

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums  
Halle (Saale)

Direktor: Prof. Dr. Stephan Zierz

Biochemische Charakterisierung der Carnitin Palmitoyltransferase II bei muskulärem  
CPT II- Mangel

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

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

von Diana Lehmann  
geboren am 16.07.1985 in Essen

Gutachter: Prof. Dr. S. Zierz  
Prof. Dr. P. Berlit, Essen  
Prof. Dr. H. Reichmann, Dresden

Eröffnungsdatum: 14.01.2014

Verteidigungsdatum: 08.07.2014

## REFERAT

Die Carnitin- Palmitoyltransferase II (CPT II) ist ein Enzym des Fettsäurestoffwechsels, welches zusammen mit der CPT I am Transport von langkettigen Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran beteiligt ist. Die Symptome des benignen muskulären CPT II- Mangels, welcher der phänotypisch häufigste CPT- Mangel ist, sind meist belastungsinduzierte Episoden von Paresen und Myalgien bis hin zur Rhabdomyolyse. Die biochemischen Konsequenzen der krankheitsauslösenden Mutation (Allelhäufigkeit der S113L Mutation: 60-70%) sind bislang nicht eindeutig geklärt. Die Hypothesen reichen von einem fehlenden Enzymprotein, über eine verminderte Stabilität des enzymatisch aktiven Proteins, bis zu einer abnormen Regulierbarkeit durch Malonyl-CoA und Triton X 100 eines ansonsten normal aktiven Enzymproteins.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die biochemische Charakterisierung der CPT II in Muskelbiopsien von Patienten mit genetisch gesichertem muskulärem CPT II- Mangel.

Die Analysen umfassten:

- (i) Charakterisierung der Aktivität (CPT I + CPT II), einschließlich Inhibition mit Malonyl CoA und Triton X 100
- (ii) Immunhistochemischer Nachweis der CPT II
- (iii) Proteinquantifizierung mittels Western Blot (CPT II)
- (iv) Proteinquantifizierung mittels ELISA (CPT I und CPT II)

Die CPT Gesamtaktivität war nicht signifikant unterschiedlich bei Patienten und Kontrollen. Die Restaktivität nach Hemmung mit Malonyl- CoA und Triton X-100 war bei Patienten signifikant reduziert. Die CPT II wurde immunhistochemisch in Typ I- Fasern mit der gleichen Intensität bei Patienten und Kontrollen dargestellt. Im Western Blot fanden sich die selben CPT II- Intensitäten bei Patienten und Kontrollen. Im ELISA fanden sich bei Patienten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede der CPT I und CPT II- Proteinkonzentrationen. Die Citratsynthaseaktivität war bei Patienten signifikant erhöht. Die CPT- Gesamtaktivität korrelierte sowohl mit der CPT I- als auch mit der CPT II- Proteinkonzentration bei Patienten und Kontrollen. Die Daten belegen die Hypothese, dass die biochemischen Folgen der Mutation eine abnorme Regulation, im Gegensatz zu einem enzymatisch inaktiven Enzymprotein zur Folge haben. Dies wurde durch die Ergebnisse auf Proteinebene, Aktivitätsmessung, Western Blot, ELISA und Immunhistochemie unterstützt.

Lehmann, Diana: Biochemische Charakterisierung der Carnitin Palmitoyltransferase II bei muskulärem CPT II- Mangel; Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 51 Seiten, 2013

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Biochemische Grundlagen .....	1
1.1.1 Fettsäureoxidation .....	1
1.1.2 Carnitintransportsystem .....	2
1.2 Carnitin- Palmitoyltransferase I .....	3
1.2.1 Struktur der Carnitin- Palmitoyltransferase I .....	3
1.2.2 Klinik des Carnitin- Palmitoyltransferase I- Mangels .....	3
1.2.3 Pathobiochemie des Carnitin- Palmitoyltransferase I- Mangels .....	4
1.2.4 Molekulargenetik des Carnitin- Palmitoyltransferase I- Mangels .....	4
1.2.5 Diagnostik des Carnitin- Palmitoyltransferase I- Mangels .....	4
1.3 Carnitin- Palmitoyltransferase II .....	5
1.3.1 Struktur der Carnitin- Palmitoyltransferase II .....	5
1.3.2 Klinik des Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels .....	5
1.3.3 Pathobiochemie des Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels .....	6
1.3.4 Molekulargenetik des Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels .....	7
1.3.5 Diagnostik des Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels .....	7
1.4 Muskulärer Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangel .....	8
1.4.1 Klinik .....	8
1.4.2 Pathobiochemie .....	8
1.4.3 Molekulargenetik .....	9
1.4.4 Diagnostik .....	9
<b>2 Zielstellung</b> .....	<b>10</b>
<b>3 Patienten</b> .....	<b>11</b>
3.1 Patienten mit Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangel .....	11
3.2 Kontrollen .....	11
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
4.1 Chemikalien .....	12
4.2 Standards: Marker und Kits .....	13
4.3 Antikörper .....	14
4.4 Geräte .....	16
4.5 Sonstiges Material .....	16

4.6 Muskelbiopsien.....	17
4.7 Biochemische Methoden.....	17
4.7.1 Messung der CPT- Enzymaktivität .....	17
4.7.2 Messung der Citratsynthaseaktivität .....	19
4.7.3 Proteinbestimmung .....	20
4.7.4 Western Blot .....	21
4.7.5 ELISA Carnitin- Palmitoyltransferase I und II .....	24
4.7.6 Immunhistochemie .....	29
4.7.7 Auswertungsmethoden.....	29
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
5.1 Enzymaktivität .....	30
5.2 Western Blot .....	30
5.3 ELISA Carnitin- Palmitoyltransferase I und II.....	31
5.4 Citratsynthase.....	34
5.5 Immunhistochemie.....	36
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>37</b>
6.1 CPT- Aktivität bei muskulärem CPT II- Mangel .....	37
6.2 CPT II- Proteinquantifizierung bei Patienten und Kontrollen .....	38
6.3 Veränderungen der Citratsynthaseaktivität bei muskulärem CPT II- Mangel .....	40
6.4 Pathophysiologische Signifikanz.....	41
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>42</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>43</b>
<b>9 Thesen .....</b>	<b>51</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Creatinkinase
CPT	Carnitin- Palmitoyltransferase
CPT I	Carnitin- Palmitoyltransferase I
CPT II	Carnitin- Palmitoyltransferase II
CS	Citratsynthase
DTT	Dithiothreitol
ELV	ELISA Lyseverfahren
FG	Feuchtgewicht
LV	Lyseverfahren
NCP	Nicht-Kollages-Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Tab.	Tabelle

# 1 Einleitung

Die Erstbeschreibung des muskulären CPT- Mangels erfolgte durch DiMauro 1973 [1]. Der muskuläre CPT II- Mangel ist die phänotypisch häufigste Form des CPT II- Mangels. Klinisch manifestiert sich der muskuläre CPT II- Mangel durch Attacken von Muskelschwäche, Myalgien und Rhabdomyolyse, teils bis zum Nierenversagen. Diese Attacken werden ausgelöst durch prolongierten Sport, Fasten, Fieber oder Kälte [2, 3]. Der benigne adulte, muskuläre CPT II- Mangel folgt einem autosomal- rezessiven Erbgang. Bei ca. 90% der Patienten findet sich die S113L Mutation auf dem CPT II- Gen, mit einer Allelhäufigkeit von 60-70% [4-6].

Da die biochemischen Konsequenzen der krankheitsauslösenden Mutation noch immer kontrovers diskutiert werden, erfolgt in der vorliegenden Arbeit eine biochemische Charakterisierung der CPT bei Patienten mit genetisch gesichertem, muskulärem CPT II- Mangel.

## 1.1 Biochemische Grundlagen

### 1.1.1 Fettsäureoxidation

Die mitochondriale Oxidation von freien Fettsäuren zur Energiegewinnung der Zelle bedarf als äußerst komplexer Prozess einer Reihe von enzymatischen Reaktionen [7-9]. Da Nahrungsfette hauptsächlich aus langkettigen Fettsäuren bestehen ( $C_{14}$ - $C_{20}$ ), welche die Mitochondrienmembran nicht direkt passieren können, braucht es ein aktives Transportsystem, welches die langkettigen Fettsäuren aktiv durch die äußere und innere Mitochondrienmembran transportiert [10]. Zu Beginn dieses Prozesses werden die Fettsäuren aus dem Zytosol durch die Acyl- CoA- Synthetase an der äußeren Mitochondrienmembran verestert [11]. Die Aktivierung der Fettsäuren ermöglicht nun den aktiven Transport durch die Mitochondrienmembran mittels eines Transportsystems, bestehend aus der Carnitin- Acylcarnitin- Translokase und den Carnitin- Palmitoyltransferasen I und II. Weiterhin wird für den Transport der veresterten Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran L- Carnitin benötigt. L- Carnitin wird durch einen plasmamembranständigen Carnitintransporter in das Zytosol befördert [12]. Das Endprodukt der  $\beta$ - Oxidation in den Mitochondrien stellt Acetyl- CoA dar.

### **1.1.2 Carnitintransportsystem**

Die CPT mit beiden Unterformen CPT I und CPT II ist im Mitochondrium lokalisiert [13, 14]. Die CPT I ist ein transmembranäres Protein an der äußeren Seite der Mitochondrienmembran [15]. Es existieren drei bekannte gewebsspezifische Isoformen der CPT I. Die eine Isoform ist gewebsspezifisch für Leber und Fibroblasten (CPT I A oder L-CPT I) und ist kodiert auf Chromosom 11q13.1 [14, 16]. Die zweite Isoform findet sich in Skelettmuskelzellen und Herzmuskelzellen (CPT I B oder M CPT I), das kodierende Gen liegt auf Chromosom 22q13.33 [14]. Die dritte bekannte Isoform der CPT I ist im Gehirn und Hoden (CPT I C) zu finden und wird auf Chromosom 19q13.33 kodiert [17]. An der inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran ist die CPT II lokalisiert. Von diesem Enzym gibt es eine einzige Isoform [14].

Die Carnitin- Palmitoyltransferasen dienen zusammen mit der Carnitin- Acylcarnitin- Translokase als Transportsystem für veresterte Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran (Abb.1). Der erste Transportschritt wird von der Carnitin- Palmitoyltransferase I an der äußeren Mitochondrienmembran katalysiert. Hierbei wird langkettiges Acyl- CoA zusammen mit Carnitin zu langkettigem Acyl- Carnitin und CoenzymA. Diese Katalyse ist geschwindigkeitsbestimmend für alle nachfolgenden Reaktionen, somit auch für die  $\beta$ -Oxidation [18]. Das durch den Transport entstandene Acyl- Carnitin kann mittels der Carnitin- Acylcarnitin- Translokase nun durch die innere Mitochondrienmembran transportiert werden. Der Acylrest des Acyl- Carnitins wird auf der Innenseite der Mitochondrienmembran durch die Carnitin- Palmitoyltransferase II wieder auf CoenzymA übertragen. Es entstehen Acyl- CoA und Carnitin. Das so wieder frei gewordene Carnitin gelangt durch die Carnitin- Acylcarnitin- Translokase zurück in den Intermembranraum des Mitochondriums und steht dem erneuten Transport von Fettsäuren zur Verfügung.

Eine Störung des Carnitin- Palmitoyltransferasesystems kann sowohl die CPT I als auch die CPT II betreffen, beide Erkrankungen folgen einem autosomal- rezessiven Erbgang.

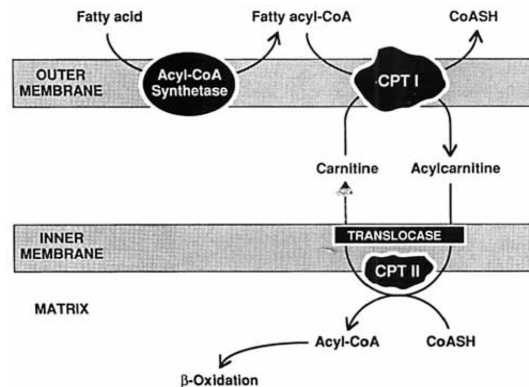


Abb. 1: Transportsystem für verestete Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran, [14]; CoASH: freies CoEnzym A. Die CPT I katalysiert die Reaktion von langkettigem Acyl- CoA mit Carnitin zu langkettigem Acyl- Carnitin und Coenzym A. Das entstandene Acyl- Carnitin kann mittels der Carnitin- Acylcarnitin- Translokase in die Mitochondrienmatrix transportiert werden. Die CPT II an der Innenseite der Mitochondrienmembran überträgt den Acylrest des Acyl- Carnitins wieder auf Coenzym A. Es entstehen Acyl- CoA und Carnitin.

## 1.2 Carnitin- Palmitoyltransferase I

### 1.2.1 Struktur der Carnitin- Palmitoyltransferase I

Die Carnitin- Palmitoyltransferase I ist ein transmembranäres Protein der äußeren Mitochondrienmembran. Seine zwei transmembranären Domänen, der N- und C- Terminus, sowie die Malonyl- CoA- Bindungsstelle liegen auf der dem Zytosol zugewandten Seite [15]. Die CPT setzt sich aus 773 Aminosäuren zusammen. Morillas et al. konnten auf Basis der Carnitinacetyltransferase und deren ähnlicher Aminosäuresequenz zur CPT I ein Strukturmodell der L- CPT I (Ratten) mit Darstellung von 607 Aminosäuren entwickeln [18].

### 1.2.2 Klinik des Carnitin- Palmitoyltransferase I- Mangels

Im Bezug auf die CPT I und ihrer drei Isoformen sind lediglich Mutationen der gewebsspezifischen Isoform für Leber und Fibroblasten (CPT I A oder L- CPT I) bekannt [19]. Störungen der CPT I sind sehr selten. Liegt ein CPT I- Mangel vor, dann betrifft die Mutation die leber- und fibroblastenspezifische Isoform CPT I A. Bis heute sind über 20 Fälle mit akut einhergehendem Leberversagen beschrieben worden [20]. Eine Aktivitätsstörung der CPT I A führt zur verminderten Aufnahme von langkettigen Fettsäuren



in die Mitochondrien. Klinische Symptome werden bei erhöhtem Energiebedarf des Körpers, meist getriggert durch fieberhafte oder gastrointestinale Infekte hervorgerufen. Es werden drei Phänotypen unterschieden. Die hepatische Enzephalopathie tritt vermehrt bei Kindern auf und geht mit hypoketotischen Hypoglykämien und akutem Leberversagen einher. Des Weiteren gibt es die Form einer adulten Myopathie. Weiterhin wurde das Auftreten einer akuten Fettleber während der Schwangerschaft beschrieben, wobei der Fetus homozygot für die CPT I A- Mutation ist. Die Therapie des CPT I A- Mangels erfolgt rein symptomatisch durch Vermeidung von Hypoglykämien und eine kohlenhydratreiche Ernährung [21].

### **1.2.3 Pathobiochemie des Carnitin- Palmitoyltransferase I- Mangels**

Die Klinik des CPT I- Mangels ist bedingt durch eine insuffiziente Ketonkörpersynthese und eine begrenzte Acetyl- CoA Synthese. Durch die mangelnde Syntheseleistung wird die Glukoneogenese stimuliert. Der kompensatorisch gesteigerte Glucoseverbrauch erklärt die Klinik des CPT I- Mangels. Da die CPT- I A nicht nur in der Leber exprimiert wird, sondern auch in anderen intestinalen Organen, kann dadurch das Auftreten einer tubulären Azidose erklärt werden.

### **1.2.4 Molekulargenetik des Carnitin- Palmitoyltransferase I- Mangels**

Die für die gewebsspezifische Isoform der CPT I für Leber und Fibroblasten (CPT I A oder L CPT I) liegt auf Chromosom 11q13 und enthält 19 Exons. Es sind aktuell für den CPT I- Mangel 24 Mutationen beschrieben worden, wobei es sich meist um seltene Mutationen innerhalb einer Familie handelt [20]. Die erste CPT I A Mutation wurde 1998 von Iljst et al. [22] nachgewiesen. Die beschriebenen Mutationen liegen über die gesamte Gensequenz verteilt. Beschrieben sind 21 Punktmutationen, wovon fünf Nonsense- Mutationen sind, bei den restlichen handelt es sich um Missense- Mutationen und eine Splice- Mutation. Bei den restlichen vier beschriebenen Mutationen handelt es sich um In- Frame- bzw. Frame- Shift- Mutationen, sowie eine 8kb- Deletionsmutation (Intron14- Exon17) [16, 22-27].

