

**Thermostabilität der Variante S113L der humanen Carnitin-
Palmitoyltransferase II und ihre Regulierung durch Malonyl-CoA**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Vorgelegt von

Leila Motlagh

geb. am 19.09.1978 in Teheran/Iran

Gutachter

1. PD Dr. Ralph Golbik
2. Prof. Dr. Stephan Zierz
3. Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger
4. Prof. Dr. Mike Schutkowski

Halle (Saale), 24.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Fettsäurestoffwechsel.....	1
1.2. CPT-System.....	3
1.2.1. Natrium-abhängiger organischer Kation/Carnitin-Transporter 2 (OCTN2)	4
1.2.2. CPT I	4
1.2.3. Carnitin/Acylcarnitin-Translokase (CACT).....	5
1.2.4. CPT II	6
1.2.5. Substrate der CPT-Enzyme	6
1.2.5.1. L-Carnitin.....	6
1.2.5.2. Coenzym A (CoA)	7
1.2.5.3. Acyl-L-carnitine.....	8
1.2.5.3.1. Klinische Aspekte der Acyl-L-carnitine	9
1.2.5.3.2. Pharmazeutische Bedeutung von Acyl-L-carnitinen	9
1.2.6. Mechanismus der Reaktion der CPT-Enzyme.....	10
1.2.7. Hemmstoffe der CPT II-Enzyme	12
1.2.7.1. Malonyl-CoA.....	12
1.2.7.2. Malonsäure	15
1.3. Fettsäure-Stoffwechselstörungen	16
1.3.1. L-Carnitin-Mangel	16
1.3.1.1. Diagnose des L-Carnitin-Mangels.....	17
1.3.1.2. Therapie des L-Carnitin-Mangels.....	18
1.3.2. CACT-Mangel	18
1.3.2.1. Diagnose des CACT-Mangels	18
1.3.2.2. Therapie des CACT-Mangels	19
1.3.3. CPT I-Mangel.....	19
1.3.3.1. L-CPT I-Mangel.....	19
1.3.3.1.1. Diagnose des L-CPT I-Mangels	20
1.3.3.1.2. Therapie	20
1.3.3.2. M-CPT I- und B-CPT I-Mangel	21
1.3.4. CPT II-Mangel.....	21
1.3.4.1. Die neonatale Form des CPT II-Mangels.....	21
1.3.4.2. Die infantile Form des CPT II-Mangels	22
1.3.4.3. Die adulte Form des CPT II-Mangels.....	22
1.3.4.4. Mutationen, die mit CPT II-Mangel assoziiert sind	23
1.3.4.5. Phänotyp-Genotyp-Korrelation	24
1.3.4.6. Differentialdiagnose.....	25
1.3.4.7. Therapie des CPT II-Mangels.....	26
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	26
2. Materialien und Methoden.....	29
2.1. Material	29
2.1.1. Chemikalien, Antibiotika, Substrate.....	29
2.1.2. Lösungen, Medien, Puffer	32
2.1.3. Geräte und <i>software</i>	34

2.2. Methoden	35
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.1.1 Transformation in chemokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.2.2. Proteinchemische Methoden.....	35
2.2.2.1. Ansetzen der Vor- und Hauptkultur.....	35
2.2.2.2. Fermentation	36
2.2.2.3. Aufschluss und Proteinreinigung	37
2.2.2.3.1. Ni-NTA Chromatographie.....	37
2.2.2.3.2. Größenausschluss-Chromatographie.....	38
2.2.2.3.3. Anionenaustauschchromatographie	39
2.2.2.3.4. Aufkonzentrierung.....	39
2.2.2.3.5. Lagerung.....	39
2.2.3. Analytische Methode.....	40
2.2.3.1. SDS-PAGE.....	40
2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	40
2.2.3.3. Aktivitätstest	41
2.2.3.4. Thermoinaktivierung der Enzyme	42
2.2.3.4.1. Der Einfluss von Substraten auf die CPT II-Aktivität.....	45
2.2.3.4.1.1. Palmitoyl-CoA.....	45
2.2.3.4.1.2. L-Carnitin und Acyl-L-carnitine	45
2.2.4. Hemmungsstudien	46
2.2.4.1. Malonyl-CoA als Hemmstoff	46
2.2.4.2. Malonsäure (Malonat) als Hemmstoff	47
2.2.4.3. Reversibilität der Hemmung	47
2.2.4.4. Malonyl-CoA als Substrat der CPT II	47
2.2.5. Computergestützte Simulationsmethoden.....	48
2.2.5.1. Homologie-Modelling.....	48
2.2.5.2. Moleküldynamik (MD).....	48
2.2.5.3. <i>docking</i> -Studien.....	49
3. Ergebnisse.....	51
3.1. Molekularbiologische Methoden	51
3.1.1. Transformation in chemokompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	51
3.2. Proteinchemische Methoden	51
3.2.1. Chromatographie-Schritte	51
3.3. Analytische Methoden	52
3.3.1. SDS-PAGE	52
3.3.2. Aktivitätstest.....	52
3.4. Experimente zur Thermostabilität der CPT II-Enzyme	54
3.4.1. Thermoinaktivierung der Enzyme.....	54
3.5. Der Effekt der Substrate auf Aktivität der Enzyme	57
3.5.1. Acyl-CoA.....	57
3.5.2. L-Carnitin und Acyl-L-carnitine	57
3.5.2.1. Moleküldynamische Studien	62
3.6. Hemmungsstudien	66
3.6.1. Malonyl-CoA	66

3.6.2. Malonsäure	67
3.6.3. Reversibilität der Hemmung	67
3.6.4. Malonyl-CoA als Substrat	69
3.6.5. <i>docking</i> -Studien	69
4. Diskussion	73
4.1. Aktivitätstest	73
4.1.1. Optimierung des Aktivitätstests	73
4.1.2. Aktivität der Variante S113L	73
4.1.3. Der Effekt der S113L-Mutation	74
4.2. Thermoinstabilität	74
4.3. Der Effekt der Substrate	75
4.3.1. Moleküldynamische Untersuchungen	77
4.4. Hemmungsstudien	78
4.4.1. Malonyl-CoA-Hemmung	78
4.4.1.1. Die Bedeutung	78
4.4.1.2. Hemmbarkeit der CPT II durch Malonyl-CoA	79
4.4.1.3. Hemmbarkeit der CPT II durch Malonsäure (Malonat)	81
4.4.1.4. <i>docking</i> -Studien	82
4.4.1.4.1. Die Hemmung von CPT I durch Malonyl-CoA	82
4.4.1.4.2. Die Hemmung von CPT II durch Malonyl-CoA	83
4.4.1.4.3. Abnormale Hemmung der Variante S113L durch Malonyl-CoA	83
5. Zusammenfassung	87
6. Ausblick	89
Literaturverzeichnis	90
Abkürzungen	104
Anhang	108

1. Einleitung

1.1. Fettsäurestoffwechsel

Die Fettsäuren, hauptsächlich die langkettigen Fettsäuren (*long-chain-fatty-acids*, LCFA), spielen eine entscheidende Rolle in der zellulären Homöostase (Dutta-Roy, 2000; Rinaldo et al., 2002). Sie sind beteiligt an vielen grundlegenden Prozessen, wie beispielsweise der Phospholipidsynthese, den posttranslationalen Modifikationen der Proteine und der Membranpermeabilität. Die β -Oxidation der Fettsäuren als Hauptquelle der Energiegewinnung des Herzens und der Muskeln ist seit über 40 Jahren bekannt (Neely and Morgan, 1974; Eaton et al., 1996).

