



"*In vitro*- und *in vivo*- Charakterisierung der humanen
Carnitin-Palmitoyltransferase 2"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Manuela Knappe

geboren am 25.02.1981 in Wolfen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Stephan Zierz
2. Prof. Dr. em. Gerhard Hübner
3. Prof. Dr. Robert Seckler

Halle (Saale), 06.07.2012

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Modus des Fettsäuretransports und partizipierende Komponenten ...	2
1.1.1	Regulation des Fettstoffwechsels	3
1.1.2	Komponenten des Carnitin-Palmitoyltransferase-Systems.....	4
1.1.3	Funktion des Carnitin-Palmitoyltransferase-Systems	5
1.1.4	Carnitin-Palmitoyltransferase 1	6
1.1.5	Carnitin-Palmitoyltransferase 2	10
1.1.5.1	Chromosomale Lokalisation & Charakterisierung	11
1.1.5.2	Proteinstruktur.....	11
1.1.5.3	Substratspezifität	12
1.1.5.4	Das aktive Zentrum.....	12
1.1.5.5	Regulation der hCPT2-Expression	14
1.1.6	Carnitin-Acylcarnitin-Translokase	15
1.1.7	Natrium-abhängiger organischer Carnitin-Transporter 2.....	16
1.2	Substrate der Carnitin-Palmitoyltransferasen	17
1.2.1	L-Carnitin.....	17
1.2.2	Coenzym A	19
1.2.3	Fettsäurecoenzym A & Fettsäurecarnitin.....	21
1.3	Fettsäureoxidationsstörungen.....	22
1.3.1	CPT2-Mangel	23
1.3.1.1	Adulte Form.....	25
1.3.1.2	Infantile Form.....	26
1.3.1.3	Neonatale Form	26
1.3.2	Epidemiologie	27
1.3.3	Korrelation von Genotyp & Phänotyp.....	27
1.3.4	Koinzidenz mit anderen Erkrankungen.....	28
1.3.5	Therapie.....	29
1.4	Zielstellung der Dissertation.....	31
2	MATERIALIEN & CHEMIKALIEN	32
2.1	Chemikalien.....	32
2.1.1	Chemikalien, Antibiotika, Substrate	32
2.2	Materialien.....	34
2.2.1	Bakterien, Plasmide, Klone, Enzyme, Antikörper & sonstige Materialien	34
2.2.2	Geräte & Software.....	36

3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	38
3.1	Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	38
3.2	Anzucht und Lagerung von <i>Pichia pastoris</i> -Stämmen	38
3.3	Transformation in <i>Escherichia coli</i>	39
3.3.1	Transformation in elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	39
3.3.2	Transformation in chemokompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
3.4	Transformation in <i>Pichia pastoris</i>	40
3.5	Phänotypisierung der <i>Pichia pastoris</i> -Transformanten	41
4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	42
4.1	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	43
4.1.1	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	43
4.1.2	Restriktionsverdau mittels Endonukleasen	44
4.1.3	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	44
4.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	45
4.1.5	Polymerase-Kettenreaktion.....	45
4.1.5.1	Primer	45
4.1.5.2	Amplifikation des <i>cpt2</i> -Gens aus pOTB7/ <i>cpt2</i>	46
4.1.5.3	PCR-Analyse von <i>Pichia pastoris</i> -Integrationsprodukten	46
4.1.5.4	Generierung von DNA-Sonden.....	47
4.1.5.5	Klonierung des <i>cpt2</i> -Gens in pPICZ B.....	48
4.1.5.6	Klonierung des <i>cpt2</i> -Gens in den pET28a(+)-Vektor.....	49
4.1.6	Mutagenese.....	50
4.1.6.1	Mutageneseprimer	50
4.1.6.2	Entfernen des Signalpeptids.....	51
4.1.7	Generierung des Wildtyp- und S113L-Gens.....	52
4.2	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	53
4.2.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	53
4.2.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	53
4.3	Isolation genomischer DNA aus <i>Pichia pastoris</i>	54
4.4	RNAse A-Verdau genomischer DNA	54
4.5	DNA- und RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	55
4.6	Isolierung von Fragmenten aus dem Gel.....	55
4.7	DNA-Sequenzierung	56
4.7.1	Sequenzierprimer	56
4.8	Southern <i>blotting</i>	57
4.9	Isolation von Total-RNA aus Muskelproben	57

5	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	58
5.1	Expression und Anreicherung	58
5.1.1	Miniexpression in <i>Pichia pastoris</i>	58
5.1.2	Miniexpression in <i>E. coli</i> BL21Gold DE3	59
5.1.3	Fermentation	59
5.2	Löslichkeitsstudien	60
5.3	Aufschluß und Proteinreinigung	61
5.3.1	Zellaufschluß.....	61
5.3.2	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	61
5.3.3	Gelfiltration.....	62
5.3.4	Anionenaustauschchromatographie.....	62
5.3.5	Konzentrierung	62
5.3.6	Lagerung.....	62
6	ANALYTISCHE METHODEN	63
6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	63
6.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	63
6.3	Western <i>blotting</i>.....	65
6.4	Analyse der Peptidfragmente von His₆-N-hCPT2 und Varianten.....	66
6.5	Lichtstreuung	67
6.5.1	Dynamische und statische Lichtstreuexperimente.....	69
6.6	Circulardichroismus.....	71
6.6.1	Fern-UV-CD	74
6.6.2	Thermische Denaturierung	74
6.6.3	Chemische Denaturierung	75
6.7	Struktur-<i>alignment</i>.....	76
6.8	Kinetische Messungen	77
6.8.1	Photometrischer Aktivitätstest mittels Ellman's Reagens.....	77
6.8.1.1	Aktivitätstest - Durchführung und Auswertung	78
6.8.1.2	Berechnung der relativen und absoluten Fehler	80
6.8.1.3	Langzeitstabilitätsuntersuchung.....	81
6.8.1.4	Inhibitorstudien	84
6.9	<i>MicroArray</i> aus humaner RNA.....	85
6.10	<i>Real time</i> -PCR-Analyse	85
6.10.1	Reverse Transkription	85
6.10.2	Quantitative PCR	85

7	ERGEBNISSE & DISKUSSION	88
7.1	Molekularbiologische Arbeiten	88
7.1.1	<i>Pichia pastoris</i> -Expressionssystem	88
7.1.1.1	Klonierung in pPICZ B und Transformation des Konstrukts in TOP10F'	88
7.1.1.2	Mutagenesen	89
7.1.1.3	Transformation und Phänotypisierung	91
7.1.1.4	Nachweis der Integration in das Hefegenom	91
7.1.1.5	Southern <i>blotting</i>	93
7.1.1.6	Testexpression	94
7.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Expressionssystem	96
7.2	Proteinchemische Arbeiten	98
7.2.1	Minirexpression in <i>E. coli</i> BL21 Gold DE3	98
7.2.2	Löslichkeitsstudien	99
7.2.3	Fermentation	101
7.2.4	Aufschluss und Reinigung der löslichen His ₆ -N-hCPT2-Fraktion	102
7.3	Proteinbiochemische Charakterisierung der hCPT2	104
7.3.1	Massenspektrometrische Analyse der Peptidfragmente	104
7.3.2	Fern-UV-CD-Spektroskopie	105
7.3.3	Streulichtmessungen	106
7.3.3.1	nOG-Mizellenbildung	106
7.3.3.2	Palmitoylcoenzym A-Mizellenbildung	107
7.3.3.3	Oligomerisierungszustand von His ₆ -N-hCPT2	108
7.3.4	Struktur- <i>alignment</i>	110
7.3.5	DTNB-Aktivitätstest	113
7.3.5.1	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter von L-Carnitin	114
7.3.5.2	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der	
	Fettsäurecoenzym A-Ester	116
7.3.5.3	Mechanismus der CPT2-Reaktion	124
7.3.5.4	Kinetische Stabilität	127
7.3.6	Denaturierungsstudien mittels Circular dichroismus	134
7.3.6.1	Chemische Denaturierung	135
7.3.6.2	Thermische Denaturierung	136
7.3.7	Inhibitorstudien	138
7.3.7.1	Malonylcoenzym A	138
7.3.7.2	L-Aminocarnitin	139
7.3.8	MicroArray & <i>real time</i> -PCR Analyse	142
8	ZUSAMMENFASSUNG	147
9	REFERENZEN	151
10	ANHANG	172

Abkürzungsverzeichnis

Gene & Proteine

ACBP	Acylcoenzym A- <i>binding</i> -Protein
ACC	Acetylcoenzym A-Carboxylase
ACS	Acylcoenzym A-Synthetase
AMD	Adenosinmonophosphat-Deaminase
CACT	Carnitin-Acylcarnitin-Translokase
CAT	Carnitin-Acetyltransferase
CD36	Fettsäuretransporter CD36
COT	Carnitin-Oktanoyltransferase
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
CPT1	Carnitin-Palmitoyltransferase 1
CPT1-C	Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 aus Gehirn
CPT1-L	Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 aus Leber
CPT1-M	Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 aus Muskel
CPT2	Carnitin-Palmitoyltransferase 2
<i>cpt2</i>	Gen der Carnitin-Palmitoyltransferase 2
CS	Citratsynthase
FABP	<i>fatty acid binding</i> -Protein
FATP	<i>fatty acid</i> -Transporter
G3PAT	Glyzerin-3-phosphat-Acyltransferase
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
hCPT1	humane CPT1
hCPT2	humane CPT2
His ₆ -N-hCPT2	reife humane Carnitin-Palmitoyltransferase 2 mit N-terminalem Hexa-Histidin- <i>tag</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
LCHACD	<i>long-chain</i> -3-Hydroxy-acylcoenzym A-Dehydrogenase
MCACD	<i>medium-chain</i> -Acylcoenzym A -Dehydrogenase
OCTN2	Natrium-abhängiger organischer Kationtransporter 2
PDK4	Pyruvatdehydrogenase-Kinase Isoenzym 4
PGC	PPAR-Koaktivator
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor
PPRE	Peroxisomen-Proliferator- <i>response</i> -Element
rCPT1-L	Isoenzym des Lebertyps der CPT1 aus <i>Rattus norvegicus</i>
rCPT2	CPT2 aus <i>Rattus norvegicus</i>
RXR	<i>cis</i> -9-Retinsäure X-Rezeptor
SCACD	<i>short-chain</i> -Acylcoenzym A -Dehydrogenase
TV	<i>triple</i> -Variante der His ₆ -N-hCPT2 (S113L, V368I, M647V)
VLCACD	<i>very-long-chain</i> -Acylcoenzym A -Dehydrogenase
WT	Wildtyp der His ₆ -N-hCPT2

Substrate & Chemikalien

5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
AcCoA	Acylcoenzym A
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
CA	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
CoA-Ester	Coenzym A-Ester
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCCP	Carbonylcyanid- <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazon
FSCoA	Fettsäurecoenzym A
Gua	Guanidinhydrochlorid
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
L-AC	L-Aminocarnitin
LCACoA	langkettige Fettsäurecoenzym A-Moleküle
LCFA	langkettige Fettsäuren
MalCoA	Malonylcoenzym A
MCFA	mediumkettige Fettsäuren
nOG	n-Oktyl- β -D-glukopyranosid
PCoA	Palmitoylcoenzym A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	Retinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin hydrochlorid
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Zeo	Zeocin

Medien & Puffer

LB	Luria-Bertani
LS-LB	<i>low salt</i> -Luria Bertani
MD	Minimal-Dextrose-Medium
MDH	Minimal-Dextrose-Histidin-Medium
MGYH	Glyzerin-YNB-Histidin-Biotin-Medium
MM	Minimal-Methanol-Medium
MMH	Minimal-Methanol-Histidin-Medium
SCED	genomische-DNA-Isolationspuffer
SSC	Southern <i>blotting</i> -DNA-Transfer-Puffer
TAE	Elektrophorese-Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TBT	Western <i>blotting</i> -Inkubationspuffer
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast peptone dextrane</i>
YPDS	<i>yeast peptone dextrane sorbitol</i>

Einheiten

bp	Basenpaar
Da	Dalton
h	Stunde
kDa	Kilodalton
min	Minute
rpm	<i>rounds per minute</i>

griechische Symbole

α	α -Helix
Δ	Delta, Angabe von Differenzen
ε	Extinktionskoeffizient einer Substanz
λ	Wellenlänge
η	Viskosität
Θ	Elliptizität
$[\Theta]_{\text{MRW}}$	<i>mean residue weight</i> -Elliptizität

Weitere Abkürzungen

$A_{260/280}$	Verhältnis der Extinktionen der Wellenlänge 260 nm zu 280 nm
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
cmc	kritische mizellare Konzentration
Ct-Wert	<i>cycle threshold number</i>
$D_{1/2}$	Denaturationskonzentration am Transitionsmittelpunkt
del	Deletion
ΔG_D^*	freie Aktivierungsenthalpie der Entfaltung eines Proteins
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES-Komplex	Enzym-Substrat-Komplex
fs	<i>frameshift</i>
grad	Grad
His ₆	hexa-Histidin
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Weg
IB	<i>inclusion bodies</i>
IR	Infrarot
IVS	<i>intervening sequence</i>
k_{kat}	Katalysekonstante
k_{kat}/K_M	katalytische Effizienz
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KW	Kohlenwasserstoff
M	Marker
MCS	<i>multi cloning site</i>
MRW	<i>mean residue weight</i> , mittleres Molekulargewicht
Mt	Mitochondrium
M_W	Molekulargewicht

MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NTK	Negativkontrolle der Reversen-Transkriptase-Reaktion ohne Total-RNA
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
O-Ester	Oxyester
ORF	<i>open reading frame</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
RIN	<i>RNA-integrity-number</i>
RMS	<i>root mean square</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RTK	Negativkontrolle der Reversen-Transkriptase-Reaktion ohne Reverse-Transkriptase-Enzymmix
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S-Ester	Thioester
SHH	<i>sonic hedgehog</i> -Protein
S _{opt}	optimale Substratkonzentration
Spez. Akt.	Spezifische Aktivität
TCA	Zitronensäurezyklus
T _m	Übergangstemperatur
UV-Vis	Ultraviolett-Visuell
v	Umsatzgeschwindigkeit
v/S	Umsatzgeschwindigkeit/Substrat-Charakteristik
z.B.	zum Beispiel

Anmerkung zur Terminologie

Für Aminosäuren und Nukleinsäuren wurde der jeweils in der biochemischen Fachliteratur übliche Einbuchstabencode verwendet. Expression wird auch als Synonym für die Proteinproduktion verwendet. Alle *Anglizismen* sind in kursiv gedruckt.

1 Einleitung

Der menschliche Körper besitzt etwa 650 Muskeln, welche nach ihrer histologischen Struktur in glatte und quergestreifte Muskulatur [Skelett-, Herzmuskulatur] differenziert werden. Die quergestreifte Muskulatur ist das größte parenchymatöse Organ des Menschen und besitzt bei einem Erwachsenen eine Masse von 40-45% des gesamten Körpergewichts. Die primäre Aufgabe der Skelettmuskulatur ist das Erzeugen von Bewegung. Außerdem wird diese auch zum Stabilisieren von Gelenken, zum Halten von Lasten oder zum Bremsen genutzt [Pongratz & Zierz, 2003].

Muskelerkrankungen stellen im Vergleich zu anderen relativ seltene Erkrankungen dar. Erste Hinweise auf eine Muskelkrankheit gehen bis in die Zeit von 2800-2500 vor Christus zurück [Pongratz & Zierz, 2003]. Bis zur heutigen Zeit sind etwa 300 verschiedene Muskelkrankungen beschrieben worden. Mit einer Prävalenz von 6 Personen auf 100000 Einwohner ist die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne die häufigste Form der Muskeldystrophien. Myopathien bedingen einerseits strukturelle Änderungen der mikroskopischen Anatomie der Muskelfaser und andererseits besitzen diese einen metabolischen Ursprung.

Die metabolischen Myopathien sind in primäre und sekundäre Subkategorien zu unterscheiden. Während primäre metabolische Myopathien Erkrankungen des Skelettmuskels darstellen und auf Mutationen in Genen von Proteinen des aeroben bzw. anaeroben Energiestoffwechsels basieren, sind sekundäre metabolische Myopathien extramuskuläre metabolische Erkrankungen [Elektrolytstörung] mit muskulärer Beteiligung. Die primären metabolischen Myopathien werden in 4 Erkrankungsgruppen, den Glykogenspeicherkrankungen, Lipidmyopathien, mitochondrialen Myopathien und verschiedenen Einzelkrankungen [z. B. Myoadenylat-Deaminase-Mangel] klassifiziert [Pongratz & Zierz, 2003]. Die hereditären Fettstoffwechselstörungen sind durch molekulare Fehlfunktionen der oxidativen Verstoffwechselung gekennzeichnet. Das Resultat ist eine insuffiziente Energiebereitstellung im Organismus.

Im Fokus der Energiegewinnung steht das energiereiche Molekül ATP, welches in den Mitochondrien produziert wird. Mitochondrien spielen daher eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellfunktionen und Integrität. Dieser Prozess der ATP-Produktion ist unter regulären Bedingungen an die zelluläre Energieanforderung angepasst. Die Balance zwischen cytosolischem ATP-Verbrauch und mitochondrialer Generierung ist vielfach enzymatisch und metabolisch reguliert, z.B. durch Adenin-Nukleotid-Transporter, Adenylatkinase, Pyruvat und langkettige Fettsäuren. Im Zusammenhang mit dieser metabolischen Regulation exponieren die Kompartimente Cytosol und Matrix verschiedene Metabolitenkonzentrationen, Proteine und Redoxstatus aufgrund der Impermeabilität der inneren Mitochondrienmembran hinsichtlich diverser Substanzen.

Spezifische Stoffwechselkonstellationen, wie Nahrungskarenz bzw. Ausdauerbelastung, bedingen ein simultanes Einsparen von Glukose bei gleichzeitig hohem Energiebedarf, um das Gehirn und die Erythrozyten mit ausreichenden Mengen Glukose versorgen zu können. Diese Forderung wird durch den Katabolismus von Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge mittels β -Oxidation in den Mitochondrien verwirklicht und ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase. Da langkettige Fettsäuren im Gegensatz zu mittel- und kurzkettigen Fettsäuren nicht die mitochondriale innere Membran durch Diffusion passieren

können, ist deren Aktivierung durch eine langkettige AcylCoA-Synthetase [ACS] an der äußeren Mitochondrienmembran notwendig. Infolgedessen wird der intrazelluläre Transport von Fettsäuren in die mitochondriale Matrix durch ein CPT-Transport-System fortgeführt, um den Fettsäuren den Zugang zu den mitochondrialen Enzymen der β -Oxidation zu ermöglichen.

1.1 Der Modus des Fettsäuretransports und partizipierende Komponenten

Die Entdeckung des L-Carnitins [Gulewitsch *et al.*, Kutscher *et al.*, 1905] und dessen Aufklärung der chemischen Struktur [Tomita *et al.*, 1927] ebneten den Weg zur Erforschung des Modus des aktiven Fettsäuretransports, allen voran des Carnitin-Palmitoyltransferasesystems [CPT-Systems]. Erste Hypothesen in Bezug auf die Existenz eines Transferasesystems wurden von Friedman *et al.* und Fritz *et al.* (1955) formuliert, wobei einerseits eine durch L-Carnitin gesteigerte Fettsäureoxidation und andererseits auch die durch Carnitin-Acetyltransferase [CAT] katalysierte Übertragung von aktivierten Fettsäuremolekülen von Coenzym A [CoA] auf L-Carnitin bestätigt wurde. Erst 1963 wurde von Bremer *et al.* ein Transferasesystem mit 2 integrierten Enzymen postuliert. Die Carnitin-Palmitoyltransferaseaktivität wurde zumeist in den Mitochondrien lokalisiert [Norum *et al.*, 1966; Yates *et al.*, 1966; Norum *et al.*, 1967; Haddock *et al.*, 1970] und dem Transport aktivierter Acylgruppen durch die für langkettige Fettsäuren [C14-C18] und CoA-Moleküle impermeable innere Mitochondrienmembran zugeordnet. Das Transferasesystem besitzt eine Substratkettenspezifität hinsichtlich langkettiger Fettsäuren, während kurzkettige Fettsäuren [C2-C6] von der CAT präferiert werden [Norum *et al.*, 1964]. Sehr langkettige, einfach ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren [$>C20$] stellen schlechtere Substrate für die Fettsäureaktivierung und Oxidation dar [Christophersen *et al.*, 1975]. Die Bildung dieser CoA-Ester verläuft sehr verzögert. Um deren Oxidation zu gewährleisten, kommen Kettenverkürzungsmechanismen zur Anwendung. Sehr langkettige Fettsäurespezies werden daher in die Peroxisomen transportiert und dort einer partiellen β -Oxidation zu mittellangen Fettsäure-CoAs [FSCoA, C8-C12] und Acetyl-CoA unterzogen. Mit Hilfe von CAT und Carnitin-Oktanoyltransferase [COT] werden die Stoffwechselprodukte aus den Peroxisomen befördert und durch das CPT-System in die Mitochondrien zur finalen vollständigen β -Oxidation transportiert. Die Anwendung von Clofibrat, einem Lipidsenker, induziert die Proliferation von Peroxisomen und stimuliert die peroxisomale β -Oxidation [Osmundsen *et al.*, 1979].

1.1.1 Regulation des Fettstoffwechsels

Die CPT-Aktivität kann durch Zustände wie diätetisches Fasten, hormonelle Modifikation oder Erkrankungen wie *Diabetes mellitus* stimuliert werden, wobei die Steigerung der Aktivität nicht auf eine *de novo*-Synthese, sondern auf eine Regulierung zurückzuführen ist [Norum *et al.*, 1965a]. Die Regulation des Fettsäurestoffwechsels ist als Übersicht in Abb. 1.1 dargestellt. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Aktivität der Acetylcoenzym A-Carboxylase [ACC] und dessen Katalyseprodukt Malonylcoenzym A [MalCoA], das erste Intermediat der Fettsäurebiosynthese. Die Hormone Insulin und Glukagon regulieren die Aktivität der ACC und beeinflussen somit den Gehalt an MalCoA in der Zelle. Insulin stimuliert die Synthese von Triglyzeriden über die Aktivierung des Enzyms Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase [G3PAT] und hemmt die Fettsäureoxidation durch den hohen *level* an MalCoA und der damit verbundenen Inhibierung der CPT1. Glukagon hingegen hemmt die Synthese von MalCoA durch Inhibierung der ACC. Der Gehalt an MalCoA in der Zelle sinkt, wobei die Aktivität der CPT1 gesteigert wird. Die β -Oxidation wird somit stimuliert. Metabolite aus anderen Stoffwechselwegen, wie Citrat und Palmitoylcoenzym A, dienen als *feed back*-Inhibitoren der ACC.

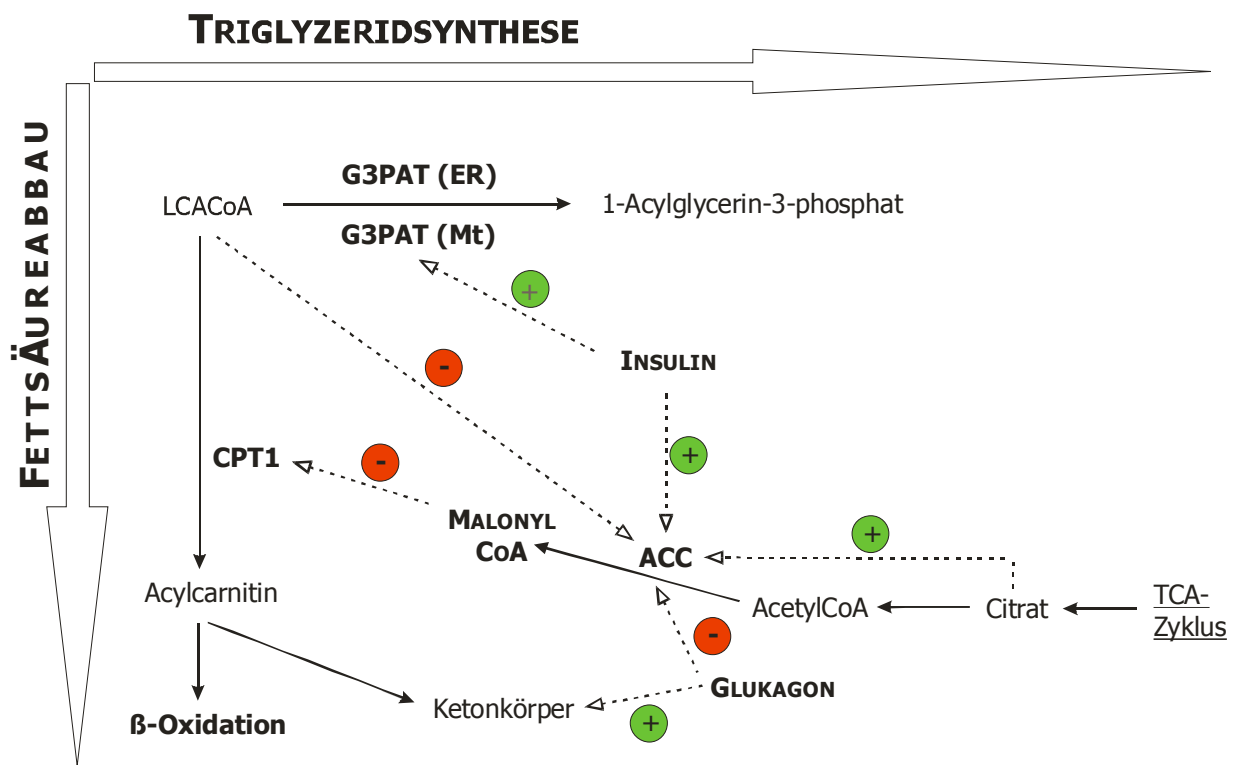


Abb. 1.1 Modifizierte Abbildung nach Zammit *et al.* (2010). Regulationsmechanismen der Fettsäurebiosynthese und des Fettsäureabbaus in der Leber. Der Einfluss der Hormone Insulin und Glukagon auf den Gehalt von MalCoA durch die Aktivität der Acetylcoenzym A-Carboxylase [ACC], sowie auf die mitochondriale Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase [G3PAT (mt)] und die β -Oxidation sind dargestellt. Die Metabolite Citrat und langkettige Fettsäurecoenzym A-Moleküle [LCACoA], wie Palmitoylcoenzym A, stellen *feed back*-Inhibitoren der ACC dar. Grün: aktivierender Effekt; Rot: inhibierender Effekt.

1.1.2 Komponenten des Carnitin-Palmitoyltransferase-Systems

Die Zusammensetzung des Transferasesystems wurde lange kontrovers diskutiert und intensiv erforscht. Die initiale Fragestellung, ob es sich bei der CPT um ein einzelnes Protein [Bremer *et al.*, 1967; Haddock *et al.*, 1970; Bergstrom *et al.*, 1980; Clarke *et al.*, 1981a; Miyazawa *et al.*, 1983] oder zwei verschiedene Enzyme handelt [Bremer *et al.*, 1963; Kopec *et al.*, 1973; Zierz *et al.*, 1987; Ramsay *et al.*, 1987; Woeltje *et al.*, 1987] wurde eingehend untersucht. Es wurde weiterhin diskutiert, ob das eine Protein ein transformiertes Produkt des anderen Proteins darstellt [Kopec *et al.*, 1973; Clarke *et al.*, 1981a] beziehungsweise ob das gleiche Enzym durch unterschiedliche Lokalisation in der Membran oder in der Matrix heterogene Reaktions- bzw. Regulationscharakteristika in Bezug auf den Einfluss der exponierten Substrate bzw. Regulatoren zeigt.

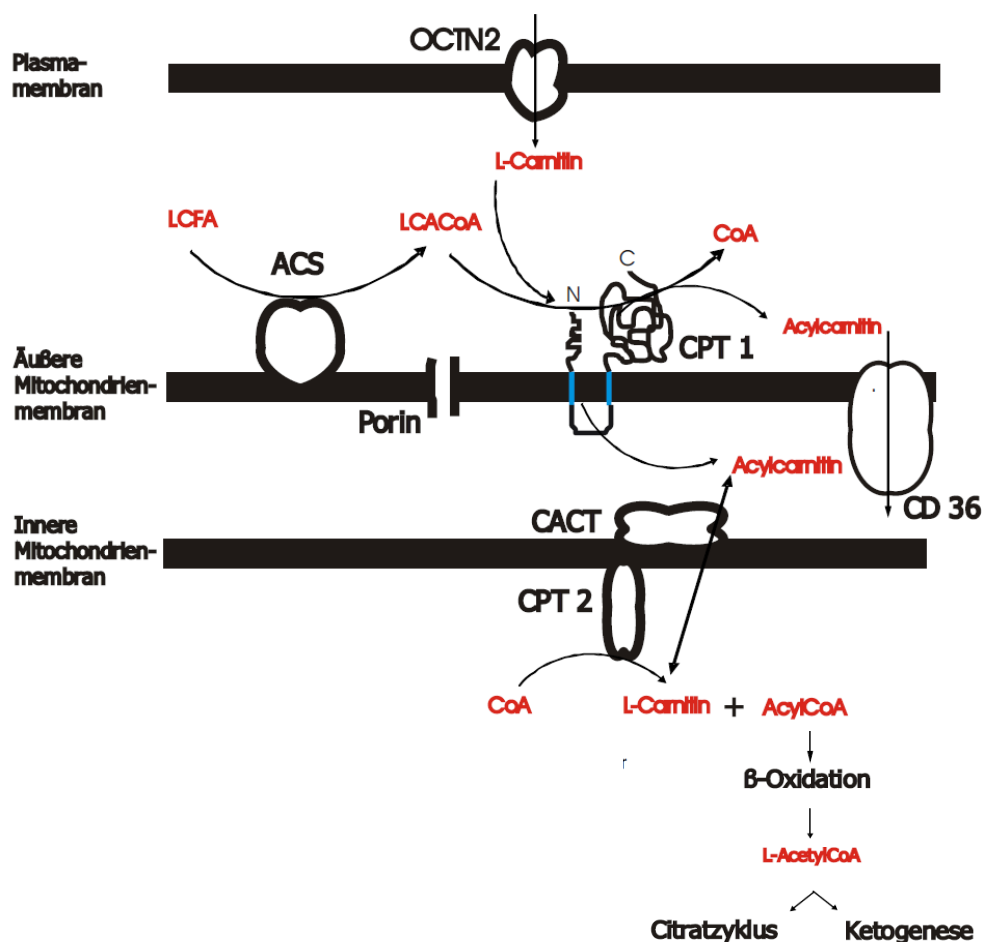


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der am Fettsäuretransport beteiligten Proteinkomponenten. L-Carnitin wird aktiv durch den Natrium-abhängigen organischen Carnitintransporter 2 [OCTN2] über die Plasmamembran in das Cytosol transportiert. Die freien langkettigen Fettsäuren [LCFA] werden an der an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Acylcoenzym A-Synthetase [ACS] zu langkettigen Acylcoenzym A-Molekülen [LCACoA] aktiviert. Die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 an der äußeren Mitochondrienmembran überträgt eine langkettige Fettsäure-Einheit von Coenzym A auf L-Carnitin. Dieses Produkt wird mittels Carnitin-Acylcarnitin-Translokase [CACT], lokalisiert an der inneren Mitochondrienmembran, durch die Mitochondrienmembran transportiert. Postulierte Transporter der Fettsäurederivate sind Porin [Steiber *et al.*, 2004; Faye *et al.*, 2007] und der Fettsäuretransporter CD36 [Coburn *et al.*, 2001, Bezaire *et al.*, 2006, Schwenk *et al.*, 2010]. Die Acylcarnitine werden in der mitochondrialen Matrix durch die an der inneren Mitochondrienmembran assoziierte Carnitin-Palmitoyltransferase 2 [CPT2] in AcCoAs und L-Carnitin rückverwandelt und mittels β -Oxidation schließlich abgebaut. Die einzelnen Bestandteile der Kaskade werden in den Kapiteln 1.1.4-1.1.7 näher erläutert.

Nach der heutigen Vorstellung besteht das Transportsystem aus drei different submitochondrial lokalisierten Proteinen, welche in einer sequentiellen Reaktionsabfolge kooperieren [siehe Abb. 1.2].

Beiträge zur präzisen Typisierung der integrierten Enzyme des CPT-Systems und dessen Lokalisation wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen [Pande *et al.*, 1975; Ramsay *et al.*, 1975,1976; Murthy *et al.*, 1987a) geleistet. 1975/1976 identifizierten die Arbeitsgruppen um Pande und Ramsay die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase [CACT] als ein Mitglied des Transportsystems, infolgedessen das vorgeschlagene Schema von Fritz & Yue (1963) erneuert wurde. CPT1, ein Detergens-labiles, MalCoA-sensitives Protein, ist als integrales Membranprotein in der äußeren Mitochondrienmembran organisiert und distinkt von der CPT2, einem Detergens-stabilen, MalCoA-insensitivem Protein der mitochondrialen Matrix [Murthy *et al.*, 1987a] zu unterscheiden. Ein zusätzliches Protein, der Natrium-abhängige Carnitintransporter OCTN2 (SLC22A5) in der Plasmamembran, ist für die aktive Aufnahme von L-Carnitin zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Carnitin-*levels* in die Zellen notwendig. Die einzelnen Bestandteile werden in den Folgekapiteln näher betrachtet.

1.1.3 Funktion des Carnitin-Palmitoyltransferase-Systems

In einem ersten Schritt werden die cytosolisch aktivierten, langkettigen Fettsäuren in einer durch CPT1 katalysierten Transesterifikationsreaktion von CoA auf L-Carnitin übertragen. Das Katalyseprodukt wird durch die Aktivität der integralen CACT in der inneren Mitochondrienmembran in einer Substitutionsreaktion in die mitochondriale Matrix translokalisiert. Dort werden die L-Acylcarnitine in einer zweiten Reaktion durch enzymatische Unterstützung der matrixassoziierten CPT2 in die betreffenden Acylcoenzym A-Moleküle rücktransformiert. Die aktive Beteiligung der Proteine Porin [Steiber *et al.*, 2004; Faye *et al.*, 2007] und CD36 [Coburn *et al.*, 2001; Bezaire *et al.*, 2006; Schwenk *et al.*, 2010] an dem Transport von Fettsäuren durch die äußere bzw. innere Mitochondrienmembran wurde postuliert. Das transmembrane Glykoprotein CD36, ein Multiliganden-bindender Rezeptor, ist in den Transport langkettiger Fettsäuren und infolgedessen an deren Oxidation in den Mitochondrien des Skelettmuskels involviert und besitzt eine regulatorische Funktion.

1.1.4 Carnitin-Palmitoyltransferase 1

CPT1 katalysiert spezifisch den ersten Schritt der mitochondrialen langkettigen Fettsäureoxidation.

Lokalisation

Die Lokalisation des Enzyms CPT1 wird seit dem Postulat der Existenz von zwei Carnitin-Palmitoyltransferasen durch Fritz *et al.* (1963) kontrovers diskutiert. Nach Ablösung der äußeren Mitochondrienmembran mittels Digitonin wurde die Lokalisation der CPT1 und CPT2 an der inneren Mitochondrienmembran von Bergstrom *et al.* (1980) postuliert. Sie spezifizierten außerdem CPT1 und CPT2 aufgrund der identischen enzymkinetischen Parameter als ein Protein, obwohl die CPT1 durch die Behandlung mit Digitonin bereits separiert wurde. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen [Bremer *et al.*, 1967; Norum *et al.*, 1967; Yates *et al.*, 1970; Brosnan *et al.*, 1973; Kopec *et al.*, 1973; McGarry *et al.*, 1978a; Bergstrom *et al.*, 1980; McGarry *et al.*, 1983; Fiol *et al.*, 1984; Woldegiorgis *et al.*, 1985; Wolf *et al.*, 1985; Lund *et al.*, 1987; Cook *et al.*, 1987; Declercq *et al.*, 1987; Woeltje *et al.*, 1987] postulierten die Lokalisation der CPT1 an der inneren Mitochondrienmembran und dem Intermembranraum zugewandt. Auch wenn die Arbeitsgruppen um Fritz *et al.* (1963) und Bremer *et al.* (1963) schon die Vermutung der äußeren Membranständigkeit der CPT1 äußerten, konnte die finale Lokalisation an der äußeren Mitochondrienmembran erst 1987 von Murthy *et al.* (1987a) mittels Subfraktionierung von Lebermitochondrien aus Ratte nachgewiesen werden. Auch die Löslichkeit des Proteins durch Detergenzien und dessen Sensitivität hinsichtlich MalCoA wurden debattiert.

Genidentifikation der CPT1-Isoenzyme Leber [L], Muskel [M] und Gehirn [C]

Das Gen der CPT1-L aus Ratte wurde 1993 von Esser *et al.* kloniert und mittels Sequenzierung identifiziert. Das in COS-Zellen exprimierte Polypeptid bestand aus 773 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 88150 Da. Der humane Konterpart wurde von Britton *et al.* (1995) isoliert und auf Chromosom 11q13.1-q13.5 lokalisiert [Britton *et al.*, 1997]. Das Gen der CPT1-L wird vorwiegend in Leber, Niere, Lunge, Darm, Pankreas, Milz und zu geringen Anteilen im Herz exprimiert [McGarry *et al.*, 1997].

Das Gen des Muskeltyps wurde 1995 von Yamazaki *et al.* identifiziert. Durch das *screening* einer Herz-cDNA-Bibliothek konnte im Folgejahr das humane Pendant isoliert werden [Yamazaki *et al.*, 1996]. 1997 erfolgte die Zuordnung des Gens auf Chromosom 22q13.31-q13.32 von Britton *et al.* Das translatierte Produkt hat eine Proteingröße von 772 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 88 kDa. Das Isoenzym dominiert im Skelettmuskel, Herzmuskel, Fettgewebe und Hoden [Esser *et al.*, 1996].

In den Folgejahren wurden beide Isoenzyme in verschiedenen Systemen [COS-Zellen, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*] hergestellt [Brown *et al.*, 1994b; Zhu *et al.*, 1997a; Shi *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2000].

Price *et al.* isolierten 2002 eine weitere CPT1-Isoform, die hauptsächlich im Gehirn lokalisiert ist. Das Gen wurde auf Chromosom 19q13.33 identifiziert. Das Protein zeigt keine katalytische Aktivität, manifestiert jedoch eine MalCoA-Hemmung. Die CPT1-C ist spezialisiert auf Fettsäuren involviert in die Funktion des Gehirns.

CPT 1-Isoenzym-Isolation und Bestimmung der Molekulargewichte

1990 wurde von Murthy *et al.* CPT1 aus *Rattus norvegicus* mittels n-Oktyl- β -D-glukopyranosid [nOG] solubilisiert und anschließend nach Fraktionierung mittels Asolektin rekonstituiert. Dabei wurden unterschiedliche Molekulargewichte für die CPT1 aus Rattenleber bzw. Muskel bestimmt [CPT1-M = 86 kDa, CPT1-L = 90 kDa].

Proteinstruktur, Substratbindestellen & Oligomerisierungszustand der CPT 1

Faye *et al.* (2007) identifizierten den Oligomerisierungszustand als Homotrimer, wobei der N-Terminus des Enzyms die Trimerisierung *triggert* [Faye *et al.*, 2007].

Die Primärsequenz der CPT1-M besitzt eine Identität von 25 % zur humanen CPT2 [*alignment* Carnitin-O-acyltransferasen im Anhang, Abb. 10.1]. CPT1-M enthält zwei große hydrophobe Domänen, die die Bereiche der Aminosäuren 53-75 [α 1] und 103-122 [α 2] betreffen. Wie aus dem *alignment* der Carnitin-O-acyltransferasen in Abb. 10.1. im Anhang ersichtlich, ist diese circa 170 Aminosäuren umfassende Region nur in der Sequenz der muskulären hCPT1 existent und zeigt keine signifikante Ähnlichkeit mit der hCPT2. Diese hydrophobe Domäne bedingt die integrale Lokalisation des Enzyms in der äußeren Mitochondrienmembran und ist für die ausgedehnte Aminosäuresequenz im Vergleich zu den anderen Transferasen relevant. α 1 fungiert als Stopp-Transfer-Signal und durchspannt die Membran. Der N-Terminus nahe der α 1 trägt fünf vollständig konservierte positiv geladene Aminosäurereste [K40, K41, R42, R45, K47]. Diese Ladungsverteilung ist signifikant für Proteine, deren N-Terminus in das Cytosol exponiert ist. CPT1 besitzt eine N-terminale (regulatorische) und eine C-terminale (katalytische) Domäne, welche beide ins Cytosol ragen [Fraser *et al.*, 1997; Zammit *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1998]. Das Enzym aus *Rattus norvegicus* weist zwei mittels partieller Proteolyse identifizierte Bindestellen für den Regulator MalCoA und das Substrat PCoA auf [Kashfi *et al.*, 1994].

Das aktive Zentrum des Enzyms besitzt ein konserviertes Histidin 473 [Morillas *et al.*, 2001] [*alignment* im Anhang Abb. 10.1] sowie Tryptophan- und Arginin-Reste, welche Einfluss auf die Aktivität besitzen. Die Modifizierung der Histidinreste des Enzyms mit Diethylpyrocarbonat [DEPC] führte zu keinem Aktivitätsverlust, wobei dies durch eine verminderte Zugänglichkeit des Histidins verursacht werden kann [Dai *et al.*, 2000].

Malonylcoenzym A-Funktion

1978 wurde von McGarry *et al.* (1978a) die Rolle des MalCoA als erstes Intermediat der Fettsäurebiosynthese aufgeklärt. Der MalCoA-Gehalt fluktuiert parallel zur Aktivität des Fettsäurebiosynthesestoffwechselwegs und hemmt in physiologischen Konzentrationsbereichen die Oxidation langkettiger Fettsäuren. MalCoA inhibiert dabei die CPT1 und blockiert die Fettsäureoxidation.

Muskel- und Leberisoform prägen eine unterschiedliche MalCoA-Sensitivität aus [McGarry *et al.*, 1983; Zhu *et al.*, 1997a], wobei CPT1-M eine hundertfach stärkere Sensitivität zeigt als CPT1-L.

Eine Δ 82 N-terminale Variante der CPT1-L hat katalytische Funktion, jedoch eine verminderte Sensitivität bezüglich MalCoA. Die Variante Δ 31-148, bei der beide Transmembrandomänen abgespalten sind [verkürzte Variante], weist kein detektierbares Translationsprodukt auf [Brown *et al.*, 1994b]. Auf Basis der Arbeiten von Brown *et al.* führten Shi *et al.* (1998) mit CPT1-L und Swanson *et al.* (1998) und Shi *et al.* (2000) mit CPT1-M limitierte Proteolyseexperimente durch. Eine Verkürzung des Leberenzym um 18 Aminosäuren [Δ 18] resultiert in einer verminderten Substrat-Bindungsenergie von 2,3 kcal/mol. Die MalCoA-Bindung ist minimiert, während die katalytische Funktion nicht beeinflusst ist.

Weiterführende Studien dokumentierten die direkte Beteiligung der konservierten Aminosäuren E3 und H5 [*alignment* der Carnitin-O-acyltransferasen im Anhang Abb. 10.1] an der Bindung von MalCoA in der N-terminalen Domäne und sind folglich ursächlich für die Sensitivität verantwortlich [Shi *et al.*, 1999].

Die Studie der N-terminalen Sequenz der CPT1-M beweist die Bedeutung der ersten 28 Aminosäuren in Bezug auf die MalCoA-Bindung und -Sensitivität [Shi *et al.*, 2000].

Die Bildung von Chimären [Austausch der N-terminalen Domäne bei CPT1-L und -M] führte zu keinem Austausch der MalCoA-Sensitivität von CPT1-L und -M [Swanson *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2000]. Die unterschiedliche Sensitivität der Muskel- und Leberisoform resultiert nicht aufgrund der differierenden Membrantopologien, sondern durch die Tertiärstruktur des Proteins, welches auf die MalCoA induzierte Konformationsänderung reagiert [McGarry *et al.*, 1992]. Histidine sind vermutlich an der Interaktion mit MalCoA beteiligt, da mit sinkendem pH-Wert, infolgedessen die Histidine protoniert werden, die Aktivität in Bezug auf MalCoA steigt [Morillas *et al.*, 2002]. Die Hemmbarkeit durch MalCoA ist durch Phosphorylierung der Aminosäuren S747 und S741 modifizierbar und transformiert die Inhibierung von einem kompetitiven zugunsten eines unkompetitiven Hemmtyps [Kerner *et al.*, 2004].

Bindung von Malonylcoenzym A

Der Metabolit verursacht einen sigmoiden Kurvenverlauf der v/S-Charakteristik von CPT1 [Cook *et al.*, 1987]. Dies würde implizieren, dass potentiell mindestens 2 Bindestellen für MalCoA existieren und diese eine Kooperativität durch MalCoA induzieren. CPT1 benötigt zur Ausprägung der MalCoA-Sensitivität eine Membranassoziation. Daher wurde eine Dateninterpretation vieler Arbeitsgruppen erschwert. Fiol *et al.* (1984) negierten die MalCoA-Hemmbarkeit von CPT1, da diese das Isolationsprotokoll von Clarke *et al.* (1981b) anwandten, welche 6 % Triton X-100 für den Aufschluß einsetzten.

Solubilisierbarkeit mittels Detergenzien

Die CPT1 wurde anfangs als leicht solubilisierbar eingestuft [West *et al.*, 1971; Hoppel *et al.*, 1972; Bergstrom *et al.*, 1980; Ramsay *et al.*, 1987], da die Sachkenntnis im Hinblick auf den Einfluss von Detergenzien auf die Isolation der CPT1 fehlte. Triton X-100 und n-Oktyl- β -D-glukopyranosid [nOG] lösen das in der Matrix lokalisierte membranassoziierte Protein CPT2 in aktiver Form, verursachen jedoch einen vollständigen Verlust der CPT1-Aktivität. Das Detergens Tween-20 hingegen löst CPT2 aktiv aus der Membranverankerung, während CPT1 membranassoziiert und katalytisch funktional im Pellet verbleibt [Woeltje *et al.*, 1987]. Diese Detergenslabilität und das Ermitteln der Membranintegrität von CPT1 wurde auch von Lund *et al.* (1986, 1987); Declercq *et al.* (1987) und Murthy *et al.* (1987a) diskutiert.

Regulation

Die Regulation der CPT1 erfolgt auf mehreren Ebenen. Das transkriptionale Niveau wird durch Änderung des Glukagon/Insulin-Verhältnisses modifiziert [McGarry *et al.*, 1980; Park *et al.*, 1995], einhergehend mit erhöhtem Gehalt an nichtveresterten Fettsäuren und verminderter Verfügbarkeit von Glukose. Fettsäuren vermitteln eine transkriptionale Regulation durch Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor [PPAR], dessen funktionales Peroxisomen-Proliferator-*response*-Element [PPRE] in Promotor-Regionen zahlreicher Gene, codierend für Lipidmetabolismus-involvierte Enzyme, integriert sind [Latruffe *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1998]. Weitere Regulationsmechanismen stellen die MalCoA-abhängige Steuerung durch Änderung der MalCoA-Gewebekonzentration [McGarry *et al.*, 1978b; Alam *et al.*,

1998], die Variation der MalCoA-Sensitivität als ketogene Antwort der Leber während einer Hungerphase [Mynatt *et al.*, 1992] sowie die MalCoA-unabhängige Stimulation durch Phosphorylierung von Cytoskelettkomponenten durch Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II oder 5'-AMP abhängige Proteinkinase [Velasco *et al.*, 1997, 1998a,b] dar.

Der adulte Herzmuskel, dessen Energiewinnung zu 60-80 % über die β -Oxidation abläuft, durchläuft neonatal eine Entwicklung der Zusammensetzung der CPT1 [Saggerson *et al.*, 1982]. Die Konzentration von 25 % an CPT1-L sinkt in der neonatalen Entwicklungsphase aufgrund der Umstellung der Ernährung auf eine fettreiche, kohlenhydratarme Diät (Muttermilch) auf 2-3 % während 97-98 % CPT1-M prominent sind [Weis *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 2001].

Import

Die reife rCPT1-L behält die N-terminale *leader*-Sequenz nach Import in das Mitochondrium. Diese Sequenz mit vielen sauren Aminosäureresten ist inkompatibel als Matrix-Target-Signal, fungiert aber als Stopp-Transfer-Signal [Kolodziej *et al.*, 1993].

1.1.5 Carnitin-Palmitoyltransferase 2

Das mit der mitochondrialen Matrix assoziierte Enzym CPT2 des Carnitin-Transportsystems ist distinkt von der CPT1. Es ist ein Translationsprodukt eines einzigen Gens und ubiquitär vorkommend. Im Vergleich zur CPT1-M-Primärstruktur [*alignment* Abb. 10.1 im Anhang] zeigt es keine N-terminale MalCoA-Bindestelle und prägt aus diesem Grund keine MalCoA-Hemmbarkeit aus [Murthy *et al.*, 1987a; McGarry *et al.*, 1991; Ramsay *et al.*, 2001; Rufer *et al.*, 2006]. Die geringere Größe der CPT2 im Vergleich zur CPT1 begründet sich durch eine indisponierte N-terminale Region von etwa 170 Aminosäuren, welche bei CPT1 zwei in hohem Maße hydrophobe Domänen enthält, die Transmembransegmente darstellen [Cohen *et al.*, 1998] und der MalCoA-Bindung dienen [*alignment* Abb. 10.1 im Anhang]. Im Gegensatz zu der initialen Hypothese ist das Protein mittels Detergenzien leicht solubilisierbar [Woeltje *et al.*, 1987; Murthy *et al.*, 1987b].

CPT2 realisiert sowohl die enzymatische Hin- als auch die Rückreaktion mit favorisiertem Verlauf in Richtung β -Oxidation [Abb. 1.3]. Bei gleichen Bedingungen im Aktivitätstest zeigt die CPT2 eine 50-70fach stärkere Aktivität als die CPT1 und ist für den Fettsäuretransport in die Mitochondrien nicht limitierend [Johnson *et al.*, 1995]. Das Protein zeigt eine deutliche Alkylkettenlängenspezifität zu C14 bis C16 [Ramsay *et al.*, 1987]. Andere Arbeitsgruppen formulierten eine Spezifität zu C12-Alkylkettenlängen [Schäfer *et al.*, 1997; Violante *et al.*, 2010].

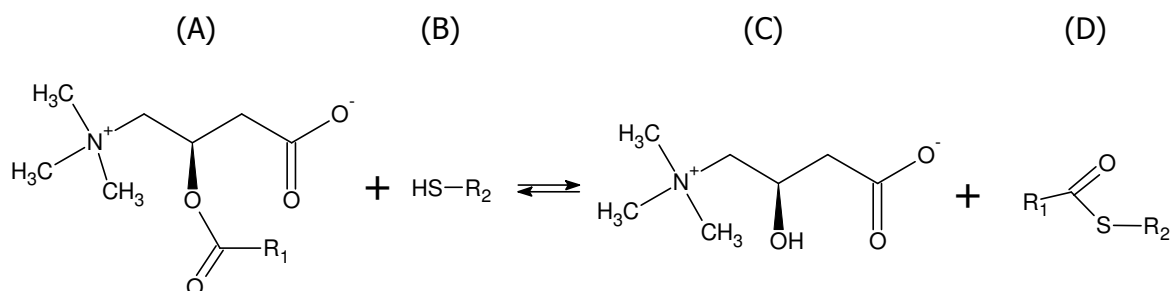


Abb. 1.3 Enzymatisch katalysierte Hin- und Rückreaktion der Carnitin-Palmitoyltransferase 2 mit favorisiertem Verlauf in Richtung β -Oxidation. Palmitoyl-L-Carnitin (A) reagiert mit der reaktiven Mercaptogruppe des Coenzym A (B) in einer Transesterifikationsreaktion zu Palmitoylcoenzym A (D) und regeneriertem L-Carnitin (C). R₁: Palmitoylrest, R₂: Coenzym A.

Die CPT2 katalysiert in der mitochondrialen Matrix die Regeneration von AcylCoA-Molekülen aus Acylcarnitin und matrixlokalisiertem CoA. Diese stellen eine wichtige Energiequelle für Herz- und Skelettmuskulatur während andauernder sportlicher Belastung und für die hepatische Ketogenese während des Langzeitfastens dar und werden direkt mittels β -Oxidation zu AcetylCoA-Einheiten abgebaut.

1.1.5.1 Chromosomale Lokalisation & Charakterisierung

Die Gene aus *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens* wurden von Woeltje *et al.* (1990b) und Finocchiaro *et al.* (1991) identifiziert. Das humane Gen wurde auf Chromosom 1p32 lokalisiert [Gellera *et al.*, 1994] und spannt circa 20 kb [Woeltje *et al.*, 1990b]. Es setzt sich aus fünf Exons zwischen 81 bp und 1305 bp zusammen und wird durch vier Introns mit einer Größe von 1500 bp bis 8000 bp separiert [Verderio *et al.*, 1995] [siehe Abb. 1.8]. Das ungewöhnlich lange Exon 4 mit 1305 bp codiert für mehr als die Hälfte der gesamten translatierten Sequenz des Gens [Verderio *et al.*, 1995].

Lediglich 0,5 % aller Exons in Wirbeltieren besitzen eine Länge von mehr als 550 bp, die durchschnittliche Länge beläuft sich auf 137 bp [Hawkins *et al.*, 1988]. Die humane *cpt2*-cDNA zeigt einen *open reading frame* [ORF] von 1974 bp.

1.1.5.2 Proteinstruktur

Das Gen der hCPT2 codiert für ein Protein von 658 Aminosäuren mit einem spaltbaren 25 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Matrix-Target-Signal [Finocchiaro *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1993]. Das Molekulargewicht des reifen Enzyms beträgt 70 kDa. Die Kristallstruktur der Ratten-CPT2 ist von Rufer *et al.* (2006) und Hsiao *et al.* (2006) gelöst [Abb. 1.4] und zeigt zur hCPT2 eine 83 %ige Sequenzidentität. Eine Kristallstruktur der humanen CPT2 bzw. eine Vorschrift zur Reinigung des humanen Enzyms ist derzeit nicht existent. Alle weiteren nachfolgenden Aussagen beruhen daher auf Ergebnissen non-humaner CPT2- oder humaner Zell-Lysat-Studien.

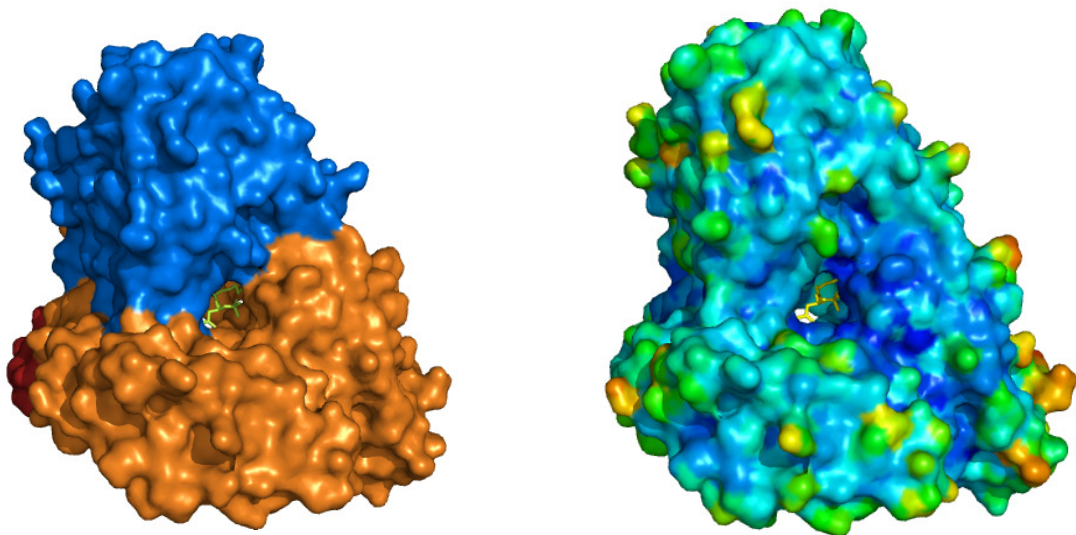


Abb. 1.4 Kristallstruktur der CPT2 aus *Rattus norvegicus* [2RCU; Rufer *et al.*, 2006]. Der Inhibitor ST1326 ist im aktiven Zentrum in Gelb dargestellt. **Links:** blau: N-Terminus [Aminosäuren 111-440], orange: C-Terminus [Aminosäuren 441-658 und 32-110], dunkelrot: Membrananker [Aminosäuren 179-208]. Das aktive Zentrum mit einem Y-förmigen Substratkanal ist in der Grenzfläche zwischen N- und C-Terminus lokalisiert. **Rechts:** Kristallstruktur der CPT2 aus *Rattus norvegicus* unter Anwendung der B-Faktoren zur Visualisierung der flexiblen Bereiche des Proteins [blau: starr; orange: stark variabel].

Der Oligomerisierungszustand des Enzyms aus verschiedenen Organismen unter nativen Bedingungen wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Durch die vielfach angewandten detergenshaltigen Reinigungsprozeduren wird die Ausbildung von Monomeren favorisiert

[Woeltje *et al.*, 1990a; Rufer *et al.*, 2006]. Andere Arbeitsgruppen beschreiben in detergensfreien Reinigungsprozeduren die Ausprägung von Tetrameren [Gellera *et al.*, 1994] oder höheren Oligomeren [Hsiao *et al.*, 2006; Rufer *et al.*, 2007].

Das Protein weist 27 α -Helices und 18 β -Faltblätter pro Monomer auf. Ein sechssträngiges zentrales antiparalleles β -Faltblattmotiv wird von α -Helices umgeben [*alignment* in Abb. 10.2 im Anhang]. Zwei dieser β -Faltblätter vermitteln den essentiellen Kontakt zwischen den Domänen. Das Protein untergliedert zwei Bereiche, eine N-terminale Domäne [Aminosäuren 111-440] und eine C-terminale Domäne [Aminosäuren 441-658 und 32-110]. CAT [Wu *et al.*, 2003, Hsiao *et al.*, 2004] und COT [Jogl *et al.*, 2005] zeigen einen identischen Aufbau. CPT2 präsentiert im Hydrophobizitätsplot eine Region, welche den Charakter der Membranverankerung aufweist [McGarry *et al.*, 1991]. Ein Transferase-exklusives 30 Aminosäuren langes *insert* [AS 179-208], adäquat der α -Helices 8 bis 10, ragt dabei über die N-terminale Domäne hinaus [*alignment* Abb. 10.1 im Anhang]. Im Gegensatz zur These von Wieser *et al.* (2003), welche eine Membranbindung durch die Aminosäuren 464 bis 479 postulierten, vermittelt die 30 Aminosäuren lange Insertion aufgrund ihrer amphipathischen Aminosäurereste die Membranassoziation [Rufer *et al.*, 2006]. Diese Helices sind in den Transferasen CAT und COT nicht vorhanden, aufgrund dessen liegen diese Proteine löslich vor.

1.1.5.3 Substratspezifität

Das Domäneninterface integriert das aktive Zentrum, welches die Struktur eines Y-förmigen Tunnels mimikriert. Dieser enthält drei Bindestellen, für L-Carnitin, CoA und die Acyl-Einheit. Die Bindestelle für Acylreste wird durch β -Faltblätter flankiert. Die Typisierung der Substratnutzung der verschiedenen Transferasen erfolgt durch eine Modifikation des Substrattunnels. Der Acyltunnel öffnet sich durch die Anordnung von kleinen Aminosäureresten [G600] hin zur Oberfläche. Dies schafft Raum für die Bindung des langkettigen Acyl-Substrats. In der CAT [M564] und COT [Q552] sind diese Aminosäurereste im Acylkanal sperriger, haben eine engere Anordnung der β -Faltblätter, da kein langer hydrophober Rest gebunden werden muss und der Kanal nicht zur Oberfläche hin geöffnet [*alignment* Abb. 10.1 im Anhang] ist. Während das Wildtyp-Enzym CAT an Position 564 ein Methionin und an Stelle 356 ein Aspartat besitzt, führt eine Einzelsubstitution von M564G zu einer Diskrimination der Substratspezifität zu mittelkettigen Fettsäureestern, während die Doppelmutation M564G/D356A die Substratspezifität zu langkettigen Fettsäureestern verschiebt [Cordente *et al.*, 2006]. Die Modifikation der COT-Aminosäure G553 zu G553M alterniert dessen Substratspezifität hin zu kurzkettigen AcylCoAs [Jogl *et al.*, 2005].

1.1.5.4 Das aktive Zentrum

Das hydrophile L-Carnitin ist in der CPT2 in ein starkes Wasserstoffbrückennetzwerk eingebunden. Die hochkonservierte katalytische Base H372 formt eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoffester des nativen Substrats [*alignment* Abb. 10.1 und Abb. 10.2; Abb. 1.5]. Allgemein ist Histidin in der Lage, mit Aspartat im aktiven Zentrum von Enzymen [Proteasen [Steitz *et al.*, 1982; Polgar *et al.*, 1992], Lipasen [Dugi *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 1990], Acetylcholinesterasen [Sussman *et al.*, 1991]] mit Beteiligung eines Serins als katalytische Triade zu fungieren.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung eines Histidins an der katalytischen Reaktion lieferten Brown *et al.* (1994a), welche nach Expression des nativen Proteins in *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* Modifikationsexperimente mittels DEPC unter Bildung von N-Carboethoxyhistidylderivaten durchführten. Die veränderten Proteine bildeten lediglich eine Restaktivität von 3 % im Vergleich zum nativen Enzym aus. Des Weiteren wurden ortsgerechte Mutagenesen der innerhalb der Gruppe der Carnitin-O-acyltransferasen stark konservierten Aspartatreste D353, D376 und D464 zu Alanin durchgeführt [Brown *et al.*, 1994a]. Die Enzymvarianten wiesen ausnahmslos keine Restaktivität auf. Die Variante D353A zeigte nur Spuren von immunoreaktivem Protein, da das Enzym misgefaltet vorliegt und umgehend abgebaut wird. Die drei Aspartate sind in der Umgebung des Histidins konserviert. Analoge Experimente führten Nic A Bhaird *et al.* (1998) und Woldegiorgis *et al.* (2000) durch und kamen zu übereinstimmenden Ergebnissen.

Die Arbeitsgruppe um Zheng *et al.* (2002) analysierte den Einfluss der konservierten Aminosäure E487 [alignment 10.1 im Anhang] auf die katalytische Aktivität des Enzyms mittels ortsgerechter Mutagenese. Die Varianten E487A, E487D und E487K manifestierten einen vollständigen Aktivitätsverlust. Das E487 ist in die Katalyse durch Orientierung des Imidazolrings des H372 für eine optimale Interaktion mit dem Substrat involviert. Durch Substitution dieser Säure können sowohl ein Wasserstoffbrückennetzwerk als auch Salzbrücken zu H372 zerstört werden. Bereits ein konservierter Austausch des Glutamats zu dem nur um eine Methylgruppe verkürzten Aspartat scheint die Carboxylatgruppe außerhalb der Wasserstoffbrückendistanz zu H372 zu bringen.

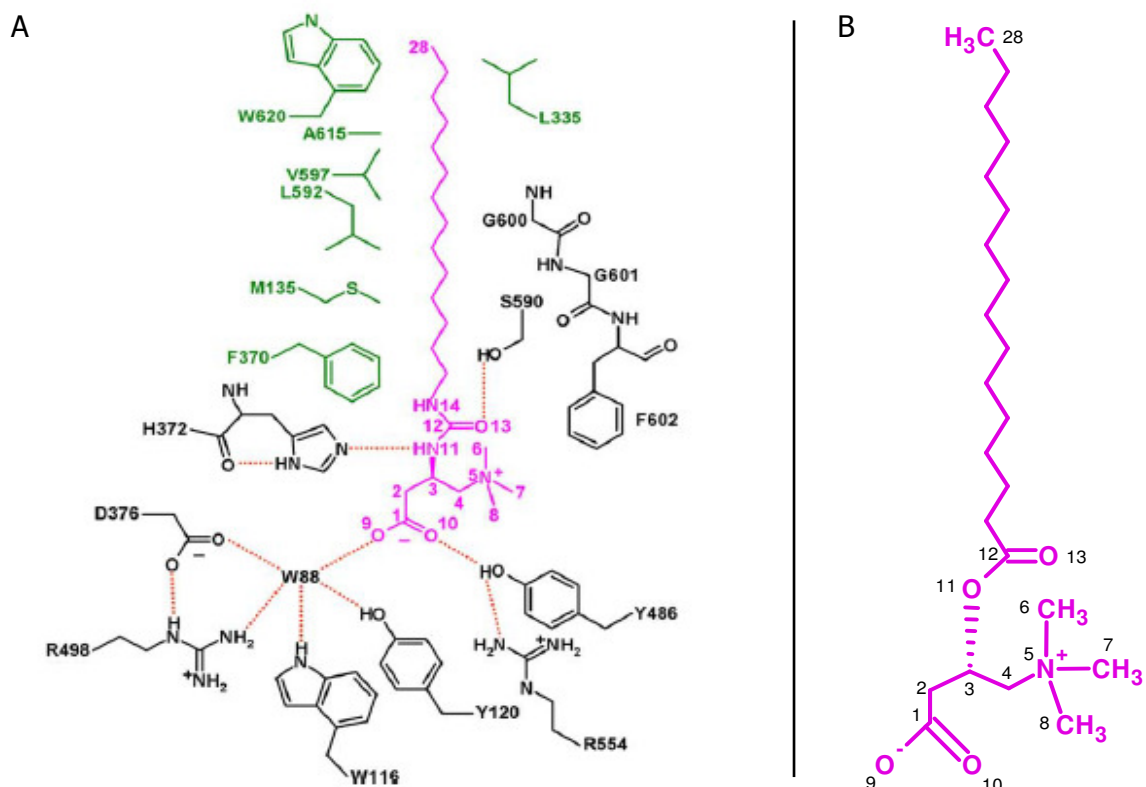


Abb. 1.5 **A:** Aktives Zentrum der rCPT2 mit dem gebundenen Inhibitor ST1326 aus Rufer *et al.* (2006). Die essentiellen Wechselwirkungen des ausgebildeten Wasserstoffbrückennetzwerks sind mittels gestrichelter Linien dargestellt. Pink: Inhibitor ST1326 [N-substituiertes Harnstoffderivat, welches nicht hydrolytisch gespalten werden kann], grün: flankierende Aminosäuren des hydrophoben Acylrestes des Inhibitors, schwarz: Aminosäuren involviert in die Ausbildung des Wasserstoffbrückennetzwerks. H372 und S590 sind in unmittelbarer Distanz zum gebundenen Inhibitor. **B:** Das natürliche Substrat Palmitoyl-L-carnitin unterscheidet sich in den Positionen 11 und 14 von dem Inhibitor ST1326 in (A).

Das Ser590, Teil eines hochkonservierten Serin-Threonin-Serin-*motifs* [*alignment* 10.2 im Anhang] ist ebenfalls in dieses Netzwerk über die Carbonylsauerstofffunktion einbezogen. Es positioniert das Substrat für die Katalyse [Abb. 1.5], könnte aber auch direkt im Sinne eines Ping-Pong-Mechanismus an der Ausbildung eines Acylenzym-Intermediats beteiligt sein. E487 und D464, Teile der Bindestelle des CoA, bilden einen negativ geladenen Bereich, welcher notwendig ist, um die Substrate zur Bindestelle zu dirigieren. Die Arbeitsgruppe um Cronin *et al.* (1997) untersuchte die Rolle des Serin-Threonin-Serin-*motifs*, welches in der Carnitin-Acyltransferase-Familie konserviert vorliegt. Die Spekulation, dass der Carnitin-O-acyltransferase-Reaktionsmechanismus die Formation von einem Serin-Acylintermediat favorisiert, wurde durch ortsgerichtete Mutagenesestudien in COT analysiert [Cronin *et al.*, 1997]. Diese zeigen keine katalytische Funktion der Serine, bestätigen aber eine essentielle Rolle in der Bindung von L-Carnitin und der Stabilisierung des Übergangszustands. Mechanistisch werden in der Literatur verschiedene Standpunkte vertreten. Während Chase *et al.* (1966) und Nic A Bhaird *et al.* (1993) die Formation eines Ternärkomplexes und einen *compulsory-ordered*-Mechanismus unterstützen, befürworten Brown *et al.* (1994a) den Einfluss einer katalytischen Triade, bei der die Hydroxylgruppe [C3] des L-Carnitins die archetypische Hydroxylgruppe des Serins ersetzt, um als Nukleophil Richtung AcylCoA-Substrat zu fungieren.

1.1.5.5 Regulation der hCPT2-Expression

Insulin steigert die mRNA-Menge und somit die Proteinbiosynthese. Die Enzymantwort der CPT2 entstammt nicht dem Proteinkinase C-Weg, da die Aktivität der CPT2 nicht durch Proteinkinase C inhibiert wird [Hudson *et al.*, 1995].

1.1.6 Carnitin-Acylcarnitin-Translokase

Die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase [CACT; SLC25A20] ist ein distinktes integrales mitochondriales Transportprotein. Das humane Gen auf Chromosom 3p21.31 [Viggiano *et al.*, 1997] wurde kloniert [Indiveri *et al.*, 1997; Huizing *et al.*, 1997] und resultiert in einem Protein mit 301 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 32,5 kDa. Es enthält sechs hydrophobe Transmembransegmente, welche durch fünf hydrophile *loops* miteinander verbunden sind. Zwei dieser Kontaktregionen sind cytosolisch exponiert, die anderen drei sind in den Matrixraum gerichtet [Tonazzi *et al.*, 2009]. Das Enzym wurde von Pande *et al.* (1975) entdeckt. Die experimentelle Analyse, ob es sich bei diesem Enzym um einen bereits bekannten Transporter oder ein neues Protein handelt, wurde von Pande *et al.* (1976) vorgenommen. Die Arbeitsgruppe wandte Inhibitoren bekannter mitochondrialer Transporter [Dicarboxylattransporter (Phenylsuccinat, Benzylmalonat), Tricarboxylattransporter (1,2,3-Tricarboxylat, 1,3,5-Pentan), α -Ketoglutarattransporter, Glutamatttransporter, Monocarboxylattransporter und Adeninnukleotidtransporter (Atractylosid)] an, um die Existenz eines prominenten Transporters auszuschließen. Die Aktivität ist unbeeinflusst von Kationen und benötigt keine Energie. Die Entkoppler 2,4-Dinitrophenol und Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon [FCCP], sowie Kaliumcyanid zeigten keinen Effekt. Mersalyl (O-(3-hydroxymercuri-2-methoxypropyl)-carbamylyphenoxyacetat) inhibiert die CACT kompetitiv.

Die Überwindung der inneren Membran für Acylcarnitine ist nur durch die CACT realisierbar [Abb. 1.2]. In Anwesenheit von Acylcarnitin katalysiert das Enzym, einem Ping-Pong-Mechanismus folgend [Tonazzi *et al.*, 2009], einen temperaturabhängigen schnellen Austausch im Verhältnis von 1:1 gegen matrixinternes Carnitin. Bei diesem Prozess sind die Bindestellen von beiden Seiten besetzt. Acyl(-)carnitine können schneller als Acyl(+)carnitine penetrieren. Die Stereospezifität ist durch die Anwesenheit der CACT erklärbar.

Es findet zudem auch ein undirektionaler Transport durch Membranlecks statt, jedoch ist dieser auch bei 37 °C für einen physiologischen Fettsäureacyltransport nur unzureichend. Die Versorgung der Mitochondrien mit Carnitin ist jedoch gewährleistet [Ramsay *et al.*, 1976]. Der Austausch findet nur sehr langsam statt, wenn kein Substrat (Acylcarnitin) vorhanden ist. In diesem Fall ist nur eine Bindestelle besetzt, sodass der Transport von Carnitin durch ein Konzentrationsgefälle koordiniert wird [Pande *et al.*, 1980].

Die CPT und die CACT sind in den Mitochondrien in räumlicher Nähe zueinander und bilden dadurch ein System, das den Carnitin-abhängigen Transport von Acylgruppen durch die mitochondriale Membran gestaltet.

1.1.7 Natrium-abhängiger organischer Carnitin-Transporter 2

OCTN2 ist ein Natrium-abhängiger hochaffiner Transporter von Carnitin in der Plasmamembran [Abb. 1.2]. Das humane Gen *SLC25A5* ist auf Chromosom 5q31 lokalisiert und enthält 10 Exons [Wu *et al.*, 1998; Sekine *et al.*, 1998]. Carnitin ist als löslicher Transporter für die Aufnahme der langkettigen Fettsäuren ins Mitochondrium essentiell. Eine Unterversorgung mit Carnitin führt zu einer gestörten β -Oxidation. Ein primärer Carnitinmangel wird vor allem durch eine beeinträchtigte Funktion des OCTN2 ausgelöst. Punktmutationen sind meist in putativen Transmembran-Regionen oder intrazellulären Domänen des Transporters lokalisiert [Filippo *et al.*, 2011]. Die Substitutionen P46S und R83L befinden sich in einem extrazellulären *loop* in der Umgebung von putativen Glykosylierungsstellen [N57, N64, N91] [Filippo *et al.*, 2011]. Ein Austausch aller Glykosylierungspositionen gegen Glutamin unterbindet den Carnitintransport in vollem Umfang [Filippo *et al.*, 2011]. Ferner belegt es die Wichtigkeit der Glykosylierung hinsichtlich der Reifung des Transporters in der Plasmamembran. Durch Einführung von Glutaminsubstitutionen konnte mittels konfokaler Mikroskopie eine progressive Rückhaltung des Transporters OCTN2 im Cytoplasma beobachtet werden [Filippo *et al.*, 2011]. Die physiologisch vorkommenden Substitutionen P46S und R83L stören den natürlichen Glykosylierungsprozess, haben aber keinen Einfluß auf die Reifung des Proteins in der Plasmamembran [Filippo *et al.*, 2011].

1.2 Substrate der Carnitin-Palmitoyltransferasen

1.2.1 L-Carnitin

Das wasserlösliche L-Carnitin wurde 1905 zeitnah von 2 Arbeitsgruppen [Gulewitsch *et al.*; Kutscher *et al.*] als Bestandteil der Skelettmuskulatur im Liebig'schen Fleischextrakt entdeckt. Aufgrund dessen wurde der Name Carnitin gewählt, welcher sich aus dem lateinischen Begriff *carnis* für Fleisch ableitet. Die chemische Struktur wurde 1927 von Tomita *et al.* als 3-Hydroxy-4-N-trimethylaminobuttersäure gelöst. Die Arbeitsgruppe um Carter *et al.* identifizierte 1952 Vitamin B₇ (isoliert aus dem Mehlwurm *Tenebrio molitor*) als Carnitin. Die Konfiguration wurde ein Jahr später als L-Carnitin spezifiziert [Strack *et al.*, 1953]. 1955 wurde die Signifikanz in Bezug auf die Oxidation von Fettsäuren in Mitochondrien entdeckt und eine durch Carnitin gesteigerte Palmitatoxidation konstatiert [Fritz *et al.*, 1955]. Zeitgleich wurde von Friedman und Fraenkel das von CAT katalysierte reversible Acetylgruppenübertragungspotential von CoA auf Carnitin erforscht [Friedman *et al.*, 1955]. Die allgemeine Befähigung der Übertragung von Fettsäureeinheiten durch Carnitin in der Muskulatur wurde durch Fritz *et al.* (1959) belegt.

Vorkommen

Carnitin kommt sowohl in geringen Mengen in Pflanzen z.B. Avocadomesokarp, Haferkeimling, Blumenkohlblütenstand, Weizenkeim [Panter *et al.*, 1969], als auch in getrockneten Steinpilzen, Erdnüssen oder Zucchini [Gustavsen 2000, Dissertation] vor. Die Hauptquelle von Carnitin sind jedoch tierische Produkte, wobei Fleischextrakt, Hirschkeule und Ziegenkeule den höchsten Gehalt an Carnitin mit 36,86, 2,21 und 1,93 mg/kg aufweisen. Der überdurchschnittlich hohe Anteil von Carnitin in Wildtieren ist der Tatsache geschuldet, dass diese eine ausgeprägte Muskulatur besitzen, in ihrer natürlichen Umgebung permanent in Bewegung bzw. auf der Flucht sind und sich im Vergleich zu Zuchttieren deutlich mehr bewegen. So sind exemplarisch im Hasen 860 mg bzw. im Kaninchen 240 mg L-Carnitin zu finden.

Endogene Carnitinbiosynthese

Carnitin wird partiell durch die Nahrung aufgenommen, weshalb es anfangs als Vitamin B₇ bezeichnet wurde. Der Körper ist jedoch in Lage, endogene Carnitinbiosynthese durchzuführen, weshalb die Klassifizierung als „Vitamin“ zurückgenommen wurde. Der Methylgruppendonator der Carnitinbiosynthese wurde von Wolf *et al.* (1961) als Methionin identifiziert. Das Grundgerüst bilden die C3-C6-Kohlenstoffatome des Lysins [Horne *et al.*, 1971]. Lysin selbst liegt nicht frei vor, sondern wird vermehrt durch Abbau von Muskelproteinen wie Calmodulin, Myosin oder Aktin zur Verfügung gestellt [Horne *et al.*, 1973; Tanphaichitr *et al.*, 1973; Dunn *et al.*, 1981]. Die Synthese besteht aus 4 Schritten I. der Hydroxylierung von Trimethyllysin zu 3-Hydroxy-6-N-trimethyllysin, II. der Spaltung zu 4-N-Trimethylaminobutyraldehyd und Glycin, III. der Oxidation des Aldehyds zu 4-N-Trimethylaminobuttersäure und schließlich IV. der Hydroxylierung zu Carnitin. Der Schritt der Hydroxylierung des Vorläufers ist örtlich auf die Leber beschränkt und nicht geschwindigkeitsbestimmend. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wurde die Freisetzung des 6-N-Trimethyllysins aus Muskelprotein konstatiert [Kerner *et al.*, 1998].

Carnitintransportmechanismen

Als Precursor dient γ -Butyrobetain. Dieses wird von dem temperaturabhängigen Natrium-abhängigen hochaffinen Transporter OCTN2 mit größerer Affinität in die Zellen aktiv transportiert als Carnitin [Abb. 1.2]. Weitere Transportmechanismen von Carnitin sind die Verteilung mittels Konzentrationsgradient und der unabhängige Efflux [Kerner *et al.*, 1998]. Carnitin fungiert als Transporter, als *shuttle* kurzkettiger Acylgruppen von den Peroxisomen in die Mitochondrien, zur Modulation des Acetylcoenzym A:Coenzym A-Verhältnisses und bei der Eliminierung endogener und exogener organischer Säuren.

Speicherung & Exkretion

Sowohl exogenes als auch endogenes Protein wird in der Leber gespeichert. In den Dünndarm gelangtes L-Carnitin kann absorbiert werden. Der Abbau erfolgt meist durch das Ausscheiden des L-Carnitins in Form von acylierten Fettsäurecarnitineestern oder als freies L-Carnitin. 0,1-0,3 % des Gesamtgehalts an L-Carnitin werden täglich unverändert abgegeben [Gustavsén 2000, Dissertation].

Carnitinanaloga

Studien mittels Carnitinanaloga wurden von Norum *et al.* (1965b) und Fritz *et al.* (1965) durchgeführt, um die Bedeutung der funktionellen Gruppen des L-Carnitins in Bezug auf dessen Bindungsaffinität und katalytische Effizienz zu untersuchen.

Die funktionelle Komponente [a] aus Abb. 1.6 benötigt mindestens zwei Methylgruppen, was zur Bildung von Norcarnitin führt, um eine ausreichende, um Faktor 3 verminderte Affinität im Vergleich zum natürlichen Carnitin zu entwickeln. Die Umwandlung des Enzym-Substratkomplexes durch Formation von Produkt und freiem Enzym ist mit Norcarnitin deutlich langsamer als bei L-Carnitin. Die Substitution der Trimethylaminofunktion durch eine Aminogruppe (Bildung von Aminobuttersäure) führt zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Das Eliminieren der funktionellen Hydroxylgruppe [b] [γ -Butyrobetain] oder dessen Acetylierung [L-Acetylcarnitin] führt zu einem Verlust der Affinität zum Enzym. Der Austausch der funktionellen Komponente [c] gegen eine Alkoholfunktion (Hydroxylgruppe), Cyanidgruppe oder Amidfunktion resultiert ebenfalls in einem Verlust der Affinität des Substrats zum Enzym. Unabhängig von der Substitution bzw. Modifikation, die an der Carboxylatfunktion vorgenommen wurde, führen diese stets zu einem vollständigen Affinitätsverlust des L-Carnitinanalogons. Daraus konnte abgeleitet werden, dass diese funktionelle Komponente stets frei existieren muss [Norum *et al.*, 1965b], um biologisch aktiv zu sein.

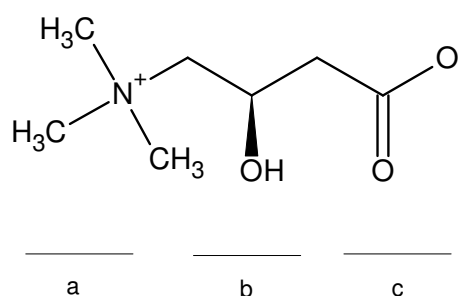


Abb. 1.6 Chemische Strukturformel von L-Carnitin [(–)- β -Hydroxy- γ -(trimethylammonio)butyrat] mit den modifizierbaren Bereichen a=Trimethylaminogruppe, b=Hydroxylfunktion, c=Carboxylatgruppe, welche zur Generation von Carnitin-Analoga führen.

Carnitinmangel

Der Mangel an Carnitin ist definiert durch eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit einer weiten Bandbreite von klinischen Symptomen. Diese resultiert aus der Funktionsvielfalt des Carnitins, da es nicht nur in die Fettsäureoxidation involviert ist, sondern auch maßgeblich an der zellulären Homöostase von freiem CoA und AcylCoA beteiligt ist. Der Carnitinmangel ist definiert als eine Verminderung der zellulären Carnitinkonzentration, welche nicht für die Aufrechterhaltung des regulären zellulären Metabolismus ausreicht [Kerner *et al.*, 1998].

Der primäre Carnitinmangel untergliedert sich in zwei Unterformen, dem a) myopathischen und dem b) systemischen Carnitinmangel.

Die muskuläre Form zeichnet sich im Vergleich zu einem CPT2-Mangel durch eine progressive Schwächung der Skelettmuskulatur ohne Rhabdomyolyse aus und ist charakterisiert durch eine Speicherung von Lipiden, primär in den Typ I-Muskelfasern. Der Gehalt an Carnitin in der Skelettmuskulatur ist deutlich vermindert, jedoch im Plasma und der Leber regulär [Kerner *et al.*, 1998].

Im Vergleich dazu zeichnet sich die systemische Form durch Ausbildung von progressiven Kardiomyopathien, Myopathien und hypoketotischen, hypoglykämischen Enzephalopathien aus und ist durch eine Verminderung der Konzentration des Plasmacarnitins und der anderen Gewebe charakterisiert [Kerner *et al.*, 1998].

Sekundärer Carnitinmangel ist mit einer Vielzahl genetischer und erworbener Erkrankungen assoziiert und ist geprägt durch eine Reduktion der Plasma- oder Gewebe-Carnitinkonzentration. Verantwortlich dafür sind Defekte der Atmungskette, ein extensiver renaler Verlust von Carnitin oder eine metabolische Störung als häufigste Form, welche mit einer beeinträchtigten Oxidation von AcylCoA-Intermediaten in den Mitochondrien einhergeht [Kerner *et al.*, 1998].

1.2.2 Coenzym A

CoA ist ein Schlüsselmolekül des Energiestoffwechsels in der Zelle und interagiert mit seinen Seitengruppen in vielen Enzymspezies über eine Vielzahl nichtkovalenter Wechselwirkungen. Aufgrund seiner essentiellen Beteiligung an vielen enzymatischen Reaktionen und der komplizierten Molekülstruktur ist das Kosubstrat stark kompartimentiert. Es spielt eine zentrale Rolle im Fettstoffwechsel und ist darin direkt involviert. CoA ist 1951 erstmals durch den späteren Nobelpreisträger Feodor Lynen [Lynen *et al.*, 1951] in Form von Acetylcoenzym A isoliert worden. Es ist im Detail aus 5 Komponenten aufgebaut [Abb. 1.7], einer 3'-phosphorylierten Adenosin-Einheit, einem Diphosphat-Segment, einer Pantoinsäure-Einheit, einer β -Alanin-Komponente und einem Cysteamin-Rest. Die Segmente β -Alanin und Pantoinsäure können als Pantothensäure zusammengefasst werden. Eine zusätzliche Beteiligung des Cysteamin-Restes führt zur Bildung der Pantethein-Domäne. 3'-Phosphoadenosin und das Diphosphat-Segment können als 3'-Phosphoadenosin-5'-diphosphat-Domäne zusammengefasst werden. Das Kosubstrat ist ein Acylgruppen-überträger in Acyltransferasen und katalysiert die Aktivierung von Fettsäuren und Derivaten. Eine essentielle Funktion besitzt die an dem Cysteamin-Arm lokalisierte endständige Thiolgruppe, welche mit Alkan- bzw. Fettsäuren eine energiereiche Verbindung unter der Bildung von Thioestern eingeht und den Bindungspartner dadurch aktiviert. Erst durch diesen Reaktionsschritt werden bestimmte chemische Reaktionen mit ausreichender Geschwindigkeit möglich, während ohne das Kosubstrat die Bindungspartner reaktionsträger

erscheinen. Die Bindungsenergie der Pantetheinstruktur des CoAs durch Wechselwirkung mit dem Apoenzym wird zur Destabilisierung der Reaktionspartner in Richtung des Übergangszustands genutzt und ist für die Geschwindigkeitserhöhung der Katalyse verantwortlich [Fierke *et al.*, 1986]. Die Interaktion der 3'-Phospho-Adenosindiphosphat-Einheit mit dem Enzym dient der Gewinnung der Bindungsenergie, welche benötigt wird, um die Pantethein-Einheit in das aktive Zentrum zu transferieren. Die Enzymkatalyse nutzt die intrinsische Bindungsenergie zum Stabilisieren des Übergangszustands der Reaktion mit spezifischen Substraten unter Bildung eines Enzym-Thiol-Ester-Intermediats. Die intrinsische Bindungsenergie wird nicht in einem ES-Komplex ausgeprägt, sondern genutzt, um eine Destabilisierung zu erreichen und einen Verlust der Entropie zu erzielen, um den Übergangszustand einfach zu erreichen [Fierke *et al.*, 1986]. Thioacylester, welche durch die Transesterifikationsreaktion der Acyltransferasen entstehen, weisen im Vergleich zu den O-Acylestern eine hohe Carbonylaktivität auf. Diese bedingt eine günstige Gleichgewichtslage. Mit Fokus auf die Hydrolysewärme weisen die S-Ester eine um 55-60 kJ/mol geringere Resonanzstabilisierung einhergehend mit einer längeren Bindung [0,1767 nm] im Vergleich mit den O-Estern [0,1329 nm] auf [Zacharias *et al.*, 1983]. Das hohe Gruppenübertragungspotential der Thioester resultiert aus diesem Grund aus dem starken elektrophilen Charakter der Carbonylgruppe in Kooperation mit der hohen Polarisierbarkeit der austretenden Thiolgruppe [Zacharias *et al.*, 1983; Schellenberger *et al.*, 1989].