### **1.2.5 Diagnostik des Carnitin- Palmitoyltransferase I- Mangels**

Bei Patienten mit einem CPT I A Mangel sind nach einem Fastentests oder während einer Attacke verminderte Serumglucosewerte sowie verminderte Ketonkörperwerte im Blut nachweisbar [20]. In der Tandem- Massenspektrometrie fällt beim CPT I Mangel ein

erhöhtes Serumcarnitin auf, langkettige Acylcarnitine sind dagegen erniedrigt. Laut Fingerhut et al. hat der Carnitin/ Palmitoylcarnitin+ Stearoylcarnitin- Quotient eine hohe Spezifität im Bezug auf die Diagnostik eines CPT I Mangels [28]. Zur Bestätigung der Diagnose wird eine erweiterte Diagnostik mittels Fibroblasten/ Lymphozyten- Enzymatik und Molekulargenetik empfohlen. Bei Patienten ist eine Reduktion der langkettigen Fettsäureoxidation in Lymphozyten oder Fibroblasten nachzuweisen. Dies ist ebenfalls bei Patienten mit einem infantilen/ neonatelen CPT II Mangel nachzuweisen [29]. Bei Patienten mit adultem CPT II Mangel hingegen liegt die Oxidation der langkettigen Fettsäuren im Normalbereich [30].

## 1.3 Carnitin- Palmitoyltransferase II

### 1.3.1 Struktur der Carnitin- Palmitoyltransferase II

Die CPT II ist ein mitochondriales Enzymprotein der inneren Mitochondrienmembran. Finocchiaro et al. gelang 1991 die erstmalige Isolation der menschlichen CPT II- cDNA, welche aus 658 Aminosäuren besteht [31]. Das für die CPT II kodierende Gen liegt auf Chromosom 1, umfasst 20kb und fünf Exons [32]. In 90% der erkrankten Patienten findet sich eine S113L Mutation mit einer Allelhäufigkeit von 60-70% [4-6].

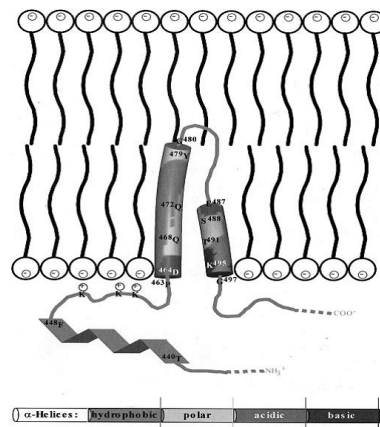


Abb. 2: Lage der Carnitin- Palmitoyltransferase II in der inneren Mitochondrienmembran und Darstellung von Mutationen, [32].

### 1.3.2 Klinik des Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels

Bei dem CPT II- Mangel werden drei Erkrankungsformen unterschieden, obwohl bei diesem

Enzym nur eine Isoform bekannt ist. Die klinische Heterogenität des CPT II- Mangels beruht auf unterschiedlichen Mutationen, welche wiederum zu unterschiedlichen Organmanifestationen führen. Es scheint zunächst schwer verständlich, dass Mutationen einer Isoform eines Enzyms zu Erkrankungen mit unterschiedlicher Ausprägung und Organbeteiligung führen können. Grundlage dessen sind verschiedene Mutationen, sowohl homozygot als auch heterozygot mit verschiedenen daraus resultierenden Konsequenzen. Eine genauere Betrachtung dieser komplexen Thematik erfolgt unter 1.3.4.

Es wird differenziert zwischen der neonatalen, infantilen und der adulten, muskulären Form des Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels. Auf Grund der Wichtigkeit für diese Arbeit wird der muskuläre Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangel im Kapitel 1.4 gesondert diskutiert.

#### **Neonataler Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangel**

Der neonatale CPT II- Mangel ist eine innerhalb der ersten Lebensmonate letal verlaufende Erkrankung. Die Erkrankung zeigt die Symptome des infantilen Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels wie rezidivierende hypoketotische Hypoglykämien, Kardiomyopathien und Lebersagen. Hinzu kommen Missbildungen des Gehirns und der Nieren [20, 33].

#### **Infantiler Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangel**

Der infantile, hepatokardiomuskuläre Typ des CPT II- Mangels ist gekennzeichnet durch Attacken weise auftretende hypoketotische Hypoglykämien, Kardiomyopathie, Lebersagen und milde Muskelbeteiligung [33, 34]. Es kann innerhalb des ersten Lebensjahres zum plötzlichen Kindstod kommen [20].

#### **1.3.3 Pathobiochemie des Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels**

Beim CPT II- Mangel kann Acylcarnitin über die innere Mitochondrienmembran transportiert werden, jedoch ist die Umwandlung in Acyl- CoA insuffizient. Folge ist eine Akkumulation von Acylcarnitin im Plasma, welche auch für diagnostische Zwecke genutzt wird. Langkettige Fettsäuren stellen während Belastung die Hauptenergiequelle für den menschlichen Muskel. Ob es zu einem schweren neonatalen, infantilen oder einem milden adulten Erkrankungstyp kommt, hängt von der Mutation ab. Das ubiquitäre Vorhandensein der CPT II- erklärt bei der neonatalen und infantilen Erkrankung die multisystemische

Organbeteiligung.

#### **1.3.4 Molekulargenetik des Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels**

Das CPT II kodierende Gen enthält fünf Exons und liegt auf Chromosom 1p32. Die klinische Heterogenität des CPT II- Mangels beruht auf Mutationen einer Isoform des Enzyms, welche zu verschiedenen Erkrankungen mit unterschiedlicher Ausprägung und Organbeteiligung führen. Grundlage dessen sind verschiedene Mutationen, sowohl homozygot als auch heterozygot mit verschiedenen daraus resultierenden Konsequenzen. Bis zum aktuellen Zeitpunkt konnten 60 Mutationen im CPT II- Gen nachgewiesen werden, welche auf den codierenden Genregionen sowie in den gesplizten Genabschnitten nachgewiesen wurden [6]. Eine eindeutige Genotyp- Phänotyp Beziehung konnte nicht beschrieben werden. Bonnefont et al. konnten jedoch beim Auftreten homozygoter Mutationen, sofern es sich um milde Missense- Mutationen handelte, wie die häufige S113L Mutation beschreiben, dass diese mit dem benignen, muskulären CPT II- Mangel assoziiert sind [5]. Schwere Mutationen, sofern sie homozygot auftreten, wie zum Beispiel die trunkierende 413delAG- F448L Mutation, konnten mit dem neonatalen oder dem infantilen Typ des CPT II- Mangels assoziiert werden [5]. Bei 90% der Patienten mit muskulärem CPT II- Mangel findet sich eine S113L Mutation mit dem Austausch der Aminosäure Serin gegen Leucin [4, 6, 20]. Diese Mutation wurde bis jetzt noch nicht bei Patienten mit der infantilen Form des CPT II- Mangels gefunden. Auch konnte bis dato noch keine Häufung einer spezifischen Mutation, die zu der infantilen Form des CPT II- Mangels führt, gefunden werden. Die neonatale, letale Form ist assoziiert mit auf beiden Allelen auftretenden trunkierenden Mutationen.

#### **1.3.5 Diagnostik des Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangels**

Bei Patienten mit einem infantilen CPT II- Mangel sind verminderte Serumglucosewerte sowie verminderte Ketonkörperwerte nach einem Fastentests oder während einer Krankheitsattacke im Blut nachweisbar [20]. In der Tandem- Massenspektrometrie wird gezielt das Acylcarnitinprofil untersucht. Bei Patienten mit CPT II- Mangel findet sich eine Akkumulation des Acylcarnitins Palmitoylcarnitin [35]. Ein erhöhter Palmitoylcarnitin+ Stearoylcarnitin/ Acetylcarnitin- Quotient kann folglich im Serum gefunden werden. Wie bereits beschrieben, findet sich bei Patienten mit infantilem/ neonatalem CPT II- Mangel eine Reduktion der langkettigen Fettsäureoxidation in Lymphozyten oder Fibroblasten [29].

## **1.4 Muskulärer Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangel**

### **1.4.1 Klinik**

Der benigne, adulte, muskuläre CPT II-Mangel wurde bisher in über 200 Familien beschrieben [20], erstmals im Jahr 1973 von DiMauro [1]. Der benigne muskuläre CPT II-Mangel ist der phänotypisch am häufigsten zu beobachtende CPT- Mangel. Er ist die häufigste Form einer Störung des muskulären Fettstoffwechsels und eine der häufigsten Ursachen für genetisch bedingte Störungen der mitochondrialen Fettsäureoxidation [36] und eine der Hauptursachen für wiederkehrende hereditär bedingte Myoglobinurien, sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen [37]. Die Erkrankung ist charakterisiert durch intermittierende Episoden von Muskelschmerzen optional mit Muskelkater oder Muskelsteifigkeit, Myoglobinurie und Rhabdomyolyse, bevorzugt treten diese Symptome nach körperlicher Anstrengung auf [3-5, 20, 38]. Das klinische Hauptmerkmal dieser Erkrankung sind die rezidivierenden, meist durch körperliche Belastung ausgelösten Myoglobinurieattacken [3, 37]. Männer sind im Verhältnis 5,5:1 häufiger betroffen als Frauen, wobei zu beachten ist, dass bei Frauen generell meist mildere Symptome auftreten. Es kommt beim weiblichen Geschlecht oftmals nur zu generalisierten, fieber- oder sportinduzierten Myalgien ohne wegweisende Myoglobinurie [4]. Die Ursache hierfür ist bislang unbekannt.

Die Behandlung erfolgt rein symptomatisch bzw. durch Vorbeugung oben beschriebener Attacken, zum Beispiel durch eine regelmäßige kohlenhydratreiche- und fettarme Ernährung. Hat der Körper einen erhöhten Energiebedarf, beispielsweise während eines Infektes, muss auf eine ausreichende Kohlenhydratzufuhr geachtet werden. Auslösende Faktoren wie Fasten, Kälte, Ausdauersport sollten vermieden werden.

### **1.4.2 Pathobiochemie**

Folge des CPT II- Mangels ist eine Akkumulation von Acylcarnitin im Plasma, welche auch für diagnostische Zwecke genutzt wird. Ursache hierfür ist, dass Acylcarnitin über die innere Mitochondrienmembran transportiert wird, jedoch die Umwandlung in Acyl- CoA insuffizient ist. Langkettige Fettsäuren stellen die Hauptenergiequelle für den menschlichen Muskel während körperlicher Belastung dar. Beim benignen, muskulären CPT II- Mangel könnte die milde Verlaufsform durch eine vorhandene Restaktivität des Enzymproteins erklärt werden. Über die biochemischen Konsequenzen dieser Mutation herrscht bislang

Uneinigkeit.

### **1.4.3 Molekulargenetik**

Das CPT II kodierende Gen enthält fünf Exons und liegt auf Chromosom 1p32. Bei ca. 90% der Patienten findet sich die S113L Mutation auf dem CPT II- Gen, mit einer Allelhäufigkeit von 60-70% [4-6]. Hierbei findet ein Austausch der Aminosäure Serin 113 gegen Leucin statt. Bis zum aktuellen Zeitpunkt konnten 60 Mutationen im CPT II- Gen nachgewiesen werden. Die bislang gefundenen Mutationen befinden sich in den codierenden Genregionen sowie in den gespliceten Genabschnitten [6]. Eine eindeutige Genotyp- Phänotyp Beziehung konnte bislang nicht identifiziert werden. Bonnefont et al. beschrieben beim Auftreten homozygoter, milder Missense Mutationen, wie der häufigen S113L Mutation eine Assoziation mit dem benignen, muskulären CPT II- Mangel [5]. Schwere Mutationen, sofern sie homozygot auftreten, wie zum Beispiel die trunkierende 413delAG- F448L Mutation, konnten mit dem neonatalen oder dem infantilen Typ des CPT II- Mangels assoziiert werden [5].

### **1.4.4 Diagnostik**

Die meisten Patienten mit einem muskulären CPT II- Mangel zeigen fasteninduziert einen unzureichenden bzw. verspäteten Anstieg der Ketonkörper im Serum, die CK ist dagegen deutlich erhöht. In der Tandem- Massenspektrometrie wird gezielt das Acylcarnitinprofil untersucht. Bei Patienten mit CPT II- Mangel findet sich eine Akkumulation des Acylcarnitins Palmitoylcarnitin [35]. Ein erhöhter Palmitoylcarnitin+ Stearoylcarnitin/ Acetylcarnitin- Quotient kann folglich im Serum gefunden werden. Zur molekulargenetischen Sicherung der Diagnose kann eine Untersuchung des Patientenserums auf die häufigsten Mutationen durchgeführt werden. Bei ca. 90% der Patienten findet sich die S113L Mutation auf dem CPT II- Gen, mit einer Allelhäufigkeit von 60-70% [4-6]. Eine Sequenzierung des gesamten CPT II- Gens ist möglich. Ist der Nachweis einer Mutation nicht möglich, stellt die biochemische Diagnostik den sichersten Weg dar, einen muskulären Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangel zu diagnostizieren. Die biochemische Untersuchung der Muskelbiopsie zeigt im Falle eines CPT II- Mangels ein abnorm reguliertes Enzymprotein [39], wohingegen die CPT- Gesamtaktivität im Muskelhomogenat unter optimalen Testbedingungen im Normalbereich liegt [4]. Myopathologisch kann bisher kein spezifischer Befund erhoben werden. Deschauer et al. konnten zeigen, dass ca. 50% der

Patienten mit CPT II- Mangel histopathologisch nur sehr unspezifische myopathische Veränderungen zeigen [4].

## **2 Zielstellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die biochemische Charakterisierung der CPT I und CPT II im Muskelhomogenat von Patienten mit genetisch gesichertem CPT II- Mangel.

Dazu wurden die CPT I und CPT II im Muskelhomogenat von Patienten im Vergleich zu Kontrollen untersucht.

Die Enzymaktivität des Enzymproteins sollte unter optimalen Testbedingungen mittels Isotopen- Vorwärtsreaktion bestimmt werden. Die Citratsynthaseaktivitäten sollten bei Patienten und Kontrollen untersucht werden. Eine Quantifizierung des Enzymproteins sollte mittels Western Blot und ELISA durchgeführt werden. Für Western Blot und ELISA galt es, optimale Testbedingungen zu etablieren.

Im Rahmen der Arbeit wird versucht, folgende Fragen zu beantworten:

1. Ist die CPT- Enzymaktivität bei Patienten mit genetisch gesichertem CPT II-Mangel reduziert im Vergleich zu Kontrollen?
2. Liegt bei Patienten mit genetisch gesichertem CPT II-Mangel im Vergleich zu Kontrollen eine abnorme Inhibierung der CPT vor?
3. Gibt es Unterschiede in der Citratsynthaseaktivität zwischen Patienten mit genetisch gesichertem CPT II- Mangel und Kontrollen?
4. Ist ein Nachweis der CPT I/ CPT II im Western Blot bei Patienten mit genetisch gesichertem CPT II-Mangel und Kontrollen möglich?
5. Gibt es einen Unterschied in der Bandenintensität der CPT I/ CPT II bei Patienten mit genetisch gesichertem CPT II- Mangel und Kontrollen?
6. Ist eine Quantifizierung der CPT I/ CPT II mittels ELISA möglich?
7. Gibt es einen Unterschied in der Proteinkonzentration der CPT I/ CPT II bei Patienten mit genetisch gesichertem CPT II- Mangel und Kontrollen?
8. Stellt sich die CPT II in der immunhistochemischen Darstellung in der gleichen Intensität bei Patienten mit genetisch gesichertem CPT II- Mangel und Kontrollen dar?

## **3 Patienten**

### **3.1 Patienten mit Carnitin- Palmitoyltransferase II- Mangel**

Für die vorliegende Arbeit wurden Muskelbiopsien von neuen Patienten mit genetisch gesichertem CPT II- Mangel untersucht. Eine Übersicht über die klinischen und molekulargenetischen Daten ist in Tab. 1 gegeben. Die Biopsien stammen aus der Neurologischen Universitätsklinik Halle/Saale, der Neurologischen Universitätsklinik Bonn, der Neurologischen Universitätsklinik München, der Neurologischen Universitätsklinik Münster und der Neurologischen Universitätsklinik Hannover.

### **3.2 Kontrollen**

Bei den in der Arbeit verwendeten 18 Muskelbiopsien der Kontrollpatienten (9 männlich, 9 weiblich), im Alter von 25 bis 81 Jahren handelt es sich ausschließlich um humane Skelettmuskulatur. Diese Biopsien wurden alle in der neurologischen Universitätsklinik Halle/Saale entnommen. Die Muskelbiopsie der Kontrollpatienten erfolgte auf Grund des Verdachts einer neuromuskulären Erkrankung. Die Kontrollen wurden als Kontrollen zugelassen, sofern sich kein Hinweis für eine Muskelerkrankung in Klinik, in Elektrophysiologie und Histologie fand.