Da in den meisten Geweben nur geringe Mengen an Lipiden gespeichert sind, hängt die Energieerzeugung von einer kontinuierlichen Zufuhr von Fettsäuren ab, die überwiegend aus Fettgewebe stammen. Verschiedene Schritte sind notwendig, um über den Fettsäuremetabolismus Energie zu gewinnen: freie Fettsäuren entstehen durch Lipolyse und werden, an Albumin gebunden, im Blut transportiert. Danach werden sie durch einen über Transportproteine in der Plasmamembran vermittelten Prozess in den Zielgeweben aufgenommen (Uziel et al., 1995; Kerner and Hoppel, 2000).

Da die Fettsäureoxidation weitgehend in den Mitochondrien stattfindet, müssen diese Fettsäuren nach der Aktivierung mit Coenzym A (CoA), mittels Carnitin-Palmitoyltransferase des CPT-Systems in die Matrix transportiert werden. Anschließend werden sie in einem wiederholten Zyklus von konzertierten Reaktionen oxidiert. Diese Reaktionen werden von Kettenlängen-spezifischen Enzymen katalysiert, die nacheinander ein Molekül von Acetyl-CoA entfernen, (Rinaldo et al., 2002).

Mittel- und kurzkettige Fettsäuren erreichen die innere Seite der Mitochondrienmembran durch passive Diffusion. Dort werden sie durch eine für mittel- bzw. kurzkettige Fettsäuren spezifische Acyl-CoA-Synthetase aktiviert. Der Transport der LCFAs dagegen ist vom CPT-System abhängig und erfolgt nach Aktivierung mittels einer für langkettige Fettsäuren spezifischen Acyl-CoA-Synthetase. Diese befindet sich in der äußeren Mitochondrienmembran (Rebouche et al., 1990; Eaton et al., 1996).

1. Einleitung

Entsprechend der Länge der Kohlenstoffkette wird der erste Schritt der Oxidation durch unterschiedliche Acyl-CoA-Dehydrogenasen katalysiert: *very-long-chain*-Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase (VLCAD), EC 1.3.8.9 für C12-C24-Fettsäuren, *long-chain*-Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase (LCAD), EC 1.3.8.8 für C8-C20-Fettsäuren, *medium-chain*-Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase (MCAD), EC 1.3.8.7 für C4-C12-Fettsäuren und *short-chain*-Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase (SCAD), EC 1.3.8.1 für C4- und C6-Fettsäuren. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von 2-Enoyl-CoA aus den entsprechenden gesättigten Estern und benötigen Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Coenzym für ihre Funktion (Eaton et al., 1996; Rinaldo et al., 2002).

Während SCAD, MCAD und LCAD Homotetramere sind, die sich in der Matrix befinden, ist VLCAD ein Homodimer und in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Rebouche et al., 1990; Rinaldo et al., 2002).

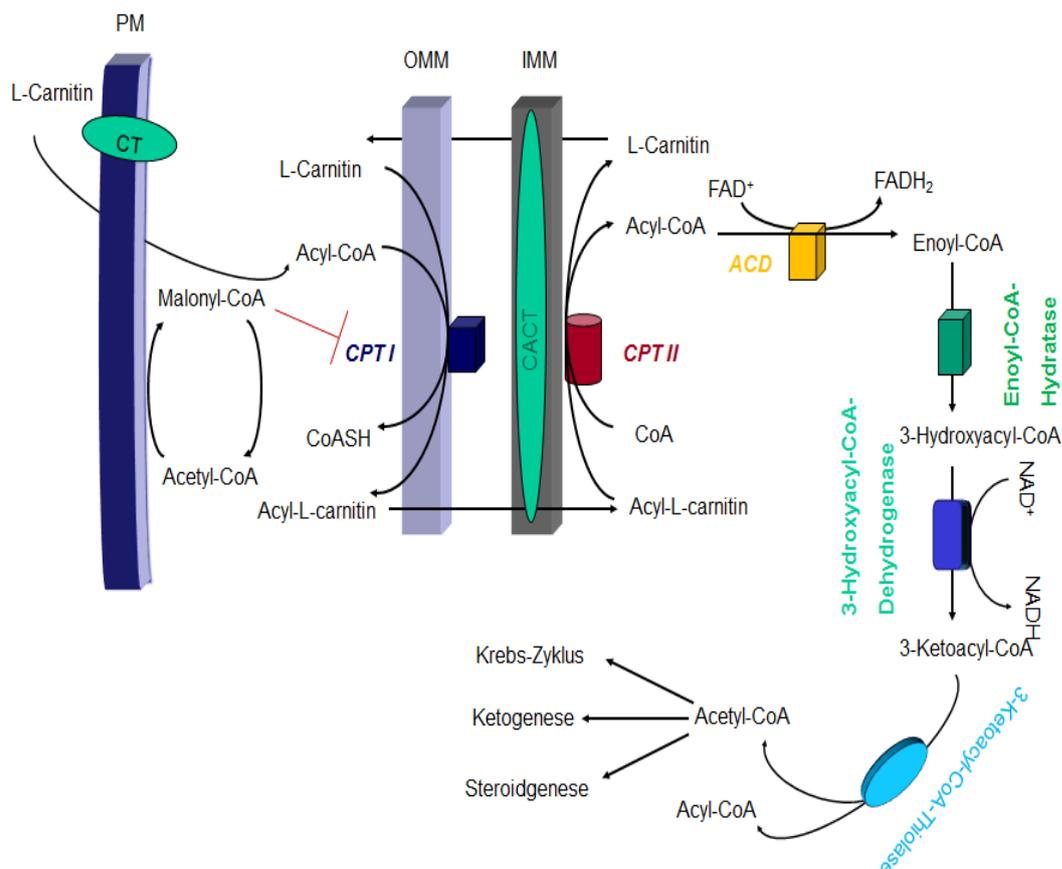


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der an der mitochondrialen β -Oxidation beteiligten Enzyme. OMM und IMM stellen die äußere bzw. innere mitochondriale Membran dar und PM zeigt die Plasmamembran (nach Eaton et al. 1996).

1. Einleitung

Die weiteren Oxidations-Schritte und deren bis zur letzten Ebene beteiligten Enzyme, die zum Endprodukt Acetyl-CoA führen, sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

1.2. CPT-System

Zusammen mit den Carnitin-Transportern spielt das CPT-System eine entscheidende Rolle beim Transport der LCFAs vom Zytosol in die mitochondriale Membran. Im Jahr 1963 wurde die These aufgestellt, dass es mindestens zwei verschiedene Formen von CPT mit unterschiedlichen Funktionen gibt: 1) CPT I: lokalisiert in der äußeren mitochondrialen Membran zum Konvertieren der Acyl-CoAs zu Acyl-L-carnitin und 2) CPT II: auf der inneren Seite der Mitochondrienmembran liegend, zum Katalysieren der umgekehrten Reaktion (Fritz et al., 1963).

Nach heutigem Wissensstand besteht das CPT-System aus drei unterschiedlich lokalisierten mitochondrialen Komponenten: Carnitin/Acylcarnitin-Translokase (CACT), Carnitin-Palmitoyltransferase I (CPT I) und Carnitin-Palmitoyltransferase II (CPT II). Die zwei Letztgenannten katalysieren reversibel die folgende Reaktion (McGarry and Brown, 1997; Kerner and Hoppel, 2000):



Im ersten Schritt werden die LCFAs durch den katalytischen Effekt der ATP-abhängigen Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoAs umgewandelt. Für den Transport durch die innere Mitochondrienmembran werden sie mit Hilfe von CPT I zu Acyl-L-carnitin umgesetzt. Bei einer Austauschreaktion gegen L-Carnitin, die mittels CACT katalysiert wird, werden diese Produkte durch die innere mitochondriale Membran transloziert. An dieser Stelle erfolgt die Konvertierung zu Acyl-CoAs durch CPT II (McGarry and Brown, 1997; Kerner and Hoppel, 2000).