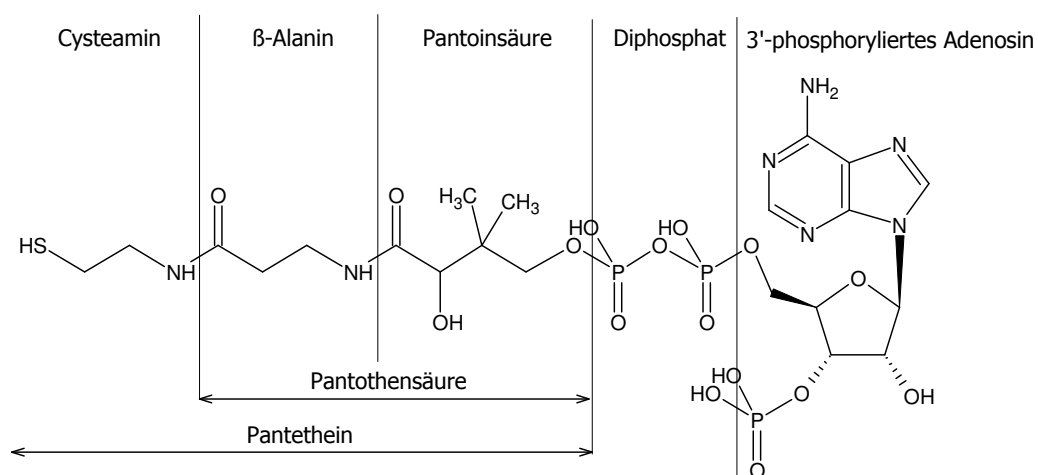


Abb. 1.7 Strukturformel von Coenzym A. Das Coenzym A besteht im Einzelnen aus 5 Komponenten: Cysteamin-Einheit, β -Alanin-Segment, Pantoinssäurerest, Diphosphat-Segment und 3'-phosphorylierte Adenosin-Einheit. Die β -Alanin- und Pantoinssäure-Einheit wird als Pantothensäure bezeichnet, Die Komponenten Pantothensäure und Cysteamin zusammen betrachtet, bilden die Pantethein-Komponente.

1.2.3 Fettsäurecoenzym A & Fettsäurecarnitin

Fettsäurecoenzym A [FSCoA] und Fettsäurecarnitinester sind amphipathische, oberflächenaktive, limitiert wasserlösliche Moleküle, welche natürliche Substrate des Carnitin-*carrier*-Systems darstellen. Diejenigen Intermediate, welche an Stelle der 3-Hydroxylgruppe mit langkettigen Fettsäuren verestert sind, erfahren einen Transfer durch eine spezifische Mikroumgebung, können Membranen zerstören und Proteine wie CPT2 solubilisieren [Fritz & Marquis, 1965]. Die destruktiven Eigenschaften der Substrate mit spezifischen Kontaktregionen [Brdiczka *et al.*, 1994] bedingen eine intrazelluläre Kompartimentierung und unterbinden aus diesem Grund die freie Penetration durch die innere Mitochondrienmembran. Der endogene CoA- und AcetylCoA-Gehalt der Mitochondrien und der Gehalt im Cytosol sind persistent. Nukleotide, außer ATP und ADP, können die innere Membran nicht passieren.

Die Gesamtkonzentration an zellulären Fettsäurecoenzym As liegt zwischen 5-160 μM [Knudsen *et al.*, 2000]. Ferner muss die Konzentration an freien Fettsäuren und Derivaten reguliert werden. Dies erfolgt durch die Bindung freier Fettsäuren und Derivate an zellulär lokalisierte Proteine. Sie unterbinden einen Anstieg dieser Intermediate in der Zelle und erzeugen einen Schutz vor Membrandestruktivität durch den Detergenseffekt der Substrate. Daher existieren freie FSCoAs nur in Konzentrationsbereichen von 0,1-200 nmol/L [Knudsen *et al.*, 2000]. In erster Instanz puffert das Acylcoenzym A-*binding*-Protein [ACBP] freie FSCoA-Moleküle. Die verbliebenen freien Fettsäuren und Derivate werden von *fatty-acid-binding*-Protein [FABP] oder Albumin neutralisiert.

Das ACBP ist im Cytosol und dem Nukleus lokalisiert [Elholm *et al.*, 2000], bindet 2 mol AcylCoAs pro mol ACBP, ist ein intrazellulärer Transporter und CoA-*pool*-Bildner. Es schützt AcylCoAs vor der Hydrolyse durch mikrosomale Hydrolasen [Knudsen *et al.*, 1999]. Im Gegensatz zum FABP binden ACBP ausschließlich AcylCoAs, während FABP auch freie Fettsäuren und Carnitinester bindet [Mikkelsen *et al.*, 1987]. Ein weiteres Fettsäurebindendes Protein ist Albumin, ein globuläres Protein, welches für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks verantwortlich ist und die Wasserlöslichkeit vieler sonst wasserunlöslicher Stoffe vermittelt. Diese Proteine fungieren als Transporter von Fettsäuren und Derivaten.

Ein hoher Gehalt an Acylcarnitinen im Herz verursacht eine kardiale Arrhythmie [Zhu *et al.*, 1997b]. Die Steigerung der Konzentration dieser Substanzklasse in Neuroblastoma-Zellen korrelierte mit der Inhibierung der Zellproliferation und förderte Differenzierungsprozesse. Es ist ein natürlicher Modulator der Proteinkinase C-Aktivität [Nalecz *et al.*, 1997].

FSCoAs hemmen die AcetylCoA-Carboxylase [ACC], welche den ersten Schritt der Fettsäure-Biosynthese katalysiert. Sie hemmen zudem auch die Citrat-Synthase [Wieland *et al.*, 1964] und die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase [Taketa *et al.*, 1966]. Sie regulieren die zellulären Funktionen von Translokasen, Ionenkanälen, Pumpen, Proteinkinasen, nukleären Transkriptionsfaktoren, Proteasen und den Proteintransport [Knudsen *et al.*, 2000].

Die Bindung von AcetylCoA durch die Chloramphenicol-Acetyltransferase unter Acetylierung von Chloramphenicol stellt einen Resistenzmechanismus auf hohem Niveau in Eubakterien dar. Infolge der enzymatischen Modifikation wird das Katalyseprodukt nicht an die bakteriellen Ribosomen gebunden und kann die Proteinbiosynthese der Eubakterien nicht inaktivieren [Day *et al.*, 1992].

1.3 Fettsäureoxidationsstörungen

Fehlfunktionen des Lipidmetabolismus in der Skelettmuskulatur können sowohl die endozelluläre Triglyzeriddegradierung, die Carnitinaufnahme, den Transport langkettiger Fettsäuren ins Mitochondrium oder die β -Oxidation involvieren.

Der in Säugerzellen realisierte Transport cytosolisch aktivierter langkettiger Fettsäuren in die mitochondriale Matrix zur konsekutiven β -Oxidation bedingt eine spezifische Assoziation der Proteine des CPT-Systems und den Enzymen der Fettsäureoxidation. Dieses Proteinnetzwerk ist ein wichtiger Bestandteil zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase in Herz- und Skelettmuskulatur [Bonfont *et al.*, 1999]. Modifikationen in der DNA der beteiligten Proteine manifestieren sich in der Ausprägung verschiedener Stoffwechselstörungen. Im Allgemeinen ist jedoch das Verständnis der Interaktionen der verschiedenen Proteine bei Fettsäureoxidationsstörungen bisher nur gering untersucht und stellt somit ein offenes Forschungsfeld dar. Die Fehlfunktionen der Enzyme der β -Oxidation sollen hier nicht im Fokus der Betrachtung stehen, obwohl der *medium-chain*-Acylcoenzym A-Dehydrogenase-Mangel [MCACD-Mangel] den häufigsten Defekt der Fettsäureoxidation charakterisiert. Andere Erkrankungen, wie der *very-long-chain*-Acylcoenzym A-Dehydrogenase-Mangel [VLCACD-Mangel], *long-chain*-3-HydroxyacylCoA-Dehydrogenase-Mangel [LCHACD-Mangel] oder *short-chain*-Acylcoenzym A-Dehydrogenase-Mangel [SCACD-Mangel] sind wesentlich seltener.

Das Spektrum der Defekte des Carnitin-Palmitoyltransferasesystems ist im Folgenden tabellarisch zusammengefasst. Ausführlich wird der in dieser Arbeit untersuchte CPT2-Mangel thematisiert.

Tab. 1.1 Das Spektrum der Defekte des Carnitin-Palmitoyltransferasesystems. ^[1] [Wilcken, 2010], ^[2] [Wilcken, 2008], ^[3] [Iacobazzi *et al.*, 2004], ^[4] [Zammit *et al.*, 2009].

Lipidmyopathie	sekundäre Veränderungen	Symptome
OCTN2-Mangel	▪ primärer Carnitinmangel ▪ Unvermögen Carnitin in Zellen zu konzentrieren ▪ Insuffizienz Fettsäuren zu metabolisieren^[1]	▪ progressive Herzfehler ▪ Skelettmuskelschwäche ▪ hypoketotische Hypoglykämie^[1] ▪ Koma
CACT-Mangel	▪ Gleichgewicht des Carnitin-<i>pool</i> in der Zelle gestört ▪ Überschuss langkettiger Fettsäure-Acylcarnitine im Plasma^[3] ▪ schneller Export organischer Säuren inhibiert^[3]	▪ Arrhythmien^[2] ▪ hypoketotische Hypoglykämie^[3]
CPT1-Mangel	▪ Defekt der Acylcarnitininformation ▪ Fettsäuren gelangen nicht zur β-Oxidation ins Mitochondrium	▪ Koma^[1] ▪ Homozygotie letal^[4]

Verschiedene krankheitsauslösende Modifikationen manifestieren einen dominant-negativen Effekt [Orngreen *et al.*, 2005] und modulieren Funktionalität, Aktivität bzw. Stabilität des resultierenden Proteins. Der Einfluss von Mutationen auf diese Eigenschaften stellt nach wie vor einen Forschungsschwerpunkt für mechanistische Studien zur Charakterisierung des CPT2-Proteins dar, da bisher nur Daten von Zell-Lysaten vorliegen. Es wären hier *in vitro*-Studien der gereinigten Proteinvarianten nötig, um den exakten Einfluss der Mutationen zu bestimmen und eine mechanistische Charakterisierung vorzunehmen. Polymorphismen verkörpern benigne Modifizierer und beeinflussen Qualität und Quantität des Phänotyps der Expression einer pathogenen Mutation [Wataya *et al.*, 1998]. Gegenwärtig konnten mehr als 70 genetische Änderungen festgestellt werden [Abb. 1.8]. Die prominenteste Mutation mit einer Allelfrequenz von 60 % in europäischen Populationen ist die S113L-Mutation, gefolgt von der P50H-Mutation mit einer Häufigkeit von 6,5 % [Bonnefont *et al.*, 2004]. Beide werden als *common*-Mutationen bezeichnet. Andere Modifikationen wie Q413fs, F448L, Y628S und R631C sind periodisch auftretend, während die übrigen Mutationen „privat“ [innerhalb einer Familie vorkommend] sind. Die Exons 4 und 5 bieten aufgrund ihrer Größe eine breite Angriffsfläche für Mutationen und tragen 83 % der existenten Mutationen. 64 % aller Mutationen sind Punktmutationen, 22 % *frameshift*-Mutationen, 10 % *nonsense*-Mutationen und 3 % Deletionen.

Der Schweregrad eines Krankheitsbildes korreliert mit der Auswirkung des enzymatischen Defekts auf die β -Oxidation. Die Effizienz des gesamten Systems begründet sich auf der physischen Assoziation der CPT2 mit den distalen Komponenten der β -Oxidationsmaschinerie und ist durch verschieden lokalisierte Mutationen variierbar [Taroni *et al.*, 1993]. Es existiert eine positive Korrelation zwischen der Restaktivität und dem Niveau der Palmitatoxidation. Diese stellt die Hauptenergiequelle im Verlauf von ausdauernder sportlicher Belastung bzw. im Fastenzustand im Skelettmuskel dar [Bonnefont *et al.*, 2004]. Der muskuläre adulte Typ zeigt eine reguläre bzw. maximal auf 50 % reduzierte Oxidation der langkettigen Fettsäuren, wobei die Restaktivitäten der CPT2 bei mehr als 15 % des Kontrollbereichs liegen. Die hepatokardiomuskuläre Form (infantil und neonatal) präsentiert weniger als 10 % der ursprünglichen β -Oxidationskapazität mit CPT2-Restaktivitäten in Bezug auf die Kontrollgruppe von weniger als 10 % [Bonnefont *et al.*, 2004].

Eine hinreichend hohe Restaktivität [≥ 22 % [Anichini *et al.*, 2011]] toleriert die Existenz zweier mutierter Allele und unterbindet eine Störung der Oxidation langkettiger Fettsäuren [Thullier *et al.*, 2003]. Daher ist an die CPT2-Restaktivität der Schweregrad des Krankheitsverlaufes gekoppelt. Eine Steigerung an Acylcarnitinen im Herzmuskel führt zu kardialen Arrhythmien [Demaugre *et al.*, 1991].

Die Mehrheit [80-88 %] der symptomatisch betroffenen Personen sind Männer [Zierz *et al.* 1994, Olpin *et al.*, 2003]. Weibliche Hormone wie Östrogen besitzen eine protektive Funktion [Djouadi *et al.*, 1998; Vladutiu *et al.*, 2002a; Olpin *et al.*, 2003], kontrollieren den Fettmetabolismus [Vladutiu *et al.*, 2002a] und modifizieren den symptomatischen Beginn der CPT2-Erkrankung.

Die ubiquitäre CPT2-Expression resultiert in drei klinischen Präsentationen. Diese differieren in Beginn der Erkrankung und Gewebeexpressionsmuster. Nachfolgend sind die drei Formen des CPT2-Mangels kurz dargelegt.

1.3.1.1 *Adulte Form*

Die adulte Form der CPT2-Erkrankung wurde erstmals von DiMauro *et al.* (1973) beschrieben. In den Folgejahren [Cumming *et al.*, 1976; Herman *et al.*, 1977; DiDonato *et al.*, 1978; Carroll *et al.*, 1978; Patten *et al.*, 1979; Scholte *et al.*, 1979; Ionasescu *et al.*, 1980; Pula *et al.*, 1981; Rumpf *et al.*, 1983; Demaugre *et al.*, 1988; Vladutiu *et al.*, 1992; Schäfer *et al.*, 1997] wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen weitere Fallbeispiele hinsichtlich der CPT2-Erkrankung publiziert. Das Krankheitsbild ist vor allem durch muskuläre Beschwerden charakterisiert. Erste Symptome manifestieren sich zwischen dem 6. und 20. Lebensjahr. In seltenen Fällen wurde der Beginn der Erkrankung erst in der fünften Lebensdekade dokumentiert [Bonfont *et al.*, 2004]. Die Störung wird durch periodische, belastungsabhängige Attacken von Myoglobinurie, Muskelschwäche, Rhabdomyolyse und belastungsinduzierten Schmerzen repräsentiert. Die Dauer der Attacken variiert von mehreren Stunden bis hin zu einigen Wochen, die Frequenz der Anfälle ist variabel. Zwischen den Attacken sind keine klinischen Symptome detektierbar. Lebensbedrohliche Komplikationen infolge der Rhabdomyolyse treten in Form von Nierenfunktionsstörungen bedingt durch Myoglobinurie, Atmungsinsuffizienz als Resultat der Beteiligung der Atemmuskulatur [Smolle *et al.*, 2001] und paroxysmale Herzrhythmusstörungen [Thuillier *et al.*, 2000] auf. Die Genese der Symptome wird durch permanente Belastung, Fasten, Fieber, milde Infekte, Kälteexposition, Aufnahme hoher Dosen an Fettsäuren, emotionalen Stress, allgemeine Anästhetika und Medikamente [Diazepam, Ibuprofen] ausgelöst. Der Phänotyp ist extrem wandelbar und verläuft von einer asymptomatischen Ausprägung bis hin zu einer letalen Form und ist auf den Skelettmuskel limitiert.

Die biologische Fehlfunktion kann durch verschiedene labortechnische Untersuchungen verifiziert werden. Serum-Creatin-Kinase und Transaminase-Gehalt sind während einer Episode deutlich erhöht. Das Niveau von Carnitin kann leicht vermindert, im Allgemeinen jedoch regulär im Serum und Skelettmuskel vorliegen. Der Gehalt an Triglyzeriden und Cholesterol im Serum ist normal, maximal um 10-20 % erhöht. Die Mobilisierung von Fettsäuren erfolgt regulär. Die durch Fasten induzierte Bildung von Ketonkörpern über den 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Weg [HMG-CoA] ist retardiert [Bonfont *et al.*, 2004]. Der Ischämie-Laktat-Test resultiert in einer normalen Glukose- und Laktatantwort im Blut. Histologisch betrachtet, existiert in über 50 % der Fälle eine Normalverteilung von Typ I- und Typ II-Muskelfasern, selten sind degenerative Muskelfasern [Patten *et al.*, 1979] zu beobachten. Als weitere Strukturanomalien sind Atrophie und Nekrose der Typ I-Fasern anzuführen. Die Skelettmuskelzellen weisen einen normalen Glykogengehalt auf. Es lassen sich in 20 % der Fälle Lipidakkumulationen durch histologische Färbemethoden visualisieren [Bonfont *et al.*, 2004]. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie kann die Strukturanomalie der Mitochondrien dargestellt werden [Scholte *et al.*, 1979].

1.3.1.2 Infantile Form

Die systemische Erkrankung der infantilen Form des CPT2-Mangels ist nicht auf die Muskulatur beschränkt. Viele der publizierten Fallbeispiele sind miteinander verwandt. Die Präsentation des Krankheitsbildes ist geschlechtsunspezifisch. Einige Patienten starben plötzlich, die Mehrheit jedoch meist innerhalb eines Jahres aufgrund zusätzlich auftretender kausaler paroxysmaler Herzrhythmusstörungen oder dem Reye-Syndrom [Demaugre *et al.*, 1991; Elpeleg *et al.*, 1993]. Der Beginn der Erkrankung manifestiert sich zwischen dem sechsten Lebensmonat und dem zweiten Lebensjahr. Die Betroffenen zeigen klinisch wiederkehrende Episoden von akutem Nierenversagen einhergehend mit hypoketotischer Hypoglykämie. Diese Symptome führen zu Koma, Krämpfen und transienter Hepatomegalie. Eine kardiale Beteiligung ist in 50 % der Fälle präsent und manifestiert sich in einer erweiterten und hypertrophen Kardiomyopathie, einer Arrhythmie und Konduktionsstörung. Die metabolischen Episoden können durch Fasten und fiebrige Infektionen initiiert werden. Die Analyse des Plasmas identifiziert eine metabolische Azidose, detektiert einen erhöhten Ammoniumgehalt, ein niedriges Niveau an Total- und freiem Carnitin begleitet von einem Anstieg von langkettigen Acylcarnitinen. Die Diagnose der *Steatosis hepatis* ist verbreitet [Bonnefont *et al.*, 1999+2004].

1.3.1.3 Neonatale Form

Die neonatale Präsentation des CPT2-Mangels ist die schwerwiegendste Ausprägungsvariante, publiziert von Bonnefont *et al.* (1999), Elpeleg *et al.* (2001), Vladutiu *et al.* (2002a,b) und Smeets *et al.* (2003). Die wenigen beschriebenen Fälle manifestieren einen pränatalen Beginn, einhergehend mit organischen Fehlbildungen, welche durch pränatale Ultraschalluntersuchungen diagnostiziert werden konnten [Witt *et al.*, 1991]. Im Allgemeinen wurden hierbei dysmorphe Charakteristika, eine zystisch renale Dysplasie, sowie neuronale Migrationsdefekte konstatiert. Eine postmortale Untersuchung offenbarte die zystische Dysplasie, Polymikrogyrie, gliale Heterotropie und Hämorrhagien [Bonnefont *et al.*, 2004]. Die symptomfreie Phase beläuft sich auf wenige Stunden nach der Geburt bis hin zu 4 Tagen. Charakteristische Symptome sind Atemnot, Hypoglykämie einhergehend mit Krämpfen und einer Hepatomegalie, sowie einer Herzbeteiligung in Form einer Kardiomegalie assoziiert mit Rhythmus- und Konduktionsstörungen [Bonnefont *et al.*, 2004]. Eine labortechnische Analyse des Plasmas identifiziert eine metabolische Azidose und eine Hyperammonämie. Die Mortalitätsrate liegt mit Ausnahme eines Patienten [Smeitink *et al.*, 1998] bei 100 %. Der Tod tritt kurz nach der Geburt zwischen Tag 0 und 34 ein [Bonnefont *et al.*, 2004].

1.3.2 Epidemiologie

Die Verbreitung von genetisch modifiziertem CPT2-Protein steht in Korrelation mit der ethnischen Herkunft der betroffenen Patienten. Das Vorkommen der Mutationen F383Y und F352C ist auf den asiatischen Raum beschränkt [Wataya *et al.*, 1998]. Y628S [Bonnefont *et al.*, 1996] und D328G [Thuillier *et al.*, 2003] sind vor allem unter der nordafrikanischen Bevölkerung zu finden. Die Bevölkerung der aschkenasischen Juden konzentriert vor allem die Existenz der Mutationen Q413fs+F448L, F383Y, Y628S und D328G.

1.3.3 Korrelation von Genotyp & Phänotyp

Obgleich nur bei einzelnen Formen gefunden, gibt es eine nicht eindeutige konstante, uniforme Relation von den Genotypen zu ihren Phänotypen. Im Allgemeinen kann eine Mutation maximal drei differente klinische Phänotypen präsentieren, welche der adulten, infantilen oder neonatalen Form zugeordnet werden. Einige genetische Variationen sind sowohl mit der adulten als auch der infantilen oder neonatalen Form assoziiert. Andere Mutationen sind eindeutig einem Phänotyp zuzuweisen [Bonnefont *et al.*, 1999].

Korrelation mit adulter Form

Sowohl die häufigste Mutation S113L [Exon 3] als auch die P50H [Exon 1], R161W [Exon 4] und E174K [Exon 4] korrelieren in homozygoter Form mit der Ausprägung des milden, adulten Phänotyps. Weitere Modifikationen, überwiegend auf Exon 4 vorkommend, treten in Heterozygotie auf, sind jedoch auch mit dem muskulären Phänotyp verknüpft. Diese zusammengesetzt heterozygoten Patienten tragen auf dem zweiten Allel die S113L- oder P50H-Mutation. Die Identifikation von genetischen Veränderungen in den Exons 1 bis 3 führt zu einem Krankheitsbeginn in der adulten Lebensphase [Bonnefont *et al.*, 2004]. Eine Ausnahme bilden die Mutationen R161W und R631C, welche auf den Exons 4 und 5 liegen, jedoch auch einen adulten Phänotyp ausprägen.

Korrelation mit multisystemischer Form

Der Genotyp der infantilen oder neonatalen CPT2-Erkrankungsform existiert in 8 Mutationen [Abb. 1.8], lokalisiert auf den Exons 4 oder 5 der DNA, wobei 5 Mutationen [R151Q, P227L, D328G, R382K, F383Y] in einem homozygoten Status vorliegen. Mutationen, die zu einem trunkierten Protein führen, sind mit der neonatalen Form der Erkrankung assoziiert. Die meisten dieser schwerwiegenden Veränderungen besitzen einen dominant-negativen Effekt in heterozygoter Form in Kombination mit einer milden Mutationsform auf dem zweiten Allel und bedingen die Assoziation mit dem klinischen Phänotyp der infantil/neonatalen Form. Im Gegensatz dazu haben die S113L- und die P50H-Mutationen in Korrelation mit einer ersten Mutation einen protektiven Effekt und bedingen den milden Phänotyp.

Korrelation mit adulter oder multisystemischer Form

6 Mutationen wurden als Genotypen identifiziert, welche sowohl mit der muskulären als auch hepatokardiomuskulären Form assoziiert sind. Zwei dieser genetischen Veränderungen treten in Kombination miteinander auf dem gleichen Chromosom auf [Q412fs, F448L] [Taggart *et al.*, 1999]. Die Relation dieser Mutationen mit S113L oder P50H führt zur Ausprägung eines milden Phänotyps. Die Mutation R631C bildet eine Ausnahme und kann in homozygoter Existenz sowohl einen adulten als auch einen infantil/neonatalen Phänotyp verursachen. Dies

lässt die Hypothese zu, dass zusätzlich zu dieser identifizierten genetischen Veränderung eine genetische Prädisposition [intragene Polymorphismen] bzw. epigenetische oder Umweltfaktoren für die klinische Variabilität der Erkrankung relevant sind [Bonnetfont *et al.*, 2004].

Polymorphismen

Zusätzlich zu den pathogenen Mutationen wurden 3 Polymorphismen [V368I, F352C und M647V] bestätigt [Verderio *et al.*, 1993; Wataya *et al.*, 1998]. Diese modulieren zusätzlich die Stabilität bzw. Aktivität des modifizierten Translationsprodukts. Polymorphismen treten in einer korrelierbaren Häufigkeit in Assoziation mit definierten malignen Mutationen auf. Diese Konstitution wird als Haplotyp definiert. Die Modulatoren V368I und M647V treten in Relation mit der S113L-Mutation auf. Die allelischen Frequenzen wurden von Verderio *et al.* (1993, 1995) publiziert. Der Polymorphismus F352C ist vor allem unter der japanischen Bevölkerung verbreitet und konnte in kaukasischen Populationen nicht bestätigt werden [Wataya *et al.*, 1998].

1.3.4 Koinzidenz mit anderen Erkrankungen

Die synergistische Heterozygotie beschreibt die Kombination von partiellen Störungen des Skelettmuskels hinsichtlich des Energiemetabolismus und involviert den CPT2-Mangel, die Adenosinmonophosphat-Deaminase-Störung [AMD-Mangel], die Glykogenspeichererkrankungen Typ V und Typ VII und milde Formen von Atmungskettenerkrankungen. Die Assoziation von einem partiellen AMD-Mangel [Reuschenbach *et al.*, 1988; Sabina *et al.*, 2000] oder Glykogenspeichererkrankung Typ V mit einer partiellen Störung der CPT2 wurde bereits beschrieben und als eine triggerbare Myopathie definiert [Vockley *et al.*, 2000; Vladutiu *et al.*, 2001]. Aufgrund der hohen Häufigkeit des AMD-Mangels [3%] ist dessen pathophysiologische Bedeutung umstritten, da es nicht zur Ausprägung von Symptomen kommt [Reuschenbach *et al.*, 1988].

1.3.5 Therapie

Symptomprävention

Symptomprävention kann durch eine ausreichende Glukoseversorgung forciert werden. Dies hemmt simultan die Lipolyse von adipösem Gewebe und die sequentielle β -Oxidation [Saudubray *et al.*, 1999]. Dies kann durch eine Langzeitkohlenhydratdiät [Ørngreen *et al.*, 2003] mit additiver Gabe mediumkettiger Triglyzeride anstelle von langkettigen Fettsäuren realisiert werden. Fastenphasen sind zu unterbinden. Vor einer sportlichen Belastung kann eine Rhabdomyolyse durch häufige Mahlzeiten mit einer zusätzlichen Kohlenhydrataufnahme vor und während des Ausdauersports reguliert werden. Im Verlauf der Attacken ist eine intravenöse Gabe von Glukoselösung zu empfehlen. Im Vergleich zu der oralen Verabreichung ist durch eine Infusion mehr Glukose frei zugänglich [Angelini *et al.*, 2010]. Smeitink *et al.* (1998) setzten eine Kombination aus Glukose und Insulin intravenös zu, um einerseits die Glukosekonzentration im Plasma aufrecht zu erhalten und andererseits die Lipolyse der Triglyzeride aus dem adipösen Gewebe zu unterbinden. Medikamente wie das Antikonvulsivum Valproinsäure und Pivalinsäure-modifizierte Medikamente [Antibiotika] induzieren eine Rhabdomyolyse und sind für den Einsatz bei CPT2-Mangel-Patienten nicht geeignet [Bieber *et al.*, 1988].

Bezafibrat-Therapie

Das hypolipidämische Medikament Bezafibrat, ein Agonist der PPAR-nukleären Rezeptoren, einer Familie von Transkriptionsfaktoren, wird zur Behandlung von Hypertriglyzeridämien eingesetzt und schützt vor kardiovaskulären Risiken.

Molekularer Wirkungsmechanismus von Bezafibrat

Die Wirkung von Liganden des PPAR, dessen Mechanismus und die Regulation sind in Abb. 1.9 dargestellt. Bezafibrat kontrolliert die muskuläre mitochondriale β -Oxidation und steigert die Proliferation von Peroxisomen, indem es den PPAR-alpha aktiviert. Dieser bindet unter Bildung eines Heterodimers mit dem RXR [*cis*-9-Retinsäure X Rezeptor] [Yu *et al.*, 1998; Brandt *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2000] an Promotorregionen von Genen mit einem Peroxisomen-Proliferator-*response*-Element [PPRE] und transaktiviert diese.

Einfluss von Bezafibrat auf cpt2

Auch die Promotorregion der *cpt2* enthält ein solches PPRE. Daher kann das mRNA-Niveau durch Zugabe dieser Agonisten reguliert werden. Dies ermöglicht die Behandlung des muskulären Typs der CPT2-Erkrankung. Die Wirkung des Medikaments ist zeit- und dosisabhängig [Djouadi *et al.*, 2003].

Folge der Bezafibratapplikation

Das modifizierte Translationsprodukt wird dabei nicht repariert. Jedoch wird durch die vermehrte Generation von CPT2-Protein der funktionale Anteil an CPT2 erhöht. Der für die Aufrechterhaltung der Fettsäureoxidation benötigte Schwellenwert an aktivem Protein kann somit realisiert werden.

Langzeitstudie

Eine Langzeitstudie der Behandlung von Patienten über drei Jahre mit der adulten Form des CPT2-Mangels mit Bezafibrat führte zu einer Verbesserung der Symptome und einer Steigerung der Palmitatoxidation um 39-209 % [Bonfont *et al.*, 2010]. Die Patienten

entwickelten eine verbesserte Laufkapazität, eine gesteigerte Fastentoleranz, eine verminderte Schmerzintensität, eine verspätete Schmerzentwicklung und zeigten eine verkürzte Genesungsphase.

Die Behandlung des infantil/neonatalen Typs, basierend auf einer pleiotropen Expression, führte zu keiner Verbesserung, da die zugrunde liegende Restaktivität des Enzyms zu marginal ist, um durch Proliferation circa 40-50 % reguläres, aktives Protein zu generieren [Bonfont *et al.*, 2010].

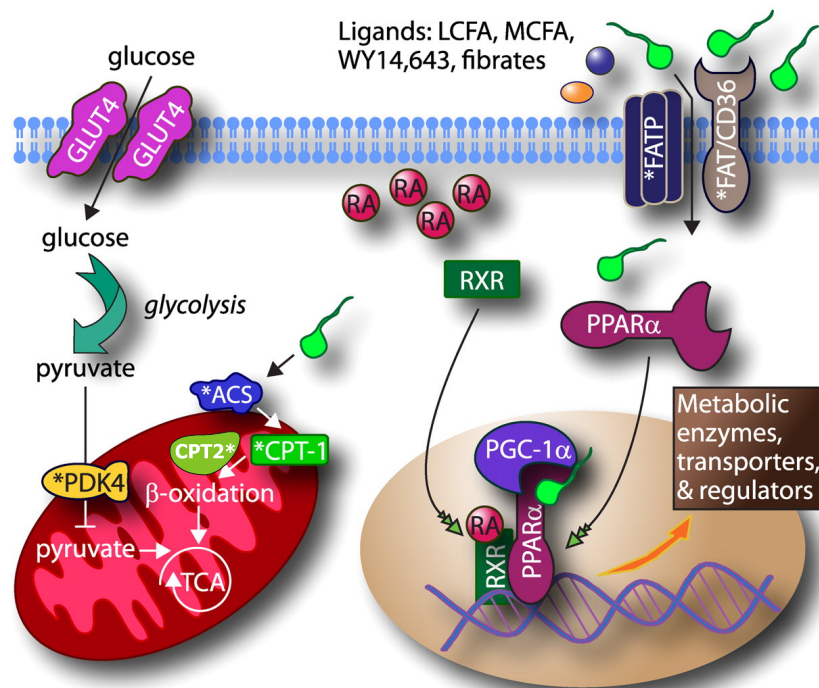


Abb. 1.9 Modifizierte Abbildung nach Lockyer *et al.* (2010). Wirkung von Fettsäuren und Fibraten auf die PPAR-vermittelte Transkription sowie Mechanismus und Regulation von PPAR. PPAR beeinflusst den Energie-Metabolismus mittels transkriptionaler Regulation der Gene *PDK4* [Pyruvatdehydrogenase-Kinase Isoenzym 4], *FATP* [*fatty-acid*-Transporter], *FAT/CD36* [Fettsäure-Transporter CD36], *ACS*, *CPT1* und *CPT2*. Diese Zielgene sind mit einem Stern in der Abbildung markiert. Dies resultiert in einer gesteigerten PPAR-Aktivität, welche Fettsäuren im Vergleich zu Glukose als bevorzugte Energiequelle des oxidativen Metabolismus nutzen. Die Abbildung zeigt einen universellen Mechanismus aller PPAR-Isoformen ungeachtet der Ligandenspezifität und der Zielgene. Der Mechanismus wird durch fünf unabhängige Prozesse realisiert. In einem ersten Schritt erfolgt die Aktivierung von PPAR und dem Retinoid-X-Rezeptor [RXR] durch Ligandenbindung (Fettsäure, Metabolite, Fibrat, 9-*cis*-Retinsäure). Es folgt die nukleäre Translokation der Liganden-gebundenen nukleären Rezeptoren, an die sich die Heterodimerisierung von PPAR und RXR und dessen Bindung an ein DNA-*response*-Element in der Promotorregion des Zielgens anschließt. Der vierte Schritt besteht aus der Rekrutierung von Kofaktoren, wie PGC-1 [*Peroxisomen-Proliferator-aktivierender Rezeptor γ-Koaktivator-1α*], welcher die Acetylierung von Histonen fördert und somit der RNA-Polymerase den Zugang zur DNA gewährt. In einem letzten Schritt erfolgt die Gentranskription. Die gesteigerte Kinaseaktivität der PDK4, begünstigt durch die erhöhte Aktivierung von PPAR, resultiert in einem inhibitorischen Effekt auf den Pyruvatdehydrogenase-Komplex. GLUT4: Glukose-Transporter 4, LCFA: langkettige Fettsäuren, MCFA: mediumkettige Fettsäuren, PGC: PPAR-Koaktivator, RA: Retinsäure, TCA: Zitronensäurezyklus.

1.4 Zielstellung der Dissertation

Der Fokus der vorliegenden Dissertation liegt auf der rekombinanten Herstellung und Etablierung einer Reinigungsstrategie für das humane Wildtypprotein CPT2 sowie ausgewählten, krankheitsauslösenden Varianten. Die Proteinspezies und einzelne Varianten aus *Rattus norvegicus* sind der aktuellen Literatur zufolge rekombinant in verschiedenen Zellsystemen [*E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, Baculovirus, COS-Zellen] erzeugt worden [Woeltje *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1994a; Johnson *et al.*, 1995; de Vries *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2002]. Rufer *et al.* und Hsiao *et al.* entwickelten 2006 unabhängig voneinander zwei Reinigungsstrategien für die Ratten-CPT2. Der humane Wildtyp-Konterpart und Varianten konnte bisher nur in Fibroblasten-, Lymphoblasten- oder Myoblastenkulturen und transfizierten COS-Zellen gewonnen und anschließend als Zell-Lysat mit potentiellen Nebenreaktionen charakterisiert werden [Taroni *et al.*, 1992,1993; Yao *et al.*, 2008]. Daher war es wünschenswert, ein valides Proteinreinigungssystem bis hin zur Homogenität des humanen CPT2-Proteins zu etablieren. Die Nutzung eines Expressionssystems ohne eine endogene CPT2-Aktivität war vorgesehen. Demzufolge standen das *Pichia pastoris*- und das *E. coli*-Expressionssystem zur Wahl. Um die Reinigung des Proteins zu vereinfachen, war die Insertion eines N-terminalen Hexahistidin-tags wünschenswert. Mittels eines zur Homogenität gereinigten CPT2-Proteins ließen sich anschließend *in vitro*-Versuche zu Aktivität, Spezifität und weitere biochemische Charakterisierungen durchführen, um den isolierten, durch hCPT2 verursachten Einfluss auf Erkrankungen zu determinieren. Bisher standen wie bereits beschrieben, nur humane, von Nebenreaktionen beeinflusste Zell-Lysate zur Verfügung. Aufgrund der Existenz einer Vielzahl pathogener Mutationen mit der Folge eines CPT2-Mangels war es zudem erstrebenswert, gezielte ortsgerichtete Mutagenesen von prominenten isolierten Mutationen und definierten Haplotypen zu realisieren. Der Einfluss der Mutationen ließe sich somit ebenfalls erstmals *in vitro* untersuchen und mit dem Wildtyp-enzym vergleichen [Aktivitätstest, Substratspezifität, Inhibitorstudien].

Die Stabilität des Proteins im Hinblick auf verschiedene pathogene Einflüsse war ein Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion der vergangenen Jahre [Taroni *et al.*, 1992,1993; Yao *et al.*, 2008; Vladutiu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1998; Wataya *et al.*, 1998; Thuillier *et al.*, 2003; Wieser *et al.*, 1997]. Die experimentelle Aufnahme der Datensätze erfolgte jedoch ebenfalls auf Grundlage von Zell-Lysaten anstelle eines isolierten Proteins. Ein Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Stabilität des Wildtypproteins und der Varianten in einem isolierten System zu charakterisieren, um somit äußere Einflüsse aus Lysaten ausschließen zu können. Daraus könnten direkte Schlussfolgerungen hinsichtlich des Einflusses definierter Mutationen gezogen und die kinetische Halbwertszeit sowie weitere Stabilitätsparameter ermittelt werden. Darauf aufbauend wären wichtige Aussagen zur molekularen Basis der CPT2-Erkrankungen zu treffen. Um die molekularen Schlussfolgerungen der CPT2-Erkrankungen wiederum in den Kontext des zellulären Systems stellen zu können, sind Einblicke in die Regulation anderer Gene durch die genetische Prädisposition des CPT2-Mangels von Interesse. Aus diesem Grund wäre die Durchführung einer *MicroArray*-Analyse auf Basis von humanen Kontrollmuskelpalten vergleichend mit Muskelmaterial genetisch gesicherter Proben relevant. Der signifikant veränderte Genstatus sollte in der Folge mittels *real time*-PCR verifiziert werden. Hiermit könnten Kenntnisse über die Regulationsmechanismen Stoffwechsel-verwandter oder -fremder Gene oder Transkriptionsfaktoren bzw. die Veränderung ganzer Gengruppen erlangt werden. Des Weiteren könnten nicht bekannte Gene lokalisiert und für weitere Studien zur Verfügung gestellt werden.

2 Materialien & Chemikalien

2.1 Chemikalien

2.1.1 Chemikalien, Antibiotika, Substrate

Chemikalien

4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
 Agar-Agar
 Agarose
 Ammoniumperoxodisulfat [APS]
 Bacto™Trypton
 Benzamidin
 Borsäure
 Bromphenolblau Natriumsalz
 Chloroform
 Coomassie Brilliant Blau G
 D-Glukose
 di-Kaliumhydrogenphosphat
 dNTP-Mix
 D-Sorbitol
 Dithiothreitol [DTT]
 Eisessig
 Ethanol
 Ethidiumbromid
 Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA]
 Ficoll-400
 Glyzerin
 Glycin
 Guanidinhydrochlorid
 Hefeextrakt
 Imidazol
 Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid [IPTG]
 Isopropanol
 Isoamylalkohol
 Kaliumchlorid
 Kaliumdihydrogenphosphat
 Kaliumhydroxid
 Kodak GBX *developer and replenisher*
 Kodak GBX *fixer and replenisher*
 Leupeptin
 Magnesiumchlorid
 Magnesiumsulfat
 Methanol

Hersteller

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 Invitrogen, USA
 Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
 Becton, Dickinson & Co., USA
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
 Merck KGaA, Darmstadt
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 Stratagene, USA
 Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
 Merck KGaA, Darmstadt
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 Merck KGaA, Darmstadt
 Merck KGaA, Darmstadt
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 Merck KGaA, Darmstadt
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.2 Materialien

2.2.1 Bakterien, Plasmide, Klone, Enzyme, Antikörper & sonstige Materialien

Kompetente Zellen

Escherichia coli BL21 Gold DE3
Escherichia coli TOP10
Escherichia coli TOP10F'
Escherichia coli XL10Gold
Pichia pastoris X-33
Pichia pastoris GS115
Pichia pastoris KM71H

Hersteller

Stratagene, USA
 Invitrogen, USA
 Invitrogen, USA
 Stratagene, USA
 Invitrogen, USA
 Invitrogen, USA
 Invitrogen, USA

Plasmide

pCR2.1-TOPO
 pET-28a(+)
 pPICZ B

Hersteller

Invitrogen, USA
 Novagen (Merck KGaA), Darmstadt
 Invitrogen, USA

Klon

IRAU *human full length* cDNA pOTB7/*hcpt2*

Hersteller

RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH), Berlin

Enzyme

Antarctic Phosphatase [50U/μL]
Avr II
Bam H I
Benzonase Nuclease [250U/μL]
Bsg I
Bst X I
Dpn I
High T4 DNA-Ligase [2000U/μL]
Kpn I
 Lysozym [20000U/mg]
 Lyticase [20U/μL]
Nhe I
Pfu Turbo DNA Polymerase [2.5U/μL]
Pfu Ultra HF DNA Polymerase [2.5U/μL]
RNase A [7U/μL]
Taq DNA Polymerase [5U/μL]
 Thrombin [1U/μL]
Xba I
 Zymolyase [20000U/g]

Hersteller

New England Biolabs, USA
 New England Biolabs, USA
 New England Biolabs, USA
 Novagen (Merck KGaA), Darmstadt
 New England Biolabs, USA
 New England Biolabs, USA
 New England Biolabs, USA
 New England Biolabs, USA
 New England Biolabs, USA
 AppliChem GmbH, Darmstadt
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 New England Biolabs, USA
 Stratagene, USA
 Stratagene, USA
 Qiagen GmbH, Hilden
 Qiagen GmbH, Hilden
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 New England Biolabs, USA
 Seikagaku Corporation, Japan

Antikörper

Anti-CPT2 (H-300), *polyclonal, rabbit*
 Anti-CPT2 1G7, *monoclonal, mouse*
 Anti-CPT2, *polyclonal, rabbit*, HPA028201
 Anti-CPT2, *polyclonal, rabbit*, HPA028202
 Anti-His HRP (C-terminal)
 Donkey anti goat HRP
 Donkey anti mouse HRP
 Goat anti rabbit HRP

Hersteller

Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
 Abnova, Taiwan
 Atlas Antibodies, Schweden
 Atlas Antibodies, Schweden
 Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
 Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
 Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
 Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

Sonstige Materialien:Kits

Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents
 BugBuster®MasterMix
 EasySelect™Pichia Expression-Kit
 ECL Direct Labelling And Detection System
 Qiagen Plasmid Midi Kit
 PureLink PCR Purification Kit
 PureLink Quick Gel Extraction Kit
 QIAprep Spin Miniprep Kit
 QuantiTect®Reverse Transcription Kit
 Quik Change Multi Site Directed Mutagenesis Kit
 RNeasy®Microarray Tissue Kit
 TOPO TA Cloning®Kit

Hersteller

GE Healthcare, Europe
 [Novagen (Merck KGaA), Darmstadt]
 Invitrogen, USA
 GE Healthcare, Europe
 Qiagen GmbH, Hilden
 Invitrogen, USA
 Invitrogen, USA
 Qiagen GmbH, Hilden
 Qiagen GmbH, Hilden
 Stratagene, USA
 Qiagen GmbH, Hilden
 Invitrogen, USA

DNA, RNA & Protein Marker

1 kb DNA-Leiter
 25 bp DNA-Leiter
 Cruz Marker Standard Protein-Molekulargewicht
 DNA-Marker II
 DNA-Marker X
 PageRuler Plus *Prestained* Protein Ladder
 Perfect Protein Western Marker
 ssRNA Leiter
Supercoiled DNA Leiter

Hersteller

New England Biolabs, USA
 Invitrogen, USA
 Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
 Novagen (Merck KGaA), Darmstadt
 New England Biolabs, USA
 Invitrogen, USA

Säulen

HighLoad 26/60 Superdex
 HisTrap™ HP Columns
 High Load Q-Sepharose 26/10

Hersteller

GE Healthcare, Europe
 GE Healthcare, Europe
 GE Healthcare, Europe

blotting-Membranen

Amersham Hybond™-N⁺
 Immobilon-P, 0,45 µm, PVDF Membran

Hersteller

GE Healthcare, Europe
 Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Dialysemembran

Float-a-Lyzer G2 8-10 kDa
 Float-a-Lyzer G2 20 kDa

Hersteller

SPECTRUM®LABORATORIES, INC., USA
 SPECTRUM®LABORATORIES, INC., USA

Konzentratoren

Vivaspin 20 MWCO 10000

Hersteller

Sartorius AG, Göttingen

KüvettenPMMA 1,5 mL Plastikkuvetten
Präzisionsquarz-KüvettenHerstellerBrand GmbH+CO KG, Wertheim
HELLMA GmbH & Co KG, Mühlheim**2.2.2 Geräte & Software**GeräteUV-Vis-Spektrophotometer:
Spectrophotometer DU800Hersteller

Beckman Instruments Inc., USA

CD-Spektropolarimeter:
JA-810

Jasco Inc., USA

Zentrifugen:

Avanti J20
Beckman L8-60M Ultrazentrifuge
Beckman J2-HC Zentrifuge
Zentrifuge 5415R
Biofuge fresco
MiniSpinBeckman Instruments Inc., USA
Beckman Instruments Inc., USA
Beckman Instruments Inc., USA
Eppendorf AG, Hamburg
Heraeus Holding GmbH, Hanau
Eppendorf AG, Hamburg

Fermenter:

Biostat C-DCU 3

B.Braun Biotech International GmbH,
Melsungen*french press:*

Gaulin Hochdruckhomogenisator

APV Homogeniser GmbH, Unna

FPLC-System:

ÄKTA Purifier

GE Healthcare, Europe

Massenspektrometer:

Ultraflex-II TOF/TOF

Bruker Daltronic, Bremen

Inkubationsschüttler:

Bühler Schüttler SM-30; Inkubationshaube TH 30

Edmund Bühler GmbH & Co KG,
Hechingen

PCR-Cycler:

Mastercycler *gradient*
Mastercycler *personal*Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf AG, Hamburg

Thermomixer: Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
PAGE-Elektrophorese Kammer: SE 250 <i>Mighty Small</i> Elektrophoresekammer	Hoefer, Inc., USA
Agarose-Gelelektrophoresekammer: Normalformat Elektrophoresekammer A2, Gator	OWL Scientific Inc., USA
<i>real time</i> PCR-Cycler: LightCycler 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim
UV-Crosslinker: UVC500	Hoefer, Inc., USA
Hybridisierungssofen: OV 11	Biometra GmbH, Göttingen
<i>Semidry Blotter</i> : UniBlot M-SC/150 Semidry Blotter	Brenzel Bioanalytik, Lahntal
Transformationsgerät: GenePulser II	Bio-Rad Laboratories GmbH, USA
Lichtstreuung:	Eigenbau Dr. Klaus Gast, Universität Potsdam, Golm
Homogenisator: TissueRuptor	Qiagen GmbH, Hilden
Titration: ML504B Dispenser	Hamilton Company, USA
<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
BioEdit Sequence Alignment Editor	Hall <i>et al.</i> , 1999
Endnote V7.0	Thomson ISI ResearchSoft, USA
GeneRunner V3.05	Hastings Software Inc., USA
KaleidaGraph V4.0	Synergy Software, USA
Microsoft Excel V2003	Microsoft Corporation, USA
pDRAW32 Version 1.1.108	AcaClone Software, USA
Pymol Version 2006	DeLano Scientific LLC, USA

3 Mikrobiologische Methoden

3.1 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli* -Stämmen

Die Anzucht der *Escherichia coli* -Stämme erfolgte durch Schüttelinkubation bei 37 °C und 225 rpm in LS-LB-Medium [1 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, pH 7,5] oder LB-Medium [1 % [w/v] Trypton, 1 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, pH 7]. Je nach Antibiotikaresistenz der vektortragenden Zellen wurden 25 µg/mL Zeocin, 30 µg/mL Kanamycin oder 50 µg/mL Ampicillin zugegeben. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Trübung bei 600 nm gegen Medium verfolgt. Die langfristige Lagerung der Bakterienstämme erfolgte durch das Herstellen von Glycerinkulturen. Zu 600 µL einer frisch angezogenen Bakterienkultur mit einer optischen Dichte zwischen 0,8 – 1,0 wurden 400 µL steriles 85 %iges Glycerin gegeben. Die Kulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

3.2 Anzucht und Lagerung von *Pichia pastoris* -Stämmen

Die *Pichia pastoris* -Stämme X-33 (Wildtyp), GS115 (*his4*) und KM71H (*arg4 aox1::ARG4*), sowie die Positivkontrolle GS115/pPICZ/*lacZ* wurden in Verbindung mit dem EasySelect™ *Pichia* Expression-Kit von der Firma Invitrogen (USA) bezogen.

Die parentalen *Pichia pastoris* -Stämme oder Zellkulturen mit integriertem Plasmid wurden bei 30 °C und 150 rpm in YPD/Zeo-Medium [1 % Hefeextrakt [w/v], 2 % Pepton [w/v], 2 % Glukose [w/v], 100 µg/mL Zeocin] angezogen. Das Anlegen von Glycerinkulturen erfolgte durch das Herstellen von 5 mL frischem *Pichia pastoris*-Stamm, welcher bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 1,3-1,5 in YPD/Zeo-Medium vermehrt wurde. Zu 800 µL Kultur wurden 200 µL steriles 85 %iges Glycerin gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

3.3 Transformation in *Escherichia coli*

Das für die Transformationen verwendete SOC-Medium wurde von der Firma Invitrogen, USA erworben.

3.3.1 Transformation in elektrokompetente *E. coli*-Zellen

Die elektrokompetenten *E. coli*-TOP10F' Zellen wurden von der Firma Invitrogen, USA bezogen. 1 µL der zu transformierenden DNA wurde auf Eis mit 40 µL elektrokompetenten Zellen gemischt und umgehend mittels Elektroporation am GenePulser II [25 µF/ 200 Ω/ 2,5 kV] transformiert. Nach sofortiger Zugabe von 480 µL temperiertem SOC-Medium schloss sich eine einstündige Inkubationsphase bei 37 °C und 225 rpm an. Der Transformationsansatz wurde unter Einsatz verschiedener Volumina auf LS-LB/Zeo-Platten [1 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 2 % [w/v] Agar-Agar, 25 µg/mL Zeocin, pH 7,5] oder LB/Kan-Platten [1 % [w/v] Trypton, 1 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 2 % [w/v] Agar-Agar, 30 µg/mL Kanamycin, pH 7] ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C temperiert.

3.3.2 Transformation in chemokompetente *E. coli*-Zellen

Die chemokompetenten TOP10-Zellen wurden im Zusammenhang mit dem TOPO TA *cloning*-Kit von der Firma Invitrogen (USA), die ultrakompetenten XL10 Gold-Zellen in Verbindung mit dem QuikChange®Multi *Site-Directed Mutagenesis*-Kit sowie die chemokompetenten BL21 GoldDE3-Zellen von der Firma Stratagene (USA) bezogen.

100 µL chemokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 1-2 µL zu transformierende DNA [20ng/µL] wurden zugegeben und 20 bis 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzepuls für 20 bis 30 s in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 42 °C erfolgte das Einbringen der DNA in die Bakterienzellen. Die Probe wurde weitere 2 min auf Eis gelagert, danach 900 µL temperiertes SOC-Medium zupipettiert. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz und zur Erholung von dem Transformationsschock erfolgte die Inkubation des Ansatzes für 1 h bei 37 °C und 225 rpm. Variierende Volumina des Transformationsansatzes wurden anschließend auf LB/Kan-Platten [1 % [w/v] Trypton, 1 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 2 % [w/v] Agar-Agar, 30 µg/mL Kanamycin, pH 7] oder LB/Amp/X-Gal-Platten [1 % [w/v] Trypton, 1 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 2 % [w/v] Agar-Agar, 50 µg/mL Ampicillin, pH 7 + 40 µL 40 mg/mL X-Gal] ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C temperiert.

3.4 Transformation in *Pichia pastoris*

Aus Glycerinkulturen der parentalen *Pichia pastoris*-Stämme wurden auf YPD/Zeo-Platten [1 % Hefeextrakt [w/v], 2 % Pepton [w/v], 2 % Glukose [w/v], 2 % Agar-Agar [w/v], 100 µg/mL Zeocin] mittels Verdünnungsausstrich Einzelkolonien gewonnen, die die Basis zur Herstellung elektrokompenter Zellen bildeten. Isolierte Kolonien wurden gepickt und jeweils in 5 mL YPD/Zeo-Medium überführt. Die Schüttelinkubation erfolgte bei 30 °C über Nacht. Aus der Vorkultur wurden 100 µL Zellen in 500 mL frisches YPD/Zeo-Medium überführt und bei 30 °C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3-1,5 vermehrt. Daran schloss sich die Ernte der Zellen bei 1500g für 5 min an. Das Pellet wurde mit 500 mL eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert, erneut bei 1500g für 5 min zentrifugiert und die Zellen in 250 mL gekühltem sterilem Wasser aufgenommen. Daran schloss sich ein weiterer Sedimentationsschritt bei 1500g für 5 min an. Der Rückstand wurde in 20 mL eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert, nochmals zentrifugiert und final in 2 mL 1 M Sorbitol aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen waren auf Eis zu lagern und am gleichen Tag zu verbrauchen [Manual, EasySelect™*Pichia* Expression-Kit].

10 µg *Bst* X I-linearisiertes parentales Plasmid pPICZ B oder pPICZ/*cpt2* und 80 µL kompetente Zellen wurden gemischt, in eine auf Eis gelagerte Elektroporationsküvette überführt und 5 min inkubiert. Es schloss sich die Elektroporation des Gemisches am Gene Pulser II [Bio-Rad Laboratories GmbH, USA] an [1,5 kV/25 µF/200 Ω]. Danach wurden sofort 1 mL eiskaltes 1 M Sorbitol zupipettiert und die Transformationsreaktion für 1,5 h bei 30 °C temperiert. Different Volumina [10-100 µL] wurden auf YPDS/Zeo-Platten [1 % Hefeextrakt [w/v], 2 % Pepton [w/v], 2 % Glukose [w/v], 1 M Sorbitol [w/v], 2 % Agar-Agar [w/v], 100 µg/mL Zeocin] ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte zwischen 3–10 Tagen bei 30 °C.

Die Linearisierung des parentalen Vektors pPICZ B bzw. des Konstrukts pPICZ/*cpt2* hatte das Ziel, die Rekombination des DNA-Fragments in *Pichia pastoris* nach der Transformation zu stimulieren, welche in der 5'*aox1*-Region nach Einbringen des Zielgens hinter den *aox1*-Promotor erfolgte.

3.5 Phänotypisierung der *Pichia pastoris*-Transformanten

Es war erforderlich, den Phänotyp der Transformanten zu überprüfen um zu zeigen, dass eine korrekte Rekombination vorliegt. Die Stämme X-33 und GS115 besitzen generell einen Mut⁺-Phänotyp, da die homologe Rekombination *via single crossover* am *aox1*-Lokus erfolgt. Da das Plasmid eine *aox1*-Sequenz trägt [Plasmidkarte pPICZ B im Anhang, Abb. 10.3], besteht die Möglichkeit der Rekombination in der 3'*aox1*-Region, welches das Wildtyp *aox1*-Gen zerstört. Dies führt zu einem Mut^S-Phänotyp.

Dieses Erscheinungsbild weisen auch Transformanten des Stammes KM71H auf und mussten ferner nicht klassifiziert werden. Der Einsatz von Minimalmedien half bei der Phänotypisierung. Auf YPDS/Zeo-Platten [1 % Hefeextrakt [w/v], 2 % Pepton [w/v], 2 % Glukose [w/v], 1 M Sorbitol [w/v], 2 % Agar-Agar [w/v], 100 µg/mL Zeocin] gewachsene Einzelkolonien wurden nochmals auf frische Platten überimpft und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Es schloss sich der Ausstrich der entstandenen Kolonien auf Selektivmedien an. Eine Kolonie wurde sowohl auf Minimal-Dextrose-Medium [MD] als auch auf Minimal-Methanol-Medium [MM] überführt und 3 d bei 30 °C inkubiert. Diese Schritte wurden einmal wiederholt.

In Tabelle 3.1 ist die Phänotypisierung der Transformationsstämme auf Selektivmedien wiedergegeben.

Tab. 3.1 Phänotypisierung der *Pichia pastoris*-Transformationsstämme auf definierten Selektivmedien [MD: Minimal-Dextrose-Medium, MM: Minimal-Methanol-Medium, MMH: Minimal-Methanol+Histidin-Medium, MDH: Minimal-Dextrose+Histidin-Medium].

Transformationsstamm	Selektivmedium
X33	MM / MD
GS115	MMH / MDH
KM71H	MM / MD

4 Molekularbiologische Methoden

Der Klon IRAUp969H109D6 wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) (Berlin) erworben und diente als Basis für alle molekulargenetischen Arbeiten. Dabei handelte es sich um GeneHogs DH10B-Zellen, die einen pOTB7-Vektor trugen, auf dem das Gen der humanen Carnitin-Palmitoyltransferase 2 als *full length*-cDNA mittels der Restriktionsschnittstellen *Eco* RI (5'-Ende) und *Xho* I (3'-Ende) eingefügt war [pOTB7/*cpt2*].

Es folgte das Umklonieren des *cpt2*-Gens in den *shuttle*-Vektor pPICZ B, wobei C-terminal ein Hexahistidin-*tag* [His₆-] inseriert wurde, der die Proteinreinigung vereinfachen sollte. Da das Gen eine Sequenz enthielt, welche für ein Signalpeptid codierte, wurde diese mittels ortsgerichteter Mutagenese mit Hilfe der in Tab. 4.3 zusammengefassten Mutagenese-Primer der Firma Invitrogen (USA) entfernt.

Die anschließende Sequenzierung [Eurofins MWG Biotech GmbH, Ebersberg] des Gens *cpt2* demaskierte 3 Punktmutationen. An Position 338 wurde ein Austausch der Base Cytosin zu Thymin nachgewiesen und führte zu einer Substitution der Aminosäure Serin113 zu Leucin. Die zweite Punktmutation wurde an Position 1102 identifiziert. Hier wurde die Base Guanin durch Adenin ersetzt, was auf Proteinebene einen Austausch der Aminosäure Valin368 zu Isoleucin zur Folge hatte. Die Mutation der Base Adenin an Position 1939 zu Guanin bedingt die Modifikation der Aminosäure Methionin647 zu Valin. Da die detektierten Mutationen S113L, V368I und M647V in dieser Konstellation im Protein von Patienten real existent sind [Anichini *et al.*, 2011], ergab sich die Möglichkeit, diese Proteinvariante als *triple*-Variante in die vorliegende Forschungsarbeit zu integrieren. Trotzdem war es erforderlich, das Wildtypenzym und die prominenteste Variante des CPT2-Mangels, die S113L-Mutation, ausgehend von der *triple*-Variante [TV] durch multiple ortsgerichtete Mutagenese [QuikChange®Multi Site Directed Mutagenesis-Kit, Stratagene, USA] zu generieren.

4.1 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

4.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Aufnahme der Messdaten erfolgte spektroskopisch bei 260 nm. Es wurde eine Basislinie mit 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Die Nukleinsäuren wurden im selben Puffer verdünnt. Um die Signifikanz der Bestimmung zu sichern, war es erforderlich, Absorptionsmessungen in einem Bereich zwischen 0,15 und 1 in einer reduzierten Quarzküvette mit einem Volumen von 100 µL durchzuführen. Da Proteine ebenfalls im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, könnten diese als Kontamination der Nukleinsäureprobe zu verfälschten Konzentrationsberechnungen führen. Eine Aussage zur Reinheit der Nukleinsäuren konnte durch die Bildung des Quotienten $A_{260/280}$ gewonnen werden. Werte zwischen 1,8 und 2,1 zeugen von einer reinen Nukleinsäureprobe. Geringere Verhältnisse $A_{260/280}$ deuten auf eine Verunreinigung mit Protein oder Phenol hin [Cornel Mülhardt, 2006].

Die Kontamination von DNA mit RNA kann durch den Verdau mit RNase A [Kapitel 4.4] minimiert werden. Die Bestimmung der DNA-Konzentration c_{DNA} ergibt sich aus Gleichung 4.1.

$$c_{\text{DNA}} = A_{260} \cdot 50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \cdot \text{DF} \quad \text{DF= Verdünnungsfaktor} \quad \text{Gl. 4.1}$$

Um die Verunreinigungen von DNA in RNA zu verringern, wurden die Proben mit DNase I verdaut. Die Berechnung der RNA-Konzentration c_{RNA} ergibt sich aus Gleichung 4.2.

$$c_{\text{RNA}} = A_{260} \cdot 44 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \cdot \text{DF} \quad \text{DF= Verdünnungsfaktor} \quad \text{Gl. 4.2}$$

Eine weitere Alternative der Konzentrationsermittlung ist die Bestimmung der Integrität der RNA mittels Agilent 2100-Bioanalyzer [Agilent Technologies, USA]. Die ribosomale RNA ist in Form von 2 Banden zu visualisieren.

Das apparente Verhältnis der 28S-rRNA zu 18S-rRNA beträgt 2:1. Die RIN [RNA *integrity number*] lässt eine Interpretation der RNA-Integrität zu. Die Qualität der RNA wird stark von der Art der Lagerung der Proben, wie zum Beispiel der Lagerung von Muskelbiopsien, beeinflusst.

4.1.2 Restriktionsverdau mittels Endonukleasen

Der Restriktionsverdau der erzeugten DNA-Fragmente erfolgte mit den in Tabelle 4.1 aufgeführten Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (USA) und führte zur Generierung von *sticky ends*, die für die Ligation obligat waren. Dabei wurden in einem 50 µL Reaktionsansatz pro µg DNA 1 bis 4 U Restriktionsenzym eingesetzt und zwischen 1 h und 3 h in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei vorgeschriebener Temperatur inkubiert. Die Enzyme wurden vorschriftsgemäß hitzeinaktiviert und der Ansatz mittels PureLink™PCR Purification-Kit [Invitrogen, USA] gereinigt.

Tab. 4.1 Restriktionsendonukleasen zur Generierung spezifischer Größenfragmente zur Analyse der Fragmentlängen oder der Herstellung definierter Enden der DNA-Fragmente zur Ligation. Inkubations-, Puffer- und Inaktivierungsbedingungen sind wiedergegeben. $T_{\text{Inkub.}}$: Inkubationstemperatur in °C, $T_{\text{Inakt.}}$: Hitzeinaktivierungstemperatur in °C. *¹ keine Hitzeinaktivierung möglich.

Enzym	$T_{\text{Inkub.}}$ [°C]	$T_{\text{Inakt.}}$ [°C]	Puffer
<i>Bst</i> X I	55 °C	65 °C, 20 min	NEB 3
<i>A</i> / <i>W</i> N I	37 °C	65 °C, 20 min	NEB 4
<i>Avr</i> II	37 °C	---* ¹	NEB 2
<i>Bam</i> H I	37 °C	---* ¹	NEB U
<i>Bsg</i> I	37 °C	65 °C, 20 min	NEB 4
<i>Dpn</i> I	37 °C	80 °C, 20 min	NEB 4
<i>Kpn</i> I	37 °C	---* ¹	NEB 1
<i>Nde</i> I	37 °C	65 °C, 20 min	NEB 4
<i>Nhe</i> I	37 °C	65 °C, 20 min	NEB 2
<i>Not</i> I	37 °C	65 °C, 20 min	NEB 3
<i>Xba</i> I	37 °C	65 °C, 20 min	NEB 2

4.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Religation von geschnittenen Vektoren zu unterbinden, wurden dessen Enden nach der Restriktion dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz wurde mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und 1 U *Antarctic Phosphatase* pro µg Plasmid versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Termination der Reaktion wurde durch eine fünfminütige Inkubation bei 65 °C erreicht. Die Proben wurden einer Reinigung unter Verwendung des PureLink™PCR Purification Kits [Invitrogen, USA] unterzogen.

4.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

In einen 20 µL Reaktionsansatz wurden 25 ng–75 ng doppelverdautes, linearisiertes Plasmid mit einem fünffach molaren Überschuss des *Insert*-Fragments gemischt. Nach Zugabe von 1 µL *High* T4 DNA-Ligase [New England Biolabs, USA] erfolgte die Reaktion in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem für 2 h bei RT oder bei 16 °C über Nacht.

Nach anschließender Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min wurden 2 µL des Ligationsansatzes direkt zur Transformation in chemokompetente Zellen eingesetzt. Um die Ligationsreaktion mittels Elektroporation in Bakterienzellen einbringen zu können, war es erforderlich, die Probe gegen Wasser für 1 h zu dialysieren. 1 µL dialysierte Ligationsfragmente wurden für eine Transformation in elektrokompente Zellen eingesetzt.

4.1.5 Polymerase-Kettenreaktion

4.1.5.1 Primer

Alle PCR-Primer wurden von der Firma Invitrogen (USA) bezogen und sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Schmelztemperaturen wurden vom Hersteller berechnet und zur Verfügung gestellt.

Tab. 4.2 PCR-Primer für die Amplifikation des Gens *cpt2* aus pOTB7/*cpt2*, für das Anfügen von spezifischen Schnittstellen zur Ligation und die Generierung von Sonden zur Anwendung im Southern *blotting*. Die Sequenz der Primer, deren Orientierung, die GC-Gehalte in % und die von Invitrogen (USA) berechneten Schmelztemperaturen in °C sind wiedergegeben. Die Sequenzen der anzufügenden Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

PCR-Primer	Richtung	Primersequenz	GC-Gehalt	T _M [°C]
PCR-Pr.1 [<i>Kpn</i> I]	<i>forward</i>	5'-ACT ACA <u>GGT ACC</u> TAG ACT CCA GAA CTC CCC ACT T-3'	50 %	59,25
PCR-Pr.2 [<i>Avr</i> II]	<i>reverse</i>	5'-GAC GTA <u>CCT AGG</u> ACA CTT TTG ATG GAT TTG CCT TCT-3'	44 %	59,14
PCR-Pr.3	<i>forward</i>	5'-AGT CGG CCC ATG AGC GC-3'	70 %	60,7
PCR-Pr.4	<i>reverse</i>	5'-CGA GTC CAC TTT CCT CAG G-3'	57 %	53,6
PCR-Pr.5	<i>forward</i>	5'-TGC GTC CAG TTT CAG AGA G-3'	52 %	58,0
PCR-Pr.6	<i>reverse</i>	5'-ACT TTT GAT GGA TTT GCC TTC-3'	43 %	58,0
PCR-Pr.7 [<i>Nde</i> I]	<i>forward</i>	5'-GTC <u>CAT ATG</u> AGC GCC GGC TCC GG-3'	69 %	66,0
PCR-Pr.8 [<i>Not</i> I]	<i>reverse</i>	5'-CGC <u>GCG GCC GCT</u> TAA CTT TTG ATG GAT TTG CCT TCT AAG-3'	51 %	61,0

4.1.5.2 Amplifikation des *cpt2*-Gens aus *pOTB7/cpt2*

Basierend auf der beigelegten Sequenz des Plasmids *pOTB7/cpt2* wurden genspezifische Primer generiert. Dies erfolgte mittels OligoPerfect™ Designer [Invitrogen, USA] bzw. der GeneRunner-Software Version 3.05 [Hastings Software, Inc., USA]. Die Amplifikation des *cpt2*-Gens wurde mittels PCR unter Einsatz der PCR-Primer 1 und 2 [Tab. 4.2] realisiert. Primer 1 enthielt eine *Kpn* I-Schnittstelle, Primer 2 eine *Avr* II-Schnittstelle. Das Konstrukt *pOTB7/cpt2* diente als Matrize. Die Plasmidkarte des Vektors *pOTB7* ist im Anhang unter Abb. 10.5 eingefügt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

I.	initiale Denaturierung	1 Zyklus	95 °C	1 min
II.	Denaturierung	40 Zyklen	95 °C	20 s
	<i>annealing</i>		55,2-60,6 °C	20 s
	Elongation		72 °C	40 s
III.	finale Elongation	1 Zyklus	72 °C	3 min

Bei der PCR kamen jeweils 150 nM Primer 1 und 2, sowie 0,8 mM dNTP-Mix [Stratagene, USA] und 0,05 U/μL PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase [Stratagene, USA] zum Einsatz.

4.1.5.3 PCR-Analyse von *Pichia pastoris*-Integrationsprodukten

Die Integration der DNA in das *Pichia pastoris*-Genom ließ sich mittels PCR-Technik nachweisen. Dazu musste die genomische DNA der Hefestämme isoliert und einem RNase A-Verdau [Kap. 4.4] unterzogen werden. Als positive Amplifikationskontrolle diente der Stamm GS115/pPICZ/*lacZ*.

Die PCR zum Nachweis von positiven Transformanten wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

I.	initiale Denaturierung	1 Zyklus	94 °C	5 min
II.	Denaturierung	35 Zyklen	94 °C	1 min
	<i>annealing</i>		55 °C	1 min
	Elongation		72 °C	2 min 25 s
III.	finale Elongation	1 Zyklus	72 °C	7 min

Es kamen jeweils 500 nM 5'AOX-1F und 3'AOX-1R [SeqPr. 1 und 3, Tab. 4.4, Kapitel 4.7.1], 2 mM dNTP-Mix, 2,5 mM MgCl₂, 0,5x Q-Solution [Qiagen GmbH, Hilden], 80 pg/μL genomische DNA und 0,05 U/μL Taq-Polymerase [Qiagen GmbH, Hilden] zum Einsatz. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese [Kapitel 4.5].

4.1.5.4 Generierung von DNA-Sonden

Für die Detektion des *cpt2*-Gens mittels Southern *blotting* wurden 2 Sonden konstruiert, für den Nachweis des *aox1*-Gens 1 Sonde mittels PCR-Technik generiert. Diese sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

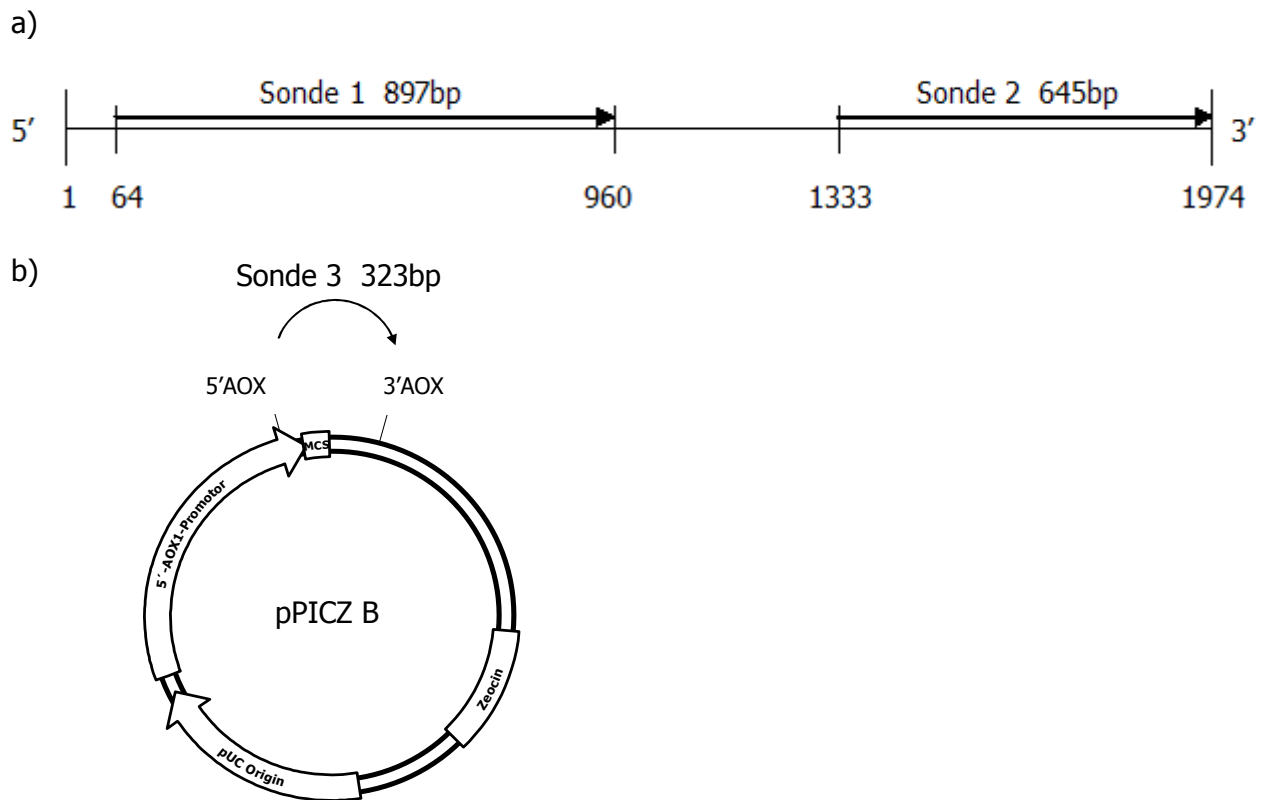


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Positionen der Sonden 1 und 2 im *cpt2*-Gen [a] und Sonde 3 im *aox1*-Gen [b] des parentalen Plasmids pPICZ B zur Anwendung im Southern *blotting*. Die Größen der Sonden sind angegeben.

Für die Amplifikation der Sonde 1 wurden die PCR-Primer 3 und 4, für Sonde 2 die PCR-Primer 5 und 6 [Tab. 4.2] und für die Sonde 3 die Sequenzierprimer 1 und 3 verwendet [Tab. 4.4]. Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

I.	initiale Denaturierung	1 Zyklus	94 °C	1 min
II.	Denaturierung	25 Zyklen	94 °C	1 min
	<i>annealing</i>		52,9 °C	1 min
	Elongation		72 °C	1 min
III.	finale Elongation	1 Zyklus	72 °C	7 min

Es wurden jeweils 200 nM *forward*- und *reverse*-Primer, 0,8 mM dNTP-Mix und 0,05 U/μL Taq-DNA-Polymerase [Qiagen GmbH, Hilden] eingesetzt. Als DNA-Matrize diente das Konstrukt pPICZ/*cpt2* [Kapitel 4.1.5.5] oder der parentale pPICZ B-Vektor. Die Verifizierung der PCR-Ergebnisse erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese [Kapitel 4.5].

4.1.5.5 Klonierung des *cpt2*-Gens in pPICZ B

Das in Kapitel 4.1.5.2 amplifizierte *cpt2*-Gen [TV] mit den flankierenden Schnittstellen *Kpn* I und *Avr* II wurde einem Restriktionsverdau nach Kapitel 4.1.2 unterzogen. Das Zielplasmid pPICZ B wurde ebenfalls an Position der *Kpn* I- und *Xba* I-Schnittstellen verdaut [Kapitel 4.1.2], die Vektorenden wurden dephosphoryliert [Kapitel 4.1.3]. Das *cpt2*-Gen wurde nachfolgend in die Restriktionsschnittstellen *Kpn* I und *Xba* I der *multi cloning site* des Plasmids pPICZ B ligiert [Kapitel 4.1.4].

An das *cpt2*-Gen konnte die Schnittstelle *Xba* I nicht angefügt werden, da es diese Sequenz ebenfalls innerhalb des Gens trug. Es war daher erforderlich, das *cpt2*-Gen mit einer *Avr* II-Schnittstelle zu komplettieren. Dieser Verdau erzeugte den gleichen 5'-CTAG-Überhang wie das Schneiden mit dem Restriktionsenzym *Xba* I. Durch die Ligation beider Segmente wurden sowohl die *Xba* I als auch die *Avr* II-Schnittstelle eliminiert [Abb. 4.2].

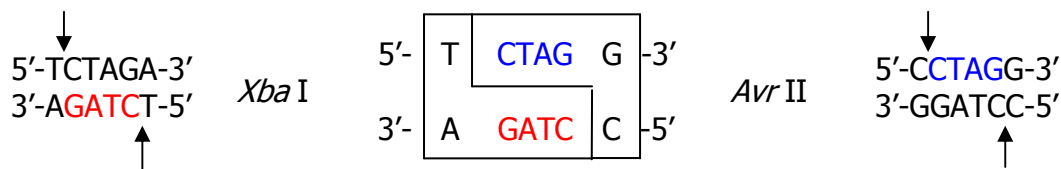


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Erzeugung von Überhängen durch den Verdau mit den Restriktionsenzymen *Xba* I und *Avr* II. Die Ligation der generierten *sticky ends* eliminiert nachfolgend beide Ausgangsschnittstellen. Die Pfeile markieren die Schnittstellen. Rot: generierter 5'-Überhang durch *Xba* I-Verdau, blau: generierter 5'-Überhang durch *Avr* II-Verdau.

4.1.5.6 Klonierung des *cpt2*-Gens in den pET28a(+)-Vektor

Da die Generierung von positiven *Pichia pastoris*-Transformanten nicht zu der gewünschten Proteinexpression führte, wurde das Expressionssystem gewechselt. Die Plasmidkarte des Vektors pET28a(+) ist im Anhang unter Abb. 10.4 zu finden. Die Konstrukte pPICZ/*cpt2* und pPICZ/*cpt2*/S113L aus Kapitel 4.1.7 sowie pPICZ/*cpt2*/TV aus Kapitel 4.1.5.5 wurden für weiterführende Klonierungsarbeiten genutzt. Mit Hilfe der abgeleiteten Primer [PCR-Pr. 7 und 8; Tabelle 4.2] wurden die Schnittstellen *Nde*I am 5'-Ende und *Not*I am 3'-Ende an das *cpt2*-Gen angefügt. Es war nicht nötig ein Startcodon zu inserieren, da dieses vor dem einzufügenden His₆-tag im Plasmid positioniert war. Andererseits musste ein Stoppcodon eingefügt werden, um den Einbau des im Plasmid vorbereiteten C-terminalen His₆-tags zu unterbinden. Die konstruierte Sequenz des *cpt2*-Gens und die *multi cloning site* [MCS] des Vektors pET28a(+) sind symbolisch in Abbildung 4.3 dargestellt.

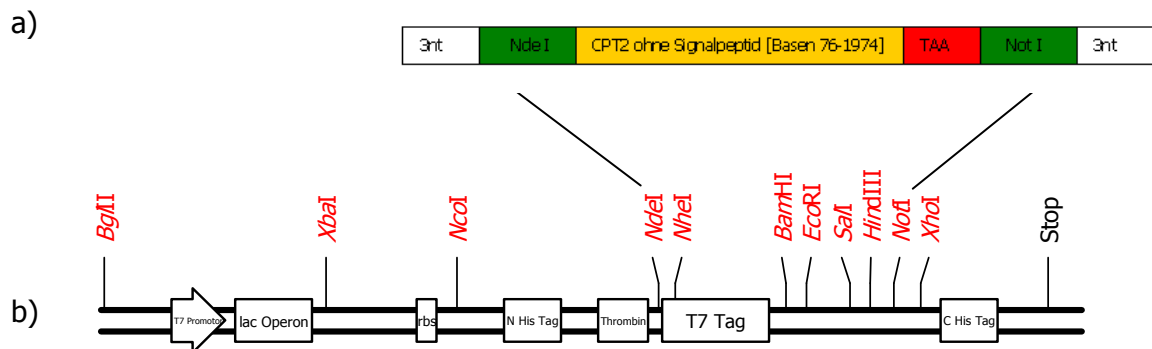


Abb. 4.3 Schematische Darstellung des erzeugten *cpt2*-Konstrukts mit angefügten Restriktionsschnittstellen sowie die für die Generierung von *sticky ends* notwendigen Überhänge. Die Insertion des *cpt2*-Fragments über die Ligationstechnik erfolgt in die Schnittstellen *Nde*I und *Not*I der *multi cloning site* des Plasmids pET28a(+). a: *cpt2*-Konstrukt; weiß: Nukleotid-Überhang [nt-Überhang], grün: Restriktionsschnittstellen, gelb: *cpt2*-Gen ohne Signalpeptid, rot: Stoppcodon. b: Ausschnitt aus der Sequenz der *multi cloning site* des Plasmids pET28a(+), Die vollständige Plasmidkarte ist im Anhang in Abb. 10.4 dargestellt.

Da die Ligation des *cpt2*-Gens in den pET28a(+)-Vektor unter normalen Bedingungen nicht realisierbar war, wurde die TOPO TA *cloning*-Technik angewandt. Dazu wurden polyA-Überhänge an das Genkonstrukt durch Behandlung mit Taq DNA-Polymerase [Qiagen GmbH, Hilden] angefügt. Daran schloss sich die Subklonierung in pCR2.1-TOPO an. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des TOPO TA *cloning*-Kits [Invitrogen, USA]. Das nach erfolgreicher Blau/Weiß-Selektion in LB/Amp-Medium [1 % [w/v] Trypton, 1 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 2 % [w/v] Agar-Agar, 50 µg/mL Ampicillin, pH 7] vermehrte Konstrukt wurde mittels Plasmidpräparation [Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden], wie in Kapitel 4.2.2 erläutert isoliert. Das subklonierte Gen wurde durch *Nde*I / *Not*I-Doppelveerdau [Kapitel 4.1.2] separiert. Der Erfolg wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese [Kapitel 4.5] überprüft und das entsprechende Fragment aus dem Gel mittels PureLink™ Quick Gel Extraction Kit [Invitrogen, USA] nach Kapitel 4.6 isoliert. Die Erzeugung der *sticky ends* des Vektors pET28a(+) mittels Restriktionsverdau nach Kapitel 4.1.2, die Dephosphorylierung der geschnittenen Plasmidenden nach Kapitel 4.1.3 und die Ligation der beiden Fragmente nach Kapitel 4.1.4 erfolgten im Anschluss.

Die PCR-Bedingungen sind nachfolgend aufgeführt.

I.	initiale Denaturierung	1 Zyklus	95 °C	2 min
II.	Denaturierung	30 Zyklen	95 °C	30 s
	<i>annealing</i>		55,6 °C	20 s
	Elongation		72 °C	45 s
III.	finale Elongation	1 Zyklus	72 °C	3 min

Bei der PCR kamen jeweils 1,4 µM PCR-Primer 7 und 8 [Tab. 4.2], 0,8 mM dNTP-Mix und 0,05 U/µL PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase [Stratagene, USA] zum Einsatz.

4.1.6 Mutagenese

4.1.6.1 Mutageneseprimer

Alle Mutagenese-Primer wurden von der Firma Invitrogen (USA) bezogen und sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tab. 4.3 Mutageneseprimer für die ortsgerichteten Mutagenesen zur Entfernung des Signalpeptids, für die Rückmutation zur Herstellung des Wildtyp-Gens und die Generierung der krankheitsbezogenen Varianten. Die Primersequenzen, die GC-Gehalte in % und deren Schmelztemperaturen in °C sind wiedergegeben. Die substituierten Nukleotide sind in Rot dargestellt.

Mutageneseprimer	Sequenz	GC-Gehalt	T _M [°C]
Mut-Pr.1 (<i>forward</i>)	5'-GGA CGA TTG TGC CCC GCC TGC TGC TGC-3'	70 %	81,66
Mut-Pr.2 (<i>reverse</i>)	5'-GCA GCA GCA GGC GGG GCA CAA TCG TCC-3'	70 %	81,66
Mut-Pr.3 (<i>forward</i>)	5'-CCC CCA GTC GGC CCA TGA GCG C-3'	77 %	73,4
Mut-Pr.4 (<i>reverse</i>)	5'-GCG CTC ATG GGC CGA CTG GGG G -3'	77 %	73,4
Mut-Pr.5 (<i>forward</i>)	5' CAT ACA AGC TAC ATT TCG GGA CCC TGG TTT G-3'	50 %	72,6
Mut-Pr.6 (<i>forward</i>)	5'-CTC TAC TGC CGT CCA CTT TGA GCA CTC TTG-3'	53 %	72,9
Mut-Pr.7 (<i>forward</i>)	5'-GCC TTA GAA GAC ATG TTT GAT GCC TTA GAA-3'	40 %	68,5

4.1.6.2 Entfernen des Signalpeptids

Das 658 Aminosäuren umfassende humane CPT2-Vorläuferprotein trägt N-terminal eine 25 Aminosäuren lange Signalsequenz. Das Signalpeptid trägt positive Ladungen und hydrophobe, unpolare Reste, welche eine amphiphile α -Helix bilden. Diese interagiert mit den Importrezeptoren des Mitochondriums und dirigiert das Zielprotein zum Bestimmungsort. Dort wird die Signalsequenz nach komplettiertem Import durch eine Peptidase abgespalten.

Da das Zielprotein intrazellulär exprimiert werden sollte, war die Existenz eines Transitpeptids nicht relevant. In der Folge wurde es durch den Einsatz von ortsgerichteter Mutagenese entfernt.

Die Durchführung der Experimente erfolgte nach dem Protokoll des QuikChange *Site-Directed Mutagenesis* Kits [Stratagene, USA]. Alle Mutageneseprimer sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Die Berechnung der Schmelztemperaturen der Primer resultierte aus folgender Gleichung:

$$T_M = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%Fehlpaarung$$

Gl. 4.3

T_M Schmelztemperatur [°C]
 N Anzahl der Basen des Primers

Das Entfernen der Signalsequenz erfolgte in 2 Schritten.

a) Eliminieren des Startcodons ATG an Position 1–3

Für das Eliminieren des Startcodons ATG an Position 1–3 des *cpt2*-Gens wurden 2 Primer [Mut-Pr. 1 und 2, Tab. 4.3] abgeleitet, in Folge dessen das Startcodon ATG in ein ATT konvertiert werden sollte [Abb. 4.4]. Als *template* diente das isolierte Plasmid pPICZ/*cpt2* aus Kapitel 4.1.5.5.