*Tabelle 1: Übersicht über die klinischen und molekulargenetischen Daten der 9 Patienten mit CPT II- Mangel*

Alter (Geschlecht)	Klinische Symptome	Genotyp
39 (w)	Während körperlicher Anstrengung dreimalig Muskelschmerzattacken, einmalig deutliche CK-Erhöhung	S113L/S113L
39 (m)	mehrmalig Myoglobinurieattacken	S113L/S113L
57 (m)	mehrmalig Myoglobinurieattacken	S113L/S113L
67 (m)	mehrmalig Myoglobinurieattacken, eine Attacke mit akutem Nierenversagen	S113L/S113L
30 (m)	einmalige Myoglobinurieattacke, Muskelschmerzen während körperlicher Belastung	S113L/R231W
47 (m)	mehrmalig Myoglobinurieattacken	S113L/Y479F
54 (m)	mehrmalig Myoglobinurieattacken	S113L/515del4
58 (m)	zweimalig Myoglobinurieattacken	S113L/413delAG-F448L
63 (m)	mehrmalig Myoglobinurieattacken und Myalgien	S113L/P50H

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

Von der Firma AppliChem (Darmstadt) stammten folgende Chemikalien: Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamin-tetraessigsäure, purum (EDTA), Glycin, Harnstoff und Magermilchpulver.

Von der Firma Beckmann Coulter (Krefeld) stammte folgende Chemikalie: Ready Safe Szintillationsflüssigkeit.

Von der Firma Ferak (Berlin) stammte folgende Chemikalie: Triton X.

Von der Firma Merck (Darmstadt) stammten folgende Chemikalien: Acetyl- Coenzym A-

Trilithiumsalz, Ammoniumlösung, gesättigt, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ammoniumsulfat, Bovines Serum Albumin (BSA), Bromophenol Blue 0,2%, Isobutanol, Isobutanollösung, konzentriert, Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) und Kaliumchlorid (KCl).

Von der Firma Merck- Schuchardt (Hohenbrunn) stammten folgende Chemikalien: Natriumchlorid (NaCl) und Tween-20.

Von der Firma Nen Life (Zaventem) stammte folgende Chemikalien: L-[ $^{14}C$ ]-Carnitinlösung.

Von der Firma Roth (Karlsruhe) stammten folgende Chemikalien: Glycerol 98%, Natriumacetat, Natriumhydroxid (NaOH), Rotiophorese Gel 30%, Salzsäure (HCl), N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, ultra pure.

Von der Firma Serva (Heidelberg) stammten folgende Chemikalien: Mannitol und Natriumdodecylsulfat (SDS, ultra pure).

Von der Firma Sigma (Steinheim) stammten folgende Chemikalien: 5,5- Dithiobis (2-Nitrobenzoic Acid) (DTNB), Isopropanol, Kaliumhydroxid (KOH), L- Carnitin, Malonyl-Coenzym A, Methanol, Oxalacetat, Palmitoyl-Coenzym A und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).

Zur Herstellung aller Puffer, Lösungen und Medien wurde Aqua bidest. (Braun, Meisungen) verwendet.

## 4.2 Standards: Marker und Kits

Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
BCA Protein Assay Reagent	Pierce (Rockford, USA)
Cruz Marker™ Molecular Weight Standards: sc-2035	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
EDTA 0,5M Solution (100X)	Thermo Scientific (Rockford, USA)
ELISA Kit for Human CPT 2, mitochondrial	USCN Life Science Inc. (Wuhan, China)
ELISA Kit for Human CPT 1B, Muscle (CPT1B)	USCN Life Science Inc. (Wuhan, China)
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific

HeLa Whole Cell Lysate: sc-2200	(Rockford, USA) Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Kodak GBX™Entwickler	Kodak (Steinheim)
Kodak GBX™ Fixierer	Kodak (Steinheim)
LSAB™ Kit	Dako (Hamburg)
Mitochondria Isolation Kit for Tissue	Pierce (Rockford, USA)
Mouse liver extract: sc-2256	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	(St. Leon Roth)
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce (Rockford, USA)

### 4.3 Antikörper

*Tabelle 2: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Primärantikörper gegen die CPT I*

Antikörper	Bestellnr.	Hersteller - verdünung	Firma	Ort
C18 CPT I- M, polyklonal	sc-20522	200µg/ml	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
H-120 CPT I-M, polyklonal	sc-20670	200µg/ml	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
SAB1300298, polyklonal	SAB1300298	200µg/ml	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
SAB1300662, polyklonal	SAB1300662	200µg/ml	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA

*Tabelle 3: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Primärantikörper gegen die CPT II*

Antikörper	Bestellnr.	Hersteller - verdünung	Firma	Ort
ab54589, monoklonal	ab54589	100µg/ml	Abcam	Cambridge, UK
H-300 CPT II, polyklonal	sc-20671	200µg/ml	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
HPA028201, polyklonal	HPA028201	0,05mg/ml	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
HPA028214, polyklonal	HPA028214	0,07mg/ml	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
O25, polyklonal	sc-130730	100µg/ml	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
SAB1401081, polyklonal	SAB1401081	200µg/ml	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA
WH00, monoklonal	WH0001376M 2	1mg/ml	Sigma- Aldrich	St. Louis, USA

*Tabelle 4: Übersicht über den in der Arbeit verwendeten Primärantikörper gegen die COX als mitochondrialen Marker*

Antikörper	Bestellnr.	Hersteller - verdünung	Firma	Ort
Anti-MTCO1 (1D6E1A8) - Mitochondrial Marker, monoklonal	ab14705	100µg /ml	Abcam	Cambridge, UK

*Tabelle 5: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Sekundärantikörper*

Antikörper	Bestellnr.	Hersteller - verdünung	Firma	Ort
donkey anti-goat IgG-HRP	sc-2033	200 µg/0.5 ml	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
donkey anti-mouse IgG-HRP	sc-2318	200 µg/0.5 ml	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
goat anti-rabbit IgG-HRP	sc-2030	200 µg/0.5 ml	Santa Cruz	Santa Cruz, USA

#### 4.4 Geräte

Flüssigkeitsszintillationszähler, Serie LS 6500	Beckmann Coulter (Krefeld)
Gelelektrophoreseeinheit Mighty Small II, SE 260	GE Healthcare (Buckinghamshire,UK)
Gelgießeinheit: Multipel Gel Casters SE 235	GE Healthcare (Buckinghamshire,UK)
Glas- Homogenisator (Typ Elvenhjem)	Wheaton (Millville, USA)
Microplate Reader Model 680	Bio Rad (München)
Schüttelbad	GFL (Burgwedel)
Spectrophotometer DU800	Beckmann Coulter (Krefeld)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Western Blot Apparatur Consort	Sigma- Aldrich, Inc.
Electrophoresis Power Supply, E835	(St. Louis, USA)

Des weiteren wurden die im Muskellabor der neurologischen Universitätsklinik Halle/Saale gebräuchlichen Pipetten, Zentrifugen und Laborgeräte benutzt.

#### 4.5 Sonstiges Material

Amersham Hyperfilm™ ECL	Amersham (S. Francisco, USA)
Gel- Blotting- Papier, 15x15cm	Whatman (Dassel)

Immobilon- P- Transfer- Membran; 0,45µm  
Mini-Gel System für Gelelektrophoreseeinheit  
Mighty Small II, SE 260

Millipore (Bedford, USA)  
GE Healthcare  
(Buckinghamshire, UK)

## 4.6 Muskelbiopsien

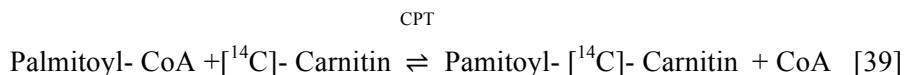
Alle untersuchten Muskelbiopsien wurden in Lokalanästhesie aus dem M. vastus lateralis entnommen. Die Biopsien wurden direkt nach der Entnahme mit isotoner Natriumchloridlösung gespült und von Fett- und Bindegewebe frei präpariert. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde ein Teil der Muskelbiopsie auf Kork fixiert. Das entnommene Material wurde sofort nach Entnahme in Isopentan gefroren und sowohl für Transport, als auch Lagerung in flüssigem Stickstoff gefroren.

## 4.7 Biochemische Methoden

### 4.7.1 Messung der CPT- Enzymaktivität

#### Isotopen- Vorwärts- Reaktion

Grundlage der Messung der Carnitin- Palmitoyltransferase- Aktivität ist die von Zierz und Engel beschriebene Isotopen- Vorwärtsreaktion [39].



Die Reaktionsgleichung zeigt, dass die CPT die Koppelung von Palmitoyl- CoA (Acyl-CoA- Ester) an radioaktiv markiertes Carnitin in einer Säure- Basen- Reaktion katalysiert. Bei dieser Reaktion werden Coenzym A und Acylcarnitin frei.

Diese Reaktionsgleichung ist durch die Möglichkeit einer Hin- und Rückreaktion gekennzeichnet, da sich Ausgang- und Endprodukte im Gleichgewicht befinden. Ist ein Reaktionsprodukt im Überschuss vorhanden kann dadurch die gewünschte Reaktionsrichtung vorgegeben werden. Bei dieser Reaktion liegt das Gleichgewicht auf der Seite der Hinreaktion, da  $[^{14}\text{C}]\text{- Carnitin}$  im Überschuss vorhanden ist. Mit Zugabe von Muskelhomogenat wird die Hinreaktion gestartet. Die Enzymaktivität wird nach 10 Minuten Inkubationszeit im Schüttelbad durch Zugabe von Isobutanol und Ammoniumsulfat abgestoppt. Eine Rückreaktion ist nicht mehr möglich. Das durch die Hinreaktion entstandene radioaktive Reaktionsprodukt Palmitoyl- $[^{14}\text{C}]\text{-Carnitin}$  wird nach Zentrifugation

abpipettiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

### Durchführung

Zur Messung der Enzymaktivität wurden die tiefgefrorenen Muskelbiopsien im Verhältnis 1:30 mit Chappel- Perry Medium A für 10 Minuten auf Eis homogenisiert.

[<sup>14</sup>C]-Carnitinstandardlösung: 50mM L-[<sup>14</sup>C]-Carnitinlösung; 300µl L- Carnitin  
Chappel-Perry Medium A: 100 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 120mM EDTA;  
50 mM Tris/HCL pH 7,5

Zur Messung der Enzymaktivität wurde gemäß Tab. 7 ein Testansatz hergestellt.

*Tabelle 7: Testansatz zur Bestimmung der CPT- Aktivität mit der Isotopen- Vorwärts-Reaktion*

Chemische Substanz (Konzentration)	Leerwert	
Tris/HCl pH 7,6 (10mM)	100 µl	100 µl
BSA (0,1%)	100 µl	100 µl
DTT (1mM)	25 µl	25 µl
Palmitoyl- CoA (0,08mM)	80 µl	80 µl
[ <sup>14</sup> C]- Carnitin (5mM)	100 µl	100 µl
Homogenat 1:30	/	100 µl

Mit Zugabe von 100 µl des Muskelhomogenats 1:30 zu dem oben dargestellten Testansatzes wurde die enzymatische Hinreaktion gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde sofort im Schüttelbad bei 30°C für exakt 10 Minuten inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde nach 10 Minuten durch 1ml Isobutanollösung, 1ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung sowie 700mg Ammoniumsulfat gestoppt. Das Gemisch wurde 10 s gevortext, anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 U/Min zur Auftrennung des Ansatzes in zwei Phasen. Die obere, fettige Phase enthält hierbei das radioaktiv markierte Reaktionsprodukt Pamitoyl-[<sup>14</sup>C]- Carnitin. Aus dieser Phase wurden 800µl abpipettiert und in einem neuen Reagenzglas mit 800µl gesättigter Isobutanollösung für 10s gevortext. Dieser Ansatz wurde für 10 Min. ebenfalls bei 5000 U/Min zentrifugiert. Der Ansatz trennte sich erneut in zwei Phasen auf. Aus der Oberphase wurden 500µl abgenommen und in ein mit 10ml Szintillationsflüssigkeit gefülltes Szintillationsvial gegeben. Nachdem auch dies gut gemixt wurde, erfolgte die Messung im Szintillationszähler. Alle Werte wurden als Doppelbestimmung gemessen. Zusätzlich wurde immer ein Szintillationsleerwert (LW) und ein Standardwert ermittelt. Der

Standardwert setzte sich aus 10µl [<sup>14</sup>C]- Carnitin- Lösung und 10ml Szintillationsflüssigkeit zusammen.

Die Aktivitätsberechnung erfolgte mit folgenden Formeln:

Aktivität pro Gramm Feuchtgewicht (FG):

$$\text{Aktivität (nmol/min/gFG)} = \frac{(C_{pm\ Probe} - C_{pm\ LW}) \times n_{Standard} \times V}{C_{pm\ Standard} \times t \times A \times a \times v}$$

Aktivität pro Gramm Nicht- Kollagenem- Protein (NCP):

$$\text{Aktivität (µmol/min/gNCP)} = \frac{(C_{pm\ Probe} - C_{pm\ LW}) \times n_{Standard} \times V}{C_{pm\ Standard} \times t \times p \times A \times a \times v}$$

V =	Volumen im Testansatz (1000µl)
n <sub>Standard</sub> =	Stoffmenge in der Standardlösung (490 nmol)
t =	Inkubationszeit (10 min)
A =	Homogenatmenge (100 µl)
a =	Homogenatverdünnung (1:30)
v =	Volumenverdünnung (1:2)
p =	Proteinmenge (mg NCP/g FG)

#### 4.7.2 Messung der Citratsynthaseaktivität

Die in der Arbeit durchgeführte Bestimmung der CS- Aktivität wurde nach Sheperd und Garland durchgeführt [40].

Für die Messung der Citratsynthase wurde das 1:30 Homogenat im Verhältnis 1:100 mit Chappel- Perry Medium-A versetzt und für die Messung verwahrt.

Chappel-Perry Medium A:	100 mM KCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 120mM EDTA; 50 mM Tris/HCL pH 7,5
5% Tritonlösung:	1,25g Triton X-100; 25ml Aqua bidest.
Tris/ Mannitol:	100ml 50mM Tris/HCl pH 7,4; 3,6g Mannitol
10nM DTNB:	4mg DTNB; 4ml Ethanol 96%
2mM Acetyl- Coenzym A- Trilithiumsals:	6,6mg Acetyl- Coenzym A- Trilithiumsals; 890µl Aqua bidest.; 100µl 1M KOH



Die Messung der Citratsynthaseaktivität erfolgte im Muskelhomogenat 1:100. Es wurde jeweils für 220s bei 412nm Wellenlänge gemessen. Zuerst wurde ein Blank leer gegen Luft ohne Küvette gemessen. Danach wurde entsprechend dem Testansatz aus Tab. 8 gemessen:

*Tabelle 8: Testansatz zur Messung der Citratsynthase*

Lösungen	Leerwert			
Tris/Mannitol	910µl	900µl	890µl	870µl
5% Triton	20µl	20µl	20µl	20µl
DTNB	10µl	10µl	10µl	10µl
Acetyl- CoA	50µl	50µl	50µl	50µl
Homogenat 1:100	/	10µl	20µl	40µl

Die Testansätze wurden für jeweils für 10 Minuten bei 30°C inkubiert, dann wurde die Reaktion mit jeweils 10µl Oxalacetat gestartet.

Die Citratsynthase- Aktivität berechnet sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Aktivität}_{CS} = (\Delta E_{CS} - \Delta E_{\text{Leerwert}}) \times \text{Korrekturfaktor}$$

Der Korrekturfaktor zur Berechnung der U/g FG beträgt bei 10µl Homogenat 727,9, bei 20µl Homogenat 364,0 und bei 40µl Homogenat 182,0. Daraus ergibt sich folgende Gleichung zur Berechnung der U/g NCP:

$$\text{U/g NCP} = \frac{U/g \text{ FG} \times 1000}{\text{Protein-Wert in mg/g FG}}$$

#### 4.7.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit zur Bestimmung des Nicht- Kollagenen- Proteins (NCP) durchgeführt. Grundlage hierfür ist die Proteinbestimmung nach Lowry [41]. Dazu wurde das 1:30 homogenisierte Muskelhomogenat in einer Verdünnung von 1:10 mit NaOH versetzt und für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Zugabe von NaOH führt hierbei zur Hydrolyse des Nicht- Kollagenen- Proteins [42]. Das unlösliche Kollagen wurde bei 9000U/Min für 5 Min abzentrifugiert.