Die wichtigsten beteiligten Proteine in diesem System werden folgend aufgelistet:

1.2.1. Natrium-abhängiger organischer Kation/Carnitin-Transporter 2 (*organic-cation/carnitine-transporter*, OCTN2)

OCTN2, ein Mitglied der multispezifischen organischen Ionen-Transporter Superfamilie, spielt neben seiner Rolle beim Transport organischer Kationen auch eine wichtige Rolle beim L-Carnitin-Transport. Im Gegensatz zu den organischen Kationen erfolgt der Transport von L-Carnitin nur in Gegenwart von Na⁺. Die kurzkettigen Acyl-L-carnitine können ebenfalls mittels dieses Systems transportiert werden. *SLC22A5* (das fünfte Mitglied der *solute-carrier-family 22*), das humane Gen, das für das OCTN2-Protein mit 557 Aminosäuren kodiert, wurde auf dem Chromosom 5q31.1–32 identifiziert (Wu et al., 1998; Wu et al., 1999).

1.2.2. CPT I

CPT I (EC 2.3.1.21) ist ein integrales Membranprotein, das bei der Umesterung der Acyl-CoAs zu Acyl-L-carnitin beim Transport der LCFAs vom Zytosol in die mitochondriale Membran eine geschwindigkeitsbestimmende Rolle spielt (Rufer et al., 2006).

Drei Gewebe-spezifische Isoformen der CPT I (L-CPT I, M-CPT I und B-CPT I) sind bekannt. Die erst im Jahre 1995 identifizierte Leber-Isoform, L-CPT I (Britton et al., 1995) mit 773 Aminosäuren und ca. 88 kDa, wird in Leber, Niere, Lunge, Milz, Darm, Pankreas, Ovarien, Lymphozyten, Fibroblasten und Gehirn synthetisiert. Das kodierende Gen konnte dem Chromosom 11q13.1-q13.5. zugeordnet werden (Britton et al., 1997; Bonnefont et al., 2004).

Die Muskel-Isoform, M-CPT I (Yamazaki et al., 1996) mit 772 Aminosäuren und ebenfalls ca. 88 kDa kommt überwiegend in den skeletalen Muskeln, in Herz, Fettgewebe und Hoden vor. Das zugehörige humane Gen konnte auf Chromosom 22q13.31-q13.32 identifiziert werden (Britton et al., 1997). Trotz 63 %iger Identität der L- und M-Isoformen zeigen diese unterschiedliche kinetische Eigenschaften (Bennett et al., 2000; Bonnefont et al., 2004).

Das Gen der schließlich 2002 entdeckten Form, B-CPT I (Price et al., 2002), liegt auf dem Chromosom 19q13.33. Dieser Typ ist mit 803 Aminosäuren und circa

1. Einleitung

91 kDa hauptsächlich im Gehirn und weniger in Hoden, Ovarien und Darm zu finden (Bonfont et al., 2004).

Im Vergleich zu L-CPT I hat die M-CPT I eine viel höhere Affinität zu L-Carnitin (McGarry et al., 1983). M-CPT I ist, verglichen mit den beiden anderen Isoformen, ebenfalls empfindlicher gegenüber der Hemmung durch Malonyl-CoA (McGarry et al., 1983; Lavrentyev et al., 2004). B-CPT I katalysiert die L-Carnitin-Acyltransferase-Reaktion mit einer sehr geringen katalytischen Effizienz. Diese Isoform zeigt jedoch eine ähnliche Affinität wie L-CPT I für Malonyl-CoA (Price et al., 2002; Zammit, 2008).

Es wird vermutet, dass es zwei separate Bindestellen für Malonyl-CoA im CPT I-Protein gibt. Die bevorzugte Bindestelle liegt auf der zytoplasmatischen Seite der Mitochondrienmembran. Für eine Hemmung an dieser Stelle scheint mehr die Präsenz einer Carbonylgruppe wesentlich zu sein und weniger der CoA-Teil (Cook et al., 1994).

Die zweite Bindestelle befindet sich im aktiven Zentrum der CPT I. Durch eine Bindung von CoA an dieser Stelle könnte das Enzym ebenfalls gehemmt werden (Cook et al., 1994).

1.2.3. Carnitin/Acylcarnitin-Translokase (CACT)

Die entscheidende Rolle der Translokase CACT besteht im Transport der langkettigen Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix, in der, wie seit 1975 bekannt, die β -Oxidation stattfindet (Pande, 1975; Ramsay and Tubbs, 1975). Diese Translokase katalysiert mit einem *ping-pong*-Mechanismus den 1:1-Austausch von Acyl-L-carnitin gegen L-Carnitin und einen viel langsameren, unidirektionalen Transport des L-Carnitins. Dieser führt zu einer Äquilibration der L-Carnitin-Konzentration über die innere mitochondriale Membran (Indiveri et al., 1994; Kunau et al., 1995; Eaton et al., 1996; Tonazzi et al., 2009).

Das humane Gen, welches für das 32,9 kDa große Protein mit 301 Aminosäuren kodiert, konnte dem Chromosom 3p21.31 zugeordnet werden (Rubio-Gozalbo et al., 2004).

1.2.4. CPT II

Der letzte Schritt im CPT-System wird durch CPT II (EC 2.3.1.21) katalysiert. Nach dem Transport in die mitochondriale Matrix erfolgt in dieser Reaktion die Rückwandlung der Acyl-L-carnitin-Ester zu den entsprechenden Acyl-CoAs. Diese dienen direkt als Substrate für die Oxidation (Kerner and Hoppel, 2000).

Im Gegensatz zu CPT I ist CPT II das Produkt eines einzelnen Gens (Sigauke et al., 2003). 1990 wurde die cDNA von CPT II in der Ratte identifiziert (Woeltje et al., 1990b). Im Anschluss erfolgte zeitnah auch die Isolierung der entsprechenden humanen cDNA (Finocchiaro et al., 1991). Das kodierende Gen *CPT2* (Erstbeschreibung *CPT1*) konnte dem Chromosom 1p32 zugeordnet werden (Gellera et al., 1994). Es ist circa 20 kb groß und besteht aus fünf Exons (zwischen 81 bp und 1305 bp lang), die durch vier Introns variierend von 1,5 kb bis 8 kb Länge separiert werden (Woeltje et al., 1990b). Das Gen hat einige sehr ungewöhnliche Eigenschaften. Als Beispiel sind die Kodierung von mehr als der Hälfte aller translatierten Sequenzen des Gens durch Exon 4 (1305 bp) und ein ungewöhnlich langes Intron 3 (≈ 8 kb) zu nennen (Verderio et al., 1995).

1.2.5. Substrate der CPT-Enzyme

Die Substrate der CPT-Enzyme im CPT-System, welches den Import von Acyl-CoAs in Mitochondrien vermittelt, sind im Folgenden beschrieben:

1.2.5.1. L-Carnitin

L-Carnitin (Trimethyl-hydroxybutyrobetain; (R)-(3-Carboxy-2-hydroxypropyl)-N,N,N-trimethylammoniumhydroxid, Abb. 1.2) ist für den Transport von langkettigen Fettsäuren in das innere mitochondriale Kompartiment erforderlich, in dem die β -Oxidation stattfindet. Der Bedarf an L-Carnitin kann sowohl aus exogenen Quellen als auch durch die Biosynthese in der Leber gedeckt werden (Kendler, 1986). Etwa 75 % davon kann unter normalen Bedingungen aus tierischen, nicht aber aus pflanzlichen Lebensmitteln gewonnen werden (Vladutiu, 2001).

1. Einleitung

L-Carnitin wird auch endogen aus beiden essentiellen Aminosäuren Lysin und Methionin synthetisiert. Die Enzyme für die verschiedenen Schritte der L-Carnitinbiosynthese sind mit Ausnahme des letzten Enzyms, der γ -Butyrobetain-Hydroxylase, ubiquitär (McGarry et al., 1989). Die Synthese von L-Carnitin findet vor allem in der Leber und in geringerem Ausmaß in der Niere und im Gehirn statt. Die menschliche Skelett- und Herzmuskulatur enthält relativ hohe Konzentrationen an L-Carnitin, das sie aus dem Plasma bezieht (Kendler, 1986; Vladutiu, 2001).