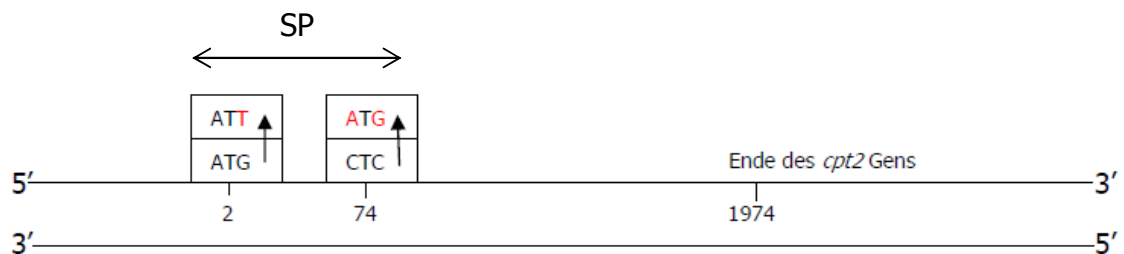


Abb. 4.4 Schematische Darstellung der Positionen der ursprünglichen Nukleotide und der einzuführenden Mutationen zur Entfernung des Signalpeptids [SP] im *cpt2*-Gen. Die substituierten Nukleotide sind in Rot dargestellt.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen realisiert:

I.	initiale Denaturierung	1 Zyklus	95 °C	30 s
II.	Denaturierung	18 Zyklen	95 °C	20 s
	<i>annealing</i>		77,8-83,5 °C	20 s
	Elongation		72 °C	1 min50 s

Dabei kamen 0,05 U/ μ L PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase [Stratagene, USA] zum Einsatz. Nach Beendigung der PCR wurde ein *Dpn*I-Verdau [New England Biolabs, USA] durchgeführt, um die parentale DNA zu verdauen. Das Reaktionsvolumen wurde einer Aufreinigung mittels PureLink™PCR Purification Kit der Firma Invitrogen (USA) unterzogen und im Anschluss gegen Wasser dialysiert. Nach der Vorbehandlung wurde 1 μ L Probe, wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben, in elektrokompetente TOP10F'-Zellen transformiert.

b) Generierung des neuen Startcodons an Position 73–75

Nach Entfernen des ursprünglichen Startcodons dienten die konstruierten Mutageneseprimer 3 und 4 [Tab. 4.3] der Insertion eines neuen Startcodons an Position 73-75 des *cpt2*-Gens. Die experimentelle Vorgehensweise entspricht der unter 4.1.6.2 a) beschriebenen.

Die Bedingungen der PCR waren wie folgt:

I.	initiale Denaturierung	1 Zyklus	95 °C	30 s
II.	Denaturierung	18 Zyklen	95 °C	20 s
	<i>annealing</i>		73,4 °C	20 s
	Elongation		72 °C	1 min50 s

4.1.7 Generierung des Wildtyp- und S113L-Gens

Die Erzeugung des Wildtyp-Gens und der isolierten S113L-Mutation erfolgten mittels QuikChange®Multi Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (USA). Als Matrize diente das unter 4.1.6.2 b) erzeugte Konstrukt. Es wurden 3 Primer [Mut-Pr. 5–7, Tabelle 4.3] generiert, welche die Korrektur der zu Anfang detektierten Mutationen [S113L, V368I, M647V] im Gen erlaubten. Die Schmelztemperaturen der Primer wurden mittels Gleichung 4.3 berechnet. Die Gesamt-Elongationszeit der PCR-Zyklen dauerte 14 min 30 s.

4.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmidisolation basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen mittels NaOH/SDS. Dabei wird die Zellmembran durch Zugabe von SDS aufgeschlossen.

Aufgrund der alkalischen Bedingungen denaturieren sowohl genomische und Plasmid-DNA als auch Proteine. Durch Validierung der Lysedauer wird der maximale Anteil an Plasmid-DNA isoliert, ohne die chromosomalen Nukleinsäuren freizusetzen. Die sich anschließende Neutralisation mittels Guanidinhydrochlorid bedingt die Existenz hoher Salzkonzentrationen, wodurch Proteine, Zelltrümmer und chromosomale DNA präzipitiert werden und die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt. Der Überstand der Probe wird auf eine Säule gegeben, wobei die Plasmid-DNA an der Silica-Membran adsorbiert. Nach erfolgten Waschschritten wird das Plasmid in Wasser oder Niedrigsalzpuffer eluiert [Isolationsprotokoll QIAprep Spin Mini- und Qiagen Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden].

4.2.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Frische Einzelkulturen von einer Platte wurden gepickt und in 2 mL LS-LB/Zeo-Medium [1 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 25 µg/mL Zeocin, pH 7,5] oder 2 mL LB/Kan-Medium [1 % [w/v] Trypton, 1 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 30 µg/mL Kanamycin, pH 7] oder LB/Amp-Medium [1 % [w/v] Trypton, 1 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 50 µg/mL Ampicillin, pH 7] überführt. Es erfolgte eine Inkubation von 9 h bei 37 °C und 225 rpm. Daran schloss sich die Plasmidpräparation aus den 2 mL-Kulturen mittels QIAprep Spin Miniprep Kit [Qiagen GmbH, Hilden] an.

4.2.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Eine 2 mL Startkultur wurde, wie unter Kapitel 4.2.1 beschrieben, angezogen. 150 µL einer 2 mL Vorkultur wurden in 100 mL Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 300 rpm vermehrt. Nach Ernte der Kultur erfolgte die Isolation der Plasmide mittels Qiagen Plasmid Midi Kit [Qiagen GmbH, Hilden].

4.3 Isolation genomischer DNA aus *Pichia pastoris*

Es wurden eine frische 10 mL *Pichia pastoris*-Kultur [MD- oder MDH-Selektivmedium, siehe Kapitel 3.5] bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 5-10 angezogen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 1500g für 10 min geerntet und das Pellet in 10 mL eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Sedimentation bei 1500g für 10 min wurden die Zellen in 2 mL SCED-Puffer [1 M Sorbitol, 10 mM Natriumcitrat, 10 mM EDTA, 10 mM DTT; pH 7,5] aufgenommen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 200 µg in Wasser gelöster Zymolyase [Seikagaku Corporation, Japan] und eine Inkubation bei 37 °C für 50 min. Dann wurden 2 mL 1 % [w/v] SDS zugeben, sorgfältig gemischt und die Probe für 5 min auf Eis belassen. Es folgten die Zugabe von 1,5 mL 5 M Kaliumacetat (pH 8,9) und die anschließende Zentrifugation bei 10000g für 10 min bei 4 °C. Die Nukleinsäuren des Überstandes wurden durch Zugabe von 2 Volumen 96 % Ethanol nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur [RT] gefällt. Nach Zentrifugation von 20 min bei 4 °C und 10000g wurde das Pellet in 700 µL TE-Puffer [10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 7,4] aufgenommen. Die Extraktion der DNA erfolgte durch das Zupipettieren von einem Volumen Phenol : Chloroform im Verhältnis 1:1 [v/v] gefolgt von einem Volumen Chloroform : Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 [v/v]. Die wässrige Phase wurde abgenommen, ein halbes Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (pH 7,5) und 2 Volumen 96 % Ethanol zupipettiert und 10 min auf Trockeneis belassen. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 20 min bei 4 °C und 10000g an. Das Sediment wurde mit 1 mL 70 % Ethanol gewaschen, erneut bei 10000g 5 min bei 4 °C zentrifugiert und im Anschluss luftgetrocknet. Diesen Schritten folgte die Resuspension des Pellets in TE-Puffer. Die Konzentration der genomischen DNA wurde spektroskopisch bei 260 nm bestimmt [Kapitel 4.1.1].

4.4 RNase A-Verdau genomischer DNA

Zu 60-80 µg genomischer DNA wurden 20 µg RNase A gegeben und bei 37 °C und 350 rpm für 15 min inkubiert. Daraufhin wurden 20 µL 4 M Natriumacetat (pH 9,6) und 500 µL 96 % Ethanol zupipettiert und die Probe bei 13000 rpm 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µL 70 % Ethanol gewaschen und in der Folge bei 37 °C für 2 h getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 50 µL bidestilliertem Wasser.

4.5 DNA- und RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der DNA- und RNA-Fragmente infolge einer PCR, eines Restriktionsverdau oder der Isolation von Total-RNA aus Muskelgewebe erfolgte mit 0,8–2 % Agarosegelen. Die DNA-Proben wurden in 5x Probenpuffer [2,5 % [w/v] Ficoll-400, 11 mM EDTA, 3,3 mM Tris/HCl, 0,017 % [w/v] SDS, 0,015 % [w/v] Bromphenolblau, pH 8,0], die RNA-Proben in 2x RNA-Probenpuffer [0,02 % [w/v] Bromphenolblau, 13 % [w/v] Ficoll, 7 M Urea, 2 mM EDTA, 90 mM Tris/Borat, pH 8,3] aufgenommen. Das Auftragsvolumen wurde durch Wasserzugabe auf eine einfache Konzentration korrigiert. Die RNA-Analyten wurden vor dem Auftragen für 5 min bei 65 °C erhitzt und sofort auf Eis gelagert. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer [40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,5]. Die Parameter für den Elektrophorese-Lauf wurden auf 120 V und 400 mA eingestellt. Die Detektion der Nukleinsäurebanden erfolgte durch Zugabe von 0,5 µg/mL Ethidiumbromid unter UV-Exposition.

4.6 Isolierung von Fragmenten aus dem Gel

Infolge des Einbringens des *cpt2*-Gens in pCR2.1 [Plasmidkarte in Abb. 10.6 im Anhang] mittels TOPO TA *cloning*-Technik [Kapitel 4.1.5.6] wurde das Konstrukt nach chemokompetenter Transformation in TOP10-Zellen [Kapitel 3.3.2] vervielfältigt und im Anschluss durch eine Plasmid-Mini-Präparation [Kapitel 4.2.1] isoliert. Das inserierte Gen wurde durch *Nde*I / *Not*I-Doppelveidau [Kapitel 4.1.2] aus dem Vektor geschnitten. Die Kontrolle erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese [Kapitel 4.5]. Mit Hilfe eines Skalpells wurde die entsprechende Bande aus dem Gel isoliert und mittels PureLink™ Quick Gel Extraction-Kit [Invitrogen, USA] nach Protokoll des Herstellers gereinigt.

4.7 DNA-Sequenzierung

4.7.1 Sequenzierprimer

Alle Sequenzierprimer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tab. 4.4 Primer für die Sequenzierung der generierten Konstrukte zur Kontrolle des Erfolgs der experimentellen Durchführung. Die Sequenz der Primer, die GC-Gehalte in % und die Schmelztemperaturen [T_M] in °C sind wiedergegeben.

Seq.-Primer	Sequenz	GC-Gehalt	T_M [°C]
SeqPr. 1	5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'	48 %	59,3
SeqPr. 2	5'-CTG GTC AAT GCG TAT CC-3'	53 %	46,7
SeqPr. 3	5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'	48 %	56,0
SeqPr. 4	5'-ACC ATG CAC TAC CAG GAC AG-3'	55 %	53,9
SeqPr. 5	5'-GAG TAG TGG CAA TGA GGA GAG C-3'	54 %	57,5
SeqPr. 6	5'-CAT ACG GGC AGA TAA ACC AC-3'	50 %	54,6
SeqPr. 7	5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG T-3'	47 %	54,5
SeqPr. 8	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	40 %	53,2

Alle DNA-Proben wurden an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt. Die Erstvalidierung erfolgte aus einer Plasmidminipräparation [Kapitel 4.2.1]. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 260 nm [Kapitel 4.1.1]. In der Folge wurde 1 µL der Konstrukte neu transformiert und einer Plasmidmidipräparation [Kapitel 4.2.2] unterzogen um eine gute Ausbeute zu erhalten. Es schloss sich eine erneute Sequenzüberprüfung an. Die zur Sequenzierung benötigten Primer sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

4.8 Southern *blotting*

Ziel des Southern *blotting* ist es, mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennte DNA-Fragmente auf einer Membran zu fixieren, um einzelne Abschnitte durch Hybridisierung mit markierten Sonden spezifisch nachweisen zu können.

Die RNase A verdaute genomische DNA [Kapitel 4.4] wurde einem *Nhe* I oder *Bsg* I-Verdau [Kapitel 4.1.2] unterzogen. *Nhe* I schnitt nur genomische DNA der Hefe, *Bsg* I verdaute sowohl genomische DNA von *Pichia pastoris* als auch das *cpt2*-Gen an Position 1255. Die Proben wurden auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und konnten bei 80 V in das Gel migrieren. Anschließend wurden 40 V angelegt, um die DNA-Fragmente über Nacht ihrer Länge nach zu trennen. Es folgte eine dreistufige Vorbehandlung des Agarosegels. Dabei wurde das Gel 30 min in 0,25 M HCl inkubiert, um die DNA teilweise zu depurinieren. Es schloss sich eine dreißigminütige Denaturierung in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl an. Im letzten Schritt wurde das Gel durch Belassen in einer Neutralisationslösung [0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,0] für 30 min behandelt. Als Membran diente eine Hybond N⁺ [GE Healthcare, Europe]. Der *blot* wurde mittels Filterpapierbrücke luftblasenfrei aufgebaut, wobei das Löschpapier in 10x SSC-Puffer [0,15 M Natriumcitrat, 1,5 M NaCl, pH 7,0] getränkt war und über Nacht inkubiert wurde. Nach dem Abbau des *blots* erfolgte das *crosslinking* der Membran bei 120 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$. Dem schloss sich die Hybridisierung mittels konstruierter Sonden [Kapitel 4.1.5.4] an. Dabei wurden 7,3 g NaCl und 5 g Blocking Agent [ECL Direct Labelling And Detection System, GE Healthcare, Europe] mit 100 mL ECLTMGold Hybridisierungspuffer [ECL Direct Labelling And Detection System, GE Healthcare, Europe] gemischt und zur Membran in eine Hybridisierungsflasche gegeben. Es folgte eine Inkubation von 50 min bei 42 °C. 10 μL der Sonden 1–3 [Kapitel 4.1.5.4] wurden mit jeweils 1,5 μL 1 kb DNA-Leiter [New England Biolabs, USA], 1,5 μL Marker X [Roche Diagnostics, Mannheim] und 2,5 μL Marker II [Roche Diagnostics, Mannheim] gemischt, 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend auf Eis für 5 min abgekühlt. Es wurden 70 μL *labelling* Reagens [ECL Direct Labelling And Detection System, GE Healthcare, Europe] und 70 μL Glutaraldehyd zupipettiert. Nach dem Vortexen der Probe wurde diese bei 37 °C für 20 min inkubiert und in der Folge in die Hybridisierungsflasche gegeben. Das Binden der Sonden an die fragmentierte DNA erfolgte über Nacht bei 42 °C im Hybridisierungssofen. Dann wurde die Membran auf dem Rotationsschüttler mittels vortemperiertem Waschpuffer [6 M Harnstoff, 0,4 % [w/v] SDS, 0,4x SSC-Puffer] 20 min bei 42 °C inkubiert. Dieser Vorgang wurde nach jeweiligem Pufferwechsel zweifach wiederholt. Es schloss sich eine Inkubation für zwei mal 5 min in 2x SSC-Puffer an. Danach erfolgte die Entwicklung des *blots* nach Anleitung der Amersham ECLTMWestern Blotting Detection Reagenzien [GE Healthcare, Europe].

4.9 Isolation von Total-RNA aus Muskelproben

Circa 25 mg Muskel wurden zur Isolation der Gesamt-RNA verwendet. Die Proben wurden sofort nach Portionierung mit einem sterilen Skalpell in QIAzol Lyse-Reagens [Qiagen GmbH, Hilden] gegeben. Der Zellaufschluß bzw. die Homogenisierung erfolgten mittels TissueRuptor [Qiagen GmbH, Hilden] für 20s bei maximaler Geschwindigkeit. Die weiteren Schritte wurden nach Anleitung des RNeasy®Microarray Tissue-Kits [Qiagen GmbH, Hilden] durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektroskopisch bei 260 nm [Kapitel 4.1.1]. Die Integrität der RNA wurde auf einem 0,8 %igen Agarosegel [Kapitel 4.5] überprüft.

5 Proteinchemische Methoden

5.1 Expression und Anreicherung

5.1.1 Miniexpression in *Pichia pastoris*

Um das Expressionsverhalten des GS115/pPICZ/*cpt2*-Stammes zu untersuchen, wurden Tests auf Miniexpression durchgeführt. Dabei dienten GS115/pPICZ B als Hintergrundkontrolle und GS115/pPICZ/*lacZ* als Positivkontrolle, wobei letztere zur Expression der β -Galactosidase führte.

Mit jeweils einer Einzelkolonie des GS115/pPICZ/*cpt2*, GS115/pPICZ B und GS115/pPICZ/*lacZ*-Stammes wurden 25 mL MGYH-Medium [1,34 % [w/v] *yeast nitrogen base* [YNB], 1 % [v/v] Glycerin, $4 \cdot 10^{-5}$ % [w/v] Biotin, 0,004 % [w/v] Histidin] inokuliert. Die Vermehrung der Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 2 bis 6 erfolgte bei 30 °C und 250 rpm. Danach wurden die Zellen bei 3000g und RT für 5 min geerntet und das Sediment in MMH-Medium [1,34 % [w/v] YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % [w/v] Biotin, 0,5 % [v/v] Methanol] resuspendiert, sodass eine OD₆₀₀ von 1 vorlag. Dieser Mediumwechsel diente der Induktion der Expression durch Anwesenheit von Methanol. Nach der Überführung der Zellsuspension in einen 1 L-Erlenmeyerkolben erfolgte die Inkubation bei 30 °C und 250 rpm. Alle 24 h wurden 0,5 % [v/v] Methanol zupipettiert um die Induktion aufrecht zu erhalten. Nach definierten Zeiten wurden Proben zur späteren Analyse des Expressionsniveaus genommen und bei 13000 rpm für 3 min geerntet. Die Probenasservierung nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte bei -20 °C. Für den Nachweis der Proteinexpression wurden die gelagerten Zellpellets in jeweils 100 μ L Aufschlußpuffer [50 mM Natriumphosphat, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 % [v/v] Glycerin, 3 mM Benzamidin, 1 mg/mL Leupeptin, 0,7 mg/mL Pepstatin A, pH 7,4] resuspendiert. Nach Zugabe eines Volumens Glasperlen wurde das Zellmaterial in 8 Intervallen alternierend 30 s gevortext und 30 s auf Eis gelagert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 4 °C unter maximaler Geschwindigkeit für 10 min wurden die Überstände 1:1 mit Probenpuffer gemischt und definierte Volumina auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen [Kapitel 6.1].

Zum Nachweis der His₆-N-hCPT2-Expression in *Pichia pastoris* schloss sich ein Western blotting [Kapitel 6.3] an. Dabei wurde der Anti-His HRP (C-terminal) Antikörper [Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach] verwendet [Tabelle 6.1].

5.1.2 Miniexpression in *E. coli* BL21Gold DE3

Jeweils 1 mL LB/Kan-Medium wurden in einer 24-*well*-Platte mit einer Einzelkolonie aus Kapitel 3.3.2 inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 220 rpm für 8 h bei 37 °C. Anschließend wurden jeweils 50 µL jeder Kultur in 1 mL LB-Medium überführt und 2 h bei 220 rpm und 37 °C temperiert. In der Folge wurden von jeder Kultur 100 µL als Nichtinduktionskontrolle entnommen. Zu den verbliebenen Proben wurden 1 mM IPTG zur Induktion der Proteinexpression gegeben und bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Nach definierten Zeiten erfolgte die Entnahme von 50 µL Probe. Von allen Analyten wurden 20 µL 1:1 mit 4x SDS-Probenpuffer [250 mM Tris/HCl, 6 % [w/v] SDS, 300 mM DTT, 30 % [v/v] Glycerin, 0,02 % [w/v] Bromphenolblau, pH 6,8] gemischt, bei 95 °C für 5 min erhitzt und danach sofort auf Eis gelagert. Im Anschluss folgten eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Kapitel 6.1] und ein Western *blotting* [Kapitel 6.3] mit einem Anti-His HRP (C-terminal)-Antikörper zum Nachweis des exprimierten His₆-N-hCPT2, His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV-Proteins.

5.1.3 Fermentation

Um ausreichend Zellmasse zu produzieren, wurde eine Fermentation durchgeführt. Dazu wurde, wie unter Kapitel 3.3.2 beschrieben, pET28a(+)/*cpt2*, pET28a(+)/*cpt2*/S113L oder pET28a(+)/*cpt2*/TV frisch in BL21 GoldDE3-Zellen transformiert. Eine 2 mL LB/Kan-Medium-Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie inokuliert und 8 h bei 37 °C vermehrt. Anschließend wurden 800 µL der Vorkultur in 400 mL frisches LB/Kan-Medium überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über Nacht bei 200 rpm und 37 °C.

Die *large scale*-Produktion der Zellen fand in einem Maßstab von 6 L in einem Fermenter Biostat C-DCU 3 der Firma B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen), mit automatischer Kontrolle von pH- und Sauerstoffgehalt statt. Die Fermentation erfolgte bei 20 °C. Der pH-Wert von 7,0 wurde durch automatisierte Zugabe von 10 %iger Phosphorsäure bzw. 10 %iger KOH justiert. Der Sauerstoffgehalt wurde in einer sequenziellen Kaskade von I.) Rührer bis max. 1200 rpm, II.) *airflow* bis 25 slpm und III.) Sauerstoffzufuhr auf einen Wert von 30 % festgesetzt. Der Fermenter sowie die Bestandteile des Mediums wurden vor der Biomasseproduktion sterilisiert, die pH- und Sauerstoffelektroden geeicht.

Das Medium bestand aus 50 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L Ammoniumchlorid, 5 g/L Glukose, 0,68 g/L Magnesiumsulfat und 11 g/L di-Kaliumhydrogenphosphat. Alle Chemikalien sind in der Chemikalienliste in Kapitel 2.1.1 gelistet.

Die Fermentation wurde durch sterile Inokulation mit 400 mL Vorkultur und 30 µg/mL Kanamycin gestartet. Nach definierten, regelmäßigen Zeitintervallen erfolgte eine Probenahme zur Überprüfung der gegenwärtigen Zelldichte.

Da bei einer OD₆₀₀ zwischen 10 und 15 die Ausgangsglukose verbraucht war, musste mit steriler *feeding*-Lösung [300 g/L Hefeextrakt und 125 g/L Glukose] zugefüttert werden. 1 mM IPTG zur Induktion der Proteinproduktion wurde bei einer Zelldichte von 80-90 zugegeben. Die Fermentation wurde für vier weitere Stunden fortgesetzt und bei einer optischen Dichte von 110 bis 115 beendet. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C und 6000 rpm [Rotor JLA8.100] [Zentrifuge Avanti J20, Beckman Instruments Inc., USA] für 20 min. Die Zellmasse wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufbereitung des rekombinanten Proteins bei -80 °C gelagert.

5.2 Löslichkeitsstudien

Um die zelluläre Löslichkeit der Proteine zu überprüfen, wurden Studien unter Einfluss der Temperatur von 37 °C und 20 °C durchgeführt. 10 mL LB/Kan-Medium wurden mit einer Einzelkolonie BL21 GoldDE3/pET28a(+)/*cpt2*, BL21 GoldDE3/pET28a(+)/*cpt2*/S113L oder BL21 GoldDE3/pET28a(+)/*cpt2*/TV angeimpft und bei 37 °C über Nacht bei 220 rpm vermehrt. Danach wurden 50 mL LB/Kan-Medium mit 2,5 mL Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6–1 bei 20 °C bzw. 37 °C und 220 rpm vermehrt. Es folgte die Induktion mit 1 mM IPTG. Nach definierten Zeiten wurden Proben genommen, woraus mittels BugBuster®MasterMix [Novagen (Merck KGaA), Darmstadt] die Gesamtprotein-, die lösliche cytosolische und die nichtlösliche cytosolische Fraktion präpariert wurden.

Für die Isolation des Gesamtproteins wurde 1 mL Probe entnommen und bei 10000g sedimentiert. Das Pellet wurde in 100 µL PBS [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4] resuspendiert und 1:1 mit 4x SDS-Probenpuffer [250 mM Tris/HCl, 6 % [w/v] SDS, 300 mM DTT, 30 % [v/v] Glyzerin, 0,02 % [w/v] Bromphenolblau, pH 6,8] vermischt.

Um die lösliche Fraktion zu isolieren wurde die 50 mL Kultur 4 h nach der Induktion geerntet und das Sediment in definierter Menge BugBuster®MasterMix [Novagen (Merck KGaA), Darmstadt] resuspendiert. Nach der Inkubation von 20 min bei RT folgte ein Zentrifugationsschritt bei 16000g. Dem Überstand wurde 1:1 [v/v] 4x SDS-Probenpuffer zugegeben. Das Pellet des vorangegangenen Sedimentationsschritts diente der Isolation der *inclusion bodies*. Die Präparation erfolgte nach BugBuster®MasterMix-Protokoll [Novagen (Merck KGaA), Darmstadt]. Die resuspendierte Probe wurde 1:1 mit 4x SDS-Probenpuffer gemixt.

Alle Versuchsproben wurden bei 85 °C 3 min temperiert und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde wie in Kapitel 6.1 beschrieben durchgeführt. Daran schloss sich ein Western *blotting* [Kapitel 6.3] mit einem Anti-His HRP (C-terminal)-Antikörper [Tabelle 6.1] an.

5.3 Aufschluß und Proteinreinigung

5.3.1 Zellaufschluß

300 g *E. coli*-Zellmaterial wurde in 500 mL Aufschlußpuffer [50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM TCEP, 10 mM Magnesiumchlorid, 3 mM Benzamidin, 1 µg/mL Leupeptin, 0,7 µg/mL Pepstatin A, pH 8,0] und 50 µg/mL Lysozym bei RT aufgetaut. Die Zellen wurden in 2 Durchgängen mittels Hochdruckdispersion an einer *french press* [Gaulin Hochdruckhomogenisator APV Homogeniser GmbH, Unna] aufgeschlossen. Dabei wurden pro Lauf maximal 800 bar erreicht. Nach Zugabe von 0,1 % [v/v] Triton X-100 wurde die Solubilisierung durch 45 min Rühren bei RT realisiert. Das Zupipettieren von 1,2 U/mL Benzonase™Nuclease [Novagen (Merck KGaA), Darmstadt] diente zum vollständigen Nukleinsäureverdau. Daran schloss sich die Abtrennung der Zelltrümmer bei 35000 rpm für 45 min mittels Ultrazentrifugation an einer Beckman L8-60M Ultrazentrifuge [Beckman Instruments Inc., USA] mit Rotor 45Ti an.

Alle Proteinvarianten wurden bei 10 °C an einem ÄKTA-Purifier [GE Healthcare, Europe] gereinigt.

5.3.2 Ni²⁺–NTA–Affinitätschromatographie

Der Überstand nach Zellaufschluss [Kapitel 5.3.1] wurde auf eine mit Puffer 1 [50 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 3 mM TCEP, 3 mM Benzamidin, 1 µg/mL Leupeptin, 0,7 µg/mL Pepstatin A, 0,1 % [v/v] Triton X-100, pH 8,0] äquilibrierte Ni²⁺–NTA–Säule aufgetragen. Es wurde nochmals mit zwei Säulenvolumina an Puffer 1 gespült, um die nichtbindenden zellulären Bestandteile abzutrennen. Dann erfolgte das Umpuffern mit Puffer 2 [50 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 3 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG, 3 mM Benzamidin, 1 µg/mL Leupeptin, 0,7 µg/mL Pepstatin A, 40 mM Imidazol, pH 8,0]. Anschließend wurde ein linearer Imidazolgradient aus Puffer 2 und 3 angelegt, um das His₆–tag tragende Enzym mit einer Flußgeschwindigkeit von 1,5 mL/min bei ~37% Puffer 3 [50 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 3 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG, 3 mM Benzamidin, 1 µg/mL Leupeptin, 0,7 µg/mL Pepstatin A, 500 mM Imidazol; pH 8,0] von der Säule zu eluieren.

Es wurden 300 µL Puffer 2 mit einem Gehalt von 20 % [v/v] Glycerin in den Reaktionsgefäßen vorgelegt. Das Elutionsvolumen betrug 1,5 mL. Die Fraktionen wurden mittels einer SDS–PAGE [Kapitel 6.1] kontrolliert. Enzymenthaltende Fraktionen wurden vereinigt und einer Gelfiltration unterzogen.

5.3.3 Gelfiltration

Die vereinigten Ni^{2+} -NTA-Fraktionen wurden auf eine mit Puffer 4 [25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG; pH 8,0] äquilibrierte HighLoad 26/60 Superdex 200-Säule [GE Healthcare, Europe] mit einer Flußgeschwindigkeit von 1 mL/min aufgetragen. Die Elution des Enzyms erfolgte in 1,5 Säulenvolumina mit einem Fluss von 1,2 mL/min mittels Puffer 4 in 8 mL-Fraktionen. Dabei wurden 1 mL Puffer 4 mit 20 % [v/v] Glyzerin in den Auffanggefäßen vorgelegt. Die Visualisierung der Proteinreinheit wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Kapitel 6.1] überprüft. Entsprechende Fraktionen wurden vereint und einer Anionenaustauschchromatographie zur Entfernung der verbliebenen Nukleinsäuren unterzogen.

5.3.4 Anionenaustauschchromatographie

Eine Q-Sepharose 26/10-Säule [GE Healthcare, Europe] wurde mit Puffer 5 [25 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG, pH 8,0] eingespült. Die aus dem Gelfiltrationsschritt gewonnenen Proben wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 mL/min aufgetragen. Anschließend wurde mit demselben Puffer eluiert. Dabei wurde das Enzym durch Auffangen von 40 mL Durchlauf nach Vorgabe von 5 mL Puffer 5 mit 20 % [v/v] Glyzerin in die Fraktionsgefäße eluiert. Die Reinheit der Proteinproben wurde mittels SDS-PAGE [Kapitel 6.1] geprüft.

5.3.5 Konzentrierung

Das Konzentrieren des Enzyms erfolgte mittels VivaSpin-Konzentrator [Sartorius AG, Göttingen] mit einem Massenausschlußgewicht von 10 kDa. Dabei entstanden Konzentrationen von circa 4 mg/mL Protein.

5.3.6 Lagerung

Alle konzentrierten Enzyme wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6 Analytische Methoden

6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Erfolg der Tests auf Miniexpression, der Reinheitsgrad von Proteinfractionen, sowie die Auftrennung von Muskelhomogenat bzw. gereinigtem Protein zum Western *blotting* wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration der verwendeten Gele betrug 10 % für das Trenngel und 5 % für das Sammelgel. Die Elektrophoresen wurden in 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 3,5 mM SDS bei pH 8,3 durchgeführt. Die Elektrophorese-Proben wurden in einem Verhältnis von 1:1 in 4x Probenpuffer [250 mM Tris/HCl, 6 % [w/v] SDS, 300 mM DTT, 30 % [v/v] Glycerin, 0,02 % [w/v] Bromphenolblau, pH 6,8] aufgenommen und nach Gelauftrag durch Anlegen einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 40 mA hinsichtlich des Molekulargewichts getrennt. Es folgte die Visualisierung durch Coomassie-Brilliantblau-Färbung [0,25 % [w/v] Coomassie Brilliant Blau G250, 30 % [v/v] Methanol, 6 % [v/v] Eisessig]. Das Entfernen des überschüssigen Farbstoffs wurde durch eine Behandlung mit Entfärberlösung [30 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Eisessig] erzielt. Das Gel wurde in Cellophanfolie unter Verwendung von Trocknungslösung [3 % [w/v] Glycerin, 50 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Eisessig] haltbar gemacht.

6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin verfügen über intrinsische Chromophore. Wird UV-Licht durch ein Molekül absorbiert, werden dessen Valenzelektronen aus den bindenden Molekülorbitalen auf energetisch höhergelegene antibindende Molekülorbitale gehoben und somit angeregt. Die Differenz zwischen zwei Energieniveaus stellt das Maß für eine definierte Wellenlänge dar, welche ein Molekül absorbieren kann. Dies ermöglicht eine direkte photometrische Bestimmung der Proteine bei 280 nm. Proteine ohne aromatische Aminosäuren zeigen nur eine sehr geringe Absorption bei 280 nm.

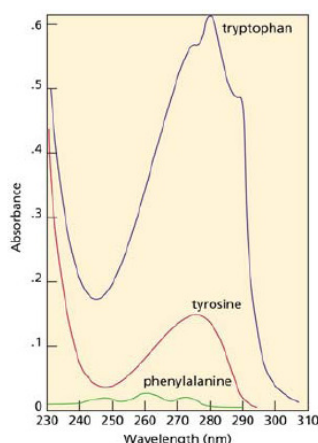


Abb. 6.1 Charakteristische Absorptionsspektren aromatischer Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 230-310 nm.

Kopie aus <http://www.bioinfo.org.cn/book/biochemistry/chapt05/116.jpg>.

Kontaminationen von Proteinproben mit Nukleinsäuren beeinträchtigen die Zuverlässigkeit des Ergebnisses, da diese eine erhebliche Absorption bei 260 nm aufweisen. Diese Beeinträchtigung kann durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm durch Anwendung von Gleichung 6.1 partiell korrigiert werden.

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260} \quad \text{Gl. 6.1}$$

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die ermittelte Extinktion wurde in das Lambert–Beersche–Gesetz [Gleichung 6.2] eingesetzt.

$$E = \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 6.2}$$

ε	Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
d	Schichtdicke [cm]
I_0	Intensität des eingestrahlten Lichtes
I	Intensität des die Probe verlassenden Lichtes
E	Extinktion
c	Konzentration [mol/L]

Der Extinktionskoeffizient des Wildtypproteins und der Varianten wurde nach einer Erweiterung der Methode nach Edelhoch *et al.* (1967) und nach Gill *et al.* (1989) bestimmt. Der theoretische, nach Gleichung 6.3 berechnete Extinktionskoeffizient beträgt $61020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Der Extinktionskoeffizient der nativen Proteine wurde experimentell ermittelt und beträgt $68443 \pm 1730 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$\varepsilon_{280_{6\text{M GUA}}} = 6_{\text{Trp}} \cdot 5690 + 21_{\text{Tyr}} \cdot 1280 \quad \text{Gl. 6.3}$$

ε Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

$$c = \frac{E_{280_{6\text{M GUA}}}}{\varepsilon_{280_{6\text{M GUA}}}} \quad \text{und} \quad \varepsilon_{280_{\text{nativ}}} = \frac{E_{280_{\text{nativ}}}}{c} \quad \text{Gl. 6.4}$$

Eine Stammlösung des Wildtypproteins und der Varianten von 2,17 mg/mL wurde 1:15 sowohl in nativem Puffer [25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG, pH 8,0] als auch in denaturierendem Puffer [25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG, 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 8,0] verdünnt. Es wurde eine Basislinie mit dem entsprechenden Verdünnungspuffer aufgenommen. Die Messung der Proteinproben erfolgte bei 25 °C in einem spektralen Bereich von 200–800 nm. Alle Experimente wurden dreifach wiederholt. Die experimentell ermittelten Extinktionskoeffizienten wurden in der Folge gemittelt.

6.3 Western *blotting*

Die zu analysierenden Proben wurden mittels SDS-PAGE aus Kapitel 6.1 aufgetrennt. Membran [Amersham HybondTM-N⁺, GE Healthcare, Europe] und *blotting*-Papier wurden in Transferpuffer [25 mM Tris/HCl, 150 mM Glycin, 10 % [v/v] Methanol] äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde auf eine Nitrocellulosemembran zwischen eine Lage *blotting*-Papier gelegt und luftblasenfrei ausgerollt. Der Proteintransfer erfolgte unter Verwendung der *semidry-blotting*-Technik. Es wurde eine Stromstärke von 2 mA/cm² für 70 min angelegt. Daran schloss sich eine Färbung der Membran mit Ponceau-Rot [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim] an um den Erfolg der Übertragung zu überprüfen. Die Membran wurde 1 h mit 5 % [w/v] Milchkpulver in TBT [1 M Tris, 70 mM NaCl, 0,1 % [v/v] Tween 20, pH 7,6] geblockt. Die sich anschließende Inkubation mit primärem Antikörper erfolgte unter Schütteln über Nacht im Kühlraum. Die Membran wurde zweimal 5 min mit TBT gespült. Danach folgte die Inkubation mit Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Die Verdünnungen der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper mit 5 % [w/v] Milchkpulver in TBT sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Es schlossen sich 4 Waschschrte á 5 min mit TBT-Puffer an. Die Detektion wurde nach Anleitung des Amersham ECLTMWestern Blotting Detection Reagents Kit [GE Healthcare, Europe] durchgeführt.

Tab. 6.1 Zusammenfassung aller verwendeter Primär- und Sekundärantikörper sowie die verwendeten Verdünnungen zum Einsatz im Western *blotting*.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Sekundäre Antikörper	Verdünnung
Anti-CPT2 1G7, monoklonal, mouse [Abnova, Taiwan]	1:1000	<i>Donkey anti mouse</i> HRP [Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA]	1:5000
Anti-CPT2, polyklonal, rabbit, HPA028202 [Atlas Antibodies, Schweden]	1:13	<i>Goat anti rabbit</i> HRP [Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA]	1:5000
Anti-CPT2 (H-300), polyklonal, rabbit [Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA]	1:200	<i>Goat anti rabbit</i> HRP [Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA]	1:5000
Anti-His HRP (C-term.) [Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach]	1:5000		

6.4 Analyse der Peptidfragmente von His₆-N-hCPT2 und Varianten

Um die Identität des Proteins nachzuweisen wurden die Proben einer SDS-PAGE [Kapitel 6.1] unterzogen und die betreffenden Banden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Das Gelfragment wurde 3x mit Wasser, 2x mit 10 mM Ammoniumbicarbonat und letztlich mit 10 mM Ammoniumbicarbonat in 50 % [v/v] ACN gewaschen. Die Gele wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in 20 µL 10 mM Ammoniumbicarbonat, pH 8,0 rehydriert. Es folgte der Verdau der Probe mit Trypsin [Promega, Madison, USA] über Nacht bei 37 °C. Das Muster der Peptidfragmente wurde mit Hilfe eines Ultraflex-II TOF/TOF Massenspektrometers [Bruker Daltonic, Bremen] aufgenommen, welches mit einer MALDI-Quelle, einem Stickstofflaser, einer LIFT-Zelle für die Analyse von ionisierten Fragmenten nach der Spaltung und einem *grid*-losen Ionenreflektor ausgestattet war. Sowohl zur Kontrolle des Instruments als auch zur anschließenden Analyse der gewonnen Daten wurden die Software Flex Control 2.4 [Bruker Daltonic, Bremen], Flex Analysis 2.4 [Bruker Daltonic, Bremen] und Biotoools 3.0 [Bruker Daltonic, Bremen] genutzt. Zur Kalibrierung des Instruments wurde eine Peptidmischung [Bruker Daltonics, Bremen] genutzt.

Die Proben wurden für die Analyse in eine Matrix aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure eingebunden.

6.5 Lichtstreuung

Theorie:

Licht breitet sich als Welle aus oszillierenden elektrischen und magnetischen Feldern aus, wobei bei Streuprozessen die magnetischen Felder keine Rolle spielen. Wird eine Probe mit einer definierten Wellenlänge bestrahlt, resultieren aus physikalischen Prozessen verschiedene Effekte. Ein Teil des Lichtes wird absorbiert und in Form von Fluoreszenz, Phosphoreszenz oder Ramanstrahlung in alle Raumrichtungen emittiert. Dabei beginnen die Elektronen in der äußeren Atomhülle der betreffenden Moleküle zu schwingen. Dieser angeregte Zustand der Elektronen kann zum Beispiel durch Schwingungsrelaxation verlassen werden. Die Energie wird durch Stöße mit anderen Molekülen an die Umgebung in Form von thermischer Energie [Wärme] abgegeben. Weitere Relaxationsprozesse sind die Fluoreszenz, und Phosphoreszenz. Diese Phänomene sind von der Wellenlänge des einzustrahlenden Lichtes, der Konzentration der Probe sowie den spektroskopisch chemischen Eigenschaften der Probe abhängig und werden in verschiedenen spektroskopischen Methoden, wie UV-Vis Spektroskopie oder IR-Spektroskopie, angewendet.

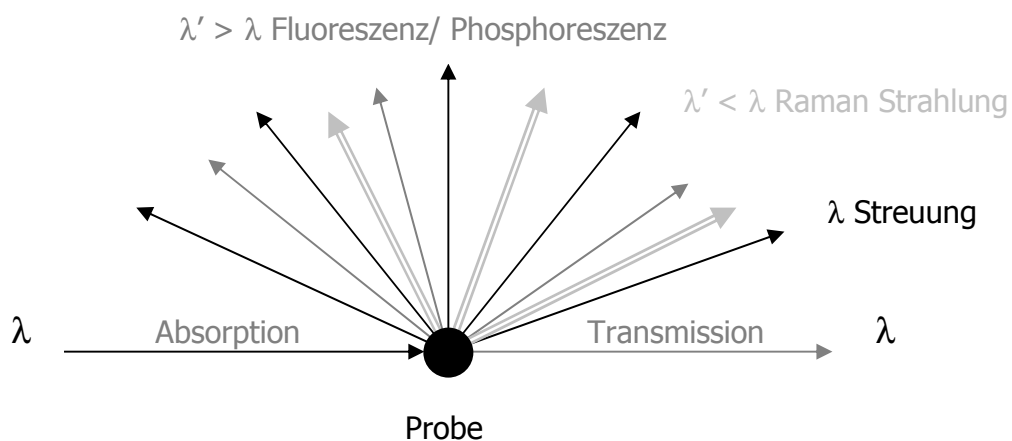


Abb. 6.2 Absorptions-, Transmissions- und Relaxationsprozesse (Wärme, Fluoreszenz, Phosphoreszenz) unter Einwirkung von Licht. Modifiziert nach [12.12.2006 - http://josef.riedl.org](http://josef.riedl.org)

Streulicht wird in alle Raumrichtungen emittiert und kann in statische und dynamische Lichtstreuung untergliedert werden. Die Streuintensität ist von der Dichte, Konzentration sowie der Größe und Form der Teilchen abhängig und wird auch von der Wellenlänge beeinflusst. Dabei erzeugt ein Teilchen mit einer Größe von 100 nm die 10^6 fache Streuintensität im Vergleich zu einem 10 nm großen Partikel [$I \sim d^6$]. Bei abnehmenden Wellenlängen nimmt sowohl die Energie des Primärlichtes und gleichermaßen auch die Streuintensität zu [$I \sim 1/\lambda^4$]. Es werden generell 2 Streuarten unterschieden, die Rayleigh-Streuung [$\lambda \gg r$] und die winkelabhängige MIE-Streuung [$\lambda = r$]. Das Streulicht von stark verdünnten Lösungen kleiner Moleküle ist vernachlässigbar, wohingegen es bei großen Molekülen in hohen Konzentrationen bestimmend ist und sogar zur Trübung der Lösung führen kann. Unter diesem Aspekt eignet sich die Methode der Lichtstreuung, um Aussagen über die Größe der Partikel von Proteinlösungen, Aggregationen, Polymerpartikeln oder Mizellen treffen zu können. Der Vorteil von sowohl statischer als auch dynamischer Lichtstreuung ist die Nicht-Destruktivität der Methode, d.h. die Proben werden durch die Experimente weder verändert noch gestört.

Statische Lichtstreuung

Die Messgröße der statischen Lichtstreuung ist bei einem festgesetzten Streuwinkel eine über einen definierten Messzeitraum gemittelte Streustrahlintensität in Bezug auf die Anzahl der streuenden Teilchen, wobei bei bekannter Konzentration der Probe das apparente Molekulargewicht von Kolloiden daraus bestimmt werden kann. Für die Messung ist ein Standard wie Toluol nötig, welcher winkelunabhängig eine konstante Streuintensität aufweist.

Durch Wechselwirkung von Licht und Materie können verschiedene Streuprozesse beobachtet werden. Trifft monochromatisches Licht mit einer hohen Intensität auf Partikel, beginnen die Elektronen in dessen Atomhülle mit der Frequenz der Welle zu schwingen. Es entsteht eine Ladungsverschiebung, wobei Dipole induziert werden. Diese emittieren die Strahlung mit der Frequenz des eingestrahnten Lichtes in alle Raumrichtungen. Die abgegebene Strahlung wird als Rayleigh-Streuung definiert. Das Verhältnis der Intensität des Streulichtes zur Intensität der Eingangsstrahlung wird durch das Rayleigh-Verhältnis R_0 beschrieben [Gl. 6.5]:

$$R_0 = \frac{I}{I_0} \cdot \frac{r^2}{V_0} \quad \text{Gl. 6.5}$$

I	Intensität des Streulichtes
I_0	Intensität der Eingangsstrahlung
r	Abstand des Detektors vom Streuvolumen
V_0	vom Detektor erfasstes Streuvolumen

Durch die Streuintensität in Abhängigkeit vom Streuwinkel kann das mittlere apparente Molekulargewicht eines Partikels bestimmt werden. Streuteilchen mit einem Durchmesser $d \geq \lambda/20$ können nicht als Elementarstreuer aufgefasst werden und besitzen aufgrund ihrer Größe mehrere Streuzentren. Die Primärwelle wird an mehreren Streuzentren gestreut. Die resultierenden Sekundärwellen haben einen Gangunterschied, welcher zur Phasendifferenz der Streuwellen führt. Die Streustrahlung interferiert konstruktiv und ist von der Verteilung der Streuzentren im Molekül abhängig. Das Streuvermögen wird von Form und Größe der Partikel bestimmt. Neben der intramolekularen Interferenz der Streustrahlung existiert auch die intermolekulare Interferenz. Dabei wird die Streustrahlung unterschiedlicher Moleküle überlagert. Das Streuvermögen eines Kolloids ist winkelabhängig. Mit steigender Konzentration der Probe erhält man aus zeitgemittelten Streustrahlintensitäten pro Winkel Informationen über die statische Struktur.

Dynamische Lichtstreuung

Durch Streulicht mit einer Zeitauflösung im Millisekundenbereich werden Streuschwankungen detektiert. Die zeitliche Intensitätsfluktuation der Streustrahlung ist visualisierbar, da die Abstände der Streuzentren aufgrund der Brownschen Molekularbewegung ständig variieren. Die Intensität fluktuiert um einen Mittelwert, welcher die Messgröße der statischen Lichtstreuung darstellt. Die Diffusion ist von Größe, Temperatur, Beschaffenheit der Teilchen und des Lösungsmittels abhängig. Aus den Fluktuationen der Streulichtintensität in kleinen Orts- und Zeitabschnitten können Aussagen über die Diffusion der Partikel getroffen werden. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist aus den Intensitätsschwankungen mittels Autokorrelationsfunktion quantifizierbar und kann zur Bestimmung von Teilchengrößen und Verteilung genutzt werden. Der Diffusionskoeffizient D wird in der Stokes-Einstein-Gleichung [Gl. 6.6] zur Berechnung des hydrodynamischen Radius herangezogen, wobei eine optimale Kugelform des Partikels angenommen wird. Die Viskosität bestimmt den Widerstand, den Teilchen bei ihrer Zufallsbewegung zu überwinden haben.

$$D = \frac{k_B \cdot T}{3\pi \cdot \eta_{LM} \cdot R_h} \quad \text{Gl. 6.6}$$

D	Diffusionskoeffizient
k_B	Boltzmann Konstante [$1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K]
T	Temperatur [°C]
η_{LM}	Viskosität des Lösungsmittels [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]
R_h	hydrodynamischer Radius [nm]

6.5.1 Dynamische und statische Lichtstreuexperimente

Alle Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Klaus Gast, Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Abteilung physikalische Biochemie, durchgeführt. Alle zu analysierenden Lösungen wurden mit einem 0,22 μm -Spritzenfilter filtriert und 100 μL in eine staubfreie Ultramikro-Quarzküvette [HELLMA GmbH & Co KG, Mühlheim] mit einem Gesamtfassungsvolumen von 160 μL gegeben. Der Streuwinkel wurde auf 90° festgelegt. Die Aufnahme der Daten erfolgte unter Verwendung von monochromatischem Licht eines Lasers bei einer Wellenlänge von 532 nm. Toluol diente als Standard für die statische Lichtstreuung. Die absolute Streuung wurde für 20 s aufgenommen, die Grenze der statistischen Schwankungen wurde auf 3 % gesetzt. Die Brechungsindices der angewandten Puffer lagen zwischen 1,3340 und 1,3356. Der bis zu diesem Zeitpunkt verwendete Wert von 1,335 stellte einen soliden Mittelwert dar. Die dynamische Viskosität η wurde auf einen Wert von 0,89 cP (Centipoise) festgelegt, da weiterführende Messungen die Werte der berechneten Stokes-Radien nur innerhalb des Messfehlers zwischen 1 bis 3 % verändert hätten.

Bestimmung der kritischen mizellaren Konzentration von nOG

Die Bestimmung der kritischen mizellaren Konzentration erfolgte bei 20 °C und 37 °C in 25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP bei pH 8,0. Dieser Puffer diente ebenfalls zur Aufnahme einer Basislinie. Die Messungen wurden 10x akkumuliert.

Bestimmung der kritischen mizellaren Konzentration von PCoA

Die Bestimmung der kritischen mizellaren Konzentration des PCoA erfolgte in 50 mM KH₂PO₄, 120 mM KCl, 1 mM EDTA bei pH 7,4. Dieser Puffer diente ebenfalls zur Aufnahme einer Basislinie. Die Messtemperatur betrug 25 °C. Die Proben wurden 25x akkumuliert. Eine höhere Akkumulationszahl war bei diesen Experimenten notwendig, da das Molekulargewicht des Analyten zu klein und somit die Überschussstreuung, das heißt die Streuung die größer als Wasser ist, sehr gering ist.

Oligomerisierungszustand von His₆-N-hCPT2

Die Basislinie wurde mit dem Messpuffer ohne Protein aufgenommen. Die Messungen wurden 20x akkumuliert. Die eingesetzte Proteinkonzentration von His₆-N-hCPT2 betrug 0,44 mg/mL und wurde spektroskopisch bestätigt. Die Messtemperatur war 25 °C. Die apparenten Massen aus statischer Lichtstreuung und Stokes-Radien aus dynamischer Lichtstreuung wurden berechnet. Die Berechnung des Molekulargewichts aus dem Stokes-Radius der dynamischen Lichtstreuung erfolgte mit nachfolgender Skalengleichung [Gl. 6.7]:

$$R_S = 0,0625 \cdot M^{0,357}$$

Gl. 6.7

R_S	Stokes-Radius [nm]
M	Molekulargewicht des Proteins [Da]

a) ohne Substratstabilisierung

Die Bestimmung des Oligomerisierungszustands ohne Substratstabilisierung von His₆-N-hCPT2 erfolgte in 25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 0,2 % [w/v] nOG bei pH 8,0.

b) mit Substratstabilisierung

Die Bestimmung des Oligomerisierungszustands von His₆-N-hCPT2 in Anwesenheit von Substrat erfolgte in 25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 0,1 % [w/v] nOG bei pH 8,0. Zur Stabilisierung der nativen Proteinstruktur wurden 6 µM PCoA in einer Konzentration der aktiven Zentren zugegeben.

6.6 Circulardichroismus

Alle Messungen wurden an einem CD-Spektropolarimeter JA-810 [Jasco Inc., USA] durchgeführt. Die Präzisionsquarz-Küvetten [HELLMA GmbH & Co KG, Mühlheim] hatten eine Schichtdicke von 1 mm. Das Reaktionsvolumen betrug 300 µL. Zu jedem Messansatz wurde ein Leerwert ohne Protein bestimmt und von den Messwerten mit Protein subtrahiert.

Theorie

Circulardichroismus ist eine Form der Absorptionsspektroskopie, welche zur Aufklärung von Strukturen, Stabilitäten und Ligandenbindung von Biopolymeren verwendet wird. Als Ursache auf molekularer Ebene ist das Auftreten von Chiralitätszentren zu nennen.

Die Methode basiert auf der unterschiedlichen Absorption der rechts- und links-circular polarisierten Komponenten des circular polarisierten Lichtes. Ein CD-Effekt kann nur bei Wellenlängen beobachtet werden, bei denen die zu analysierende Substanz auch eine Absorptionsbande aufweist. Als optisch aktiv werden Moleküle bezeichnet, die chiral sind. Diese Moleküle besitzen ein Chiralitätszentrum, beispielsweise ein asymmetrisches C-Atom mit vier unterschiedlichen Substituenten oder eines in dessen unmittelbarer Umgebung. Da die Substituenten sich in zwei zueinander spiegelbildlichen Arten um das Chiralitätszentrum anordnen können, werden diese Substanzen, abgeleitet vom griechischen Wort *enantion* für Gegenteil, als Enantiomere bezeichnet. Die chemischen Eigenschaften der Enantiomere sind gleichartig. Ein Unterschied besteht in dem differenten Absorptionsverhalten bezüglich des links- bzw. rechts-circular polarisierten Lichtes. In der Fern-UV- oder Amidregion des Spektrums [170-250 nm] können die Peptidbindungen detektiert und damit Aussagen zum Sekundärstrukturgehalt getroffen werden. Dieser Nachweis beruht auf der Nähe der Carbonylfunktion der Peptidbindung zu einem asymmetrischen Kohlenstoffatom und lässt das Chromophor [Carbonylfunktion] optisch aktiv werden. Entspricht die Absorption von rechts-circular polarisiertem Licht [A_R] nicht der Absorption von links-circular polarisiertem Licht [A_L] ist die Differenz $A_L - A_R$ bei einer definierten Wellenlänge ungleich null [Gl. 6.8].

$$\Delta A(\lambda) = A_L(\lambda) - A_R(\lambda) \quad \text{Gl. 6.8}$$

Durch Multiplikation mit dem Faktor 33 ergibt sich daraus die Elliptizität Θ in [deg] [Gl.6.9]. Der Faktor 33 resultiert aus der Umrechnung von Bogenmaß in Gradeinheiten [Gl. 6.10].

$$\Theta = 33 \cdot \Delta A(\lambda) \quad \text{Gl. 6.9}$$

$$33 = \ln 10 \frac{180}{4\pi} \quad \text{Gl. 6.10}$$

Die Standardisierung der Messdaten wird durch Division durch die Substratkonzentration c und der verwendeten Schichtdicke d der Küvette erzielt. Aus Gleichung 6.11 resultiert die molare Elliptizität $[\Theta]$.

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot 100}{c \cdot d} \quad \text{Faktor 100: Umrechnung von mmol in dmol} \quad \text{Gl. 6.11}$$

Durch den Einsatz der mittleren molaren Masse einer Aminosäure [MRW, *mean residue weight*] an Stelle des Molekulargewichts des Proteins resultiert $[\Theta]_{\text{MRW}}$.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\text{Signal} \cdot \frac{142,5}{5610051} \cdot 3300 \cdot \text{MRW}}{c \cdot d}$$

Gl. 6.12

$[\Theta]_{\text{MRW}}$	<i>mean residue weight</i> -Elliptizität	[deg·cm ² /dmol]
Signal	Ausgabeeinheit des Messgeräts bei definierter λ	
MRW	<i>mean residue weight</i> , mittleres Molekulargewicht einer Aminosäure des Zielproteins	[mg/mmol]
c	Proteinkonzentration des Messansatzes	[mg/mL]
d	Schichtdicke	[cm]

Die Berechnung des MRW der in der Arbeit verwendeten Proteine erfolgte nach Kelly *et al.* (2005) mittels Gl. 6.13 und ist in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

$$\text{MRW} = M / (N - 1)$$

Gl. 6.13

M	Molekulargewicht [Da]
N	Anzahl an Aminosäuren in der Peptidkette

Tab. 6.2 Übersicht über die Molekulargewichte der in dieser Arbeit generierten Proteinvarianten ohne Signalpeptid und deren zugehörige mittleren Molekulargewichte einer Aminosäure, berechnet nach Gl 6.13.

Protein	MRW [g/mol]	Masse [Da]	Anzahl AS
His ₆ -N-hCPT2	112,45	73433	654
His ₆ -N-hCPT2/S113L	112,49	73459	654
His ₆ -N-hCPT2/TV	112,47	73441	654

Faltungsstudien

Eine native Proteinkonformation ist, abgesehen von Fluktuationen, durch eine konkrete dreidimensionale Struktur definiert. Diese resultiert aus kovalenten oder nichtkovalenten Wechselwirkungen wie Disulfidbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen, ionischen Wechselwirkungen oder hydrophoben Interaktionen.

Additiv dazu kann auch eine ideale Packungsdichte zu einer gesteigerten Stabilität führen. Diese benannten stabilisierenden Wechselwirkungen werden durch denaturierende Effekte wie Temperaturerhöhung, Zugabe von Denaturantien oder Druckerhöhung partiell oder vollständig eliminiert.

Der denaturierte Zustand weist eine Vielzahl heterogener, flexibler, miteinander im Gleichgewicht stehender Intermediate auf, welche trotz der deutlich niedrigeren Anzahl an Wechselwirkungen im Vergleich zur nativen Konformation, nur geringe Stabilitätsunterschiede zeigen. Dieser Umstand wird dadurch realisiert, dass die durch die Faltung generierten energetisch ungünstigen Wechselwirkungen durch energetisch günstige Wechselwirkungen kompensiert werden müssen [Dissertation Köditz, 2004].

Die thermodynamischen Parameter der Faltungs- bzw. Entfaltungswege werden anhand von Gleichgewichtsuntersuchungen ermittelt und basieren auf der Voraussetzung von reversibel denaturierenden Proteinen. Die Untersuchungen zur Gleichgewichtslage konzentrieren sich auf die Messung von Übergangstemperaturen [T_m] und Übergangskonzentrationen an Denaturans [$D_{1/2}$]. Durch Bestimmung dieser Parameter für ein Wildtypprotein und davon abgeleitete Varianten können anschließend Vergleiche durchgeführt werden. Die thermodynamische Stabilität wird durch die freie Enthalpie des Gleichgewichts der Denaturierung definiert und wird im einfachsten Fall zwischen nativem und denaturiertem Zustand nach einem Zweizustandsmodell bestimmt. Die Gleichgewichtslage steht in direktem Zusammenhang mit den Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und der Rückfaltung, wobei durch steigende Intensität der Denaturantien das Gleichgewicht auf die Seite des denaturierten Zustands verschoben wird und die freie Enthalpie ΔG sinkt. ΔG setzt sich aus einem enthalpischen und einem entropischen Term entsprechend der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gl. 6.31) zusammen. Spektroskopisch kann diese Verschiebung des Gleichgewichts durch die Änderung von Signalintensitäten verfolgt und der Anteil an nativem und denaturiertem Protein berechnet werden. Die Übergangsmittelpunkte in Kombination mit den Anstiegen der Transitionen geben Auskunft über die Stabilität des Proteins.

Thermische Übergangskurven werden nach der gleichen Methode wie die durch chemische Denaturanzien induzierten Übergangskurven untersucht. Es besteht jedoch keine lineare Beziehung zwischen freier Enthalpie und der Temperatur.

6.6.1 Fern-UV-CD

Die Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren liefert Informationen zum Sekundärstrukturgehalt von Proteinen. Gleichzeitig kann die korrekte Faltung des Proteins überprüft werden. Die native Struktur der Proteinvarianten wurde durch die Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren in einem Wellenlängenbereich von 195-260 nm überprüft. Es wurden 0,15 mg/mL Protein in 25 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG, pH 8,0 eingesetzt. Der Tris-Puffer und das Detergens nOG eignen sich aufgrund ihrer niedrigen Absorptionseigenschaften bei niedrigen Wellenlängen im UV-Bereich. Die Anwesenheit von Chloridionen erhöht die Absorption unter 200 nm, war jedoch für die Messungen noch akzeptabel. Die Messtemperatur betrug 25 °C. Die Spektren wurden 60x akkumuliert. Die Aufnahme der Messdaten erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 20 nm/min. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Gleichung 6.12. Die Stabilität der Proteine war über den Akkumulationszeitraum gegeben.

6.6.2 Thermische Denaturierung

Die thermische Stabilität der Proteine wurde mittels Hitzedenaturierung bei einer Wellenlänge von 210 nm aufgenommen. Die Temperatur wurde mit einer Geschwindigkeit von 1 grad pro min bzw. 10 grad pro h von 5 auf 95 °C erhöht. Die finale Temperatur wurde für 5 min gehalten und dann auf 5 °C zurückgeführt. Der filtrierte Messpuffer setzte sich aus 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NaCl, 2 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG, pH 8,0 zusammen. Es wurde ein Phosphatpuffer gewählt, da Trispuffer thermoinstabil ist. Da phosphathaltige Puffersysteme eine hohe Eigenabsorption bei niedrigen Wellenlängen zeigen, erfolgte die Datenaufnahme bei 210 nm. nOG ist für Messungen im Fern-UV-Bereich geeignet. Es wurden 0,175 mg/mL Protein eingesetzt. Der Einfluß von Substraten auf die Thermostabilität wurde in Einzelmessungen durch Zugabe von 80 µM PalmitoylCoA, 80 µM CoA, 15 mM Carnitin oder 1 mM Palmitoylcarnitin überprüft. Zusätzlich wurden Blindwerte ohne Protein in Anwesenheit von Substraten aufgenommen und von den Messdaten subtrahiert. Die Temperatur in K wird gegen die Elliptizität [mdeg] aufgetragen und nach Gleichung 6.14 gefittet.

$$X = \frac{(n_N + m_N \cdot [T]) + (n_D + m_D \cdot [T]) \cdot \exp\left(\frac{\Delta G(T)}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G(T)}{RT}\right)} \quad \text{Gl. 6.14}$$

N	natives Protein
D	denaturiertes Protein
$\Delta G(T)$	freie Enthalpie der Denaturierung bei der Temperatur T [J/mol]
n	<i>offset</i>
m	Anstieg der Basislinie
R	universelle Gaskonstante [J/K·mol]
T	Temperatur [K]
X	Meßgröße

6.6.3 Chemische Denaturierung

Die Stabilität der nativen Proteine nach Zugabe von chaotropen Reagenzien wurde mittels Titrationsreihe mit Harnstoff von 0 bis 8 M untersucht. Dazu wurden 50 mL einer 1 M und einer 10 M Harnstoffstammlösung hergestellt. Zu jeder Messung der Harnstoffkonzentration wurde ein Leerwert ohne Protein aufgenommen. Um Pipettierungenauigkeiten zu reduzieren, wurden die Harnstoffkonzentrationen von Mess- und Leerwerten mit einem Titrator ML504B Dispenser [Hamilton Company, USA] vorbereitet. Es wurde ein 15x konzentrierter Messpuffer [375 mM Tris/HCl, 750 mM NaCl, 30 mM TCEP, 15 % [w/v] nOG, pH 8,0] hergestellt. Die Proteinkonzentration der Messung betrug 0,1 mg/mL. Messpuffer und Protein wurden mit einer 10 µL- bzw. 50 µL-Spritze [Hamilton Company, USA] zupipettiert. Die Endkonzentration des Puffers hatte eine Zusammensetzung von 25 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG bei pH 8,0.

Alle Proben wurden 10 min bei RT inkubiert um eine Gleichgewichtseinstellung zu gewähren. Die Messtemperatur betrug 25 °C. Die Aufnahme der Einzelspektren erfolgte zwischen 205-230 nm. Alle Messungen wurden fünffach akkumuliert. Zur Auswertung wurden die Elliptizitäten von 221-223 nm gemittelt und gegen die verwendeten Harnstoffkonzentrationen aufgetragen. Die Messpunkte wurden nach Gleichung 6.15 gefittet. Aufgrund der hohen Absorptionseigenschaften von Harnstoff, selbst bei geringer Schichtdicke, konnten die Daten nur in einem Wellenlängenbereich von 222 oder 225 nm ausgewertet werden.

$$X = \frac{(n_N + m_N \cdot [D]) + (n_D + m_D \cdot [D]) \cdot \exp\left(\frac{-m_T \cdot ([D]_{50\%} - [D])}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-m_T \cdot ([D]_{50\%} - [D])}{RT}\right)} \quad \text{Gl. 6.15}$$

N	natives Protein
D	denaturiertes Protein
m_T	Anstieg am Transitionsmittelpunkt
n	<i>offset</i>
m	Anstieg der Basislinie
$[D]$	Denaturanskonzentration [M]
R	universelle Gaskonstante [J/K·mol]
T	Temperatur [K]
X	Meßgröße

6.7 Struktur-*alignment*

Die Kristallstruktur der CPT2 aus *Rattus norvegicus* wurde 2006 parallel von zwei Arbeitsgruppen [Rufer *et al.*, 2006; Hsiao *et al.*, 2006] gelöst. Rufer und Mitarbeiter kokristallisierten das Enzym im Komplex mit dem Inhibitor ST1326, dessen chemische Struktur im Monomer das Substratanalogon für Palmitoyl-L-carnitin darstellt, jedoch an einer Stelle inkorrekt in der pdb-Datenbank hinterlegt ist.

Aufgrund dessen wurde ein *refinement* der vorhandenen Struktur durchgeführt und mit dieser korrigierten Struktur gearbeitet. Die Koordinaten des Liganden wurden mit dem Programm JLigand korrigiert und mittels des Programms Coot [Emsley *et al.*, 2010] in die Basisstruktur integriert. Die in dem pdb-*file* hinterlegten Strukturfaktoren wurden für ein erneutes *refinement* mittels RefMac5 [Vagin *et al.*, 2004; Murshudov *et al.*, 2011], einen Teil des Programms CCP4 [Potterton *et al.*, 2003], genutzt.

Die daraus resultierende verfeinerte Struktur der CPT2 der Ratte wurde als Basis zur Modellierung einer humanen CPT2-Struktur mittels SwissProt [Peitsch, 1995; Guex & Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003] genutzt, da trotz einer Vielzahl getesteter Kristallisationsbedingungen die Kristallisation der humanen CPT2 nicht erfolgreich war. Dies kann verschiedene Ursachen haben, wie z.B. eine unzureichend monodisperse Probe aufgrund von Protein- oder Nukleinsäurekontaminationen, eine insuffiziente Stabilität des Proteins aufgrund der hohen einzusetzenden Proteinkonzentration, nicht optimierte Puffersysteme, pH-Wert und Additiva oder eine nicht geeignete Kristallisationsmethode. Der B-Faktor, welcher Aussagen über flexible bzw. starre Bereiche des Enzyms gibt, kann bei der humanen CPT2 zu einer Interpretation nicht herangezogen werden, da es sich um eine modellierte Struktur handelt, welche auf Basis der rCPT2 generiert wurde. Diese erforderlichen Daten können nur mittels experimenteller Strukturdaten erzeugt werden.

6.8 Kinetische Messungen

6.8.1 Photometrischer Aktivitätstest mittels Ellman's Reagens

Theorie

Die Bestimmung der Enzymaktivität der His₆-N-hCPT2 und Varianten erfolgte mit Modifikationen nach dem Protokoll des gekoppelten optischen Tests nach Rufer *et al.* (2006). Der Test beruhte ursprünglich auf einer Vorschrift von Marquis *et al.* (1964). Ellman beschrieb erstmals 1959 die Kombination von 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure [DTNB] mit Sulfhydrylgruppen zur Bildung von 4-Nitrothiolat. Der Aktivitätstest basiert auf dem Nachweis von freien Thiolen im Reaktionsansatz. hCPT2 katalysiert in einer Esterifikation die Übertragung eines Fettsäurerestes [Palmitoyl-] von PCoA auf L-Carnitin. DTNB reagiert mit der freien Thiolgruppe des CoA-Moleküls in einer Substitutionsreaktion und bildet ein gemischtes Disulfid und den gelben Farbstoff 4-Nitrothiolat. Die Substitution ist spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 410 nm zu verfolgen. Die Reaktion verläuft schnell und stöchiometrisch, wobei durch Zugabe von 1 Mol Thiol 1 Mol 4-Nitrothiolat freigesetzt wird [Abb. 6.3].

Der Extinktionskoeffizient von DTNB beträgt $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [Ellman, 1959].

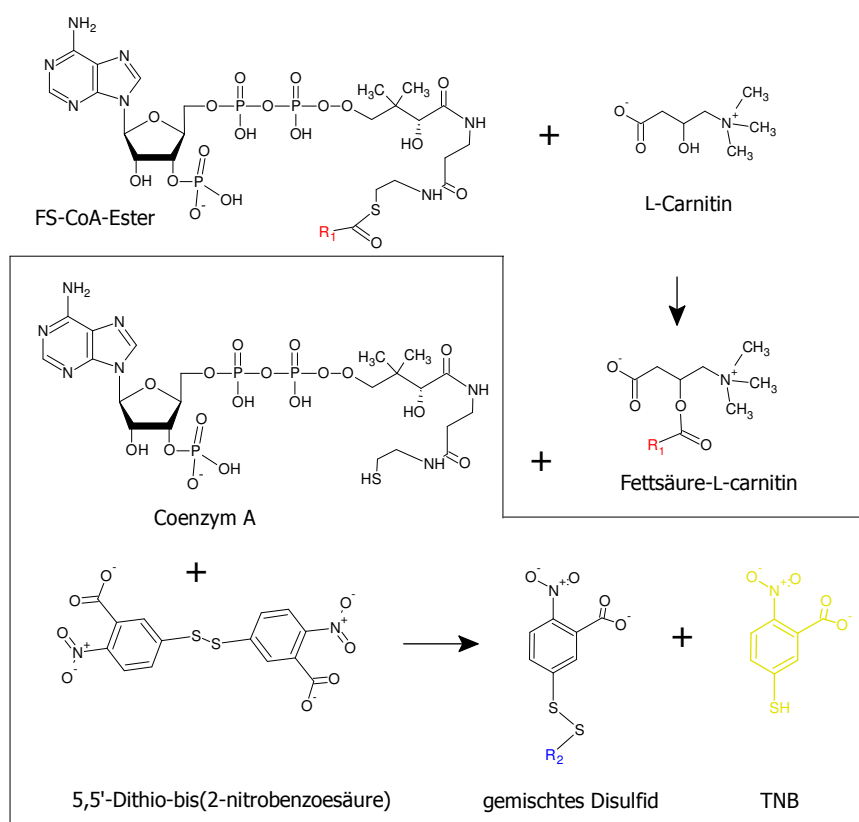


Abb. 6.3 Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktion der CPT2 sowie der Detektionsreaktion [Kasten] im DTNB-Aktivitätstest nach Rufer *et al.* (2006). Der Fettsäurecoenzym A-Ester [FS-CoA-Ester] und das L-Carnitin reagieren zu Fettsäure-L-carnitin unter Freisetzung von Coenzym A. Coenzym A wird in einer Nachfolgereaktion mit DTNB unter Bildung eines gemischten Disulfids und der Freisetzung von 4-Nitrothiolat [TNB] umgesetzt. R₁: Fettsäurerest, R₂: Coenzym A.

6.8.1.1 Aktivitätstest - Durchführung und Auswertung

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung bei 25 °C an einem Beckman DU®800 Spektrophotometer [Beckman Instruments Inc., USA] durchgeführt. Es wurden PMMA-Halbmikroküvetten [Brand GmbH & Co KG, Wertheim] verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 1000 µL. Der Messpuffer setzte sich final aus 50 mM KH₂PO₄, 120 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 zusammen und wurde sterilfiltriert. Die Endkonzentration an DTNB betrug 1 mM. Es wurden 15 nM Protein pro Messung eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden pipettiert, sorgfältig gemischt und 1 min bei 25 °C inkubiert. Nach dem Start der Reaktion mit Substrat konnte die Geschwindigkeit des *turnover* v , welche der Formation von 5'-Nitro-2-thiobenzoat [TNB] entsprach, bei 410 nm verfolgt werden und war proportional dem Verbrauch an PCoA.

Die kinetischen Parameter der in Tabelle 6.3 unter Substrat 1 aufgeführten Verbindungen wurden durch Aufnahme von v/S -Charakteristiken bestimmt. Dabei wurde die Konzentration von Substrat 1 im Test variiert. Die Konzentrationsbereiche sind in den jeweiligen v/S -Charakteristiken im Anhang [Abb. 10.10-10.18] zu finden. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Substrat 2. Das Volumen des zu variiierenden Reaktionspartners wurde bei der Messung der Blindreaktion durch Puffer substituiert. Die Messwerte wurden anschließend um diesen Wert korrigiert. Die Datenauswertung erfolgte mittels Gleichung nach einer Michaelis-Menten Auftragung [Gl. 6.16] oder nach einer Substratüberschusshemmung [Gl. 6.17]. Die Berechnung von S_{opt} wurde nach Gleichung 6.18 durchgeführt, welche aus Schellenberger (1989) entnommen wurde. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm KaleidaGraph Version 4.0 [Synergy Software, USA].

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S_0}{K_M + S_0} \quad \text{Gl. 6.16}$$

$$v = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \left(\frac{K_M}{S_0^n}\right) + \left(\frac{S_0^n}{K_I}\right)\right)} \quad \text{Gl. 6.17}$$

$$S_{\text{opt}}^n = \sqrt{K_I \cdot K_M} \quad \text{Gl. 6.18}$$

$$k_{\text{kat}} = \frac{V_{\max}}{\varepsilon \cdot c_E} \quad \text{Gl. 6.19}$$

v	Geschwindigkeit des <i>turnover</i> [min ⁻¹]
$V_{\max}$	maximale Geschwindigkeit [min ⁻¹]
S_0	Ausgangssubstratkonzentration [M]
K_M	Michaelis-Menten-Konstante [M]
K_I	Inhibitor-konstante [M]
n	Hillkoeffizient
S_{opt}	optimale Substratkonzentration [M]
k_{kat}	Katalysekonstante [s ⁻¹]
ε	Extinktionskoeffizient _{DTNB} 13600 [M ⁻¹ · cm ⁻¹]
c_E	eingesetzte Enzymkonzentration [M]

Tab. 6.3 Zusammenfassung der Kombinationen der Substrate 1 und 2 im DTNB-Aktivitätstest. Substrat 1 wurde in variierenden Konzentrationen in einer Messreihe eingesetzt, Substrat 2 wird mit einer festgesetzten Konzentration innerhalb einer Messreihe zugegeben. Die Länge der Kohlenstoffkette des Substrats 1, dessen Sättigungsgrad und der Ort der Doppelbindungen sind wiedergegeben. Aufgrund der Vielzahl der Messungen des Wildtypproteins und der Varianten und der dabei verwendeten Konzentrationsbereiche wird auf eine exakte Konzentrationsangabe an dieser Stelle verzichtet. Diese sind in den jeweiligen Graphen der Auswertung im Anhang in den Abbildungen 10.10-10.18 hinterlegt.

Kettenlänge und Sättigungsgrad des Substrats 1	Substrat 1	Substrat 2
	Carnitin	Palmitoylcoenzym A
C6:0	Hexanoylcoenzym A	Carnitin
C8:0	Oktanoylcoenzym A	Carnitin
C10:0	Dekanoylcoenzym A	Carnitin
C12:0	Lauroylcoenzym A	Carnitin
C14:0	Myristoylcoenzym A	Carnitin
C16:0	Palmitoylcoenzym A	Carnitin
<i>cis</i>-9-C16:1	Palmitoleoylcoenzym A	Carnitin
<i>trans</i>-9-C16:1	Palmitelaidoylcoenzym A	Carnitin
C18:0	Stearoylcoenzym A	Carnitin
<i>cis</i>-9-C18:1	Oleoylcoenzym A	Carnitin
<i>cis</i>-11-C18:1	Vaccenoylcoenzym A	Carnitin
<i>cis,cis</i>-9,12-C18:2	Linoleoylcoenzym A	Carnitin
C20:0	Arachidoylcoenzym A	Carnitin
<i>cis,cis,cis,cis</i>-5,8,11,14-C20:4	Arachidonoylcoenzym A	Carnitin
<i>cis</i>-13-C22:1	Erucoylcoenzym A	Carnitin

6.8.1.2 Berechnung der relativen und absoluten Fehler

Die generierten Daten aus Kapitel 6.8.1.1 stellen Näherungswerte zu einem wahren Wert x aus dem Fit dar. Die Angabe der Fehler wurde aus dem Fit des Programms KaleidaGraph V4.0 [Synergy Software, USA] übernommen. Bei der Berechnung der Konstanten k_{kat} [Gl. 6.19], k_{kat}/K_M und S_{opt} [Gl. 6.18] aus den Werten, die mit Fehlern behaftet sind, müssen die Fehler kombiniert werden. Die Ungenauigkeit entsteht in erster Linie durch die in die Rechnung eingehenden Näherungswerte. Dessen Fehler verhalten sich additiv. Die Berechnung der relativen bzw. absoluten Fehler am Beispiel der Bestimmung der katalytischen Effizienz ist in Gl. 6.20-22 beschrieben [Kleine Enzyklopädie Mathematik 1971]. Die berechneten Parameter und ihre relativen und absoluten Fehler sind in Tabelle 10.1 im Anhang dargestellt. Die relativen Fehler betragen im Allgemeinen nicht mehr als 25 % vom Näherungswert.

$$f = \frac{k_{kat} \pm \Delta a}{K_M \pm \Delta b} \quad \text{Gl. 6.20}$$

Relativer Fehler:
$$\Delta f_r = \frac{\Delta f}{|f|} = \frac{\Delta a}{k_{kat}} + \frac{\Delta b}{K_M} \quad \text{Gl. 6.21}$$

Absoluter Fehler:
$$\Delta f_a = f \cdot \frac{\Delta f}{|f|} \quad \text{Gl. 6.22}$$

Δa	Abweichung von k_{kat}
Δb	Abweichung von K_M
Δf	Fehler
Δf_r	relativer Fehler
Δf_a	absoluter Fehler

6.8.1.3 Langzeitstabilitätsuntersuchung

Die Stabilität von Proteinen wird durch intramolekulare und intermolekulare Interaktionen beeinflusst. Die Ausbildung von Disulfidbrücken kann die Tertiärstruktur von Proteinen ebenso signifikant stabilisieren, wie die Wechselwirkung gegensätzlich geladener Aminosäuren, die Ausbildung von Wasserstoffbrücken oder hydrophober Bereiche durch ungeladene Aminosäuren, die die Wassermoleküle aus dem Protein weitgehend ausschließen. Trotz all dieser Effekte ist der stabil gefaltete Zustand eines Proteins energetisch oft nur geringfügig günstiger als der ungefaltete Zustand, bei dem die Aminosäuren mit den umgebenden Wasser- oder Lösungsmittel-Molekülen interagieren [entropische Effekte]. Jedes Protein hat eine charakteristische Halbwertszeit, welche sowohl durch die Abfolge der Aminosäuren am N-Terminus [Varshavsky *et al.*, 1997] als auch durch die Temperatur oder durch Mutationen im Molekül beeinflusst wird.

Die Halbwertszeiten der His₆-N-hCPT2-Proteine [WT + Varianten] wurden durch Langzeitinkubation bei 45 °C, 42 °C, 40 °C und 37 °C bestimmt. Aufgrund des auftretenden Verdunstungseffekts bei höheren Temperaturen war die Nutzung einer Deckelheizung eines PCR-Cyclers [Eppendorf AG, Hamburg] bei 105 °C obligat. Da es sich bei den rekombinant gereinigten His₆-N-hCPT2-Proteinen um humane Enzyme handelte, symbolisierten die 37 °C die normale Körpertemperatur. Eine Erhöhung der Temperatur auf 40 bzw. 42 °C simulierte die Bedingung im Körper, der Proteine bei Fieber ausgesetzt sind. Die Messung der Restaktivitäten erfolgte in 1 mM DTNB, 5 µM PCoA, 10 mM bzw. 12 mM L-Carnitin und 15 nM Protein im DTNB-Test [Kapitel 6.8.1.3]. Die Daten wurden nach einer Gleichung erster Ordnung gefittet. Die Berechnung der kinetischen Halbwertszeit erfolgte nach Gleichung 6.24. Die Bestimmung der Aktivierungsparameter erfolgte durch Auftragung von $\ln[k/T]$ gegen $\ln[T]$ aus Gl. 6.35.

$$A = n + A_0 \cdot e^{(-k \cdot t)} \quad \text{Gl. 6.23}$$

k	Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung [min^{-1}]
n	<i>offset</i>
A_0	Startmenge an aktivem Protein [M]
t	Zeit [min]
A	Absorption

$$k = \ln 2 / t_{1/2} = 0,69 / t_{1/2} \quad \text{Gl. 6.24}$$

$t_{1/2}$ Halbwertszeit [min]

Die Geschwindigkeit der Entfaltung eines Proteins und die daraus resultierende kinetische Stabilität wird durch die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^*_D beschrieben. Diese Größe wird als Maß für die Stabilität verwendet. Der quantitative Zusammenhang zwischen Temperatur und Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Eyring-Gleichung [Gl. 6.33] beschrieben. Um Aussagen über die kinetische Stabilität der His₆-N-hCPT2 und deren Varianten treffen zu können, werden die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Entfaltung bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Während des Entfaltungsprozesses wird ein aktivierter Komplex

gebildet. Der Übergangszustand wird beim Energiemaximum durchlaufen. Dieser stellt ein instabiles, entropisch höher geordnetes Molekül dar, indem Wechselwirkungen gelöst oder gebildet werden können. Wird dabei der erforderliche Schwellenwert überwunden, liegt das Protein folglich denaturiert vor. Wird die freie Aktivierungsenthalpie nicht aufgebracht, kommt es zur Rückbildung des nativen Zustands.

Der Übergangszustand steht mit den Reaktanden im Gleichgewicht. Dadurch ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der Konzentration an aktiviertem Komplex.

$$v = -\frac{\Delta E^*}{\Delta t} = k^* \cdot E^* \quad \text{Gl. 6.25}$$

E^*	Konzentration an aktiviertem Übergangszustand [M]
k^*	Geschwindigkeitskonstante [min^{-1}]
t	Zeit [min]
v	Geschwindigkeit [M/min]

Die statistische Thermodynamik definiert k^* als:

$$k^* = \frac{k_B \cdot T}{h} \quad \text{Gl. 6.26}$$

T	absolute Temperatur [K]
k_B	Boltzmannkonstante [$1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$]
h	Planksches Wirkungsquantum [$6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$]

k^* beschreibt dabei die universelle Geschwindigkeitskonstante für einen Übergangszustand und ist mit der Zerfallsfrequenz n des aktivierten Komplexes konform [$\sim 6 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$]. Da der aktivierte Komplex im Gleichgewicht mit dem Ausgangszustand an nativem Protein steht, kann das Massenwirkungsgesetz abgeleitet werden [Gl. 6.27].

$$E^* = K^* \cdot E_N \quad \text{Gl. 6.27}$$

K^*	thermodynamische Gleichgewichtskonstante
E_N	Konzentration an nativem Enzym

Der native Ausgangszustand des Proteins und der aktivierte Komplex werden durch die schnelle Nachbildung des Gleichgewichtszustands zügig ineinander umgewandelt. Aus Gleichung 6.25 resultiert unter Einbeziehung der Gleichungen 6.26 und 6.27 die Gleichung 6.28:

$$-\frac{\Delta E}{\Delta t} = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot K^* \cdot E_N \quad \text{Gl. 6.28}$$

Kombiniert man die Gleichung 6.28 mit $v = \frac{\Delta E_D}{\Delta t} = k \cdot E_N$ resultiert für die Gesamtreaktion die Geschwindigkeitskonstante [Gl. 6.29]:

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot K^* \quad \text{Gl. 6.29}$$

Eine weitere thermodynamische Beschreibung der Gleichgewichtseinstellung zwischen E_N und E^* basiert auf der Van't-Hoff'schen-Reaktionsisothermen:

$$\Delta G^* = -RT \cdot \ln K^* \quad \text{Gl. 6.30}$$

R universelle Gaskonstante [$8,1345 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$]
 ΔG^* freie Enthalpie des Übergangszustands [J/mol]

ΔG^* wird durch die Gibbs-Helmholtz-Gleichung beschrieben:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \cdot \Delta S^* \quad \text{Gl. 6.31}$$

ΔG^* freie Aktivierungsenthalpie [kJ/mol]
 ΔH^* Aktivierungsenthalpie [kJ/mol]
 ΔS^* Aktivierungsentropie [$\text{J/mol} \cdot \text{K}$]

Wird Gleichung 6.30 nach Kombination mit Gleichung 6.31 nach $\ln K^*$ aufgelöst, entsteht

$$\ln K^* = -\frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R} \quad \text{Gl. 6.32}$$

Unter Einbeziehung von Gleichung 6.29 resultiert die Eyring-Gleichung:

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta H^*}{RT}} \cdot e^{\frac{\Delta S^*}{R}} \quad \text{Gl. 6.33}$$

Diese Gleichung kann zur experimentellen Auswertung herangezogen werden. Die Linearisierung führt zu folgender Form:

$$\ln k = \ln \frac{k_B}{h} T - \frac{\Delta H^*}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^*}{R} \quad \text{Gl. 6.34}$$

Wird $[\ln k/T]$ gegen $1/T$ aufgetragen, resultiert eine Gerade der Form $y=mx+n$ mit folgender Gleichung:

$$\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^*}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^*}{R} \quad \text{Gl. 6.35}$$

Aus dem Anstieg $m = -\Delta H^*/R$ kann ΔH^* , aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse ΔS^* bestimmt werden. Nachfolgend kann aus Gleichung 6.31 die freie Reaktionsenthalpie des Übergangszustands bei einer definierten Temperatur berechnet werden. Um die Änderung

der freien Reaktionsenthalpie des Übergangszustands zwischen Wildtypenzym und Varianten beurteilen zu können, wurde $\Delta\Delta G^*_{WT \rightarrow S113L}$ bzw. $\Delta\Delta G^*_{WT \rightarrow TV}$ bestimmt.

6.8.1.4 Inhibitorstudien

Der Einfluss von R-Aminocarnitin als potentieller Inhibitor auf die Aktivität der His₆-N-hCPT2-Proteine wurde durch Aufnahme von Messreihen verschiedener Inhibitorkonzentrationen untersucht. Dabei wurden 5 Datensätze aufgenommen. Die L-Carnitinkonzentration wurde innerhalb einer Messreihe konstant, die Konzentration an R-Aminocarnitin innerhalb einer Messreihe variiert. Die Datenauswertung und die Bestimmung des Hemmtyps erfolgten mittels Dixon-Plot.

Der Einfluss von MalCoA auf die Aktivität der His₆-N-hCPT2-Proteine wurde durch Aufnahme einer Messreihe mit einer konstanten, in Überschuss gehaltenen L-Carnitinkonzentration und variierenden MalCoA-Konzentrationen bestimmt. Die Prozente der Restaktivitäten wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Inhibitorkonzentration aufgetragen.

6.9 *MicroArray* aus humaner RNA

Die für den *MicroArray* benötigten humanen Muskelproben resultierten von Patienten, bei denen eine Muskelbiopsie zur Klärung diagnostischer Fragestellungen durchgeführt wurde. Die Biopsate der Kontrollgruppe, bestehend aus 3 männlichen Probanden [26-50 Jahren], zeigten nach klinischer, elektrophysiologischer, histologischer und biochemischer Untersuchung keine neuromuskulären Störungen. Die Vergleichsgruppe CPT2-defizienter Patienten bestand ebenfalls aus 3 männlichen Probanden analogen Alters [29-52 Jahren] mit einem genetisch gesicherten CPT2-Mangel [Haplotyp S113L/V368I/M647V].

Die Biopsate wurden, wie in Kapitel 4.9 beschrieben, aufbereitet, die enthaltene Total-RNA isoliert und mittels *MicroArray*-Technik analysiert.

Die Verarbeitung der präparierten Total-RNA und das Auslesen der Affymetrix HumanGene 1.0 st-v1-Chips wurde am Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung [IZKF] in Leipzig durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Ivo Grosse und Frau Dipl.-Bioinf. Yvonne Pöschl, Institut für Bioinformatik, MLU Halle-Wittenberg. Die graphische Aufbereitung der Daten wurde mittels Excel 2003 [Microsoft, USA] oder KaleidaGraph 4.0 [Synergy Software, USA] durchgeführt.