Der Überstand, in dem das Nicht- Kollagene- Protein enthalten war, wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde aus einer BSA- Stammlösung eine Eichkurve erstellt. Die Proteinkonzentration in mgNCP/g

Feuchtgewicht (FG) konnte berechnet werden.

50mM NaOH: 200mg NaOH; 100ml Aqua bidest.

Protein- Standardlösung: 2mg Bovines Serum Albumin; 1ml Aqua bidest.

#### **4.7.4 Western Blot**

Zur Optimierung des Western Blots zum Nachweis der CPT- I und CPT- II Enzymproteine wurden verschiedene Antikörper getestet. Des Weiteren wurden drei Lyse- und Homogenisierungsverfahren (LV1, LV2, LV3) ausgetestet. Die für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese benötigte Probenmenge wurde ebenfalls variiert um optimale Testergebnisse zu schaffen.

#### **Lyse- und Homogenisierung der Muskelbiopsien für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot**

Für die Lyse und Homogenisierung der Muskelbiopsien für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und den anschließenden Western Blot wurden verschiedene Verfahren getestet und miteinander verglichen um optimale Testbedingungen zu schaffen. Zusätzlich wurden verschiedene Mengen des lysierten und homogenisierten Muskelbiopsates aufgetragen und miteinander verglichen.

**Lyseverfahren 1 und 2 (LV1 und LV2):** Lyse und Homogenisierung mit dem „Mitochondria Isolation Kit for Tissue“. Mittels dieser Methode werden die Mitochondrien aus der Zelle isoliert und es steigt der Mitochondriengehalt im Homogenat. Bei der Lyse und Homogenisierung mit dem „Mitochondria Isolation Kit for Tissue“ wurden die Muskelbiopsien nach Protokoll 1 (LV1) und 2 (LV2) des Kits lysiert und homogenisiert. Die Mitochondrien wurden aus 50mg Feuchtgewicht isoliert. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren. Bei diesem Homogenisierungsverfahren wurde ein Vergleich der beiden Protokolle durchgeführt um im Western Blot das bestmögliche Ergebnis erzielen zu können.

**Lyseverfahren 3 (LV 3):** Bei der Lyse und Homogenisierung mittels Suspensionspuffergebrauchslösung und 2x SDS- gel- loading- Puffer- Gebrauchslösung wurde das Muskelhomogenat 1:15 mit Suspensionspuffergebrauchslösung versetzt und für ca. 7 Min. auf Eis gepottert. Zu dem Homogenatvolumen wurde die identische Menge 2x SDS- gel- loading- Puffer- Gebrauchslösung hinzugegeben. Das Homogenat wurde bei 99°C im Wasserbad für 3 Minuten denaturiert und danach für 15 Minuten bei 14000U/Min, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand als

lysiertes Homogenat wurde fraktioniert bei -80°C eingefroren.

Transferpuffer pH 8,3:	25mM Tris- Base; 150mM Glycin; 10%Methanol
Laufpuffer pH 8,3:	25mM Tris- Base; 150mM Glycin; SDS
Trenngelpuffer pH 8,8:	1M Tris; HCl
Sammelgelpuffer pH 6,8:	0,5M Tris; HCl
Tris buffered Tween pH 7,6:	1M Tris pH 7,6; NaCl; Tween 20
Trenngel 5%:	10 ml Rotiophorese Gel 30%; 11,25 ml Trenngelpuffer; 0,15ml SDS 20%; 12,3 ml Aqua bidest.; 20 µl Temed; 300 µl APS 10%; 3 ml Isopropanol
Sammelgel 5%:	2,01 ml Rotiophorese Gel 30%; 3,75 ml Sammelgelpuffer; 150 µl SDS 20%; 9,22 ml Aqua bidest.; 15 µl Temed; 150 µl APS 10%

### **Primärantikörper**

Zuerst galt es einen Primärantikörper zu finden, der eindeutig an dem gesuchten Enzymprotein bindet, und dies ohne Darstellung von Störbanden. Vorgegangen wurde zunächst nach dem jeweiligen Herstellerprotokoll. Als Positivkontrolle wurde das *mouse liver extract sc-2256* der Firma *Santa Cruz* verwendet. Zeigte der Primärantikörper mehrere Banden an, oder wurde die Positivkontrolle nicht gebunden, wurden keinen weiteren Optimierungstest mit diesen Antikörpern durchgeführt. Von den in dieser Arbeit getesteten Primärantikörpern gegen die CPT I band kein Antikörper an die Positivkontrolle, sodass alle weiteren Optimierungsversuche zum Nachweis der CPT I- Antikörper mittels Western Blot eingestellt wurden. Ein Nachweis der CPT I im Western Blot gelang in dieser Arbeit nicht. Das eindeutigste Signal und vor allem die wenigsten Störbanden fanden sich für die CPT II mit dem *ab54589, monoklonal, Abcam*. Die weiteren Optimierungen wurden folglich mit diesem Antikörper durchgeführt.

### **Austestung der Lyse- und Homogenisierungsverfahren**

Es wurden zur optimalen Erfassung der CPT II mittels Western Blot die optimalen Lyse- und Homogenisierungsverfahren getestet. Verglichen wurden die drei unter 4.7.2 beschriebenen Verfahren (LV1, LV2, LV3).

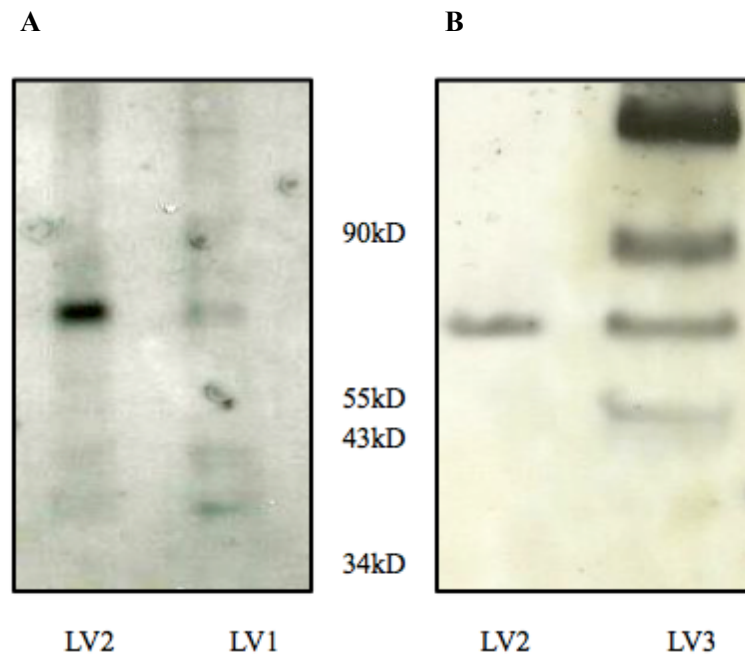


Abb. 3: CPT II- Bande bei ca. 70kD. A: Darstellung der CPT II Bande mittels Mitochondrienisolationsprotokoll LV2 aus 50mg Muskel (Feuchtgewicht). Das Isolationsverfahren LV1 zeigte keine eindeutige Bande. B: Darstellung der CPT II- Bande mittels Mitochondrienisolationsprotokoll LV2 aus 50mg Muskel (Feuchtgewicht). Das Isolationsverfahren LV3 zeigt ebenfalls eine Bande bei ca. 70kD, jedoch sind weitere Banden sichtbar.

Auf Grund der in Abb. 3 A und B gezeigten Ergebnisse wurde das Lyse- und Homogenisierungsverfahren LV2 als das optimale Verfahren bewertet. Die für die nachfolgenden Versuche benötigten Muskelhomogenate wurden nach dem Mitochondrienisolationsprotokoll 2 hergestellt. Die Mitochondrien wurden aus 50mg Feuchtgewicht Muskulatur isoliert.

#### **Aufgetragene Probenmenge**

Nachdem der Primärantikörper sowie das optimale Lyse- und Homogenisierungsverfahren gefunden wurde, galt es die optimale Auftragemenge für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und den nachfolgenden Western Blot zu finden. Die aus Kontrollen isolierten Mitochondrien (LV2) wurden in 5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l und 20 $\mu$ l aufgetragen. Die eindeutigste Bande ohne Verschmierungen zeigte sich bei 20 $\mu$ l.

#### **Arbeitsprotokoll SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot**

Nach oben beschriebenen Vorversuchen wurde folgendes Versuchsschema für die

Hauptversuche festgelegt.

Für die Gelelektrophorese wurden die Mitochondrien aus 50mg Feuchtgewicht Muskulatur wie unter 4.7.2 beschrieben nach Lyse- und Homogenisierungsverfahren LV2 aufbereitet.

20µl der jeweiligen Proben wurde aufgetragen bei 210V für eine Stunde in den SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele geblottet.

Zum selektiven Nachweis der CPT I und CPT II erfolgten im Anschluss an die SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen Western Blots vom Typ Semi-Dry-Transfer. Für den Blot eines Gels wurden zwei Gel-Blotting-Papiere und eine Transfer-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und für ca. 5 Min. in Transferpuffer inkubiert. Danach wurde das Gel mit der Membran luftblasenfrei zwischen die beiden Gel-Blotting-Papiere zwischen Kathode und Anode gelegt. Der Transfer auf die Membran erfolgte mit  $1\text{mA}/\text{cm}^2$  für ca. 90 Min. bei Raumtemperatur. Das Blocken der freien Bindungsstellen der Membran erfolgte mit 5% Milchpulver/TBT-Puffer-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran wurde in TBT-Puffer für 5 Min. gewaschen. Die Membran wurde in 5% Milchpulver/TBT-Puffer-Lösung mit dem primären Antikörper *ab54589, Abcam* (CPT-II Antikörper), Verhältnis 1:200, bzw. *ab14705, Abcam* (COX-Antikörper), Verhältnis 1:5000 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5 Min. in TBT-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundäntikörper *sc-2318, Santa Cruz* im Verhältnis 1:10000 in 5% Milchpulver/TBT-Puffer-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut dreimalig in TBT-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents Kit. Die nach Anleitung hergestellte Lösung wurde für ca. eine Minute auf der Membran belassen, danach wurde in einer Dunkelkammer ein Film aufgelegt und ca. 20 Minuten lang entwickelt.

#### **4.7.5 ELISA Carnitin- Palmitoyltransferase I und II**

##### **Optimierung ELISA Carnitin- Palmitoyltransferase I und II**

Vor Durchführung des ELISAs an Patienten, galt es optimale Testbedingungen zu etablieren. Es galt ein optimales Homogenisierungsverfahren zu finden, sowie die optimale Verdünnung des Homogenats für den ELISA zu bestimmen. Die Vorversuche zur Versuchsoptimierung wurden jeweils für den ELISA CPT I und den ELISA CPT II durchgeführt. Verglichen wurden vier Homogenisierungsverfahren. Getestet wurden alle Verfahren in einer Verdünnung von 1:15, 1:25 und 1:40.

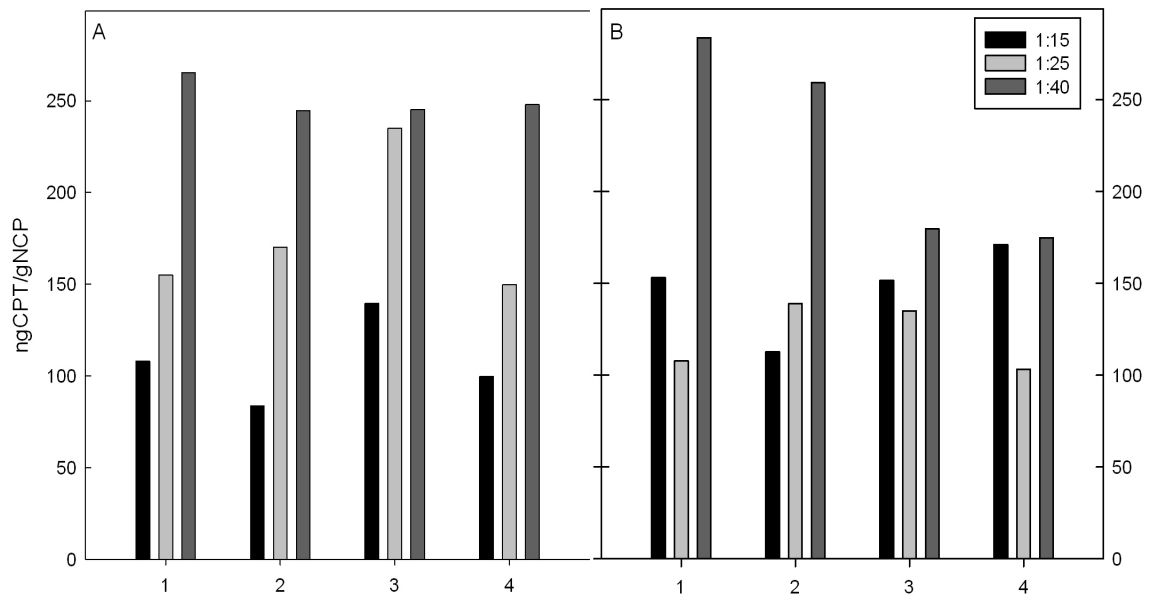


Abb. 4: CPT- Gesamtaktivität (ngCPT/gNCP) gemessen in vier verschiedenen Homogenisierungsverfahren, ausgetestet in jeweils drei verschiedenen Verdünnungen. Alle Verfahren wurden zentrifugiert bei 4°C, 5 Min. 1: Glas/ Glas, 1000g Überstand; 2: Glas/ Glas, 5000g Überstand; 3: Tween 1%, 1000g Überstand; 4: Stickstoff, 1000g Überstand.

Die Homogenate wurden jeweils aus 50mg Feuchtgewicht Muskulatur hergestellt. Es wurde jeweils der Überstand als lysiertes Homogenat fraktioniert bei -80°C eingefroren.

**ELISA Homogenisierungsverfahren 1:** Die Muskelbiopsien wurden mit einem Handhomogenisator auf Eis gepottert, anschließend bei 4°C und 1000g/Min für 5 Min. zentrifugiert.

**ELISA Homogenisierungsverfahren 2:** Die Muskelbiopsien wurden mit einem Handhomogenisator auf Eis gepottert, anschließend bei 4°C und 5000g/Min für 5 Min. zentrifugiert.

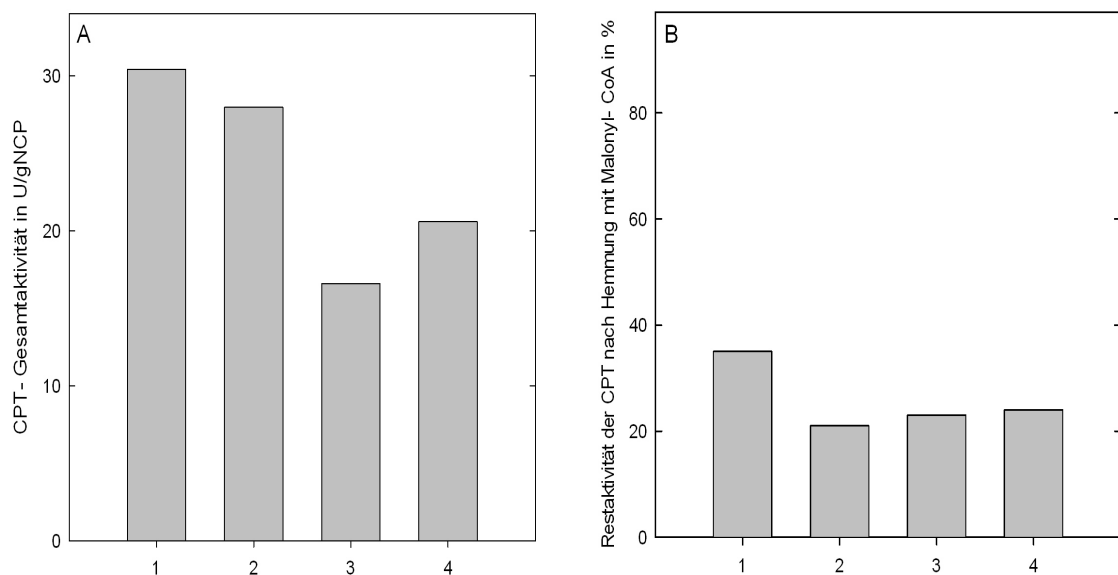
**ELISA Homogenisierungsverfahren 3:** Die Muskelbiopsien wurden in Tween 1% mit einem Handhomogenisator in oben genannten Verdünnungen bei 4°C und 1000g/Min für 5 Min. zentrifugiert.