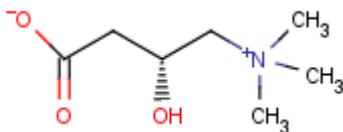


Abb. 1.2. Die chemische Struktur des L-Carnitins

1.2.5.2. Coenzym A (CoA)

CoA fungiert als Acyl-Gruppen-Träger und Carbonyl-aktivierende Gruppe in einer Reihe von biochemischen Prozessen (Leonardi et al., 2005). Anders als die meisten Cofaktoren, die ihre Wirkung durch die Bindung an ein einzelnes Enzym entfalten, vermittelt CoA als diffusionsfähiger Träger von Acylgruppen die Verbindung einer Enzym-katalysierten Reaktion mit einer anderen (Mishra and Drueckhammer, 2000).

CoA-Ester sind an vielen grundlegenden Prozessen, wie der Biosynthese und dem Abbau von Fettsäuren im Citratzyklus beteiligt. Etwa vier Prozent der bekannten Enzyme nutzen CoA als einen obligatorischen Cofaktor. CoA ist in über hundert verschiedenen Reaktionen im intermediären Stoffwechsel beteiligt (Mishra and Drueckhammer, 2000; Leonardi et al., 2005).

Wegen der Entdeckung von CoA 1945 (Lipmann, 1945) und der Lösung seiner Struktur im Jahre 1953 (Baddiley et al., 1953) wurde Lipmann mit dem Nobelpreis 1953 ausgezeichnet.

Wie in der Abbildung 1.3 schematisch dargestellt, besteht CoA aus 3'-Phospho-Adenosin und Pantethein, die durch eine Pyrophosphat-Gruppe verknüpft sind (Mishra and Drueckhammer, 2000).

1. Einleitung

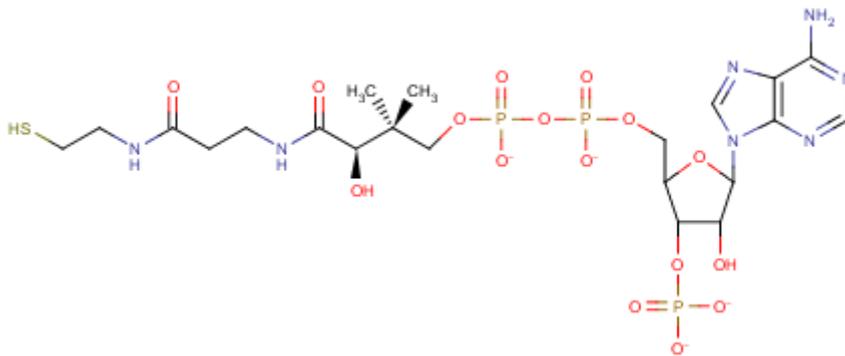


Abb. 1.3. Die chemische Struktur des CoAs

Die Biosynthese von CoA aus Pantothersäure (Vitamin B5) ist ein wesentlicher universeller Stoffwechselweg in Prokaryoten und Eukaryoten (Daugherty et al., 2002).

Viele Bakterien sowie Pflanzen und Hefen sind in der Lage, eine *de novo* Biosynthese von CoA durchzuführen. Im Gegensatz dazu fehlt bei Tieren und einigen pathogenen Mikroben ein solcher Stoffwechselweg, was sie völlig abhängig von exogenem Vitamin B5 macht. Vitamin B5-Mangel in Säugetieren kann während der neonatalen und pränatalen Phase viele systemische Effekte wie gestörte motorische Reaktionen, verändertes Wachstum und modifizierte Reifung des Dünndarms sowie erhöhte pränatale Mortalität verursachen (Daugherty et al., 2002).

1.2.5.3. Acyl-L-carnitine

L-Carnitin und Acyl-L-carnitine enthalten quartäre Aminogruppen sowie Carboxylgruppen. Demzufolge besitzen diese zwitterionischen Substanzen in wässriger Lösung einen neutralen pH-Wert. Das CPT-System steuert die Umwandlung zwischen Acyl-CoAs und Acyl-L-carnitinen und deren Fluss in die innere Matrix. Acyl-L-carnitine sind in Peroxisomen als Produkte der partiellen Oxidation von LCFAs und VLCFAs vorhanden. Die mittelkettigen Acyl-L-carnitine können auch durch den partiellen Abbau der sehr langkettigen gesättigten Fettsäuren im Inneren der Peroxisomen gebildet werden. Diese werden direkt durch eine individuelle Translokase in die innere Mitochondrienmembran transportiert (Ho et al., 2002).

1.2.5.3.1. Klinische Aspekte der Acyl-L-carnitine

L-Carnitin hat eine amphiphile Struktur, so dass es sich sehr mobil in der gesamten Zelle bewegen kann. Die freie Hydroxylgruppe hat das Potenzial, an viele verschiedene Moleküle zu binden. Das daraus resultierende breite Spektrum von möglichen Acyl-L-carnitinen hat sowohl chemisch als auch metabolisch sehr unterschiedliche Eigenschaften (Jones et al., 2010; Traina, 2011).

Diese Eigenschaft macht Acyl-L-carnitine zum einzigartigen Indikator für metabolische Veränderungen, insbesondere für Krankheitszustände (Jones et al., 2010; Traina, 2011).

Die Analyse des Acyl-L-carnitin-Spektrums mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS / MS) von Trockenblutproben gehört zum Neugeborenen-*screening* und wird zur Identifizierung angeborener Stoffwechselstörungen verwendet. Wichtige Beispiele (Tabelle 1.1) sind Störungen der Oxidation von Fettsäuren, Defekte wie langkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (VLCAD) und Störungen des Stoffwechsels organischer Säuren, wie Propionyl-CoA-Carboxylase-Mangel. Diese Analyse kann ebenfalls ein nützlicher Indikator für andere Krankheitsbilder, wie Colitis ulcerosa und Diabetes sein (Jones et al., 2010). Einen Überblick über ein verändertes Acyl-L-carnitin-Spektrum im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten bietet Tabelle 1.1.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Acyl-L-carnitine sind in Abbildung 1 im Anhang aufgelistet.

1.2.5.3.2. Pharmazeutische Bedeutung von Acyl-L-carnitinen

L-Carnitin und Acyl-L-carnitine werden als natürliche und wirksame Mittel zur Verbesserung der gastrointestinalen Resorption eingesetzt. Sie sind in Kombination mit einer Vielzahl von chemisch unterschiedlichen Medikamenten effektiv und erhöhen die Absorption der Wirkstoffe ohne deutliche Veränderungen der Schleimhaut-Struktur (Fix et al., 1986).

1. Einleitung

Tabelle 1.1. Zusammenhang von angeborenen Fettsäureoxidationsstörungen mit dem Blut-Acyl-L-carnitin-Spektrum aus (Rinaldo et al., 2002; Rinaldo et al., 2008; Jones et al., 2010; Laforet and Vianey-Saban, 2010; Vorgerd and Deschauer, 2013).