6.10 *Real time* -PCR-Analyse

Die Gene, deren Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe im *MicroArray* [Kapitel 6.9] signifikant verändert vorlagen, sollten durch eine quantitative PCR bestätigt werden. Die Analyse erfolgte mittels *fast-two-step*-Reverse-Transkriptase-PCR.

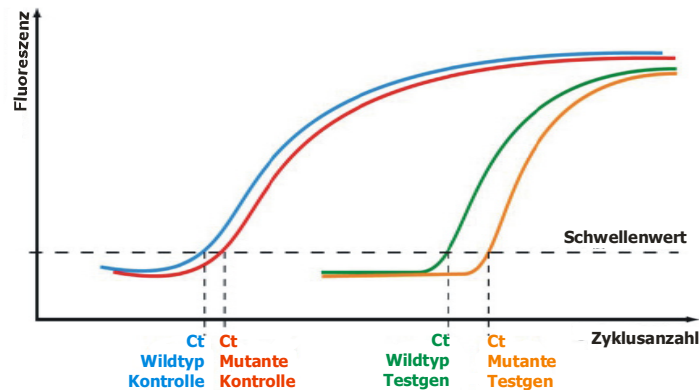
6.10.1 Reverse Transkription

500ng Total-RNA der aus Kapitel 4.9 präparierten Muskelgewebe-Proben wurden einer Reverse-Transkriptase-Reaktion zur Generierung von cDNA unterzogen. Es wurde das QuantiTect®Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden) verwendet. In einem ersten Schritt war es essentiell, die noch vorhandene genomische DNA-Kontamination aus den isolierten RNA-Proben durch einen enzymatischen Verdau zu entfernen. Die nachfolgende Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde mit einem Mix aus Oligo-dT und *random*-Primern nach Protokoll des QuantiTect®Reverse Transcription Kits durchgeführt. Es wurden sowohl eine Kontrolle ohne Total-RNA [NTK] als auch eine Probe ohne Reverse-Transkriptase-Enzymmix [RTK] mitgeführt. Die RTK wurde realisiert, um den Erfolg des Verdau der genomischen DNA aus der Total-RNA zu überprüfen.

6.10.2 Quantitative PCR

Die *real time*-PCR wurde mittels SYBR-Green auf einem Light Cycler 1.5 [Roche Diagnostics, Mannheim] durchgeführt. SYBR-Green [2-(2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-

phenyl-1*H*-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation], ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, bindet doppelsträngige DNA. Der resultierende DNA-Fluoreszenzfarbkomplex absorbiert blaues Licht [$\lambda = 494 \text{ nm}$] und emittiert grünes Licht bei 521 nm. Die cytosolisch exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase [GAPDH] und die mitochondrial lokalisierte Citratsynthase [CS] dienten als interne Kontrollen für alle Proben. Der Ct-Wert [*cycle threshold number*] beschreibt den Teil der Kurve, bei dem die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht und die Fluoreszenz erstmals über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dieser wurde für alle analysierten Gene bestimmt.



$$\text{Expressionsniveau Testgen (Mutante)} = \frac{2^{[Ct \text{ Wildtyp Testgen} - Ct \text{ Mutante Testgen}]}}{2^{[Ct \text{ Wildtyp Kontrollgen} - Ct \text{ Mutante Kontrollgen}]}} = \frac{2^{\Delta Ct \text{ Testgen}}}{2^{\Delta Ct \text{ Kontrollgen}}} \quad \text{Gl. 6.36}$$

Abb. 6.4 Modifizierte Abbildung der Berechnung des Expressionsniveaus eines Testgens (Mutante) nach Vorlage von <http://www.ruhr-uni-bochum.de/sfb480/Workshop.../Real Time Seminar SFB.pdf>. Die Ct-Werte der Zielgene und internen Kontrollgene aus der Test- und Kontrollgruppe wurden in einer quantitativen Messung mittels *real time*-PCR ermittelt und zur Berechnung in oben angegebene Gleichung eingesetzt.

Die Niveaus der Genexpression wurden mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode bestimmt. Durch dieses Mittel erfolgte die Analyse der Zielgenexpression relativ zur internen Kontrolle und relativ zu der verwendeten Kontrollgruppe. Die angewandten Primer und die Größe der Amplifikate sind in Tabelle 10.4 im Anhang aufgeführt.

Es kam das QuantiFast SYBR-Green PCR-Kit [Qiagen GmbH, Hilden] zur Anwendung. 1 μL der generierten cDNA wurden mit 9 μL RNase freiem Wasser auf Eis gemischt. 10 μL 2x QuantiFast SYBR-Green PCR-Master-Mix und 2 μL 10x QuantiTect Primer-Assay wurden ebenfalls pipettiert. Beide Mastermixe wurden vereint und in eine LightCycler®Kapillare [Roche Diagnostics, Mannheim] gefüllt. Die Kapillaren wurden mit Hilfe eines Adapters in einer Hettich Micro 200 Zentrifuge für 1 min bei 700 rpm sedimentiert. Die *real time*-PCR wurde mittels der in Tab. 6.4 aufgezeigten Parameter durchgeführt.

Tab. 6.4 Bedingungen der Durchführung der *real time*-PCR.

Funktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Aktivierung	95 °C	5 min	1
Quantifizierung	95 °C	10 s	40
	60 °C	30 s	
Schmelzkurvenanalyse	95 °C	15 s	1
	60 °C	15 s	
	95 °C	0,1 °C/s	
Kühlen	40 °C	30 s	1

Von jedem Primer wurde eine Schmelzkurve aufgenommen. Exemplarisch sind einige Schmelzkurven im Anhang dargestellt [Abb. 10.24]. Nach Abschluss der qPCR wurden die Proben einer Agarose-Gelelektrophorese [Kapitel 4.5] unterzogen, [Gel im Anhang Abb. 10.25]. Beide Experimente dienten der Überprüfung der spezifischen Bindung der Primer an die cDNA. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Excel 2003 [Microsoft, USA] oder KaleidaGraph Version 4.0 [Synergy Software, USA].

7 Ergebnisse & Diskussion

7.1 Molekularbiologische Arbeiten

7.1.1 *Pichia pastoris* -Expressionssystem

7.1.1.1 Klonierung in pPICZ B und Transformation des Konstrukts in TOP10F'

Der Klon IRAUp969H109D6 wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (Berlin) erworben. Daraus erfolgte die Isolation des *cpt2*-Gens. Mit Hilfe der angefügten Restriktionsschnittstellen *Kpn* I und *Avr* II wurde das Gen in den *shuttle*-Vektor pPICZ B ligiert, in TOP10F'-Zellen transformiert und vermehrt.

Das Agarosegel des isolierten *cpt2*-Gens mit angefügten Schnittstellen, das parentale Plasmid, das pPICZ/*cpt2*-Konstrukt und eine Analyse der Länge der Restriktionsfragmente des pPICZ/*cpt2*-Konstrukts sind in Abbildung 7.1 dargestellt. Das *cpt2*-Gen, geschnitten mit *Kpn* I und *Avr* II, zeigte eine Größe von 2053 bp. Weitere dünne Banden stellen nichtspezifische PCR-Produkte dar. Das Ligationsprodukt hatte eine Länge von 5335 bp und lag nach der Transformation in die *E. coli* TOP10F'-Zellen, ebenso wie das parentale Plasmid, zirkulär vor. Die weiteren sichtbaren Banden entsprechen Supersekundärstrukturen der DNA und stellen keine Verunreinigungen dar. Es wurde eine Analyse der Länge der Restriktionsfragmente mit den Restriktionsendonukleasen *Bam* H I und *A*/w N I durchgeführt. *Bam* H I schneidet das zirkuläre Konstrukt einmal und hat dessen Linearisierung mit einer Bande von 5335 bp zur Folge. *A*/w N I weist zwei Schnittstellen im *cpt2*-Gen und eine im Plasmid auf, sodass 3 Fragmente mit einer Bandengröße von 3071 bp, 1451 bp und 713 bp entstanden.

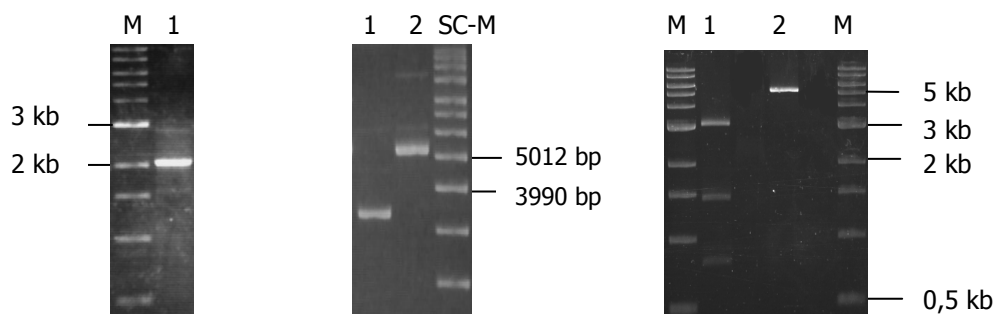


Abb. 7.1 **Links:** 1 %iges Agarosegel des *Kpn* I / *Avr* II – verdautes *hcpt2*/TV-PCR-Konstrukts. M: 1 kb-Leiter, 1: *Kpn* I / *Avr* II-verdautes *hcpt2*/TV-PCR-Konstrukt. **Mitte:** 1 %iges Agarosegel des zirkulären parentalen Plasmids pPICZ B und pPICZ/*cpt2*/TV. 1: zirkuläres parentales Plasmid pPICZ B [3328 bp], 2: Konstrukt pPICZ/*cpt2*/TV [5335 bp], SC-M: *Supercoiled*-DNA-Marker. **Rechts:** 1 %iges Agarosegel des Verdaus von pPICZ/*cpt2*/TV mit Restriktionsenzymen. M: 1 kb-Leiter, 1: pPICZ/*cpt2*/TV nach *A*/w N I-Verdau [3071 bp/1451 bp/ 831 bp], 2: pPICZ/*cpt2*/TV nach *Bam* H I-Verdau [5335 bp].

7.1.1.2 Mutagenesen

Das Signalpeptid wurde in zwei Schritten durch ortsgerichtete Mutagenese wie in Kapitel 4.1.6.2 beschrieben entfernt. Durch eine Sequenzierung konnte sowohl die erfolgreiche Eliminierung des Startcodons an Position 1 bis 3 von einem ATG zu einem ATT [Abb. 7.2], als auch die Generierung eines neuen Startcodons an Position 73-75 [Abb. 7.3] des *cpt2*-Gens nachgewiesen werden.

1.Schritt

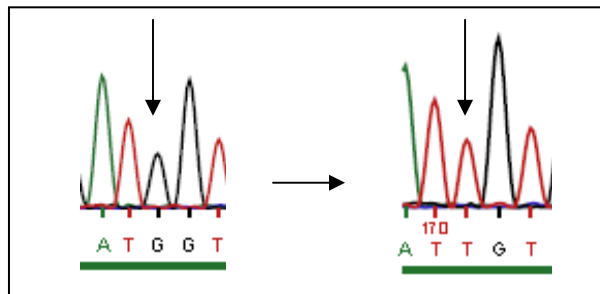


Abb. 7.2 Auszug der Nukleotidsequenz des Gens *hcpt2*. Abgebildet ist die Substitution der Base Guanin an Position 3 des *cpt2*-Gens [links] zu Thymin [rechts] [Base 3 des *cpt2*-Gens entspricht dem Nukleotid 171 der dargestellten Sequenzierung]. Ziel war es, das reguläre ATG-Startcodon zu eliminieren. Der Basenaustausch ist mit einem Pfeil markiert.

2.Schritt

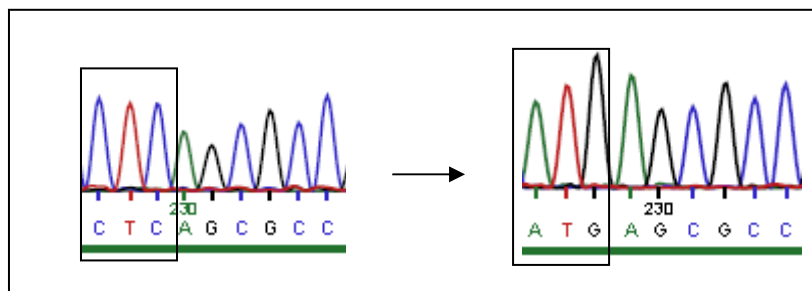


Abb. 7.3 Auszug der Nukleotidsequenz des Gens *hcpt2*. Wiedergegeben ist die Modifikation des Basentriplets CTC [links] der Positionen 73 bis 75 des *hcpt2*-Gens zu ATG [rechts] [Die Nummerierung der Sequenzierung entspricht nicht der Nummerierung der Gensequenz]. Ziel war es, ein ATG-Startcodon an dieser Stelle zu inserieren, um das Gen für ein Protein ohne Signalpeptid zu generieren. Das betreffende Triplet ist markiert.

Die vollständige Sequenzierung des Konstrukts pPICZ/*cpt2* identifizierte 3 Punktmutationen, die auf Proteinebene zu den Aminosäuresubstitutionen S113L, V368I und M647V führten. Auf Basis dieses Konstruktes wurden mittels multipler ortsgerichteter Mutagenesen jeweils das Gen für das Wildtypprotein sowie die isolierte S113L-Variante erzeugt.

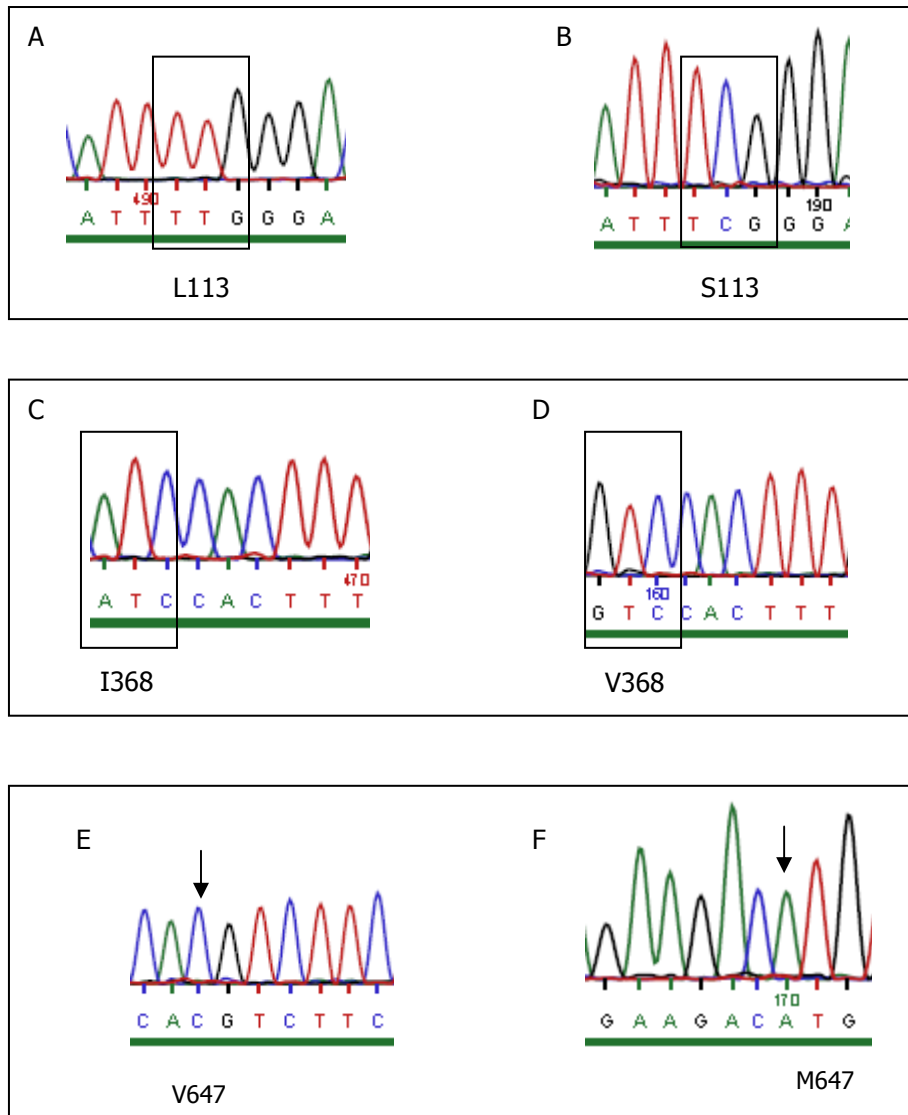


Abb. 7.4 Auszug der Nukleotidsequenzen des Gens *hcpt2*. Dargestellt sind die Bereiche der Sequenzen des modifizierten *cpt2*-Gens und die erfolgreichen Rückmutationen zur natürlichen Gensequenz. Die Nummerierungen der Sequenzierungen entsprechen nicht der Nummerierung der Gensequenz. Die betreffenden Basen/ Tripletts sind markiert. **A:** forward-Sequenzierung, Modifikation des Tripletts der Aminosäure 113 zu Leucin [TTG]; **B:** forward-Sequenzierung, Rückmutation des Tripletts der Aminosäure 113 zu Serin [TCG]; **C:** forward-Sequenzierung, Modifikation des Tripletts der Aminosäure 368 zu Isoleucin [ATC]; **D:** forward-Sequenzierung, Rückmutation des Tripletts der Aminosäure 368 zu Valin [GTC]; **E:** reverse-Sequenzierung, Modifikation der Aminosäure 647 zu Valin [GTG]; **F:** forward-Sequenzierung, Rückmutation der Aminosäure 647 zu Methionin [ATG].

7.1.1.3 Transformation und Phänotypisierung

Nach der positiven Transformation des Konstrukts pPICZ/*cpt2* in das Hefegenom [GS115] erfolgte die visuelle Wachstumskontrolle auf Vollmedium-Platten [YPD^S/Zeo].

Es war erforderlich, den Phänotyp der Transformanten zu überprüfen. Der Stamm GS115 besitzt generell einen Mut⁺-Phänotyp, da die homologe Rekombination *via single crossover* am *aox1*-Lokus erfolgt. Da das Plasmid eine *aox1*-Sequenz trägt, besteht die Möglichkeit der Rekombination in der 3'*aox1*-Region, welches das Wildtyp *aox1*-Gen zerstört. Dies führt zu einem Mut^S-Phänotyp.

Die Phänotypisierung der GS115/pPICZ/*cpt2* und GS115/pPICZ B-Transformanten erfolgte sowohl auf Minimal-Dextrose/Histidin-Medium-Platten [MDH] als auch auf Minimal-Methanol/Histidin-Medium-Platten [MMH]. Da der GS115-Stamm auxotroph für Histidin ist, war die Zugabe dieser Aminosäure essentiell. Als Kontrolle diente der Stamm GS115/pPICZ/*lacZ*, der einen Mut⁺-Phänotyp aufweisen sollte. Nach zweitägiger Inkubation der Platten bei 30 °C wurden die Kolonien begutachtet. Die Test- und Kontrollstämmen zeigten auf beiden Plattentypen normales Wachstumsverhalten. Der erneute simultane Ausstrich von Einzelkolonien auf Selektivmedien lieferte reproduzierbare Ergebnisse. Dieses Resultat demonstrierte den erwarteten Mut⁺-Phänotyp der Teststämmen. Da die reguläre Bildung von Kolonien auf MMH-Medium erfolgte, mussten die untersuchten Kulturen in der Lage sein, Methanol zu metabolisieren. Diese Tatsache führte den Beweis an, dass das für den Umsatz von Methanol verantwortliche *aox1*-Gen funktionsfähig vorlag und damit der Mut⁺-Phänotyp bestätigt wurde.

7.1.1.4 Nachweis der Integration in das Hefegenom

Die erfolgreiche Integration des Konstrukts pPICZ/*cpt2* in den *Pichia pastoris*-Stamm GS115 wurde nach Isolation der genomischen DNA mittels PCR oder Southern *blotting* überprüft.

Positive Integranten erzeugen 2 Banden im Agarosegel. Eine entspricht der Größe des Zielgens, die andere der Größe des *aox1*-Gens. Die Integration des parentalen Plasmids in das *Pichia pastoris*-Genom generiert ein PCR-Produkt von 323 bp. Um die Längen der DNA-Fragmente korrekt interpretieren zu können, wurde die Größe des *cpt2*-Gens zu der aus dem parentalen Plasmid realisierten Fragmentlänge addiert. Als Positivkontrolle für spätere Expressionstests diente der von Invitrogen (USA) erworbene Stamm GS115/pPICZ/*lacZ*, als Hintergrundkontrolle wurde GS115/pPICZ B mitgeführt. Die nach Polymerasekettenreaktion zu erwartenden Amplifikate sind in Tabelle 7.1 aufgeführt. Alle in Abb. 7.5 (rechts) dargestellten Spuren entstammen einem Agarosegel. Nicht relevante Spuren wurden der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet.

Tab. 7.1 Darstellung der mittels PCR generierten Amplifikationsprodukte zum Nachweis des erfolgreichen Einbaus der aufgeführten Konstrukte in GS115.

Stamm & Konstrukt	PCR-Produkte
GS115/pPICZ/ <i>cpt2</i>	<i>aox1</i> = 2,2 kb, <i>cpt2</i> = 2,33 kb
GS115/pPICZ B (Hintergrundkontrolle)	<i>aox1</i> = 2,2 kb, pPICZ B = 323 bp
GS115/pPICZ/ <i>lacZ</i> (Positivkontrolle)	<i>aox1</i> = 2,2 kb, <i>lacZ</i> = 3,2 kb

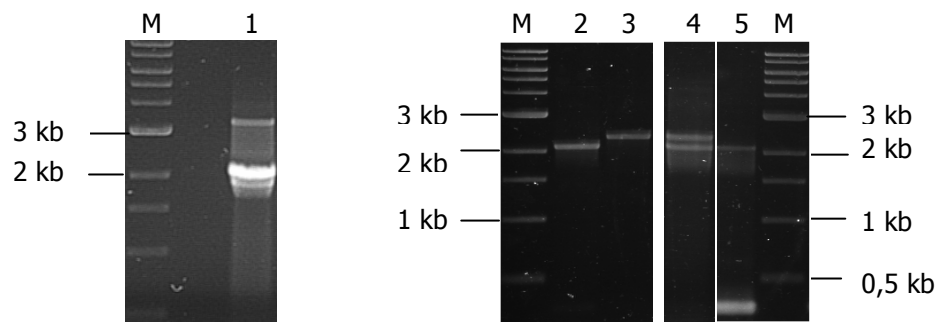


Abb. 7.5 Darstellung der Integrationskontrolle des pPICZ/*lacZ* [Positivkontrolle], pPICZ/*cpt2*- und pPICZ B-Konstrukts in GS115 [Negativkontrolle]. **Links:** M: 1 kb-Marker, 1: GS115/pPICZ/*lacZ*. **Rechts:** M: 1 kb-Leiter, 2: *aox1*-Gen, 3: *hcpt2*-Gen, 4: GS115/pPICZ/*cpt2*, 5: GS115/pPICZ B.

In Abbildung 7.5 (links) sind die generierten PCR-Fragmente der Positivkontrolle GS115/pPICZ/*lacZ* visualisiert. Das *lacZ*-Gen, welches für das Enzym β -Galaktosidase codiert, wurde in den Vektor pPICZ B ligiert und in den *Pichia pastoris*-Stamm GS115 integriert. Spur 1 zeigt die vorhergesagten DNA-Banden von 3,2 kb für das *lacZ*-Gen und 2,2 kb für das *aox1*-Gen. In Abbildung 7.5 (rechts) sind sowohl die erzeugten PCR-Fragmente der Hintergrundkontrolle als auch des Konstrukts GS115/pPICZ/*cpt2* in einem Agarosegel dargestellt. Die Spur 2 zeigt die erwartete Bande des *aox1*-Gens mit 2,2 kb, Spur 3 das in pPICZ B integrierte Zielgen *cpt2* mit einer Größe von 2,33 kb. Die PCR-Produkte des GS115/pPICZ/*cpt2*-Konstrukts sind in Spur 4 dargestellt und entsprechen dem in Tabelle 7.1 postulierten Bandenmuster. Spur 5 bildet die regulär generierten DNA-Fragmente der Hintergrundkontrolle ab. Dieses Agarosegel belegt sowohl die erfolgreiche Integration des pPICZ/*cpt2*- und des pPICZ/*lacZ*-Konstrukts in den *Pichia pastoris*-Stamm GS115 als auch den Einbau des parentalen Plasmids in das GS115-Genom.

7.1.1.5 Southern blotting

Die Analyse der genomischen DNA mittels Southern *blotting* führte zum Nachweis der Integration des Konstrukts in das *Pichia pastoris*-Genom. Es wurden 2 Kontrollen generiert und mitgeführt. Das isolierte pPICZ/*cpt2*-Konstrukt wurde mittels *Alw*NI verdaut, das parentale Plasmid mit *Bst*XI geschnitten. Das postulierte Bandenmuster der Kontrollen ist in Tabelle 7.2 aufgeführt.

Tab. 7.2 Darstellung der für das Southern *blotting* generierten Kontrollen und der mittels Restriktionsverdau erwarteten Banden.

Kontrolle	Konstrukt	Restriktionsenzym	Fragmentmuster
1	pPICZ/ <i>cpt2</i> [5335 bp]	<i>Alw</i> NI	3071 bp, 1451 bp, 713 bp
2	pPICZ B [3328 bp]	<i>Bst</i> XI	3328 bp linear

Das Southern *blotting* ist in Abbildung 7.6 dargestellt. Die genomische DNA wurde mittels *Nhe*I oder *Bsg*I fragmentiert. *Nhe*I schneidet nur die Bereiche der genomischen DNA und erzeugt nach Hybridisierung der DNA mit den Sonden 1 und 2 aus Kapitel 4.1.5.4 ein Fragment. Der Verdau mit *Bsg*I generiert 2 Fragmente, da das Zielgen *cpt2* über diese Schnittstelle verfügt.

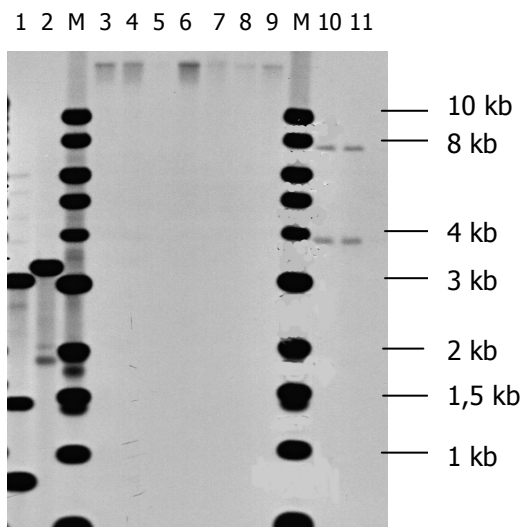


Abb. 7.6 Southern *blotting* der *Nhe*I bzw. *Bsg*I verdauten genomischen DNA isoliert aus *Pichia pastoris*. 1: Kontrolle 1; 2: Kontrolle 2; M: 1 kb-Leiter; 3-9: aus Einzelkulturen isolierte, *Nhe*I verdaute genomische DNA aus *Pichia pastoris* mit pPICZ/*cpt2*-Integriant; 10-11: aus Einzelkulturen isolierte, *Bsg*I verdaute genomische DNA aus *Pichia pastoris* mit pPICZ/*cpt2*-Integriant.

Das in Abbildung 7.6 dargestellte Southern *blotting* bildet in den Spuren 1 und 2 die Kontrollen 1 und 2 ab. Wie in Tabelle 7.2 beschrieben, konnten die postulierten Banden nachgewiesen werden. In den Spuren 3 bis 9 wurden *Nhe*I verdaute genomische DNA-Proben aufgetragen. *Bsg*I geschnittenes Material wurde in den Bahnen 10 und 11 getrennt. Wie zuvor postuliert, konnten ein Fragment nach *Nhe*I-Verdau und 2 Banden nach *Bsg*I-Verdau mittels Hybridisierung mit den Sonden 1 und 2 detektiert werden. Der Nachweis dieser Fragmente belegt somit die Integration des pPICZ/*cpt2*-Konstrukts in das *Pichia pastoris*-GS115 Genom.

7.1.1.6 Testexpression

Die Translation des Zielgens wurde in einem Test auf Miniexpression überprüft. Die Proteinproduktion erfolgte durch Methanolinduktion. Es wurden eine Positivkontrolle [GS115/pPICZ/*lacZ*] und eine Hintergrundkontrolle [GS115/pPICZ B] zur Überprüfung der Expression mitgeführt. Der Erfolg wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Abb. 7.7] [Kapitel 6.1] bzw. *dot blot*-Analyse überprüft. Letztere Technik wurde analog der Western *blotting* nach Kapitel 6.3 durchgeführt. Die Proben wurden jedoch nicht auf einem Polyacrylamidgel getrennt, sondern direkt auf eine in Transferpuffer [25 mM Tris/HCl, 150 mM Glycin, 10 % [v/v] Methanol] äquilibrierte Membran [Amersham HybondTM-N⁺, GE Healthcare, Europe] aufgetragen. Die weitere Verfahrensweise entspricht der in Kapitel 6.3 beschriebenen.

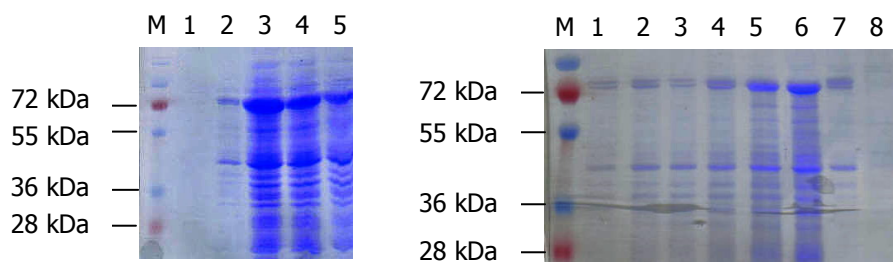


Abb. 7.7 10 %ige SDS-PAGE der Miniexpression von 1mL *Pichia pastoris* GS115 mit Plasmiden für *hcpt2* und pPICZ B. **Links:** Hintergrundkontrolle GS115/pPICZ B; M: Proteinmarker; 1: 0 h nach Induktion, 2: 7 h nach Induktion, 3: 24 h nach Induktion, 4: 30,5 h nach Induktion, 5: 46,5 h nach Induktion. **Rechts:** GS115/pPICZ/*cpt2*; M: Proteinmarker, 1: 143,5 h nach Induktion, 2: 79,5 h nach Induktion, 3: 69,5 h nach Induktion, 4: 46,5 h nach Induktion, 5: 30,5 h nach Induktion, 6: 24 h nach Induktion, 7: 7 h nach Induktion, 8: 0 h nach Induktion.

Die Polyacrylamidgele 7.7 (links) und 7.7 (rechts) visualisieren das Expressionsverhalten von GS115/pPICZ/*cpt2* und der Hintergrundkontrolle GS115/pPICZ B. Die Gene *aox1* und *cpt2* sind verantwortlich für die Expression von Proteinen mit vergleichbarem Molekulargewicht. In beiden Gelen war auf Höhe von 72 kDa eine Proteinbande detektierbar. In Abbildung 7.7 (links) ist die einfache Proteinbande der Alkoholoxidase 1 auf einer Höhe von 72 kDa zuzuordnen. In Abbildung 7.7 (rechts) ist eine Doppelbande bei 72 kDa zu beobachten. Diese resultiert aus der synchronen Produktion der CPT2 und der Alkoholoxidase 1. Um die Proteinbande der His₆-N-hCPT2 zuordnen zu können, wurde ein *dot blot* mit Anti-His HRP (C-terminal) spezifischem Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle der *dot blot*-Analyse diente ein Protein mit einem His₆-tag [M_w der Kontrolle = 72 kDa].



Abb. 7.8 *dot blot* des GS115/pPICZ/*cpt2*-Konstrukts mit dem Ziel der Detektion der rekombinant hergestellten CPT2. K: Kontrollprotein mit His₆-tag, 1: 0 h nach Methanolinduktion, 2: 7 h nach Methanolinduktion, 3: 24 h nach Methanolinduktion.

Das Kontrollprotein war deutlich nachweisbar. Die Expression der His₆-N-hCPT2 nach definierten Zeiten war kaum demonstrierbar. Da die Proteinausbeute zu gering für eine Aufreinigung war, das System schwierig genetisch zu manipulieren und dies an einen hohen

Zeitfaktor und Kostenaufwand gebunden wäre, wurde das Expressionssystem gewechselt. Eine unzureichende Antikörperzugänglichkeit zu dem His₆-*tag* der His₆-N-hCPT2 konnte später ausgeschlossen werden, da im *E. coli*-System eine deutliche Anfärbung erreicht wurde [Kapitel 7.2.1]. Dies unterstützt ebenfalls die Aussage, dass eine schlechte Expressionsrate des Proteins in *Pichia pastoris* vorlag. Eine exakte Positionsbestimmung der Integration des Konstrukts in das Pichia-Genom konnte aufgrund des patentrechtlichen Schutzes der Pichia-Sequenz [Invitrogen, USA] nicht durchgeführt werden. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das His₆-N-hCPT2-Konstrukt potentiell an einer anderen Stelle im Genom integriert wurde.

7.1.2 *Escherichia coli*-Expressionssystem

Molekularbiologische Arbeiten

Das Konstrukt pPICZ/*cpt2* aus Kapitel 4.1.5.5 diente als Basis für alle molekulargenetischen Arbeiten in *Escherichia coli*. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurde das Gen der *cpt2* aus dem Konstrukt isoliert und gleichzeitig die Schnittstellen *Nde*I [5'-Ende] und *Not*I [3'-Ende] angefügt. Parallel dazu wurde der Zielvektor pET28a(+) vermehrt. Die Resultate sind in den Agarosegelen in Abbildung 7.9 (links) und (rechts) wiedergegeben. Abbildung 7.9 (links) zeigt die extrahierte Bande des Plasmids von 5369 bp in zirkulärer Form. Die zusätzlichen dünnen DNA-Fragmente entsprechen Supersekundärstrukturen des Vektors und stellen keine Verunreinigungen dar. Das PCR-Produkt des isolierten *cpt2*-Gens mit angefügten Schnittstellen ist in Abbildung 7.9 (rechts) mit einer Größe von 1922 bp nachgewiesen.

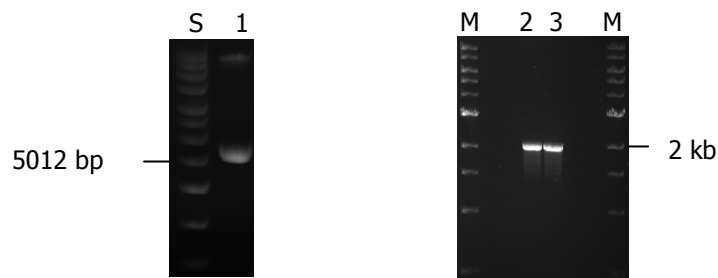


Abb. 7.9 1 %ige Agarosegele des gereinigten Plasmids pET28a(+) und des isolierten *cpt2*-Gens mit angefügten Schnittstellen. **Links:** pET28a(+) nach Miniplasmidpräparation, S: *Supercoiled* DNA-Leiter, 1: pET28a(+). **Rechts:** *cpt2*-Konstrukt mit angefügten Schnittstellen, M: 1 kb-Leiter, 2+3: *Nde*I- und *Not*I-verdaute *cpt2*.

Da sich die Ligation des restriktionsverdauten PCR-Produkts in den pET28a(+)-Vektor als schwierig gestaltete, wurde das Fragment mittels TOPO TA Cloning®Kit [Invitrogen, USA] subkloniert und das Konstrukt anschließend erfolgreich vermehrt [Kapitel 4.1.5.6]. Abbildung 7.10A bildet das gereinigte Konstrukt pCR2.1/*cpt2* in der zirkulären Form mit einer Bandenhöhe von 5854 bp ab. Die zusätzlichen Banden zeigen Supersekundärstrukturen und stellen keine Verunreinigungen dar. Mittels *Nde*I/*Not*I-Doppelverdau erfolgte das Ausschneiden des *cpt2*-Gens aus dem Konstrukt, wobei die erforderlichen *sticky ends* generiert wurden. In Abbildung 7.10B ist der *Nde*I/*Not*I-Doppelverdau dargestellt,

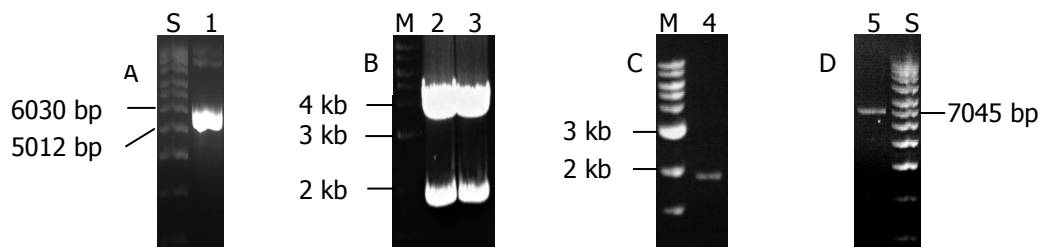


Abb. 7.10A-D 1 %ige Agarosegele des TOPO TA-Vektors pCR2.1 mit inseriertem *cpt2* [A], dem erfolgreichen Verdau des Konstrukts mittels *Nde*I und *Not*I [B], die Extraktion der Zielbande aus dem Gel [C] und die erfolgreiche Ligation des *cpt2*-Fragments in pET28a(+) [D]. **A:** Konstrukt aus TOPO TA-Klonierungsvektor pCR2.1 und inseriertem *cpt2*-Gen [5854bp], S: *Supercoiled* DNA-Leiter, 1: pCR2.1/*cpt2*. **B:** Restriktionsverdau von pCR2.1/*cpt2* mit *Nde*I/*Not*I [3902 bp, 1908 bp und 44 bp], M: 1kb-Leiter, 2+3: pCR2.1/*cpt2*. **C:** Extraktion der Zielbande *cpt2* [1908 bp] aus dem 1 %igen Agarosegel, M: 1 kb-Leiter, 4: *cpt2*-Fragment. **D:** Ligationsprodukt pET28a(+)/*cpt2* [7207 bp], S: *Supercoiled* DNA-Leiter, 5: pET28a(+)/*cpt2*.

wodurch 3 DNA-Fragmente mit einer Größe von 3902 bp, 1908 bp und 44 bp generiert wurden. Das kürzeste Fragment ist im Gel nicht visualisiert. Um eine optimale elektrophoretische Auftrennung der großen DNA-Abschnitte zu erzielen, war es nötig, das 44 bp Fragment aus dem Gel laufen zu lassen. Die DNA-Bande mit einer Laufhöhe von 1908 bp wurde mittels Gelextraktion isoliert [Kapitel 4.6], in den Zielvektor pET28a(+) ligiert [Kapitel 4.1.4] und anschließend in TOP10-Zellen vermehrt [Kapitel 3.3.2]. Das Agarosegel des geextrahierten Fragments ist in Abb. 7.10C, das in TOP10-Zellen vermehrte und mittels Plasmidpräparation isolierte zirkuläre pET28a(+)/*cpt2*-Konstrukt ist in Abbildung 7.11D dargestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Klonierung in *E. coli*-Vektoren erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Kontrolle der Gene zeigte die erwarteten Sequenzen und bestätigte das Vorhandensein der humanen *cpt2* [Wildtyp, S113L-Variante und *triple*-Variante].

7.2 Proteinchemische Arbeiten

7.2.1 Miniexpression in *E. coli* BL21 Gold DE3

Die Gewinnung der His₆-N-hCPT2 erfolgte in *Escherichia coli* BL21Gold DE3-Zellen. Dieser Stamm ist ein Derivat von *Escherichia coli* B, einem Proteinexpressionsstamm, besitzt keine Lon-Protease und ist defizient für die ompT-Protease. Die rekombinant generierten Proteine sind somit vor dem Abbau durch diese Proteasen während der Reinigung geschützt. Die Testproteinexpression wurde mit einem SDS-Polyacrylamidgel [Kapitel 6.1] bzw. einem Western *blotting* [Kapitel 6.3] unter Verwendung eines Anti-His HRP (C-terminal)-Antikörpers überprüft.

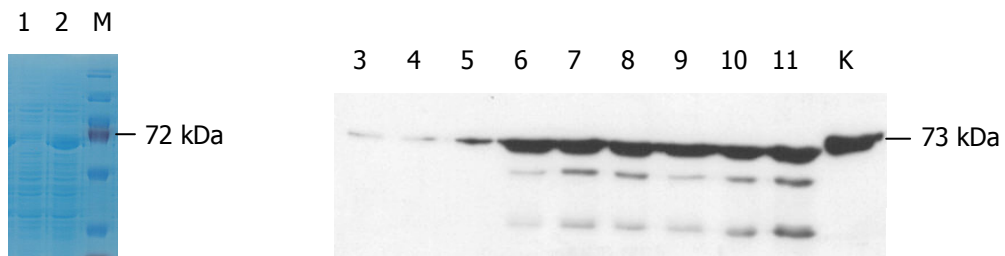


Abb. 7.11 10 %ige SDS-PAGE des Tests einer Miniexpression und Western *blotting* von His₆-N-hCPT2. **Links:** Test auf Miniexpression von His₆-N-hCPT2. 1: Proteinexpression vor Induktion, 2: Proteinexpression 2 h nach Induktion mit IPTG, M: Proteinmarker. **Rechts:** Western *blotting* von jeweils 1 mL Einzelkultur His₆-N-hCPT2 in *E. coli* BL21GoldDE3. 3-5: His₆-N-hCPT2-Expressionsniveau vor der IPTG-Induktion, 6-8: His₆-N-hCPT2-Expressionsniveau 2 h nach IPTG-Induktion, 9-11: His₆-N-hCPT2-Expressionsniveau 4h IPTG-Induktion, K: His₆-Kontrollprotein [$M_w = 73$ kDa].

Abbildung 7.11 (links) zeigt einen Test auf Miniexpression von His₆-N-hCPT2. Spur 1 bildet eine Expressionsprobe vor der Induktion mit 1 mM IPTG ab, Spur 2 gibt die hergestellte Proteinmenge von His₆-N-hCPT2 2 h nach Induktion wieder. Mit einem Western *blotting* [Abb. 7.11 (rechts)] erfolgte die Detektion des His₆-N-hCPT2-Proteins mittels Anti-His HRP (C-terminal)-Antikörper. Die Spuren 3-5 geben das Expressionsniveau vor Induktion, die Spuren 6-11 2 h bzw. 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG wieder. In Bahn K ist ein 73 kDa His₆-Proteingrößenmarker aufgetragen. Die zusätzlichen Banden zeigen einen proteolytischen Abbau des His₆-N-hCPT2-Proteins an.

7.2.2 Löslichkeitsstudien

Rekombinante Proteine können durch koexprimierte Faltungshelfer z.B. Chaperone wie GroEL und GroES des Wirtsorganismus löslich hergestellt werden. Diese schützen vor unerwünschten Nebenreaktionen, wie Aggregation [Buchner *et al.*, 1991, Hendrick *et al.*, 1993]. Bei starker Überexpression führt auch die Anwesenheit von Chaperonen zur Bildung von *inclusion bodies* [IB]. Um eine korrekte Faltung der Zielproteine zu unterstützen ist es notwendig, die Bildung von IBs zu reduzieren, was durch die Präsenz von Disulfid-isomerasen oder Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerasen [Goloubinoff *et al.*, 1989] gezeigt wurde. Die Neigung zur IB-Formation korreliert nicht mit der Größe des exprimierten Proteins, dessen Oligomerstruktur oder der relativen Hydrophobizität bzw. der Nutzung von Fusionsproteinen [Wilkinson *et al.*, 1991]. Die Bildung von nativ gefaltetem Protein wird bedingt durch die Geschwindigkeit der Faltung, Aggregation und der Proteinbiosynthese [Kiefhaber *et al.*, 1991], wodurch eine erhöhte Ausbeute aufgrund reduzierter Wachstumsbedingungen, wie Temperatur, pH oder Anwendung spezifischer Minimalmedien erzielt wird. Die zeitlich limitierte Induktionsphase führt zur Anreicherung von nativem löslichen Protein [Rudolph *et al.*, 1996].

Optimierung der IPTG-Konzentration bei 37 °C

Die minimal erforderliche IPTG-Konzentration wurde durch Test auf Miniexpression mit definierten IPTG-Konzentrationen zwischen 0,005 mM und 1 mM bei 37 °C bestimmt. Der Test auf Proteinexpression wurde mit einem SDS-PAGE [Kapitel 6.1] überprüft.

Abbildung 7.12 bildet die separierten löslichen Fraktionen der His₆-N-hCPT2 mit 1 mM [Spur 1], 0,1 mM [Spur 2], 0,01 mM [Spur 3] und 0,005 mM IPTG [Spur 4] ab. Die Spuren 5-8 zeigen die zugehörig präparierten IB-Fraktionen. Dabei ändert sich der Anteil an löslichem Protein im Vergleich zur Ausbeute der IBs bei steigenden IPTG-Konzentrationen nicht. Da zu Beginn der Arbeit die Möglichkeit in Betracht gezogen wurde, das His₆-N-hCPT2-Protein mittels Rückfaltung der IBs zu gewinnen, wurde für die Induktion mit IPTG eine Konzentration von 1mM eingesetzt.

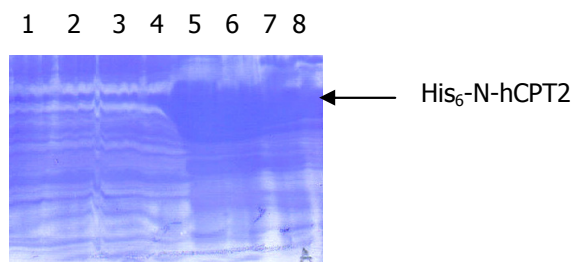


Abb. 7.12 10 %ige SDS-PAGE der Etablierung der für die Proteinherstellung optimalen IPTG-Konzentration in Bezug auf lösliche und unlösliche Proteinfraction. Test der IPTG-Konzentration für die Induktion, 1: lösliche Fraktion His₆-N-hCPT2+1 mM IPTG; 2: lösliche Fraktion His₆-N-hCPT2+0,1 mM IPTG; 3: lösliche Fraktion His₆-N-hCPT2+0,01 mM IPTG; 4: lösliche Fraktion His₆-N-hCPT2+0,005 mM IPTG; 5: IB-Fraktion His₆-N-hCPT2+1 mM IPTG; 6: IB-Fraktion His₆-N-hCPT2+0,1 mM IPTG; 7: IB-Fraktion His₆-N-hCPT2+0,01 mM IPTG; 8: IB-Fraktion His₆-N-hCPT2+0,005 mM IPTG.

Etablierung der Induktionsdauer von IPTG bei 37 °C

Die Löslichkeit des Proteins wurde in Abhängigkeit der Induktionsdauer mit IPTG bei 37 °C untersucht.

Abbildung 7.13 zeigt einen Western *blotting* zur Überprüfung der Induktionsdauer. Bahn 1 zeigt die Situation der löslichen His₆-N-hCPT2-Fraktion vor der Induktion mit IPTG. Die Spuren 2 bis 4 geben die Proteingewinnung des löslichen Anteils nach 1 h bis 3 h Induktion mit IPTG wieder. Dabei beschreibt Spur 2 den löslichen Teil nach 1 h, Spur 3 nach 2 h und Spur 4 nach 3 h. Die Bahnen 6 [1 h] und 7 [3 h] bilden nach Induktion mit IPTG den Anteil der nichtlöslichen His₆-N-hCPT2-Fraktion nach Separation aus dem Gesamtzellextrakt ab. Eine Kontrolle der nichtlöslichen Proteine vor Induktion ist auf Bahn 5 aufgetragen. Als Größenkontrolle diente ein gereinigtes 73 kDa Protein [K] und ein Western *blotting* His-HRP Marker [M]. Dabei ist nach 1 bis 3 h der lösliche Anteil der His₆-N-hCPT2 unverändert. Die Menge der unlöslichen His₆-N-hCPT2 ist nach 3 h im Vergleich zu 1 h deutlich gesteigert. Daher wurde im Folgenden die Induktion nach 3 h durch Ernte der Zellen beendet.

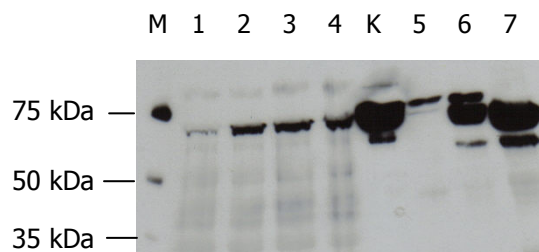


Abb. 7.13 Western *blotting*-Analyse der Induktionsdauer der Proteinexpression His₆-N-hCPT2 bei 37 °C. M: Western *blotting*-Marker, 1: lösliche Fraktion vor Induktion, 2: lösliche Fraktion 1 h nach Induktion, 3: lösliche Fraktion 2 h nach Induktion, 4: lösliche Fraktion 3 h nach Induktion, 5: IB-Fraktion vor Induktion, 6: IB-Fraktion 1 h Induktion, 7: IB-Fraktion 3 h nach Induktion, K: His₆-Kontrollprotein [$M_w = 73$ kDa].

Etablierung der Inkubationstemperatur

Da der quantitative Anteil an *inclusion bodies* dominierte, war es erstrebenswert das Verhältnis in Richtung der löslichen Proteinfraction durch Herabsetzen der Induktionstemperatur zu korrigieren.

Abbildung 7.14 zeigt eine SDS-PAGE zur Analyse der Proteine der löslichen und unlöslichen Fraktionen der His₆-N-hCPT2 bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C und 20 °C mit einer Inkubationsdauer von 3 h. Spur 1 gibt das Gesamtzellextrakt bei 37 °C wieder. Die Bahn 2 zeigt die lösliche, Bahn 3 die IB-Fraktion von His₆-N-hCPT2 bei jeweils 37 °C. In Spur 4 ist die Situation löslicher His₆-N-hCPT2, in Spur 5 die Menge an unlöslichem His₆-N-hCPT2-Protein bei 20 °C Inkubationstemperatur wiedergegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an löslichem Protein bei 20 °C gesteigert werden konnte. Daher wurde das Enzym im Folgenden bei 20 °C erzeugt.

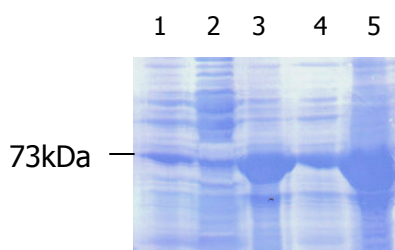


Abb. 7.14 10 %ige SDS-PAGE der Proteinexpression von His₆-N-hCPT2 bei verschiedenen Temperaturen. 1: Gesamtzellextrakt bei 37 °C, 2: lösliche Fraktion His₆-N-hCPT2 bei 37 °C, 3: IB His₆-N-hCPT2 bei 37 °C, 4: lösliche Fraktion His₆-N-hCPT2 bei 20 °C, 5: IB His₆-N-hCPT2 bei 20 °C.

Rückfaltungsexperimente der inclusion bodies

Die Bildung von IBs schützt rekombinant generierte Proteine vor der Proteolyse durch intrazelluläre Proteasen. Die Protein-Isolation durch Kombination von Lysozyminkubation mit anschließender Hochdruckdispersion und nachfolgender Verwendung von Detergenzien wie Triton X-100, die Solubilisierung mit starken Denaturanzien wie 6 M Guanidiniumchlorid oder 8 M Harnstoff und die Rückfaltung durch Entfernung des Denaturans mittels Dialyse stellt eine weitere Methode zur funktionalen Gewinnung von rekombinanten Proteinen dar. Während der Rückfaltung ist das rekombinante Protein für eine längere Zeitspanne einer intermediären Konzentration an Denaturans ausgesetzt, was für die korrekte Faltung sowohl von Vorteil als auch Nachteil sein kann. Der Versuch der Rückfaltung erfolgte durch Aufnahme der IBs in 6 M Harnstoff und der anschließenden Dialyse gegen Basispuffer [50 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 5 mM TCEP, pH 8,0].

Es wurde die Zugabe von diversen Detergenzien [1 % [w/v] nOG, 0,1 % [v/v] Triton X-100, 8 mM CHAPS, 15 mM n-Oktyl-1-thio- β -D-glukopyranosid, 15 mM Desoxycholat] zum Basispuffer untersucht. Das in Harnstoff solubilisierete Protein präzipitierte jedoch in allen Fällen während der Dialyse zur Rückfaltung.

Ein weiterer Versuch der Rückfaltung erfolgte mittels iFold Protein Refolding System1 [Novagen (Merck KGaA), Darmstadt]. Dabei wurden 92 Pufferbedingungen variierender pH-Bereiche nach Zugabe heterogener Salze, Cyclodextrin, Redoxagentien oder Detergenzien getestet. Da diese Rückfaltungsstudie ebenfalls zu keinem Erfolg führte, erfolgte daher die Reinigung der löslichen Enzymfraktion.

7.2.3 Fermentation

Die Fermentation erfolgte wie unter Kapitel 5.1.3 beschrieben. Nach definierten Zeiten wurden Proben entnommen um die Zelldichte zu überprüfen. Dies ist in Abb. 7.15 graphisch dargestellt. Die Induktion mit IPTG erfolgte bei einer Zelldichte zwischen 80-100, die Zellernte bei einer OD_{600} zwischen 110-130. Es wurde ein Feuchtgewicht von ca. 1300 g Zellen aus 6 L Fermentationsvolumen gewonnen. Daraus ließen sich annähernd 150 mg lösliches His₆-N-hCPT2-Protein und dessen Varianten reinigen.

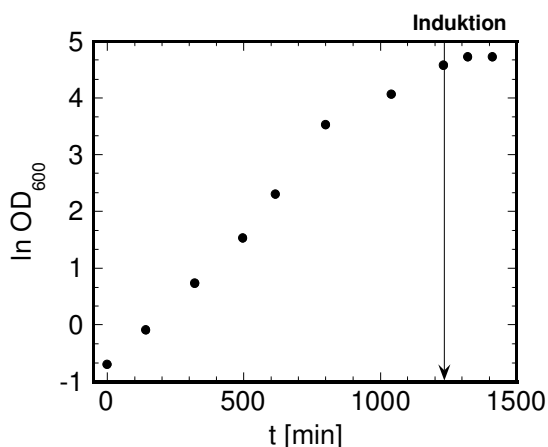


Abb. 7.15 Zeitlicher Verlauf der Zelldichte während der Fermentation bei 20 °C. Die Probeentnahme unter sterilen Bedingungen erfolgte nach definierten Zeiten. Der Zeitpunkt der Induktion mit 1 mM IPTG ist angezeigt. Die Ernte erfolgte bei einer $\ln OD_{600}$ zwischen 4,7-4,9 nach einer Induktionsdauer von 3-4 h.

7.2.4 Aufschluss und Reinigung der löslichen His₆-N-hCPT2-Fraktion

Die Präparation erfolgte in einem detergenshaltigen Puffersystem, da das native Protein eine Membranassoziation aufweist.

Membranproteine sind ein Bestandteil von biologischen Membranen. Deren Reinigung, Charakterisierung und Rekonstitution der Membranbestandteile erfolgt durch die Solubilisierung mittels Bildung von gemischten Mizellen mit eingeführten löslichen amphiphilen Substanzen. Dadurch wird eine thermodynamisch stabile isotrope Lösung erzeugt, die ursprünglich nicht oder nur marginal in dem angewandten Puffersystem löslich ist. Die Bindung von Detergenzien an den hydrophoben Bereichen des Proteins ist beeinflusst durch Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und anderen milieubedingende Faktoren. Triton X-100 und nOG aus der Gruppe der nichtionischen, milden Detergenzien solubilisieren membranassoziierte Proteine unter Retention der biologischen Aktivität. Durch permanente oder reversible nichtkovalente Interaktionen zwischen den amphiphilen Substanzen und dem membranassoziierten Protein wird dessen nativer Zustand aufrecht erhalten. Triton X-100 wurde für die ersten Solubilisierungsschritte verwendet und im weiteren Verlauf des Aufreinigungsverfahrens gegen nOG substituiert. Triton X-100-Mizellen zeigen einen großen Stokes-Radius und eine kleine kritische mizellare Konzentration [cmc]. Deshalb eignet sich Triton X-100 nicht zum Entfernen durch Dialyse oder Gelfiltration, da es auf Höhe des zu reinigenden Proteins eluieren würde. Daher ist der Austausch gegen ein leichter zu entfernendes Detergens zu bevorzugen [Helenius *et al.*, 1975]. nOG besitzt viele günstige Eigenschaften, was die Isolierung funktionaler membranassoziiierter Proteine erlaubt [Baron *et al.*, 1975]. Es ist nichtionisch, nichtdenaturierend und gut wasserlöslich. Die cmc von nOG liegt bei 0,7 % [w/v] [23,9 mM], was, wie unter Kapitel 6.5.3.1 beschrieben, in einem adäquaten Puffersystem bestimmt wurde. Es zeigt keine Absorption bei 280 nm und ist aufgrund der hohen cmc leicht dialysierbar.

Der Aufschluss der *E. coli*-Zellen mittels *french press*, die Abtrennung des Zelldebris mittels Ultrazentrifugation und die Solubilisierung der löslichen His₆-N-hCPT2-Spezies erfolgten wie unter Kapitel 5.3.1 beschrieben. Die dreistufige chromatographische Aufreinigung, bestehend aus Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie, Gelfiltration und Anionenaustauschchromatographie, wurde wie in den Kapiteln 5.3.2-5.3.4 beschrieben durchgeführt. Die schematische Darstellung der Reinigungsabfolge ist in Abb. 7.16 dargestellt. Der His₆-tag konnte mittels Thrombinverdau nicht abgespalten werden.

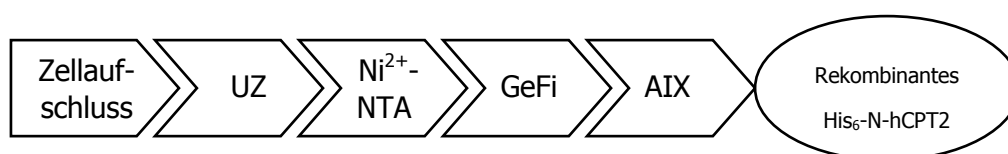


Abb. 7.16 Schematische Darstellung der Aufschluß- und Reinigungsprozedur des rekombinanten His₆-N-hCPT2 und Varianten aus *E. coli* BL21 GoldDE3-Zellen. UZ: Ultrazentrifugation, Ni²⁺-NTA: Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie, GeFi: Gelfiltration, AIX: Anionenaustauschchromatographie.

Die Abbildung 7.17 (rechts) und (links) demonstrieren die Effektivität der Reinigungsstrategie.

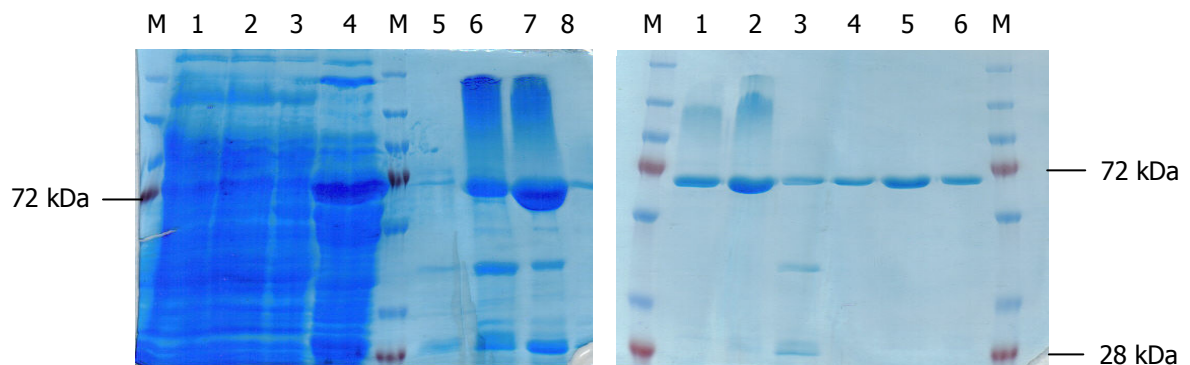


Abb. 7.17 10 %ige SDS-PAGE der entnommenen Proben aus den Reinigungsschritten der Präparation von His₆-N-hCPT2. **Links:** M: Proteinmarker, 1: Überstand nach Ultrazentrifugation, 2: Durchlauf nach Auftrag des Überstands des Ultrazentrifugationslaufes auf die Ni²⁺-NTA-Affinitätssäule, 3: Durchlauf nach Spülung mit einem Säulenvolumen des Auftragspuffers, 4: Durchlauf nach Umpuffern mit Puffer 3, 5-8: Elutionsfraktionen der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. **Rechts:** M: Proteinmarker, 1-3: Elutionsfraktionen nach Gelfiltration, 4-6: Durchlaufaktionen der Anionenaustauschchromatographie.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Verfahren zur Fermentation [Kapitel 7.2.3] und zur Reinigung des membranassoziierten Proteins His₆-N-hCPT2 in löslicher Form mit einem N-terminalen His₆-tag etabliert werden konnte. Mit Hilfe des entwickelten Verfahrens konnten das Wildtyp-Protein der hCPT2, sowie die Varianten S113L und TV zur apparenten Homogenität gereinigt werden.

7.3 Proteinbiochemische Charakterisierung der hCPT2

7.3.1 Massenspektrometrische Analyse der Peptidfragmente

Zusätzlich zur Überprüfung der generierten Plasmide mittels DNA-Sequenzierung und Visualisierung der Proteinbanden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte die Analyse der fragmentierten Proteine mittels Maldi-TOF/TOF-Massenspektrometrie. Da alle Analyseproben zuvor auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend ausgeschnitten wurden, konnte die erforderliche Reinheit der Proben gewährleistet werden.

Die massenspektrometrischen Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Angelika Schierhorn [Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale] durchgeführt. Dabei konnte keine vollständige Sequenzabdeckung von 100 % erzielt werden. Die spezifischen Sequenzübereinstimmungen sind in Tab. 7.3 dargestellt. Alle Massenspektren und zugehörigen Überlappungsbereiche sind im Anhang in Abb. 10.7-9 angefügt. Ein Beispiel der Sequenz-alignments ist in Abb. 7.18 dargestellt. Mit Hilfe der Analyse der Peptidfragmente konnte sowohl die Identität des Wildtyp-Enzyms bestätigt, als auch die erfolgreiche Generierung der His₆-N-hCPT2-Varianten [S113L und TV] und der damit verbundenen vorhandenen Aminosäuresubstitutionen nachgewiesen werden. Anhand der korrekten Aminosäure-Zusammensetzung war eine exakte Molekulargewichtsbestimmung rechnerisch möglich.

Tab. 7.3 Sequenzabdeckungen der massenspektrometrischen Analyse der Peptidfragmente für His₆-N-hCPT2 [Wildtyp und Varianten].

Variante	Sequenzabdeckung	Berechnetes M _w
His ₆ -N-hCPT2	51,4 %	73433 Da
His ₆ -N-hCPT2/S113L	62,1 %	73459 Da
His ₆ -N-hCPT2/TV	72,0 %	73441 Da

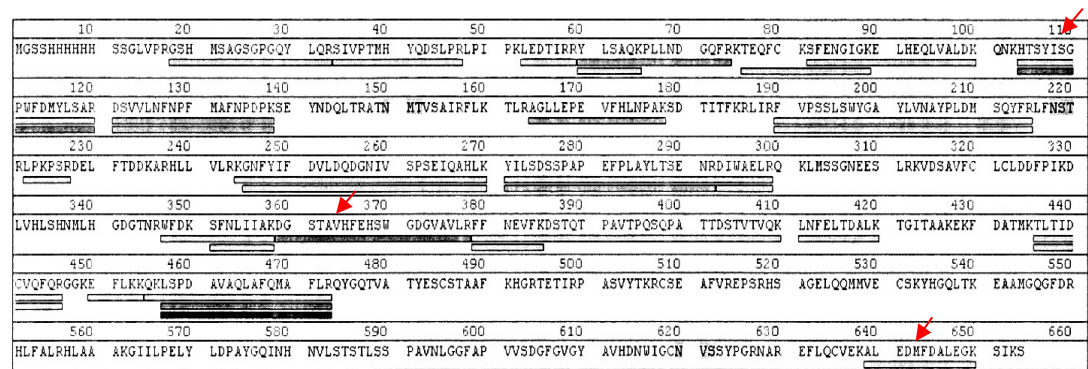


Abb. 7.18 Sequenzabdeckung der Analyse der massenspektrometrischen Peptidfragmentierung des Wildtypenzym His₆-N-hCPT2. Die roten Pfeile markieren die Positionen, an denen die erfolgreichen Rückmutationen zu den Aminosäuren S113, V368 und M647 durchgeführt werden konnte. Die Balken unter der Primärsequenz spannen die Bereiche, deren Sequenzfragmente detektiert werden konnten.

7.3.2 Fern-UV-CD-Spektroskopie

Die strukturelle Integrität des Wildtypproteins und der Varianten wurde durch Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren überprüft.

Die vom Gerät ausgegebenen Einheiten wurden, wie in Kapitel 6.6. beschrieben, in eine mittlere molare Elliptizität umgerechnet. Die Daten sind in Abbildung 7.19 aufgetragen.

Das Wildtypprotein und die Varianten zeigen ein Spektrum mit einem hohen Anteil an α -Helices mit einem positiven Extremum zwischen 180-200 nm und einem geringeren Anteil an β -Faltblättern einhergehend mit zwei negativen Extrema bei 209 nm und 221 nm. Prinzipiell sind die Faltungszustände der Proteine konformationell vergleichbar und weisen gemeinsame Strukturbereiche auf. Die Spektren der zu beurteilenden Proteine sind jedoch nicht identisch, sondern repräsentieren, durch den differentiellen Verlauf interpretierbar, geringe strukturelle Änderungen des Proteinmoleküls. Diese Charakteristika resultieren in zwei isodichroischen Punkten bei 200 nm und 214 nm. Dies deutet darauf hin, dass die grundsätzliche Faltung von Wildtyp und Varianten vergleichbar ist. Durch die Substitution von Aminosäuren im Protein kann es zu minimalen strukturellen Veränderungen kommen. Diese können die abgebildeten Differenzen insbesondere im UV-Bereich <200 nm verursachen. Das Vorhandensein der strukturellen Integrität, welche mittels der Fern-UV-CD-Messungen nachgewiesen werden konnte, war eine Voraussetzung zur Durchführung von Aktivitätstests [Kapitel 7.3.5]. Die im DTNB-Aktivitätstest detektierten aktiven Proteinspezies sind im Umkehrschluss ein weiterer Nachweis für das Vorhandensein einer korrekt gefalteten Enzymstruktur.

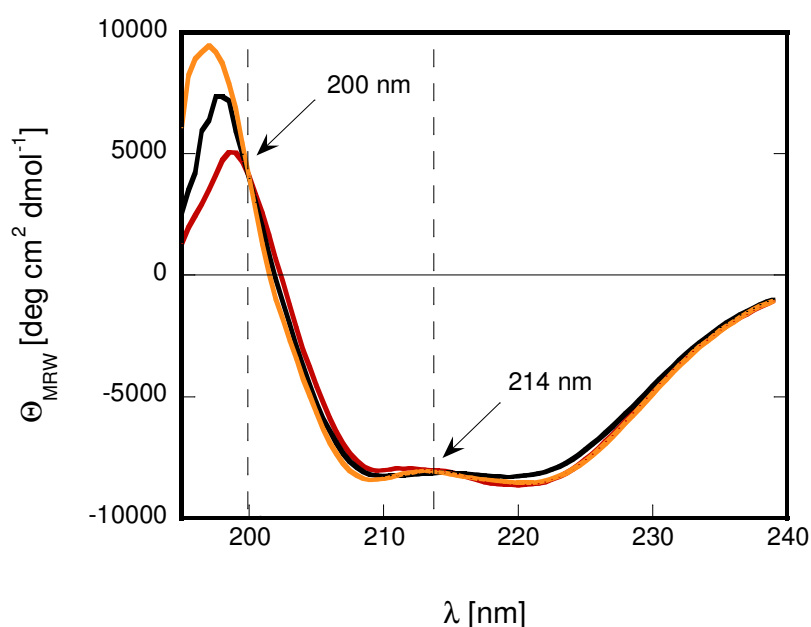


Abb. 7.19 Vergleich der Fern-UV-CD-Spektren des Wildtypenzyms His₆-N-hCPT2 [schwarz], His₆-N-hCPT2/S113L [orange] und His₆-N-hCPT2/TV [rot]. Experimentelle Bedingungen: je 0,175 mg/mL Protein in 25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 1 % [w/v] nOG, pH 8,0, T=25 °C, d=0,1 cm, Küvettenvolumen: 300 μ L, Akkumulation: 60x, *scan*-Geschwindigkeit: 20 nm/min.

7.3.3 Streulichtmessungen

7.3.3.1 nOG-Mizellenbildung

Theorie

Amphiphilie [griech.: „philos“ = starke Affinität] ist eine Eigenschaft eines Moleküls, welches in wässriger Lösung sowohl hydrophile als auch lipophile Reste besitzt. Die hydrophilen Gruppen können geladen [anionisch, kationisch, zwitterionisch] oder neutral, jedoch polar [Polyoxyethylen- oder Polyhydroxyreste] vorliegen. Die hydrophoben Gruppen bestehen aus Kohlenwasserstoffen [KW] und sind aliphatische Ketten, polyzyklische Reste oder aromatische Gruppen, welche nur marginal löslich in Wasser sind. Die Zusammensetzung der amphiphilen Stoffe reflektiert deren Verhalten in Wasser und stellt eine Basis für ihre Klassifikation dar. Der hydrophobe Charakter entsteht aus Wasser-Wasserstoffbrückenbindungen, welche durch das Einführen von KW-Ketten in das Medium gebrochen werden müssten. Die Ursache des hydrophoben Effekts resultiert aus der Prävention der Zerstörung von starken Anziehungskräften der Wassermoleküle. Der destruktive Prozess würde bei der Solubilisierung hydrophober Substanzen in Wasser ablaufen, wenn Amphiphile wie Seifen oder Detergenzien nicht in der Lage wären, in wässriger Lösung zu aggregieren und Mizellen zu bilden. Die treibende Kraft bilden hierbei die hydrophoben Ketten, welche im Inneren aneinander gelagert werden, wobei die hydrophile Kopfgruppe an der Oberfläche im Kontakt mit dem Wasser verbleibt. Dadurch werden die lipophilen Segmente von der wässrigen Umgebung abgeschirmt [Lichtenberg *et al.*, 1983].

Die kritische mizellare Konzentration [cmc] ist essentiell für die Anwendung von oberflächenaktiven Substanzen in Puffersystemen und ist definiert als der Konzentrationsbereich eines Detergens, bei dem unterhalb keine Mizellenbildung nachweisbar ist und oberhalb dessen zusätzliches Detergens Mizellen formt. Die cmc ist abhängig von der Temperatur und der Ionenstärke des Puffersystems und sinkt mit zunehmendem hydrophobem Charakter der KW-Gruppe. Die Einführung von Verzweigungen oder Doppelbindungen stört die gleichmäßige Ausprägung von stabilen Interaktionen und erhöht die cmc [Helenius *et al.*, 1975].

Durch die Brown'sche Translation und Molekularbewegung der gesamten Mizelle kann dessen Molekulargewicht durch Lichtstreuungen bestimmt werden. Weitere Methoden sind Ultrazentrifugation, Viskosimetrie und Gelfiltration.

nOG ist ein nichtionisches, nichtdenaturierendes, wasserlösliches Detergens und zeigt keine Absorption bei 280 nm. Die cmc von nOG liegt bei 0,7 % [w/v] oder 23,9 mM und wurde aus dem Anstieg der Lichtstreuintensität aus Abb. 7.20 ermittelt. Die Angaben der Literatur liegen zwischen 23,4-24,5 mM [Chattopadhyay *et al.*, 1984] bzw. 25–30 mM [Baron *et al.*, 1975]. Der Prozess der Mizellenbildung ist bei 37 °C stärker manifestiert als bei 20 °C. Die Größenverteilungen, aus denen die Stokes-Radien der entstehenden Mizellen entnommen werden können, sind in Abb. 7.20 dargestellt. Dieser beträgt etwa 2,4 nm. Die Mizellen zeigen eine einheitliche Größe. Diese hängt in dem verwendeten Konzentrationsbereich nur marginal von der Konzentration des nOG ab und ist bei beiden gewählten Temperaturen etwa identisch. Die experimentelle Verwendung von 0,75 % nOG bei einer Temperatur von 25 °C sollten die Ergebnisse von Lichtstreuungen kaum beeinflussen, vorausgesetzt

diese Konzentration ist für eine Solubilisierung des Proteins His₆-N-hCPT2 hinreichend. Die Anwendung höherer nOG-Konzentrationen kann zu Komplikationen führen, da sich der Stokes-Radius von nOG mit 2,4 nm nicht explizit von dem theoretischen Stokes-Radius des Monomers von His₆-N-hCPT2 von 3,5-4 nm unterscheidet.

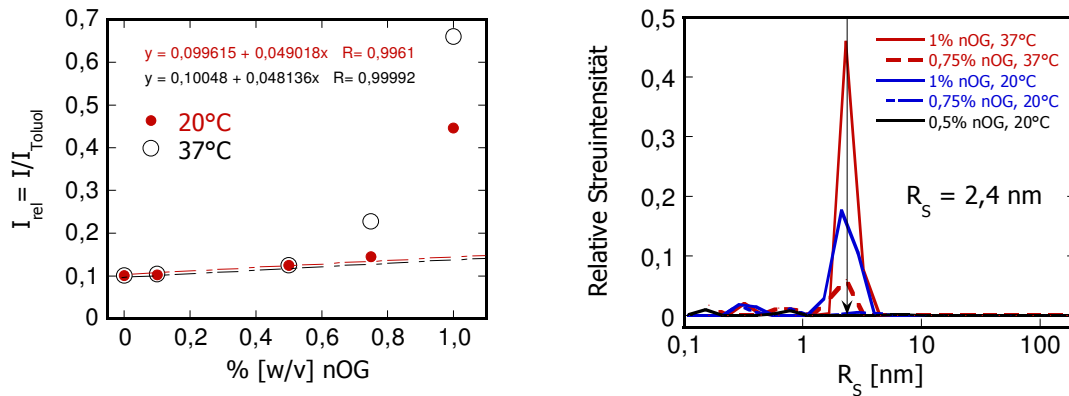


Abb. 7.20 Berechnung der cmc und der Größenverteilung der entstehenden Mizellen des nOG. Experimentelle Bedingungen wie unter Kapitel 6.5.1 beschrieben. **Links:** Bestimmung der cmc aus dem Anstieg der Lichtstreuintensität bei 20 °C und 37 °C. **Rechts:** Größenverteilung der generierten Mizellen des nOG, woraus der Stokes-Radius entnommen werden kann.

7.3.3.2 Palmitoylcoenzym A-Mizellenbildung

Theorie

Fettsäurecoenzym A-Moleküle, wie PCoA, sind amphiphile Moleküle und spielen eine essentielle Rolle als Intermediate im Fettsäuremetabolismus von Fettsäuren und Lipiden. Sie agieren als natürliche Substrate der CPT1 und CPT2.

Die cmc von PCoA von 3-4 μM und dessen Aggregationszahl von circa 1000 wurde von Zahler *et al.* (1968) bestimmt. Powell *et al.* (1981) korrigierten mittels später durchgeführter Gelpermeationschromatographie und Ultrazentrifugation die cmc von PCoA in einem 50 mM KH_2PO_4 -haltigen Puffer bei pH 7,4 auf 30-60 μM . Die Aggregationszahl wurde auf größer 200 ermittelt. Constantinides *et al.* (1988) gaben die cmc von PCoA in 60 mM KH_2PO_4 pH 7,4 durch fluorimetrische Titration mit 6-(*p*-Toluidino)-2-naphthalensulfonsäure (TNS) auf 70 μM an. Im Gegensatz zu den freien Fettsäuren zeigen Fettsäureacylcoenzym A-Spezies durch den hydrophilen Effekt des Coenzym A-Rests kleinere cmc-Werte [Tab. 10.2, 10.3 im Anhang]. Die Neigung zur Mizellenbildung von PCoA verändert die freie Konzentration und somit die Zugänglichkeit des Substrats zum aktiven Zentrum der hCPT2. Des Weiteren beeinflussen die Substrate und ihre differierenden Zustände die enzymkinetischen Parameter und die Eigenschaften des Proteins hCPT2 durch die Anwesenheit des Substrats als oberflächenaktive Substanz. Eine Mizellenbildung der amphiphilen Moleküle, wie Palmitoylcoenzym A, kann zur Inhibierung von Enzymen führen. Die cmc eines nichtionischen Amphiphils sinkt mit steigender Salzkonzentration bedingt durch eine Verminderung der abstoßenden Kräfte der ionischen Komponente der Kopfgruppe in der Mizelle [Tippett *et al.*, 1982]. Die Zugabe von Glycerin reduziert zudem die hydrophoben Anziehungskräfte, welche sowohl die Mizellenbildung als auch nichtspezifische Amphiphil-Protein-Interaktionen verursachen.

Die exakte cmc von PCoA konnte durch die Messdaten [Abb. 7.21] mittels statischer Lichtstreuung nicht bestimmt werden. Die kleinste Messkonzentration an PCoA betrug 0,05 mM. Bei geringerer Konzentration des Substrats war die Überschussstreuung [die Streuung, die größer ist als Wasser] sehr gering und konnte für die cmc-Bestimmung nicht verwendet werden. In Abb. 7.21 sind die Mizell-Radien bei den verschiedenen PCoA-Konzentrationen aufgetragen. Sie sind innerhalb des Messfehlers von $\pm 2\%$ praktisch identisch und liegen zwischen 3,54-3,69 nm.

Schlussfolgernd konnten Mizellen schon bei einer Konzentration von 50 μM nachgewiesen werden.

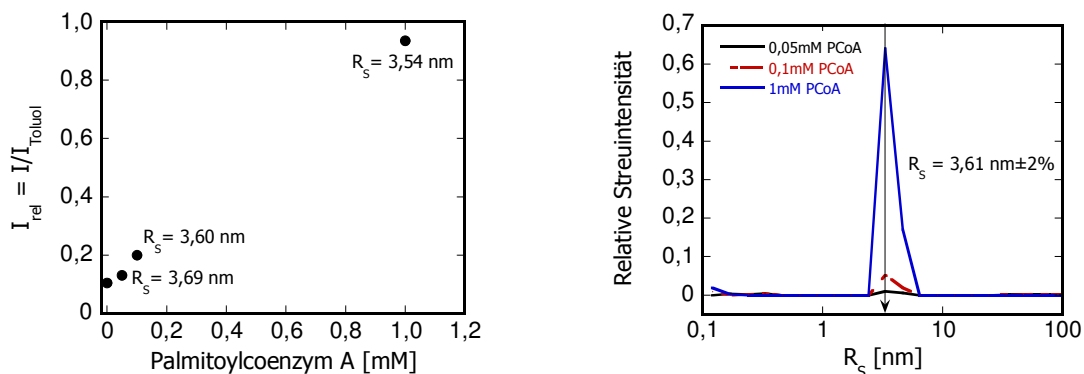


Abb. 7.21 Abschätzung der cmc und Bestimmung der Größenverteilung von PCoA. **Links:** Auftragung der Mizellradien bei unterschiedlichen Palmitoylcoenzym A-Konzentrationen. **Rechts:** Größenverteilung der entstehenden Mizellen des PCoA, woraus der Stokes-Radius entnommen werden kann. Experimentelle Bedingungen wie unter Kapitel 6.5.1 beschrieben.

7.3.3.3 Oligomerisierungszustand von His₆-N-hCPT2

Bei Annahme einer globulären Proteinform der hCPT2 würde sich nach Gleichung 6.7 ein theoretischer Stokes-Radius von 3,41 nm bei einer Molmasse von 73433 g/mol ergeben.

Ohne Stabilisatoren

Dem Messpuffer wurden lediglich 0,2 % [w/v] nOG zugesetzt, wodurch der störende Einfluss der nOG-Mizellen [Kapitel 7.3.3.1] auf das zu ermittelnde Ergebnis mittels Skalengleichung [Gl. 6.7] gering ist.

Nach Doppelbestimmung wurde ein Molekulargewicht für das Wildtyp-Enzym von 107112 und 105051 g/mol bestimmt. Der Stokes-Radius nach dynamischer Lichtstreuung wurde mittels Skalengleichung von 3,44 und 3,41 nm ermittelt. Daraus wurde ein Molekulargewicht nach Gleichung 6.7 von 74753 und 73122 Da berechnet. Diese Molekulargewichte liegen nahe der Monomermasse des Proteins der in Tabelle 7.3 berechneten Molekulargewichte. Bei Berechnung der apparenten Molekulargewichte mittels statischer Lichtstreuung erfolgte keine angemessene Rundung der Werte.

Problematisch war die geringe Stabilität des nativen Proteins aufgrund des geringen Anteils an nOG von 0,2 % [w/v] im Messpuffer, wodurch das Protein zur Aggregation neigte. Diese Aggregate haben Einfluss auf die berechneten Massen und Stokes-Radien.

Zusatz von Palmitoylcoenzym A

Dem Messpuffer wurden lediglich 0,1 % [w/v] nOG zugesetzt, wodurch der störende Einfluss der nOG-Mizellen auf das zu ermittelnde Ergebnis mittels Skalengleichung Gl.6.7 gering ist. Der Zusatz von PCoA in der Konzentration der aktiven Zentren des Proteins stabilisiert die native Proteinstruktur und hat keinen Einfluss auf das Molekulargewicht, da das Substrat keine Mizellen ausprägt [Kapitel 7.3.3.2]. Das Unterdrücken der Protein-Aggregation durch das Besetzen der Substratbindestelle wurde durch Messung des Streulichtes mittels Fluoreszenzmessung durch Detektion der Aggregate bei 340 nm Anregungs- und Emissionswellenlänge überprüft [Daten nicht gezeigt]. Das Protein zeigt nach 50 min Messzeit eine stabile Fluktuation aufgrund Brownscher Molekularbewegung. Bei längerer Messphase ist keine stabile Messung der dynamischen Lichtstreuung mehr möglich. Dieses Phänomen könnte durch die Hydrolyse des Substrats PCoA unter Bildung von Palmitinsäure und CoA verursacht sein. Nachfolgend würde das Produkt aus dem aktiven Zentrum entfernt und dieses unbesetzt verbleiben. Dies würde auf eine *single turnover*-Reaktion des Enzyms hindeuten. Nach Berechnung des apparenten Molekulargewichts mittels statischer Lichtstreuung erfolgte keine angemessene Rundung der Werte. Es wurde ein Molekulargewicht von 159700 g/mol ermittelt. Im Gegensatz dazu wurde mittels Skalengleichung ein Stokes-Radius von 3,076 nm berechnet, woraus ein Molekulargewicht von 54700 Da resultierte. Bei der Auswertung wurde nur eine Größenspezies berücksichtigt, was durch die Dämpfung der Werte einzustellen war. Das berechnete Molekulargewicht ist zu gering, was durch die Messdaten-Dämpfung verursacht sein kann. Der Radius von 3,076 nm kann auch als Mittelwert zweier Molekülspezies interpretiert werden. Daher wurden die Messwerte mit veränderter Dämpfung neu justiert. Es konnten dadurch zwei Molekülspezies mit 3,49 nm und 1,99 nm Stokes-Radius ermittelt werden. Diese entsprächen einer molaren Masse von 78235,6 und 16218,4 Da. Diese Neuinterpretation der Messdaten könnte auf eine Verunreinigung des Messproteins mit einem 16,2 kDa-Protein hindeuten. Die kleinere Proteinspezies kann an der His₆-N-hCPT2 assoziiert und durch die Proteinreinigung nicht vollständig entfernt worden sein. Ein Grund, warum das niedermolekulare Protein im SDS-Gel nicht detektiert wurde, kann durch die experimentelle Durchführung SDS-PAGE begründet sein. Um eine ausreichende Auftrennung der höhermolekularen Proteinbanden in einem SDS-Gel zu erreichen, wurde die Elektrophorese länger betrieben. Kleinere Proteinspezies liefen aus dem Gel und wurden daher nicht detektiert. Diese Proteinspezies würden die Stokes-Radien und die Berechnung des Molekulargewichts der His₆-N-hCPT2 aus den Streulichtexperimenten beeinflussen und verändern.

Die ermittelten Ergebnisse lassen eine erste Spekulation über den Oligomerisierungszustand des His₆-N-hCPT2-Proteins zu. Die Resultate der dynamischen Lichtstreuung würden auf einen monomeren Zustand hindeuten, was eventuell der Beteiligung von Detergenzien [Hsiao *et al.*, 2006] zuzuschreiben wäre. Diese könnten die Assoziation von Proteinuntereinheiten unterbinden und ein monomeres Protein erzeugen. Die Messungen der statischen Lichtstreuung können dieses Ergebnis stützen, bedürfen jedoch aufgrund der potentiellen niedermolekularen Verunreinigung einer weiterführenden Verifizierung.

7.3.4 Struktur-*alignment*

Die Primärsequenzen der CPT2 aus *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens* aus Abbildung 10.2 im Anhang weisen eine hohe Identität von 83 %, sowie eine Homologie von 91,2 % auf. Daher ist die Proteinstruktur der Ratte als Vorlage für ein Proteinstruktur-*modelling* der humanen CPT2 geeignet. Es ist eine hohe Analogie der Charakteristika der humanen Proteinstruktur in Bezug auf die Kristallstruktur des Rattenenzym zu erwarten.

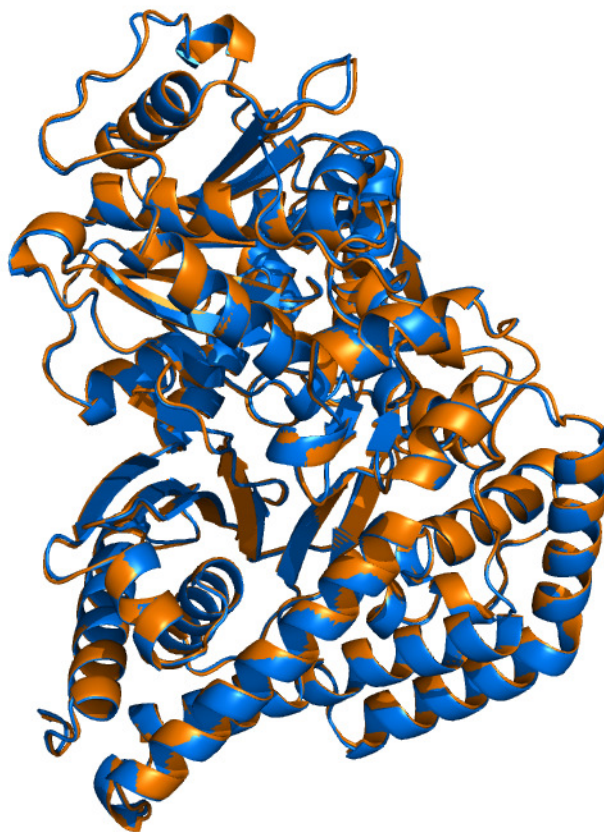


Abb. 7.22 Struktur-*alignment* eines Monomers der modellierten humanen CPT2-Struktur [orange] und der rCPT2 [blau] [NCBI-Dateneintrag 2RCU nach Rufer *et al.* (2006)]. Der RMS-Wert des *alignments* betrug 0,372.

