54	1,71	0,3
	p-Wert	0,1587	0,2299	0,2919	0,2529
0,25 mM vs.		15 min	30 min	45 min	60 min
0,5 mM	p-Wert	-	-	-	-

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen erstellt, sowie wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Annemarie Thäle

Halle (Saale), den 30.09.2017

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich versichere, dass ich mich erstmalig einem Promotionsverfahren stelle und keine früheren Versuche stattgefunden haben.

Annemarie Thäle

Halle (Saale), den 30.09.2017