Fettsäureoxidationsstörungen	Acyl-L-carnitin-Veränderungen
primärer L-Carnitin-Mangel	LC ↓
sekundärer L-Carnitin-Mangel	
SCACD-Mangel	C4 ↑
MCACD-Mangel	C6 ↑, C8 ↑, C10 ↑, C10:1 ↑
trifunktionaler Proteindeфект (Defekt der <i>long-chain-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase</i> , <i>long-chain-2-Enoyl-CoA-Hydratase</i> und <i>long-chain-3-Ketoacyl-Thiolase</i>)	C16-OH ↑, C16:1-OH ↑, C18-OH ↑, C18:1-OH ↑
VLCACD-Mangel	C14 ↑, C14:1 ↑, C14:2 ↑
multipler Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (Glutaracidurie Typ 2, MADD)	C4-C18:1 ↑
CPT I-Mangel	LC ↑, C16 ↓, LC 18↓
CPT II-Mangel	C16 ↑, C18 ↑, C18:1 ↑, C18:2 ↑
CACT-Mangel	C16 ↑, C18 ↑, C18:1 ↑, C18:2 ↑

1.2.6. Mechanismus der Reaktion der CPT-Enzyme

In der Arbeit von KNAPE (Knape, 2012) wird vermutet, dass dem Mechanismus, durch den die CPT-Enzyme die Umesterung zwischen Palmitoyl-CoA und L-Carnitin katalysieren, ein *ping-pong*-Mechanismus zugrunde liegen könnte. Bei einem *ping-pong*-Mechanismus reagiert das Enzym zunächst mit einem Substrat, was zur Bildung eines kovalent modifizierten Enzyms und der Freisetzung von Produkt „P“ führt (Beard and Qian, 2008).

Das Enzym in diesem Zustand reagiert dann mit einem zweiten Substrat und wird zu einem unmodifizierten Enzym zurückgewandelt. Eine schematische Darstellung für diesen Mechanismus ist in Abbildung 1.4 zu sehen.

1. Einleitung

Daraus ergibt sich, dass durch die Bindung des ersten Substrates (hier Palmitoyl-CoA) das Enzym modifiziert wird und ein so genanntes „Intermediat“ entsteht. Anschließend führt die Aufnahme des zweiten Substrates (hier L-Carnitin) zur Freisetzung des Palmitoyl-L-carnitins als Produkt.

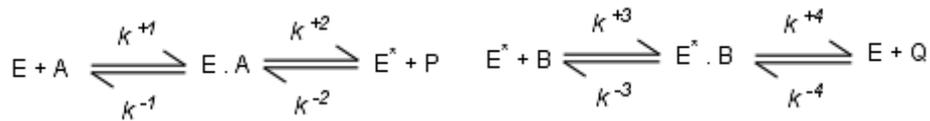


Abb. 1.4. Die schematische Darstellung eines *ping-pong*-Mechanismus. E und E* stehen für freies (ungebundenes) bzw. substituiertes Enzym. A und B stellen die Substrate dar. P und Q stellen das erste bzw. das zweite Substrat dar. E.A und E*.B stellen die Komplexbildung zwischen Enzym und dem Substrat A bzw. Substrat B dar. *k* stellt die Geschwindigkeitskonstante dar.

Es konnte ebenfalls bewiesen werden, dass eine Einsubstrat-Reaktion bei einer alleinigen Zugabe von Palmitoyl-CoA möglich ist, was ebenfalls für die These eines *ping-pong*-Mechanismus spricht. Dabei wird in Gegenwart von Wasser der gespaltete CoA-Teil nicht auf L-Carnitin, sondern auf das Wassermolekül übertragen (Knape, 2012). Die Bildung des Acyl-Enzym-Intermediats konnte allerdings nicht bewiesen werden.

Zur Erklärung des CPT II-Verhaltens könnte ebenfalls der *compulsory order ternary-complex* (sequenzieller bi-bi-Mechanismus) in Frage kommen.

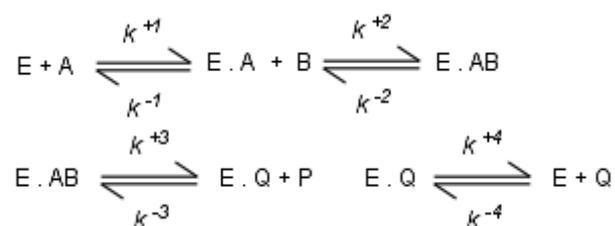


Abb. 1.5. Schematische Darstellung des sequenziellen bi-bi-Mechanismus. E steht für freies (ungebundenes) Enzym. A und B stellen die Substrate dar. P und Q stellen das erste bzw. das zweite Substrat dar. E.A stellt die Komplexbildung zwischen Enzym und der Spezies A dar. E-AB ist der ternäre Substrat-Enzym Komplex. E.Q stellt den Komplex zwischen Enzym und Spezies Q. dar. *k* stellt die Geschwindigkeitskonstante dar.

Wie es in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt wurde, binden bei diesem Mechanismus zwei Substrate (Palmitoyl-CoA und L-Carnitin) in einer geordneten Weise an ein Enzym. Dadurch werden zwei Produkte in einer ebenso geordneten Form dissoziieren.

„bi-bi“ bezeichnet eine Zwei-Substrat-, Zwei-Produkt Reaktion. Der Begriff „*ternary*“ bezieht sich auf den Dreispezies-Komplex, der durch die gleichzeitige Bindung von zwei Substraten an ein Enzym gebildet wird (Storey, 2004; Beard and Qian, 2008).

1.2.7. Hemmstoffe der CPT II-Enzyme

1.2.7.1. Malonyl-CoA

Malonyl-CoA kann in Mitochondrien, Peroxisomen und im Zytosol von Säugerzellen synthetisiert werden. Neben seiner wichtigen Funktion als Zwischenprodukt bei der *de novo* Fettsäuresynthese spielt es eine entscheidende Rolle in der Regulation der CPT I-Aktivität bei der Fettsäureoxidation (Saggerson, 2008).

Die Konzentration von Malonyl-CoA im Gewebe wird durch die Synthese von Acetyl-Coenzym A-Carboxylase (ACC) und durch seine Abbaugeschwindigkeit durch Malonyl-Coenzym A-Decarboxylase (MCD) bestimmt (Hamilton and Saggerson, 2000; Sambandam et al., 2004).

In adipogenen Geweben wie der Leber und weißem Fettgewebe erzeugt ACC nach der Nahrungsaufnahme zytoplasmatisches Malonyl-CoA als Vorläufer für die Fettsäuresynthese. Dieser zytoplasmatische *pool* von Malonyl-CoA wird durch die Fettsäure-Synthetase (FAS) verbraucht. Allerdings produzieren auch die nichtadipogenen Gewebe, wie Herz- und Skelettmuskel, durch Katalyse von ACC signifikante Mengen an zytoplasmatischem Malonyl-CoA. Die hemmende Wirkung von Malonyl-CoA auf CPT I in diesen Geweben ist ca. 100-fach höher als in der Leber (Sacksteder et al., 1999).

ACCs (EC 6.4.1.2.) sind biotinabhängige Enzyme, die am Fettsäureoxidationsprozess beteiligt sind. Zwei humane Isoformen von ACC wurden identifiziert: ACC1 oder ACC α und ACC2 oder ACC β . Trotz der gleichen enzymatischen Funktionen werden diese Enzyme durch separate Gene kodiert und spielen unterschiedliche Rollen bei der Fettsäureoxidation (Jung et al., 2012).

ACC1 (265 kDa) ist hauptsächlich in den lipogenen Geweben, wie Leber und den Fettgeweben lokalisiert. ACC2 (280 kDa) wird in erster Linie in Geweben wie Le-

1. Einleitung

ber, Herz und Skelettmuskulatur synthetisiert. Außerdem wurde gezeigt, dass ACC1 ein cytosolisches und ACC2 ein Mitochondrien-assoziiertes Protein ist (Abu-Elheiga et al., 1997; Abu-Elheiga et al., 2000).

Die beiden Isoformen haben ähnliche Aminosäuresequenzen mit einer etwa 80 %igen Identität. Verglichen mit ACC1, hat ACC2 circa 140 zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus. Es wird vermutet, dass durch diesen Teil die Bindung an der äußeren Mitochondrienmembran und damit die Steuerung der Malonyl-CoA-Konzentration nahe der Malonyl-CoA-Bindungsstelle ermöglicht wird (Saggerson, 2008).