Die generierte humane Struktur und die verfeinerte Kristallstruktur der CPT2 der Ratte wurden mittels des Programms Pymol 2006 [DeLano Scientific LLC, USA] überlagert [Abb 7.22]. Der RMS-Wert betrug 0,372, welcher auf eine signifikante Übereinstimmung der beiden Strukturen hindeutet. Die Konformation weniger verbindender *loops* ist divergent, was durch das realisierte Primärsequenz*alignment* beider Spezies in Abbildung 10.2 im Anhang erwartet werden konnte.

Der humane Konterpart bestehend aus 658 Aminosäuren mit einem 25 Aminosäuren langen *precursor*, formt 27 α -Helices und 18 β -Faltblätter. Das Protein setzt sich aus einer N- und C-terminalen Domäne zusammen [Abb. 7.23A]. An der Interaktionsfläche beider Domänen befindet sich das aktive Zentrum, ein Y-förmiger Tunnel, der jeweils eine Bindestelle für die Acyldomäne, das L-Carnitinmolekül und die CoA-Einheit besitzt [Abb. 7.23B]. Im Gegensatz zu anderen Transferasen, wie CAT oder COT, öffnet sich der Acyltunnel hin zur Oberfläche. Die Domänen enthalten ein 6 strängiges zentrales antiparalleles β -Faltblatt, welches von α -Helices umgeben ist. Die Faltblätter 1 und 16 vermitteln hauptsächlich den Kontakt der beiden Domänen [Rufer *et al.*, 2006]. Die Aminosäuren 178-208 bilden einen Membrananker und vermitteln den Kontakt zur inneren Mitochondrienmembran [Abb. 7.23A+B].

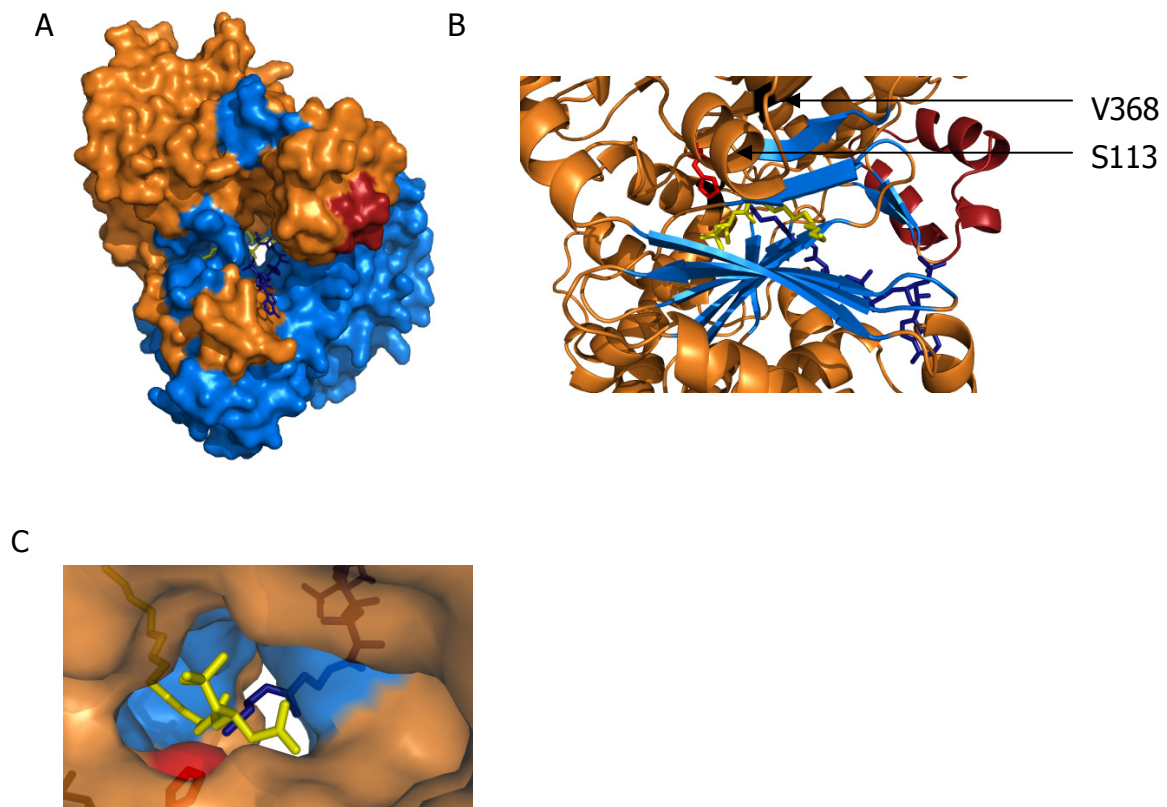


Abb. 7.23A-C Schematische Darstellungen des humanen gemodelten Proteins der CPT2 mittels swissprot [Peitsch, 1995; Guex & Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003] und ein Einblick in den Substratkanal. Das Substrat Coenzym A ist dunkelblau [durch Homologiemodelling mit CAT; pdb 1t7q], der Inhibitor ST1326 [(R)-N-(tetradecylcarbamoyl)-aminocarnitin [durch Homologiemodelling mit rCPT2; pdb 2RCU] in Gelb dargestellt. **A:** Darstellung der modellierten Struktur der humanen CPT2. Die N-terminale Domäne ist orange, die C-terminale Domäne blau dargestellt. Die Interaktionsfläche zwischen N- und C-terminaler Domäne bildet das aktive Zentrum aus. Der Membrananker, bestehend aus den Aminosäuren 178-208, ist dunkelrot eingefärbt. **B:** Sekundärstrukturelemente der hCPT2 im aktiven Zentrum [hellblau: zentrale β -Faltblätter, dunkelrot: Membrananker, schwarz: modifizierte Aminosäuren im Protein, rot: Histidin 372]. **C:** Einblick in den Substratkanal der modellierten Proteinstruktur der humanen CPT2. Die Kosubstrate, welche den Substratkanal besetzen, sind gelb [ST1326] und dunkelblau [CoA] dargestellt. In Rot ist das Histidin 372 gefärbt.

Der Inhibitor ST1326 und das Kosubstrat CoA wurden in das aktive Zentrum der gemodelten humanen CPT2 mittels Homologie-*modelling*-Technik auf Basis der komplexen Strukturen [2RCU; Rufer *et al.*, 2006] und [1T7Q; Hsiao *et al.*, 2004] hinein gerechnet, um die vorhandenen Substratbindestellen zu besetzen und die Situation im aktiven Zentrum zu visualisieren [Abb. 7.23B,C]. Beide Kosubstrate befinden sich in unmittelbarer Nähe

zueinander. In Abb. 7.23B,C ist das Substratanalogon in gelb und das CoA-Molekül in schwarz dargestellt. Im Einzelnen wurden Heteroatome der Aminosäuren mit essentiellen Funktionen gesondert eingefärbt. Das Substratanalogon ST1326 ist durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen fest an das aktive Zentrum gebunden. Besonders die Kopfgruppe des Inhibitors ST1326 wechselwirkt mit einer Vielzahl geladener Aminosäuren, welche sowohl die Ausrichtung des Substrats als auch die optimale Positionierung der Reste im aktiven Zentrum zur Katalyse bedingen. Die Aminosäurereste des aktiven Zentrums, welche mit der hydrophilen Carbamoyl-aminocarnitin-Gruppe interagieren, sind in der Abbildung 7.24 in grün dargestellt. Eine essentielle Funktion besitzen das Histidin 372 und das Serin 590 sowie das Asparat 376 und das Glutamat 487. Die Diskussion hinsichtlich der Rolle dieser Aminosäuren wird im folgenden Kapitel intensiviert.

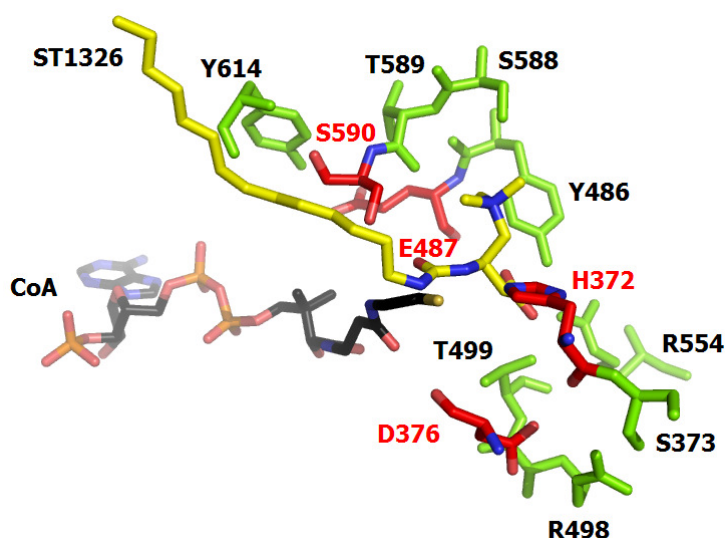


Abb. 7.24 Darstellung des aktiven Zentrums der modellierten Struktur der humanen CPT2. Das Kosubstrat Coenzym A ist schwarz, der Inhibitor ST1326 gelb dargestellt. Aminosäuren, welche an der Ausprägung des Wasserstoffbrückennetzwerks mit der hydrophilen Kopfgruppe des Substratanalogons ST1326 beteiligt sind, sind grün eingefärbt. Die katalytischen Reste mit essentiellen Funktionen sind rot abgebildet. Die Heteroatome des Coenzym A-Moleküls, des Inhibitors ST1326 und der essentiellen Aminosäurereste des aktiven Zentrums sind gesondert markiert. Dabei wurden Stickstoffatome blau, Schwefelatome gelb, Phosphoratome orange und Sauerstoffatome hellrot dargestellt.

Der lipophile Rest des Inhibitors ist vor allem von hydrophoben Aminosäuren des Substrattunnels umgeben [Abb. 1.5], wobei die Substratspezifität hin zu langkettigen Fettsäuren vor allem der Aminosäure Glycin 600 zuzuschreiben ist, welche den Substratkanal an der Oberfläche des Proteins öffnet und somit den Raum für die Bindung langkettiger Substrate schafft. Eine simultane Bindung von Acyl-L-carnitin- und Acylcoenzym A-Molekülen ist aufgrund des extremen Raumbedarfs der hydrophoben Acylkette nicht realisierbar.

7.3.5 DTNB-Aktivitätstest

Hintergrund

Das Carnitin-*carrier*-System besteht aus der CPT1, einem integralen Membranprotein an der äußeren Mitochondrienmembran, der CACT und der CPT2, dem membranassoziierten Enzym in der inneren Mitochondrienmembran. Das *shuttle*-System transportiert Fettsäuren aus dem Cytosol durch die Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix, um diese dort der β -Oxidation zuzuführen. Die am Fettsäuretransport beteiligten Proteinkomponenten sind in Abb. 1.2 der Einleitung dargestellt. Um die Reaktion ablaufen zu lassen muss sowohl ein Acyl-Donor als auch ein Akzeptor vorliegen [Zweisubstrat-Reaktion]. Als Donoren fungieren Acyl-L-carnitin oder AcylCoA, als Akzeptoren dienen die Kofaktoren L-Carnitin oder CoA. Die Acylgruppenakzeptoren werden während der Tranferasereaktion regeneriert. Um die Enzymreaktion zu bedingen müssen Fettsäuren im Cytosol durch die Übertragung auf CoA, katalysiert durch die ACS, aktiviert werden. Der mobile Carrier L-Carnitin fungiert anschließend als Rezeptormolekül für aktivierte Fettsäuren im Cytosol, wobei, katalysiert durch die CPT1, der O-Ester Palmitoyl-L-carnitin generiert wird. Der Kofaktor CoA wird dabei regeneriert und verbleibt im Cytosol. Das gebildete Produkt der CPT1 wird von der Translokase übernommen und durch die Mitochondrienmembran transportiert, um anschließend von der CPT2 übernommen zu werden. CPT2 katalysiert eine erneute Transesterifikation des Palmitoylrests von Carnitin auf CoA aus dem Matrix-Pool, wobei ein energiereicher Thioester, das PCoA entsteht. Der wiederhergestellte Kofaktor L-Carnitin kann durch die CACT rücktransportiert werden, um erneut als Rezeptormolekül für aktivierte Fettsäuren zu fungieren. Sowohl die katalysierten Reaktionsschritte der CPT1 als auch der CPT2 unterliegen einer Gleichgewichtsreaktion. Aufgrund dieser Gleichgewichtsreaktion war es bisher nicht möglich, die enzymkinetischen Parameter der Einzelkomponenten der humanen CPT2 *in vitro* zu messen und zu studieren, da es sich bei den Aktivitätsmessungen entweder um humanes Skelettmuskel-Homogenat oder nicht aufgereinigte Proteine handelte. Das Homogenat enthält Aktivitäten der CPT1 und 2, sowie der COT, nicht aufgereinigte Proteine enthalten andere, den Aktivitätstest beeinflussende Komponenten und können somit das Ergebnis der enzymkinetischen Parameter in einem Aktivitätstest verfälschen.

Durch die rekombinante Herstellung und Reinigung der hCPT2 und Varianten können die Enzyme *in vitro* durch isolierte enzymkinetische Untersuchungen mittels Aktivitätstest charakterisiert werden. Die Hinreaktion der CPT2, d.h. die Bildung des Thioesters Palmitoylcoenzym A aus Palmitoyl-L-carnitin und freiem CoA unter Freisetzung von L-Carnitin, ist dabei deutlich schwieriger zu detektieren als die Rückreaktion, wobei Palmitoyl-L-carnitin gebildet und CoA freigesetzt wird. Die Freisetzung des CoA kann mittels DTNB im Aktivitätstest bestimmt werden [Kapitel 6.8.1]. Die kinetischen Parameter K_M , K_I , S_{opt} , k_{kat} sowie die spezifische Aktivität und die katalytische Effizienz k_{kat}/K_M der natürlichen Substrate L-Carnitin und PCoA sowie der in Tabelle 6.3 aufgeführten AcylCoA-Ester mit variierenden Kettenlängen oder Omega-n-Fettsäurecoenzym A-Ester wurden mit diesem artifiziellem Testsystem für das Wildtypenzym und dessen Varianten bestimmt.

7.3.5.1 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter von L-Carnitin

Es wurden PCoA als Donor- und L-Carnitin als Akzeptorsubstrat in der CPT2-katalysierten Enzymreaktion eingesetzt. Für die Entwicklung eines validen Testsystems zur Bestimmung der Aktivität der His₆-N-hCPT2 sind Eigenschaften der Substrate und des Puffersystems hinsichtlich deren Einfluss auf die zu detektierende Enzymaktivität zu berücksichtigen.

Ein essentielles Kriterium für die Etablierung eines optimierten Aktivitätstests bezieht sich auf das verwendete Puffersystem. MOPS- und HEPES-Puffer inhibieren kompetitiv das Enzym aufgrund ihrer dem L-Carnitin konformen Eigenschaften als Zwitterionen [Ramsay *et al.*, 1987]. TES, Tris und Tricin können nachweislich durch CAT alkyliert werden, was auch durch die Aktivität der CPT2 nicht ausgeschlossen ist [Christiansen *et al.*, 1976]. Der Zusatz von EDTA perturbiert die Bildung von divalenten Metallpräzipitaten, wie Kalziumpalmitat [Fritz *et al.*, 1959]. Daher wurde für die enzymatische Charakterisierung ein Phosphat-gepuffertes System gewählt.

PCoA und andere FSCoAs zeigen mizellare Effekte wie Detergenseigenschaften. Diese resultieren als Erklärung für ein anomales kinetisches Verhalten [Barden *et al.*, 1969]. Reine AcylCoAs enthalten 4-5% freie CoAs [Constantinides *et al.*, 1988], weshalb eine Basislinienkorrektur des Messansatzes ohne Protein vorgenommen werden musste. Die Bedingungen des Aktivitätstests in Anwesenheit von Membranen, BSA und divalenten Magnesiumionen erschweren den Assay durch Bindung der Fettsäuren an die zugesetzten Komponenten [Constantinides *et al.*, 1988]. Die freie Konzentration der Substrate hinsichtlich ihrer Kinetiken des enzymatischen Umsatzes wird dadurch verändert.

Sowohl der Überschuss des Donorsubstrats als auch des Akzeptorsubstrats führen zu einer Substratüberschusshemmung. Der verursachte Hemmeffekt der Substrate überlagert die enzymkatalysierte Reaktion. Die Substratkonzentrationen müssen daher für eine Charakterisierung des Enzyms so eingesetzt werden, dass die Hemmeffekte nicht mit der eigentlichen Reaktion interferieren.

Innerhalb einer Messreihe wurde das Substrat PCoA festgesetzt und die Carnitinkonzentration variiert. In den verschiedenen Messreihen wurde hingegen die PCoA-Konzentration variiert [Abb. 7.25A-C]. Für alle gereinigten Proteine wurden in einer v/S-Charakteristik die bestimmten Extinktionsänderungen pro Proteinmenge gegen die gemessenen L-Carnitinkonzentrationen aufgetragen [Abb. 7.25A-C]. Es konnte der Einfluss des Hemmeffekts des festgesetzten Substrats PCoA visualisiert werden. Die Messkurven, die nicht durch hohe PCoA-Konzentrationen beeinflusst waren [in rot in Abb. 7.25A-C dargestellt], wurden mittels Fit nach Substratüberschusshemmung Gl. 6.17 einzeln ausgewertet. Die daraus resultierenden kinetischen Parameter wurden anschließend gemittelt.

Es zeigte sich für den Wildtyp ein K_M für L-Carnitin von 2711 μM , wobei die Messreihen mit einer festgesetzten PCoA-Konzentration zwischen 4-7 μM die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter des L-Carnitins nicht behindern. Die Variante S113L besitzt ein K_M für L-Carnitin von 1480 μM , die *triple*-Variante von 1940 μM . Die für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante verwendeten Messreihen der Variante His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV sind in rot in Abb. 7.25A-C dargestellt. Die K_M -Werte der gemessenen Protein-Varianten liegen in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich. Alle gemessenen Proteine der hCPT2 prägen unter Einwirkung hoher L-Carnitin-Konzentrationen

eine Substratüberschusshemmung aus. Die Inhibitorkonstante K_I des L-Carnitins ist, den jeweiligen Protein-Varianten zugeordnet, in Abb. 7.25A-C aufgeführt. Die Substratüberschusshemmungen des L-Carnitins mit einem K_I von 23,6 mM im Hinblick auf das Wildtypprotein und 22,5 mM die *triple*-Variante betreffend, sind stärker ausgeprägt als der Hemmeffekt des L-Carnitins der S113L-Variante mit einem K_I -Wert von 35,2 mM.

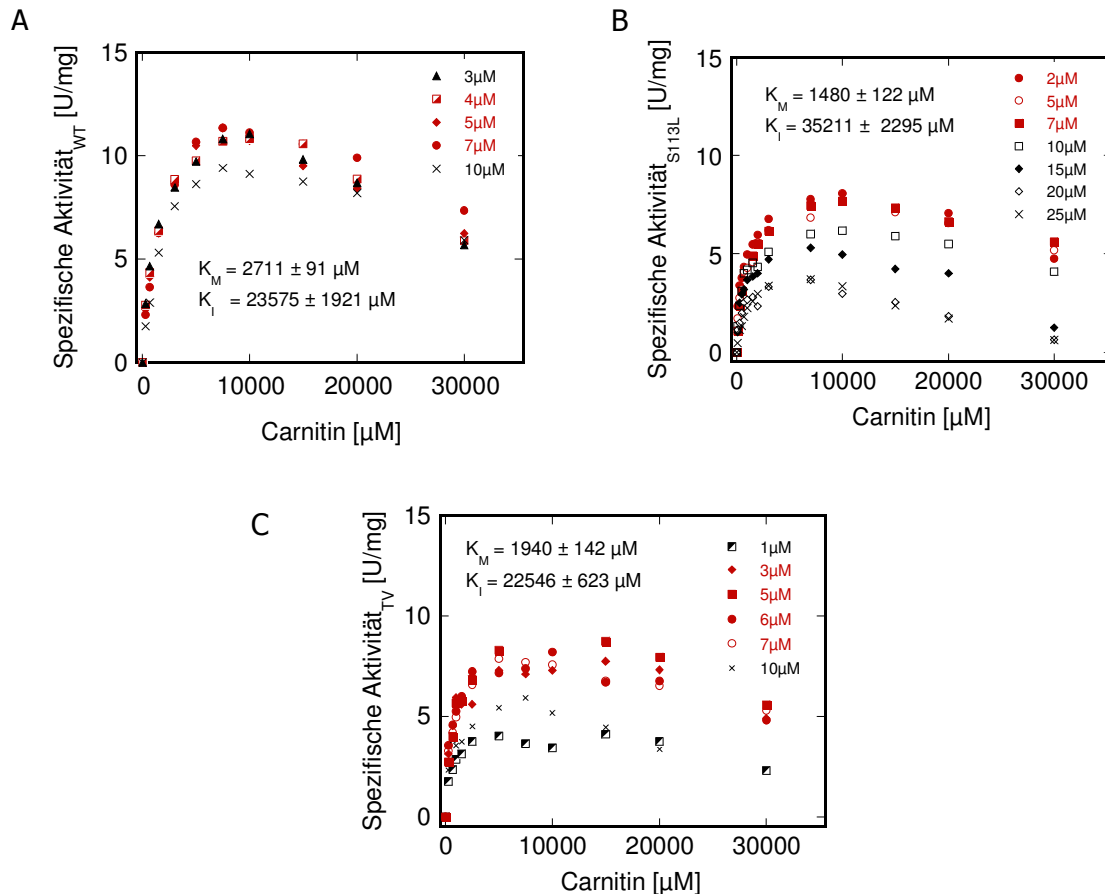


Abb. 7.25A-C v/S-Charakteristiken zur Bestimmung der K_M -Werte für L-Carnitin der Proteine His₆-N-hCPT2 (A), His₆-N-hCPT2/S113L (B) und His₆-N-hCPT2/TV (C). Die in den Grafiken angeführten Legenden beschreiben die Konzentration von PCoA pro Messreihe. Die rot dargestellten Sättigungskurven wurden nach der Gleichung für eine Substratüberschusshemmung [Gl. 6.17] ausgewertet. Die daraus resultierenden Ergebnisse der einzelnen v/S-Charakteristiken einer Protein-Variante wurden gemittelt. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

Um eine Beeinflussung der kinetischen Progresskurven durch hohe L-Carnitin-Konzentrationen im weiteren Verlauf zu unterbinden, wurden die weiteren Kinetiken nicht mit einem zehnfachen Überschuss an L-Carnitin aufgenommen. Die Messungen mit dem Wildtypprotein wurden nachfolgend bei 12 mM L-Carnitin durchgeführt, was einem fünffachen K_M -Wert entspricht. Die Aufnahme der Kinetiken der Varianten His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV erfolgte bei jeweils 10 mM L-Carnitin. Dies entspricht ebenfalls einem fünffachen K_M -Wert.

7.3.5.2 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der Fettsäurecoenzym A-Ester

Die nachfolgend aufgenommenen v/S-Charakteristika zur Bestimmung der kinetischen Parameter der AcylCoenzym A-Ester aus Tabelle 6.3 wurden mit einem definierten Überschuss an L-Carnitin gemessen, sodass L-Carnitin keine Substratüberschusshemmung verursachte. Dies entsprachen beim Wildtypprotein 12 mM L-Carnitin und für die Varianten His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV jeweils 10 mM L-Carnitin.

Abbildung 7.26 zeigt die v/S-Charakteristika der hCPT2, hCPT2/S113L und hCPT2/TV stellvertretend mit PCoA als zweitem Reaktionspartner. Das erste Substrat L-Carnitin wurde wie unter Kapitel 7.3.5.1 beschrieben im Überschuss eingesetzt. Die graphische Darstellung lässt deutlich eine Substratüberschusshemmung erkennen. Mit Ausnahme der Substrate Hexanoylcoenzym A für hCPT2 und Varianten, sowie Oktanoylcoenzym A und Dekanoylcoenzym A für hCPT2/TV, welche nach einer Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet wurden, waren alle v/S-Charakteristika mit der Gleichung nach einer Substratüberschusshemmung angepasst. Die Daten wurden mittels Gleichung 6.17 ausgewertet und die daraus resultierenden enzymkinetischen Parameter in Tabelle 7.4 zusammengefasst.

Alle weiteren v/S-Charakteristika sind im Anhang in den Abb. 10.10-18 aufgeführt.

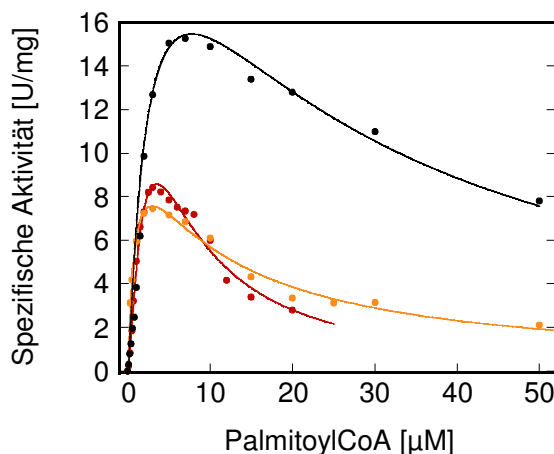


Abb. 7.26 v/S-Charakteristika der Proteine His₆-N-hCPT2 [schwarz], His₆-N-hCPT2/S113L [orange] und His₆-N-hCPT2/TV [rot] mit Palmitoylcoenzym A als variierendes Substrat und L-Carnitin im Überschuss. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie unter 6.8.1.1 beschrieben.

Schlussfolgerungen für das Wildtyp-Enzym

Die Interpretation der kinetischen Parameter für die Substrate aus Tabelle 7.4 wird im Folgenden für das Wildtypprotein diskutiert. Die Substrataffinität erhöht sich erheblich mit steigender Länge der gesättigten Kohlenstoffkette des Acylcoenzym A-Substrats [Abb. 7.27 (links)]. Durch das Einbringen von Doppelbindungen, die überwiegend in cis-Konfiguration vorliegen, wird eine starre 30°-Krümmung der hydrophoben Kohlenstoffkette erzeugt. In Konsequenz kann dadurch nicht mehr jede funktionelle Gruppe des Substrats an das Enzym nach dem Prinzip des *multiple point attachment* binden. Dadurch kann die maximale Bindungsenergie nicht realisiert werden. Dies führt zu einer Verringerung der Bindungsaffinität und somit zu steigenden K_M-Werten [Abb: 7.27 (rechts)].

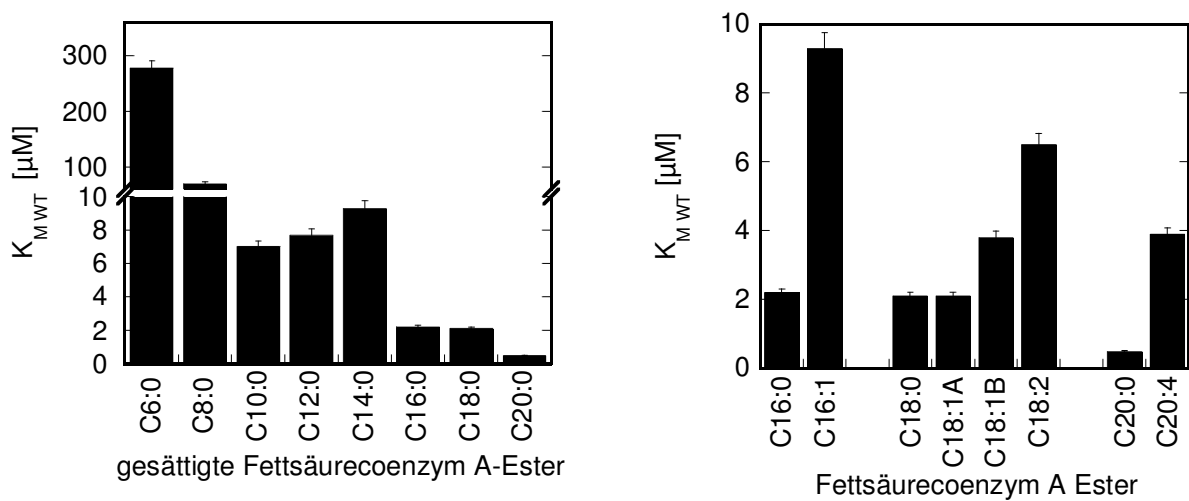


Abb. 7.27 Einfluss der Acylcoenzym A-Ester auf den kinetischen Parameter K_M des WT. **Links:** Änderung der Michaelis-Menten-Konstante unter Einfluß variierender Kettenlängen gesättigter FSCoA-Ester. **Rechts:** Vergleich der K_M -Werte von gesättigten und ungesättigten FSCoA-Ester gleicher Kettenlänge [C₁₆-C₂₀]. C18:1A: Oleoylcoenzym A, C18:1B: Vaccenoylcoenzym A. Die enzymatischen Parameter wurden wie in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben bestimmt.

Die Inhibierung des Enzyms durch einen Überschuss an Fettsäuresubstrat wird durch die Länge der Kohlenstoffkette des Substrats beeinflusst. Die Inhibitorkonstante K_I sinkt wesentlich mit steigender Anzahl an C-Atomen im Substrat [Abb. 7.28]. Auch das Einbringen von Doppelbindungen, was zur Entstehung von Omega-n-Fettsäuren führt, hat Einfluss auf den Hemmeffekt. Im Vergleich zu den gesättigten Fettsäurecoenzym A-Estern steigt die Inhibitorkonstante durch das Einführen von Doppelbindungen [Abb. 7.28]. Somit nimmt die Hemmbarkeit durch einen Überschuss an ungesättigtem Substrat ab.

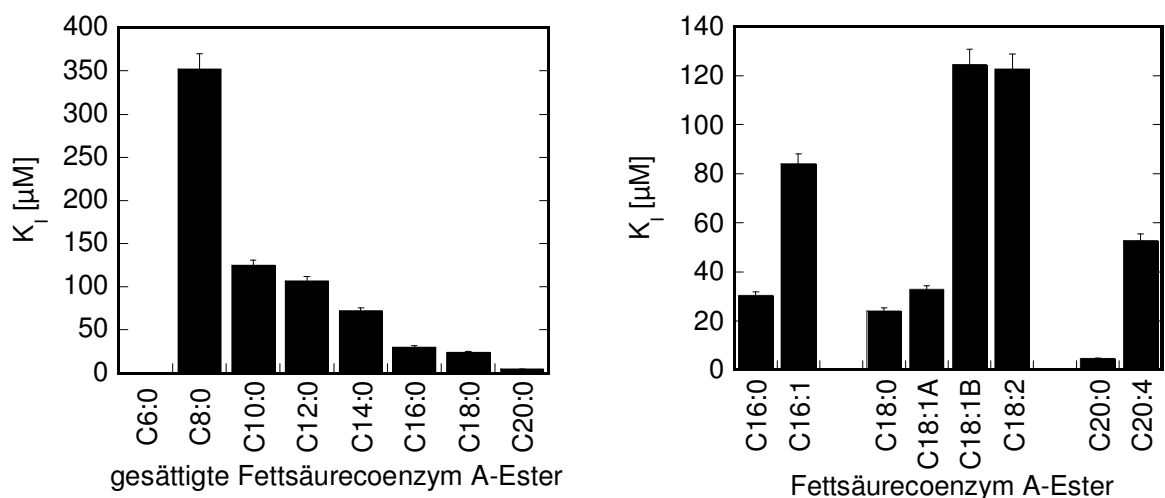


Abb. 7.28 Einfluss der Acylcoenzym A-Ester auf den kinetischen Parameter K_I des WT. **Links:** Änderung der Inhibitorkonstante unter Einfluß variierender gesättigter FSCoA-Ester. **Rechts:** Vergleich der K_I -Werte gesättigter und ungesättigter Fettsäure-CoAs gleicher Kettenlänge (C₁₆-C₂₀). C18:1A: Oleoylcoenzym A, C18:1B: Vaccenoylcoenzym A. Die enzymatischen Parameter wurden wie in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben bestimmt.

Die spezifische Aktivität des Enzyms verringert sich tendenziell mit steigender Kettenlänge der gesättigten Substrate [Abb. 7.30 (links)]. Durch die Bindung des Substrats an das Enzym

mit dem Resultat der Generierung eines Enzym-Substrat-Komplexes kann die gesamte freie Bindungsenthalpie bei Enzym-Substrat-Komplementarität gewonnen werden. Durch das Verlängern der Kohlenstoffkette der Fettsäurecoenzym A-Ester kann der ES-Komplex stabilisiert werden, was zu einer Erhöhung der freien Aktivierungsenthalpie ΔG^* durch einen zusätzlichen Beitrag freier Bindungsenthalpie führt. Die freie Enthalpie des Übergangszustands hat dabei keinen Einfluss. Durch die Steigerung der freien Aktivierungsenthalpie resultiert daraus eine Verminderung der Geschwindigkeit und somit eine geringere spezifische Aktivität.

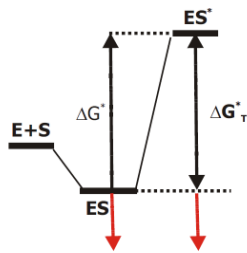


Abb. 7.29 Schematische Darstellung der Änderung der Aktivierungsenthalpie des Übergangszustands durch das Einbringen von zusätzlichen Bindungen aufgrund der Verlängerung der Kette von Acylcoenzym A-Estern aus „Structure and Mechanism in Protein Science“ (A.R. Fersht, 2003).

Dementsprechend wird die spezifische Aktivität durch ungesättigte Omega-n-Fettsäurecoenzym A-Ester erhöht [Abb. 7.30] in dem der ES-Komplex destabilisiert und der Übergang zu ES^* minimiert wird. Es zeigt sich am Beispiel der C18-Fettsäurecoenzym A-Substrate, dass auch die Lage der Doppelbindung einen Einfluss auf die Intensität der Ausprägung der Effekte hat [Abb. 7.30]. Durch das Einführen einer *cis*-Doppelbindung an Position C9 [C18:1A] wird eine Verdopplung der spezifischen Aktivität erreicht, während aus dem Einbringen einer *cis*-Doppelbindung an Position C12 [C18:1B] keine signifikante Erhöhung der spezifischen Aktivität resultiert. Das Einbringen von Doppelbindungen an den Positionen *cis*-C9,11 führt zu einer spezifischen Aktivität, welche dem dominant-negativen Effekt der *cis*-C9-Doppelbindung entsprechen kann. Genauere Aussagen können jedoch nicht getroffen werden, da separate Untersuchungen zur isolierten Einführung der *cis*-C11-Doppelbindung nicht existieren.

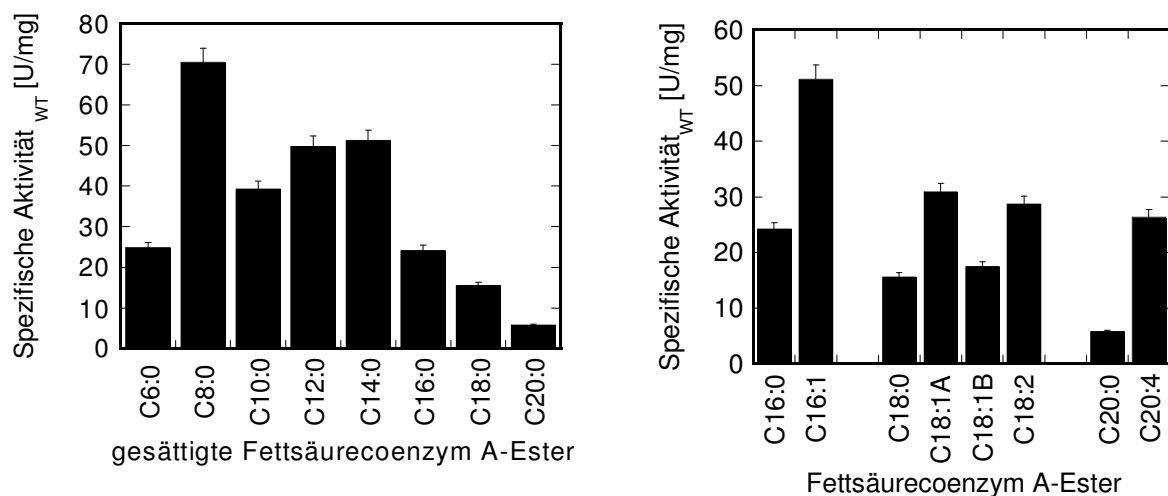


Abb. 7.30 Einfluss der Acylcoenzym A-Ester auf die spezifische Aktivität des WT. **Links:** Änderung der spezifischen Aktivität unter Einfluß variierender gesättigter FSCoA-Ester. **Rechts:** Vergleich der spezifischen Aktivität gesättigter und ungesättigter FSCoA-Ester gleicher Kettenlängen (C₁₆-C₂₀). C18:1A: Oleoylcoenzym A, C18:1B: Vaccenoylcoenzym A. Die enzymatischen Parameter wurden wie in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben bestimmt.

Die Arbeitsgruppen um Schäfer *et al.* (1997) und Violante *et al.* (2010) detektierten eine maximale spezifische Aktivität bei den gesättigten Tetradekanoyl- und Dodekanoylkettenlängen. Sie verbanden dies mit der maximalen Effektivität der Substrate zum Enzym CPT2. Die Effektivität einer Enzymkatalyse wird jedoch durch den Quotienten der Katalysekonstante k_{kat} und der Michaelis-Menten-Konstante K_M beschrieben.

Die katalytische Effizienz k_{kat}/K_M forciert sich bis zu einer Kettenlänge der gesättigten Kohlenstoffkette C16 [Abb. 7.31], welches das natürliche Substrat des Enzyms darstellt. Das Substrat Stearoylcoenzym A zeigt eine geringere Katalyseeffizienz, während Arachidoylcoenzym A wiederum eine erhöhte Effizienz aufweist. Doppelbindungen führen zu einer reduzierten Effizienz mit Ausnahme des Substrats Oleoylcoenzym A [Abb. 7.31].

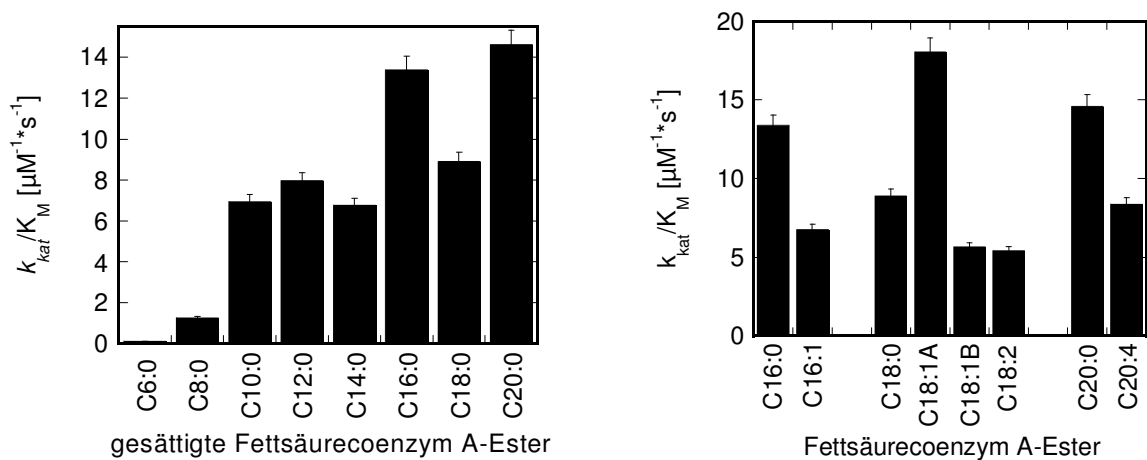


Abb. 7.31 Einfluss der Acylcoenzym A-Ester auf die katalytische Effizienz des WT. **Links:** Änderung der katalytischen Effizienz unter Einfluß variierender Kettenlängen gesättigter Fettsäurecoenzym A-Ester. **Rechts:** Vergleich der katalytischen Effizienz gesättigter und ungesättigter Fettsäurecoenzym A-Ester gleicher Kettenlängen. C18:1A: Oleoylcoenzym A, C18:1B: Vaccenoylcoenzym A. Die enzymatischen Parameter wurden wie in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben bestimmt.

Schlussfolgerungen zu den Varianten S113L und TV

Zusätzlich sollte der Einfluss durch das Einführen der isoliert prominenten Punktmutation S113L und derselben in Verbindung mit den Polymorphismen V368I und M647V [TV] auf die enzymkinetischen Parameter untersucht werden. In Abb. 7.32 sind die Affinitäten der gesättigten Substrate vergleichend für Wildtypprotein und Varianten dargestellt. Die K_M -Werte verringern sich in Bezug auf alle drei untersuchten Proteine mit steigender Kettenlänge der gesättigten Substrate. Betrachtet man ein gesättigtes Substrat und vergleicht dessen Bindungsaffinitäten hinsichtlich der Enzymvarianten sind lediglich geringe Änderungen der K_M -Werte in gleicher Größenordnung zu beobachten. Hingegen besitzt der WT in Bezug auf die ungesättigten Substrate stets den größten K_M -Wert und somit die geringste Bindungsaffinität. Durch das Einführen von Mutationen in das Protein [S113L und TV] verbessert sich die Bindungsaffinität der ungesättigten Substrate im Vergleich zum WT. Die anderen enzymkinetischen Parameter der Varianten weisen analoge Tendenzen auf wie im Wildtypprotein gezeigt.

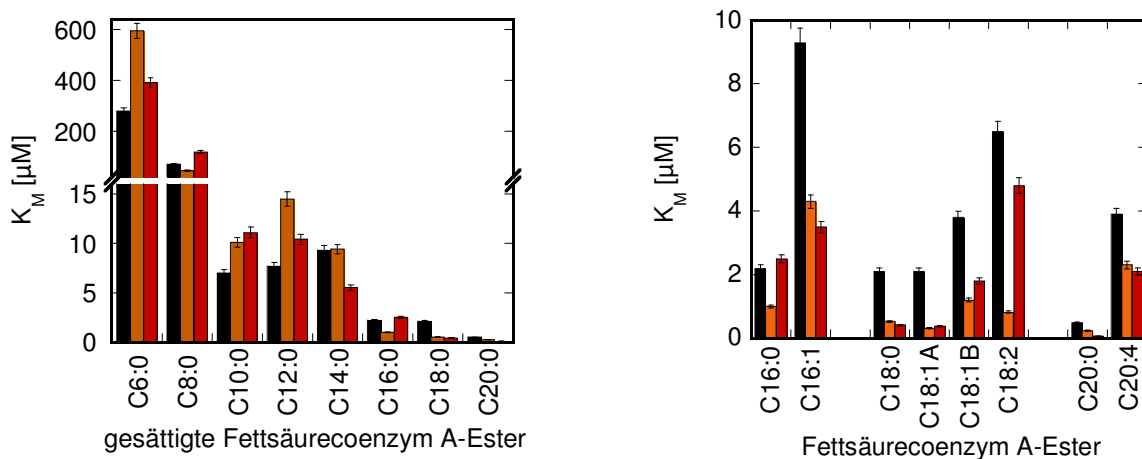


Abb. 7.32 Vergleich des Einflusses der Acylcoenzym A-Ester auf den K_M -Wert des WT [schwarz] und der Proteinvarianten S113L [orange] und TV [dunkelrot]. **Links:** Änderung des K_M -Wertes unter Einfluß variierender Kettenlänge gesättigter Fettsäurecoenzym A-Ester. **Rechts:** Vergleich der K_M -Werte für die verschiedenen Proteine in Bezug auf die Kettenlänge der Substrate und die Lage der Doppelbindung. C18:1A: Oleoylcoenzym A, C18:1B: Vaccenoylcoenzym A. Die enzymatischen Parameter wurden wie in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben bestimmt.

Stellt man die spezifische Aktivität des Wildtypproteins der der Enzymvarianten gegenüber, ist vor allem hier eine konkrete Veränderung [Abb. 7.33] nachweisbar. Diese uniforme Verminderung im Vergleich zum Wildtypenzym liegt je nach Substrat zwischen 20 und 80 %. Dabei scheint vor allem das Einbringen der S113L-Punktmutation für den Verlust der spezifischen Aktivität verantwortlich zu sein, da das zusätzliche Einführen der Polymorphismen V368I und M647V nur noch marginale Unterschiede verursacht. In Abbildung 7.33 ist die katalytische Effizienz des Wildtypenzym und der generierten Proteinvarianten in Bezug auf die Substrate mit unterschiedlicher Kettenlänge aufgetragen. Mit zunehmender Kettenlänge von C6-C20 wird die katalytische Effizienz des Umsatzes der Substrate in allen gemessenen Proteinvarianten gesteigert. Eine Ausnahme bildet das Substrat Stearoylcoenzym A [C18:0]. Vergleicht man die katalytischen Effizienzen der Substrate der einzelnen Proteinvarianten miteinander, wird der k_{cat}/K_M -Wert der kurzkettigen gesättigten Substrate [bis C14] durch die Substitution von Aminosäuren im Enzymmolekül reduziert. Für die Kettenlängen C16 und C18 ist eine geringfügige Erhöhung in den Varianten His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV zu beobachten. Das Substrat Arachidoylcoenzym A stellt hier die einzige Ausnahme dar.

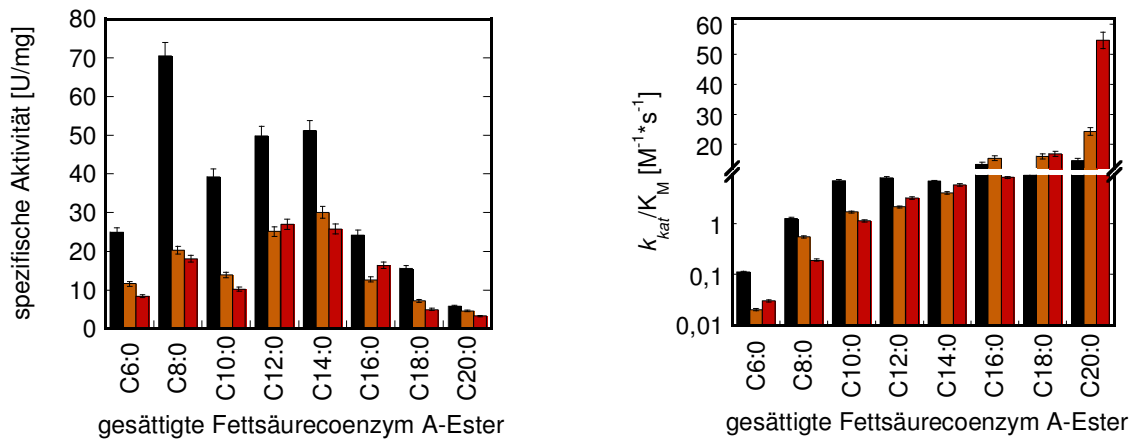


Abb. 7.33 Vergleich des Einflusses der Acylcoenzym A-Ester auf die spezifische Aktivität und die katalytische Effizienz des Wildtypproteins [schwarz] und der Proteinvarianten S113L [orange] und TV [dunkelrot].
Links: Änderung der spezifischen Aktivität unter Einfluß variierender gesättigter Fettsäurecoenzym A-Ester.
Rechts: Modifikation der katalytischen Effizienz durch Applikation von gesättigten Fettsäurecoenzym A-Estern mit verschiedenen Kettenlängen. Die enzymatischen Parameter wurden wie in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben bestimmt.

Die Hemmbarkeit der Enzymreaktion durch Substratüberschuss nimmt mit steigender Kettenlänge zu. Die Substrate Hexanoylcoenzym A (für alle Proteine), Oktanoylcoenzym A und Dekanoylcoenzym A (für die *triple*-Variante) zeigen keine Substratüberschusshemmung in den gemessenen Konzentrationsbereichen [Abb. 7.34].

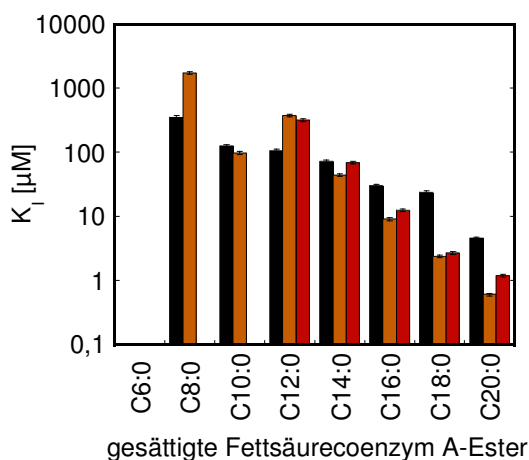


Abb. 7.34 Vergleich (logarithmierte Auftragung) des Einflusses der Acylcoenzym A-Ester auf die Inhibitorkonstante K_I des WT [schwarz] und der Proteinvarianten S113L [orange] und TV [dunkelrot]. Die enzymatischen Parameter wurden wie in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben bestimmt.

Die Inhibierung durch Substratüberschuss in allen Enzymvarianten lässt sich erst ab einer Kettenlänge von 12 Kohlenstoffatomen beobachten. Die Inhibitorkonstante K_I sinkt bei allen Proteinvarianten mit zunehmender Länge der Kohlenstoffkette. Vergleicht man die Inhibierungseffekte der Substrate isoliert hinsichtlich der gemessenen Proteine ist der Inhibierungseffekt K_I in der His₆-N-hCPT2/S113L meist ausgeprägter als im Wildtypprotein.

Die Variante His₆-N-hCPT2/TV mit den zusätzlich generierten Aminosäuresubstitutionen V368I und M647V zeigen keine größeren Veränderungen des Hemmeffektes im Vergleich zur S113L-Mutation. Daher kann geschlossen werden, dass der Hemmeffekt größtenteils durch den S113L-Anteil in der *triple*-Variante verursacht wird.

Alle ermittelten enzymkinetischen Parameter für das WT-Protein und die Varianten sind in Tab. 7.4 zusammengefasst.

Tab. 7.4 Zusammenfassung über alle kinetischen Parameter der His₆-N-hCPT2-Proteine Wildtyp, S113L und TV im DTNB-Aktivitätstest. Die ausführliche Tabelle inklusive Fehlerangaben ist aufgrund der Übersichtlichkeit im Anhang in Tab. 10.1 zu finden. *¹⁾: unter den gewählten Bedingungen im DTNB-Aktivitätstest nicht beobachtet, *²⁾: nicht gemessen.

Substrat	Protein	K _M [μM]	K _I [μM]	S _{opt} [μM]	Spez. Akt. [U/mg]	k _{kat} [s ⁻¹]	k _{kat} /K _M [μM/s]
Hexanoyl-CoA C6:0	WT	277,0	* ¹⁾	* ¹⁾	24,92	31,1	0,11
	S113L	594,9	* ¹⁾	* ¹⁾	11,6	13,9	0,02
	TV	391,2	* ¹⁾	* ¹⁾	8,4	10,3	0,03
Oktanoyl-CoA C8:0	WT	69,5	352,5	124,2	70,4	87,4	1,26
	S113L	45,1	1727,5	264,3	20,3	24,8	0,55
	TV	118,4	* ¹⁾	* ¹⁾	18,1	22,1	0,19
Decanal-CoA C10:0	WT	7,0	124,9	27,6	39,3	48,8	6,94
	S113L	10,1	98,3	31,7	13,9	17,1	1,69
	TV	11,1	* ¹⁾	* ¹⁾	10,2	12,5	1,13
Lauroyl-CoA C12:0	WT	7,7	106,7	28,8	49,8	61,3	7,96
	S113L	14,5	375,0	73,6	25,1	30,6	2,11
	TV	10,4	317,2	56,6	27,0	33,0	3,19
Myristoyl-CoA C14:0	WT	9,3	72,1	15,0	51,2	62,9	6,76
	S113L	9,4	44,2	18,8	30,1	37,6	4,00
	TV	5,5	69,0	17,5	25,8	31,7	5,76
Palmitoyl-CoA C16:0	WT	2,2	30,3	7,3	24,2	29,4	13,37
	S113L	1,0	9,1	3,0	12,7	15,5	15,32
	TV	2,5	12,5	3,5	16,4	20,1	8,04
Palmitoleoyl-CoA <i>cis</i> -9-C16:1	WT	9,3	84,0	21,3	51,1	62,9	6,76
	S113L	4,3	76,5	16,9	23,7	29,0	6,74
	TV	3,5	213,3	26,8	20,4	25,0	7,14
Palmitelaidoyl-CoA <i>trans</i> -9-C16:1	WT	* ²⁾	* ²⁾	* ²⁾	* ²⁾	* ²⁾	* ²⁾
	S113L	1,45	64,6	9,7	11,3	13,8	9,52
	TV	2,40	184,1	21,2	14,0	17,2	7,15

Substrat	Protein	K_M [μM]	K_I [μM]	S_{opt} [μM]	Spez. Akt [U/mg]	k_{kat} [s ⁻¹]	k_{kat}/K_M [$\mu M/s$]
Stearoyl-CoA C18:0	WT	2,1	24,1	5,3	15,6	19,0	8,90
	S113L	0,53	2,4	1,1	7,2	8,5	16,00
	TV	0,41	2,7	1,1	5,0	6,9	16,82
Oleoyl-CoA <i>cis</i> -9-C18:1	WT	2,1	32,8	7,8	30,9	37,9	18,05
	S113L	0,31	9,9	1,7	6,7	8,2	26,36
	TV	0,38	10,0	1,8	7,2	9,0	23,65
Vaccenoyl-CoA <i>cis</i> -11-C18:1	WT	3,8	124,5	20,1	17,5	21,5	5,65
	S113L	1,2	25,4	5,3	6,9	8,4	7,32
	TV	1,8	26,7	6,8	7,7	9,5	5,18
Linoleoyl-CoA (<i>cis,cis</i>)-9,12-C18:2	WT	6,5	122,6	27,0	28,7	35,2	5,42
	S113L	0,82	95,2	8,9	6,5	7,9	9,62
	TV	4,8	140,0	28,6	7,9	9,7	2,03
Arachidoyl-CoA C20:0	WT	0,49	4,6	1,3	5,8	7,1	14,59
	S113L	0,23	0,61	0,61	4,6	5,7	24,27
	TV	0,07	1,2	0,53	3,3	4,0	54,65
Arachidonoyl-CoA (<i>cis,cis,cis,cis</i>)-5,8,11,14-C20:4	WT	3,9	52,9	12,5	26,4	32,6	8,36
	S113L	2,3	44,0	9,9	11,7	14,4	6,25
	TV	2,1	242,5	22,4	10,3	12,6	5,99
Erucoyl-CoA <i>cis</i> -13-C22:1	WT	2,1	78,2	11,6	3,7	4,6	2,19
	S113L	0,78	41,7	2,5	3,6	4,4	5,66
	TV	0,60	7,90	1,7	2,5	3,1	5,16

7.3.5.3 Mechanismus der CPT2-Reaktion

Die aus Kapitel 7.3.5.1 generierten Daten wurden nicht nur für die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter des Substrats L-Carnitin herangezogen, sondern auch für die Aufklärung des Mechanismus von hCPT2 genutzt. Da beide Substrate in hohen Konzentrationen aufgrund der ausgeprägten Hemmeffekte die existente Reaktion beeinflussen, war es nur möglich, die Anfangsbereiche der v/S-Charakteristika für eine Auswertung heranzuziehen. Die reziproke Auftragung der Anfangsbereiche aus Abb. 7.35 der festgesetzten niedrigen PCoA-Konzentrationen der Messreihen bei variierenden L-Carnitin-Konzentrationen nach Lineweaver-Burk lässt eine Aussage zum Mechanismus des Enzyms zu. Nic a' Bháird *et al.* (1993) postulierten einen *compulsory order ternary-complex*-Mechanismus, während Brown *et al.* (1994) den Einfluß einer katalytischen Triade vermuteten.

Die in dieser Arbeit generierten Daten nach einer Lineweaver-Burk-Auswertung zeigen einen parallelen Verlauf der Messreihen, welcher auf einen Ping-Pong-Mechanismus hindeuten würde [Abb. 7.35].

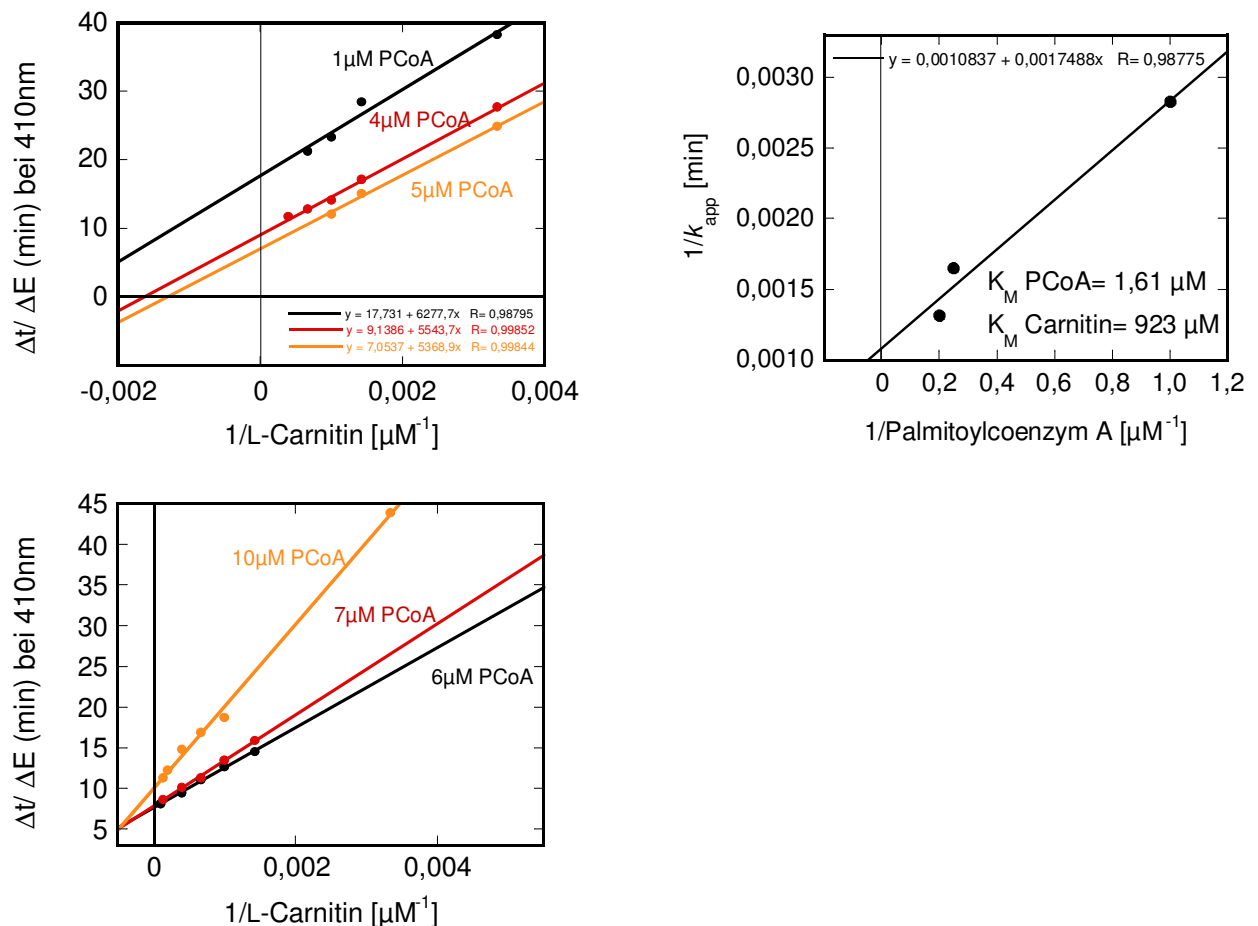


Abb. 7.35 **Oben:** Primär- und Sekundärplots zur Bestimmung des Mechanismus und der kinetischen Parameter am Beispiel des Wildtypenzyms der His₆-N-hCPT2. Es wurden nur die niedrigen Konzentrationsbereiche der Palmitoylcoenzyme A-Reihen für die Evaluierung des Mechanismus verwendet, da höhere Konzentrationen zu einer Beeinflussung des Ergebnisses im Sinne einer Substratüberschusshemmung führen. Die entsprechenden Geradengleichungen sind in den Diagrammen mit abgebildet. **Unten:** Doppelt reziproke Auftragung der höheren Konzentrationsbereiche der Palmitoylcoenzyme A-Reihen. Die experimentellen Bedingungen sind unter Kapitel 6.8.1.1 aufgezeigt.

Die Sekundärauftragung aus Abb. 7.35 kann zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für die Substrate PCoA und L-Carnitin genutzt werden. Der ermittelte K_M -Wert von PCoA [$K_M=1,61 \mu\text{M}$] entspricht dem in Kapitel 7.3.5.3 mittels v/S-Charakteristik ermittelten Wert [$K_M=2,2 \mu\text{M}$]. Der aus dem Sekundärplot resultierende K_M -Wert für L-Carnitin von $923 \mu\text{M}$ divergiert von dem aus Kapitel 7.3.5.1 ermittelten Wert von $2711 \mu\text{M}$ um Faktor 3. Eine Ursache der unterschiedlichen Messdaten kann in der Auswertung der in Kapitel 7.3.5.1 generierten Daten liegen. Aufgrund des Hemmeffektes des zweiten Substrats PCoA auf die Messkurven können die enzymkinetischen Parameter des Substrats L-Carnitin nicht durch eine Primärauftragung der Daten mit nachfolgender Auftragung im Sekundärplot ermittelt werden. Die generierten Messkurven wurden aus diesem Grund einzeln ausgewertet und die resultierenden enzymkinetischen Parameter gemittelt. Durch diese Verfahrensweise kann es zu Abweichungen der in diesem Kapitel ermittelten Parameter kommen. Dennoch liegen die ermittelten Daten in gleicher Größenordnung.

Eine reziproke Auftragung der höheren PCoA-Konzentrationen führt zu einem Schnittpunkt der Geraden im 2. Quadranten [Abb. 7.35] und deutet auf eine Inhibierung durch PCoA hin [Daten nur für das Wildtypprotein bestimmt].

Um diese generierten Resultate im Zusammenhang interpretieren zu können, muss man die Kenntnisse zum existierenden Mikromilieu des aktiven Zentrums aus dem Strukturkapitel 7.3.4 hinzuziehen.

Die Bindung des Palmitoyl-L-carnitin-Analogons ST1326 erfolgt sowohl durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk, verursacht durch die hydrophile Kopfgruppe, und durch hydrophobe Interaktionen, welche den hydrophoben Acylrest im Substratkanal arretieren. Eine der bedeutenden Wechselwirkungen wird durch die Base H372 verursacht, welche eine Wasserstoffbrücke mit dem Estersauerstoff des nativen Substrats ausbildet [Abb. 7.36].

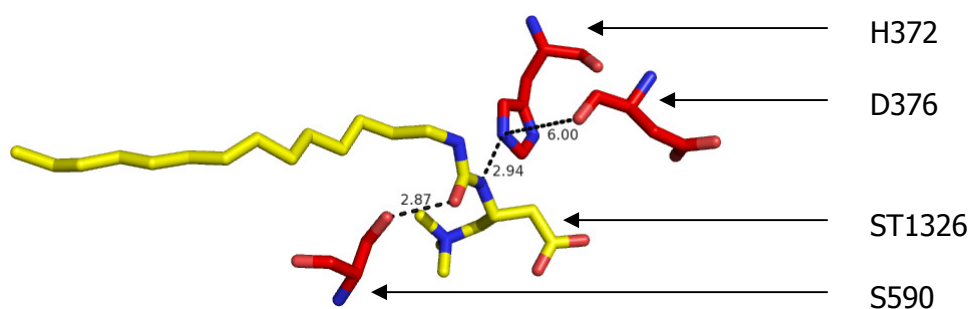


Abb. 7.36 Strukturmodell des Inhibitors ST1326 aus 2RCU [Rufer *et al.*, 2006] und den Aminosäuren H372, S590 und D376 aus dem modellierten Monomer der humanen CPT2-Struktur. Die gestrichelten Linien beschreiben die Abstände zwischen zwei definierten Atomen. Diese sind in Å angegeben. Die konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums sind rot, der Inhibitor ST1326 gelb dargestellt. Stickstoffatome sind blau, Sauerstoffatome rosa wiedergegeben.

Eine weitere Wasserstoffbrücke wird zwischen dem Carbonylsauerstoff und der hochkonservierten Aminosäure Serin 590 eines Serin-Threonin-Serin-*motifs* [Cronin *et al.*, 1997] ausgeprägt. Die Wechselwirkung trägt zur Positionierung des Substrats während der Katalyse bei. Um die Beteiligung des Serins 590 an der enzymatischen Katalyse der CPT2 bestätigen zu können und somit den Ping-Pong-Mechanismus zu validieren, könnten eine ortsgerichtete Mutagenese des Serins 590 zu Alanin und anschließende Charakterisierungsstudien durchgeführt werden. Eine weitere Option, die Reaktivität von Serinen im aktiven

Zentrum von Enzymen nachzuweisen, besteht in dem Zusatz von PMSF zum Aktivitätspuffer. Das sehr reaktive Serin mit einem pK_A -Wert der Hydroxylgruppe größer 14 kann mit PMSF modifiziert werden. Reguläre Hydroxylgruppen werden von dem Proteaseinhibitor nicht beeinflusst, wohingegen der Substratumsatz durch die Modifizierung der Hydroxylgruppe des Serins deutlich reduziert würde, wenn diese Aminosäure einen konservierten, an der Katalyse beteiligten Rest darstellt. Im Sinne einer katalytischen Triade müsste eine Säure wie das Aspartat 376 zur Verfügung stehen, welches polarisierend wirkt und die Nukleophilie des Histidins erhöht. Auch die Beteiligung des Aspartats 376 könnte durch ortsgerichtete Mutagenese und anschließende biochemische Charakterisierung am rekombinanten Protein verifiziert werden.

Test auf Einsubstrat-Reaktion

Ein weiterer Hinweis, welcher für eine enzymatische Katalyse mittels Ping-Pong-Mechanismus sprechen würde, wäre das Vorliegen einer Einsubstrat-Reaktion, wobei eine enzymatische Reaktion mit einer Proteinkonzentration von 150 nM nach Zugabe eines einzigen Substrats [PCoA] katalysiert wird [Abb. 7.37]. Der Palmitoylrest wird in diesem Fall nicht auf Carnitin übertragen, sondern findet in einem Wassermolekül einen Reaktionspartner. Es entsteht Palmitinsäure unter Freisetzung von CoA, welches unmittelbar von dem im Puffer enthaltenen DTNB komplexiert wird. Eine Einsubstrat-Reaktion würde bei einem geordneten Mechanismus unter Ausbildung eines Ternärkomplexes nicht ablaufen, da beide Substrate erst in einer geordneten Abfolge gebunden werden müssen, bevor die Katalyse ablaufen kann.

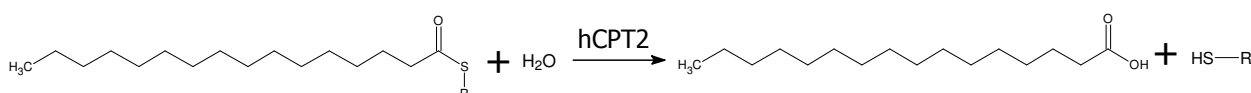


Abb. 7.37 Postulierte Einsubstrat-Reaktion nach Zugabe von 150 nM His₆-N-hCPT2 und 5 μM bzw. 10 μM PCoA. R: CoA-Einheit.

Die nachfolgend aufgenommenen Progresskurven [Abb. 7.38] mit einer Wildtypprotein-Konzentration von 150 nM und den PCoA-Konzentrationen von 5 bzw. 10 μM sprechen für einen Umsatz des alleinigen Substrats PCoA im Sinne einer Einsubstrat-Reaktion, welches die These eines Ping-Pong-Mechanismus unterstützen würde.

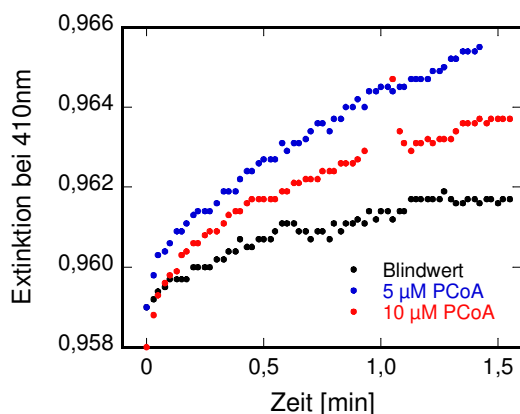


Abb. 7.38 Progresskurven der Einsubstratreaktion der His₆-N-hCPT2 [150 nM] ohne und mit 5 bzw. 10 μM Palmitoylcoenzym A ohne Zugabe von L-Carnitin. Alle weiteren experimentellen Bedingungen wie unter Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

7.3.5.4 Kinetische Stabilität

Proteine sind *in vivo*, aber vor allem auch *in vitro* reversiblen als auch irreversiblen Prozessen ausgesetzt. Letztere, wie zum Beispiel Aggregation oder proteolytischer Abbau, führen zu einer Verminderung der biologischen Aktivität des Enzyms.

Die Substitution von Aminosäuren im Enzymmolekül kann sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Wirkung auf die native dreidimensionale Struktur und damit die biologische Aktivität haben. In jedem Proteinmolekül existieren Bereiche, welche entscheidend Einfluss auf einen Entfaltungsprozess nehmen. Findet ein Austausch der Aminosäuren in einer instabilen Proteinregion statt, kann dessen erhöhte Instabilität zu einer Destabilisierung des gesamten Enzymmoleküls führen.

Die Geschwindigkeit der Entfaltung eines Proteins und die daraus resultierende kinetische Stabilität wird durch die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^*_D beschrieben. Diese Größe wird als Maß für die Stabilität verwendet. Die Interpretation des Effektes der modifizierten Proteinstruktur auf die kinetische Stabilität des Enzyms erfolgt mittels Bestimmung der Differenzen der freien Aktivierungsenthalpie $\Delta\Delta G^*$. Die Entfaltungsphasen folgen im Allgemeinen einer Reaktion 1. Ordnung.

Die Verfolgung der Entfaltungskinetik erfolgte mittels DTNB-Aktivitätstest. Die Aktivität des Enzyms ist proportional zu dem Anteil an nativ gefalteten, aktivem Protein. Nach definierten Zeiten wurden Proben entnommen und per Aktivitätstest gemessen. Anschließend erfolgte eine Auftragung der Restaktivität gegen die Inkubationsdauer.

Abb. 7.39 gibt die Progresskurven der Inaktivierung beispielhaft für das Wildtypenzym, die His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV bei einer Temperatur von 45 °C wieder. Die Messpunkte wurden mit einer Gleichung 1. Ordnung [Gl. 6.23] angepasst und die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung ermittelt. Alle weiteren Kinetiken zu den Inaktivierungstemperaturen von 42 °C, 40 °C und 37 °C sind im Anhang Abb. 10.19-9.20 dargestellt.

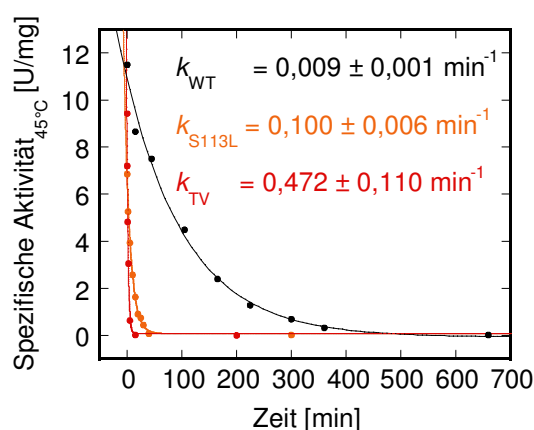


Abb. 7.39 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k der Inaktivierung bei 45 °C der His₆-N-hCPT2-Proteine [schwarz: Wildtypprotein, orange: His₆-N-hCPT2/S113L, rot: His₆-N-hCPT2/TV] mittels DTNB-Aktivitätstest. Die experimentelle Durchführung ist in Kapitel 6.8.1.3 beschrieben. Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach einer Anpassung an eine Reaktion 1. Ordnung.

Die aus Abbildung 7.39 ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k der Inaktivierung wurden anschließend in Gleichung 6.24 eingesetzt um die kinetische Halbwertszeit $t_{1/2}$ zu berechnen. Diese gibt Auskunft darüber, wie viel Zeit benötigt wird, um die Anfangsaktivität auf die Hälfte zu reduzieren.

Die ermittelten Halbwertszeiten der kinetischen Stabilität für die analysierten Temperaturen 45 °C, 42 °C, 40 °C und 37 °C wurden für alle Proteine in Abbildung 7.40 aufgetragen.

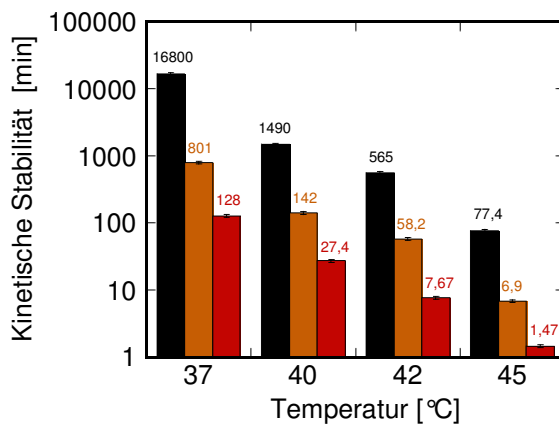


Abb. 7.40 Auftragung der kinetischen Halbwertszeiten unter Einfluss verschiedener Temperaturen auf das Wildtypprotein und die Varianten [schwarz: His₆-N-hCPT2, orange: His₆-N-hCPT2/S113L, rot: His₆-N-hCPT2/TV]. Um eine optimale graphische Darstellung zu erzielen, wurde eine logarithmierte Ordinaten-einteilung gewählt.

Die nachfolgenden Interpretationen werden exemplarisch für die Parameter des Wildtypproteins diskutiert, da sie für die Varianten analog sind. Die kinetische Stabilität bzw. die Halbwertszeit des nativen Proteins verringert sich mit steigender Temperatur. Dabei ist das Enzym bei 40 °C 11x, bei 42 °C 30x und bei 45 °C 217x schneller denaturiert als bei 37 °C. Wie erwartet, führt eine Temperaturerhöhung zu einem schnelleren Verlust der Aktivität. Vermutlich werden labile Proteinregionen durch eine Temperaturerhöhung schneller denaturiert als stabile Strukturbereiche.

Vergleicht man die Halbwertszeiten der drei Proteine bei 37 °C, der menschlichen Körpertemperatur, lässt sich der Wildtyp um Faktor 21 langsamer denaturieren als hCPT2/S113L. Das Wildtypprotein im Vergleich mit hCPT2/TV ist um Faktor 131 stabiler.

Diese Daten belegen, dass sowohl die Modifikation des Proteins durch die Aminosäuresubstitution S113L als auch das Einbringen der Polymorphismen in das Enzymmolekül einen großen Beitrag zur Destabilisierung des Proteins leisten.

Da die biologische Aktivität des Enzyms eng mit seiner nativen, dreidimensionalen Struktur verbunden ist, können denaturierende Einflüsse, wie Temperaturerhöhung, diese vermindern. Je nach Lage der instabilen Strukturregion und der Intensität des denaturierenden Prinzips führt dessen Wirkung entweder zu einem partiellen oder vollständigen Struktur- bzw. Aktivitätsverlust. Betrachtet man den Einfluss der Temperatur von 45 °C auf die Stabilität der Proteine, ist der Wildtyp um Faktor 11,4 stabiler als His₆-N-hCPT2/S113L und um Faktor 60 stabiler als His₆-N-hCPT2/TV. Führt man jetzt einen direkten Vergleich des Wildtypproteins (37 °C *versus* 45 °C) an, kann gezeigt werden, dass die Temperaturerhöhung von 8 grd im Wildtypprotein zu einer Stabilitätsminderung um den Faktor 217 führt. Das zusätzliche Einbringen der 3 Punktmutationen in hCPT2/TV bei 45 °C erzielt eine weitere Destabilisierung um den Faktor 60. Durch den Austausch der Aminosäuren der His₆-N-hCPT2 und der Erhöhung der Temperatur von 37 °C auf 45 °C wird das Protein insgesamt um den Faktor 13025 schneller denaturiert.

Durch eine Auftragung von $\ln[k/T]$ gegen $1/T$ nach einer linearisierten Eyring-Gleichung [Gl. 6.35] können die Messdaten durch einen linearen Fit [Abb. 7.41] angepasst werden. Daraus werden die kinetischen Parameter ΔH^* und ΔS^* ermittelt. Die entsprechenden Parameter sind in Tabelle 7.5 wiedergegeben.

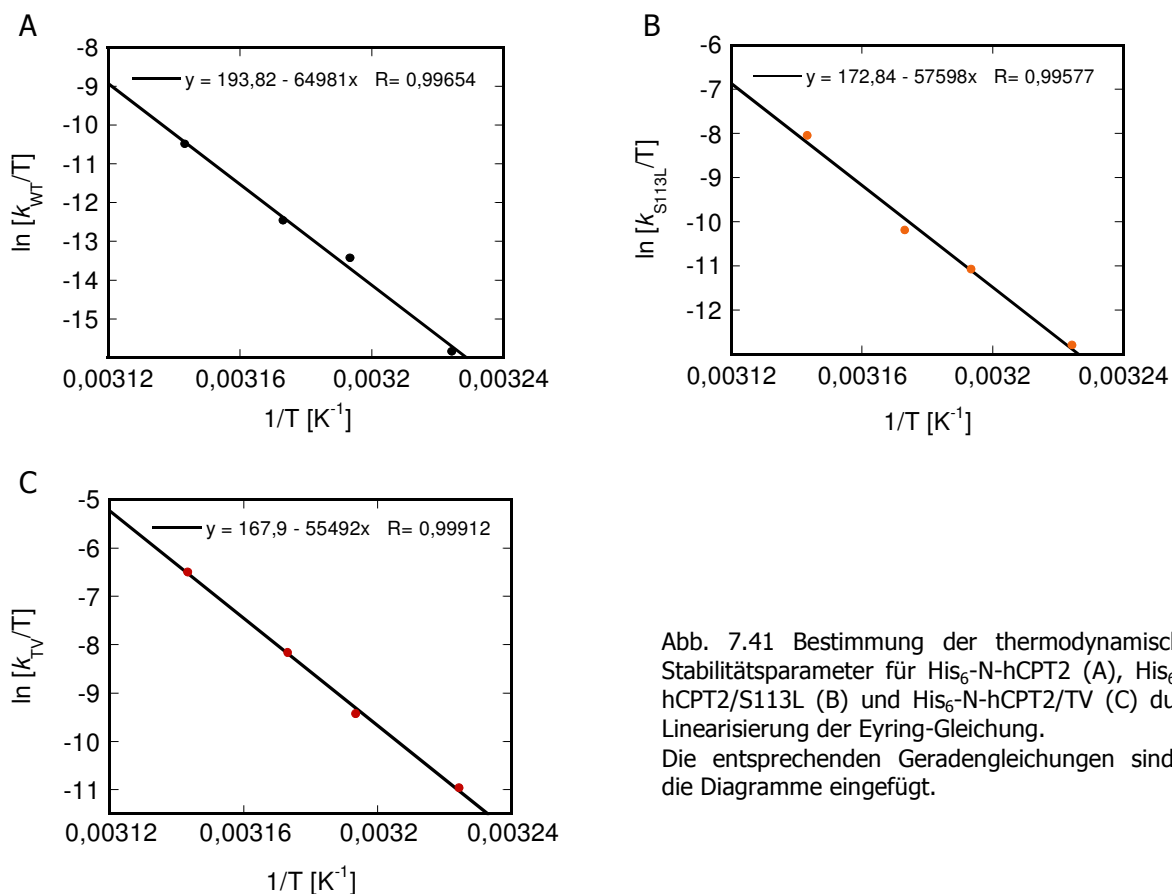


Abb. 7.41 Bestimmung der thermodynamischen Stabilitätsparameter für His₆-N-hCPT2 (A), His₆-N-hCPT2/S113L (B) und His₆-N-hCPT2/TV (C) durch Linearisierung der Eyring-Gleichung. Die entsprechenden Geradengleichungen sind in die Diagramme eingefügt.

Tab. 7.5 Zusammenfassung der ermittelten Stabilitätsparameter für His₆-N-hCPT2 und Varianten durch Auswertung nach Eyring.

Protein	ΔH^* [kJ/mol]	ΔS^* [J/K.mol]
WT	540,3	-1809,6
S113L	478,9	-1635,1
TV	461,4	-1594,0

Mit Hilfe der ermittelten Parameter ΔH^* und ΔS^* kann aus Gleichung 6.31 ΔG^* und daraus $\Delta\Delta G^*_{WT \rightarrow S113L}$ und $\Delta\Delta G^*_{WT \rightarrow TV}$ ermittelt werden. Die berechneten Parameter sind in Tabelle 7.6 zusammengefasst.

Vergleicht man die freie Aktivierungsenthalpie des Übergangszustands des Wildtyps bei 37 °C mit der der generierten Varianten, muss für die Überwindung der Energiebarriere der His₆-N-hCPT2/S113L, welche zur thermischen Inaktivierung durch Denaturierung des Proteins führt, ein um 115,5 kJ/mol verringerter Betrag an freier Aktivierungsenergie aufgebracht werden.

Tab. 7.6 Zusammenfassung der thermodynamischen Stabilitätsparameter ΔG^* und $\Delta\Delta G^*$ für die Betrachtung der Unterschiede zwischen Wildtypprotein und den Proteinvarianten.

T [°C]	ΔG^*_{WT} [kJ/mol]	ΔG^*_{S113L} [kJ/mol]	ΔG^*_{TV} [kJ/mol]	$\Delta\Delta G^*_{WT \rightarrow S113L}$ [kJ/mol]	$\Delta\Delta G^*_{WT \rightarrow TV}$ [kJ/mol]
45	1116,0	999,1	968,5	116,9	147,5
42	1110,6	994,2	963,7	116,4	146,8
40	1107,0	990,9	960,6	116,0	146,4
37	1101,5	986,0	955,8	115,5	145,8

Bei der His₆-N-hCPT2/TV beträgt die Verminderung von ΔG^* im Vergleich zum Wildtypenzym 145,8 kJ/mol. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der größte Anteil des destabilisierenden Effektes aus der Substitution der Aminosäure Serin gegen Leucin resultiert. Dennoch wird der aufzubringende Betrag an ΔG^* durch das additive Einführen der benignen Modifizierer zusätzlich um 30 kJ/mol reduziert [Tab. 7.6].

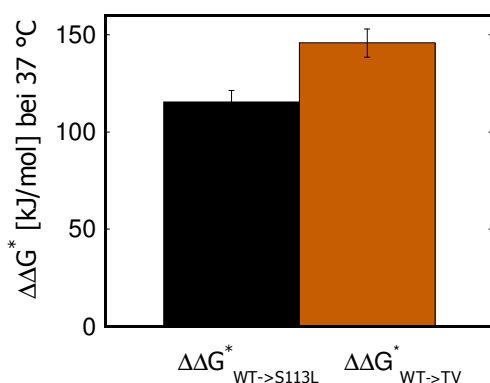


Abb. 7.42 Änderung der freien Aktivierungsenthalpie für His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV bezogen auf den Wildtyp bei 37 °C.

Um die Unterschiede von $\Delta\Delta G^*_{WT \rightarrow S113L}$ und $\Delta\Delta G^*_{WT \rightarrow TV}$ bei verschiedenen Temperaturen besser hervorzuheben, wurden die definierten Temperaturen gegen die Änderungen der freien Aktivierungsenthalpien von Wildtypenzym zu His₆-N-hCPT2/S113L und Wildtypenzym zu His₆-N-hCPT2/TV aufgetragen [Abb. 7.43]. Damit kann verdeutlicht werden, dass mit der Erhöhung der Temperatur der Schwellenwert der freien Aktivierungsenthalpie für die Denaturierung des Enzyms herabgesetzt wird. Somit führen die generierten Modifikationen im Enzym zu einer instabilen Gesamtmolekülstruktur. Mit zunehmender Anzahl der Perturbationen im Protein und steigender Temperatur wird die Stabilität des Enzymmoleküls nachweislich herabgesetzt.

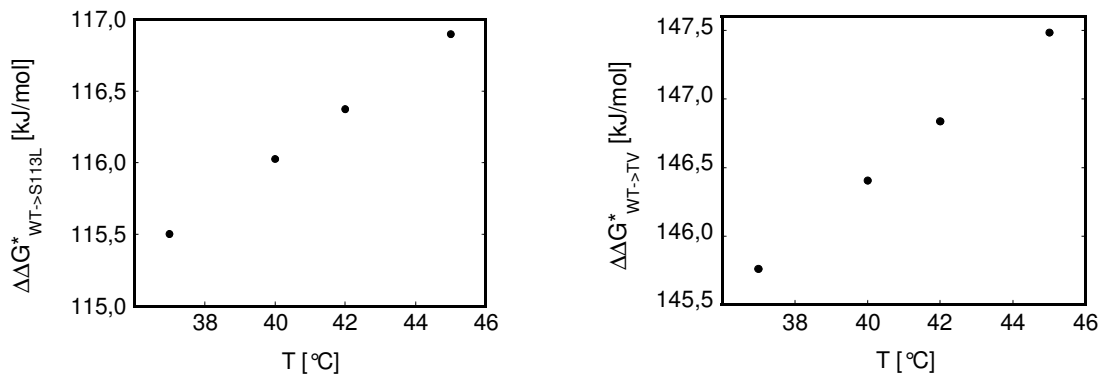


Abb. 7.43 Auftragung der Änderung der Differenzen der freien Aktivierungsenthalpien $\Delta\Delta G^*$ von Wildtypenzym zu His₆-hCPT2/S113L (*links*) und Wildtyp zu His₆-hCPT2/TV (*rechts*) gegen die Temperatur.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mit steigender Temperatur eine Verminderung der kinetischen Stabilität des Wildtypproteins erreicht wurde. Durch das Einführen der S113L-Punktmutation wurde eine Destabilisierung der Proteinstruktur erreicht. Dies äußerte sich vor allem in geringeren Halbwertszeiten bei allen gemessenen Temperaturen. Das additive Einführen der Polymorphismen V368I und M647V bedingt einen zusätzlichen Verlust an kinetischer Stabilität. Die Bestimmung der freien Energie ΔG^* des Wildtypproteins und der Varianten bestätigte eine Destabilisierung des Proteinmoleküls durch a) die Erhöhung der Temperatur und b) das Einbringen von Mutationen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den krankheitsauslösenden Faktoren der CPT2-Erkrankung. Dabei werden die Symptome der Fettsäureoxidationsstörung zum Beispiel durch fiebrige Infekte oder einer Ausdauerbelastung ausgelöst. Die steigende Körpertemperatur führt zu einer schnelleren Entfaltung der nativen Proteinstruktur, welche durch die Anwesenheit der prominenten S113L-Mutation bzw. der S113L-Mutation in Kombination mit den Polymorphismen V368I und M647V verstärkt wird. Unter sportlicher Dauerbelastung ist eine gesteigerte β -Oxidation die Folge. Da die für die β -Oxidation benötigten Fettsäuren nicht effektiv durch die Anwesenheit der Modifikationen im Protein in das Mitochondrium transportiert werden können, kann nicht ausreichend Energie generiert werden. Daraus resultieren Symptome, wie die Ausbildung einer Rhabdomyolyse.