**ELISA Homogenisierungsverfahren 4:** Das Muskelbiopsat wurde zweimalig hintereinander in flüssigen Stickstoff gegeben, anschließend bei 4°C und 1000g/Min für 5 Min. zentrifugiert.

Da die 1:40 Verdünnung in allen vier Homogenaten, sowohl beim CPT I ELISA (Abb. 4 A), als auch beim CPT II ELISA (Abb. 4 B) den höchsten Enzymproteingehalt brachte, wurden

die Hauptversuche mit dieser Verdünnung durchgeführt.

Zur Absicherung des optimalen Homogenisierungsverfahrens für den in dieser Arbeit äußerst bedeutenden ELISA, wurden weitere Versuche durchgeführt. Es wurde die CPT-Gesamtaktivität im Muskelhomogenat 1:40 aus 50mg Muskulatur Feuchtgewicht nach der von Zierz und Engel beschriebenen Isotopen- Vorwärtsreaktion bestimmt [39]. Es zeigte sich, dass die höchste CPT- Gesamtaktivität mit dem Lyseverfahren 1 (Glas/ Glas, 1000g Überstand, 4°C, 5 Min) erreicht wurde (Abb. 5 A). Auch die nach Hemmung mit Malonyl-CoA vorhandene Restaktivität war bei dem Lyseverfahren 1 am höchsten (Abb. 5 B).



*Abb. 5: A: CPT- Gesamtaktivität (U/gNCP) gemessen in den vier für den ELISA getesteten Homogenisierungsverfahren. B: Restaktivität der CPT nach Hemmung mit Malonyl-CoA in % in den vier für den ELISA getesteten Homogenisierungsverfahren.*

*Alle Verfahren wurden zentrifugiert bei 4°C, 5 Min. 1: Glas/ Glas, 1000g Überstand; 2: Glas/ Glas, 5000g Überstand; 3: Tween 1%, 1000g Überstand; 4: Stickstoff, 1000g Überstand.*

Zur weiteren Absicherung des ELISAs und des vorgesehenen Homogenisierungsverfahrens sowie der Verdünnung wurden weitere Validierungsversuche durchgeführt. Gemessen wurden vier Kontrollen und vier Patienten. Jeweils zwei mit hoher und zwei mit niedriger CPT- Gesamtaktivität. Bei korrekten Testbedingungen ist davon auszugehen, dass die CPT- Gesamtproteinmenge direkt mit der CPT- Gesamtaktivität korreliert. In Abb. 6 zeigt sich, dass die CPT- Gesamtaktivität um das 3,5-fache im Verhältnis zur CPT- Gesamtproteinmenge ansteigt ( $m=3,5$ ). Bei Vorliegen dieser Linearität zwischen CPT- Gesamtproteinmenge CPT- Gesamtaktivität ist von einer korrekten Validierung der ELISA-

Testbedingungen auszugehen.

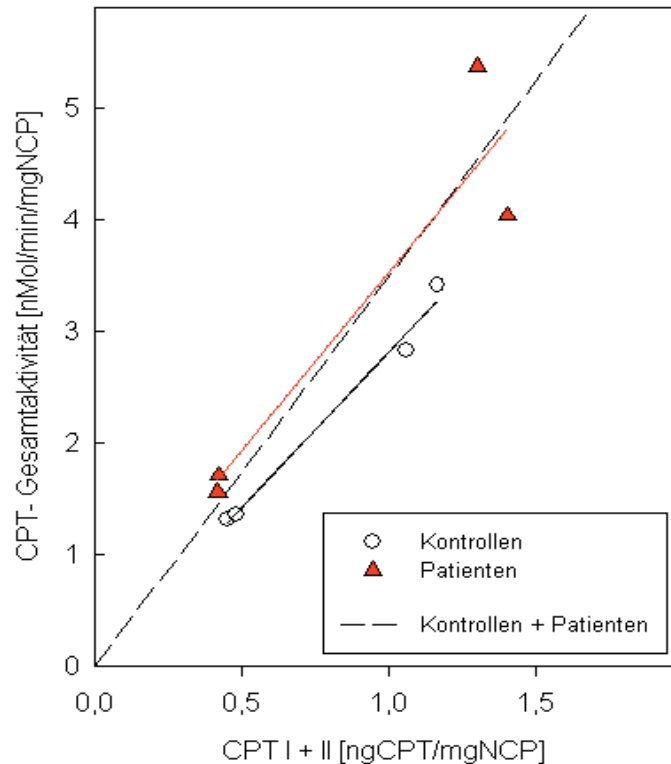


Abb. 6: Validierung des ELISA. Gemessen im Muskelhomogenat, hergestellt nach Lyseverfahren 1, 1:40. Die Regressionsgeraden sind für Patienten, Kontrollen und für Patienten und Kontrollen gemeinsam ( $m=3.5$ ) gezeigt. Pat.:  $r=0.86$ ,  $p<0.001$ ; Kontr.:  $r=0.99$ ,  $p<0.001$ ; alle:  $r=0.85$ ,  $p<0.001$ .

Die Hauptversuche wurden mit Muskelhomogenat, hergestellt nach Lyseverfahren 1, 1:40 verdünnt durchgeführt.

Die Ergebnisse des ELISAs wurden unter Berücksichtigung der benutzten Verdünnung (1:40) ausgewertet. Zuerst wurde das reine Feuchtgewicht (FG) Muskulatur, welches in jedes Well der Mikrotiterplatte pipettiert wurde, berechnet, Bezug nehmend auf die Verdünnung. Bei einer Verdünnung von 1:40 und 100 $\mu$ l Muskelhomogenat pro Well handelt es sich um 2,5 mg Feuchtgewicht (FG) Muskel/Well. Der im ELISA mittels Korrelationskurve ermittelte Wert für die CPT- Konzentration wurde dementsprechend auf den Feuchtgewichtanteil (FG) und anschließend auf den Proteingehalt des Homogenats bezogen. Dies ergab unter Berücksichtigung der Maßeinheiten eine Endkonzentration von ngCPT/gNCP.



### **Arbeitsprotokoll ELISA Carnitin- Palmitoyltransferase I und II**

Grundlage für den Enzyme Linked Immunosorbent Assay war die Etablierung des Radioimmunoassay (RIA) von Yalow und Berson. Sie konnten erfolgreich eine Hormonmarkierung bei Insulin mit radioaktiven Isotopen durchführen [43]. 1971 konnte der erste ELISA von Engvall und Perlmann etabliert werden. Sie kombinierten die enzymatische Markierung von Proteinen mit der Immobilisation von Antikörpern auf einer Oberfläche [44]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich ELISA durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen nicht kompetitiven, heterogenen Assay. Das Verfahren basiert auf zwei Antikörpern, die spezifisch an unterschiedlichen Epitopen das Antigen binden [45].

Die in der Arbeit verwendeten ELISAs zum spezifischen und quantitativen Nachweis von Carnitin- Palmitoyltransferase I und II wurden mit Kits der Firma USCN Life Science Inc. gemäß Anleitung durchgeführt. Auf Grund der Wichtigkeit für die vorliegende Arbeit soll hier noch einmal das Grundprinzip und der Arbeitsablauf erläutert werden.

Die 96- well- Platte ist gecoatet mit einem monoklonalem Antikörper, welcher sich spezifisch an die CPT I- bzw. CPT II- Enzymproteine bindet. Auf die gecoatete Platte wurden nun der Standard, jeweils 100µl und das Muskelhomogenat, ebenfalls 100µl in der entsprechenden Verdünnung aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde nun für zwei Std. bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die Flüssigkeit wurde aus der Mikrotiterplatte entfernt, nicht ausgewaschen. Der zweite polyklonale biotinylierte Antikörper, welcher sich gegen ein anderes Epitop der CPT I bzw. CPT II richtet, wurde hinzugegeben und für 60 Min. bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die 96- well- Platte 4x gewaschen. Nun wurde ein HRP konjugiertes Avidin- Enzymsubstrat für 30 Min. bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Es folgte fünfmaliges Waschen der Mikrotiterplatte. TMB-Substrat wurde für 15 Min. bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Danach erfolgte die Abstopfung der Reaktion mit einer Stopplösung.

Die Bindung des biotinylierten Antikörpers an das Avidin-Biotin-HRP-Enzymkonjugat führten zu einem Farbumschlag. Die optische Dichte wurde photospektrometrisch gemessen und die Antigenkonzentration anhand einer Kalibrierungskurve, welche mittels des Standards ermittelt wurde, abgelesen (Abb. 7).

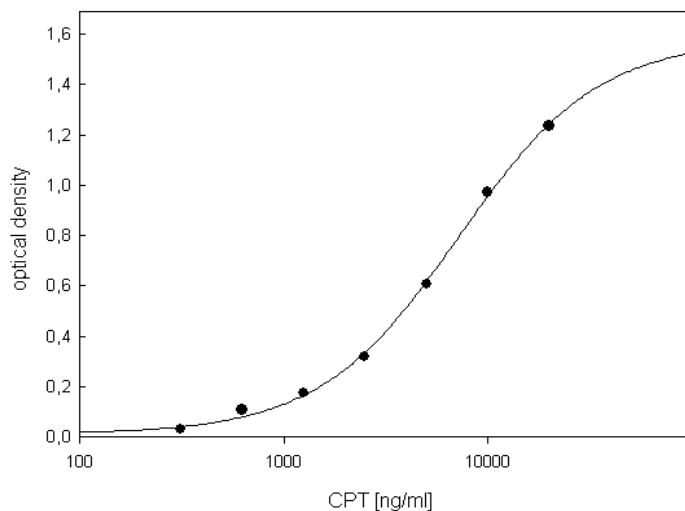


Abb. 7: Darstellung einer exemplarischen Standardkurve. 4- Parameter log- Gleichung der CPT- Immunoreaktivität. Regressionskoeffizient: 0,99, Standarabweichung: 0,02.

#### 4.7.6 Immunhistochemie

Die auf Kork aufgeblockten Muskelbiopsien wurden in 5µm dicke Kryoschnitte geschnitten. Die Kryoschnitte wurden in Citratpuffer pH 6,0 für 17 Min gekocht. Danach erfolgte die Inkubation über Nacht mit dem Primärantikörper *HPA028214*, *polyklonal*, *Sigma- Aldrich*. Die Visualisierung erfolgte gemäß Protokoll mit dem LSAB™ Kit.

Citratpuffer pH 6,0      29,4g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>H<sub>2</sub>O; 1000ml Aqua bidest.; HCl

#### 4.7.7 Auswertungsmethoden

Die Auswertung des Western Blots erfolgte mit dem Programm *GeneTools*, *Version 3.05.03* der Firma *SynGene*. Die Adsorptionsmessung zur Auswertung des ELISA erfolgte mit dem *Microplate Reader*, *Model 680*. Die statistische und graphische Auswertung wurde mit dem Programm *Sigma Plot 11.0* der Firma *Systat Software Inc.* durchgeführt. Um Pipettier- und Messfehler möglichst auszuschließen, wurden für den ELISA alle Proben als 3- fach-Bestimmung gemessen. Die in der Arbeit angegebenen Werte sind Mittelwerte aus allen drei Wells.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Enzymaktivität

Die CPT- Gesamtaktivität der Patienten unterschied sich in der Isotopen- Vorwärtsreaktion nicht signifikant von der CPT- Gesamtaktivität der Kontrollen (Tab. 9). Die Restaktivität nach Hemmung mit Malonyl- CoA und Triton X-100 betrug bei Patienten jedoch nur 25% im Vergleich zu den Kontrollen ( $p < 0.001$ ) (Tab. 9). Die CPT- Gesamtaktivität normiert auf die Citratsynthaseaktivität betrug bei Patienten nur 70% von der Aktivität in den Kontrollhomogenaten ( $p < 0.017$ ) (Tab. 9).

*Tabelle 9: CPT- Gesamtaktivität ( CPT I und CPT II) und Citratsynthaseaktivität im Muskelhomogenat von Patienten und Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD.*

Enzymaktivität	Patienten (n=9)	Kontrollen (n=18)	p
<b>CPT- Gesamtaktivität</b>			
[nmol x min <sup>-1</sup> x mg NCP <sup>-1</sup> ]	2.8 $\pm$ 1.5	1.9 $\pm$ 0.6	ns
[nmol x min <sup>-1</sup> x gFG <sup>-1</sup> ]	194.6 $\pm$ 43.3	225.7 $\pm$ 61.5	ns
<b>Restaktivität [%]</b>			
nach Malonyl-CoA	8.1 $\pm$ 7.1	32.6 $\pm$ 4.8	<0.001
nach Triton X-100	11.5 $\pm$ 6.4	45.9 $\pm$ 6.6	<0.001
<b>Citratsynthaseaktivität</b>			
[nmol x min <sup>-1</sup> x mg NCP <sup>-1</sup> ]	165 $\pm$ 53.1	85.7 $\pm$ 23.3	<0.001
[nmol x min <sup>-1</sup> x gFG <sup>-1</sup> ]	13 $\pm$ 4.4	10.1 $\pm$ 3.3	ns
<b>CPT/Citratesynthase</b>			
[nmol x min <sup>-1</sup> x mg NCP <sup>-1</sup> ]	16.4 $\pm$ 5.9	23.3 $\pm$ 6.9	0.017
[nmol x min <sup>-1</sup> x gFG <sup>-1</sup> ]	15.0 $\pm$ 6.3	22.4 $\pm$ 8.6	0.027

### 5.2 Western Blot

Der Nachweis des CPT II- Enzymproteins mittels Western Blot war bei Patienten und Kontrollen möglich. Die CPT II Banden stellten sich bei Patienten und Kontrollen in gleicher Intensität dar (Abb. 8), sowohl unverdünnt, als auch in einer Verdünnung des Muskelhomogenats von 1:25. Die COX als mitochondrialer Marker wurde zur Quantifizierung des CPT II- Enzymproteins verwendet. Die COX- Bande war im verdünnten

Homogenat höher bei Patienten als Kontrollen (Abb. 8A). Die Intensität der CPT II-Bande wurde mit der COX- Bande verglichen. Bei Patienten fanden sich im Western Blot höhere CPT/COX- Verhältnisse (Ratios) als in Kontrollen. Die CPT- und COX- Bandenintensitäten wurden mit dem Programm *GeneTools*, Version 3.05.03 der Firma *SynGene* gemessen.

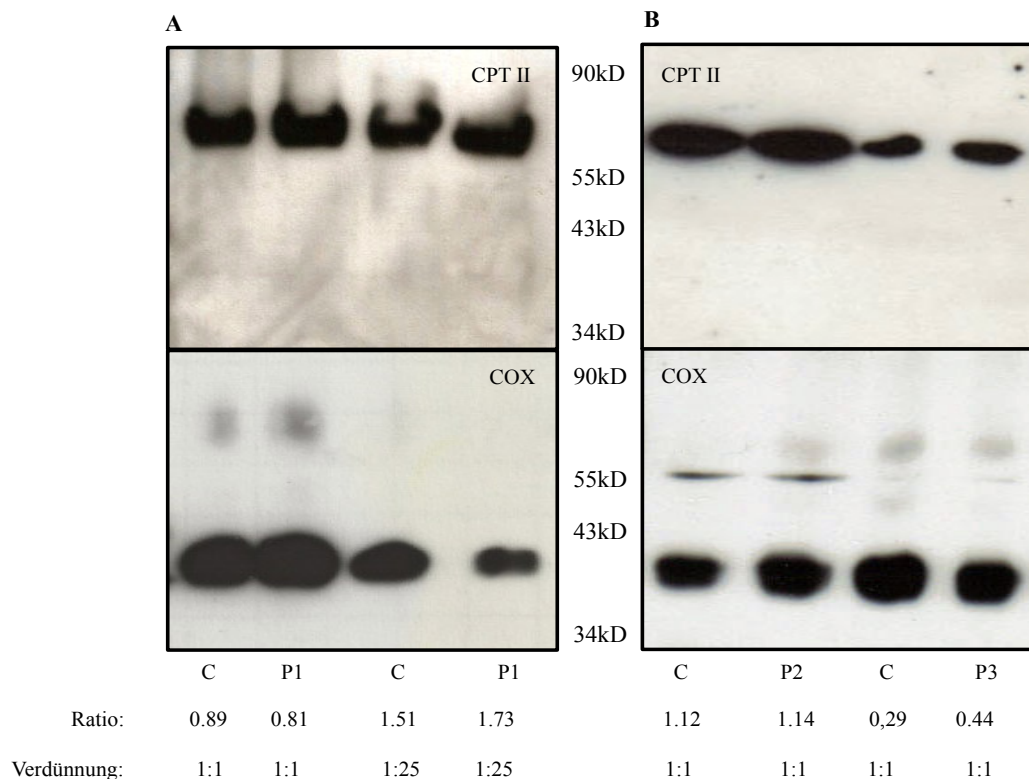


Abb. 8: Nachweis der CPT II und COX im Muskelhomogenat von Patienten (P) und Kontrollen (C). Die Ratios und Verdünnungen sind unter dem Blot angegeben A: Darstellung der CPT II und COX im unverdünnten Muskelhomogenat und bei einer Verdünnung von 1:25. B: Darstellung der CPT II und COX bei Patienten und Kontrollen im unverdünnten Muskelhomogenat.