Das von ACC1 generierte Malonyl-CoA wird durch FAS für die Synthese der Fettsäuren im Cytosol verwendet. Im Gegensatz dazu fungiert das von ACC2 generierte Malonyl-CoA als Inhibitor der CPT I. Die durch ACC1 und ACC2 erzeugten Malonyl-CoA-Moleküle mischen sich nicht innerhalb der Zelle (Saggerson, 2008; Wakil and Abu-Elheiga, 2009).

Fasten oder Diabetes unterdrückt die Expression der Carboxylase-Gene und führt zu einer Verringerung der Aktivität der ACC-Enzyme. Bei einer Wiederaufnahme der Nahrungszufuhr hingegen, insbesondere nach einer kohlenhydratreichen, fettfreien Diät, wird die Synthese dieser Enzyme induziert und ihre Aktivität steigt (Wakil and Abu-Elheiga, 2009).

Der *knockout* des ACC2-Gens in Mäusen, $ACC2^{-/-}$, führt zu einem nichtletalen Phänotyp mit erhöhter β -Oxidation in Leber und Muskeln. Diese Tiere sind im Vergleich zu den Wildtyp-Kohorten schlank und resistent gegen Übergewicht und Diät-induzierter Diabetes. In diesem Fall zeigt sich im Muskel ein verringerter Malonyl-CoA-Gehalt, während das hepatische Malonyl-CoA unverändert bleibt (Abu-Elheiga et al., 2005; Saggerson, 2008).

Bei der Paarung von $ACC1^{-/-}$ -*knockout*-Mäusen, konnten jedoch keine lebensfähigen Embryonen erzeugt werden. Die heterozygoten mutierten Mäuse ($ACC1^{+/-}$) zeigten dagegen eine normale Fruchtbarkeit und Lebensdauer. Das Körpergewicht dieser Mäuse ähnelte ebenfalls ihren Wildtyp-Kohorten. Das ist eine Bestätigung für die Notwendigkeit der ACC1 für die Entwicklung gesunder, lebensfähiger Mäuseembryonen (Abu-Elheiga et al., 2005).

1. Einleitung

Malonyl-CoA kann darüber hinaus zu einem geringen Teil in Mitochondrien mittels Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC) aus Acetyl-CoA hergestellt werden (Lopaschuk et al., 1994; Saggerson, 2008).

Die Malonyl-CoA-Decarboxylase (MCD, MLYCD, EC 4.1.1.9) katalysiert den Abbau von gebildetem Malonyl-CoA in Mitochondrien und Peroxisomen:



Durch den Abbau von Malonyl-CoA erhöht MCD die Fettsäureoxidation (Saggerson, 2008).

Die MCD zeigt eine Gewebe-spezifische Expression. Das Enzym hat hohe Expressionsgeschwindigkeit im Skelett- und Herzmuskel, sowie in Leber, Niere und Fettgewebe. MCD zeigt eine breite intrazelluläre Verteilung, einschließlich Zytoplasma, Mitochondrien und Peroxisomen (Sacksteder et al., 1999; Voilley et al., 1999).

Eine Zusammenarbeit von MCD und ACC sorgt vermutlich für die Regulierung des *pools* von Malonyl-CoA (Saggerson, 2008).

Malonyl-CoA-Decarboxylase-Mangel (MCD-Mangel, OMIM 248360), auch als Malon-Acidurie bezeichnet, ist eine selten vorkommende, autosomal-rezessive Erkrankung. Diese führt durch Ausscheidung von überschüssigen Malon- und Methylmalonsäuren im Urin zu metabolischer Azidose, zu Entwicklungsverzögerung, Epilepsie, Hypoglykämie, Kardiomyopathie und zu geistiger Behinderung. Die Erkrankung kann in ihren schweren Formen zum neonatalen Tod führen (Sacksteder et al., 1999; Xue et al., 2012).

Der MCD-Mangel führt zu einer Akkumulation des Malonyl-CoAs und dadurch zu einer Hemmung der CPT I. Dieser verhindert den Eintritt von cytoplasmatischem Acyl-CoA in die Mitochondrien und Peroxisomen und verringert die β -Oxidation von Fettsäuren (Xue et al., 2012).

Bei MCD-Mangel-Fällen wurde von einer Erhöhung der Malonsäure-Konzentration im Urin berichtet. Ein Teil von dem durch MCD-Mangel in den Mitochondrien ak-

1. Einleitung

kumulierten Malonyl-CoA kann durch CPT II zu Malonylcarnitin umgesetzt werden. Ein anderer Teil wird zu freiem L-Carnitin hydrolysiert. Das kann zur Ausscheidung von Malonsäure und Malonylcarnitin führen (Abu-Elheiga et al., 2005).

1.2.7.2. Malonsäure

Malonsäure ist ein kompetitiver Inhibitor der Succinat-Dehydrogenase (SDH). SDH ist ein mitochondriales Enzym, das eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel spielt. Es ist sowohl am Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus als auch bei der oxidativen Phosphorylierung beteiligt (Greene and Greenamyre, 1995).

Aus Malonyl-CoA entstehen mit Hilfe der kurzkettigen Acyl-CoA-Hydrolase Malonsäure und CoA (Abb. 1.6).

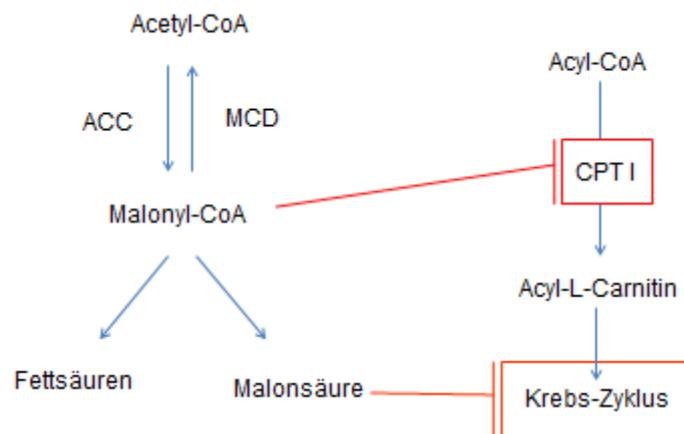


Abb. 1.6. Malonsäure als TCA-Zyklus-Hemmer, verändert nach XUE et al., 2012.

Malonsäure verhindert als ein TCA-Zyklus-Hemmer in den Zellen die ATP-Produktion durch Oxidation (Abb. 1.6). Zur Kompensation werden die Zellen zu einer Erhöhung der Glykolyse angeregt. (Xue et al., 2012).

1.3. Fettsäure-Stoffwechselstörungen

Wie zuvor bereits beschrieben, stellen die langkettigen Fettsäuren eine wichtige Energiequelle dar, insbesondere für das Herz, die Leber und die Muskeln. Sie werden als bevorzugtes Substrat im Myokard im Ruhezustand und bei länger andauernder körperlicher Belastung in den Skelettmuskeln gebraucht (Demaugre et al., 1991). Ketonkörper, die in der Leber bei der Oxidation der langkettigen Fettsäuren produziert werden, können im Gehirn die Glukose ersetzen und damit die Aufrechterhaltung der Normoglykämie gewährleisten. Zusätzlich verhindern die Ketonkörper den Abbau von Muskelprotein zum Zweck der Glukoneogenese (McGarry and Foster, 1980).

Die wichtigsten Fettsäure-Stoffwechselstörungen mit Beteiligung des CPT II-Systems werden folgend aufgelistet:

1.3.1. L-Carnitin-Mangel

L-Carnitin-Mangel ist eine Form der Fettstoffwechselstörung.

Die L-Carnitin-Mangel-Syndrome können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: eine überwiegend myopathische und eine systemische Form (Karakoç et al., 2006).

Die meisten Patienten, bei denen die Diagnose einer Myopathie mit L-Carnitin-Mangel gestellt wurde, leiden unter Folgen anderer Erkrankungen (Uziel et al., 1995; Eaton et al., 1996).