Die Stabilitäten von verschiedenen Proteinvarianten *in vivo* [R631C, S113L, F383Y, E174K, F352C] wurden bislang durch Expression in diversen Systemen [COS-Zellen] untersucht. Die erhobenen Daten postulieren im Vergleich zum Wildtypprotein ein regulär synthetisiertes Protein mit einem reduziertem *steady state*-Niveau und einer verminderten Stabilität [Taroni *et al.*, 1992; 1993; Wataya *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2008]. Die strukturelle Instabilität aufgrund einer abnormalen Konformation des modifizierten Proteins [S113L, R631C, F383Y] in Folge der inkorrekten Faltung oder Assemblierung multimerer Proteine resultiert in einer schnelleren Degradation im Vergleich zum Wildtypenzym. Die modifizierten Enzymvarianten besitzen eine thermische Instabilität [Olpin *et al.*, 2003]. Dieser temperaturlabile Phänotyp besitzt eine verminderte katalytische Aktivität und einen unveränderten K_M .

Vergleich mit anderen Proteinvarianten

Die Variante E174K zeigt ein normales *steady-state*-Niveau, eine geringe Instabilität und offenbart eine gestörte Substratbindungsaffinität [Wataya *et al.*, 1998]. Die metabolischen und klinischen Konsequenzen der Erkrankung sind abhängig von der Restaktivität, wobei die CPT2 unter identischen Bedingungen im Aktivitätstest eine 50 bis 70fach höhere Aktivität zeigt als die CPT1 [Johnson *et al.*, 1995]. Die Geschwindigkeit der CPT2 ist daher nicht limitierend. Infolgedessen ist eine CPT2-Restaktivität von 20 % im Vergleich zum Wildtypenzym zur Aufrechterhaltung der β -Oxidation ausreichend. Die Ausprägung definierter Erkrankungen beeinflusst die CPT2-Restaktivität des modifizierten Proteins. Durch Infektionen hervorgerufenen Fieber induziert einen Fastenstatus durch inadäquate Ernährung und Erbrechen. Das in Folge dessen reduzierte Muskelglykogen und der erniedrigte Blutzucker führte zu einer gesteigerten Abhängigkeit vom Fettsäuremetabolismus, welcher von einer unzureichenden Ketonkörperbildung begleitet ist. Einsetzendes Zittern als Form gesteigerter Muskelaktivität verstärkt den Bedarf an Fettsäureoxidation, welche aufgrund der CPT2-Fehlfunktion nicht realisierbar ist [Bruno *et al.*, 2000]. Der Einfluss von Kälte spielt ebenfalls eine signifikante Rolle. Bei niedrigen Temperaturen steigt die Konzentration an Carnitin im Körper. Dadurch werden die Fettsäuredepots mobilisiert. Dies resultiert in einer steigenden Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma und dementsprechend einer erhöhten β -Oxidation [Therriault *et al.*, 1965; Donatello *et al.*, 1988].

Genetische Erkrankungen [Mukoviszidose, Phenylketonurie] bilden zwei Mutationskategorien aus, welche a) entweder das aktive Zentrum beeinflussen, mit einem normalen Gehalt an Protein und einer verminderten Aktivität, oder b) konformationelle Störungen ausbilden, verbunden mit einem verminderten Proteinniveau mit möglichen Konsequenzen hinsichtlich der Ausprägung des Phänotyps, die von Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition abhängig sind [Bross *et al.*, 1999]. Letztere Gruppe hat den proteolytischen Abbau von modifiziertem Protein zur Folge. Dieser folgt einem allgemeinen Pathomechanismus. Alle Polypeptide haben eine intrinsische Faltungsneigung, welche durch die Einführung von Mutationen beeinflusst ist. Diese Proteine benötigen eine längere Faltungszeit und sind daher länger in einer nichtfunktionellen Konformation exponiert. Beeinträchtigt gefaltetes oder ungefaltetes Protein steht in permanenter Interaktion mit molekularen Chaperonen [Hsp70, Hsp60 und Hsp10] und intrazellulären Proteasen. Ein ineffizientes Degradationssystem hat die Akkumulation von Proteinaggregaten zur Folge, welche die Zelle schädigen [Bross *et al.*, 1999]. Symptomatisch spiegelt sich dies bei der CPT2-Erkrankung in der Ausprägung einer Rhabdomyolyse wieder.

Die genauen Proteolysemechanismen der CPT2 werden kontrovers diskutiert. Die Proteine des Mitochondriums unterliegen einem kontinuierlichen *turnover*. Die äußeren Membranproteine tendieren zu einem schnelleren Abbau als die inneren Membranproteine [$T_{1/2}$ zwischen 70 min und 3,5-5 h] [Desautels *et al.*, 1982a]. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten lassen sich nicht durch einen unbestimmten Abbau der Organellen in den Lysosomen erklären. Auf der einen Seite lassen sich die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Proteolyse durch eine Proteinexkretion aus den Mitochondrien in das Cytoplasma oder in die Lysosomen erklären, andererseits können diese Organellen aufgrund Matrix-assoziierten proteolytischer Systeme selbstständig eine limitierte Degradation von kurzlebigen Proteinen durchführen. Die Tatsache der Existenz von Proteasen in Mitochondrien kann durch die Anwesenheit von Proteasen zur selektiven Entfernung von *precursor*-Peptiden bestätigt werden. Desautels *et al.* wiesen 1982a einen ATP-abhängigen, Vanadat-sensitiven Weg zur Proteolyse von mitochondrialen Proteinen nach. Im gleichen Jahr verifizierten sie die Anwesenheit einer Matrix-Endoprotease, welche bei basischem pH-Wert aktiv ist [Desautels

et al., 1982b] und unabhängig einer Abbaumarkierung durch Ubiquitin wirkt. Die Anwesenheit von AAA-Proteasen in den Mitochondrien wurde von Bross *et al.* (1999) debattiert und von den Arbeitsgruppen um Leonhard *et al.* [2000] und Langer *et al.* [2001] beschrieben. Ein in der Matrix lokalisiertes Enzym der β -Oxidation, die *short-chain*-AcylCoA-DH [SCAD], weist eine schnelle Degradation von mutierten Proteinuntereinheiten nach deren Import in die mitochondriale Matrix auf. Die verbleibende Restaktivität zeigt Stabilitäten vergleichbar mit dem Wildtypprotein. Es werden nur Faltungsintermediate abgebaut [Corydon *et al.*, 1998]. Die kinetisch stabilen SCAD-Tetramere stellen ein funktionelles Enzym dar. Bei sinkender Zelltemperatur nimmt der Anteil an fehlgebildetem Protein ab und der funktionale Anteil steigt. Dies deutet auf einen temperaturabhängigen Degradationsmechanismus in den Mitochondrien hin. Die Proteinvarianten werden in normalen Mengen synthetisiert und in das Mitochondrium transportiert. Die kinetische Stabilität wird durch die Bildung korrekt gefalteter Tetramere bedingt und ist von dem Wildtypprotein nicht unterscheidbar. Der Unterschied liegt in der mitochondrialen Degradation von partiell misgefalteten Untereinheiten. Die thermalen Stabilitätsprofile zwischen Wildtypenzym und Varianten zeigen keinen Unterschied in der thermalen Übergangstemperatur von 40 °C und belegen im Gegensatz zur CPT2 eine Resistenz der SCAD gegen thermische Inaktivierung [Corydon *et al.*, 1998]. Die Faltung und Assemblierung der *medium-chain*-AcylCoA-DH [MCAD], strukturell ähnlich der SCAD, wird vor allem durch Chaperone reguliert. Das kernkodierte Protein formt vor dem Transport in die Mitochondrien einen Intermediärkomplex mit Hsp70. Anschließend wird das Protein an Hsp60 übergeben, welches unter Assistenz des Ko-Chaperonins Hsp10 die Faltung, Prozessierung und Assemblierung hin zum Tetramer bewirkt. Sind die Monomerkonformationen inkorrekt oder instabil, durchläuft das Protein iterative Runden an den Chaperonen zur Realisierung des Faltungsprozesses. Die pathogene Mutation K304E der MCAD provoziert einen stabilen Hsp60-E304K-Komplex, wodurch die Assemblierung zum Tetramer gestört ist. Die extensive Verweildauer der nicht assemblierten Untereinheiten forciert in der Folge dessen proteolytische Degradation durch mitochondriale Proteasesysteme [Saijo *et al.*, 1994; Corydon *et al.*, 1998].

Yao *et al.* beschrieben 2008 ein an die Influenza-assoziierte-Enzephalopathie gekoppeltes Auftreten von CPT2-Störungen [F352C]. Die Proteine sind aufgrund des Fiebers thermolabil und zeigen geringe Halbwertszeiten [$T_{1/2WT} = 18$ h, $T_{1/2P504L} = 10,4$ h, $T_{1/2V605L} = 9,9$ h, $T_{1/2F352C,V368I,V605L} < 3$ h]. Die von Yao *et al.* (2008) ermittelten Halbwertszeiten für das Wildtypprotein sind bei gleicher Temperatur [37 °C] um Faktor 10 geringer, während die Halbwertszeiten der mono- bzw. multisubstituierten Varianten mit den in dieser Arbeit *in vitro* generierten Daten vergleichbar sind. Yao und Kollegen demonstrierten einen Abbau der thermolabilen Proteinspezies über den proteasomalen Weg mittels Polyubiquitylierung. Die Polyubiquitylierung ist ein schneller Prozess und konnte nur unter Anwendung eines Proteasominhibitors Laktacystin in einer Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden. Dies würde bedeuten, dass die CPT2 über einen retrograden Transport in das Cytosol befördert werden muss, um dort markiert und über den proteasomale Abbauweg proteolysiert werden zu können. Es stellt sich die Frage, ob dieser Abbauweg wirklich realistisch ist, da die Mitochondrien eigene Degradationssysteme aufweisen, welche zur Degradation der CPT2 in der Matrix beitragen können. Die CPT1 hingegen, welche in der äußeren Mitochondrienmembran integriert vorliegt aber ein Großteil der Peptidkette in Richtung Cytosol zeigt, ist für eine Abbaumarkierung mittels Ubiquitin erreichbar und kann einfacher dem proteasomalen Abbau unterzogen werden [Shi *et al.*, 1999].

7.3.6 Denaturierungsstudien mittels Circular dichroismus

Eine native Proteinkonformation ist, abgesehen von Fluktuationen, durch eine konkrete dreidimensionale Struktur definiert. Diese kann durch kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen, wie Disulfidbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen oder hydrophobe Interaktionen gefestigt werden.

Additiv dazu kann auch eine ideale Packungsdichte zu einer gesteigerten Stabilität führen. Diese benannten Wechselwirkungen werden durch denaturierende Einflüsse, wie Temperaturerhöhung, Denaturanzien oder Druckerhöhung partiell oder vollständig eliminiert. Der denaturierte Zustand ist eine Vielzahl an heterogener, flexibler, miteinander im Gleichgewicht stehenden konformationellen Zustände charakterisiert, welche, trotz der deutlich niedrigeren Anzahl an Wechselwirkungen im Vergleich zur nativen Konformation nur geringe Stabilitätsunterschiede zeigen. Dieser Umstand wird dadurch realisiert, dass die durch die Faltung generierten energetisch ungünstigen Wechselwirkungen durch energetisch günstige Wechselwirkungen kompensiert werden müssen.

7.3.6.1 Chemische Denaturierung

Die chemische Denaturierung des Wildtypproteins und der Varianten wurde mittels Harnstoff-Titrationsreihe in einem Bereich zwischen 0 M bis 8 M realisiert [Abb. 7.44]. Da zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter eine Reversibilität der Faltungsreaktion Voraussetzung ist, konnten diese an dieser Stelle nicht bestimmt werden, da die Entfaltung der His₆-N-hCPT2 nicht reversibel verläuft. Deshalb wurden lediglich die Übergangsmittelpunkte als Orientierungswerte für die Stabilitätsinterpretationen genutzt. Zur Auswertung wurden die Messpunkte bei einer Wellenlänge von 222 nm herangezogen. Diese wurden gegen die verwendeten Harnstoffkonzentrationen aufgetragen. Die Daten wurden nach Gleichung 6.15 gefittet. Der Vergleich der Übergangsmittelpunkte [$D_{1/2}$] dokumentiert eine Destabilisierung der Proteinstruktur mit zunehmender Anzahl an Modifikationen im Enzymmolekül [Abb. 7.44D]. Die isolierte Substitution der Aminosäure Serin 113 gegen Leucin trägt den größten Anteil zur Destabilisierung bei. Diese Resultate stehen in Übereinstimmung zu den Ergebnissen der kinetischen Stabilisierungsstudien.

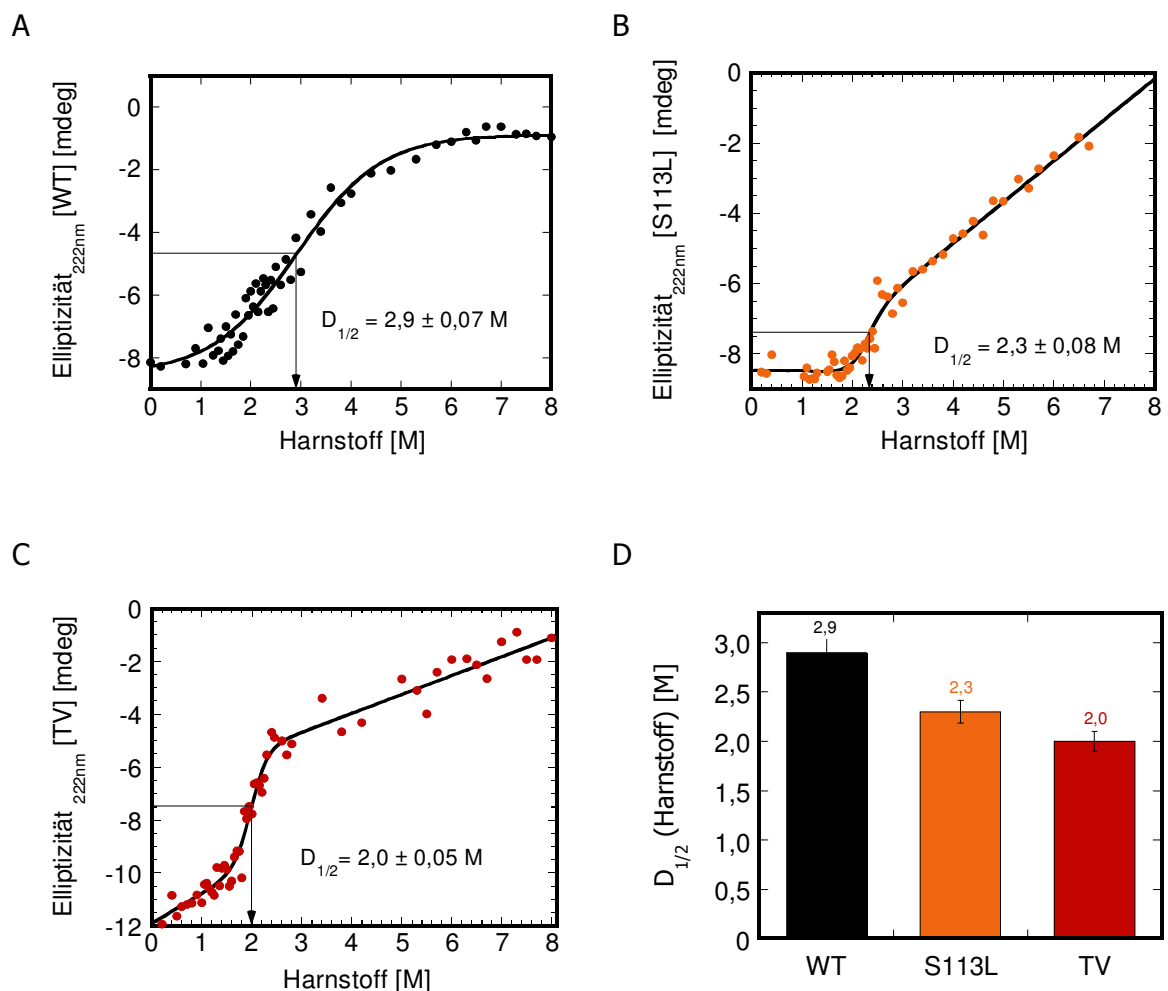


Abb. 7.44 Transitionskurven einer chemischen Denaturierung mittels Harnstoff für das Wildtypprotein (A) und die Varianten S113L (B) und TV (C). Die ermittelten Übergangsmittelpunkte sind in die Graphen eingefügt. Experimentelle Bedingungen und Auswertung sind unter Kapitel 6.6.3 zu finden. Abbildung (D) gibt die $D_{1/2}$ -Resultate graphisch wieder.

7.3.6.2 Thermische Denaturierung

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden thermische Denaturierungskurven am Beispiel des Wildtypenzym mit einem Temperaturgradient von 1 grd pro min und $\frac{1}{6}$ grd pro min aufgenommen. Ziel war es, auftretende Effekte unterschiedlicher Heizgeschwindigkeit zu detektieren [Denaturierungskurven im Anhang Abb. 10.21]. Dabei wird ersichtlich, dass ein flacher Temperaturgradient mit einer experimentellen Gesamtdauer von 9 h zu einer um 3,5 grd niedrigeren Temperatur am Transitionsmittelpunkt [$T_{1/2}$] führte im Vergleich zur Aufnahme von Transitionskurven mit einer Heizgeschwindigkeit von 1 grd pro min und mit einer experimentellen Gesamtdauer von 1,5 h führte. Die längere Temperaturexposition von 9 h führte zu einer schnelleren Entfaltung des Proteins. Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten, wurden fortan alle thermischen Denaturierungen mit einer Heizrate von 1 grd pro min durchgeführt.

Die ausgewerteten Transitionskurven der Proteine [Abb. 7.45] zeigen Übergangsmittelpunkte, welche mit zunehmender Anzahl an Perturbationen im Enzymmolekül sinken. Der größte Betrag von circa 5 grd wird durch die Variante His₆-N-hCPT2/S113L verursacht. Die Variante His₆-N-hCPT2/TV bewirkt additiv eine Verminderung des Temperaturübergangsmittelpunkts um 2 grd. Diese Beobachtung verhält sich analog der Untersuchungen der chemischen Denaturierung mittels Harnstoff und der Bestimmung der kinetischen Stabilitätsparameter im DTNB-Aktivitätstest.

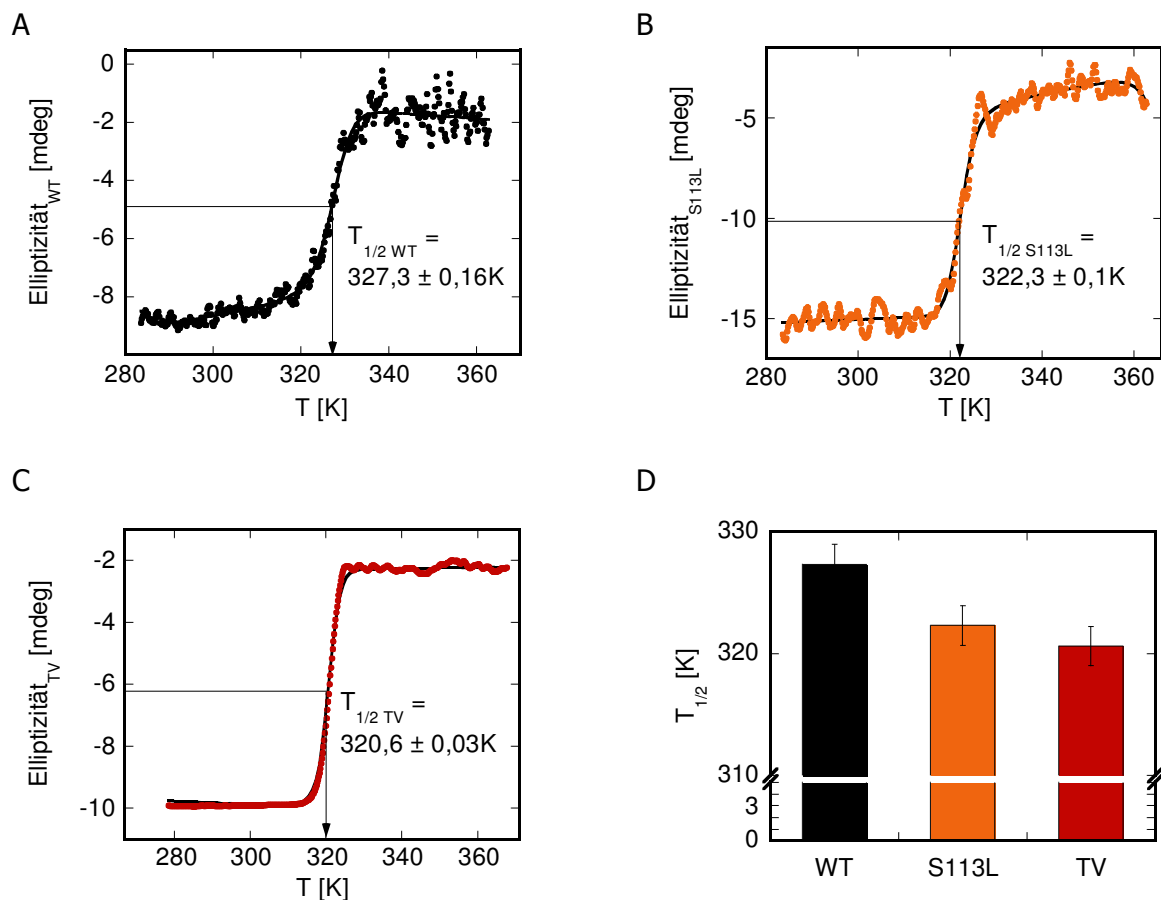


Abb. 7.45 Denaturierungskurven einer thermischen Denaturierung des Wildtypproteins (A) und der Varianten S113L (B) und TV (C). Experimentelle Bedingungen und Auswertung sind unter Kapitel 6.6.2 zu finden. Abbildung (D) gibt die $T_{1/2}$ -Resultate graphisch wieder.

Einfluss des Substrats PCoA auf die thermische Stabilität

Rufer *et al.* führten 2007 fluoreszenzbasierte Messungen des Temperaturübergangs mit rekombinant gereinigter CPT2 aus Ratte durch. Das Rattenprotein zeigte einen Übergangsmittelpunkt von 320,75 K. Der Schmelzpunkt mittel CD-generierter Daten der rCPT2 betrug 320,15 K. Die Temperatur des Übergangsmittelpunkts ist in Anwesenheit der Komponente 16 [(S)-N-Palmitoylaminocarnitin] erhöht und stabilisierte die rCPT2. Ein dreifach molarer Überschuss der Komponente 16 steigerte den Schmelzpunkt um 10 grad. Dieser ausgeprägte Effekt auf die Stabilität resultierte aus den verbesserten Wechselwirkungen zwischen N- und C-terminaler Domäne durch Anwesenheit der Komponente 16. Auch die Bindung der hydrophoben Acylkette in der Domänengrenzfläche stabilisierte das native Protein.

Das rekombinant gereinigte humane Protein dieser Arbeit zeigt im Vergleich dazu einen Übergangsmittelpunkt von 327,3 K. Der Zusatz von 30 μM PCoA führte lediglich zu einer minimalen Stabilisierung des nativen Wildtypenzym um 1 grad [Abb. 7.46]. Die Varianten verhalten sich analog zum Wildtypprotein. Höchstwahrscheinlich sind diese Unterschiede zu Rufer *et al.* (2007) durch den Einsatz verschiedener Puffersysteme erklärbar. Rufer *et al.* setzten ein Tris-basiertes Puffersystem ein. Tris ist eine zwitterionische Substanz, die im Vergleich zu Phosphatpuffer-basierten Systemen eine niedrigere Thermostabilität aufweist und zu einer Änderung des pH-Werts bei Temperaturänderung führt. Aufgrund der vergleichbaren Eigenschaften von Tris zu dem natürlichen Substrat L-Carnitin ist ein positiver Effekt auf die Stabilisierung des Proteins durch das Puffersystem nicht auszuschließen und wird durch zusätzliche Additiva, wie das Substrat PCoA, noch verstärkt. Es wird postuliert, dass das Phosphat-basierte System aufgrund der geringen Sekundäreffekte auf die thermische Denaturierung die realistischeren Resultate wiedergibt.

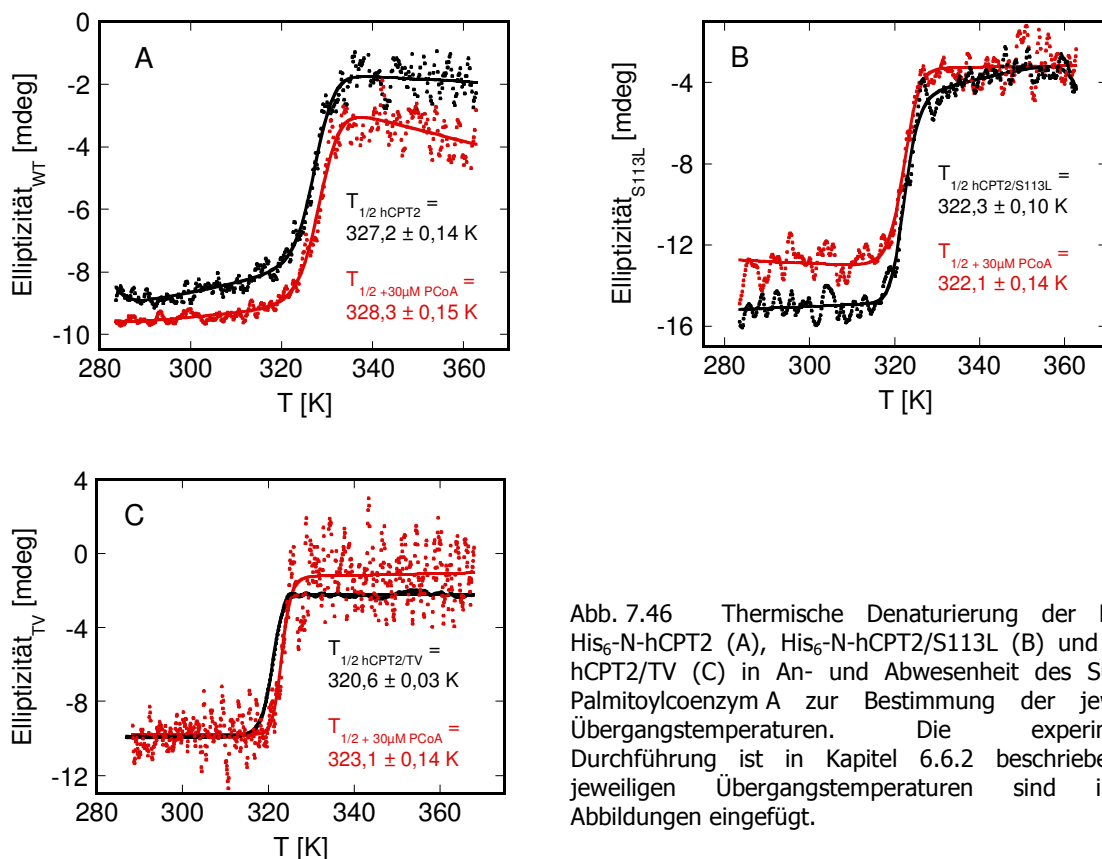


Abb. 7.46 Thermische Denaturierung der Proteine His₆-N-hCPT2 (A), His₆-N-hCPT2/S113L (B) und His₆-N-hCPT2/TV (C) in An- und Abwesenheit des Substrats Palmitoylcoenzym A zur Bestimmung der jeweiligen Übergangstemperaturen. Die experimentelle Durchführung ist in Kapitel 6.6.2 beschrieben. Die jeweiligen Übergangstemperaturen sind in die Abbildungen eingefügt.

7.3.7 Inhibitorstudien

7.3.7.1 Malonylcoenzym A

MalCoA ist der Thioester der Malonsäure mit CoA. Es wird durch die Carboxylierung von aktivierter Essigsäure durch die Acetylcoenzym A-Carboxylase [ACC] gebildet. Die prosthetische Gruppe des Enzyms stellt Biotin dar, welche über eine Amidbindung zwischen der terminalen Carboxylgruppe der Biotinseitenkette und der ϵ -Aminogruppe des Lysinrests im Enzym gebunden ist. Der dadurch generierte lange „flexible Arm“ erlaubt die ATP-abhängige Carboxylierung von Biotin im aktiven Zentrum und dem folgenden Transfer der Carboxylgruppe zu Acetylcoenzym A am zweiten aktiven Zentrum. MalCoA ist ein hochreguliertes Molekül des Fettsäuremetabolismus und stellt eine Vorstufe der Entstehung von Fettsäuren dar. Das „Schrittmacherenzym“ ACC wird sowohl durch Phosphorylierung, allosterisch durch lokale Metaboliten [Citrat = aktivierend, PCoA = inaktivierend] als auch durch Hormone reguliert [Abb. 1.1]. Somit unterliegt auch die β -Oxidation dieser Kontrolle. Die mittels Albumin im Blut transportierten freien Fettsäuren müssen vor dem oxidativen Abbau an CoA gebunden und über das Carnitin-*carrier*-Systems aus dem Cytosol in die mitochondriale Matrix transportiert werden [Abb. 1.2]. Da die Bildung von MalCoA im Cytosol abläuft und von der CPT1, welche integriert in die äußere Mitochondrienmembran, eine N-terminale MalCoA-Bindedomäne aufweist und größere C-terminale hydrophile Bereiche [Ramsay, 2001] ins Cytosol hineinragen, wird dieses Enzym durch MalCoA reguliert. Eine Verminderung der MalCoA-Konzentration im Cytosol führt zu einer erhöhten Aktivität der CPT1 und resultiert in einer gesteigerten β -Oxidation. Die dabei produzierten Acetylcoenzym A-Moleküle gelangen in den Krebs-Zyklus mit einer damit einhergehenden ATP-Produktion. Da die CPT2 in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, wird vermutet, dass diese keinen Hemmeffekt bezüglich des MalCoA aufweist.

Die *in vitro*-Bestimmung der MalCoA-Hemmbarkeit von rekombinanter His₆-N-hCPT2 und Varianten erfolgte wie unter Kapitel 6.8.1.4 beschrieben. Sowohl der Wildtyp als auch die generierten Varianten prägen keine MalCoA-Hemmbarkeit aus [Abb. 7.47]. Dies ist in Analogie zur Literatur [McGarry *et al.*, 1978a, 1980, 1997; Murthy *et al.*, 1987; Woeltje *et al.*, 1987, 1990a,b; Zierz *et al.*, 1987; Ramsay *et al.*, 1988; Finocchiaro *et al.*, 1991; Vladutiu *et al.*, 1992; Taroni *et al.*, 1992; Nic A Bhaird *et al.*, 1993, 1998; Johnson *et al.*, 1995; Hudson *et al.*, 1995; deVries *et al.*, 1997; Schäfer *et al.*, 1997; Kerner *et al.*, 1998, 2000; Ventura *et al.*, 1998; Bonnefont *et al.*, 1999, 2004; Woldegiorgis *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002; Sigauke *et al.*, 2003; Rufer *et al.*, 2006].

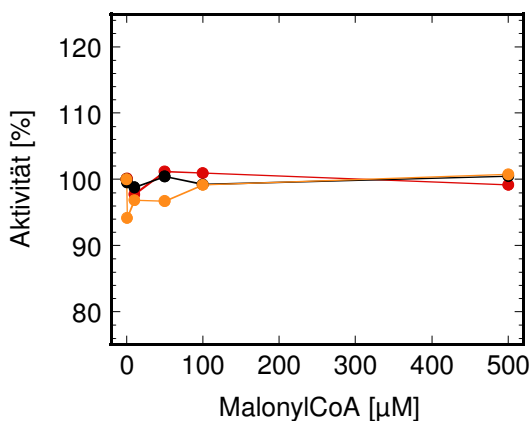


Abb. 7.47 Bestimmung der Restaktivität im DTNB-Test der Proteine His₆-N-hCPT2 [schwarz], His₆-N-hCPT2/S113L [orange] und His₆-N-hCPT2/TV [dunkelrot] auf Hemmbarkeit durch MalCoA. Die experimentelle Durchführung ist in Kapitel 6.8.1.4 zu finden.

7.3.7.2 L-Aminocarnitin

Die β -Oxidation ist einer der wichtigsten Stoffwechselwege zur Generation von Reduktionsäquivalenten in Folge dessen ATP über die Atmungskette produziert werden kann. Viele Erkrankungen basieren auf einer Störung der Fettsäureoxidation. Ein Beispiel ist die Jamaika-Brechkrankheit, welche, verursacht durch das Toxin Hypoglycin aus der mit der Litschi verwandten Akee-Frucht (*Blighia sapida*) stammend, die β -Oxidation an Position der Butyrylcoenzym A-Dehydrogenase durch die Bildung des Inhibitor-metabolits Methylencyclopropylacetylcoenzym A inhibiert [Bressler *et al.*, 1969; Schulz *et al.*, 1987]. Das Carnitin-carrier-System wird vor allem an Stelle der CPT1 blockiert. 2-Tetradecylglycidylcoenzym A (Oxiran-Carboxylat-Einheit) und 2-Brompalmitoylcoenzym A sind Carbonsäuren mit reaktiven bzw. potentiell reaktiven funktionellen Gruppen. Diese werden in ihre CoA-Ester konvertiert und binden irreversibel im aktiven Zentrum des Targetenzym. Da diese Substanzen keine Spezifität hinsichtlich Muskel- und Leber-Typ der CPT1 aufweisen und zusätzlich die Nebenwirkung einer kardialen Myopathie ausprägen, wurden diese Substanzen nicht weiter erforscht [Gianessi *et al.*, 2001]. Ziel einiger Inhibitorstudien der Fettsäureoxidation waren sowohl die Entwicklung potentieller hypoglykämischer Medikamente als auch die Generation von Werkzeugen zur Erforschung der Regulation der Fettsäureoxidation [Schulz *et al.*, 1987].

Die Messung der Hemmbarkeit der His₆-N-hCPT2 und Varianten durch L-AC erfolgte wie unter Kapitel 6.8.1.4 beschrieben. Die Inhibitor-konstante K_I wurde mittels Dixon-Plot der L-AC Konzentration gegen die reziproke Geschwindigkeit v aus dem Schnittpunkt der Geraden ermittelt. Der Dixon-Plot des Wildtypenzym ist exemplarisch in Abb. 7.48 dargestellt. Alle weiteren Plots sind im Anhang in Abb. 10.22 zu finden. Der Wildtyp realisiert einen K_I -Wert von 4,45 μ M, die Variante His₆-N-hCPT2/S113L zeigt einen K_I von 0,58 μ M und der Haplotyp His₆-N-hCPT2/TV besitzt einen K_I -Wert von 1,11 μ M. Die K_I -Werte des Wildtypproteins und der Varianten liegen in einer Größenordnung und werden durch das Einführen von Mutationen im *cpt2*-Gen nicht verändert.

Aus dem Dixon-Plot konnte der Hemmtyp eines kompetitiven Inhibitors für L-AC für alle Proteinvarianten ermittelt werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem von Trauffer *et al.* (2004) bestimmten Inhibortyp eines partiell kompetitiven Inhibitors. Ursächlich für

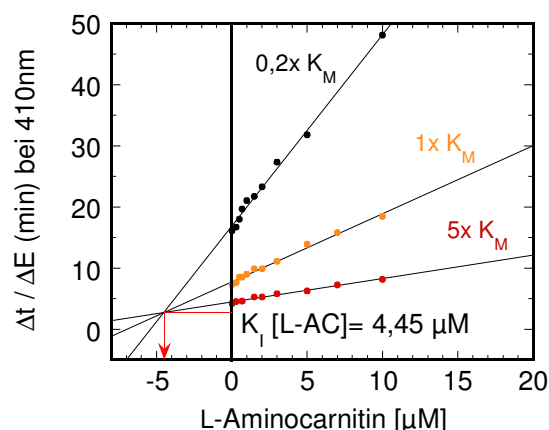


Abb. 7.48 Dixon-Auftragung des Proteins His₆-N-hCPT2 für den kompetitiven Inhibitor L-AC in Gegenwart verschiedener PCoA-Konzentrationen zur Bestimmung der Inhibitor-konstante K_I für L-Aminocarnitin. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.4 beschrieben. Die Diagramme der Varianten befinden sich im Anhang.

diese divergierenden Ergebnisse ist vermutlich die Anwendung unterschiedlicher Aktivitätstests für die Bestimmung des Inhibitortyps und das Einsetzen verschiedener präparierter Enzymspezies. Das von Trauffer und Kollegen genutzte Muskel-Homogenat enthält unter anderem andere Transferasen [CPT1, CPT2, COT, CAT], welche den Aktivitätstest beeinflussen können und die Spezifität des Systems herabsetzen. Das benutzte Detektionssystem beschreibt eine Gleichgewichtsreaktion der Enzyme CPT1 und 2. Die isolierten CPT-Spezies sind mit diesem System nicht präzise zu bestimmen.

Der in dieser Arbeit verwendete Aktivitätstest basiert auf keiner Gleichgewichtsreaktion und wird mit einem rekombinant gereinigten His₆-N-hCPT2-Protein durchgeführt, was für ein spezifisches Resultat in Bezug auf mechanistische Aussagen von Vorteil ist.

Emericedin [L-Acetylaminoarnitin] ist ein Metabolit aus dem Pilz *Emericella quadrilineata* und wurde 1985 von den Arbeitsgruppen Kanamaru *et al.* und Jenkins *et al.* beschrieben. Das L-Aminocarnitin [L-AC] oder das Emeriamin [Abb. 7.49], ein β -Aminobetain, wurde aus Emericedin gewonnen, ist löslich in Wasser und eine zwitterionische extrem hygroskopische Base. Die pK_a -Werte der Carboxylatgruppe bzw. der primären Aminofunktion des L-AC betragen 2,84 und 6,37. Im Vergleich dazu besitzt die Carboxylatfunktion des Acetyl-L-AC einen pK_a -Wert von 3,77. Die Carboxylatgruppe der natürlichen Substrate L-Carnitin und L-Acetylcarnitin zeigen einen nahezu identischen pK_a -Wert von 3,76 bzw. 3,53.

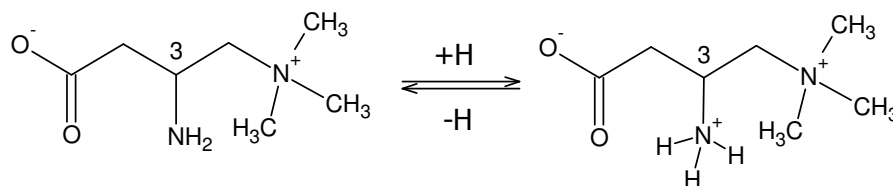


Abb. 7.49 Gleichgewicht von L-Aminocarnitin und der 3-protonierten Ammoniumform.

Aminocarnitine besitzen ein niedriges Gruppenübertragungspotential von der Amidgruppe auf den Akzeptor CoA. Im Vergleich zu Acylcarnitinen sollten Acylaminocarnitine thermodynamisch und metabolisch so stabil sein, dass diese nicht in der Lage sind, Acylgruppen zu übertragen. Der Transfer einer Acetylgruppe von CoA auf L-Aminocarnitin ist nicht realisierbar. Somit stellt diese Stoffklasse sowohl ein Enzym- als auch Transportinhibitor dar [Jenkins *et al.*, 1985].

L-AC wurde als starker spezifischer Inhibitor der β -Oxidation langkettiger Fettsäuren, hauptsächlich der CPT1 identifiziert, wobei sich die Interpretation von Kanamaru *et al.* (1985) hinsichtlich der Lokalisation von CPT1 an der äußeren Oberfläche der inneren Membran, in den folgenden Jahren als inkorrekt herausstellte.

L-AC ist ein nichtkovalenter Inhibitor. Die Hemmung ist durch Verdünnung reversibel. L-AC stellt ein unzureichend gebundenes Substrat und einen kompetitiven Inhibitor für CPT1, CPT2, CAT und CACT dar [Jenkins *et al.*, 1985; 1986]. Interessanterweise sind Thiocarnitin und seine acylierten Derivate keine Inhibitoren, sondern beschreiben Substrate, zum Beispiel für CAT, die mit identischen Affinitäten im Vergleich zu den natürlichen Substraten gebunden werden. Die hohen K_M - und K_I -Werte von L-AC lassen sich nicht durch sterische Faktoren erklären. Die Aminogruppe ist nur marginal größer als die natürlich vorkommende Hydroxylgruppe, aber deutlich kleiner als eine Sulfhydrylgruppe des Thiocarnitins. Amino- und Hydroxylgruppe zeigen unterschiedliche Möglichkeiten zur Ausbildung von

Wasserstoffbrücken, wobei die Bindungen eventuell essentiell für die Substratbindung sind. Durch Substitution der funktionellen Gruppe am β -C-Atom vom Carnitin kann es zur inkorrekten Ausprägung von Wasserstoffbrückenbindungen zur aktiven Base [Histidin 372 bei CPT2] kommen [Abb. 7.24]. Die schwache Bindung und die langsame enzymatische Reaktion von L-AC ist nicht einer Protonierung der 3-Aminogruppe zuzuschreiben, da die angrenzende Trimethylammoniumfunktion einen sehr kleinen pK_a -Wert von 6,37 der Aminogruppen bei pH 7,6 aufweist. Unter diesen Bedingungen liegen weniger als 6 % des Analogons in ihrer 3-protonierten Ammoniumform [Abb. 7.49] vor [Jenkins *et al.*, 1985].

DL-AC hemmt CPT1+2 in Mitochondrien bei einer Konzentration von 500 μ M zu 98 %. Traufeller *et al.* (2004) und Chegary *et al.* (2008) stellten eine präferierte Hemmbarkeit der CPT2 im Vergleich zu anderen Acylcarnitintransferasen und CACT fest. Der Inhibitionstyp wird als gemischt partielle Inhibierung in Bezug auf L-Carnitin identifiziert [Traufeller *et al.*, 2004].

Emericedin zeigt eine konzentrationsabhängige antiglykämische und antiketogene Aktivität. Im Vergleich zu dessen acetyliertem Derivat ist es toxisch, führt zu extensiven peritonealen Blutungen, welche aufgrund der Zerstörung der Gefäße durch den Detergenseffekt des Inhibitors bedingt sind. Weitere Symptome sind Lethargie, Hypothermie und verminderte Nahrungsaufnahme [Jenkins *et al.*, 1986].

Die Acylderivate von L-AC stellen effektivere Inhibitoren dar. Die längeren Alkylgruppen induzieren eine stärkere inhibitorische Kapazität und hemmen CPT1+2 in Mitochondrien bei einer Konzentration von 5-50 μ M zu 99-100 %, schützen vor Ketoazidose und entwickeln einen hypoglykämischen Effekt [Jenkins *et al.*, 1986]. Weitere Inhibitorstudien mit potenteren, selektiveren Emericedin-Analoga wie [(R)-N-(tetradecylcarbamoyl)-aminocarnitin [ST1326] und [(R)-N-(dodecylsulfonamoyl)-aminocarnitin [Komponente 27] wurden von Shinagawa *et al.* (1987), Gianessi *et al.* (2001,2003) und Rufer *et al.* (2006) durchgeführt.

7.3.8 *MicroArray* & *real time* -PCR Analyse

Die primäre Ursache der CPT2-Erkrankung basiert auf verschiedenen Mutationen im *cpt2*-Gen, welche zu einer Reduktion der spezifischen Aktivität oder einer Verminderung der Stabilität des Proteins führen. Obwohl in den letzten Jahren über 70 genetische Modifikationen des *cpt2*-Gens nachgewiesen wurden und sowohl das klinische als auch histologische Bild der Erkrankung bereits bekannt waren, sind die molekularen Interaktionen nach wie vor unbekannt. Um die Details pathogener Stoffwechselwege und die Beteiligung modifizierender Faktoren als Ursache der CPT2-Erkrankung zu untersuchen, wurden durch die Anwendung eines Expressions-*MicroArrays* Profile für Skelettmuskel-Biopsien vergleichend von CPT2-Mangel-Patienten und gesunden Kontrollen erstellt. In dieser Arbeit wurde eine vergleichende Expressionsanalyse von 30000 Genen auf einem Affymetrix HumanGene 1.0 st-v1-Chip durchgeführt. Die individuellen Expressionsprofile wurden von 3 CPT2-Mangel-Patienten und 3 gesunden Kontrollen erstellt. In Tabelle 10.5 im Anhang ist die Rangfolge der 100 als differentiell identifizierten Genkandidaten inklusive der statistischen Fakten (*fold change*, t-Wert, p-Wert, Benjamini-Hochberg-Korrektur und Bonferoni-Korrektur) wiedergegeben. Die Analyse identifizierte 93 bekannte und 7 nicht beschriebene Gene, welche sich signifikant in ihrem Expressionsniveau zwischen gesundem und pathogenem Muskel unterscheiden.

Statistische Auswertung

Für die konventionelle statistische Aufbereitung großer Datenmengen, wie dem *MicroArray*, werden in der Regel traditionelle Testmethoden angewandt, um Signifikanzen zu spezifizieren. Der klassische t-Test ist hierfür jedoch nicht geeignet. Eine Verbesserung dieses Tests stellt der *shrinkage* t-Test [Opge-Rhein & Strimmer *et al.*, 2007] dar, welcher Fragestellungen mit wenigen Wiederholungen einer Messgruppe toleriert. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der ein definierter Wert durch Zufall erreicht werden kann und spiegelt die Signifikanz der zu interpretierenden Daten wieder. Dieser Wert ist *per se* nicht übereinstimmend mit der experimentellen Wahrheit. Durch ein multiples Testen ist eine Bonferoni- bzw. Benjamini-Hochberg-Korrektur nötig, wobei letztere sich als deutlich sensitiver erweist.

Die Auswertung der vorliegenden Datensätze erfolgte durch eine iterative Verfahrensweise mit experimenteller Validierung *via real time* -PCR von jeweils 10 Genen [Expressionsniveau], da das zur Verfügung stehende humane Untersuchungsmaterial für eine Bestimmung von circa 40 Genen limitiert war. Die mittels *MicroArray* generierten Daten wurden durch verschiedene Normierungsverfahren und dazu alternierender Rankingverfahren ausgewertet [Abb. 10.23], wobei der Einfluß auf die resultierende Validierung der Daten sowohl vom Organismus bzw. des Systems als auch von der zu untersuchenden Fragestellung abhängig ist. Dabei erwiesen sich sowohl das Normierungsverfahren PLM mit dem *ranking*-Verfahren *fold change*, als auch das Normierungsverfahren RMA in Kombination mit dem *ranking*-Verfahren *fold change* als gleichermaßen praktikabel, wobei die erste Kombination in dieser Fragestellung zur Anwendung kam. Das Normierungsverfahren PLM definiert die Intensität der *perfect matches*. Der *fold change* gibt die Veränderung des Genstatus im Vergleich zur Kontrollgruppe wieder und wurde ab einer Veränderung von ± 1 als differentiell gewertet. Nach Beendigung des letzten Validierungslaufs erwies sich die Auftragung der differentiellen Gene gegen alle Genkandidaten als konsistent. Die Vorhersage differentieller Genkandidaten

ist inkrementell hinsichtlich der durchgeführten Validierung, wobei 90 % der prognostizierten Genkandidaten bestätigt werden konnten. Das vorhandene Rauschen der Rohexpressionsdaten ist für das Auftreten falschpositiver Genkandidaten ursächlich.

Durch das in dieser Arbeit gewählte iterative Verfahren in Kombination mit experimenteller Validierung wird jedoch den klassischen Signifikanztests weniger Bedeutung beigemessen.

Die ersten 10 der als differentiell eingestuften Kandidatengene eines jeden Validierungslaufs wurden unmittelbar mittels quantitativer *real time*-PCR verifiziert bzw. falsifiziert. Somit beschreibt dieses inkrementelle Vorgehen eine kontinuierliche Annäherung an den realen Zustand der Genexpression in der humanen Muskulatur. Unter der Voraussetzung, mehr Daten mittels iterativem Verfahren in Kombination mit experimenteller Validierung generieren zu können, wäre auch eine Auftragung der differentiellen Gene gegen die Kontrollgene aussagekräftig gewesen. Es wurden insgesamt 36 Expressionsniveaus mittels *real time*-PCR untersucht.

Auswertung

Nachfolgend wird die Vorstellung und Diskussion der veränderten Genkandidaten auf hochsignifikante Gene, Genfamilien oder Gene, involviert in spezifische Stoffwechselwege beschränkt. Die Änderung der Expressionsniveaus aller mittels *real time*-PCR validierter Genkandidaten ist in Abbildung 7.50 dargestellt. Dieses Experiment erweitert die Sicht auf die molekularen Wege, welche bei einem CPT2-Mangel alternieren. Die Familie der Homöobox-Gene *hoxc* 10, 9, 8 und 6 scheint wesentlich in den Krankheitsprozess involviert zu sein, da deren Genstatus im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht sind. Diese Gene kodieren für eine konservierte Familie von Transkriptionsfaktoren, welche eine essentielle Funktion in der Morphogenese von allen mehrzelligen Organismen besitzen [Stanchina *et al.*, 2000]. Godwin & Capecchi (1998) postulierten einen regulatorischen Einfluss der HOX-Proteine auf die strukturelle Proteinbiosynthese und einen potentiellen Einfluss auf den mitotischen Verlauf. Homöoproteine könnten eine Verbindung zwischen der Regulation der Entwicklung und der Zellzyklus-Kontrolle darstellen [Gabellini *et al.*, 2003]. Der Verlauf des eukaryotischen Zellzyklus ist hochreguliert. Dies wird durch eine Reihe von Schlüsselereignissen gewährleistet, wodurch die exakte Transmission des Genoms sichergestellt wird. Die Abfolge des Zellzyklus unterliegt einer irreversiblen Direktionalität aufgrund des proteolytischen Abbaus regulatorischer Proteine mittels Ubiquitin-Proteasom-Weg. Die Hypothese des strukturellen Einflusses auf die Proteinbiosynthese in Kombination mit der irreversiblen Richtung des Zellzyklus durch die Aktivität von Proteasen könnte in Verbindung mit der signifikanten Erhöhung des Genexpressionsniveaus der *hox*-Gene [Abb. 7.50] aufgrund der genetischen Veränderung des *cpt2*-Gens in der Skelettmuskulatur stehen. Eine Untersuchung der Duchenne-Muskelerkrankung mittels *MicroArray*-Technik von Haslett *et al.* (2003) beschreibt eine, im Gegensatz zur vorliegenden Analyse, differentielle Verminderung des *hoxc10*-Gens [NCBI GEO Set Browser DataSet Record GDS609] der pathogenen Muskelproben im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterführende Untersuchungen zur Erweiterung des Kenntnisstands hinsichtlich der Funktion der Genfamilie auf den Krankheitsprozess des CPT2-Mangels sind von Vorteil.

Das deubiquitynlierende Enzym OTUD1 ist eine Protease, welche spezifisch Ubiquitinbindungen spaltet und die Aktivität von Ubiquitin-Ligasen negiert. Das Expressionsniveau dieses Proteins ist bei Muskelproben mit CPT2-Mangel im Vergleich zur Kontrollgruppe um Faktor 8,2 in Bezug auf das Kontrollprotein GAPDH erhöht. Dieses Resultat steht im Einklang mit der Überexpression an HOXC-Proteinen, deren Aktivität stark

durch Ubiquitinylierung kontrolliert wird. Durch das Protein OTUD1 kann der Kontrollmechanismus ein wenig gelockert werden, indem die Markierung zum Abbau mittels Ubiquitin reversibel gemacht wird und die Wirkweise der HOXC-Proteine unterstützt werden kann.

Der Fettsäuretransporter, wie das FABP5, kann durch die Aktivität von PPAR reguliert werden. Die induzierte Peroxisomen-Proliferation ist eine Antwort auf definierte Impulse [Abb. 1.9]. Somit kann eine Steuerung des Nährstoffbedarfs, eine Regulation des Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus erreicht werden. FABP5 ist mittels *MicroArray*-Technik als differentiell nachgewiesen worden. Auch in diesem Fall konnte der differentielle Status mittels *real time*-PCR nicht verifiziert werden.

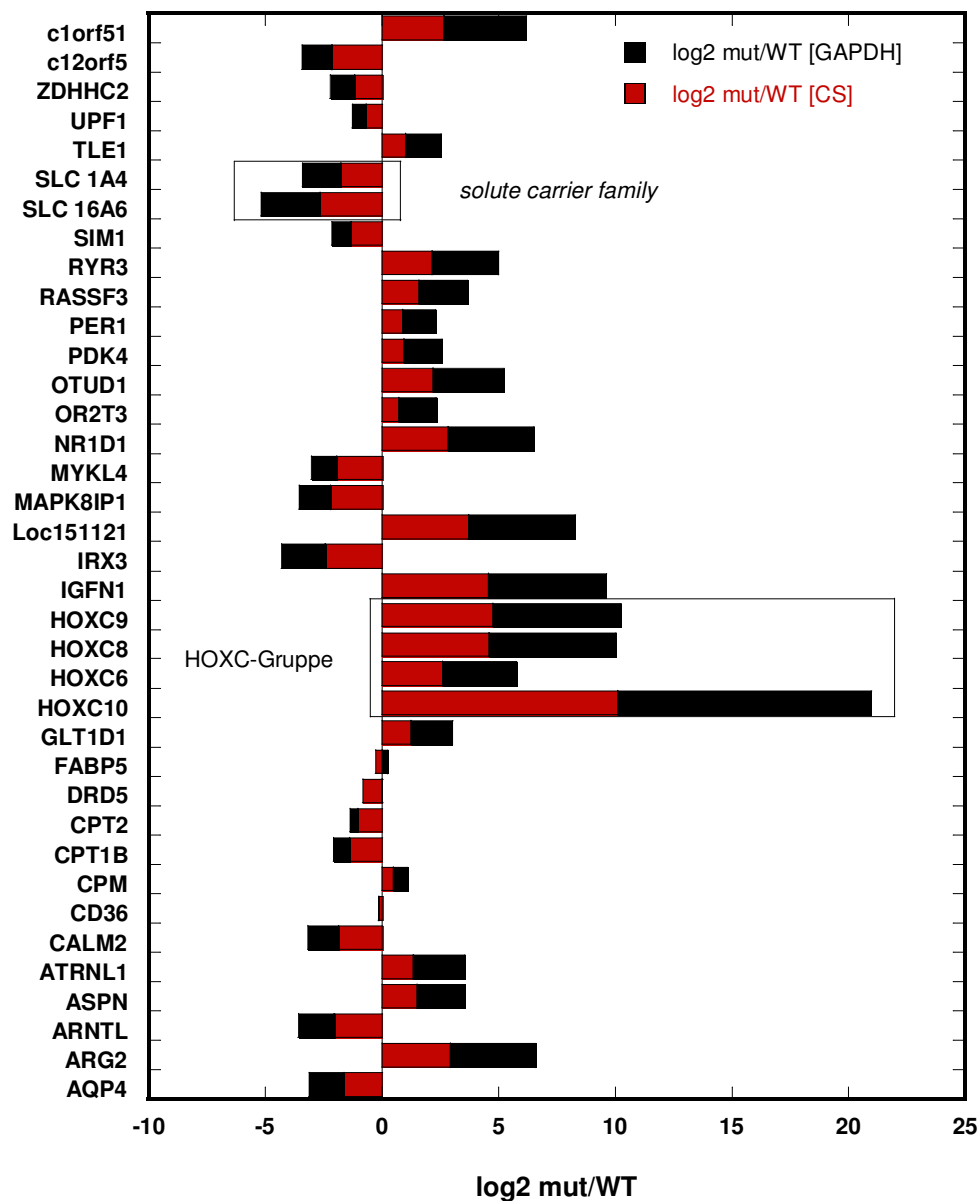


Abb. 7.50 Auftragung der Analyse der logarithmierten Änderung des Niveaus der Zielgenexpression relativ zur internen Kontrolle und relativ zu der verwendeten Kontrollgruppe. Die Balken in Schwarz beschreiben den Bezug auf das Kontrollgen GAPDH, die roten Balken geben den Bezug auf das mitochondriale Markerenzym Citrat-Synthase wieder. Die Gene der Ordinate sind in Tabelle 10.4 spezifiziert.

Mehrere Proteine des Calcium-Signal-Wegs sind aufgrund der CPT2-Erkrankung signifikant verändert. Dazu zählen RYR3, ein Rezeptor, welcher die Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen- und Sarkoplasmatischen Retikulum reguliert. Calcium selbst ist dabei der Aktivator des Kanals. Der Prozess der Calcium-induzierten Calcium-Freisetzung bewirkt eine sehr schnelle und signifikante Erhöhung der Calcium-Konzentration im Cytoplasma und beschreibt einen zentralen Prozess des Calcium-Signalwegs. Proteine, welche in die Kontraktion des Muskels involviert sind, realisieren die Anwesenheit von Calciumionen entweder direkt oder durch intermediäre Calciumsensoren, wie Calmodulin. Das Gen CALM2 ist durch die Ausprägung eines CPT2-Mangels nur 0,3-0,4fach so stark exprimiert wie in der Gesundkontrolle. Die *myosin light chain kinase* MYLK4, ein Calcium-Calmodulin-abhängiges Enzym, ist ausschließlich in der adulten Skelettmuskulatur exprimiert und benötigt divalente Metallionen, wie Calcium oder Magnesium als Kofaktor. Es katalysiert eine Phosphorylierungsreaktion von Myosin, wodurch eine Quervernetzung zu Aktinfilamenten realisiert und die Kontraktion initiiert werden kann. Sowohl RYR3 als auch CALM2 und MYLK4 sind in einen Calcium-Signalweg eingebunden. Die Freisetzung von Calciumionen über den Kanal RYR3 ist essentiell für die Aktivität von CALM2 und MYLK4. Während das Genexpressionsniveau auf der Stufe von RYR3 erhöht ist und dieses Gen somit nicht den Calcium-Signalweg unterbindet, sind die Expressionsniveaus der Proteine CALM2 und MYLK4 in den CPT2-Mangel-Patienten reduziert. Dies würde eine Störung der Calcium-Signalwege bedingen, die Vernetzung von Myosin und Aktinfilamenten unterbinden und zu einer verminderten Kontraktion des Skelettmuskels führen. Die Folge davon kann zum Beispiel eine muskuläre Schwäche und somit eine reduzierte Leistungsfähigkeit sein.

Ein differentielles Expressionsniveaus im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten auch zwei Mitglieder der löslichen *carrier*-Proteinfamilie, SLC1A4 und SLC6A16. Beide Genkandidaten zeigen einen verminderten Expressionsstatus. SLC1A4 ist ein Natrium-abhängiger Transporter für Glutamat und neutralen Aminosäuren. Der Transporter dient der Aufnahme von definierten Aminosäuren aus dem Darm durch den Transport über die Plasmamembran. Aminosäuren werden in der Niere resorbiert und auf Zellen verteilt, welche diese Aminosäuren als Bausteine für Proteine nutzen oder als Neurotransmitter dienen. SLC6A16 ist als ein Natrium- und Chloridionen-abhängiger Neurotransmitter- bzw. Monocarbonsäure-Transporter definiert. Die exakte Funktion dieser Proteine im Hinblick auf die Funktionsstörung der CPT2 könnte durch Nachfolgeexperimente bestimmt werden.

Ein weiteres differentielles Gen ist das *arg2*. Das Protein Arginase 2 katalysiert die Hydrolyse von Arginin zu Ornithin und Harnstoff. Seine Funktion besteht in der Regulation des Arginin-Metabolismus und der *down*-Regulation der Stickstoffoxidsynthese. Der Harnstoffzyklus dient der Gewinnung von Harnstoff, der Hauptquelle der Stickstoffexkretion des Körpers und der Aminosäure Arginin. Ein erhöhter Gehalt an freien Aminosäuren, realisiert durch eine gesteigerte Menge von Arginin, stimuliert die Harnstoffsynthese. Die Rolle von *arg2* unter physiologischen Bedingungen ist noch nicht geklärt. In Verbindung mit dem Krankheitsprozess des CPT2-Mangels führt dies zu einer gesteigerten Expression von *arg2*.

Der Transport der RNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma ist essentiell für die Genexpression. Bei weiteren Proteinen aus dem RNA-Transport, wie das UPF1, welche mittels *MicroArray* als signifikant differentiell identifiziert wurden, war die Bestätigung des differentiellen Genstatus mittels *real time*-PCR jedoch nicht erfolgreich.

NR1D1 ist ein bifunktionaler Transkriptionsfaktor der Familie der nukleären Rezeptorproteine [NR]. Diese Transkriptionsfaktoren binden an die DNA. Die Bindung von freien nukleären Rezeptoren an definierte Zielgene führt zur Rekrutierung spezifischer Korepressor-Komplexe,

welche eine transkriptionale Repression vermitteln. Um eine Signalwirkung zu erreichen, können Hormone, Vitamine und kleine Signalmoleküle an eine spezifische Domäne des NR-Proteins binden und eine konformationelle Veränderung hervorrufen. In der Folge wird der Korepressor-Komplex gegen einen Koaktivator-Komplex substituiert. Ob die CPT2 auch ein Zielgen für diesen Transkriptionsfaktor darstellt ist bis dato nicht bekannt. Das Expressionsniveau dieses Transkriptionsfaktors ist aber um Faktor 12 bezogen auf das Kontrollprotein GAPDH erhöht. Deshalb wäre es von Interesse, die Funktion von NR1D1 in Bezug auf die CPT2-Erkrankung mittels weiterführender Untersuchungen zu analysieren.

Der Transkriptionsfaktor IRX3 ist ein Mitglied der Iroquois Homöobox-Genfamilie. Dieser Faktor ist in die frühen Stufen der SHH-abhängigen neuronalen Entwicklung involviert [Bellefroid *et al.*, 1998] und steuert die Segmentierung der Nephrone [Reggiani *et al.*, 2007]. Sie haben einen Einfluss während der *pattern formation of vertebrate embryos* [Lewis *et al.*, 1999]. IRX3 gehört zu einer Klasse I-Proteinen von neuronalen Vorläufer-Faktoren, welche durch SSH-Signale reprimiert werden. Das Gen *irx3* in CPT2-Mangel-Skelettmuskeln ist in Bezug auf die Kontrollgruppe nur 0,19-0,27fach so stark exprimiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wären weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Funktion des Transkriptionsfaktors IRX3 in Bezug auf die CPT2-Erkrankung wünschenswert.

Das Z-Band-assoziierte Protein KY unterliegt einer Form von muskulärer Dystrophie exklusiv im Muskel. Eine Charakterisierung dieses Proteins durch Interaktionsstudien identifizierte IGFN1, Immunoglobulin-like und Fibronectin Typ III-enthaltende Domäne-Protein 1, und das Z-Band-Protein Filamin C als Interaktionspartner des KY-Proteins und als einen Teil des Z-Band-assoziierten Proteinkomplexes [Baker *et al.*, 2010]. Der Transkriptionsfaktor IGFN1 ist mittels *real time*-PCR um den Faktor 33,8 stärker in Bezug auf das Kontrollprotein GAPDH und den Kontrollmuskel exprimiert. Um die genaue Wirkweise dieses Proteins im Hinblick auf die CPT2-Erkrankung zu untersuchen, sind weiterführende Studien von Interesse.

Die Anzahl unbekannter Gene [c1orf51, c12orf5, Loc151121], deren Expression differentiell vorliegt, rückt in den Fokus, um die Pathogenese der CPT2-Erkrankung aufzuklären. Der Nachweis der differentiellen, nicht-identifizierten Genkandidaten mittels der quantitativen *real time*-PCR kann als Basis für Nachfolgeexperimente genutzt werden. Das bis dato nicht bekannte Gen Loc151121 ist in Bezug auf die GAPDH um Faktor 23 im Vergleich zum gesunden Skelettmuskel erhöht. Die Generierung von *knock out*-Mäusen und nachfolgende Untersuchung der Genkandidaten aus definierten, isolierten Muskeln wäre sehr interessant und würde zur Aufklärung der Funktion des unbekannten Gens im Kontext der CPT2-Erkrankung beitragen.

Die Kombination der *MicroArray-Technik* mit der *real time*-PCR ermöglicht einen Einblick in die Situation des Stoffwechsels unter der Bedingung eines CPT2-Mangels und eröffnet die Gelegenheit für weitere Forschungsansätze, um Details pathogener Stoffwechselwege und die Beteiligung modifizierender Faktoren als Ursache der CPT2-Erkrankung zu identifizieren.

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden molekularbiologische, enzymkinetische und spektroskopische Methoden angewandt, um *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zur humanen Carnitin-Palmitoyltransferase 2 durchzuführen.

Mit Hilfe von Klonierungsarbeiten konnte das humane *cpt2*-Gen, welches als Klon IRAUp969H109D6 vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin erworben wurde, in den *shuttle*-Vektor pPICZ B ligiert werden.

Anhand von ortsgerichteter Mutagenese konnte das humane Wildtyp-Gen der CPT2 aus dem Gen *hcpt2*/S113L/V368I/M647V [=TV] sowie die isolierte Variante *hcpt2*/S113L erfolgreich generiert werden.

Die Integration der verschiedenen Genvarianten in das *Pichia pastoris*-Genom wurde erzielt und durch Southern *blotting*, PCR und Sequenzierung die Identität bestätigt. Der Folgeschritt der Expression des CPT2-Proteins in den *Pichia pastoris*-Zellen war jedoch nicht in ausreichenden Mengen möglich, aufgrund dessen das Expressionssystem gewechselt wurde.

Anhand molekularbiologischer Arbeiten ließ sich das *cpt2*-Gen zunächst mittels TOPO TA-*cloning*-Technik in den Vektor pCR2.1 subklonieren, bevor das Gen in das Plasmid pET-28a(+) erfolgreich ligiert werden konnte. Durch die Klonierung in den Vektor pET-28a(+) wurde ein Hexahistidin-*tag* inseriert, um die Reinigung des Proteins mittels chromatographischer Methoden aus *E. coli* BL21*Gold* DE3-Zellen effizienter und spezifischer zu gestalten. Mittels Test auf Miniexpression erfolgte die Etablierung der Proteinexpression durch Optimierung der Inkubationstemperatur sowie der Konzentration an IPTG und die Dauer der Induktion. Des Weiteren wurde eine Fermentationsvorschrift zur Generierung von größeren Mengen an Protein erarbeitet. Es gelang in dieser Arbeit, eine Reinigungsstrategie durch Anwendung chromatographischer Methoden [Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie, Gelfiltration, Anionenaustauschchromatographie] für das rekombinant hergestellte lösliche Wildtypprotein der CPT2 und der Varianten [S113L und TV] zu etablieren. Die Proteine konnten damit zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Die Identität des Wildtypenzym und der Varianten ließ sich mittels massenspektrometrischer Analyse der Peptidfragmente bzw. durch Western *blotting* mittels Anti-His HRP- oder Anti-CPT2-Antikörper bestätigen. Das Molekulargewicht der Proteine wurde mittels denaturierender SDS-PAGE überprüft. Die Integrität des Wildtypproteins und der generierten Varianten wurde durch Fern-UV-CD-Messungen verifiziert.

Da sowohl das Protein eine Detergens-haltige Umgebung benötigt, wobei die cmc des Detergens nOG eine essentielle Rolle spielt, als auch das natürliche Substrat der hCPT2, wie Palmitoylcoenzym A, zur Bildung von Mizellen neigt, waren Lichtstreuemessungen zur Bestimmung der cmc von nOG und PCoA durchgeführt worden. Die erhaltenen Ergebnisse flossen unter anderem in die Etablierung des DTNB-abhängigen Aktivitätstests bzw. in Optimierungen von Reinigungs- und Messpuffern ein.

Die enzymkinetischen Parameter der natürlichen Substrate PCoA und L-Carnitin und 14 weiterer Fettsäurecoenzym A-Ester wurden nach Etablierung eines DTNB-abhängigen Aktivitätstests [Optimierung L-Carnitin- und nOG-Konzentration und Puffersystem] in Anlehnung an Rufer *et al.* (2006) für das Wildtypenzym und die Varianten bestimmt. Die gesättigten Substrate mit einer Kettenlänge von C6 bis C20 sowie weitere ungesättigte

Acylcoenzym A-Ester [Tab. 6.3], wurden vergleichend betrachtet. Mit dem Fokus auf das Wildtypenzym zeigte sich, dass die Substrataffinität mit steigender Kettenlänge an gesättigtem Substrat erhöht wird. Durch das Einführen von Doppelbindungen kann die maximale Bindungsenergie im Sinne eines *multi point attachment* nicht realisiert werden, was eine verminderte Substrataffinität im Vergleich zu den gesättigten Analoga zur Folge hat. Die Katalysekonstante k_{kat} sinkt mit steigender Kettenlänge des gesättigten Substrats um Faktor 4 im Vergleich C6 zu C20, um den Faktor 12 im Vergleich C8 zu C20.

Betrachtet man ein Substrat und vergleicht dessen Bindungsaffinitäten hinsichtlich der gemessenen Enzymvarianten, sind lediglich marginale Änderungen der K_M -Werte zu beobachten. Fokussiert man die Änderung der spezifischen Aktivität eines definierten Substrats im Vergleich zu den gemessenen Varianten, resultieren Verminderungen auf 67-23% der spezifischen Aktivität des Substrats in den Varianten. Dabei scheint vor allem das Einbringen der S113L-Punktmutation für den Verlust der spezifischen Aktivität verantwortlich zu sein. Das zusätzliche Einführen der Polymorphismen V368I und M647V verursachte nur marginale additive Aktivitätsunterschiede.

Durch eine doppelt-reziproke Auftragung der niedrigen Substratkonzentrationen an PCoA im Lineweaver-Burk-Plot konnte ein paralleler Geradenverlauf visualisiert werden, welcher einen Hinweis auf einen Ping-Pong-Mechanismus lieferte. Ein weiteres Indiz, was für die These eines Ping-Pong-Mechanismus spricht, ist der Nachweis einer Einsubstrat-Reaktion bei alleiniger Zugabe von PCoA zum Enzym im DTNB-Aktivitätstest. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu dem bisher angenommenen *compulsory-ordered*-Mechanismus.

Anhand von Inaktivierungsstudien von Wildtypenzym und der Varianten bei verschiedenen Temperaturen konnten Aussagen über die kinetische Stabilität gewonnen werden. Die Halbwertszeit des nativen Proteins verringert sich mit steigender Temperatur von 16800 min [280 h] bei 37 °C auf 77,4 min [1,29 h] bei 45 °C. Wie erwartet, führte eine Temperaturerhöhung zu einem schnelleren Verlust der Aktivität. Es zeigte sich dabei, dass der WT bei 45 °C 217fach schneller, bei 42 °C 29,7fach schneller und bei 40 °C 11,3fach schneller im Vergleich zu 37 °C denaturiert. Die Varianten zeigten ein ähnlich analoges Verhalten [S113L: 45 °C→37 °C: 116fach schneller denaturiert, 42 °C→37 °C: 13fach schneller denaturiert, 40 °C→37 °C: 5,6fach schneller denaturiert, TV: 45 °C→37 °C: 87,1fach schneller denaturiert, 42 °C→37 °C: 16,7fach schneller denaturiert, 40 °C→37 °C: 4,7fach schneller denaturiert]. Zudem wurde ermittelt, dass erneut die S113L-Mutation den stärksten Beitrag zur Destabilisierung des Proteins leistet, während das additive Einführen der Polymorphismen nur noch einen geringen Anteil zur Destabilisierung beiträgt. Die Aktivitätsmessungen wurden zudem zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter ΔH^* und ΔS^* herangezogen, woraus die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^* des Übergangszustands und dessen Änderung $\Delta\Delta G^*$ im Vergleich der Varianten zum Wildtypprotein bestimmt werden konnte. Durch das Einführen der Mutationen S113L oder S113L, V368I, M647V in das *cpt2*-Gen ist die freie Aktivierungsenthalpie des Übergangszustands zur Inaktivierung der Proteine herabgesetzt, welche für die Überwindung der Energiebarriere aufgebracht werden muss. Dies führt zu einer instabilen Gesamtmolekülstruktur. Mit zunehmender Anzahl der Perturbationen im Protein und steigender Temperatur wird die Stabilität des Enzymmoleküls nachweislich herabgesetzt [WT_{37 °C}→S113L_{45 °C}: 2435fach schneller denaturiert, WT_{37 °C}→TV_{45 °C}: 11429fach schneller denaturiert].

Es wurden chemische und thermische Denaturierungsstudien mittels Circular Dichroismus durchgeführt. Sowohl die Temperatur-abhängige als auch die Harnstoff-abhängige Charakterisierung des Wildtypproteins im Vergleich zu den Varianten zeigte eine Destabilisierung des Enzymmoleküls durch das Einführen von Mutationen. Der WT ist im Hinblick auf die thermischen Denaturierungsstudien mit 54,16 °C um 5 grd stabiler als die S113L-Variante und um 6,7 grd stabiler als die TV. Mittels chemischer Denaturierungsstudien zeigte der WT eine Denaturationskonzentration am Transitionsmittelpunkt von 2,9 M, wobei die Varianten S113L und TV schon bei Harnstoff-Konzentrationen von 2,3 M und 2 M zur Hälfte denaturiert vorlagen.

Die Zugabe des natürlichen Substrats PCoA zeigte lediglich einen marginalen stabilisierenden Effekt [~ 1 grd] auf die Übergangstemperatur bei der thermischen Denaturierung.

Mit Hilfe der Inhibitoren MalCoA und L-AC wurden Inhibitorstudien durchgeführt. MalCoA stellt keinen Inhibitor der humanen CPT2 dar. Anhand der gemessenen Daten wurde L-AC als kompetitiver Inhibitor identifiziert.

Den *in vitro*-Studien rekombinanter hCPT2 wurden Untersuchungen des *in vivo*-Systems aus humaner Skelettmuskulatur entgegengesetzt. Mittels *MicroArray*-Technik wurde erstmals die Situation der Gene im gesunden Skelettmuskel und in Muskeln mit einem definierten Haplotyp S113L, V368I, M647V der hCPT2-Erkrankung untersucht. Die nach statistischer Auswertung signifikanten Gene wurden in einer quantitativen *real time*-PCR verifiziert bzw. falsifiziert. Es zeigte sich, dass die Gene der Homöobox C-Familie [*hoxc* 10, *hoxc* 9, *hoxc* 8 und *hoxc* 6] in der Gruppe mit definierter CPT2-Erkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht vorliegen, während die Gene *slc1a4* und *slc16a6* der löslichen *carrier*-Proteine einen differentiell erniedrigten Expressionsstatus aufweisen. Mehrere Proteine des Calcium-Signal-Wegs sind aufgrund der CPT2-Erkrankung signifikant verändert [RYR3, CALM2, MYLK4]. Eine weitere Gruppe differentieller Gene umfasst Transkriptionsfaktoren, wie IGFN1, IRX3 und NR1D1, welche 33,8fach, 0,27fach und 12fach so stark im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe exprimiert werden. Des Weiteren wurden mittels *real time*-PCR auch 3 unbekannte Gene [*c1orf51*, *c12orf5*, *Loc151121*] als differentiell identifiziert. In den Fokus rückt dabei das Gen *Loc151121*, welches in Bezug auf die GAPDH um Faktor 23 im Vergleich zum gesunden Skelettmuskel erhöht vorlag.

Die pathophysiologische Bedeutung der Ergebnisse lässt sich wie folgt zusammenfassen. Entgegen der vorherrschenden Meinung ist das Protein der S113L-Variante aktiv, zeigt jedoch eine geringere Thermostabilität. Die Enzymaktivität der S113L, welche im Vergleich zum Wildtypprotein um circa 50% vermindert ist, scheint im ruhenden Muskel und auch in den meisten Belastungssituationen für eine Energieversorgung ausreichend zu sein. Folglich wird das Krankheitsbild des CPT2-Mangels im Vergleich zum progressiven Verlauf des Carnitin-Mangels mit Lipidakkumulation vorwiegend in den Typ I-Muskelfasern durch das Auftreten von wenigen Attacken dominiert. Ein *trigger* der Attacken ist die verminderte Thermostabilität. Diese Erklärung wird forciert, da Dauerbelastung und Fieber typische Auslösesituationen für den symptomatischen Verlauf des CPT2-Mangels darstellen. Während einer Nahrungskarenz werden vorwiegend Fettsäuren verstoffwechselt. Die verminderte Aktivität des mutierten Proteins kann während dieser Stoffwechselkonstellation nicht kompensiert werden und bewirkt daher eine unzureichende Energieversorgung im Muskel. Daraus resultieren wiederum die rezidivierenden Attacken.

Ausblick

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ergeben sich einige interessante Folgeprojekte, die nachfolgend kurz vorgestellt werden sollen.

Da die für den CPT2-Mangel ursächlichen Mutationen S113L und TV zu keinem inaktiven Protein, sondern zu einem fehlgefalteten bzw. entfalteten Protein führen, eröffnet dies neue therapeutische Möglichkeiten, wie zum Beispiel eine Enzym-*enhancement*- oder Enzyersatz-Therapie. Um eine Enzym-*enhancement*-Therapie entwickeln zu können, müssten Chaperone oder andere die Proteinstruktur stabilisierende Substanzen experimentell überprüft werden, um eine Stabilisierung der Tertiärstruktur zu erreichen und somit die Leistungsfähigkeit und die ausreichende Energieversorgung der Muskulatur bzw. der betreffenden Organe gewährleisten zu können.

Trotz der ubiquitären Verteilung der CPT2 im Organismus führt eine S113L-Mutation ausschließlich zu einer muskulären Ausprägung der Symptome während andere Mutationen, wie z.B. die R631C-Mutation, sowohl zu einer muskulären als auch multisystemischen Ausprägung führen kann. Um einen tieferen Einblick der Effekte pathogener Mutationen [R631C] hinsichtlich des Schweregrades des CPT2-Mangels zu gewinnen, wären weitere ortsgerichtete Mutagenesen, isoliert oder in Kombination miteinander, angebracht. Die anschließend generierten Proteine wären enzymkinetisch und spektroskopisch zu charakterisieren. Das Lösen der Kristallstruktur wäre wünschenswert, um Informationen zur Lage und Funktion der Mutationen in dem gefalteten Protein zu erhalten. Dies würde zu einem besseren Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehung beitragen.

Um ein vertieftes Verständnis zum Enzymmechanismus der hCPT2 auf molekularer Ebene zu erhalten, wären weitere ortsgerichtete Mutagenesen von spezifischen Aminosäuren des aktiven Zentrums wünschenswert. Hierzu wären zum Beispiel das Histidin 372, Serin 590 oder die Aspartate 376 bzw. 464 und das Glutamat 487 zu nennen, welche direkt im aktiven Zentrum lokalisiert sind und somit unmittelbar an der enzymatischen Katalyse beteiligt sein könnten. Weiterhin könnte durch die Aufklärung der Kristallstruktur mit anschließendem Substrat-*soaking* das postulierte Acylintermediat nachgewiesen werden. Das Intermediat würde stark auf einen Ping-Pong-Mechanismus hindeuten.

Der native Oligomerisierungszustand des homogenen Proteins ließe sich durch analytische Ultrazentrifugationsexperimente oder verbesserte Lichtstreuexperimente untersuchen.

Die Untersuchung der Genstatus von gesundem Probandenmuskel und CPT2-Mangel-Muskel könnte mit einem größeren Kollektiv durchgeführt bzw. mit anderen pathogenen Mutationen wiederholt werden. Dies würde Aussagen zu den Auswirkungen der Mutationen im *cpt2*-Gen auf die verschiedenen Stoffwechselwege zulassen und eventuelle Möglichkeiten zur Kompensation offenbaren. Signifikant veränderte Gene, vor allem aber jene, deren Aufgaben noch nicht erforscht wurden, könnten in Mäusen ausgeknockt werden, um die Folgen des *knock outs* zu untersuchen und somit diesen Genen eine Funktion zuweisen zu können. Aus dem Gesamtbild der Ergebnisse ließen sich eventuell neue Therapieansätze ableiten.

9 Referenzen

- ALAM, N. & SAGGERSON, E. D. (1998). Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochem J* **334** (Pt 1), 233-241.
- ANICHINI, A., FANIN, M., VIANEY-SABAN, C., CASSANDRINI, D., FIORILLO, C., BRUNO, C. & ANGELINI, C. (2011). Genotype-phenotype correlations in a large series of patients with muscle type CPT II deficiency. *Neurol Res* **33**, 24-32.
- AUTORENGRUPPE. (1971). *Kleine Enzyklopädie Mathematik*. VEB Bibliographisches Institut Leipzig.
- BAKER, J., RILEY, G., ROMERO, M. R., HAYNES, A. R., HILTON, H., SIMON, M., HANCOCK, J., TATEOSSIAN, H., RIPOLL, V. M. & BLANCO, G. Identification of a Z-band associated protein complex involving KY, FLNC and IGFN1. *Exp Cell Res* **316**, 1856-1870.
- BARDEN, R. E. & CLELAND, W. W. (1969). 1-Acylglycerol 3-phosphate acyltransferase from rat liver. *J Biol Chem* **244**, 3677-3684.
- BARON, C. & THOMPSON, T. E. (1975). Solubilization of Bacterial Membrane Proteins using Alkyl Glucosides and Dioctanoyl Phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta* **382**, 276-285.
- BELLEFROID, E. J., KOBBE, A., GRUSS, P., PIELER, T., GURDON, J. B. & PAPALOPULU, N. (1998). Xiro3 encodes a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois genes and functions in neural specification. *Embo J* **17**, 191-203.
- BERGSTROM, J. D. & REITZ, R. C. (1980). Studies on carnitine palmitoyl transferase: The similar nature of CPTI (inner form) and CPTO (outer form). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **204**, 71-79.
- BEZAIRE, V., BRUCE, C. R., HEIGENHAUSER, G. J., TANDON, N. N., GLATZ, J. F., LUIKEN, J. J., BONEN, A. & SPRIET, L. L. (2006). Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E509-515.
- BONNEFONT, J. P., BASTIN, J., LAFORET, P., AUBEY, F., MOGENET, A., ROMANO, S., RICQUIER, D., GOBIN-LIMBALLE, S., VASSAULT, A., BEHIN, A., EYMARD, B., BRESSON, J. L. & DJOUADI, F. (2010). Long-Term Follow-Up of Bezafibrate Treatment in Patients With the Myopathic Form of Carnitine Palmitoyltransferase 2 Deficiency. **88**, 101-108.
- BONNEFONT, J. P., DEMAUGRE, F., PRIP-BUUS, C., SAUDUBRAY, J. M., BRIVET, M., ABADI, N. & THUILLIER, L. (1999). Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol Genet Metab* **68**, 424-440.
- BONNEFONT, J.-P., 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.
- BONNEFONT, J. P., TARONI, F., CAVADINI, P., CEPANEC, C., BRIVET, M., SAUDUBRAY, J. M., LEROUX, J. P. & DEMAUGRE, F. (1996). Molecular analysis of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatocardiomyocardial expression. *Am J Hum Genet* **58**, 971-978.

- BRANDT, J. M., DJOUADI, F. & KELLY, D. P.** (1998). Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* **273**, 23786-23792.
- BRDICZKA, D. & WALLIMANN, T.** (1994). The importance of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism. *Mol Cell Biochem* **133-134**, 69-83.
- BREMER, J.** (1963). Carnitine in Intermediary Metabolism *Journal of Biological Chemistry* **238** 2774-2779
- BREMER, J. & NORUM, K. R.** (1967). Palmityl-CoA: carnitine O-palmityltransferase in the mitochondrial oxidation of palmityl-CoA. *Eur J Biochem* **1**, 427-433.
- BRESSLER, R., CORREDOR, C. & BRENDL, K.** (1969). Hypoglycin and hypoglycin-like compounds. *Pharmacol Rev* **21**, 105-130.
- BRITTON, C. H., MACKAY, D. W., ESSER, V., FOSTER, D. W., BURNS, D. K., YARNALL, D. P., FROGUEL, P. & MCGARRY, J. D.** (1997). Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPT1A and CPT1B). *Genomics* **40**, 209-211.
- BRITTON, C. H., SCHULTZ, R. A., ZHANG, B., ESSER, V., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D.** (1995). Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1984-1988.
- BROSAN, J. T., KOPEC, B. & FRITZ, I. B.** (1973). The Localization of Carnitine Palmitoyltransferase on the Inner Membrane of Bovine Liver Mitochondria *Journal of Biological Chemistry* **248** 4075-4082
- BROSS, P., CORYDON, T. J., ANDRESEN, B. S., JORGENSEN, M. M., BOLUND, L. & GREGERSEN, N.** (1999). Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Hum Mutat* **14**, 186-198.
- BROWN, N. F., ANDERSON, R. C., CAPLAN, S. L., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D.** (1994a). Catalytically important domains of rat carnitine palmitoyltransferase II as determined by site-directed mutagenesis and chemical modification. Evidence for a critical histidine residue. *J Biol Chem* **269**, 19157-19162.
- BROWN, N. F., ESSER, V., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D.** (1994b). Expression of a cDNA for rat liver carnitine palmitoyltransferase I in yeast establishes that catalytic activity and malonyl-CoA sensitivity reside in a single polypeptide. *J Biol Chem* **269**, 26438-26442.
- BROWN, N. F., SEN, A., SOLTIS, D. A., JONES, B., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D.** (1993). Expression of precursor and mature carnitine palmitoyltransferase II in Escherichia coli and in vitro: differential behaviour of rat and human isoforms. *Biochem J* **294 (Pt 1)**, 79-86.
- BROWN, N. F., VICTORIA ESSER, ALMUDENDA. GONZALEZS, CLAUDIA T. EVANS, CLIVE A. SLAUGHTERS, DANIEL W. FOSTER & MCGARRY, J. D.** (1991). Mitochondrial Import and Processing of Rat Liver Carnitine of the Mature Protein Palmitoyltransferase II Defines the Amino Terminus POSSIBILITY OF DIFFERENTIAL MODIFICATION OF THE RAT AND HUMAN ISOFORMS*. *JBC* **266**, 15446-15449.
- BROWN, N. F., WEIS, B. C., HUSTI, J. E., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D.** (1995). Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. *J Biol Chem* **270**, 8952-8957.