### 5.3 ELISA Carnitin- Palmitoyltransferase I und II

Die CPT- I- und CPT- II- Proteinkonzentrationen waren bei Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 10). Ein paired-t-test der CPT I – und CPT II- Konzentrationen bei Patienten und Kontrollen zeigte keinen signifikanten Unterschied in den CPT I- und CPT II- Konzentrationen. Nach Normierung der CPT I auf die CS zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (Tab. 10). Die auf die CS

normierte CPT II betrug bei Patienten nur 60% im Vergleich zu den Kontrollen (Tab. 10). Es zeigte sich bei Patienten ( $p < 0.001$ ), Kontrollen ( $p = 0.008$ ), sowie in allen untersuchten Proben gemeinsam ( $p < 0.001$ ) eine signifikante Korrelation der CPT- Gesamtaktivität zu der CPT- Gesamtproteinkonzentration (CPT I+CPT II) (Abb. 9). Die CPT- Gesamtaktivität in Korrelation zu den Proteinkonzentrationen der CPT I (Abb. 10 A) und CPT II (Abb. 10 B) zeigte eine Signifikanz bei Patienten ( $p < 0.001$ ), bei Kontrollen ( $p < 0.001$ ), sowie in allen untersuchten Proben gemeinsam ( $p < 0.001$ ).

*Tabelle 10: Quantifizierung der CPT I und CPT II im Muskelhomogenat mittels ELISA. Der CPT- Proteingehalt wurde auch auf die Citratsynthaseaktivität normiert. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD.*

CPT Protein	Patienten (n=9)	Kontrollen (n=18)	p
CPT I [ngCPT/mgNCP <sup>-1</sup> ]	0.46 $\pm$ 0.38	0.35 $\pm$ 0.2	ns
CPT II [ngCPT/mgNCP <sup>-1</sup> ]	0.32 $\pm$ 0.17	0.26 $\pm$ 0.06	ns
CPT I/CS [ngCPT/nMol/min x10 <sup>-3</sup> ]	2.59 $\pm$ 1.97	4.16 $\pm$ 2.48	ns
CPT II/CS [ngCPT/nMol/min x10 <sup>-3</sup> ]	1.91 $\pm$ 0.83	3.15 $\pm$ 0.99	0.003

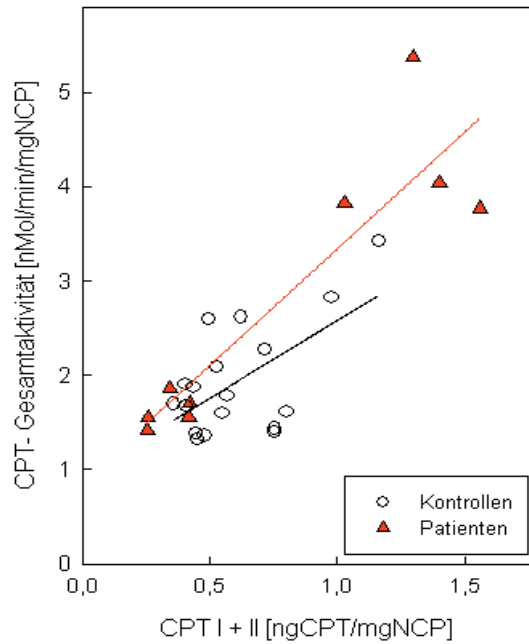


Abb. 9: Korrelation zwischen der CPT- Gesamtaktivität und der CPT- Gesamtproteinkonzentration (CPT I +II). Regressionsgeraden für Patienten und Kontrollen. Pat.:  $r=0.908$ ,  $p<0.001$ ; Kontr.:  $r=0.603$ ,  $p=0.008$ ; alle:  $r=0.832$ ,  $p<0.001$ .

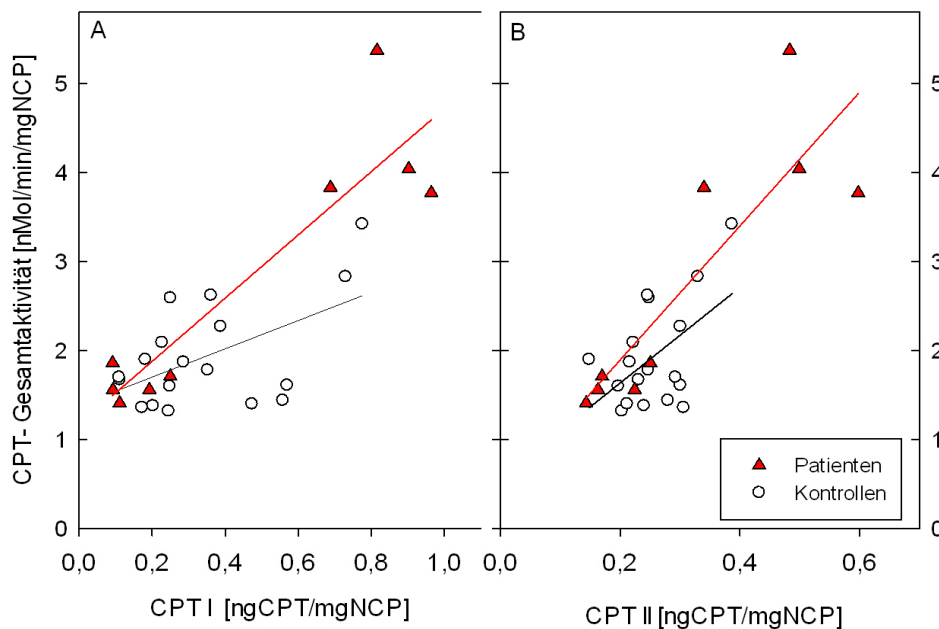


Abb. 10: Korrelation zwischen der CPT- Gesamtaktivität [nmol x min x mg NCP] und der CPT I (A) Proteinkonzentration [ngCPT/mgNCP] und der der CPT II (B) Proteinkonzentration [ngCPT/mgNCP]. Die Regressionsgeraden sind für Patienten und Kontrollen gezeigt. A: Pat.:  $r=0.91$ ,  $p<0.001$ ; Kontr.:  $r=0.53$ ,  $p<0.001$ ; alle:  $r=0.78$ ,  $p<0.001$ . B: Pat.:  $r=0.86$ ,  $p<0.001$ ; Kontr.:  $r=0.51$ ,  $p<0.001$ ; alle:  $r=0.8$ ,  $p<0.001$ .

## 5.4 Citratsynthase

Im Patientenhomogenat fand sich eine um das Zweifache erhöhte Citratsynthase im Vergleich zu den Kontrollen ( $p < 0.001$ ) (Tab. 9). Eine signifikante Korrelation zwischen der CPT- Gesamtaktivität und der Citratsynthaseaktivität fand sich bei Patienten ( $p = 0.007$ ), bei Kontrollen ( $p = 0.05$ ), sowie bei Patienten und Kontrollen gemeinsam ( $p < 0.001$ ) (Abb. 11). Wurde die CPT- Gesamtaktivität normiert auf die CS in Bezug gesetzt zu den CPT I (Abb. 12 A) und CPT II (Abb. 12 B) Proteinkonzentrationen, welche ebenfalls auf die CS normiert wurden, so zeigte sich eine Signifikanz bei Patienten ( $p < 0.001$ ), bei Kontrollen ( $p < 0.001$ ) und in allen untersuchten Proben gemeinsam ( $p < 0.001$ ).

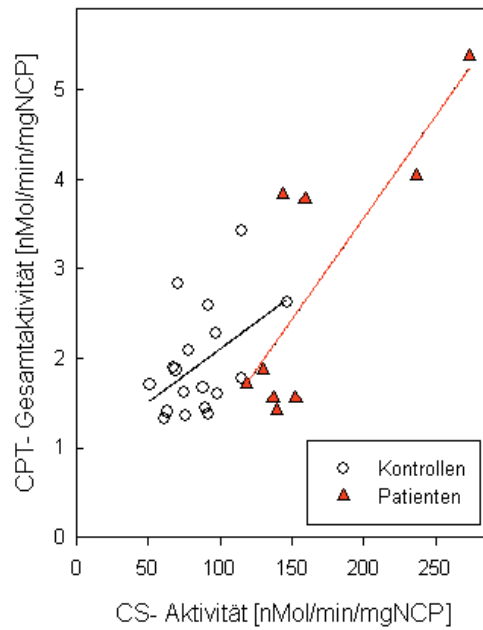


Abb. 11: Korrelation zwischen der CPT- Gesamtaktivität [nmol x min x mg NCP] und der Citratsynthaseaktivität [nMol x min x mg NCP]. Die Regressionsgeraden sind für Patienten und Kontrollen gezeigt. Pat.:  $r=0.820$ ,  $p=0.007$ ; Kontr.:  $r=0.467$ ,  $p=0.051$ ; alle:  $r=0.741$ ,  $p<0.001$ .

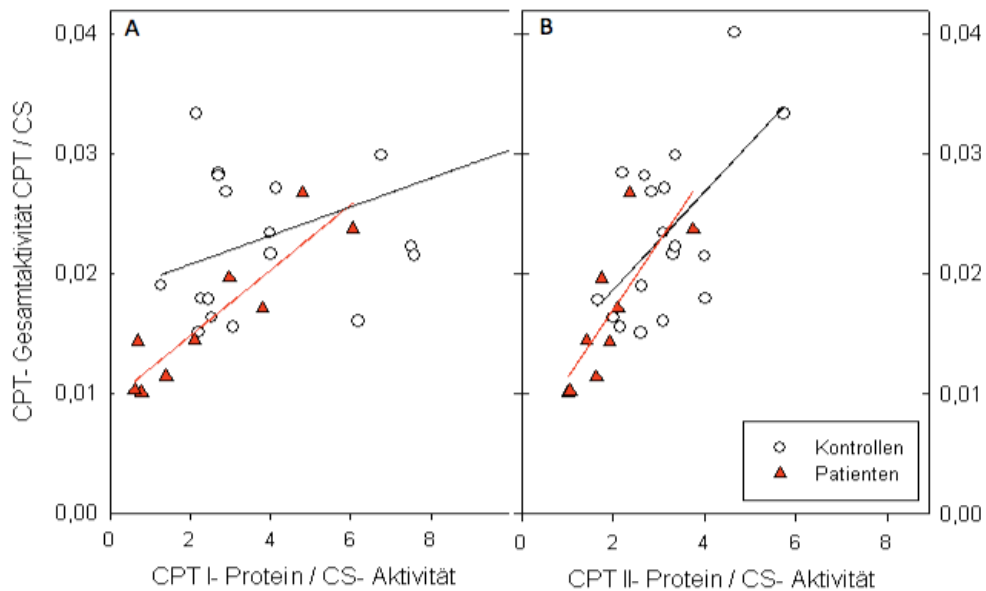


Abb. 12: Korrelation zwischen der CPT- Gesamtaktivität, normiert auf die CS und der CPT I (A) Proteinkonzentration und der CPT II (B) Proteinkonzentration normiert auf die CS. Die Regressionsgeraden sind für Patienten und Kontrollen gezeigt. A: Pat.:  $r=0.9$ ,  $p<0.001$ ; Kontr.:  $r=0.43$ ,  $p<0.001$ ; alle:  $r=0.6$ ,  $p<0.001$ . B: Pat.:  $r=0.78$ ,  $p<0.001$ ; Kontr.:  $r=0.58$ ,  $p<0.001$ ; alle:  $r=0.72$ ,  $p<0.001$ .



## 5.5 Immunhistochemie

Die CPT II konnte immunhistochemisch bei Patienten (Abb. 13 B) und Kontrollen (Abb. 13 A) mit derselben Intensität dargestellt werden. Die Immunoreaktivität wurde überwiegend in Typ- I Fasern, durch MHC- slow- Färbung (Abb. 13 C) dargestellt.

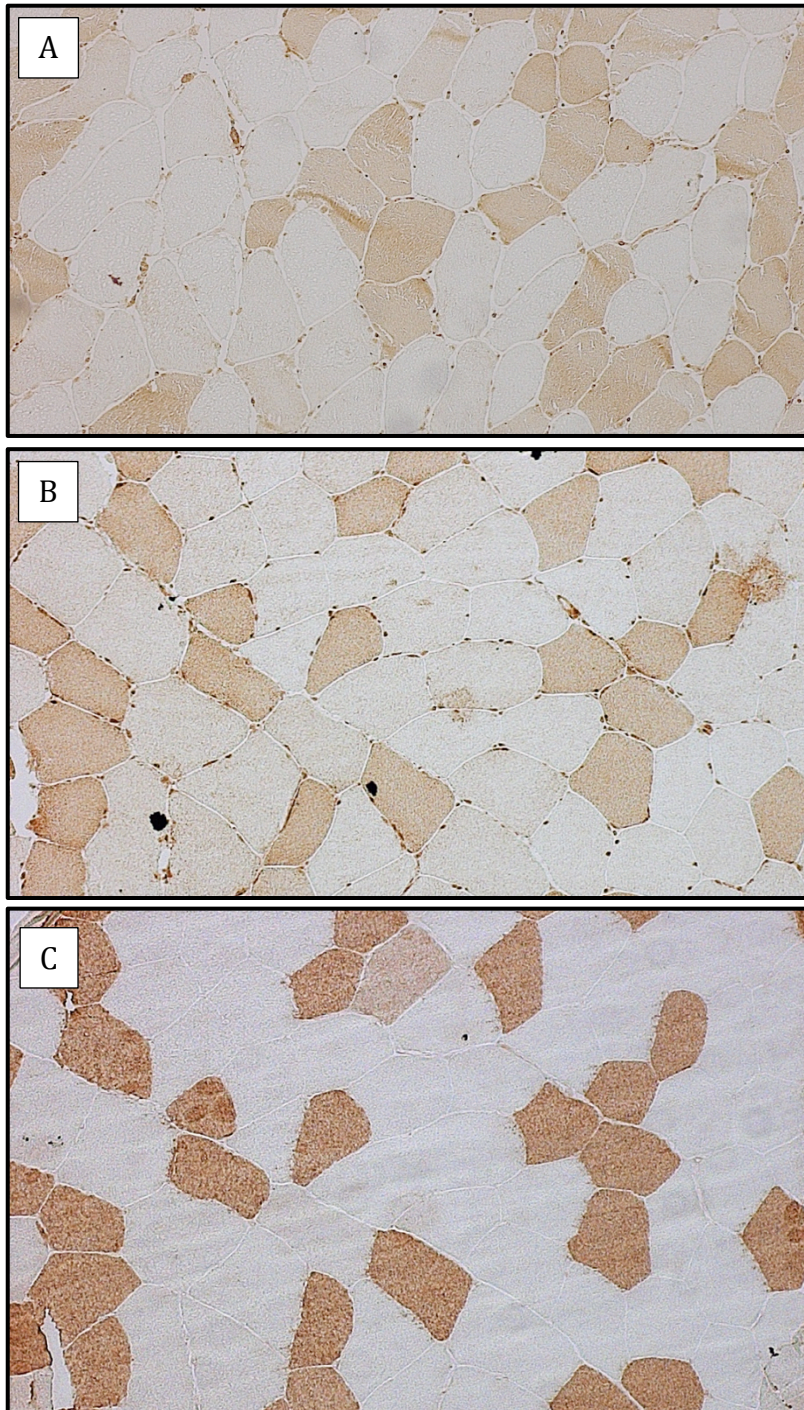


Abb. 13: Immunhistochemische Darstellung der CPT II bei Patient und Kontrolle. Die CPT

*II konnte bei Patienten (B) und Kontrollen (A) in gleicher Intensität dargestellt werden. Darstellung der Immunoreaktivität überwiegend in Typ- I Fasern, durch MHC- slow-Färbung (C).*

## **6 Diskussion**

### **6.1 CPT- Aktivität bei muskulärem CPT II- Mangel**

Die CPT- Gesamtaktivität (CPT I+CPT II), in der vorliegenden Arbeit gemessen mittels Isotopen- Vorwärts- Reaktion, war nicht signifikant unterschiedlich bei Patienten und Kontrollen (Tab. 9). Eine signifikante Korrelation der CPT- Gesamtaktivität und CPT- Gesamtproteinkonzentration konnte bei Patienten, Kontrollen und Patienten und Kontrollen zusammen gezeigt werden (Abb. 9). Dies könnte bedingt sein durch eine reduzierte CPT II- Aktivität mit einer kompensatorisch erhöhten CPT I- Aktivität oder aber durch eine enzymatisch normal aktives CPT II- Enzymprotein. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen, beide Proteinkonzentrationen (CPT I und CPT II) signifikant mit der CPT- Gesamtaktivität korrelieren (Abb. 10). Dies spricht gegen eine kompensatorisch erhöhte CPT I. Diese Ergebnisse könnten erklären, warum frühere Studien jedoch eine normale CPT- Gesamtaktivität gezeigt haben [39, 46]. In fast allen Studien, in denen eine reduzierte CPT II- Enzymaktivität bei Patienten mit muskulärem CPT II- Mangel postuliert wurde, wurden die Enzymaktivitäten mittels Isotopen- Austausch- Reaktion oder Isotopen- Rückwärts- Reaktion gemessen. In fast sämtlichen Studien, in denen die CPT- Gesamtaktivität mittels Isotopen- Rückwärts- Reaktion gemessen wurde, wurde die Reaktion in Gegenwart von 2mM Palmitoyl-L- Carnitin durchgeführt [29, 34, 47]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits 0,2mM DL- Palmitoylcarnitin zunehmend die Enzymaktivität sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen inhibiert, jedoch ist der inhibitorische Effekt von Palmitoylcarnitin bei Patienten signifikant höher [39]. Zudem fanden die Messungen in allen bisherigen Arbeiten, in denen ein CPT II- Enzymproteinmangel postuliert wurde, in Gegenwart von Malonyl- CoA als selektivem Inhibitor der CPT I statt [48]. Unter normalen Bedingungen ist die CPT I durch Malonyl- CoA hemmbar. Bei Patienten kommt es jedoch, wie von Zierz und Engel [39] und in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt zu einer abnormen Inhibition des Enzymproteins. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von Malonyl CoA bei Patienten mit gesichertem CPT- Mangel stärker ist im Vergleich zu Kontrollen [39, 49]. Wieser et al. zeigten bei 32 Patienten, dass beim benignen muskulären CPT II- Mangel die CPT- Aktivität im Normbereich lag, jedoch war das Enzym

durch Malonyl- CoA, Palmitoyl- CoA, sowie die Detergenzien Triton X und Tween 20 abnorm inhibiert [32].