Der Mangel an L-Carnitin im Muskel ist durch eine Muskelschwäche und Lipidspeicherung in den Muskeln, mit normalem Serum- und niedrigem Muskel-L-Carnitinspiegel charakterisiert (Karakoç et al., 2006).

Die Ursache für den myopathischen L-Carnitin-Mangel bei diesen Krankheiten ist wahrscheinlich die Akkumulation von Metaboliten in den Mitochondrien, die mit L-Carnitin reagieren können. Dies führt zu einer Reduktion von freiem L-Carnitin und einem erhöhten renalen Verlust von L-Carnitin-Estern. In der Pathogenese einer Reihe von Erbkrankheiten und erworbenen Erkrankungen kann dieser Mechanismus eine Rolle spielen. Hier sind beispielsweise die organischen Azidurien sowie

Defekte in der Atmungskette zu nennen. Auch Hämodialyse-Patienten, Frühgeborene und Patienten, die über längere Zeit mittels totaler parenteraler Ernährung ohne L-Carnitinsupplementierung versorgt wurden, tragen ein erhöhtes Risiko für ein L-Carnitin-Mangel-Syndrom. Darüber hinaus wurde über medikamentös ausgelöste Fälle bei der Einnahme von Valproat, Cyclosporin oder Pivampicillin berichtet. Diese werden als sekundärer L-Carnitin-Mangel bezeichnet (Uziel et al., 1995; Eaton et al., 1996; Magoulas and El-Hattab, 2012).

In Gegensatz zu den sekundären L-Carnitin-Mangel-Situationen kann der seltene primäre systemische L-Carnitin-Mangel nur im Falle eines Defekts im OCTN2-Gen (SLC22A5) vorkommen (Rinaldo et al., 2002). Hierbei handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung (Schimmenti et al., 2007).

Die systemische Form des L-Carnitin-Mangels manifestiert sich meistens im Säuglings- oder Kindesalter als Intoleranz gegenüber Fasten, Hypoglykämie, wiederkehrende Episoden hepatischer Enzephalopathie sowie Muskelschwäche, progressive Kardiomyopathie und plötzlicher Tod. Eine erniedrigte Konzentration von L-Carnitin in Muskel, Leber und Serum sowie eine Lipidspeicherung in Muskel, Leber und Herz können nachgewiesen werden (Rinaldo et al., 2002; Karakoç et al., 2006).

Ein L-Carnitin-Mangel, der wegen eines genetischen Defekts in der L-Carnitin-Synthese eintritt, wurde bisher nicht beschrieben (Karakoç et al., 2006).

1.3.1.1. Diagnose des L-Carnitin-Mangels

Ein verminderter muskulärer, kardialer und hepatischer L-Carnitingehalt kann auf einen L-Carnitin-Mangel hinweisen. Dieser Mangel führt meistens ebenfalls zu einer Verminderung des L-Carnitingehaltes im Serum (Jerusalem and Zierz, 2003). Eine direkte molekular-genetische Untersuchung des OCTN2-Gens kann die Diagnose bestätigen (Rinaldo et al., 2002).

1.3.1.2. Therapie des L-Carnitin-Mangels

Eine Standardtherapie des L-Carnitin-Mangels ist noch nicht vorhanden. Allerdings reagieren die Patienten gut auf eine orale L-Carnitinsupplementierung (ab 100 mg / kg / Tag). Bei frühzeitigem Beginn können die Organfolgeschäden und Kardiomyopathien verhindert werden. Die L-Carnitindosis sollte für jeden Patienten durch serielle Messungen des Plasma-L-Carnitin-Gehaltes individuell angepasst werden (Longo et al., 2006; Schimmenti et al., 2007).

1.3.2. CACT-Mangel

Seit der ersten Beschreibung des CACT-Mangels (OMIM 212138) im Jahr 1992, wurden nur wenige Fälle dokumentiert (Eaton et al., 1996).

Die meisten publizierten Fälle von CACT-Mangel hatten einen schweren klinischen Phänotyp, mit Kardiomyopathie und Tod im frühen Kindesalter (Longo et al., 2006). Viele Patienten mit dieser Störung sterben aufgrund chronisch progressiven Leberversagens, an nichtreversiblen Hyperammonämien, an hypertrophen Kardiomyopathien oder septalen Herzfehlern. Myopathien sind ebenfalls charakteristisch. Eine Hypoglykämie ist selten beschrieben worden (Stanley et al., 1992; Rinaldo et al., 2002).

Es wurden allerdings auch einige Patienten mit einem milderem Verlauf beschrieben (Morris et al., 1998). In diesen Fällen werden mildere Attacken wie bei anderen Fettsäureoxidationsdefekten durch Fieber, Infektionen und Fasten ausgelöst (Longo et al., 2006).

1.3.2.1. Diagnose des CACT-Mangels

Die Diagnose wird anhand des abnormen Acylcarnitin-Profiles im Plasma mit extrem reduziertem freiem L-Carnitin und erhöhtem C16-C18 (Palmitoyl-L-carnitin und Stearoyl-L-carnitin) gestellt. Dieses abnorme Profil ist allerdings nicht unterscheidbar von dem eines CPT II-Mangels. Deswegen wird ein direkter Assay der Carnitin/Acylcarnitin-Translokase-Aktivität in Fibroblasten zur diagnostischen Bestätigung benötigt.

1. Einleitung

Molekulargenetische Untersuchungen zur Identifizierung von Mutationen im kodierenden Gen auf Chromosom 3p21 können die Diagnose klären (Longo et al., 2006).

1.3.2.2. Therapie des CACT-Mangels

Der therapeutische Ansatz während des akuten Zustands umfasst die intravenöse Glukoseinjektion (\pm Insulin) zusammen mit anderen unterstützenden Maßnahmen in Abhängigkeit von den klinischen Symptomen.

Die langfristige Basistherapie umfasst die Vermeidung von Fasten mit häufigen Mahlzeiten und einer speziellen Diät. Die Ernährung in dieser Krankheit (wie bei anderen langkettigen Fettsäurestörungen) soll normokalorisch und reich an Kohlenhydraten sein sowie einen normalen Proteingehalt haben. Langkettige Fettsäuren sollen durch mittelkettige Fettsäuren ersetzt werden (Rubio-Gozalbo et al., 2004).

1.3.3. CPT I-Mangel

Drei gewebespezifische Isoformen der CPT I sind bekannt: die Leber-Isoform (L-CPT I), Die Muskel-Isoform M-CPT I und die Gehirn-Isoform (B-CPT I).

1.3.3.1. L-CPT I-Mangel

Der selten vorkommende L-CPT I-Mangel (OMIM 255120) führt zu einem Versagen der Bildung von Acyl-L-carnitin und somit zu einer geringen oder völlig fehlenden Aufnahme von LCFA in die Mitochondrien für die β -Oxidation. Über einen Defekt in L-CPT I wurde erstmals 1981 berichtet (Bougneres et al., 1981). Betroffene mit diesem angeborenen Mangel der Fettsäure-Oxidation weisen schwere metabolische Störungen auf, wie etwa eine hypoketotische Hypoglykämie und Fettleber. Die betroffenen Kinder zeigen meist einen veränderten mentalen Status und eine Hepatomegalie. Die Symptome werden in der Regel durch Fasten oder virale Erkrankungen ausgelöst (Nyman et al., 2005; Longo et al., 2006). Bei dieser Er-

krankung sind Männer und Frauen gleichermaßen betroffen (Bondefont et al., 2004).

Normalerweise liegt bei L-CPT I-Mangel keine Herzbeteiligung vor; es wurde allerdings auch von Fällen mit leichter Kardiomegalie oder anderen Herzerkrankungen berichtet (Tein et al., 1989).