- BRUNO, C., BADO, M., MINETTI, C., CORDONE, G. & DIMAURO, S. (2000). Novel mutation in the CPT II gene in a child with periodic febrile myalgia and myoglobinuria. *J Child Neurol* **15**, 390-393.
- BUCHNER, J., SCHMIDT, M., FUCHS, M., JAENICKE, R., RUDOLPH, R., SCHMID, F. X. & KIEFHABER, T. (1991). GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. *Biochemistry* **30**, 1586-1591.
- CARROLL, J. E., BROOKE, M. H., DEVIVO, D. C., KAISER, K. K. & HAGBERG, J. M. (1978). Biochemical and physiologic consequences of carnitine palmityltransferase deficiency. *Muscle Nerve* **1**, 103-110.
- CARTER, H. E., BHATTACHARYYA, P. K., WEIDMAN, K. R. & FRAENKEL, G. (1952). Chemical studies on vitamin BT isolation and characterization as carnitine. *Arch Biochem Biophys* **38**, 405-416.
- CHASE, J. F. & TUBBS, P. K. (1966). Some kinetic studies on the mechanism of action of carnitine acetyltransferase. *Biochem J* **99**, 32-40.
- CHATTOPADHYAY, A. & LONDON, E. (1984). Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Analytical Biochemistry* **139**, 408-412.
- CHEGARY, M., TE BRINKE, H., DOOLAARD, M., IJLST, L., WIJBURG, F. A., WANDERS, R. J. A. & HOUTEN, S. M. (2008). Characterization of l-aminocarnitine, an inhibitor of fatty acid oxidation. *Molecular Genetics and Metabolism* **93**, 403-410.
- CHRISTIANSEN, R. Z. & BREMER, J. (1976). Active transport of butyrobetaine and carnitine into isolated liver cells. *Biochim Biophys Acta* **448**, 562-577.
- CHRISTOPHERSEN, B. O. & CHRISTIANSEN, R. Z. (1975). Studies on the mechanism of the inhibitory effects of erucylcarnitine in rat heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **388**, 402-412.
- CLARKE, P. R. H. & BIEBER, L. L. (1981a). Effect of Micelles on the Kinetics of Purified Beef Heart Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase". *JBC* **256**, 9869-9873.
- CLARKE, P. R. H. & BIEBER, L. L. (1981b). Isolation and Purification of Mitochondrial Carnitine Octanoyltransferase Activities from Beef Heart*. *JBC* **256**, 9861-9868.
- COBURN, C. T., HAJRI, T., IBRAHIMI, A. & ABUMRAD, N. A. (2001). Role of CD36 in membrane transport and utilization of long-chain fatty acids by different tissues. *J Mol Neurosci* **16**, 117-121; discussion 151-117.
- COHEN, I., KOHL, C., MCGARRY, J. D., GIRARD, J. & PRIP-BUUS, C. (1998). The N-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 mediates import into the outer mitochondrial membrane and is essential for activity and malonyl-CoA sensitivity. *J Biol Chem* **273**, 29896-29904.
- CONSTANTINIDES, P. P. & STEIM, J. M. (1988). Micellization of fatty acyl-CoA mixtures and its relevance to the fatty acyl selectivity of acyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **261**, 430-436.
- COOK, G. A., EDWARDS, T. L., JANSEN, M. S., BAHOUTH, S. W., WILCOX, H. G. & PARK, E. A. (2001). Differential regulation of carnitine palmitoyltransferase-I gene isoforms (CPT-I alpha and CPT-I beta) in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 317-329.
- COOK, G. A. & GAMBLE, M. S. (1987). Regulation of carnitine palmitoyltransferase by insulin results in decreased activity and decreased apparent Ki values for malonyl-CoA. *J Biol Chem* **262**, 2050-2055.

- CORDENTE, A. G., LÓPEZ-VIAS, E., VIZQUEZ, M. A. I., GMEZ-PUERTAS, P., ASINS, G., SERRA, D. & HEGARDT, F. G.** (2006). Mutagenesis of Specific Amino Acids Converts Carnitine Acetyltransferase into Carnitine Palmitoyltransferase. *Biochemistry* **45**, 6133-6141.
- CORTI, S., BORDONI, A., RONCHI, D., MUSUMECI, O., AGUENNOUZ, M., TOSCANO, A., LAMPERTI, C., BRESOLIN, N. & COMI, G. P.** (2008). Clinical features and new molecular findings in Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *Journal of the Neurological Sciences* **266**, 97-103.
- CORYDON, T. J., BROSS, P., JENSEN, T. G., CORYDON, M. J., LUND, T. B., JENSEN, U. B., KIM, J. J., GREGERSEN, N. & BOLUND, L.** (1998). Rapid degradation of short-chain acyl-CoA dehydrogenase variants with temperature-sensitive folding defects occurs after import into mitochondria. *J Biol Chem* **273**, 13065-13071.
- CRONIN, C. N.** (1997). The conserved serine-threonine-serine motif of the carnitine acyltransferases is involved in carnitine binding and transition-state stabilization: a site-directed mutagenesis study. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 784-789.
- CUMMING, W. J. K., HARDY, M., HUDGSON, P. & WALLS, J.** (1976). Carnitine-palmityl-transferase deficiency. *Journal of the Neurological Sciences* **30**, 247-258.
- DAI, J., ZHU, H., SHI, J. & WOLDEGIORGIS, G.** (2000). Identification by mutagenesis of conserved arginine and tryptophan residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I important for catalytic activity. *J Biol Chem* **275**, 22020-22024.
- DAY, P. J. & SHAW, W. V.** (1992). Acetyl coenzyme A binding by chloramphenicol acetyltransferase. Hydrophobic determinants of recognition and catalysis. *J Biol Chem* **267**, 5122-5127.
- DE STANCHINA, E., GABELLINI, D., NORIO, P., GIACCA, M., PEVERALI, F. A., RIVA, S., FALASCHI, A. & BIAMONTI, G.** (2000). Selection of homeotic proteins for binding to a human DNA replication origin. *J Mol Biol* **299**, 667-680.
- DE VRIES, Y., ARVIDSON, D. N., WATERHAM, H. R., CREGG, J. M. & WOLDEGIORGIS, G.** (1997). Functional Characterization of Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferases I and II Expressed in the Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* **36**, 5285-5292.
- DECLERCQ, P. E., FALCK, J. R., KUWAJIMA, M., TYMINSKI, H., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D.** (1987). Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. I. Use of inhibitors. *J Biol Chem* **262**, 9812-9821.
- DEMAUGRE, F., BONNEFONT, J. P., COLONNA, M., CEPANEC, C., LEROUX, J. P. & SAUDUBRAY, J. M.** (1991). Infantile form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatomuscular symptoms and sudden death. Physiopathological approach to carnitine palmitoyltransferase II deficiencies. *The Journal of Clinical Investigation* **87**, 859-864.
- DEMAUGRE, F., BONNEFONT, J. P., MITCHELL, G., NGUYEN-HOANG, N., PELET, A., RIMOLDI, M., DI DONATO, S. & SAUDUBRAY, J. M.** (1988). Hepatic and muscular presentations of carnitine palmitoyl transferase deficiency: two distinct entities. *Pediatr Res* **24**, 308-311.

- DESAUTELS, M. & GOLDBERG, A. L. (1982a). Demonstration of an ATP-dependent, vanadate-sensitive endoprotease in the matrix of rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **257**, 11673-11679.
- DESAUTELS, M. & GOLDBERG, A. L. (1982b). Liver mitochondria contain an ATP-dependent, vanadate-sensitive pathway for the degradation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1869-1873.
- DESCHAUER, M., CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z. M., BIEKMANN, E., POURFARZAM, M., TAYLOR, R. W., TURNBULL, D. M. & ZIERZ, S. (2003). A splice junction mutation in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* **79**, 124-128.
- DESCHAUER, M., WIESER, T., SCHRODER, R. & ZIERZ, S. (2002). A novel nonsense mutation (515del4) in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* **75**, 181-185.
- DIDONATO, S., CORNELIO, F., PACINI, L., PELUCHETTI, D., RIMOLDI, M. & SPREAFICO, S. (1978). Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency: a case with enzyme deficiency in cultured fibroblasts. *Ann Neurol* **4**, 465-467.
- DIMAURO, S. & DIMAURO, P. M. (1973). Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science* **182**, 929-931.
- DJOUADI, F., BONNEFONT, J. P., THUILLIER, L., DROIN, V., KHADOM, N., MUNNICH, A. & BASTIN, J. (2003). Correction of fatty acid oxidation in carnitine palmitoyl transferase 2-deficient cultured skin fibroblasts by bezafibrate. *Pediatr Res* **54**, 446-451.
- DJOUADI, F., WEINHEIMER, C. J., SAFFITZ, J. E., PITCHFORD, C., BASTIN, J., GONZALEZ, F. J. & KELLY, D. P. (1998). A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha- deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation* **102**, 1083-1091.
- DONATELLO, S., SPENNETTA, T., STRIELEMAN, P., WOLDEGIORGIS, G. & SHRAGO, E. (1988). Adaptive changes in individual acyl-CoA esters from hamster BAT during cold acclimation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **254**, E181-186.
- DUGI, K. A., DICHEK, H. L., TALLEY, G. D., BREWER, H. B., JR. & SANTAMARINA-FOJO, S. (1992). Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *J Biol Chem* **267**, 25086-25091.
- DUNN, W. A. & ENGLARD, S. (1981). Carnitine biosynthesis by the perfused rat liver from exogenous protein-bound trimethyllysine. Metabolism of methylated lysine derivatives arising from the degradation of 6-N-[methyl-3H]lysine-labeled glycoproteins. *J Biol Chem* **256**, 12437-12444.
- EDELHOCH, H. (1967). Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins*. *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
- ELHOLM, M., GARRAS, A., NEVE, S., TORNEHAVE, D., LUND, T. B., SKORVE, J., FLATMARK, T., KRISTIANSEN, K. & BERGE, R. K. (2000). Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells. *J. Lipid Res.* **41**, 538-545.
- ELLMAN, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**, 70-77.

- ELPELEG, O. N., HAMMERMAN, C., SAADA, A., SHAAG, A., GOLZAND, E., HOCHNER-CELNIKIER, D., BERGER, I. & NADJARI, M. (2001). Antenatal presentation of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *American Journal of Medical Genetics* **102**, 183-187.
- ELPELEG, O. N., JOSEPH, A., BRANSKI, D., CHRISTENSEN, E., HOLME, E., DEMAUGRE, F., SAUDUBRAY, J. M. & GUTMAN, A. (1993). Recurrent metabolic decompensation in profound carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *J Pediatr* **122**, 917-919.
- EMSLEY, P., LOHKAMP, B., SCOTT, W. G. & COWTAN, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D* **66**, 486-501.
- ESSER, V., BRITTON, C. H., WEIS, B. C., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D. (1993). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem* **268**, 5817-5822.
- ESSER, V., BROWN, N. F., COWAN, A. T., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D. (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). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem* **271**, 6972-6977.
- FAYE, A., ESNOUS, C., PRICE, N. T., ONFRAY, M. A., GIRARD, J. & PRIP-BUUS, C. (2007). Rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 forms an oligomeric complex within the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **282**, 26908-26916.
- FERSHT, A. (2003). *Structure and mechanism in protein science*. Verlag: Palgrave Macmillan. 5.Auflage.
- FIERKE, C. A. & JENCKS, W. P. (1986). Two functional domains of coenzyme A activate catalysis by coenzyme A transferase. Pantetheine and adenosine 3'-phosphate 5'-diphosphate. . *Journal of Biological Chemistry* **261** 7603-7606
- FILIPPO, C. A., ARDON, O. & LONGO, N. (2011). Glycosylation of the OCTN2 carnitine transporter: study of natural mutations identified in patients with primary carnitine deficiency. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 312-320.
- FINOCCHIARO. (1991). Erratum. *PNAS*.
- FINOCCHIARO, G., TARONI, F., ROCCHI, M., LIRAS MARTIN, A., COLOMBO, I., TARELLI, G. T. & DiDONATO, S. (1991). cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of human carnitine palmitoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10981.
- FIOL, C. J. & BIEBER, L. L. (1984). Sigmoid kinetics of purified beef heart mitochondrial carnitine palmitoyltransferase. Effect of pH and malonyl-CoA. *J Biol Chem* **259**, 13084-13088.
- FRASER, F., CORSTORPHINE, C. G. & ZAMMIT, V. A. (1997). Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. *Biochem J* **323** (Pt 3), 711-718.
- FRIEDMAN, S. & FRAENKEL, G. (1955). Reversible enzymatic acetylation of carnitine. *Arch Biochem Biophys* **59**, 491-501.
- FRITZ, I. (1955). The effect of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates. *Acta Physiol Scand* **34**, 367-385.

- FRITZ, I. B. (1959). Action of carnitine on long chain fatty acid oxidation by liver. *Am J Physiol* **197**, 297-304.
- FRITZ, I. B. & MARQUIS, N. R. (1965). The role of acylcarnitine esters and carnitine palmityltransferase in the transport of fatty acyl groups across mitochondrial membranes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **54** 1226-1233
- FRITZ, I. B. & SCHULTZ, S. K. (1965). Carnitine Acetyltransferase. Ii. Inhibiiton by Carnitine Analogues and by Sulphydryl Reagents. *J Biol Chem* **240**, 2188-2192.
- FRITZ, I. B. & YUE, K. T. (1963). Long-Chain Carnitine Acyltransferase and the Role of Acylcarnitine Derivatives in the Catalytic Increase of Fatty Acid Oxidation Induced by Carnitine. *J Lipid Res* **4**, 279-288.
- GABELLINI, D., COLALUCA, I. N., VODERMAIER, H. C., BIAMONTI, G., GIACCA, M., FALASCHI, A., RIVA, S. & PEVERALI, F. A. (2003). Early mitotic degradation of the homeoprotein HOXC10 is potentially linked to cell cycle progression. **22**, 3715-3724.
- 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 (CPT1) to chromosome 1p32. *Genomics* **24**, 195-197.
- GELLERA, C., WITT, D., VERDERIO, E., CAVADINI, P., DiDONATO, S. & TARONI, F. (1992). Molecular study of lethal neonatal carnitine palmitoyltransferase II (CPTII) deficiency. *Am J Hum Genet* **52**, A168.
- GIANNESSI, F., CHIODI, P., MARZI, M., MINETTI, P., PESSOTTO, P., DE ANGELIS, F., TASSONI, E., CONTI, R., GIORGI, F., MABILIA, M., DELL'UOMO, N., MUCK, S., TINTI, M. O., CARMINATI, P. & ARDUINI, A. (2001). Reversible Carnitine Palmitoyltransferase Inhibitors with Broad Chemical Diversity as Potential Antidiabetic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 2383-2386.
- GIANNESSI, F., PESSOTTO, P., TASSONI, E., CHIODI, P., CONTI, R., DE ANGELIS, F., DELL'UOMO, N., CATINI, R., DEIAS, R., TINTI, M. O., CARMINATI, P. & ARDUINI, A. (2003). Discovery of a Long-Chain Carbamoyl Aminocarnitine Derivative, a Reversible Carnitine Palmitoyltransferase Inhibitor with Antiketotic and Antidiabetic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**, 303-309.
- GILL, S. C. & VON HIPPEL, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**, 319-326.
- GODWIN, A. R. & CAPECCHI, M. R. (1998). Hoxc13 mutant mice lack external hair. *Genes Dev* **12**, 11-20.
- GOLOUBINOFF, P., CHRISTELLER, J. T., GATENBY, A. A. & LORIMER, G. H. (1989). Reconstitution of active dimeric ribulose bisphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* **342**, 884-889.
- GREGERSEN, N., ANDRESEN, B. S., CORYDON, M. J., CORYDON, T. J., OLSEN, R. K., BOLUND, L. & BROSS, P. (2001). Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. *Hum Mutat* **18**, 169-189.
- GUEx, N. & PEITSCH, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.

- GULEWITSCH, W. & KRIMBERG, R. (1905). Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **45**, 325-330.
- GUSTAVSEN, H. (2000). Dissertation: Bestimmung des L-Carnitin-Gehaltes in rohen und zubereiteten pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln. *Physiologisches Institut der tierärztlichen Hochschule Hannover*.
- HADDOCK, B. A., YATES, D. W. & GARLAND, P. B. (1970). The localization of some coenzyme A-dependent enzymes in rat liver mitochondria. *Biochem J* **119**, 565-573.
- HALL, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- HAWKINS, J. D. (1988). A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res* **16**, 9893-9908.
- HELENIUS, A. & SIMONS, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **415**, 29-79.
- HENDRICK, J. P. & HARTL, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* **62**, 349-384.
- HERMAN, J. & NADLER, H. L. (1977). Recurrent myoglobinuria and muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency. *The Journal of Pediatrics* **91**, 247-250.
- HOPPEL, C. L. & TOMEK, R. J. (1972). Carnitine palmitoyltransferase. Location of two enzymatic activities in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **247**, 832-841.
- HORNE, D. W. & BROQUIST, H. P. (1973). Role of lysine and -N-trimethyllysine in carnitine biosynthesis. I. Studies in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **248**, 2170-2175.
- HORNE, D. W., TANPHAICHITR, V. & BROQUIST, H. P. (1971). Role of lysine in carnitine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **246**, 4373-4375.
- HSIAO, Y.-S., JOGL, G., ESSER, V. & TONG, L. (2006). Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **346**, 974-980.
- HSIAO, Y.-S., JOGL, G. & TONG, L. (2004). Structural and Biochemical Studies of the Substrate Selectivity of Carnitine Acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 31584-31589.
- HUDSON, E. K., LIU, M.-H., MAXIMILIAN[^]BUJA, L. & McMILLIN, J. B. (1995). Insulin-associated Changes in Carnitine Palmitoyltransferase in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **27**, 599-613.
- HUIZING, M., IACOBazzi, V., IJLST, L., SAVELKOU, P., RUITENBEEK, W., VAN DEN HEUVEL, L., INDIVERI, C., SMEITINK, J., TRIJBELS, F., WANDERS, R. & PALMIERI, F. (1997). Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA and identification of the molecular defect in a patient. *Am J Hum Genet* **61**, 1239-1245.
- IACOBazzi, V., PASQUALI, M., SINGH, R., MATERN, D., RINALDO, P., AMAT DI SAN FILIPPO, C., PALMIERI, F. & LONGO, N. (2004). Response to therapy in carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) deficiency due to a novel missense mutation. *Am J Med Genet A* **126A**, 150-155.

- IJLST, L., HENDRIKSEN AG, RUITER JPN, WANDERS RJ. (1999). Molecular basis of CPTII deficiency: Identification of 9 novel mutations. *J Inherit Metab Dis* **22**, A53.
- INDIVERI, C., IACOBazzi, V., GIANGREGORIO, N. & PALMIERI, F. (1997). The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Biochem J* **321** (Pt 3), 713-719.
- IONASESCU, V., HUG, G. & HOPPEL, C. (1980). Combined partial deficiency of muscle carnitine palmitoyltransferase and carnitine with autosomal dominant inheritance. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **43**, 679-682.
- ISACKSON, P. J., BENNETT, M. J., LICHTER-KONECKI, U., WILLIS, M., NYHAN, W. L., SUTTON, V. R., TEIN, I. & VLADUTIU, G. D. (2008). CPT2 gene mutations resulting in lethal neonatal or severe infantile carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* **94**, 422-427.
- ISACKSON, P. J., BENNETT, M. J. & VLADUTIU, G. D. (2006). Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* **89**, 323-331.
- JENKINS, D. & GRIFFITH, O. (1985). DL-aminocarnitine and acetyl-DL-aminocarnitine. Potent inhibitors of carnitine acyltransferases and hepatic triglyceride catabolism. *J. Biol. Chem.* **260**, 14748-14755.
- JENKINS, D. L. & GRIFFITH, O. W. (1986). Antiketogenic and hypoglycemic effects of aminocarnitine and acylaminocarnitines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 290-294.
- JOGL, G., HSIAO, Y.-S. & TONG, L. (2005). Crystal Structure of Mouse Carnitine Octanoyltransferase and Molecular Determinants of Substrate Selectivity. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 738-744.
- JOHNSON, T. M., MANN, W. R., DRAGLAND, C. J., ANDERSON, R. C., NEMECEK, G. M. & BELL, P. A. (1995). Over-expression and characterization of active recombinant rat liver carnitine palmitoyltransferase II using baculovirus. *Biochem J* **309** (Pt 2), 689-693.
- KANAMARU, T., SHINAGAWA, S., ASAI, M., OKAZAKI, H., SUGIYAMA, Y., FUJITA, T., IWATSUKA, H. & YONEDA, M. (1985). Emeriamine, an antidiabetic [beta]-aminobetaine derived from a novel fungal metabolite. *Life Sciences* **37**, 217-223.
- KANEOKA, H., UESUGI, N., MORIGUCHI, A., HIROSE, S., TAKAYANAGI, M., YAMAGUCHI, S., SHIGEMATSU, Y., YASUNO, T., SASATOMI, Y. & SAITO, T. (2005). Carnitine palmitoyltransferase II deficiency due to a novel gene variant in a patient with rhabdomyolysis and ARF. *Am J Kidney Dis* **45**, 596-602.
- KASHFI, K., MYNATT, R. L. & COOK, G. A. (1994). Hepatic carnitine palmitoyltransferase-I has two independent inhibitory binding sites for regulation of fatty acid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1212**, 245-252.
- KELLY, S. M., JESS, T. J. & PRICE, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1751**, 119-139.

- KERNER, J., DISTLER, A. M., MINKLER, P., PARLAND, W., PETERMAN, S. M. & HOPPEL, C. L. (2004). Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I: effect on the kinetic properties of the enzyme. *J Biol Chem* **279**, 41104-41113.
- KERNER, J. & HOPPEL, C. (1998). Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu Rev Nutr* **18**, 179-206.
- KERNER, J. & HOPPEL, C. (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1486**, 1-17.
- KIEFHABER, T., RUDOLPH, R., KOHLER, H. H. & BUCHNER, J. (1991). Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)* **9**, 825-829.
- KLER, R. S., JACKSON, S., BARTLETT, K., BINDOFF, L. A., EATON, S., POURFARZAM, M., FRERMAN, F. E., GOODMAN, S. I., WATMOUGH, N. J. & TURNBULL, D. M. (1991). Quantitation of acyl-CoA and acylcarnitine esters accumulated during abnormal mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem* **266**, 22932-22938.
- KNUDSEN, J., JENSEN, M. V., HANSEN, J. K., FAERGEMAN, N. J., NEERGAARD, T. B. & GAIGG, B. (1999). Role of acylCoA binding protein in acylCoA transport, metabolism and cell signaling. *Mol Cell Biochem* **192**, 95-103.
- KNUDSEN, J., NEERGAARD, T. B., GAIGG, B., JENSEN, M. V. & HANSEN, J. K. (2000). Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J Nutr* **130**, 294S-298S.
- KÖDITZ, J. (2004). Dissertation: Lokale Änderungen der Struktur und ihr Einfluss auf die Stabilität und Faltung von Ribonuklease A. *Institut für Biochemie/ Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*, 132.
- KOŁODZIEJ, M. P. & ZAMMIT, V. A. (1993). Mature carnitine palmitoyltransferase I retains the N-terminus of the nascent protein in rat liver. *FEBS Lett* **327**, 294-296.
- KOPEC, B. & FRITZ, I. B. (1973). Comparison of properties of carnitine palmitoyltransferase I with those of carnitine palmitoyltransferase II, and preparation of antibodies to carnitine palmitoyltransferases. *J Biol Chem* **248**, 4069-4074.
- KUTSCHER, F. (1905). Über Liebig's Fleischextrakt. *Mitteilung I. Z. Untersuch Nahr Genußm* **10**, 529-537.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LANGER, T., KASER, M., KLANNER, C. & LEONHARD, K. (2001). AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans* **29**, 431-436.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., McGETTIGAN, P. A., McWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.

- LATRUFFE, N. & VAMECQ, J. (1997). Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* **79**, 81-94.
- LEONHARD, K., GUIARD, B., PELLECCIA, G., TZAGOLOFF, A., NEUPERT, W. & LANGER, T. (2000). Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol Cell* **5**, 629-638.
- LEWIS, M. T., ROSS, S., STRICKLAND, P. A., SNYDER, C. J. & DANIEL, C. W. (1999). Regulated expression patterns of IRX-2, an Iroquois-class homeobox gene, in the human breast. *Cell Tissue Res* **296**, 549-554.
- LICHTENBERG, D., ROBSON, R. J. & DENNIS, E. A. (1983). Solubilization of phospholipids by detergents structural and kinetic aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **737**, 285-304.
- LOCKYER, P., SCHISLER, J. C., PATTERSON, C. & WILLIS, M. S. (2010). Minireview: Won't get fooled again: the nonmetabolic roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the heart. *Mol Endocrinol* **24**, 1111-1119.
- LUND, H. (1987). Carnitine palmitoyltransferase: characterization of a labile detergent-extracted malonyl-CoA-sensitive enzyme from rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **918**, 67-75.
- LUND, H. & WOLDEGIORGIS, G. (1986). Carnitine palmitoyltransferase: separation of enzyme activity and malonyl-CoA binding in rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **878**, 243-249.
- MARQUIS, N. R. & FRITZ, I. B. (1964). Enzymological Determination of Free Carnitine Concentrations in Rat Tissues. *J Lipid Res* **5**, 184-187.
- MARTIN, M. A., RUBIO, J. C., DEL HOYO, P., GARCIA, A., BUSTOS, F., CAMPOS, Y., CABELLO, A., CULEBRAS, J. M. & ARENAS, J. (2000). Identification of novel mutations in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Mutat* **15**, 579-580.
- MCGARRY, J. (1992). What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science* **258**, 766-770.
- MCGARRY, J. D. & BROWN, N. F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system From concept to molecular analysis. *European Journal of Biochemistry* **244**, 1-14.
- MCGARRY, J. D. & FOSTER, D. W. (1980). Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production. *Annual Review of Biochemistry* **49**, 395-420.
- MCGARRY, J. D., LEATHERMAN, G. F. & FOSTER, D. W. (1978a). Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J Biol Chem* **253**, 4128-4136.
- MCGARRY, J. D., MILLS, S. E., LONG, C. S. & FOSTER, D. W. (1983). Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* **214**, 21-28.
- MCGARRY, J. D., SEN, A., ESSER, V., WOELTJE, K. F., WEIS, B. & FOSTER, D. W. (1991). New insights into the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. *Biochimie* **73**, 77-84.

- MCGARRY, J. D., TAKABAYASHI, Y. & FOSTER, D. W.** (1978b). The role of malonyl-coa in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* **253**, 8294-8300.
- MIKKELSEN, J. & KNUDSEN, J.** (1987). Acyl-CoA-binding protein from cow. *Biochemical Journal* **248**, 709-714.
- MIYAZAWA, S., OZASA, H., OSUMI, T. & HASHIMOTO, T.** (1983). Purification and properties of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase from rat liver. *J Biochem (Tokyo)* **94**, 529-542.
- MORILLAS, M., GOMEZ-PUERTAS, P., ROCA, R., SERRA, D., ASINS, G., VALENCIA, A. & HEGARDT, F. G.** (2001). Structural Model of the Catalytic Core of Carnitine Palmitoyltransferase I and Carnitine Octanoyltransferase (COT). *Journal of Biological Chemistry* **276**, 45001-45008.
- MORILLAS, M., GOMEZ-PUERTAS, P., RUBI, B., CLOTET, J., ARINO, J., VALENCIA, A., HEGARDT, F. G., SERRA, D. & ASINS, G.** (2002). Structural Model of a Malonyl-CoA-binding Site of Carnitine Octanoyltransferase and Carnitine Palmitoyltransferase I. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 11473-11480.
- MÜLHARDT, C.** (2003). *Der Experimentator - Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- MURAKAMI, K., CHAN, S. Y. & ROUTTENBERG, A.** (1986). Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca²⁺ and phospholipids. *J Biol Chem* **261**, 15424-15429.
- MURSHUDOV, G. N., SKUBAK, P., LEBEDEV, A. A., PANNU, N. S., STEINER, R. A., NICHOLLS, R. A., WINN, M. D., LONG, F. & VAGIN, A. A.** (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D* **67**, 355-367.
- MURTHY, M. S. & PANDE, S. V.** (1987a). Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 378-382.
- MURTHY, M. S. & PANDE, S. V.** (1990). Characterization of a solubilized malonyl-CoA-sensitive carnitine palmitoyltransferase from the mitochondrial outer membrane as a protein distinct from the malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase of the inner membrane. *Biochem J* **268**, 599-604.
- MURTHY, M. S. R. & PANDE, S. V.** (1987b). Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membranes. *Biochemical Journal* **248**, 727-733.
- MYNATT, R. L., LAPPI, M. D. & COOK, G. A.** (1992). Myocardial carnitine palmitoyltransferase of the mitochondrial outer membrane is not altered by fasting. *Biochim Biophys Acta* **1128**, 105-111.
- NALECZ, K. A., MROCZKOWSKA, J. E., BERENT, U. & NALECZ, M. J.** (1997). Effect of palmitoylcarnitine on the cellular differentiation, proliferation and protein kinase C activity in neuroblastoma nb-2a cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **57**, 263-274.
- NIC A' BHÁIRD, N., KUMARAVEL, G., GANDOUR, R. D., KRUEGER, M. J. & RAMSAY, R. R.** (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.

- NIC A' BHAIRD, N., YANKOVSKAYA, V. & RAMSAY, R. R. (1998). Active sites residues of beef liver carnitine octanoyltransferase (COT) and carnitine palmitoyltransferase (CPT-II). *Biochem J* **330** (Pt 2), 1029-1036.
- NORUM, K. R. (1964). Palmityl-CoA:Carnitine Palmityltransferase. Purification from Calf-Liver Mitochondria and Some Properties of the Enzyme. *Biochim Biophys Acta* **89**, 95-108.
- NORUM, K. R. (1965a). Activation of palmityl-coA: carnitine palmityltransferase in livers from fasted, fat-fed, or diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* **98**, 652-654.
- NORUM, K. R. (1965b). Palmityl-CoA:carnitine palmityltransferase studies on the substrate specificity of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation* **99**, 511-522.
- NORUM, K. R. & BREMER, J. (1967). The localization of acyl coenzyme A-carnitine acyltransferases in rat liver cells. *J Biol Chem* **242**, 407-411.
- NORUM, K. R., FARSTAD, M. & BREMER, J. (1966). The submitochondrial distribution of acid:CoA ligase (AMP) and palmityl-CoA:carnitine palmityltransferase in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **22**, 797-804.
- OLPIN, S., AFIFI, A., CLARK, S., MANNING, N., BONHAM, J., DALTON, A., LEONARD, J., LAND, J., ANDRESEN, B., MORRIS, A., MUNTONI, F., TURNBULL, D., POURFARZAM, M., RAHMAN, S. & POLLITT, R. (2003). Mutation and biochemical analysis in carnitine palmitoyltransferase type II (CPT II) deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **26**, 543-557.
- OPGEN-RHEIN, R. & STRIMMER, K. (2007). Accurate ranking of differentially expressed genes by a distribution-free shrinkage approach. *Stat Appl Genet Mol Biol* **6**, Article9.
- ORNGREEN, M. C., DUNO, M., EJSTRUP, R., CHRISTENSEN, E., SCHWARTZ, M., SACCHETTI, M. & VISSING, J. (2005). Fuel utilization in subjects with carnitine palmitoyltransferase 2 gene mutations. *Ann Neurol* **57**, 60-66.
- ORNGREEN, M. C., EJSTRUP, R. & VISSING, J. (2003). Effect of diet on exercise tolerance in carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Neurology* **61**, 559-561.
- OSMUNDSEN, H., NEAT, C. E. & NORUM, K. R. (1979). Peroxisomal oxidation of long chain fatty acids. *FEBS Letters* **99**, 292-296.
- PANDE, S. V. (1975). A mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 883-887.
- PANDE, S. V. & PARVIN, R. (1976). Characterization of carnitine acylcarnitine translocase system of heart mitochondria. *J Biol Chem* **251**, 6683-6691.
- PANDE, S. V. & PARVIN, R. (1980). Carnitine-acylcarnitine translocase catalyzes an equilibrating unidirectional transport as well. . *Journal of Biological Chemistry* **255** 2994-3001
- PANTER, R. A. & MUDD, J. B. (1969). Carnitine levels in some higher plants. *FEBS Lett* **5**, 169-170.

- PARK, E. A., MYNATT, R. L., COOK, G. A. & KASHFI, K. (1995). Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I. *Biochem J* **310** (Pt 3), 853-858.
- PATTEN, B. M., WOOD, J. M., HARATI, Y., HEFFERAN, P. & HOWELL, R. R. (1979). Familial recurrent rhabdomyolysis due to carnitine palmitoyl transferase deficiency. *The American Journal of Medicine* **67**, 167-171.
- PEITSCH, M. C. (1995). Protein modelling by e-mail. *Biotechnology (N Y)* **13**, 658-660.
- POLGAR, L. (1992). Structural relationship between lipases and peptidases of the prolyl oligopeptidase family. *FEBS Lett* **311**, 281-284.
- PONGRATZ, D. & ZIERZ, S. (2003). *Neuromuskuläre Erkrankungen - Diagnostik, interdisziplinäre Therapie und Selbsthilfe*, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln; 1. Auflage.
- POTTERTON, E., BRIGGS, P., TURKENBURG, M. & DODSON, E. (2003). A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallographica Section D* **59**, 1131-1137.
- POWELL, G. L., GROTHUSEN, J. R., ZIMMERMAN, J. K., EVANS, C. A. & FISH, W. W. (1981). A re-examination of some properties of fatty acyl-CoA micelles. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 12740-12747.
- PRICE, N., VAN DER LEIJ, F., JACKSON, V., CORSTORPHINE, C., THOMSON, R., SORESENSEN, A. & ZAMMIT, V. (2002). A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* **80**, 433-442.
- PULA, T. P., MAX, S. R., ZIELKE, H. R., CHACON, M., BAAB, P., GUMBINAS, M. & REED, W. D. (1981). Selective carnitine palmitoyltransferase deficiency in fibroblasts from a patient with muscle CPT deficiency. *Ann Neurol* **10**, 196-198.
- RAMSAY, R. R. (1988). The soluble carnitine palmitoyltransferase from bovine liver. A comparison with the enzymes from peroxisomes and from the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* **249**, 239-245.
- RAMSAY, R. R., DERRICK, J. P., FRIEND, A. S. & TUBBS, P. K. (1987). Purification and properties of the soluble carnitine palmitoyltransferase from bovine liver mitochondria. *Biochem J* **244**, 271-278.
- RAMSAY, R. R., GANDOUR, R. D. & VAN DER LEIJ, F. R. (2001). Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1546**, 21-43.
- RAMSAY, R. R. & TUBBS, P. K. (1975). The mechanism of fatty acid uptake by heart mitochondria: an acylcarnitine-carnitine exchange. *FEBS Lett* **54**, 21-25.
- RAMSAY, R. R. & TUBBS, P. K. (1976). The effects of temperature and some inhibitors on the carnitine exchange system of heart mitochondria. *Eur J Biochem* **69**, 299-303.
- REGGIANI, L., RACITI, D., AIRIK, R., KISPERT, A. & BRANDLI, A. W. (2007). The prepattern transcription factor Irx3 directs nephron segment identity. *Genes Dev* **21**, 2358-2370.
- REUSCHENBACH, C. & ZIERZ, S. (1988). Mutant carnitine palmitoyltransferase associated with myoadenylate deaminase deficiency in skeletal muscle. *The Journal of Pediatrics* **112**, 600-603.

- RUDOLPH, R. & LILIE, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb J* **10**, 49-56.
- RUFER, A. C., LOMIZE, A., BENZ, J., CHOMIENNE, O., THOMA, R. & HENNIG, M. (2007). Carnitine palmitoyltransferase 2: Analysis of membrane association and complex structure with a substrate analog. *FEBS Letters* **581**, 3247-3252.
- RUFER, A. C., THOMA, R., BENZ, J., STIHLE, M., GSELL, B., DE ROO, E., BANNER, D. W., MUELLER, F., CHOMIENNE, O. & HENNIG, M. (2006). The Crystal Structure of Carnitine Palmitoyltransferase 2 and Implications for Diabetes Treatment. *Structure* **14**, 713-723.
- RUMPF, K. W., KAISER, H., GOEBEL, H. H., WAGNER, H. A., ULLMANN, B., DiMAURO, S. & SCHELER, F. (1983). [Muscular carnitine-palmityl-transferase deficiency]. *Dtsch Med Wochenschr* **108**, 1058-1061.
- SABINA, R. L. (2000). Myoadenylate deaminase deficiency. A common inherited defect with heterogeneous clinical presentation. *Neurol Clin* **18**, 185-194.
- SAGGERSON, E. D. & CARPENTER, C. A. (1982). Regulation of hepatic carnitine palmitoyltransferase activity during the foetal-neonatal transition. *FEBS Lett* **150**, 177-180.
- SAIJO, T., WELCH, W. J. & TANAKA, K. (1994). Intramitochondrial folding and assembly of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD). Demonstration of impaired transfer of K304E-variant MCAD from its complex with hsp60 to the native tetramer. *J Biol Chem* **269**, 4401-4408.
- SAUDUBRAY, J. M., MARTIN, D., DE LONLAY, P., TOUATI, G., POGGI-TRAVERT, F., BONNET, D., JOUVET, P., BOUTRON, M., SLAMA, A., VIANEY-SABAN, C., BONNEFONT, J. P., RABIER, D., KAMOUN, P. & BRIVET, M. (1999). Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inherit Metab Dis* **22**, 488-502.
- SCHAEFER, J., JACKSON, S., TARONI, F., SWIFT, P. & TURNBULL, D. M. (1997). Characterisation of carnitine palmitoyltransferases in patients with a carnitine palmitoyltransferase deficiency: implications for diagnosis and therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **62**, 169-176.
- SCELLENBERGER, A., FISCHER, G., HÜBNER, G. & ULBRICH, R. (1989). *Enzymkatalyse - Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme*. Springer Verlag.
- SCHOLTE, H. R., JENNEKENS, F. G. I. & BOUVY, J. J. B. J. (1979). Carnitine palmitoyltransferase II deficiency with normal carnitine palmitoyltransferase I in skeletal muscle and leucocytes. *Journal of the Neurological Sciences* **40**, 39-51.
- SCHULZ, H. (1987). Inhibitors of fatty acid oxidation. *Life Sciences* **40**, 1443-1449.
- SCHWEDE, T., KOPP, J., GUEX, N. & PEITSCH, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**, 3381-3385.
- SCHWENK, R. W., HOLLOWAY, G. P., LUIKEN, J. J. F. P., BONEN, A. & GLATZ, J. F. C. (2010). Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **82**, 149-154.

- SEKINE, T., KUSUHARA, H., UTSUNOMIYA-TATE, N., TSUDA, M., SUGIYAMA, Y., KANAI, Y. & ENDOU, H. (1998). Molecular cloning and characterization of high-affinity carnitine transporter from rat intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 586-591.
- SHI, J., ZHU, H., ARVIDSON, D. N., CREGG, J. M. & WOLDEGIORGIS, G. (1998). Deletion of the conserved first 18 N-terminal amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA sensitivity and binding. *Biochemistry* **37**, 11033-11038.
- SHI, J., ZHU, H., ARVIDSON, D. N. & WOLDEGIORGIS, G. (1999). A single amino acid change (substitution of glutamate 3 with alanine) in the N-terminal region of rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA inhibition and high affinity binding. *J Biol Chem* **274**, 9421-9426.
- SHI, J., ZHU, H., ARVIDSON, D. N. & WOLDEGIORGIS, G. (2000). The First 28 N-Terminal Amino Acid Residues of Human Heart Muscle Carnitine Palmitoyltransferase I Are Essential for Malonyl CoA Sensitivity and High-Affinity Binding. *Biochemistry* **39**, 712-717.
- SHINAGAWA, S., KANAMARU, T., HARADA, S., ASAI, M. & OKAZAKI, H. (1987). Chemistry and inhibitory activity of long chain fatty acid oxidation of emeramine and its analogues. *J Med Chem* **30**, 1458-1463.
- SIGAUKE, E., RAKHEJA, D., KITSON, K. & BENNETT, M. J. (2003). Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency: A Clinical, Biochemical, and Molecular Review. **83**, 1543-1554.
- SMEETS, R. J., SMEITINK, J. A., SEMMEKROT, B. A., SCHOLTE, H. R., WANDERS, R. J. & VAN DEN HEUVEL, L. P. (2003). A novel splice site mutation in neonatal carnitine palmitoyl transferase II deficiency. *J Hum Genet* **48**, 8-13.
- SMEITINK, J., SCHOLTE, J., DURAN, R., WENDEL, U., COSTA, C., RUITENBEEK, W., WANDERS, R., RUBIO-GOZALBO, E., SENGERS, R., TRIJBELS, F. & VAN DEN HEUVEL, B. (1998). Treatment and molecular analysis of neonatal carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *J Inherit Metab Dis* **21**, O2.
- SMOLLE, K. H., KAUFMANN, P. & GASSER, R. (2001). Recurrent rhabdomyolysis and acute respiratory failure due to carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Intensive Care Med* **27**, 1235.
- STEIBER, A., KERNER, J. & HOPPEL, C. L. (2004). Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Molecular Aspects of Medicine* **25**, 455-473.
- STEITZ, T. A. & SHULMAN, R. G. (1982). Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. *Annu Rev Biophys Bioeng* **11**, 419-444.
- STRACK, E. & FORSTERLING, K. (1953). [The stimulating effect of esters of L-carnitine on isolated organs]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **295**, 377-387.
- SUSSMAN, J. L., HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L. & SILMAN, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**, 872-879.
- SWANSON, S. T., FOSTER, D. W., MCGARRY, J. D. & BROWN, N. F. (1998). Roles of the N- and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues. *Biochem J* **335 (Pt 3)**, 513-519.

- TAGGART, R. T., SMAIL, D., APOLITO, C. & VLADUTIU, G. D.** (1999). Novel mutations associated with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Mutat* **13**, 210-220.
- TAKETA, K. & POGELL, B. M.** (1966). The effect of palmityl coenzyme A on glucose 6-phosphate dehydrogenase and other enzymes. *J Biol Chem* **241**, 720-726.
- TANPHAICHITR, V. & BROQUIST, H. P.** (1973). Role of lysine and -N-trimethyllysine in carnitine biosynthesis. II. Studies in the rat. *J Biol Chem* **248**, 2176-2181.
- TARONI, F., GELLERA, C., CAVADINI, P., BARATTA, S., LAMANTEA, E., S, D., DiDONATO, S., REIK, R. & BENKE, P.** (1994). Lethal carnitine palmitoyltransferase (CPT) II deficiency in newborns: A molecular genetic study. *Am J Hum Genet* **55**, A245.
- TARONI, F., VERDERIO, E., DWORZAK, F., WILLEMS, P. J., CAVADINI, P. & DiDONATO, S.** (1993). Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients. *Nat Genet* **4**, 314-320.
- TARONI, F., VERDERIO, E., FIORUCCI, S., CAVADINI, P., FINOCCHIARO, G., UZIEL, G., LAMANTEA, E., GELLERA, C. & DiDONATO, S.** (1992). Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *PNAS* **89**, 8429-8433.
- TERRIAULT, D. G. & MEHLMAN, M. A.** (1965). Metabolism of carnitine in cold-acclimated rats. *Can J Biochem* **43**, 1437-1443.
- THUILLIER, L., ROSTANE, H., DROIN, V., DEMAUGRE, F., BRIVET, M. L., KADHOM, N., PRIP-BUUS, C., GOBIN, S. P., SAUDUBRAY, J.-M. & BONNEFONT, J.-P.** (2003). Correlation between genotype, metabolic data, and clinical presentation in carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) deficiency. *Human Mutation* **21**, 493-501.
- THUILLIER, L., SEVIN, C., DEMAUGRE, F., BRIVET, M., RABIER, D., DROIN, V., AUPETIT, J., ABADI, N., KAMOUN, P., SAUDUBRAY, J. M. & BONNEFONT, J. P.** (2000). Genotype/phenotype correlation in carnitine palmitoyltransferase II deficiency: lessons from a compound heterozygous patient. *Neuromuscul Disord* **10**, 200-205.
- TIPPETT, P. S. & NEET, K. E.** (1982). An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A. *J Biol Chem* **257**, 12846-12852.
- TOMITA, M. & SENDJU, Y.** (1927). Über die Oxyaminverbindungen, welche die Biuretreaktion zeigen. III Spaltung der gamma Amino-beta-oxybuttersäure in die optisch-aktiven Komponenten. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **169**, 263-277.
- TONAZZI, A., GIANGREGORIO, N., INDIVERI, C. & PALMIERI, 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 (BBA) - Bioenergetics* **1787**, 1009-1015.
- TRAUFELLER, K., GELLERICH, F. N. & ZIERZ, S.** (2004). Different sensitivities of CPT I and CPT II for inhibition by -aminocarnitine in human skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1608**, 149-154.

- VAGIN, A. A., STEINER, R. A., LEBEDEV, A. A., POTTERTON, L., McNICHOLAS, S., LONG, F. & MURSHUDOV, G. N. (2004). REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2184-2195.
- VARSHAVSKY, A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* **2**, 13-28.
- VELASCO, G., GEELLEN, M. J., GOMEZ DEL PULGAR, T. & GUZMAN, M. (1998a). Malonyl-CoA-independent acute control of hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and cytoskeletal components. *J Biol Chem* **273**, 21497-21504.
- VELASCO, G., GEELLEN, M. J. & GUZMAN, M. (1997). Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch Biochem Biophys* **337**, 169-175.
- VELASCO, G., GOMEZ DEL PULGAR, T., CARLING, D. & GUZMAN, M. (1998b). Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components. *FEBS Lett* **439**, 317-320.
- VENTURA, F. V., IJLST, L., RUITER, J., OFMAN, R., COSTA, C. G., JAKOBS, C., DURAN, M., TAVARES DE ALMEIDA, I., BIEBER, L. L. & WANDERS, R. J. (1998). Carnitine palmitoyltransferase II specificity towards beta-oxidation intermediates--evidence for a reverse carnitine cycle in mitochondria. *Eur J Biochem* **253**, 614-618.
- 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. *Hum Mol Genet* **4**, 19-29.
- VERDERIO, E., CAVADINI, P., PANDOLFO, M., DiDONATO, S. & TARONI, F. (1993). Two novel sequence polymorphisms of the human carnitine palmitoyltransferase II (CPT1) gene. *Hum Mol Genet* **2**, 334.
- VIGGIANO, L., IACOBazzi, V., MARZELLA, R., CASSANO, C., ROCCHI, M. & PALMIERI, F. (1997). Assignment of the carnitine/acylcarnitine translocase gene (CACT) to human chromosome band 3p21.31 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **79**, 62-63.
- VIOLANTE, S., IJLST, L., VAN LENTHE, H., DE ALMEIDA, I. T., WANDERS, R. J. & VENTURA, F. V. (2010). Carnitine palmitoyltransferase 2: New insights on the substrate specificity and implications for acylcarnitine profiling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **In Press, Corrected Proof**.
- VLADUTIU, G. D. (2001). Heterozygosity: an expanding role in proteomics. *Mol Genet Metab* **74**, 51-63.
- VLADUTIU, G. D., BENNETT, M. J., FISHER, N. M., SMAIL, D., BORJACK, R., LEDDY, J. & PENDERGAST, D. R. (2002a). Phenotypic variability among first-degree relatives with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Muscle Nerve* **26**, 492-498.
- VLADUTIU, G. D., QUACKENBUSH, E. J., HAINLINE, B. E., ALBERS, S., SMAIL, D. S. & BENNETT, M. J. (2002b). Lethal neonatal and severe late infantile forms of carnitine palmitoyltransferase II deficiency associated with compound heterozygosity for different protein truncation mutations. *J Pediatr* **141**, 734-736.
- VLADUTIU, G. D., SAPONARA, I., CONROY, J. M., GRIER, R. E., BRADY, L. & BRADY, P. (1992). Immunoquantitation of carnitine palmitoyl transferase in skeletal muscle of 31 patients. *Neuromuscular Disorders* **2**, 249-259.

- VOCKLEY, J., RINALDO, P., BENNETT, M. J., MATERN, D. & VLADUTIU, G. D. (2000). Synergistic heterozygosity: disease resulting from multiple partial defects in one or more metabolic pathways. *Mol Genet Metab* **71**, 10-18.
- WATAYA, K., AKANUMA, J., CAVADINI, P., AOKI, Y., KURE, S., INVERNIZZI, F., YOSHIDA, I., KIRA, J., TARONI, F., MATSUBARA, Y. & NARISAWA, K. (1998). Two CPT2 mutations in three Japanese patients with carnitine palmitoyltransferase II deficiency: functional analysis and association with polymorphic haplotypes and two clinical phenotypes. *Hum Mutat* **11**, 377-386.
- WEIS, B. C., ESSER, V., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D. (1994). Rat heart expresses two forms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. The minor component is identical to the liver enzyme. *J Biol Chem* **269**, 18712-18715.
- WEST, D. W., CHASE, J. F. & TUBBS, P. K. (1971). The separation and properties of two forms of carnitine palmitoyltransferase from ox liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **42**, 912-918.
- WIELAND, O., WEISS, L. & EGER-NEUFELDT, I. (1964). [Inhibition of Enzymatic Citric Acid Synthesis by Long-Chain Acyl-Thioesters of Coenzyme a]. *Biochem Z* **339**, 501-513.
- 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.
- WIESER, T., DESCHAUER, M. & ZIERZ, S. (1997). Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: Three novel mutations. *Ann Neurol* **42**, 414.
- WILCKEN, B. (2008). More on medium-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in a neonate. *N Engl J Med* **358**, 647.
- WILCKEN, B. (2010). Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis* **33**, 501-506.
- WILKINSON, D. L. & HARRISON, R. G. (1991). Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. *Biotechnology (N Y)* **9**, 443-448.
- WINKLER, F. K., D'ARCY, A. & HUNZIKER, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771-774.
- WITT, D. R., THEOBALD, M., SANTA-MARIA, M., PACKMAN, S., TOWNSEND, S., SWEETMAN, L., GOODMAN, S., RHEAD, W. & HOPPEL, C. L. (1991). Carnitine palmitoyltransferase-type 2 deficiency. *Am J Hum Genet* **49**, 109.
- WOELTJE, K. F., ESSER, V., WEIS, B. C., COX, W. F., SCHROEDER, J. G., LIAO, S. T., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D. (1990a). Inter-tissue and inter-species characteristics of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. *J Biol Chem* **265**, 10714-10719.
- WOELTJE, K. F., ESSER, V., WEIS, B. C., SEN, A., COX, W. F., MCPHAUL, M. J., SLAUGHTER, C. A., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D. (1990b). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase II. *J Biol Chem* **265**, 10720-10725.

- WOELTJE, K. F., KUWAJIMA, M., FOSTER, D. W. & MCGARRY, J. D. (1987). Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. II. Use of detergents and antibodies. *J Biol Chem* **262**, 9822-9827.
- WOLDEGIORGIS, G., BREMER, J. & SHRAGO, E. (1985). Substrate inhibition of carnitine palmitoyltransferase by palmitoyl-CoA and activation by phospholipids and proteins. *Biochim Biophys Acta* **837**, 135-140.
- WOLDEGIORGIS, G., SHI, J., ZHU, H. & ARVIDSON, D. N. (2000). Functional Characterization of Mammalian Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferases I and II Expressed in the Yeast *Pichia pastoris*. *J. Nutr.* **130**, 310-.
- WOLF, G. & BERGER, C. R. (1961). Studies on the biosynthesis and turnover of carnitine. *Arch Biochem Biophys* **92**, 360-365.
- WOLF, H. P. & ENGEL, D. W. (1985). Decrease of fatty acid oxidation, ketogenesis and gluconeogenesis in isolated perfused rat liver by phenylalkyl oxirane carboxylate (B 807-27) due to inhibition of CPT I (EC 2.3.1.21). *European Journal of Biochemistry* **146**, 359-363.
- WU, D., GOVINDASAMY, L., LIAN, W., GU, Y., KUKAR, T., AGBANDJE-MCKENNA, M. & MCKENNA, R. (2003). Structure of human carnitine acetyltransferase. Molecular basis for fatty acyl transfer. *J Biol Chem* **278**, 13159-13165.
- WU, X., PRASAD, P. D., LEIBACH, F. H. & GANAPATHY, V. (1998). cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 589-595.
- YAMAMOTO, S., ABE, H., KOHGO, T., OGAWA, A., OHTAKE, A., HAYASHIBE, H., SAKURABA, H., SUZUKI, Y., ARAMAKI, S., TAKAYANAGI, M., HASEGAWA, S. & NIIMI, H. (1996). Two novel gene mutations (Glu174-->Lys, Phe383-->Tyr) causing the "hepatic" form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Genet* **98**, 116-118.
- YAMAZAKI, N., SHINOHARA, Y., SHIMA, A. & TERADA, H. (1995). High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett* **363**, 41-45.
- 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. *Biochim Biophys Acta* **1307**, 157-161.
- YANG, B., DING, J., ROE, D., DEMAUGRE, F., BRIVET, M. & ROE, C. (1997). Carnitin palmitoyltransferase II deficiency: Clinical forms and mutations. *Proceedings, 7th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Vienna, May*, 21-25.
- YANG, B.-Z., DING, J.-H., DEWESE, T., ROE, D., HE, G., WILKINSON, J., DAY, D. W., DEMAUGRE, F., RABIER, D., BRIVET, M. & ROE, C. (1998a). Identification of Four Novel Mutations in Patients with Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) Deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* **64**, 229-236.
- YANG, B.-Z., DING, J.-H., ROE, D., DEWESE, T., DAY, D. & ROE, C. (1998b). A novel mutation identified in carnitin palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* **53**, 110-115.

- YAO, D., MIZUGUCHI, H., YAMAGUCHI, M., YAMADA, H., CHIDA, J., SHIKATA, K. & KIDO, H. (2008). Thermal instability of compound variants of carnitine palmitoyltransferase II and impaired mitochondrial fuel utilization in influenza-associated encephalopathy. *Hum Mutat* **29**, 718-727.
- YATES, D. W. & GARLAND, P. B. (1966). The partial latency and intramitochondrial distribution of carnitine-palmitoyltransferase (e.c.2.3.1.-), and the CoASH and carnitine permeable space of rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **23**, 460-465.
- YATES, D. W. & GARLAND, P. B. (1970). Carnitine palmitoyltransferase activities (EC 2.3.1.-) of rat liver mitochondria. *Biochem J* **119**, 547-552.
- YU, G. S., LU, Y. C. & GULICK, T. (1998). Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I beta gene promoters by fatty acid enzyme substrate. *J Biol Chem* **273**, 32901-32909.
- ZACHARIAS, D. E., MURRAY-RUST, P., PRESTON, R. M. & GLUSKER, J. P. (1983). The geometry of the thioester group and its implications for the chemistry of acyl coenzyme A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **222**, 22-34.
- ZAHLER, W. L., BARDEN, R. E. & CLELAND, W. W. (1968). Some physical properties of palmityl-coenzyme A micelles. *Biochim Biophys Acta* **164**, 1-11.
- ZAMMIT, V. A. (2010). Regulation of Ketogenesis in Liver. *In Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- ZAMMIT, V. A., FRASER, F. & ORSTORPHINE, C. G. (1997). Regulation of mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase (CPT I): role of membrane-topology. *Adv Enzyme Regul* **37**, 295-317.
- ZAMMIT, V. A., RAMSAY, R. R., BONOMINI, M. & ARDUINI, A. (2009). Carnitine, mitochondrial function and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 1353-1362.
- 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. *J. Biol. Chem.* **277**, 42219-42223.
- ZHU, H., SHI, J., CREGG, J. M. & WOLDEGIORGIS, G. (1997a). Reconstitution of highly expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 498-502.
- ZHU, H., SHI, J., DE VRIES, Y., ARVIDSON, D. N., CREGG, J. M. & WOLDEGIORGIS, G. (1997b). Functional studies of yeast-expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I. *Arch Biochem Biophys* **347**, 53-61.
- ZIERZ, S. (1994). *Myology: Basic and clinical: 2nd ed. Carnitine palmitoyltransferase deficiency*. Mc Graw-Hill, New York.
- ZIERZ, S. & ENGEL, A. G. (1987). Are there two forms of carnitine palmitoyltransferase in muscle? *Neurology* **37**, 1785-1790.

10Anhang

alignment der humanen Carnitin O-acyltransferasen

			10		20		30		40		50
<i>hCPT2</i>	1		----- ----- ----- ----- -----								
<i>hCOT</i>	1		----- ----- ----- ----- -----								
<i>hCAT</i>	1		----- ----- ----- ----- -----								
<i>hCPT1b</i>	1		MAEAHQAVAF		QFTVTPDGV		FRLSREALKH		VYLSGINSWK		KRLIRIKNGI
<i>Consensus</i>											
			60		70		80		90		100
<i>hCPT2</i>	1		----- ----- ----- ----- -----								
<i>hCOT</i>	1		----- ----- ----- ----- -----								
<i>hCAT</i>	1		----- ----- ----- ----- -----								
<i>hCPT1b</i>	51		LRGVYPGSPT		SWLVVIMATV		GSSFCNVDIS		LGLVSCIQRC		LPQGCOPYQT
<i>Consensus</i>											
			110		120		130		140		150
<i>hCPT2</i>	1		----- ----- ----- ----- -----								
<i>hCOT</i>	1		----- ----- ----- ----- -----								
<i>hCAT</i>	1		----- ----- ----- ----- -----								
<i>hCPT1b</i>	101		PQTRALLSMA		IFSTGVWVTG		IFFFRQTLKL		LLCYHGWME		MHGKTSNLTR
<i>Consensus</i>											
			160		170		180		190		200
<i>hCPT2</i>	27		AGSGPGQYLQ		RSIVPTMHYQ		DSLPLRLPIPK		LEDTIRRYLS		AQKPLLNDGQ
<i>hCOT</i>	1		--MENQLAK		STEERTFQYQ		DSLPSLPVPS		LEESLKKYLE		SVKPFANQEE
<i>hCAT</i>	13		LGFLKPFSLM		KASSRFKAHQ		DALPLRPVPP		LQQLDHYLK		ALQPIVSEEE
<i>hCPT1b</i>	151		IWAMCIRLLS		SRHPMLYSFQ		TSLPKLPVPR		VSATIQRYLE		SVRPLLDEEE
<i>Consensus</i>					*		** * * *		: : : * :		: : * : : :
			210		220		230		240		250
<i>hCPT2</i>	77		FRKTEQFCKS		FENGIGKELH		EQLVALDKQN		KHTSYISGPW		FDMYLSARDS
<i>hCOT</i>	48		YKKTEEIVQK		FQS--GIGEK		LHQKLLERAK		GKRNWLEEW		LNVAYLVDRI
<i>hCAT</i>	63		WAHTKQLVDE		FQASGGVGER		LQKGLERRAR		KTENWLSEWW		LKTAYLQYRQ
<i>hCPT1b</i>	201		YYRMELLAKE		FQD--KTAPR		LQKYLVLKSW		WASNYSVDWW		EEYIYLRGRS
<i>Consensus</i>	21		: : : : .		* :		:		: : : *		.
			260		270		280		290		300
<i>hCPT2</i>	127		VVLNFPFMA		FNPDPKSEYN		DQLTRATNMT		VSAIRFLKTL		RAGLLEPEVF
<i>hCOT</i>	96		PSQLNVNFA		P--AAHFEHY		WPPKEGTQLE		RGSITLWNNL		NYWQLLRKEK
<i>hCAT</i>	113		P--VVIYSS		P--GVMLPKQ		DFVDLQGQLR		FAAKLIEGVL		DFKVMIDNET
<i>hCPT1b</i>	249		PLMVNSNYV		M--DLVLIKN		---TDVQAAR		LGNIIHAMIM		YRRKLDREEI
<i>Consensus</i>			:		:		:		:		:
			310		320		330		340		350
<i>hCPT2</i>	177		HLNPAKSDTI		TFKRILRFVP		SSLSWYGAYL		VNAYPLDMSQ		YFRLFNSTR
<i>hCOT</i>	144		VP-----		-----VHK		VGNTPLDMNQ		FRMLFSTCKV		
<i>hCAT</i>	158		LP-----		-----VEY		LGGKPLCMNQ		YYQILSSCRV		
<i>hCPT1b</i>	294		KP-----		-----VMA		LGIVPMCSYQ		MERMFNTR		
<i>Consensus</i>							:		: : * :		: : : : :
			360		370		380		390		400
<i>hCPT2</i>	227		PKPSRDELF		DDKAR----		--HLLVLRKG		NFYIFDVL		DGNIVSPSEI
<i>hCOT</i>	169		PGITRDSIMN		YFRTESEGRS		PNHIVVLCRG		RAFVFDVIH		EGCLVTPEEL
<i>hCAT</i>	183		PQPKQDTSN		FSKTK--KP		PTHITVVHNY		QFFELDVYHS		DGTPLTADQI
<i>hCPT1b</i>	319		PQKQDVLQH		LSDSR-----		--HVAVYHKG		RFFKLWLYEG		ARLLKPQDLE
<i>Consensus</i>	46		* * :		: :		* : *		: : : :		.

		410	420	430	440	450
<i>hCPT2</i>	270	Q A H L K Y I L S D	S S P A P E F P - L	A Y L T S E N R D I	W A E L R Q K L M S	S G N E E - - S L R
<i>hCOT</i>	218	L R Q L T Y I H K K	C H S E P D G P G I	A A L T S E E R T R	W A K A R E Y L I G	L D P E N L A L L E
<i>hCAT</i>	230	F V Q L E K I W N S	S L Q T N K E P - V	G I L T S N H R N S	W A K A Y N T L I -	K D K V N R D S V R
<i>hCPT1b</i>	362	M Q F Q R I L D D P	S P P Q P G E E K L	A A L T A G G R V E	W A Q A R Q A F F S	S G K N K A A L E A
<i>Consensus</i>		: .	: . * * : *	* * : : : :	: : :	: :
		460	470	480	490	500
<i>hCPT2</i>	317	K V D S A V F C L C	L D D F P I K D L V	H L S H N M L H G D	G T N - - - - -	- - - R W F D K S F
<i>hCOT</i>	268	K I Q S S L L V Y S	M E D S S P H V T P	E D Y S E I I A A I	L I G - - - - -	D P T V R W G D K S Y
<i>hCAT</i>	278	S I Q K S I F T V C	L D A T M P R V S E	D V Y R S H V A G Q	M L H G G G S R L N	S G N R W F D K T L
<i>hCPT1b</i>	412	I E R A A F F V A L	D E E S Y S Y D P E	D E A S L S L Y G K	A L L H G - - - - N	C Y N R W F D K S F
<i>Consensus</i>		: : :	:	: .	: :	* * * * :
		510	520	530	540	550
<i>hCPT2</i>	357	N L I I A K D G S T	A V H F E H S W G D	G V A V L R F F N E	V F K - - D S T Q T	P A V T P Q S Q P A
<i>hCOT</i>	312	N L I S F S N G V F	G C N C D H A P F D	A M I M V N I S Y Y	V D - - - - E K I F	Q N E G R W K G S E
<i>hCAT</i>	328	Q F I V A E D G S C	G L V Y E H A A A E	G P P I V T L L D Y	V I - - - - E Y T K	K P E - - - L V R S
<i>hCPT1b</i>	458	T L I S F K N G Q L	G L N A E H A W A D	A P I I G H L W E F	V L G T D S F H L G	Y T E T G H C L G K
<i>Consensus</i>		: * : *	: * : :	: : :	*	: :
		560	570	580	590	600
<i>hCPT2</i>	405	T T D S T V T V Q K	L N F E L T D A L K	T G I T A A K E K F	D A T M K T L T I D	C V Q F Q R G G K E
<i>hCOT</i>	358	K V R D I P L P E E	L I F I V D E K V L	N D I N Q A K A Q Y	L R E A S D L Q I A	A Y A F T S F G K K
<i>hCAT</i>	371	P L V P L M P K K	L R F N I T P E I K	S D I E K A K Q N L	S I M I Q D L D I T	V M V F H F G K D
<i>hCPT1b</i>	508	P N P A L A P P T R	L Q W D I P K Q C Q	A V I E S S Y Q V A	K A L A D D V E L Y	C F Q F L P F G K G
<i>Consensus</i>		: : :	* : :	* : :	: : :	* * * * :
		610	620	630	640	650
<i>hCPT2</i>	455	F L K K Q K L S P D	A V A Q L A F Q M A	F L R Q Y G Q T V A	T Y E S C S T A A F	K H G R T E T I R P
<i>hCOT</i>	408	L T K N K M L H P D	T F I Q L A L Q L A	Y Y R L H G H P G C	C Y E T A M T R H F	Y H G R T E T M R S
<i>hCAT</i>	421	F P K S E K L S P D	A F I Q M A L Q L A	Y Y R I Y G Q A C A	T Y E S A S L R M F	H L G R T D T I R S
<i>hCPT1b</i>	558	L I K K C R T S P D	A F V Q I A L Q L A	H F R D R G K F C L	T Y E A S M T R M F	R E G R T E T V R S
<i>Consensus</i>	99	: * .	* * : : * * : *	: * * :	* * : .	* * * * : * .
		660	670	680	690	700
<i>hCPT2</i>	505	A S V Y T K R C S E	A F V R E P S R H S	A G E L Q Q M M V E	C S K Y H G Q L T K	E A A M G Q G F D R
<i>hCOT</i>	458	C T V E A V R W C Q	S M Q D - - P S V N	L R E R Q Q K M L Q	A F A K H N K M M K	D C S A G K G F D R
<i>hCAT</i>	471	A S M D S L T F V K	A M D D - - S S V T	E H Q K V E L L R K	A V Q A H R G Y T D	R A I R G E A F D R
<i>hCPT1b</i>	608	C T S E S T A F V Q	A M M E - - G S H T	K A D L R D L F Q K	A A K K H Q N M Y R	L A M T G A G I D R
<i>Consensus</i>	124	: : :	: : :	: : : :	: *	: * : * *
		710	720	730	740	750
<i>hCPT2</i>	555	H L F A L R H L A A	A K G I I - - - -	- - L P E L Y L D P	A Y G Q I N H N - -	V L S T S T L S S P
<i>hCOT</i>	506	H L L G L L L I A K	E E G L P - - - -	- - V P E L F T D P	L F S K S G G G G N	F V L S T S L V G Y
<i>hCAT</i>	519	H L L G L K L Q A I	E D L V S - - - -	- - M P D I F M D T	S Y A I A M H - - F	H L S T S Q V P A K
<i>hCPT1b</i>	656	H L F C L Y L V S K	Y L G V S S P F L A	E V L S E P W R L S	T S Q I P Q S Q I R	M F D P E Q H P N H
<i>Consensus</i>	139	* * : *	: :	: : : :	: :	: :
		760	770	780	790	800
<i>hCPT2</i>	596	A V N L G G F A P V	V S D G F G V G Y A	V H - D N W I G C N	V S S Y P G - - - R	N A R E F L Q C V E
<i>hCOT</i>	549	L R V Q G V V V P M	V H N G Y G F F Y H	I R - D D R F V V A	C S A W K S C P E T	D A E K L V Q L T F
<i>hCAT</i>	560	T D C V M F F G P V	V P D G Y G V C Y N	P M - E A H I N F S	L S A Y N S C A E T	N A A R L A H Y L E
<i>hCPT1b</i>	706	L G A G G G F G P V	A D D G Y G V S Y M	I A G E N T I F F H	I S S K F S S E T	N A Q R F G N H I R
<i>Consensus</i>		: *	: : * * : *	: :	* : .	: * : : :
		810				
<i>hCPT2</i>	642	K A L E D M F D A L	E G K S I K S -			
<i>hCOT</i>	598	C A F H D M I Q L M	N S T H L - - -			
<i>hCAT</i>	609	K A L L D M R A L L	Q S H P R A K L			
<i>hCPT1b</i>	756	K A L L D I A D L F	Q V P K A Y S -			
<i>Consensus</i>		* : * :	: :			

Abb. 10.1 *alignment* verschiedener Carnitin O-acyltransferase Primärsequenzen mit mitochondrialem Signalpeptid. *hCPT2*: CPT2 aus *Homo sapiens* [NCBI-Datenbankeintrag: NP_000089.1]; *hCOT*: humane peroxisomale Carnitin O-oktanoyltransferase [Q9UKG9, UniProtKB/Swiss-Prot] ; *hCAT*: humane Carnitin O-acetyltransferase [P43155, UniProtKB/Swiss-Prot]; *hCPT1b*: humane Carnitin O-palmitoyltransferase 1 Muskelisofom [Q92523, UniProtKB/Swiss-Prot]. Grad der Konservierung: „*“ identisch in allen Sequenzen des *alignments*; „:“ konservierte Substitutionen der Aminosäuren; „. “ semikonservierte Substitutionen der Aminosäuren. Das *alignment* wurde mittels ClustalW (V2.0.12, Larkin *et al.*, 2007) erstellt, die Darstellung mittels Bioedit [V7.0.5.3, Hall 2005] optimiert.

***alignment* der CPT2 aus verschiedenen Organismen**

Figure 1: Multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequences of the *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, and *Grad d. Konservierung* proteins. The alignment is organized into blocks corresponding to different structural domains, labeled with Greek letters (α1, α2, α3, α4, α5, β1, α6, α7, β2, α8, α9, α10, β3, α11, β4, β5, β6, β7, α12, α13, α14, α15, β8, α16, β9, β10, α17). The sequences are color-coded to highlight conserved residues across the species. The alignment shows high sequence identity between the species, particularly in the conserved regions. The *Grad d. Konservierung* sequence is shown in a different color (purple) to distinguish it from the other species. The alignment is presented in a grid format, with the species names on the left and the domain labels above the sequences. The sequences are aligned in blocks of 10 amino acids, with the domain labels indicating the boundaries of the structural elements. The alignment shows that the *Grad d. Konservierung* protein is highly similar to the other species, with many conserved residues highlighted in the same color. The alignment is presented in a clear and organized manner, making it easy to compare the sequences across the different species and domains.

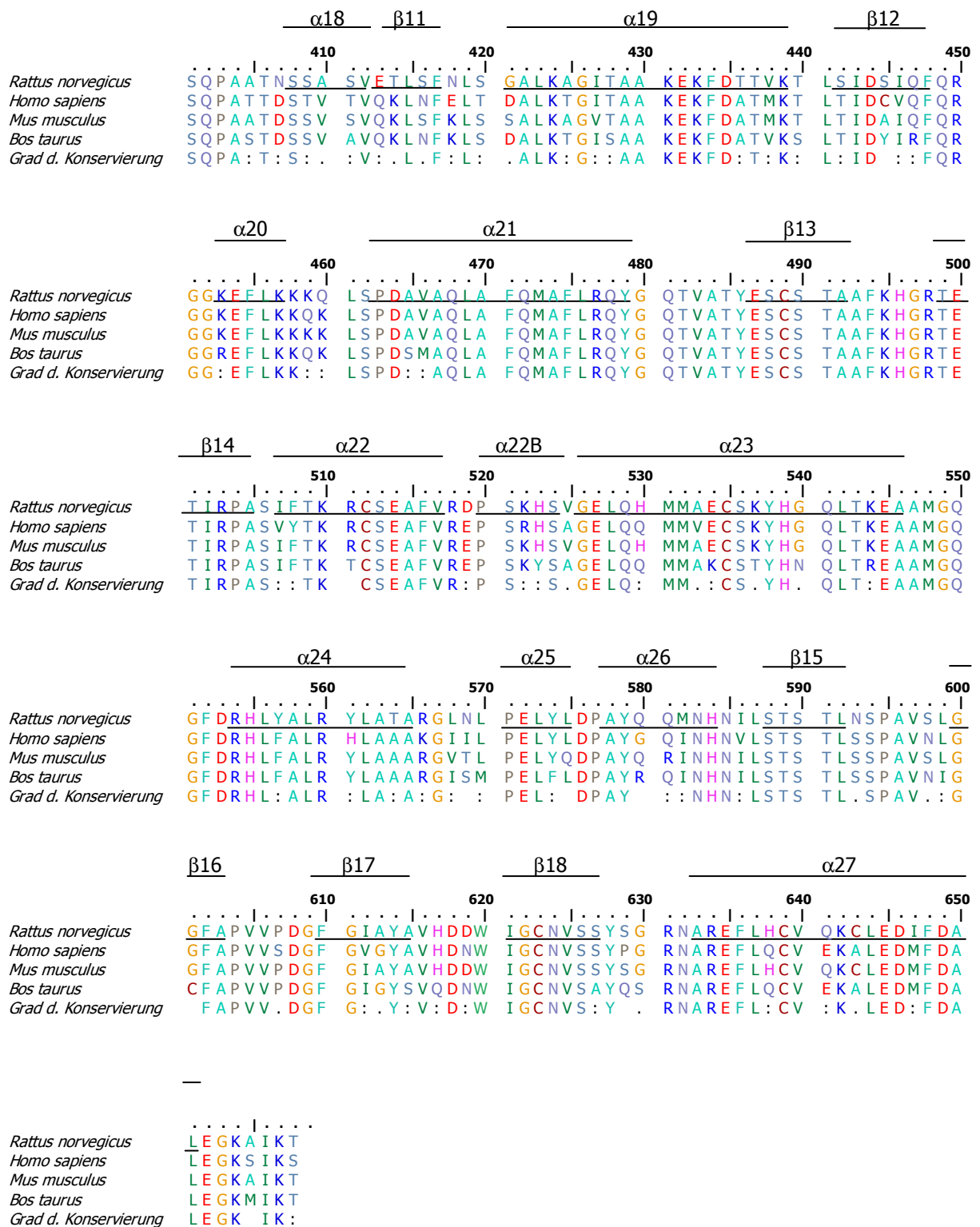


Abb. 10.2 alignment verschiedener Carnitin O-palmitoyltransferase 2-Primärsequenzen mit mitochondrialem Signalpeptid. CPT2 aus *Rattus norvegicus* [NCBI-Datenbankeintrag: NP_037062.1]; *Homo sapiens* [NP_000089.1]; *Mus musculus* [NP_034079.2]; *Bos taurus* [NP_001039354.1]. Grad der Konservierung: „Aminosäure“ identisch in allen Sequenzen des alignments; „:“ konservierte Substitutionen der Aminosäuren; „:“ semikonservierte Substitutionen der Aminosäuren. Die unterstrichenen Sequenzbereiche zeigen die Sekundärstrukturen der CPT2 aus *Rattus norvegicus*, welche obenstehend konkret definiert wurden. Das alignment wurde mittels ClustalW (V2.0.12, Larkin *et al.*, 2007) erstellt, die Darstellung mittels Bioedit [V7.0.5.3, Hall 2005] optimiert.

Plasmide

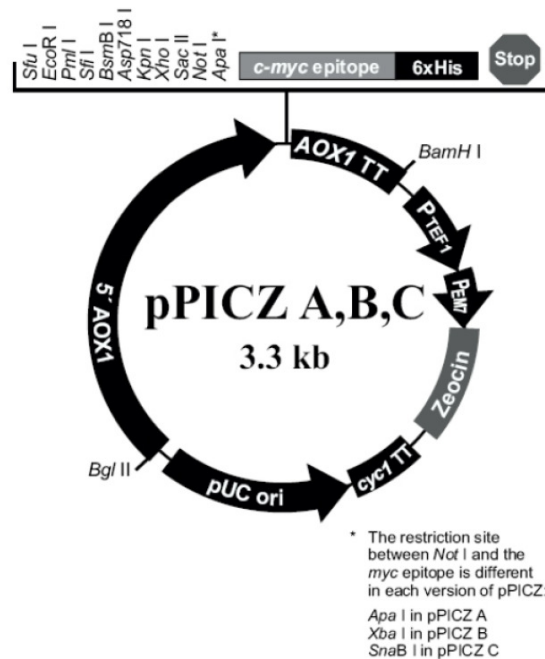


Abb. 10.3 Plasmidkarte des Vektors pPICZ B der Firma Invitrogen, USA entnommen aus dem EasySelect™ Pichia Expression-Kit. 5'AOX 1-Promotor-Region: Basen 1-941; MCS: Basen 932-1011; Hexahistidin-tag: Basen 1057-1077; AOX1-Transkriptions-Terminations-Region: Basen 1078-1418; Fragment mit TEF1-Promotor: Basen 1419-1830; EM7-Promotor: Basen 1831-1898; *she ble* [Zeocin]-ORF: Basen 1899-2273; pUC-Ursprung: Basen 2602-3275

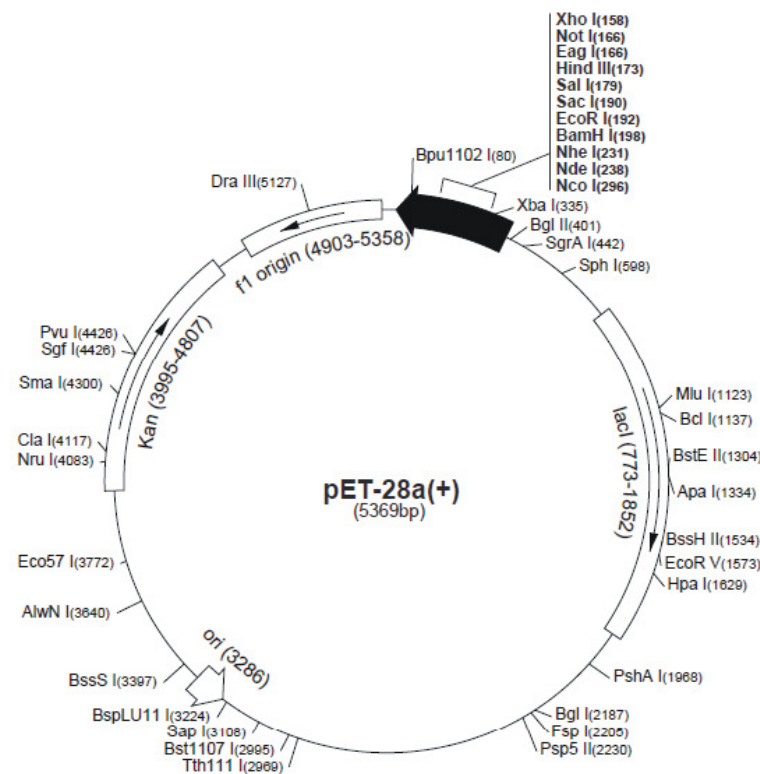


Abb. 10.4 Plasmidkarte des Vektors pET-28a(+) der Firma Novagen (Merck KGaA), Darmstadt entnommen aus dem pET-28a(+)-Manual. T7-Promotor: Basen 370-386; MCS: Basen 158-203; Hexahistidin-tag-codierende Sequenz: Basen 140-157; 270-287; T7-Terminations-Region: Basen 26-72; Kanamycin-codierende Sequenz: Basen 3995-4807; f1-Ursprung: Basen 4903-5358.

Massenspektrometrische Analyse der Peptidfragmente

His₆-N-hCPT2/TV

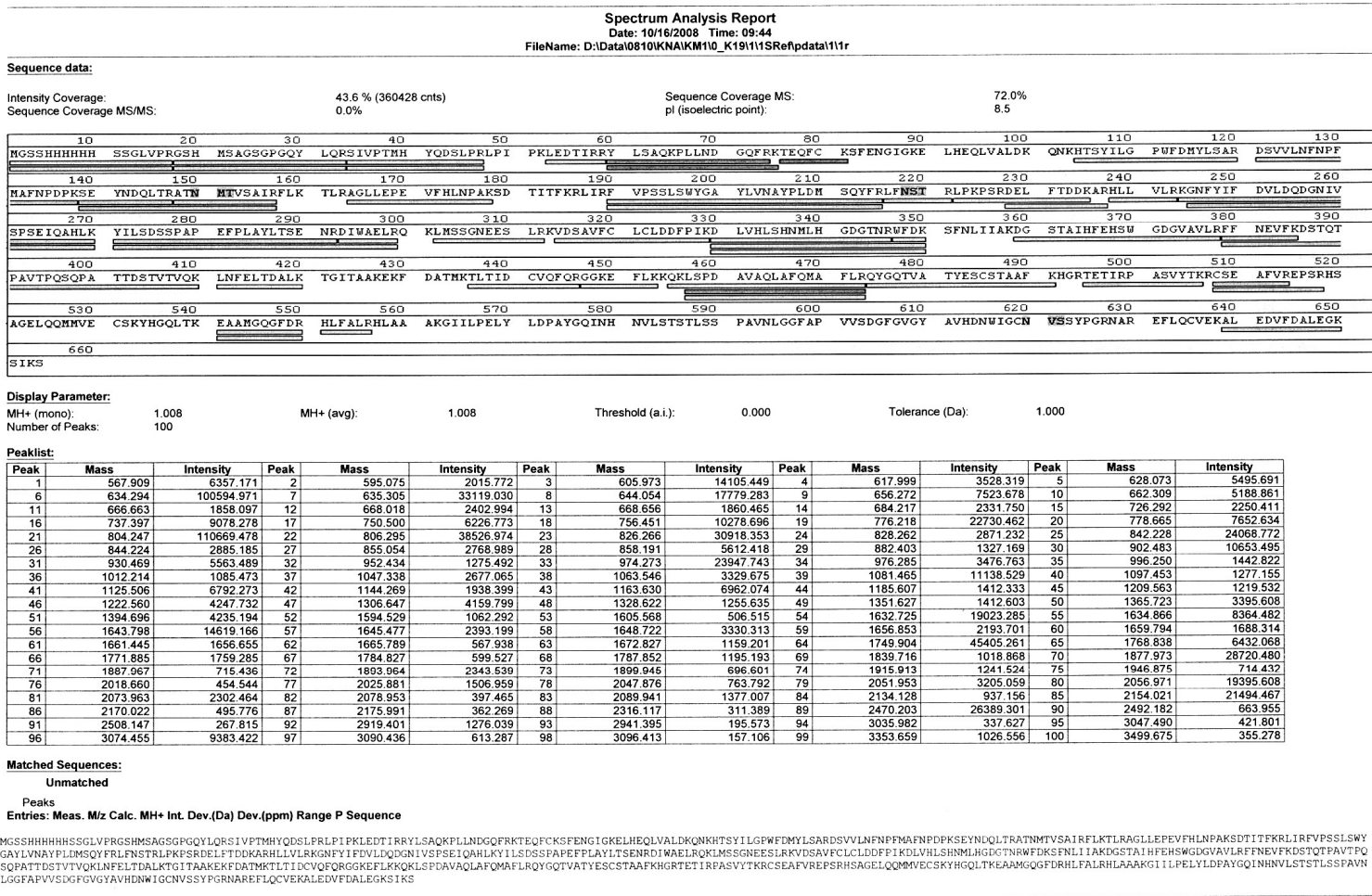


Abb.10.7 Parameter der massenspektrometrischen Analyse der His₆-N-hCPT2/TV-Fragmente. Oben: Sequenzabdeckung der CPT2-Primärsequenz. Unten: Peak-Auswertung.

His₆-N-hCPT2/S113L

Display Parameter:
MH+ (mono): 1.008 MH+ (avg): 1.008 Threshold (a.i.): 0.000 Tolerance (Da): 1.000
Number of Peaks: 79

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	541.157	1237.554	2	553.163	1576.079	3	595.208	1076.178	4	621.499	1403.896	5	634.448	1062.539
6	662.505	13063.918	7	663.575	2426.702	8	664.514	1861.522	9	737.564	1088.709	10	750.685	3008.423
11	756.639	7469.614	12	763.589	1670.305	13	782.662	1373.335	14	811.599	1077.260	15	832.523	8826.922
16	834.562	3354.743	17	902.710	9506.685	18	905.746	1908.148	19	928.751	1873.169	20	930.722	8238.869
21	956.742	3802.482	22	1081.714	1877.837	23	1097.734	1796.598	24	1125.808	3117.920	25	1163.927	2567.540
26	1189.952	3402.546	27	1209.872	1528.826	28	1222.883	1552.650	29	1238.871	961.332	30	1295.025	3971.864
31	1323.983	2327.820	32	1338.967	4014.523	33	1354.938	1517.135	34	1366.054	2740.263	35	1395.024	1891.427
36	1482.187	3468.377	37	1635.288	24569.830	38	1644.181	9842.521	39	1649.148	7798.703	40	1659.181	4446.504
41	1661.279	12607.221	42	1665.295	1322.171	43	1750.323	23440.902	44	1769.267	23546.993	45	1776.351	2921.140
46	1783.219	1659.836	47	1840.244	1228.253	48	1878.435	37576.200	49	1888.442	2264.276	50	1894.457	15101.794
51	1904.429	3886.794	52	1920.464	3454.511	53	1947.381	3718.208	54	2014.443	1168.307	55	2026.457	1856.523
56	2052.467	13862.898	57	2057.471	31849.548	58	2068.475	13077.642	59	2073.490	7570.598	60	2078.493	2173.185
61	2094.487	3174.831	62	2140.575	31670.860	63	2156.555	1215.449	64	2166.568	2632.835	65	2470.812	31234.505
66	2496.794	1282.653	67	2588.870	2475.963	68	2678.911	2548.883	69	2806.980	1341.226	70	2920.118	10311.986
71	2946.089	606.324	72	2962.120	566.666	73	3048.219	4704.536	74	3075.145	7093.727	75	3091.150	4767.042
76	3354.381	3380.550	77	3500.491	1848.619	78	3526.491	291.957	79	4186.917	195.327			

Matched Sequences:
Unmatched
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMSAGSGPGQYLQRSIVPTMHYQDSLRLPIPKLEDITIRRYLSAQKPLLNDGQFRKTEQFCKSFENGIGELHEQLVALDKQNKHTSYILGPWFDMYLSARDSVVVNFNPFMAFNDPKSEYNDQLTRATNMTVSAIRFLKTLRAGLLEPEVFHLPNPAKSDTITFKRLIRFVPSLSWY
GAYLVNAYPLDMSQYFRLFNSTRLPKPSRDELFTDDKARHLLVLRKGNFYIFDVLQDQGNIVSPSEIQAHLYILSDSSPAPEFPLAYLTSENRIWAE LRQKLMSSGNEESLRKVDSAVFCLCLDDFPDKDLVHLSHNLHLDGTDNRWFDKSNLIIAKDGTAIHFEHSWGDGVAVLRFFNEVFKDSTQTPAVTFQ
SQPATTDSVTYQKLNLFELTDALKTGITAACEKFDATMKTLTIDCVQFQGGKEFLKQKLSPDVAQLAFQMAFLRQYGTATVATYESCSTAFAKHGRTETIRPASVYTKRCSEAFVREPSRHSAGELQMMVECSKYHGQLTKEAAMQGQFDRHLFALRHLLAAAKGIILPELYLDPAYGQINHNVLSTSTLSSPAVN
LGGFAPVSDGFGVGYAVHDNWIGCNVSSYPGRNAREFLQCVEKALEDVFDALGKSIKS

Abb. 10.8 Parameter der massenspektrometrischen Analyse der His₆-N-hCPT2/S113L-Fragmente. Peak-Auswertung.