Dies deutet darauf hin, dass vorherige Arbeiten, welche eine reduzierte CPT II-Enzymaktivität postulieren, als das Ergebnis einer abnormen Inhibition interpretiert werden können. So stärken diese Studien, mit der Postulierung eines CPT II- Enzymmangels die Hypothese eines abnorm regulierten Enzymproteins. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten sprechen für eine normale CPT II- Enzymaktivität, welches abnorm inhibiert wird. Dies könnte auch den attackenartigen Verlauf der Symptome erklären.

## **6.2 CPT II- Proteinquantifizierung bei Patienten und Kontrollen**

### **CPT II- Darstellung mittels Western Blot**

Bisherige Proteinquantifizierungen der CPT II mittels Antikörpern wurden als ein Fehlen des CPT Enzymproteins interpretiert. Im unter 5.2 gezeigten Western Blot, in dem ein monoklonaler, humaner Antikörper, welcher 100bB auf Exon 4 erkennt eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass die CPT II- Banden von Patienten und Kontrollen sich in der gleichen Intensität anfärben. Dies konnte bestätigt werden, indem die CPT II- Bande mit dem mitochondrialen Markerprotein COX korreliert wurde, sowohl im verdünnten, als auch im unverdünnten Muskelhomogenat. Auf Grund dessen wird die These unterstützt, dass Patienten mit einem muskulären CPT II Mangel keinen Mangel des Enzymproteins CPT II in der Muskulatur haben. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früheren Immunoreaktivitätsstudien.

Singh et al. interpretierten ihre 1988 erhobenen Daten, erhoben mittels Western Blot- Studie von einem Patienten als ein Fehlen des enzymatisch aktiven CPT II- Enzymproteins. In dieser Arbeit wurde jedoch ein Antikörper gegen Rinderleber- CPT II eingesetzt [50]. In einer anderen Studie, in der Antikörper gegen Rattenleber- CPT II eingesetzt wurden, wurden fünf Patientengruppen anhand von verschiedenen Enzymaktivitäten und Proteingehalt differenziert [46]. Beide Arbeiten wurden vor der Zeit des molekulargenetischen Verständnisses der Erkrankungen angefertigt.

Als Ursache der divergenten Ergebnisse und Interpretationen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit kommen die verwendeten Antikörper in Betracht. In der hier vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen die humane CPT II verwendet. In den früheren Arbeiten wurden keine monoklonalen Antikörper verwendet, auch waren sie nicht gegen die humane CPT II gerichtet. Die verwendeten Antikörper wiesen wahrscheinlich schlechtere

Bindungseigenschaften auf, als die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper. Eventuell banden die verwendeten Antikörper zwar gut an den menschlichen Wildtyp der CPT II, jedoch nicht an das mutierte CPT II- Enzym. Weiterhin ist es möglich, dass es sich bei den Mutationen aus den früheren Arbeiten, unter anderem um trunkierende Mutation gehandelt haben könnte. Diese Mutationen waren damals noch nicht bekannt, und konnten nicht vom Antikörper gebunden werden. Die nicht- trunkierenden Mutationen, wie z. B. die S113L Mutation führen nicht zu einem Stopcodon, und damit nicht zu einem verkürzten Enzymprotein. Auch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das CPT II- Protein in normaler Konzentration sowie in Höhe der zu erwartenden kD- Bande (72kD) nachweisbar war. Zum Nachweis des mutierten Enzyms ist der in dieser Arbeit verwendete, monoklonale Antikörper zu bevorzugen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen deutlich, dass das mutierte CPT II- Enzym von dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper erkannt wird, nachweisbar ist und in normaler Konzentration vorhanden ist.

#### **CPT I und II- Proteinquantifizierung mittels ELISA**

Auf Grund von „pulse- label“- Experimenten, welche die selbe radiomarkierte CPT II- Konzentration bei Patienten und Kontrollen zeigten, wurde eine normale Biosynthese des CPT II- Enzymproteins postuliert [47]. In der gleichen Arbeit, zeigten Western Blot- Studien, als auch die Immunpräzipitation von radiomarkierten Zellen fast keine nachzuweisenden CPT II- Banden [47]. Ein deutlich reduzierter „steady- state- level“ des mutierten CPT II- Enzymproteins wurde postuliert [47]. In dieser Arbeit wurde jedoch ein nur 43bB, auf Exon 5 erkennender Antikörper verwendet. Zudem geht aus der Arbeit nicht klar hervor, ob der untersuchte Patient die S113L- Mutation besitzt oder nicht. Die in der vorliegenden Arbeit gestellte Hypothese der normalen CPT II- Proteinkonzentration beim muskulären CPT II- Mangel wurde durch die im ELISA erhobenen Daten gestützt. Es wurden monoklonale Antikörper gegen humane CPT I- B und humane CPT II verwendet. Die Korrelation der CPT- Gesamtaktivität mit der CPT- Gesamtproteinkonzentration (CPT I + CPT) schließt jedoch nicht einen selektiven CPT II- Mangel mit einer kompensatorischen CPT I Erhöhung aus. Zum Ausschluss eines selektiven CPT II- Mangels, oder einer kompensatorischen CPT I- Erhöhung wurden auch die CPT I- und CPT II- Proteinkonzentrationen separat bestimmt. Die erhobenen Daten zeigen die selbe CPT I- und CPT II- Proteinkonzentrationen bei Patienten und Kontrollen. In Abb. 10 A und B zeigt sich bei Patienten und Kontrollen eine signifikante Korrelation der CPT- Gesamtaktivität zur der jeweils einzeln gemessenen CPT I- als auch der CPT II- Proteinkonzentration. Diese

Korrelationen sprechen eindeutig gegen einen selektiven CPT II- Mangel oder eine kompensatorische CPT I- Erhöhung. Die in Abb. 10 B gezeigte Signifikanz der CPT- Gesamtaktivität zu der CPT II- Proteinkonzentration belegt, dass bei Patienten ein aktives CPT II- Enzymprotein vorliegt, welches auch enzymatisch aktiv ist. Würde es sich um einen Enzymmangel handeln, ließe sich keine Korrelation nachweisen. Die CPT II- Proteinkonzentration betrug 41% bei Patienten und 43% bei Kontrollen der Gesamtproteinkonzentration (Tab. 10). Die signifikant reduzierte CPT II- Proteinkonzentration/ CS- Verhältnis war nicht durch einen erhöhten CPT I- Proteingehalt bedingt, sondern durch eine erhöhte CS- Aktivität (Tab. 9 und Tab. 10).

### **Immunhistochemische Darstellung der CPT II**

Die überwiegende Anfärbung der CPT II in Typ I- Fasern ist in Übereinstimmung mit einer Studie von Carroll an Rattenmuskulatur, in welcher die CPT- Aktivität in roten Muskelfasern 5x höher war als in weißen Muskelfasern [51]. Dies wiederum ist in Übereinstimmung mit dem höheren oxidativen Level und dem höheren Mitochondriengehalt in Typ I- Fasern. Die angefärbten Typ I- Fasern zeichnen sich durch einen höheren Myoglobingehalt im Vergleich zu Typ II- Fasern aus, sowie eine erhöhte oxidative und geringere glykolytische Aktivität [52]. Die CPT II konnte in der vorliegenden Arbeit mittels immunhistochemischer Darstellung in gleicher Intensität bei Patienten und Kontrollen dargestellt werden.

## **6.3 Veränderungen der Citratsynthaseaktivität bei muskulärem CPT**

### **II- Mangel**

Die Aktivität der Citratsynthase als intramitochondriales Enzym, das gut mit dem Mitochondriengehalt einer Muskelprobe korreliert, sollte eine Aussage zur Mitochondrienmenge der jeweiligen Muskelprobe und somit auch zum CPT- Gehalt ermöglichen [53]. Das CPT-Gesamtaktivität/CS- Aktivitäts- Verhältnis bei Patienten war erniedrigt, bedingt durch eine erhöhte CS- Aktivität bei Patienten, jedoch ohne veränderte CPT- Gesamtaktivität (Tab. 9). Dies ist in Übereinstimmung mit dem CPT- Proteingehalt/CS- Aktivitäts- Verhältnis (Tab. 10). Jedoch neigen Patienten dazu einen reduzierten Gesamtproteingehalt zu haben. Die CS- Aktivität war erhöht, sowohl bezogen auf FG oder NCP (Tab. 9). Frühere Arbeiten haben eine reduzierte bis normale CS- Aktivität

gezeigt, jedoch auch eindeutig erniedrigte CPT-Gesamtaktivität/CS- Aktivitäts- Verhältnisse bei Patienten [54, 55]. Die erniedrigte CPT-Gesamtaktivität/CS- Aktivitäts- Verhältnisse in diesen Arbeiten ist zurückzuführen auf eine 3- 7fach reduzierte CPT-Gesamtaktivität, anstatt auf eine erhöhte CS- Aktivität. Ursache hierfür können die verschiedenen Messmethoden zu der vorliegenden Arbeit sein. Zum einen wurde die CPT- Aktivität in Vladutiu's Studie mittels Isotopen- Austausch- Reaktion gemessen, wohingegen in dieser Arbeit die CPT- Aktivität anhand der Isotopen- Vorwärts- Reaktion bestimmt wurde. Weiterhin wurde in Vladutiu's Arbeit die CS- Aktivität mit der Methode nach Srere bestimmt [54]. Bei Messung der CS- Aktivität nach Srere erfolgt die Messung bei einer Wellenlänge von 233nm. Auf Grund des hohen Absorptionsspektrums von Proteinen bei 233nm ist diese Messmethode jedoch ungeeignet für eine Messung im Muskelgewebe [56]. Auch auf Grund dieser Tatsache könnten die damals erhobenen Daten verfälscht worden sein. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden nach der Methode von Sheperd und Garland gemessen, welche als optimale Messmethode im Muskelgewebe gilt.

Die erhöhte CS- Aktivität in der vorliegenden Arbeit könnte auf einen kompensatorischen Proliferationsreiz des mitochondrialen Matrixkompartiments ohne Proliferation der CPT- Proteinkonzentraion hindeuten. Eine erhöhte CS- Aktivität konnte bereits bei Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen gezeigt werden. In der gleichen Arbeit fanden sich bei Patienten ein ebenfalls Enzym-/ CS- Aktivitätsquotient (COX/ CS- Aktivitätsquotient und SDH/ CS- Aktivitätsquotient) [57].

## **6.4 Pathophysiologische Signifikanz**

Im Gegensatz zum Carnitinmangel treten Symptome beim muskulären CPT II- Mangel intermittierend auf, zudem finden sich deutlich weniger Lipidakkumulationen in der Muskulatur als bei Patienten mit Carnitinmangel [58, 59]. Besteht kein Stresszustand für den Fettsäurestoffwechsel, gewährleisten der normaler Proteingehalt und die normale Enzymaktivität eine normale Funktion des CPT- Systems. Es bleibt offen, ob die dauerhaft erhöhte CS- Aktivität ein subklinischer Effekts des mutierten CPT II- Enzymproteins ist, welches einen Proliferationsreiz an das mitochondriale Matrixkompartiment im symptomfreien Intervall sendet. Es ist jedoch deutlich, dass das mutierte CPT II- Protein am anfälligsten für Inhibition ist, wenn es man meisten gebraucht wird. Das Enzym ist normal aktiv, jedoch abnormal inhibiert, wenn der Fettsäuremetabolismus gestresst ist, zum Beispiel während Fasten, Fieber oder prolongiertem Sport [59-61]. Die postulierte Thermostabilität

[62] des mutierten CPT- Enzyms könnte zum Zusammenbruch des CPT- Systems in Situationen wie Fieber und prolongiertem Sport beitragen.

## **7 Zusammenfassung**

Der muskuläre CPT II- Mangel ist gekennzeichnet durch rezidivierende Attacken von Myoglobulinurie, häufig begleitet von Myalgien oder Muskelsteifigkeit, ausgelöst durch längere körperliche Belastung, Fasten oder fieberhafte Infekte [4]. In schweren Fällen kann die Myoglobulinurie zum akuten Nierenversagen führen. Mutationen im CPT II-Gen sind Grundlage für die verschiedenen Typen des CPT II- Mangels. Der adulte, benigne muskuläre CPT II- Mangel ist der phänotypisch häufigste CPT- Mangel und die häufigste Form einer Störung des muskulären Fettstoffwechsels. Bei ca. 90% der Patienten findet sich die S113L Mutation auf dem CPT II- Gen, mit einer Allelhäufigkeit von 60-70% [4-6]. Die biochemischen Konsequenzen der krankheitsauslösenden Mutation werden noch immer kontrovers diskutiert. Die Hypothesen reichen von einem völligen oder partiellen Mangel an enzymatisch aktivem Protein [46], einer verminderten Stabilität des enzymatisch aktiven Proteins [62], bis zu einer abnormen Regulierbarkeit eines ansonsten normal aktiven Enzymproteins [14]. In der vorliegenden Arbeit wurde die CPT II in Muskelbiopsien von neun Patienten mit molekulargenetisch gesichertem CPT II- Mangel biochemisch analysiert. Die Analysen umfassten die Charakterisierung der Aktivität (CPT I + CPT II), einschließlich der Enzyminhibition mit Malonyl CoA und Triton X 100 unter optimalen Testbedingungen. Es erfolgte die Proteinquantifizierung mittels Western Blot (CPT II) und ELISA (CPT I und CPT II) sowie eine immunhistochemische Darstellung an Kryostatschnitten (CPT II), wobei hier optimale Testbedingungen etabliert wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass beim muskulären CPT II- Mangel die Gesamtaktivität (CPT I + CPT II) unter optimalen Testbedingungen normal ist, jedoch bei Patienten abnorm inhibiert wird. Im Western Blot konnte die CPT II bei Patienten und Kontrollen in gleicher Intensität dargestellt werden. Im ELISA fanden sich bei Patienten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede der Proteinkonzentrationen von CPT I und CPT II. Die Citratsynthaseaktivität bezogen auf den Proteingehalt war bei Patienten deutlich erhöht, die CPT II- Konzentration als auch die CPT- Gesamtaktivität normiert für die Citratsynthaseaktivität somit erniedrigt. Die Immunhistochemie (CPT II) zeigte bei Patienten und Kontrollen die gleiche Darstellung der CPT II.