10	20	30	40	50
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSH	MSAGSGPGQY	LQRSIVPTMH	YQDSLRLPI
60	70	80	90	100
PKLEDTIRRY	LSAQKPLLND	GQFRKTEQFC	KSFENGIGKE	LHEQLVALDK
110	120	130	140	150
QNKHTSYILG	PWFDMYLSAR	DSVVLNFPF	MAFNPDPKSE	YNDQLTRATN
160	170	180	190	200
MTVS AIRFLK	TLRAGLLEPE	VFHLNPAKSD	TITFKRLIRF	VPSSLWYGA
210	220	230	240	250
YLVNAYPLDM	SQYERLENST	RLPKPSRDEL	FTDDKARHLL	VLRKGNFYIF
260	270	280	290	300
DVLDODGNIV	SPSEIOAHLK	YILSDSSPAP	EEPLAYLTSE	NRDIWAELRQ
310	320	330	340	350
KLMSSGNEES	LRKVDSAVFC	LCLDDFPIKD	LVHLSHNLH	GDGTNRWFDK
360	370	380	390	400
SFNLIIAKDG	STAVHFEHSW	GDGVAVLRFF	NEVFKDSTQT	PAVTPQSOPA
410	420	430	440	450
TTDSTVTQVK	LNfelTDALK	TGITAAKEKF	DATMKTLTID	CVQFQRGGKE
460	470	480	490	500
FLKKQKLSPD	AVAQLAFQMA	FLRQYGQTV	TYESCSTAAF	KHGRtETIRP
510	520	530	540	550
ASVYTKRCSE	AFVREPSRHS	AGELOOMMVE	CSKYHGOLTK	EAAMGOGFDR
560	570	580	590	600
HLFALRHLAG	AKGIILPELY	LDPAYGQINH	NVLSTSTLSS	PAVNLGGFAP
610	620	630	640	650
VVSDGFGVGY	AVHDNWIGCN	VSSYPGRNAR	EFLQCVEKAL	EDMFDALGK
660				
SIKS				

Abb. 10.9 Sequenzabdeckung der massenspektrometrischen Analyse der His₆-N-hCPT2/S113L-Fragmente.

DTNB-Aktivitätstest

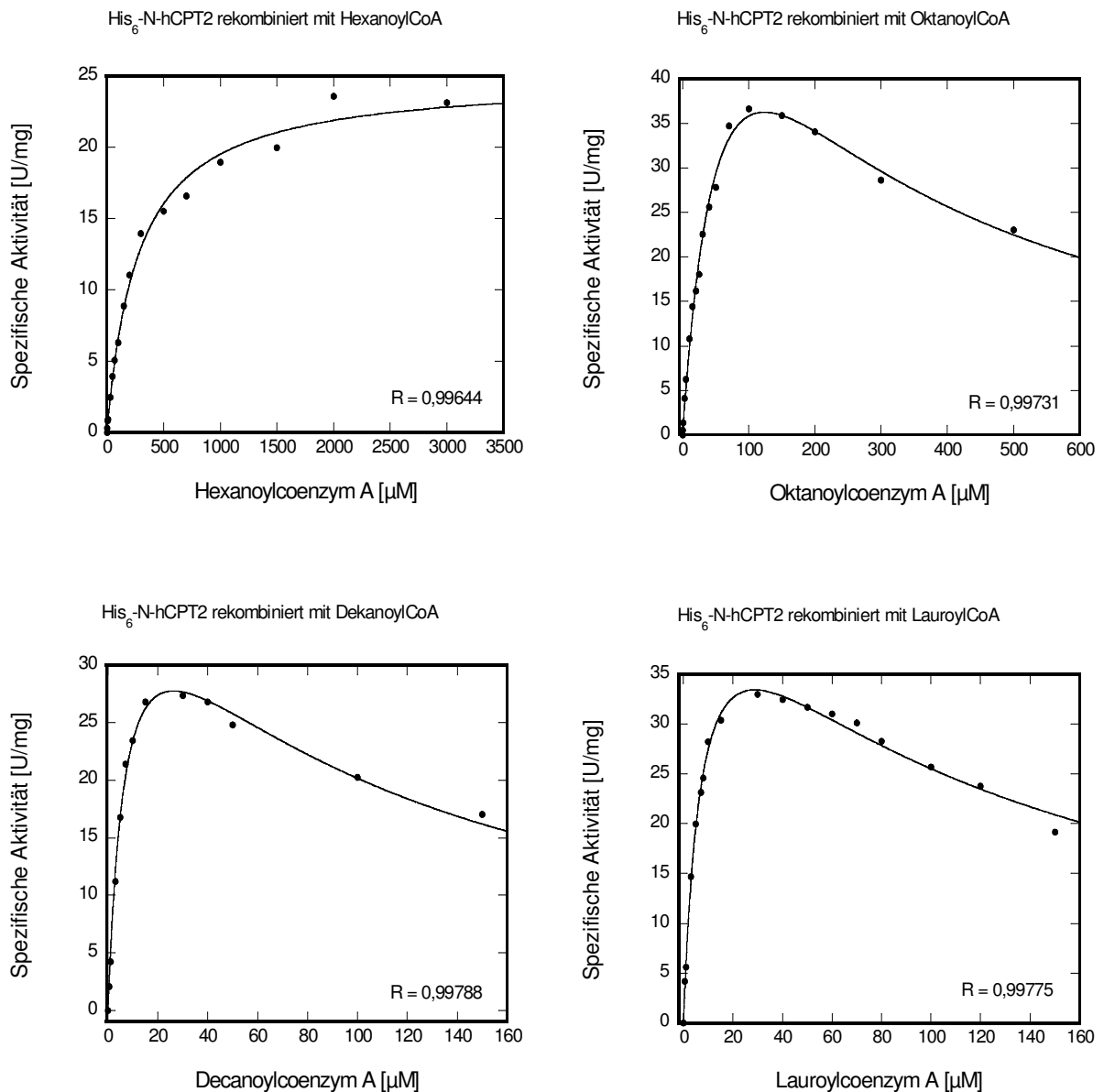


Abb. 10.10 v/S-Charakteristiken der His₆-N-hCPT2 rekombiniert mit verschiedenen variierenden Substraten und L-Carnitin im Überschuss [12mM]. Die Anpassung der Messdaten erfolgte nach einer Michaelis-Menten-Gleichung oder nach einer Gleichung für eine Substratüberschusshemmung Gl. 6.17. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 7.4 bzw. unter Einbezug der relativen und absoluten Fehler der kinetischen Parameter in Tab. 10.1 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

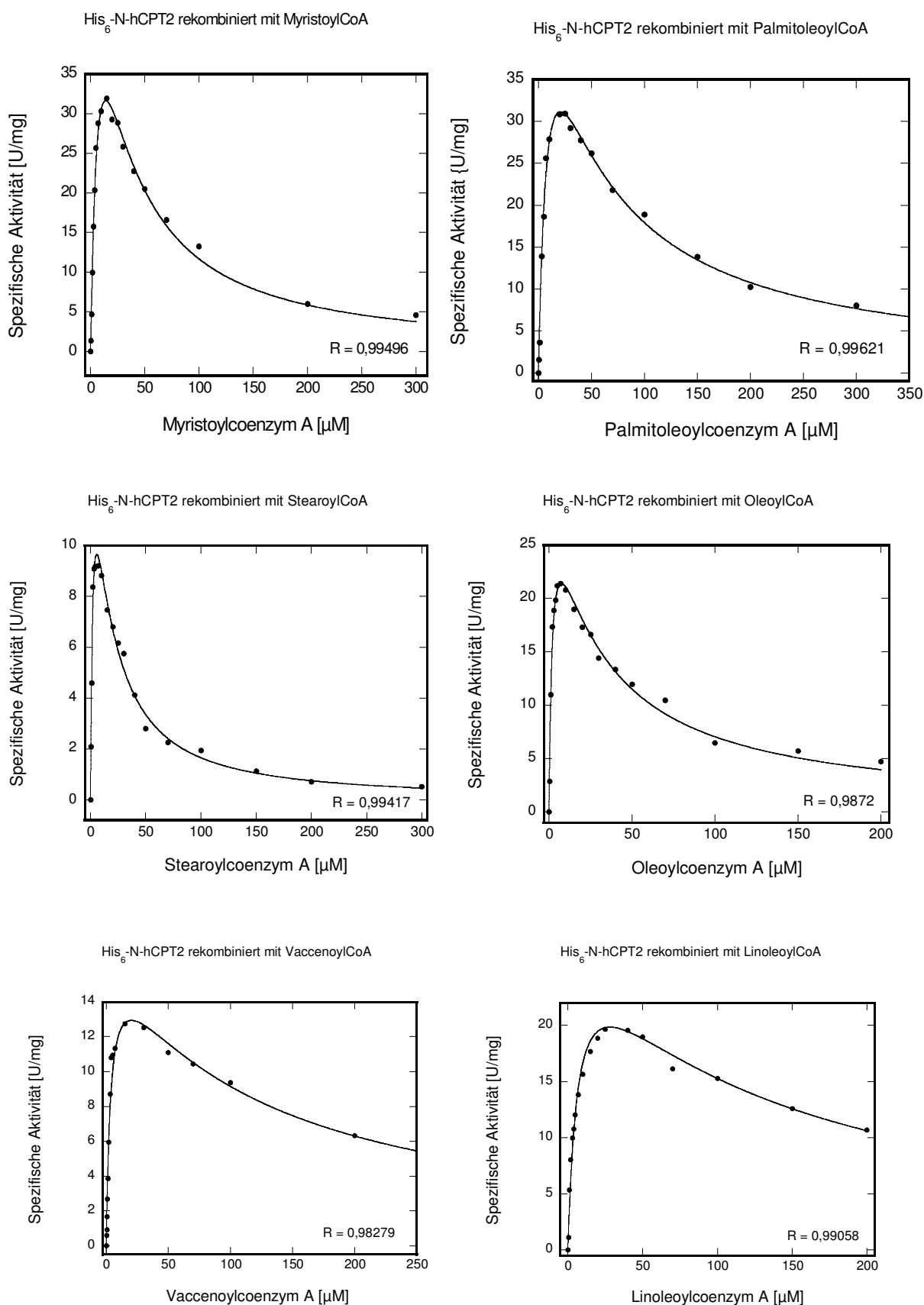


Abb. 10.11 v/S-Charakteristiken der His₆-N-hCPT2 rekombiniert mit verschiedenen variierenden Substraten und L-Carnitin im Überschuss [12mM]. Die Anpassung der Messdaten erfolgte nach einer Substratüberschusshemmung Gl. 6.17. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 7.4 bzw. unter Einbezug der relativen und absoluten Fehler der kinetischen Parameter in Tab. 10.1 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

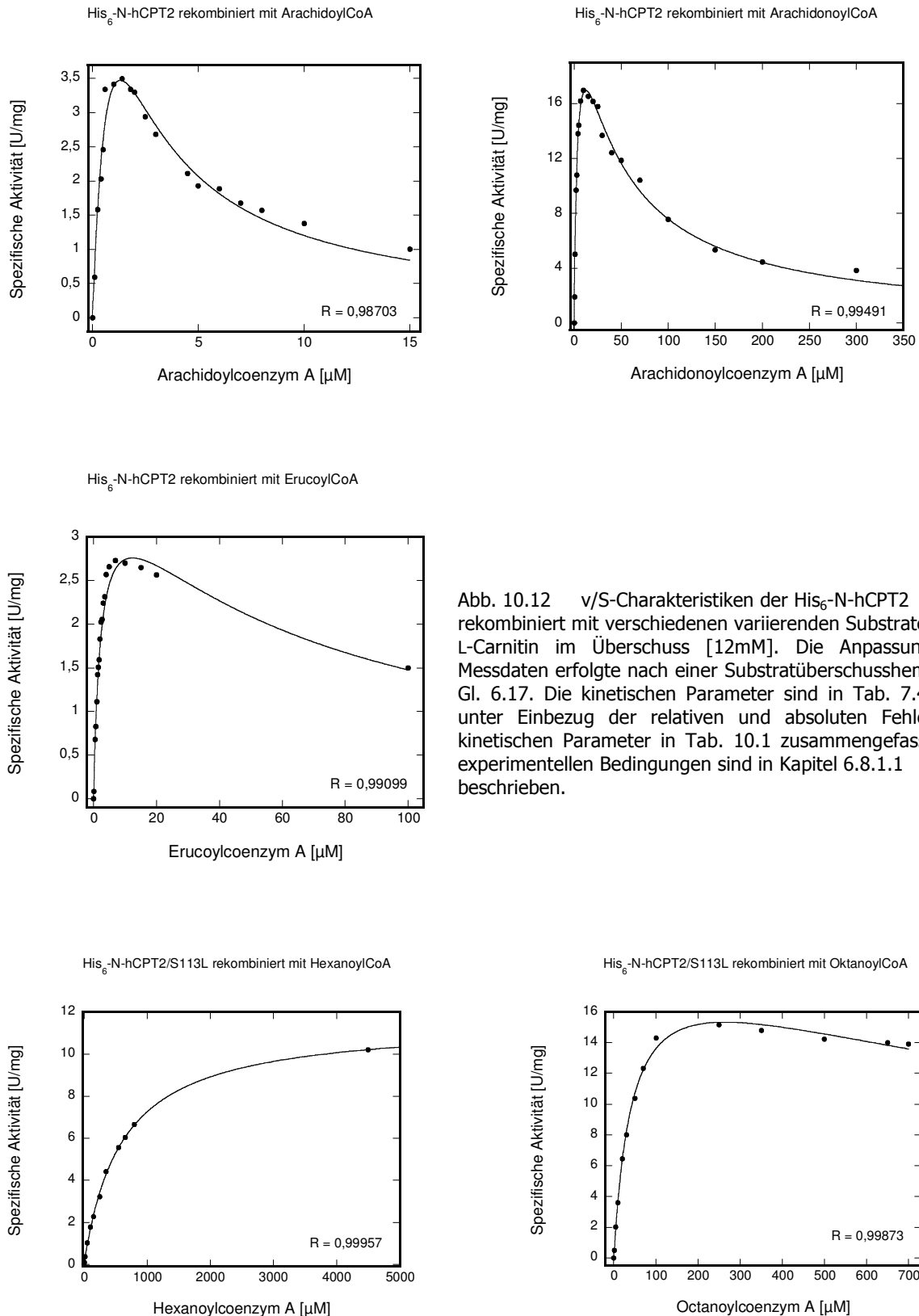


Abb. 10.12 v/S-Charakteristiken der His₆-N-hCPT2 rekombiniert mit verschiedenen variierenden Substraten und L-Carnitin im Überschuss [12mM]. Die Anpassung der Messdaten erfolgte nach einer Substratüberschusshemmung Gl. 6.17. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 7.4 bzw. unter Einbezug der relativen und absoluten Fehler der kinetischen Parameter in Tab. 10.1 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

Abb. 10.13 v/S-Charakteristiken der His₆-N-hCPT2/S113L rekombiniert mit verschiedenen variierenden Substraten und L-Carnitin im Überschuss [10mM]. Die Anpassung der Messdaten erfolgte mit Gl. 6.17 nach einer Substratüberschusshemmung oder nach einer Michaelis-Menten-Gleichung. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 7.4 bzw. unter Einbezug der relativen und absoluten Fehler der kinetischen Parameter in Tab. 10.1 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

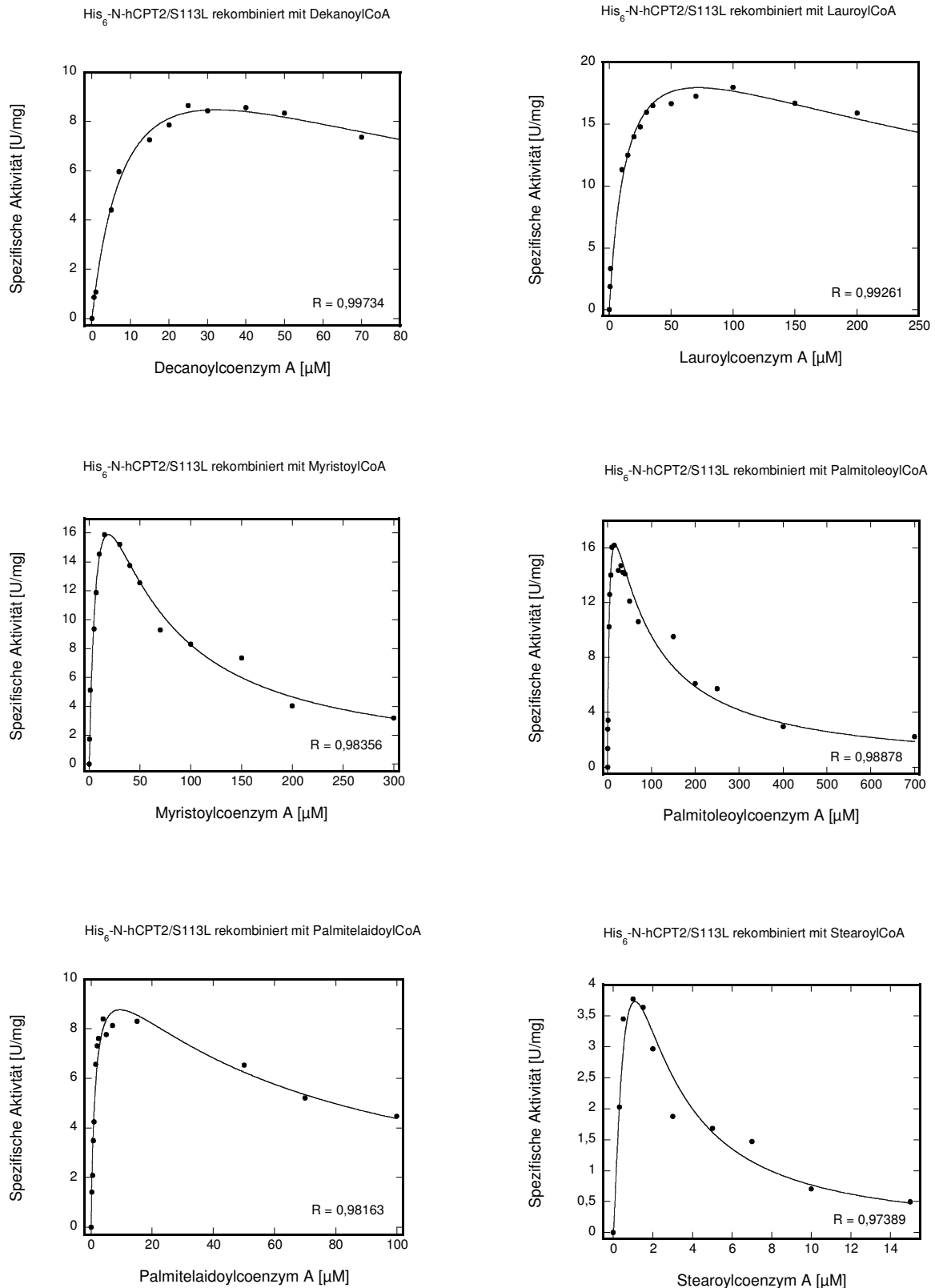


Abb. 10.14 v/S-Charakteristiken der His₆-N-hCPT2/S113L rekombiniert mit verschiedenen variierenden Substraten und L-Carnitin im Überschuss [10mM]. Die Anpassung der Messdaten erfolgte mit Gl. 6.17 nach einer Substratüberschusshemmung. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 7.4 bzw. unter Einbezug der relativen und absoluten Fehler der kinetischen Parameter in Tab. 10.1 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

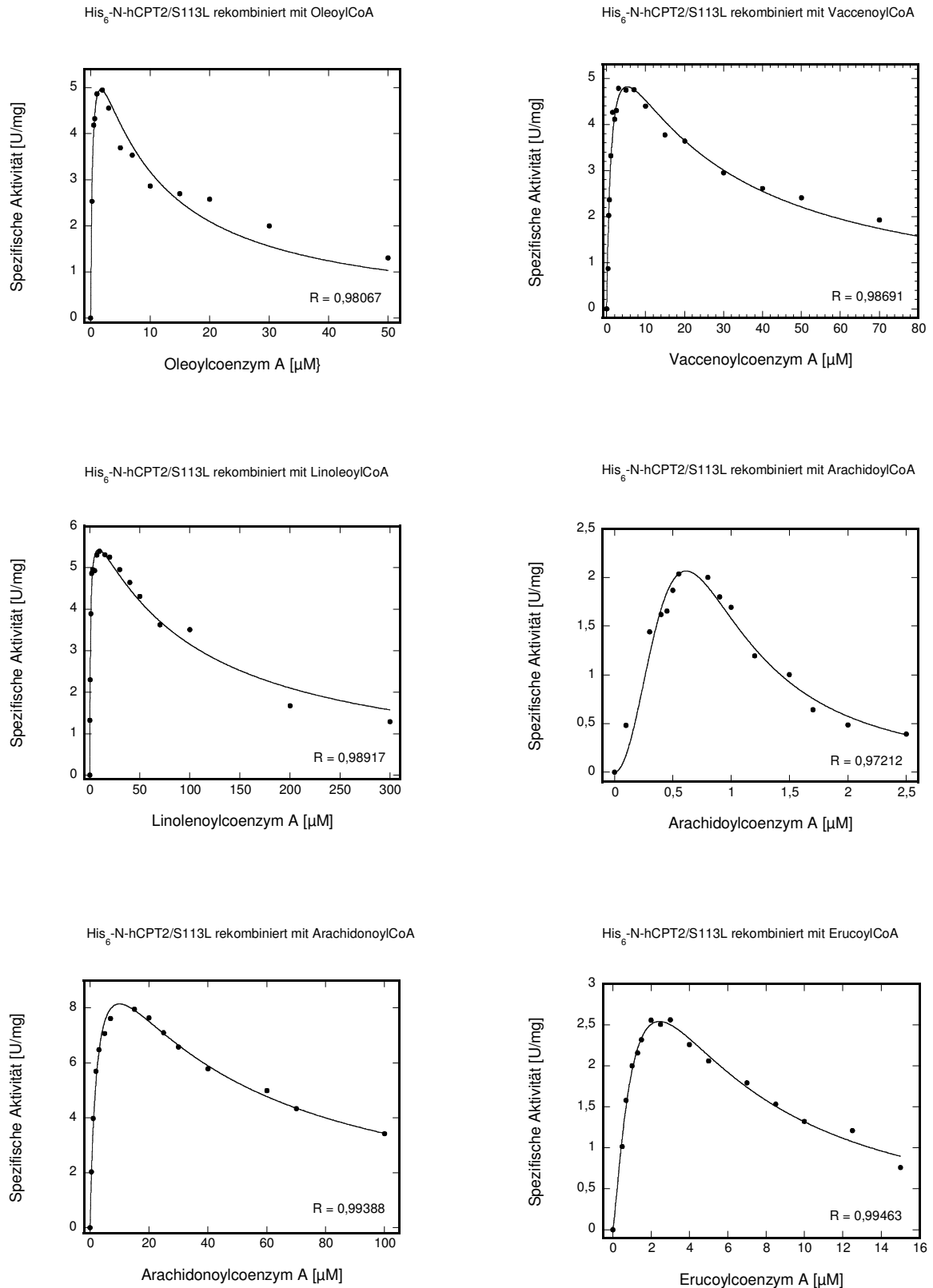


Abb. 10.15 v/S-Charakteristiken der His₆-N-hCPT2/S113L rekombiniert mit verschiedenen variierenden Substraten und L-Carnitin im Überschuss [10mM]. Die Anpassung der Messdaten erfolgte mit Gl. 6.17 nach einer Substratüberschusshemmung. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 7.4 bzw. unter Einbezug der relativen und absoluten Fehler der kinetischen Parameter in Tab. 10.1 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

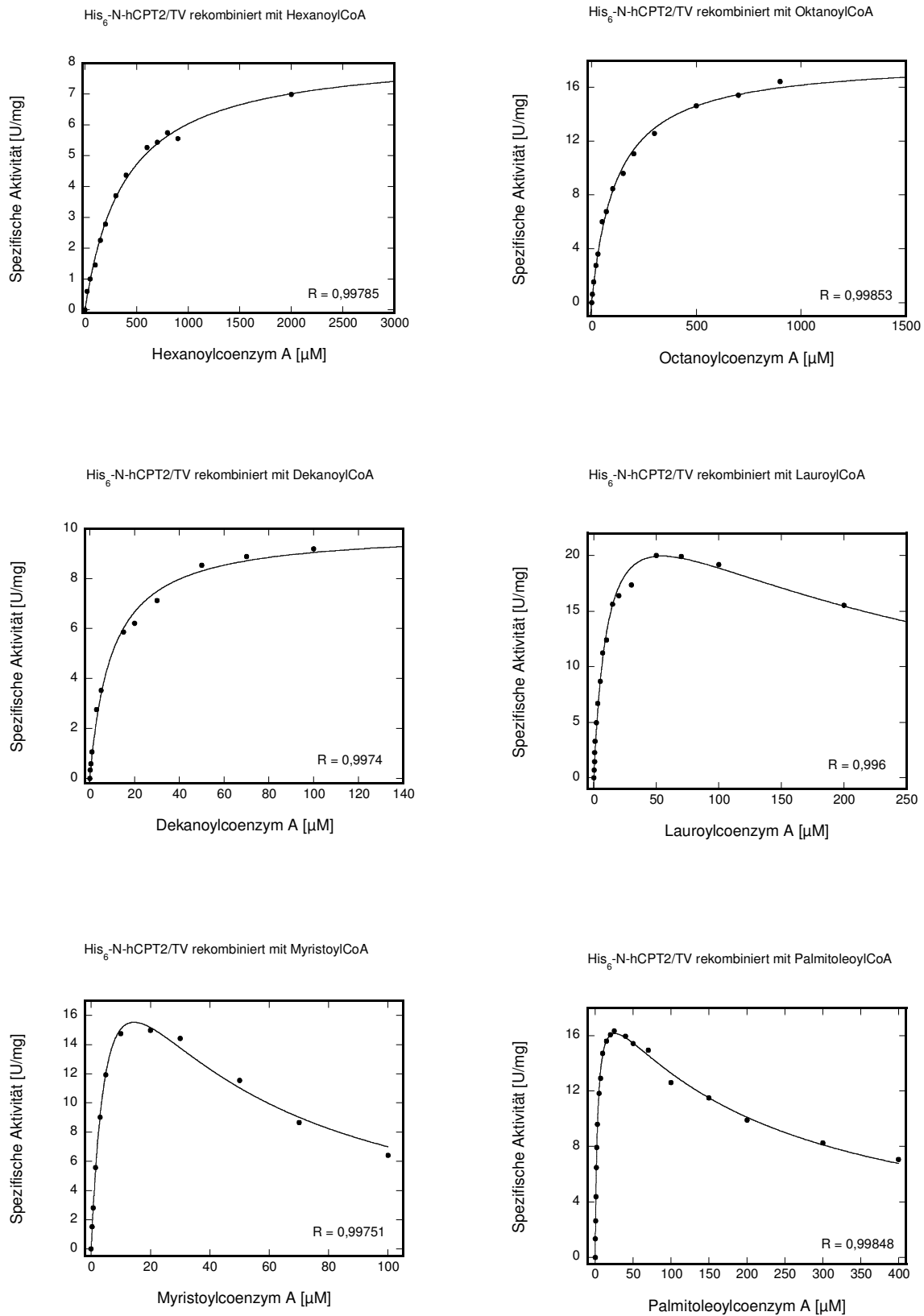


Abb. 10.16 v/S-Charakteristiken der His₆-N-hCPT2/TV rekombiniert mit verschiedenen variierenden Substraten und L-Carnitin im Überschuss [10mM]. Die Anpassung der Messdaten erfolgte mit Gl. 6.17 nach einer Substratüberschusshemmung oder nach einer Michaelis-Menten-Gleichung. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 7.4 bzw. unter Einbezug der relativen und absoluten Fehler der kinetischen Parameter in Tab. 10.1 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

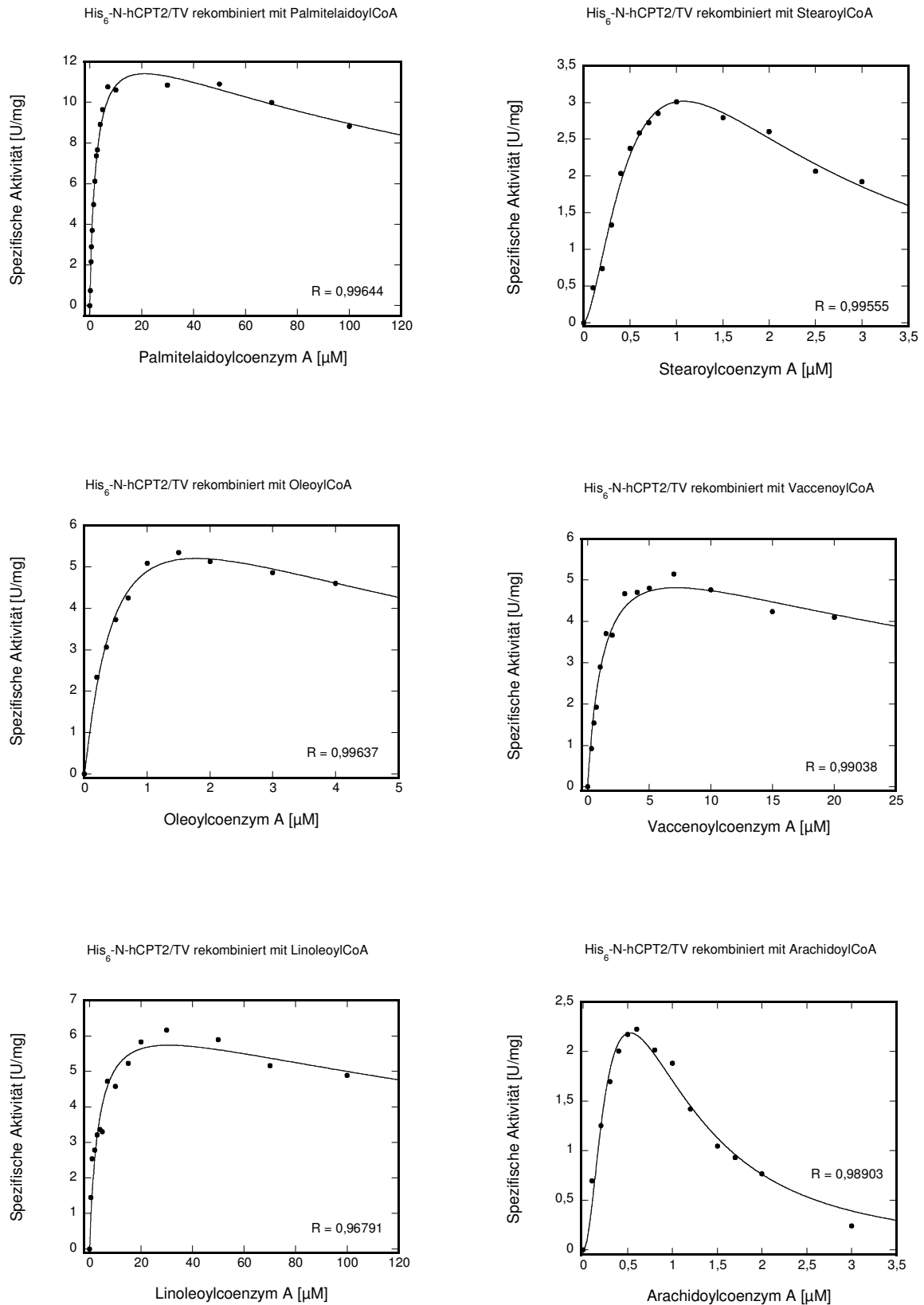


Abb. 10.17 v/S-Charakteristiken der His₆-N-hCPT2/TV rekombiniert mit verschiedenen variierenden Substraten und L-Carnitin im Überschuss [10mM]. Die Anpassung der Messdaten erfolgte mit Gl. 6.17 nach einer Substratüberschusshemmung. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 7.4 bzw. unter Einbezug der relativen und absoluten Fehler der kinetischen Parameter in Tab. 10.1 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

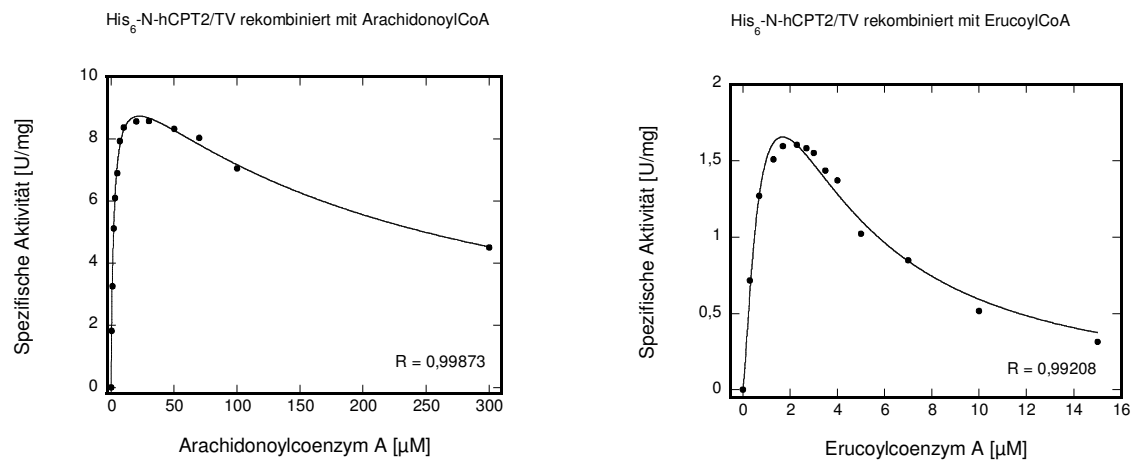


Abb. 10.18 v/S-Charakteristiken der His₆-N-hCPT2/TV rekombiniert mit verschiedenen variierenden Substraten und L-Carnitin im Überschuss [10mM]. Die Anpassung der Messdaten erfolgte mit Gl. 6.17 nach einer Substratüberschusshemmung. Die kinetischen Parameter sind in Tab. 7.4 bzw. unter Einbezug der relativen und absoluten Fehler der kinetischen Parameter in Tab. 10.1 zusammengefasst. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.1 beschrieben.

Tab. 10.1 Übersicht der Bestimmung der kinetischen Parameter der Proteine His₆-N-hCPT2, His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV im DTNB-Aktivitätstest. Die relativen und absoluten Fehler wurden, wie in Kapitel 6.8.1.2 beschrieben, berechnet. A_r: relative Abweichung, * Werte im Kurvenfit festgesetzt, ^{*1}): unter den gewählten Bedingungen im DTNB-Aktivitätstest nicht beobachtet, ^{*2}): nicht gemessen.

<i>Substrat</i>	<i>Protein</i>	<i>A_r</i>		<i>A_r</i>		<i>A_r</i>		<i>A_r</i>		<i>A_r</i>		<i>A_r</i>	
		<i>K_M</i>	<i>K_M</i>	<i>K_I</i>	<i>K_I</i>	<i>S_{opt}</i>	<i>S_{opt}</i>	<i>Spez. Akt</i>	<i>Spez Akt.</i>	<i>k_{kat}</i>	<i>k_{kat}</i>	<i>k_{kat}/K_M</i>	<i>k_{kat}/K_M</i>
		[μM]	[%]	[μM]	[%]	[μM]	[%]	[U/mg]	[%]	[s ⁻¹]	[%]	[μM/s]	[%]
Hexanoyl-CoA	WT	276,95±21,42	7,73	^{*1}		^{*1}		24,92±0,58	2,33	31,05±0,74	2,37	0,112±0,011	10,12
	S113L	592,36±16,49	2,78	^{*1}		^{*1}		11,56±0,14	1,21	14,13±0,16	1,16	0,024±0,001	3,94
	TV	387,08±26,35	6,81	^{*1}		^{*1}		8,36±0,22	2,63	10,29±0,27	2,62	0,027±0,0025	9,43
Oktanoyl-CoA	WT	69,48±8,92	12,84	352,5±34,17	9,69	124,11±26,73	21,60	70,37±4,63	6,58	87,42±5,64	6,45	1,26±0,24	19,29
	S113L	45,10±4,09	9,07	1727,5±237,8	13,77	264,26±45,72	17,30	20,29±0,60	2,96	24,84±0,74	2,96	0,55±0,07	12,03
	TV	118,38±6,07	5,13	^{*1}		^{*1}		18,07±0,30	1,66	22,14±0,41	1,85	0,19±0,013	6,97
Dekanoyl-CoA	WT	7,03±0,70	9,96	124,93±7,47	5,98	28,84±4,53	15,50	39,27±1,04	2,66	49,02±1,80	3,67	6,97±0,95	13,62
	S113L	10,19±1,32	15,87	97,97±15,62	15,94	31,52±8,96	28,52	14,00±0,39	2,79	17,16±1,63	9,52	1,68±0,38	22,45
	TV	11,12±0,91	8,18	^{*1}		^{*1}		10,20±0,21	2,06	12,50±0,29	2,29	1,12±0,12	10,47
Lauroyl-CoA	WT	7,67±0,58	7,56	106,15±9,55	9,00	28,70±3,65	12,70	49,82±1,48	2,97	61,28±1,88	3,07	7,99±0,85	10,63
	S113L	14,48±0,90	6,22	374,97±21,72	5,79	73,66±9,25	12,56	25,05*	0	31,05*	0	2,14±0,13	6,22
	TV	10,68±0,55	5,15	300,07±19,28	6,43	56,02±6,45	11,51	27,40±0,52	1,90	33,50±0,65	1,95	3,14±0,22	7,10
Myristoyl-CoA	WT	9,24±1,24	13,42	72,1*	0	15,16±2,27	14,97	51,61±2,25	4,36	64,54±3,02	4,68	6,99±1,27	18,10
	S113L	9,83±0,87	8,85	45,83±2,76	6,02	18,82±2,19	11,61	30,89±1,29	4,18	37,58±1,59	4,13	3,82±0,50	13,07
	TV	5,33±0,53	9,94	73,81±6,60	8,94	17,89±2,43	13,58	25,36±1,08	4,26	31,05±1,31	4,21	5,82±0,80	13,79
Palmitoyl-CoA	WT	2,24*	0	30,33*	0	7,36±0,1	1,36	24,15*	0	29,58*	0	13,20*	0
	S113L	1,01±0,059	5,84	9,11±0,55	6,04	3,02±0,39	12,91	12,70±0,80	6,30	15,52±0,98	6,32	15,37±1,87	12,16
	TV	2,51±0,24	9,56	12,5*	0	3,55±0,42	11,84	16,43±0,68	4,14	20,43±0,74	3,60	8,14±1,07	13,16
Palmitoleoyl-CoA	WT	9,26±1,27	13,71	84,00±3,02	3,60	21,30±4,21	19,72	51,13±2,82	5,52	62,91±3,76	5,97	6,79±1,34	19,69
	S113L	4,29±0,40	9,32	76,47±8,22	10,75	16,95±3,09	18,21	23,69±1,40	5,91	29,00±1,72	5,92	6,76±1,03	15,24
	TV	3,47±0,15	4,32	213,29±48,57	22,77	26,85±7,97	29,68	20,39±1,12	5,49	25,00±1,39	5,55	7,20±0,71	9,88

Palmitelaidoyl-CoA	WT	*2		*2		*2		*2		*2		*2	
	S113L	1,45±0,24	16,55	64,56±8,41	13,03	9,64±1,95	20,23	11,30±0,44	3,89	13,81±0,53	3,85	9,52±1,94	20,40
	TV	2,44±0,082	3,36	184,05±12,35	6,71	21,19±2,13	10,07	14,03*	0	17,16*	0	7,03±0,24	3,36
Stearoyl-CoA	WT	2,13±0,27	12,68	24,08±0,21	0,87	5,28±0,81	15,40	15,55±0,48	3,10	18,95±0,57	3,02	8,90±1,40	15,69
	S113L	0,53*	0	2,40*	0	1,10±0,080	7,25	7,23±0,37	5,12	8,50±0,33	3,85	16,00±0,62	3,85
	TV	0,52±0,037	7,12	2,67±0,18	6,74	1,11±0,14	12,61	5,00±0,12	2,40	6,86±0,16	2,38	13,20±1,25	9,50
Oleoyl-CoA	WT	2,07±0,28	13,53	32,82±1,39	4,22 6,59	7,83±1,56	19,89	30,90±0,91	2,94	38,40±1,47	3,83	18,55±3,22	17,36
	S113L	0,31±0,033	10,65	9,87±0,65		1,73±0,27	15,61	6,68*	0	8,17*	0	26,36±2,81	10,65
	TV	0,38±0,033	8,68	10*		1,79±0,25	14,12	7,22±0,15	2,08	8,99±0,18	2,00	23,65±2,53	10,68
Vaccenoyl-CoA	WT	3,76±0,35	9,31	124,5*	0	20,14±1,98	9,82	17,52±0,21	1,20	21,49±0,25	1,14	5,71±0,60	10,45
	S113L	1,15±0,13	11,30	25,44±3,30	12,97	5,26±0,94	17,93	6,88±0,29	4,22	8,42±0,36	4,27	7,32±1,14	15,58
	TV	1,83±0,15	8,20	26,74±4,39	16,42	6,77±1,26	18,61	7,73±0,60	7,76	9,80±0,74	7,50	5,36±0,84	15,70
Linoleoyl-CoA	WT	6,46±0,43	6,66	122,61±1,67	1,36	26,93±2,94	10,91	28,23±0,18	0,64	35,13±0,25	0,70	5,44±0,40	7,35
	S113L	0,82±0,077	9,39	95,20±6,55	6,88	8,85±1,44	16,27	6,47±0,16	2,47	7,92±0,16	2,06	9,66±1,11	11,45
	TV	5,39±0,70	12,99	140,00*	0	27,44±3,60	13,10	8,37±0,40	4,78	10,21±0,49	4,80	1,890±0,34	17,79
Arachidoyl-CoA	WT	0,49±0,046	9,39	4,58*	0	1,33±0,17	12,98	5,80±0,19	3,28	7,19±0,23	3,18	14,67±1,84	12,57
	S113L	0,23±0,05	25,43	0,61±0,25	40,98	0,61±0,28	45,98	4,61±0,60	13,02	5,72±0,73	12,71	24,44±8,42	34,45
	TV	0,06±0,012	20,00	1,30±0,21	15,15	0,53±0,19	36,55	3,12±0,23	7,37	3,84±0,28	7,23	65,08±17,72	27,23
Arachidonoyl-CoA	WT	3,87±0,62	16,02	52,94±5,75	10,86	12,46±3,82	30,66	26,42±2,96	11,20	32,68±3,68	11,25	8,44±2,30	27,27
	S113L	2,27±0,15	6,61	44,04±2,34	5,31	9,86±0,73	7,36	11,72±0,24	2,05	14,38±0,29	2,05	6,33±0,55	8,65
	TV	2,09±0,087	4,16	242,53±11,48	4,73	22,40±1,54	6,86	10,29±0,16	1,55	12,58±0,15	1,17	6,02±0,32	5,33
Erucoyl-CoA	WT	2,08±0,14	6,73	78,19±3,26	4,17	11,54±1,42	12,33	3,65±0,038	1,04	4,58±0,11	2,50	2,20±0,20	9,23
	S113L	0,81±0,05	6,17	45,27±5,76	12,72	2,45±0,27	11,15	3,65±0,087	2,38	4,49±0,11	2,55	5,55±0,48	8,72
	TV	0,55±0,044	8,00	7,85*	0	1,68±0,19	11,05	2,53±0,076	3,00	3,10±0,09	2,89	5,64±0,61	10,89

Kritische mizellare Konzentrationen der Fettsäuren und Acylcoenzym A-Substrate

Tab. 10.2 Übersicht der cmc verschiedener Fettsäuren, entnommen aus ^{*1} Murakami *et al.* [1986].

Substrate	cmc [mM]
Capronsäure	0,73-1,57·10 ³ ^{*1}
Caprylsäure	70-340 ^{*1}
Caprinsäure	94-124 ^{*1}
Laurinsäure	19-31 ^{*1}
Myristinsäure	6-10 ^{*1}
Palmitinsäure	0,4-3,3 ^{*1}
Stearinsäure	0,075-1,8 ^{*1}
Arachinsäure	---
Palmitoleinsäure	---
Ölsäure	0,72-3,5 ^{*1}
Vaccensäure	---
Erucasäure	---
Linolsäure	---
Arachidonsäure	---
Palmitelaidinsäure	---

Tab. 10.3 Übersicht der cmc von Fettsäurecoenzym As entnommen aus ^{*2} Tippet *et al.* [1982, mittels Pinacyanolchlorid-Farbstoffeinlagerung], ^{*3} aus Powell *et al.* [1981 mittels *spin-labelling*-Technik, Ultrazentrifugation], ^{*4} Zahler *et al.* [1968 mittels Lichtstreuung und Pinacyanolchlorid-Farbstoffeinlagerung], sowie aus Tippet *et al.* [1982 mittels ^{*5} Ultrafiltration oder ^{*6} Ultrazentrifugation].

Substrat	cmc [μM]
Lauroylcoenzym A	28,8-67 ^{*2}
Myristoylcoenzym A	5,8-17 ^{*2}
Palmitoylcoenzym A	1,52-4,55 ^{*2} , 30-60 ^{*3} , 2-4 ^{*4} , 22 ^{*5} ; 10-30 ^{*6}
Stearoylcoenzym A	0,4-1 ^{*2}
Oleoylcoenzym A	1,2-6,8 ^{*2}

Kinetische Stabilitäten

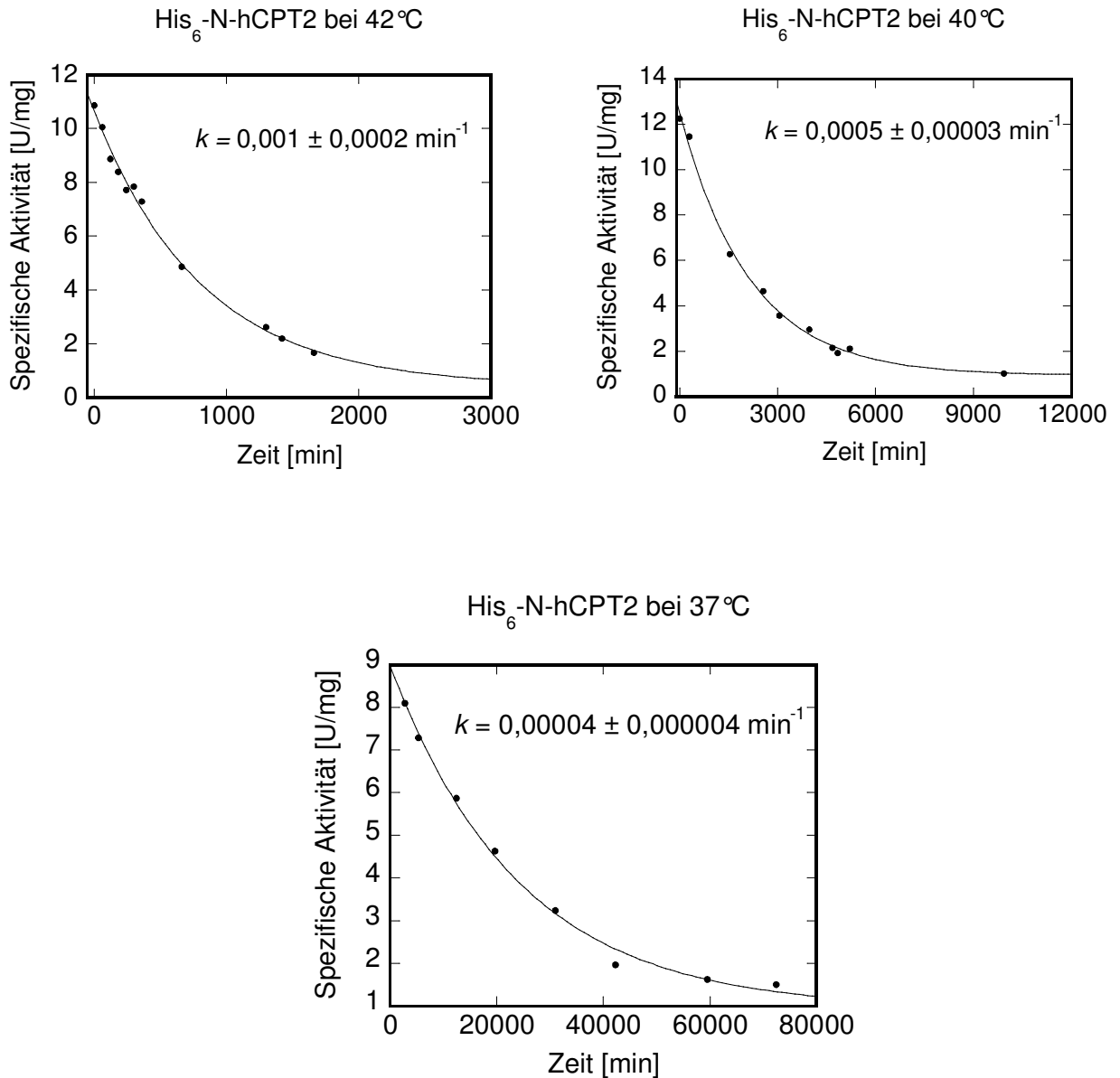


Abb. 10.19 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k der Inaktivierung des Proteins His₆-N-hCPT2 bei unterschiedlichen Temperaturen mittels DTNB-Aktivitätstest. Die experimentelle Durchführung ist in Kapitel 6.8.1.3 beschrieben. Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach einer Anpassung an eine Reaktion 1. Ordnung.

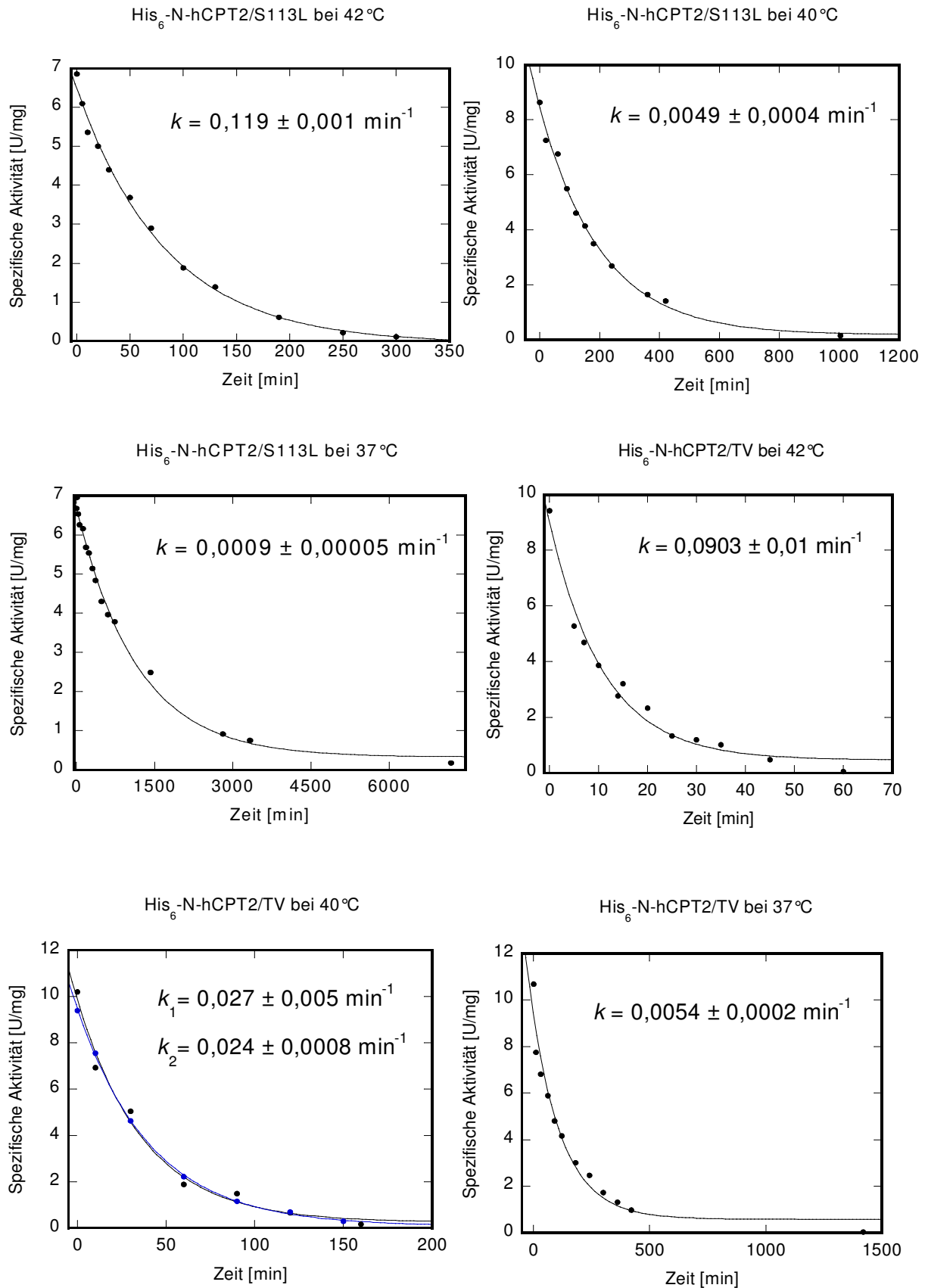


Abb. 10.20 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k der Inaktivierung der Proteine His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV bei unterschiedlichen Temperaturen mittels DTNB-Aktivitätstest. Die experimentelle Durchführung ist in Kapitel 6.8.1.3 beschrieben. Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach einer Anpassung an eine Reaktion 1. Ordnung.

Etablierung der Testkonditionen der thermischen Denaturierung

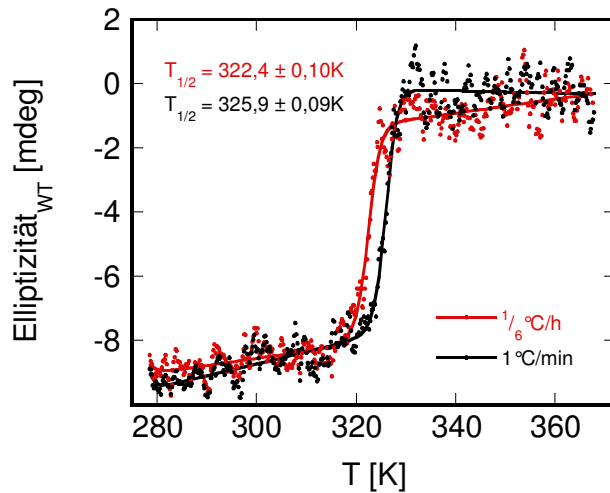


Abb. 10.21 Etablierung des Temperaturgradienten zur Durchführung einer thermischen Denaturierung der His₆-N-hCPT2. Experimentelle Bedingungen: $\lambda=210\text{nm}$, $d=0,1\text{cm}$, $T=5-95^\circ\text{C}$, $c_{\text{hCPT2}}=0,175\text{mg/mL}$, $25\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, 50mM NaCl , 2mM TCEP , $1\% \text{ [w/v] nOG}$, $\text{pH } 8,0$. Die Testbedingungen wurden für His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV übernommen.

Bestimmung des Hemmtyps und des K_i –Wertes von L-Aminocarnitin für die Proteinvarianten S113L und TV

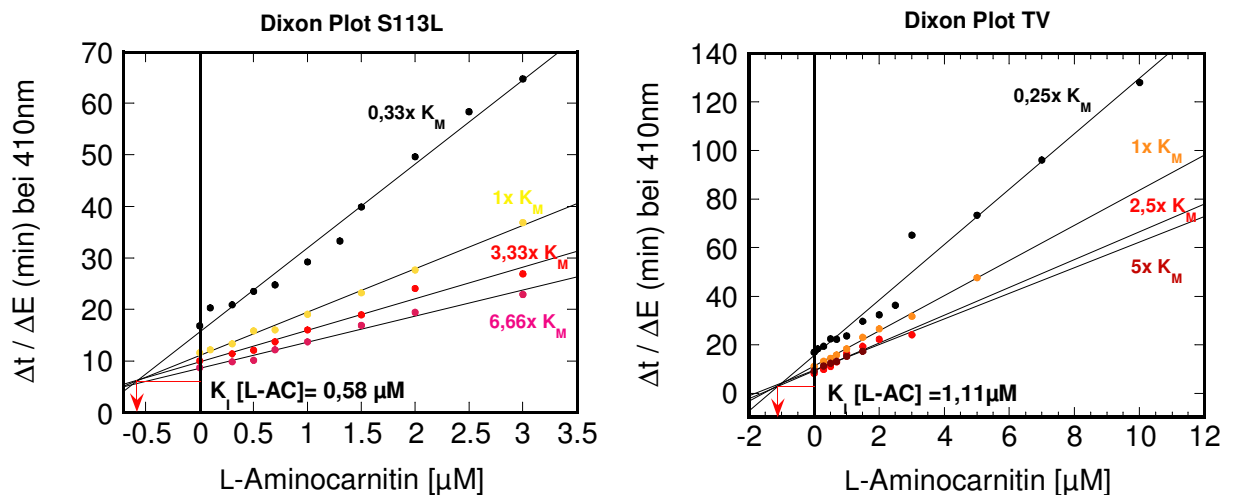


Abb. 10.22 Dixon-Auftragung der Proteine His₆-N-hCPT2/S113L und His₆-N-hCPT2/TV für den kompetitiven Inhibitor L-AC in Gegenwart verschiedener Substratkonzentrationen an PCoA zur Bestimmung der Inhibitorkonstante K_i für L-Aminocarnitin. Die experimentellen Bedingungen sind in Kapitel 6.8.1.4 beschrieben.

real time-PCR-Primer

Tab. 10.4 Zusammenfassung der eingesetzten Primer [QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden] zum Nachweis der angeführten Gene mittels quantitativer *real time*-PCR.

Gen	Primer	Amplikon	Bezeichnung (englische Schreibweise)
AQP4	Hs_AQP4_1_SG	90bp	aquaporin 4
ARG2	Hs_ARG2_1_SG	89bp	arginase, type II
ARNTL	Hs_ARNTL_1_SG	91bp	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
ASPN	Hs_ASPN_1_SG	138bp	asporin
ATRNL1	Hs_ATRNL1_1_SG	113bp	attractin-like 1
C12orf5	Hs_C12orf5_1_SG	124bp	chromosome 12 open reading frame 5
C1orf51	Hs_C1orf51_1_SG	104bp	chromosome 1 open reading frame 51
CALM2	Hs_CALM2_1_SG	68bp	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)
CD36	Hs_CD36_3_SG	110bp	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
CPM	Hs_CPM_1_SG	93bp	carboxypeptidase M
CPT1B	Hs_CPT1B_2_SG	85bp	carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)
CPT2	Hs_CPT2_1_SG	147bp	carnitine palmitoyltransferase 2
CS	Hs_CS_1_SG	142bp	citrate synthase
DRD5	Hs_DRD5_1_SG	77bp	dopamine receptor D5
FABP5	Hs_FABP5_1_SG	97bp	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
GAPDH	Hs_GAPDH_2_SG	119bp	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLT1D1	Hs_FLJ31978_1_SG	119bp	glycosyltransferase 1 domain containing 1
HOXC10	Hs_HOXC10_1_SG	106bp	homeobox C10
HOXC6	Hs_HOXC6_1_SG	158bp	homeobox C6
HOXC8	Hs_HOXC8_1_SG	71bp	homeobox C8
HOXC9	Hs_HOXC9_1_SG	110bp	homeobox C9
IGFN1	Hs_IGFN1_1_SG	149bp	immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1
IRX3	Hs_IRX3_1_SG	108bp	iroquois homeobox 3
LOC151121	Hs_LOC151121_2_SG	119bp	hypothetical LOC151121
MAPK8IP1	Hs_MAPK8IP1_1_SG	110bp	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1
MYLK4	Hs_MYLK4_1_SG	69bp	myosin light chain kinase family, member 4
NR1D1	Hs_NR1D1_1_SG	113bp	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
OR2T3	Hs_OR2T3_1_SG	117bp	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 3
OTUD1	Hs_OTUD1_1_SG	106bp	OTU domain containing 1
PDK4	Hs_PDK4_1_SG	124bp	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
PER1	Hs_PER1_1_SG	118bp	period homolog 1 (Drosophila)
RASSF3	Hs_RASSF3_1_SG	126bp	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 3
RYR3	Hs_RYR3_1_SG	70bp	ryanodine receptor 3
SIM1	Hs_SIM1_1_SG	100bp	single-minded homolog 1 (Drosophila)
SLC16A6	Hs_SLC16A6_1_SG	105bp	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)
SLC1A4	Hs_SLC1A4_2_SG	88bp	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4
TLE1	Hs_TLE1_1_SG	82bp	transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)
UPF1	Hs_UPF1_1_SG	123bp	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)
ZDHHC2	Hs_ZDHHC2_1_SG	110bp	zinc finger, DHHC-type containing 2

heat map der Korrelation von Normierungsverfahren und *ranking*-Verfahren

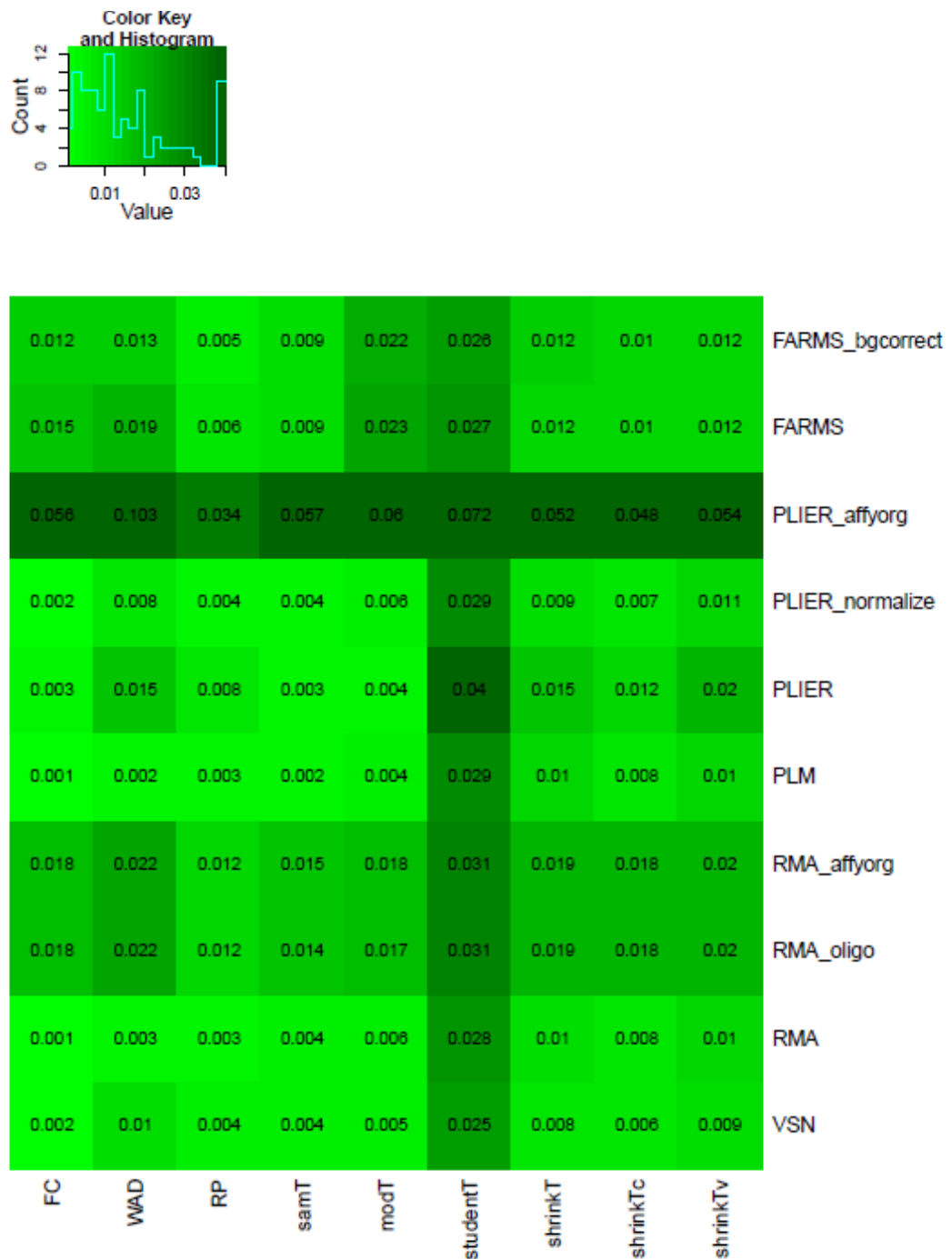


Abb. 10.23 *heat map* zur Auswahl der optimalen Kombination des Normierungs- und *ranking*-Verfahrens zur optimalen Interpretation der *MicroArray*-Datensätze.

top-100-Genkandidaten nach Auswertung des *MicroArrays*

Tab. 10.5 Zusammenfassung der top-100-Genkandidaten. Die statistischen Werte des *fold change*, der p- und t-Wert sowie die Benjamini-Hochberg- und Bonferoni-Korrektur sind angegeben. Die mittels *real time*-PCR getesteten Gene sind mit diff für differenziert und con für nicht differenziert markiert. *¹ nicht getestet.

Score	Gen-Symbol	Probe Set ID	getestet	<i>fold change</i>	t-Wert	p-Wert	Benjamini Hoch- berg Korrektur	Bonferoni- Korrektur	<i>gene accession</i>
1	HOXC10	7955858	diff	4.774326	32.31018	5.33E-15	1.72E-10	1.72E-10	NM_017409
2	RYR3	7982392	diff	2.28491	2.975392	0.009657	0.456496	1	NM_001036
3	DRD5	7905025	con	2.278138	3.082396	0.007782	0.429927	1	NM_000798
4	MAPK8IP1	8007848	diff	-2.22332	-4.47252	0.000476	0.1251	1	NM_005456
5	ATRNL1	7930714	diff	2.199576	1.909457	0.076046	0.856784	1	NM_207303
6	NR1D1	8014956	diff	1.976524	5.15746	0.000127	0.055559	1	NM_021724
7	HOXC8	7955869	diff	1.961943	9.878537	7.46E-08	0.000555	0.002411	NM_022658
8	SNORD116-21	7981990	* ¹	-1.93403	-1.59615	0.131862	0.957682	1	NR_003335
9	MYLK4	8123584	diff	-1.90034	-3.69398	0.002255	0.26517	1	NM_001012418
10	OR2T3	7911283	diff	-1.86459	-2.73816	0.015534	0.547108	1	NM_001005495
11	LOC151121	8055139	diff	1.82989	3.754273	0.001996	0.252032	1	AK056598
12	OTUD1	7926677	diff	1.764921	2.351284	0.033206	0.694448	1	NM_001145373
13	HOXC9	7955865	diff	1.757443	13.53835	1.15E-09	1.24E-05	3.72E-05	NM_006897
14	C1orf51	7905154	diff	1.68671	4.894476	0.00021	0.074504	1	BC027999
15	C12orf5	7953211	diff	-1.66976	-3.20862	0.006029	0.391595	1	NM_020375
16	POM121L1P	8074714	* ¹	1.567508	1.909507	0.07604	0.856784	1	NR_024591
17	TLE1	8161919	diff	1.529919	7.672961	1.7E-06	0.003922	0.054914	NM_005077
18	HOXC6	7955873	diff	1.443949	16.01969	1.14E-10	1.84E-06	3.69E-06	NM_004503
19	IGFN1	7908650	diff	1.411688	3.092386	0.007627	0.429082	1	NM_178275
20	TCF19	8177947	* ¹	-1.40349	-2.31055	0.035915	0.709318	1	NM_007109
21	PDK4	8141094	diff	1.398004	2.478046	0.025959	0.640989	1	NM_002612
22	ASPN	8162394	diff	1.373505	4.177469	0.000854	0.176867	1	NM_017680
23	ARG2	7975268	diff	1.367307	3.970816	0.001291	0.213924	1	NM_001172
24	CALML6	7897026	* ¹	-1.33736	-2.4523	0.027297	0.645879	1	NM_138705

Score	Gen-Symbol	Probe Set ID	getestet	fold change	t-Wert	p-Wert	Benjamini Hoch- berg Korrektur	Bonferoni- Korrektur	gene accession
25	AQP4	8022655	diff	-1.3373	-5.84782	3.57E-05	0.02456	1	NM_001650
26	RND3	8055688	*1	-1.33018	-2.38537	0.031088	0.677684	1	NM_005168
27	RASSF3	7956819	diff	1.328687	6.310804	1.58E-05	0.015607	0.510695	NM_178169
28	HYAL4	8135827	*1	1.322498	2.009243	0.063365	0.826482	1	NM_012269
29	IL12RB2	7902205	*1	-1.26499	-6.8141	6.73E-06	0.009068	0.217624	NM_001559
30	MAPK8IP1	8016261	*1	-1.26064	-3.0651	0.008059	0.432748	1	NM_005456
31	FABP5	7948420	con	1.235394	5.641553	5.19E-05	0.031369	1	NM_001444
32	IRX3	8001449	diff	-1.23078	-4.94556	0.00019	0.069864	1	NM_024336
33	NPY6R	8108251	*1	-1.17923	-3.8425	0.001671	0.23861	1	NR_002713
34	ARNTL	7938563	diff	-1.15375	-6.20226	1.91E-05	0.016666	0.616655	NM_001178
35	CLDN1	8092726	*1	-1.14597	-2.1783	0.046211	0.760093	1	NM_021101
36	SNORD14C	7952339	*1	-1.14438	-3.61829	0.002628	0.275426	1	NR_001453
37	FLJ41484	7972932	*1	-1.13704	-2.94542	0.010257	0.467946	1	AK092862
38	SLC1A4	8042310	diff	-1.13207	-6.28867	1.64E-05	0.015607	0.530641	NM_003038
39	GLT1D1	7959834	diff	1.128492	6.133982	2.15E-05	0.017761	0.694876	NM_144669
40	UBASH3B	7944722	*1	-1.12618	-2.34586	0.033555	0.695659	1	NM_032873
41	CALM2	8052010	diff	-1.12523	-4.97599	0.000179	0.068245	1	NM_001743
42	HK2	8042942	*1	-1.1142	-2.77763	0.014358	0.533422	1	NM_000189
43	PER1	8012349	diff	1.105764	3.899423	0.00149	0.230295	1	NM_002616
44	SIM1	8128459	con	-1.08631	-3.9023	0.001481	0.230295	1	NM_005068
45	PDE11A	8057004	*1	1.083896	3.091141	0.007646	0.429082	1	NM_001077197
46	CTXN3	8107764	*1	1.077048	3.148809	0.006805	0.408793	1	NM_001048252
47	SLC25A33	7948088	*1	1.067061	3.603444	0.002708	0.277004	1	NM_032315
48	FOS	7975779	*1	1.063182	1.179874	0.256912	0.999215	1	NM_005252
49	LBP	8062461	*1	-1.06318	-1.55064	0.142383	0.970416	1	NM_004139
50	MTHFD1L	8161484	*1	1.054461	4.280407	0.000696	0.160609	1	ENST00000367321
51	GAB1	8097586	*1	1.028873	5.090991	0.000144	0.058271	1	NM_207123
52	AGBL1	7985741	*1	-1.02661	-2.80934	0.013477	0.521068	1	NM_152336
53	LOC284581	7909144	*1	1.020364	2.186145	0.04553	0.756047	1	AK094426

Score	Gen-Symbol	Probe Set ID	getestet	fold change	t-Wert	p-Wert	Benjamini Hoch- berg Korrektur	Bonferoni- Korrektur	gene accession
54	C1orf168	7916506	*1	-1.01504	-1.45476	0.166889	0.993613	1	NM_001004303
55	FAM153C	8110417	*1	-1.01313	-1.23724	0.235521	0.999215	1	NM_001079527
56	KLF15	8090343	*1	1.006637	3.940644	0.001371	0.222656	1	NM_014079
57	PVALB	8075838	*1	-1.00566	-1.14922	0.268938	0.999215	1	NM_002854
58	THRSP	7942793	*1	-1.00269	-2.53801	0.023082	0.620481	1	NM_003251
59	HOXC5	7955887	*1	0.999246	9.204137	1.83E-07	0.000987	0.005919	NM_018953
60	LOC100293211	7981728	*1	-0.99474	-2.03791	0.060095	0.817064	1	ENST00000390601
61	MICAL2	7938485	*1	0.991871	2.884588	0.011591	0.491795	1	NM_014632
62	CA14	7905131	*1	-0.9892	-2.3012	0.036565	0.709665	1	NM_012113
63	HCN1	8111998	*1	0.985685	1.595744	0.131952	0.957682	1	NM_021072
64	GGT7	8065798	*1	-0.97949	-3.1953	0.006194	0.393096	1	NM_178026
65	psiTPTE22	8071063	*1	-0.97837	-2.46587	0.026584	0.640989	1	NR_001591
66	G0S2	7909441	*1	-0.97655	-2.91529	0.010898	0.480529	1	NM_015714
67	PIK3IP1	8075483	*1	0.976309	6.90397	5.8E-06	0.008438	0.187558	NM_052880
68	GDNF	8111670	*1	-0.96854	-2.73908	0.015506	0.547108	1	NM_000514
69	IRX5	7995668	*1	-0.96785	-7.41705	2.54E-06	0.005121	0.081936	NM_005853
70	SNORD115-11	7982092	*1	-0.96755	-4.10798	0.000981	0.190452	1	NR_003303
71	FGF6	7960407	*1	-0.9667	-2.27827	0.038208	0.719639	1	NM_020996
72	SNORD115-44	7982094	*1	-0.95986	-4.80691	0.000248	0.080236	1	NR_003359
73	SERPINE2	8059376	*1	-0.94784	-3.43394	0.003818	0.330278	1	NM_001136529
74	PER3	7897378	*1	0.944831	3.626301	0.002586	0.275426	1	NM_016831
75	MTHFD2	8042830	*1	-0.93836	-3.72071	0.002136	0.26244	1	NR_027405
76	GPR115	8120135	*1	-0.9243	-2.93462	0.010483	0.474526	1	NM_153838
77	FABP7	8121784	*1	0.922978	2.483559	0.025681	0.640053	1	NM_001446
78	CHRNA	8049166	*1	0.92193	1.697245	0.11085	0.924036	1	NM_005199
79	MET	8135601	*1	0.921305	5.443418	7.46E-05	0.040086	1	NM_001127500
80	CCDC39	8092295	*1	0.921302	3.252535	0.005516	0.37689	1	NM_181426
81	CD36	8133876	con	0.911407	5.174838	0.000123	0.055559	1	NM_001001548
82	FABP4	8151532	*1	0.910067	4.01401	0.001184	0.204541	1	NM_001442

Score	Gen-Symbol	Probe Set ID	getestet	fold change	t-Wert	p-Wert	Benjamini Hoch- berg Korrektur	Bonferoni- Korrektur	gene accession
83	SLC24A3	8061227	*1	0.90897	4.681058	0.000317	0.094472	1	NM_020689
84	FGD4	7954729	*1	0.906352	3.672761	0.002354	0.267679	1	NM_139241
85	ADAM22	8133983	*1	0.902579	2.945181	0.010262	0.467946	1	NM_021723
86	AREG	8095744	*1	0.902063	1.615109	0.127678	0.953141	1	NM_001657
87	NR1D2	8078272	*1	0.898974	7.324124	2.94E-06	0.005585	0.09495	NM_005126
88	LOC196913	7978917	*1	-0.89761	-5.4357	7.57E-05	0.040086	1	NM_001014830
89	TPTE2	7970404	*1	0.89338	1.457024	0.166273	0.993184	1	NM_130785
90	BTG2	7908917	*1	0.892993	1.363825	0.193274	0.999215	1	NM_006763
91	OSBPL6	8046646	*1	-0.89237	-4.47725	0.000472	0.124958	1	NM_032523
92	ACTN3	7941662	*1	-0.89034	-0.96752	0.349034	0.999215	1	NM_001104
93	RSPO3	8121916	*1	0.888513	2.599635	0.020445	0.597466	1	NM_032784
94	TRIM63	7913907	*1	0.888391	3.343942	0.004583	0.352345	1	NM_032588
95	DUSP1	8115831	*1	0.887943	1.463015	0.16465	0.992132	1	NM_004417
96	IP6K3	8125780	*1	-0.88432	-3.10994	0.007361	0.424281	1	NM_054111
97	HOXD8	8046546	*1	-0.88317	-6.22413	1.84E-05	0.016489	0.593592	NM_019558
98	SNORD14E	7952335	*1	-0.882	-2.27475	0.038466	0.721704	1	NR_003125
99	ABCC2	7929779	*1	-0.87889	-5.89369	3.29E-05	0.023832	1	NM_000392
100	HBA1	7991766	*1	-0.87436	-2.78703	0.014091	0.528356	1	NM_000558
4686	CPT2	7901549	con	-0.26529	-1.45967	0.165556	0.992638	1	NM_000098
25743	CHKB-CPT1B	8077123	con	-0.03842	-0.22227	0.827178	0.999215	1	NR_027928
30811	SLC25A20	8087224	*1	0.009173	0.030949	0.975729	0.999215	1	NM_000387

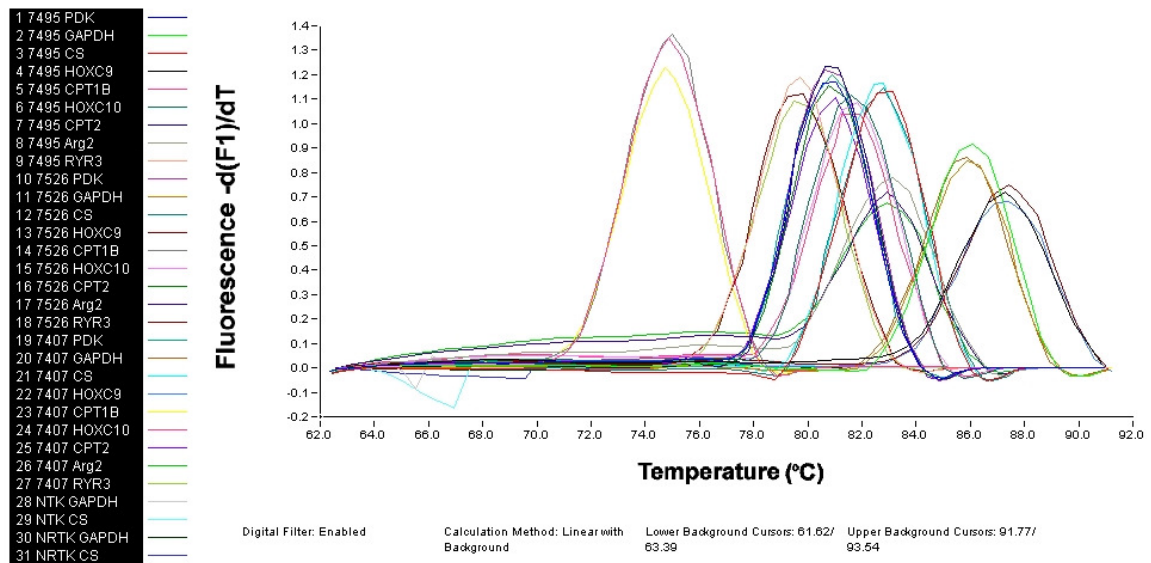


Abb. 10.24 Exemplarische Aufnahmen von Schmelzkurven der Primer der quantitativen *real time*-PCR zum Nachweis der spezifischen Bindung der Primer an einem Genabschnitt. Die Abkürzungen der Primer in Zuordnung zu der jeweiligen Farbskala der dargestellten Schmelzkurven sind nebenstehend erläutert.

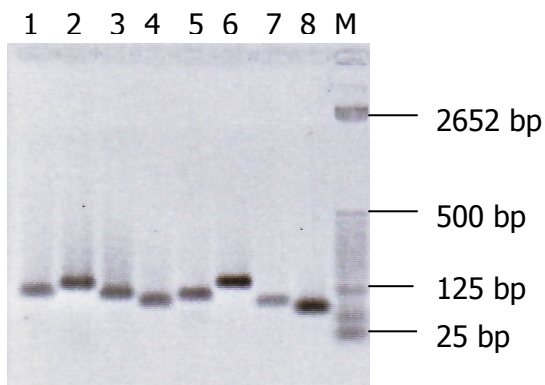


Abb. 10.25 Exemplarisches Agarosegel zur Visualisierung der spezifischen Bindung der Primer der *real time*-PCR durch Amplifizierung einer einzigen Bande. 1: GAPDH, Hs_GAPDH_2_SG, 119bp; 2: CS, Hs_CS_1_SG, 142bp; 3: HOXC9, Hs_HOXC9_1_SG, 110bp; 4: CPT1B, Hs_CPT1B_2_SG, 85bp; 5: HOXC10, Hs_HOXC10_1_SG, 106bp; 6: CPT2, Hs_CPT2_1_SG, 147bp; 7: ARG2, Hs_ARG2_1_SG, 89bp; 8: RYR3, Hs_RYR3_1_SG, 70bp; M: 25bp DNA-Marker.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Zierz, meinem Betreuer der medizinischen Fakultät, für die Vergabe des sowohl klinisch als auch biochemisch anspruchsvollen, interessanten Themas und die Möglichkeit, diese wissenschaftliche Problematik in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten. Mein Dank richtet sich auch an das Muskellabor, insbesondere an Frau Karina Sandmann.

Herrn Prof. em. Dr. Gerhard Hübner, dem Betreuer der naturwissenschaftlichen Fakultät, danke ich insbesondere für die stets hilfreichen, wissenschaftlichen Diskussionen, welche den Fortgang meiner Arbeit positiv beeinflussten.

Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie, danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie die Möglichkeit der intensiven Nutzung der labortechnischen Geräte. Ein großes Dankeschön gilt dabei der Arbeitsgruppe Behrens, im Besonderen Frau Dipl.-Biol. Anke Pichotta und Frau Christine Hamann, welche mich in verschiedene Techniken einarbeiteten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. Ivo Grosse, Institut für Informatik, Arbeitsgruppe Bioinformatik, und seiner wissenschaftlichen Mitarbeiterin Frau Dipl.-Bioinf. Yvonne Pöschl danke ich für die zeitnahe, zuverlässige Durchführung der statistischen Auswertung der Vielzahl an *MicroArray*-Daten. Sie vermitteln mir einen Einblick in die Analyse statistischer Fragestellungen und waren für anregende Diskussionen jederzeit bereit.

Herr PD Dr. Ralph Golbik, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie, danke ich für sein besonderes Engagement sowohl auf ideellem als auch auf experimentellem Gebiet. Seiner regen Diskussionsbereitschaft (verbunden mit einer Tasse Kaffee) und den daraus resultierenden fachlichen Ansatzpunkten verdanke ich eine stets erfolgreiche Fortführung meiner Arbeit.

Herr Dr. Klaus Gast der Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Abteilung physikalische Biochemie danke ich für die Einführung in die Theorie zur Lichtstreuung sowie für die experimentelle Durchführung und Auswertung der Messdaten und den daraus resultierenden fruchtbaren Dialogen.

Herr Dr. Christoph Parthier, Abteilung Physikalische Biotechnologie, danke ich für Durchführung der Korrektur zu den kristallographischen Daten der Struktur aus *Rattus norvegicus* sowie den *screening*-Versuchen der Kristallisation des humanen Proteins.

Frau Dr. Angelika Schierhorn, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale, danke ich für die experimentelle Durchführung der massenspektrometrischen Peptidfragmentierungsanalyse.

Bei Herrn Dr. Thomas Klose bedanke ich mich recht herzlich für die Vielzahl an „interkontinentalen“ fruchtbaren Diskussionen.

Ein besonders großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Peter Asztalos. Er hat mir vor allem mit seinen Gesprächen hilfreich zur Seite gestanden und mich auch in schwierigen Phasen der Arbeit stets motiviert und bei der Lösung vieler Problemstellungen aktiv unterstützt.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Frau Claudia Bruhne und Frau Karin Hölsken der Arbeitsgruppe Dermatologie für ihren steten Zuspruch und den experimentellen Hilfestellungen.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich vor allem für ihre Geduld und Ihre Unterstützung, die zu der Realisierung der Arbeit führten, sowie für die Ablenkung vom Laboralltag und die vielen Zusprüche im Endspurt der Arbeit danken.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. An Stellen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere außerdem, dass ich keine andere als die angegebene Literatur verwendet habe. Diese Versicherung bezieht sich auch auf alle in der Arbeit enthaltenen Zeichnungen, Skizzen, bildlichen Darstellungen und dergleichen.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Halle, den 03.11.2011

Manuela Knappe

CURRICULUM VITAE

Angaben zur Person:

Name:	Manuela Knappe
Geburtsdatum, -ort:	25. Februar 1981, Wolfen
Familienstand:	ledig
Anschrift:	Herderstr. 4 06114 Halle/Saale
Email:	manuela.knappe@biochemtech.uni-halle.de

Universitäre Ausbildung:

seit Mai 2005	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie, Muskellabor Promotion zum Thema: „ <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> - Charakterisierung der humanen Carnitin-Palmitoyltransferase 2“ unter der Leitung von Prof. Dr. Stephan Zierz & Prof. em. Dr. Gerhard Hübner
2004-2005	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie und Biotechnologie/ Abteilung Enzymologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2003-2004	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Biotechnologie/ Abteilung Enzymologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss Diplom (Note: gut)
1999-2003	Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulbildung:

1991-1999	Gymnasium „Wolfen-Nord“ in Wolfen-Nord, Abschluss: Abitur
-----------	--

Veröffentlichungen/ Projekte/Lehrgänge:

- 2011
(in Vorbereitung) Histological characterization and biochemical analyses of respiratory chain enzymes of autochthonous back muscles in neuromuscular healthy subjects
M. Ponfick, C. Zimmermann, A.C. Ludolph, H. Reichel, B. Cakir, W. Käfer, A. Hauburger, M. Knape, S. Zierz, J. Kassubek, A.D. Sperfeld, H.-J. Gdynia
- 2009 Frankfurt am Main
Gentechnikrecht: Gefährdungspotentiale, Sicherheitsmaßnahmen und Rechtsvorschriften; Staatlich anerkannte Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und BBS gemäß § 15 GenTSV
- 2009 Phosphoglycerate mutase deficiency: case report of a manifesting heterozygote with a novel E154K mutation and very late onset.
Joshi PR, Knape M, Zierz S, Deschauer M.,
Acta Neuropathol. 2009 Jun;117(6):723-5. 2009 Mar 26.
- 2009 Mitteldeutsche Neurologische Konferenz
Vortrag: Expression, Reinigung & Charakterisierung von hCPT2-N Wildtyp und Varianten
- 2008 DGN-Jahreskongress 2008, 10. - 13. September 2008, Hamburg
Thema: Biochemische und molekulargenetische Identifikation von Patienten mit Phosphoglycerat-Mutase Mangel
- 2007 Wirksamkeitsstudie: Biologischer Einfluss von Komposita auf mitochondriale Enzymaktivitäten in humanen Kontrollbiopsaten und Muskelproben von Patienten mit gesicherter Diagnose einer Mitochondriopathie, sowie in Rindermuskel als Referenz [Biologische Heilmittel Heel GmbH, Baden-Baden]
- 2007 Analysis of spectrum and frequencies of mutations in McArdle disease. Identification of 13 novel mutations.
Deschauer M, Morgenroth A, Joshi PR, Gläser D, Chinnery PF, Aasly J, Schreiber H, Knape M, Zierz S, Vorgerd M.
J Neurol. 2007 Jun;254(6):797-802.
- 2006 Molecular and biochemical investigations in fumarase deficiency.
Deschauer M, Gizatullina Z, Schulze A, Pritsch M, Knöppel C, Knape M, Zierz S, Gellerich FN.
Mol Genet Metab. 2006 Jun;88(2):146-52.