Die Daten deuten darauf hin, dass beim muskulären CPT II- Mangel das Enzymprotein unter

optimalen Testbedingungen enzymatisch aktiv und in normaler Menge vorhanden ist. Die abnorme Hemmbarkeit durch Malonyl- CoA und Triton X-100 deutet auf eine abnorme Regulation und Stabilität des Enzyms hin, was den attackenartigen Verlauf der Symptome erklären könnte. Gleichwohl scheint das mutierte Enzym mit einer auch im symptomfreien Intervall kompensatorischen Vergrößerung des mitochondrialen Matrixkompartiments einherzugehen. Dies wurde durch die Ergebnisse auf Proteinebene, Aktivitätsmessung, Western Blot, ELISA und Immunhistochemie unterstützt.

## **8 Literaturverzeichnis**

[1] S. DiMauro, P.M. DiMauro, Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria, *Science*, 182 (1973) 929-931.

[2] P.R. Joshi, M. Deschauer, S. Zierz, Clinically symptomatic heterozygous carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency, *Wiener klinische Wochenschrift*, 124 (2012) 851-854.

[3] P.R. Joshi, M. Deschauer, S. Zierz, Carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency: Genotype-Phenotype analysis of 50 patients, *Journal of the neurological sciences*, (2013).

[4] M. Deschauer, T. Wieser, S. Zierz, Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: clinical and molecular genetic features and diagnostic aspects, *Archives of neurology*, 62 (2005) 37-41.

[5] J.P. Bonnefont, F. Demaugre, C. Prip-Buus, J.M. Saudubray, M. Brivet, N. Abadi, L. Thuillier, Carnitine palmitoyltransferase deficiencies, *Molecular genetics and metabolism*, 68 (1999) 424-440.

[6] P.J. Isackson, M.J. Bennett, G.D. Vladutiu, Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Molecular genetics and metabolism*, 89 (2006) 323-331.

[7] K. Bartlett, S. Eaton, Mitochondrial beta-oxidation, *European journal of biochemistry / FEBS*, 271 (2004) 462-469.



- [8] C.A. Stanley, Carnitine disorders, *Advances in pediatrics*, 42 (1995) 209-242.
- [9] W.H. Kunau, V. Dommes, H. Schulz, beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress, *Progress in lipid research*, 34 (1995) 267-342.
- [10] K.F. Woeltje, M. Kuwajima, D.W. Foster, J.D. McGarry, Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. II. Use of detergents and antibodies, *J Biol Chem*, 262 (1987) 9822-9827.
- [11] K.R. Norum, M. Farstad, J. Bremer, The submitochondrial distribution of acid:CoA ligase (AMP) and palmitoyl-CoA:carnitine palmitoyltransferase in rat liver mitochondria, *Biochemical and biophysical research communications*, 22 (1966) 797-804.
- [12] I. Tamai, R. Ohashi, J. Nezu, H. Yabuuchi, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai, A. Tsuji, Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2, *J Biol Chem*, 273 (1998) 20378-20382.
- [13] J.T. Bronsnan, B. Kopec, I.B. Fritz, The Localization of Carnitine Palmitoyltransferase on the Inner Membrane of Bovine Liver Mitochondria, *The Journal of Biological Chemistry*, 248, No.11 (1973) 4075-4082.
- [14] J.D. McGarry, N.F. Brown, The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis, *European journal of biochemistry / FEBS*, 244 (1997) 1-14.
- [15] F. Fraser, C.G. Corstorphine, V.A. Zammit, Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane, *The Biochemical journal*, 323 ( Pt 3) (1997) 711-718.
- [16] S. Gobin, J.P. Bonnefont, C. Prip-Buus, C. Mugnier, M. Ferrec, F. Demaugre, J.M. Saudubray, H. Rostane, F. Djouadi, W. Wilcox, S. Cederbaum, R. Haas, W.L. Nyhan, A. Green, G. Gray, J. Girard, L. Thuillier, Organization of the human liver

carnitine palmitoyltransferase 1 gene ( CPT1A) and identification of novel mutations in hypoketotic hypoglycaemia, *Human genetics*, 111 (2002) 179-189.

[17] N. Price, F. van der Leij, V. Jackson, C. Corstorphine, R. Thomson, A. Sorensen, V. Zammit, A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I, *Genomics*, 80 (2002) 433-442.

[18] M. Morillas, E. Lopez-Vinas, A. Valencia, D. Serra, P. Gomez-Puertas, F.G. Hegardt, G. Asins, Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal, *The Biochemical journal*, 379 (2004) 777-784.

[19] C.H. Britton, R.A. Schultz, B. Zhang, V. Esser, D.W. Foster, J.D. McGarry, Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (1995) 1984-1988.

[20] J.P. Bonnefont, F. Djouadi, C. Prip-Buus, S. Gobin, A. Munnich, J. Bastin, Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects, *Molecular aspects of medicine*, 25 (2004) 495-520.

[21] M.J. Bennett, S.B. Narayan, A.B. Santani, Carnitine Palmitoyltransferase 1A Deficiency, in: R.A. Pagon, T.D. Bird, C.R. Dolan, K. Stephens (Eds.) *GeneReviews*, Seattle (WA), 1993.

[22] I.J. L, H. Mandel, W. Oostheim, J.P. Ruiter, A. Gutman, R.J. Wanders, Molecular basis of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency, *The Journal of clinical investigation*, 102 (1998) 527-531.

[23] C. Prip-Buus, L. Thuillier, N. Abadi, C. Prasad, L. Dilling, J. Klasing, F. Demaugre, C.R. Greenberg, J.C. Haworth, V. Droin, N. Kadhom, S. Gobin, P. Kamoun, J. Girard, J.P. Bonnefont, Molecular and enzymatic characterization of a unique carnitine palmitoyltransferase 1A mutation in the Hutterite community, *Molecular genetics and metabolism*, 73 (2001) 46-54.

- [24] N.F. Brown, R.S. Mullur, I. Subramanian, V. Esser, M.J. Bennett, J.M. Saudubray, A.S. Feigenbaum, J.A. Kobari, P.M. Macleod, J.D. McGarry, J.C. Cohen, Molecular characterization of L-CPT I deficiency in six patients: insights into function of the native enzyme, *Journal of lipid research*, 42 (2001) 1134-1142.
- [25] E. Ogawa, M. Kanazawa, S. Yamamoto, S. Ohtsuka, A. Ogawa, A. Ohtake, M. Takayanagi, Y. Kohno, Expression analysis of two mutations in carnitine palmitoyltransferase IA deficiency, *Journal of human genetics*, 47 (2002) 342-347.
- [26] M.J. Bennett, R.L. Boriack, S. Narayan, S.L. Rutledge, M.L. Raff, Novel mutations in CPT 1A define molecular heterogeneity of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency, *Molecular genetics and metabolism*, 82 (2004) 59-63.
- [27] S. Gobin, L. Thuillier, G. Jogl, A. Faye, L. Tong, M. Chi, J.P. Bonnefont, J. Girard, C. Prip-Buus, Functional and structural basis of carnitine palmitoyltransferase 1A deficiency, *J Biol Chem*, 278 (2003) 50428-50434.
- [28] R. Fingerhut, W. Roschinger, A.C. Muntau, T. Dame, J. Kreischer, R. Arnecke, A. Superti-Furga, H. Troxler, B. Liebl, B. Olgemoller, A.A. Roscher, Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency: acylcarnitine profiles in blood spots are highly specific, *Clinical chemistry*, 47 (2001) 1763-1768.
- [29] F. Demaugre, J.P. Bonnefont, G. Mitchell, N. Nguyen-Hoang, A. Pelet, M. Rimoldi, S. Di Donato, J.M. Saudubray, Hepatic and muscular presentations of carnitine palmitoyl transferase deficiency: two distinct entities, *Pediatric research*, 24 (1988) 308-311.
- [30] A. Slama, M. Brivet, A. Boutron, A. Legrand, J.M. Saudubray, F. Demaugre, Complementation analysis of carnitine palmitoyltransferase I and II defects, *Pediatric research*, 40 (1996) 542-546.
- [31] G. Finocchiaro, F. Taroni, M. Rocchi, A. Liras Martin, I. Colombo, G.T. Tarelli, S. DiDonato, cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of

human carnitine palmitoyltransferase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (1991) 10981.

[32] T. Wieser, M. Deschauer, K. Olek, T. Hermann, S. Zierz, Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: molecular and biochemical analysis of 32 patients, *Neurology*, 60 (2003) 1351-1353.

[33] F. Taroni, G. Uziel, Fatty acid mitochondrial beta-oxidation and hypoglycaemia in children, *Current opinion in neurology*, 9 (1996) 477-485.

[34] F. Taroni, E. Verderio, S. Fiorucci, P. Cavadini, G. Finocchiaro, G. Uziel, E. Lamantea, C. Gellera, S. DiDonato, Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (1992) 8429-8433.

[35] M.A. Nada, W.J. Rhead, H. Sprecher, H. Schulz, C.R. Roe, Evidence for intermediate channeling in mitochondrial beta-oxidation, *J Biol Chem*, 270 (1995) 530-535.

[36] J.M. Saudubray, D. Martin, P. de Lonlay, G. Touati, F. Poggi-Travert, D. Bonnet, P. Jouvret, M. Boutron, A. Slama, C. Vianey-Saban, J.P. Bonnefont, D. Rabier, P. Kamoun, M. Brivet, Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients, *Journal of inherited metabolic disease*, 22 (1999) 488-502.

[37] I. Tein, S. DiMauro, D.C. DeVivo, Recurrent childhood myoglobinuria, *Advances in pediatrics*, 37 (1990) 77-117.

[38] E. Sigauke, D. Rakheja, K. Kitson, M.J. Bennett, Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical, and molecular review, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 83 (2003) 1543-1554.

- [39] S. Zierz, A.G. Engel, Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle, *European Journal of Biochemistry*, 149 (1985) 207–214.
- [40] D. Shepherd, & Garland Citrate Synthase from Rat Liver, in: J.M. Lowenstein (Ed.) *Methods in Enzymology* vol. XIII, New York, London, 1969, pp. 11-16.
- [41] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193 (1951) 265-275.
- [42] J. Lilienthal, K. Zierler, B. Folk, R. Buka, M. Riley A reference base and system for analysis of muscle constituents., *J Biol Chem*, 182 (1950) 501–508.
- [43] R.S. Yalow, S.A. Berson, Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, *Nature*, 184 (Suppl 21) (1959) 1648-1649.
- [44] E. Engvall, P. Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry*, 8 (1971) 871-874.
- [45] R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J. Kuby, *Enzyme- Linked Immunosorbent Assay*, 5th ed. ed., W.H. Freeman, New York, 2003.
- [46] G.D. Vladutiu, I. Saponara, J.M. Conroy, R.E. Grier, L. Brady, P. Brady, Immunoquantitation of carnitine palmitoyl transferase in skeletal muscle of 31 patients, *Neuromuscular disorders : NMD*, 2 (1992) 249-259.
- [47] F. Taroni, E. Verderio, F. Dworzak, P.J. Willems, P. Cavadini, S. DiDonato, Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients, *Nature genetics*, 4 (1993) 314-320.
- [48] J.D. McGarry, K.F. Woeltje, M. Kuwajima, D.W. Foster, Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase, *Diabetes/metabolism reviews*, 5 (1989) 271-284.

- [49] S. Zierz, A.G. Engel, Different sites of inhibition of carnitine palmitoyltransferase by malonyl-CoA, and by acetyl-CoA and CoA, in human skeletal muscle *Biochem. J.*, 245 (1987) 205-209.
- [50] R. Singh, I.M. Shepherd, J.P. Derrick, R.R. Ramsay, H.S. Sherratt, D.M. Turnbull, A case of carnitine palmitoyltransferase II deficiency in human skeletal muscle, *FEBS letters*, 241 (1988) 126-130.
- [51] J.E. Carroll, A. Villadiego, D.P. Morse, Fatty acid oxidation intermediates and the effect of fasting on oxidation in red and white skeletal muscle, *Muscle & nerve*, 6 (1983) 367-373.
- [52] S.J. Zierz, F., *Muskelerkrankungen*, Stuttgart, 2003.
- [53] K. Schwerzmann, H. Hoppeler, S.R. Kayar, E.R. Weibel, Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (1989) 1583-1587.
- [54] G.D. Vladutiu, Biochemical and molecular correlations in carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Muscle & nerve*, 22 (1999) 949-951.
- [55] P.J. Isackson, K.A. Sutton, K.Y. Hostetler, G.D. Vladutiu, Novel mutations in the gene encoding very long-chain acyl-CoA dehydrogenase identified in patients with partial carnitine palmitoyltransferase II deficiency, *Muscle & nerve*, 47 (2013) 224-229.
- [56] P.A. Srere, Citrate Synthase, in: J.M. Lowenstein (Ed.) *Methods in Enzymology*, vol. XIII, New York, London, 1969, pp. 3-11.
- [57] F.N. Gellerich, M. Deschauer, Y. Chen, T. Muller, S. Neudecker, S. Zierz, Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size, *Biochimica et biophysica acta*, 1556 (2002) 41-52.

- [58] A.G. Engel, C. Angelini, Carnitine deficiency of human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy: a new syndrome, *Science*, 179 (1973) 899-902.
- [59] W.M. Bortz, F. Lynen, Elevation of Long Chain Acyl Coa Derivatives in Livers of Fasted Rats, *Biochemische Zeitschrift*, 339 (1963) 77-82.
- [60] P.K. Tubbs, P.B. Garland, Variations in tissue contents of coenzyme A thio esters and possible metabolic implications, *The Biochemical journal*, 93 (1964) 550-557.
- [61] D.J. Pearson, P.K. Tubbs, Tissue Levels of Acid-Insoluble Carnitine in Rat Heart, *Biochimica et biophysica acta*, 84 (1964) 772-773.
- [62] S.E. Olpin, A. Afifi, S. Clark, N.J. Manning, J.R. Bonham, A. Dalton, J.V. Leonard, J.M. Land, B.S. Andresen, A.A. Morris, F. Muntoni, D. Turnbull, M. Pourfarzam, S. Rahman, R.J. Pollitt, Mutation and biochemical analysis in carnitine palmitoyltransferase type II (CPT II) deficiency, *Journal of inherited metabolic disease*, 26 (2003) 543-557.

## 9 Thesen

1. Der adulte, benigne muskuläre CPT II- Mangel ist der phänotypisch häufigste CPT- Mangel und die häufigste Form einer Störung des muskulären Fettstoffwechsels.
2. Patienten, die an einem muskulären CPT- II Mangel erkrankt sind, haben keinen CPT II- Mangel in der Muskulatur.
3. Dem muskulären CPT- II Mangel liegt keine kompensatorische Erhöhung der CPT I zu Grunde.
4. Das CPT II- Enzymprotein bei Patienten mit muskulärem CPT- II Mangel ist in normaler Konzentration vorhanden.
5. Das CPT II- Enzymprotein bei Patienten mit muskulärem CPT- II Mangel ist enzymatisch aktiv, jedoch abnorm inhibiert.
6. Der Nachweis der CPT II im Western Blot ist bei Patienten mit muskulärem CPT- II Mangel möglich und dies in gleicher Intensität wie bei Kontrollen.
7. Die immunhistochemische Darstellung der CPT II ist bei Patienten und Kontrollen in gleicher Intensität und in den selben Fasertypen möglich.
8. Patienten mit einem muskulärem CPT- II Mangel haben eine erhöhte Citratsynthaseaktivität.



## **Lebenslauf**

Name	Lehmann
Vorname	Diana
Geburtsdatum	16.07.1985
Geburtsort	Essen
Wohnhaft	Rathausstr. 8, 06108 Halle
Familienstand	ledig
Eltern	Elizabeth Lehmann, geb. Arsova, geb. 10.07.1956 Dr. med. Manfred Lehmann, geb. 24.07.1950

### Ausbildungsgang

1991- 1995	Meisenburg Grundschule, Essen
1995- 2004	Goethegymnasium, Essen, Abitur im Juni 2004
10/ 2006	Beginn des Medizinstudiums an der MLU Halle- Wittenberg
12/ 2012	Staatsexamen Medizin und Approbation als Ärztin

Halle, Dezember 2013

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Fakultät vorgelegt. Es ist an keiner anderen Fakultät im In- oder Ausland ein anderes Promotionsverfahren anhängig.

Halle, Dezember 2013

## **Danksagung**

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

Den medizinisch- technischen Assistentinnen des Muskellabors der Neurologischen Universitätsklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für ihre Unterstützung.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Partner Oli danke ich von Herzen für Ihre ständige Ermutigung, Motivation, Geduld und Unterstützung.