1.3.3.1.1. Diagnose des L-CPT I-Mangels

Laborergebnisse verweisen auf eine nichtketotische Hypoglykämie, eine milde Hyperammonämie, erhöhte Leberwerte und erhöhte freie Fettsäuren (Tabelle 1.1). In den organischen Säuren des Urins konnten geringe Spuren von Ketonen nachgewiesen werden. Bei einigen Patienten konnten während der akuten Attacken erhöhte CK-Werte nachgewiesen werden (Longo et al., 2006).

Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS / MS) kann ein CPT I-Mangel beim Neugeborenen-*screening* identifiziert werden. Obwohl bei dieser Krankheit der Plasma-L-Carnitin-Gehalt oft erhöht ist, ermöglicht vor allem ein erhöhtes Verhältnis zwischen freiem L-Carnitin (C0) und der Summe von Palmitoyl-L-carnitin und Stearoyl-L-carnitin (C16+C18) die differentialdiagnostische Abgrenzung zu Fällen von exogener L-Carnitin Supplementation (Longo et al., 2006).

Eine Aktivitätsmessung der CPT I in Fibroblasten oder im Muskelhomogenat kann die Diagnose bestätigen. Die Enzym-Aktivität liegt bei diesen Patienten im Bereich von 5-20 % der Kontrollwerte (Bondefont et al., 2004). Alternativ kann gezielt mit molekular-genetischen Methoden nach den bekannten Mutationen der CPT I-L gesucht werden.

1.3.3.1.2. Therapie

Eine Diät reich an Glucose und mittelkettigen Fettsäuren sowie das Vermeiden von Fasten kann für Patienten mit einem CPT I-Mangel hilfreich sein, um Attacken vorzubeugen (Bondefont et al., 2004).

1.3.3.2. M-CPT I- und B-CPT I-Mangel

Angesichts der Bedeutung der M-CPT I für die Herzfunktion ist der Verlust der M-CPT I wahrscheinlich letal. Dies könnte der Grund dafür sein, dass nach heutigem Wissen kein Patient mit einem Mangel dieser Isoform nachgewiesen werden konnte. Es wurde ebenfalls über keinen B-CPT I-Mangel berichtet (Bonfont et al., 2004).

1.3.4. CPT II-Mangel

Da es in der vorliegenden Arbeit um die Charakterisierung der humanen CPT II geht, werden in diesem Abschnitt die Folgen des Defekts umfassend dargestellt.

Seit der Erstbeschreibung des CPT II-Mangels durch DIMAURO und DIMAURO (DiMauro and DiMauro, 1973) wurden mehrere Fälle dieses Defekts beschrieben. Aufgrund der größeren Prävalenz und der steigenden Inzidenz des CPT II-Mangels in der letzten Zeit wird dieser Defekt als die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des Lipidstoffwechsels und die häufigste Ursache der erblichen Myoglobinurie angesehen (McGarry and Brown, 1997). Die CPT II-Defekte lassen sich in drei verschiedene Phänotypen unterteilen: die neonatale Form, die systemische infantile / juvenile Form und die mildere muskuläre adulte Form (Bonfont et al., 2004). Sowohl das Alter zum Zeitpunkt der Symptommanifestation, als auch die Beteiligung der Organe sollten bei der Einstufung berücksichtigt werden (Isackson et al., 2008).

1.3.4.1. Die neonatale Form des CPT II-Mangels

Der neonatale Phänotyp des CPT II-Mangels (OMIM 608836) scheint schwerwiegender ausgeprägt zu sein als die infantile Form der Krankheit (Bonfont et al., 2004). Er zeigt nämlich neben den Symptomen der infantilen Krankheit auch Dysmorphien, wie Mikrozephalie, Fehlbildungen der Nieren und des Gehirns und periventrikuläre Verkalkungen (Isackson et al., 2008).

Mehrere Fälle des plötzlichen Todes wurden während der ersten Lebensmonate beschrieben. Das frühzeitige Auftreten von Fehlentwicklungen liefert den Hinweis

für einen möglichen pränatalen Beginn der Krankheit. Es gibt einige Berichte über eine Früherkennung dieser Abnormitäten durch den pränatalen Ultraschall (Witt et al., 1991; Bonnefont et al., 2004).

Die neonatale Form präsentiert sich kurz nach der Geburt (einige Stunden bis 4 Tage) mit Atemnot, Krämpfen, Bewusstseinsstörungen, Hepatomegalie, Kardiomegalie, einer nicht-ketotischen Hypoglykämie, Herzrhythmusstörungen, Nierendysgenese und Defekten in der neuronalen Migration (Longo et al., 2006).

1.3.4.2. Die infantile Form des CPT II-Mangels

Die schwere infantile Ausprägung des CPT II-Mangels (OMIM 600649) ist auch als die hepatocardiomuskuläre Form des CPT II-Mangels bekannt. Bei dieser Krankheit treten Symptome wie hypoketotische Hypoglykämie, erhöhte Leberenzyme, Hepatomegalie, Herzfehler, Lethargie, Erbrechen und Krämpfe auf (Isackson et al., 2008).

1.3.4.3. Die adulte Form des CPT II-Mangels

Der muskuläre Phänotyp (OMIM 255110) ist die häufigste klinische Ausprägung des CPT II-Mangels. Dieser manifestiert sich vorwiegend im frühen Erwachsenenalter von unter 30 Jahren, kann sich aber auch schon im Kleinkindalter bemerkbar machen. Eine Erstmanifestation nach dem 40. Lebensjahr wurde nur sehr selten beschrieben. Die Symptomatik besteht meist aus rezidivierenden Attacken von nicht persistierenden Paresen, wiederkehrenden Episoden von Myalgien, Muskelschmerzen, Rhabdomyolyse und Myoglobinurie.

Als Trigger kommen oft schwere körperliche Belastung, Fasten und mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit Kälte, Infektionen und emotionaler Stress in Frage. Es wurde aber auch über medikamentös ausgelöste Attacken, z. B. bei der Einnahme von Ibuprofen (Ross and Hoppel, 1987), sehr hohen Dosen von Diazepam (Woeltje et al., 1990a), Valproat-Natrium (Katsuya et al., 1988) oder durch eine Vollnarkose (Vladutiu et al., 2002a) berichtet. Die wiederkehrenden Anfälle und Muskelsteifheit oder –schwäche sind oft mit Myoglobinurie verbunden. Die Dauer

der Attacken kann von einigen Stunden bis zu mehreren Wochen variieren. Die Häufigkeit ist ebenfalls sehr variabel. Der klinische Zustand der Betroffenen zwischen den Anfällen bleibt normal (zusammenfassende Darstellung bei Bonnefont et al., 1999).

1.3.4.4. Mutationen, die mit CPT II-Mangel assoziiert sind

Bisher wurden mehr als 70 Mutationen in dem Gen *CPT2* identifiziert, die zu der adulten, infantilen oder neonatalen Form des CPT II-Mangels führen. Der Austausch eines Serins gegen ein Leucin an der Aminosäureposition 113 des CPT II-Proteins (S113L) (Taroni et al., 1993) konnte in etwa 90 % der in unserer Klinik untersuchten Fälle (Allelfrequenz 60 %) festgestellt werden (Joshi et al., 2014). An zweiter Stelle, mit einer Allelfrequenz von 6,5 %, liegt die Mutation P50H vor (Verderio et al., 1995; Bonnefont et al., 2004).

Die *CPT2*-Null-Mutationen in homozygotem oder *compound*-heterozygotem Zustand zeigten in allen beschriebenen Fällen die schwersten Phänotypen, den tödlichen neonatalen CPT II-Mangel. Die meisten der identifizierten krankheitsauslösenden Mutationen sind allerdings Aminosäure-Substitutionen oder Deletionen (Isackson et al., 2008). Die Auswirkungen solcher *missense*-Mutationen sind unvorhersehbar: Während einige von ihnen die milde muskuläre Form verursachen, führen die anderen zu den schweren, multi-systemischen Formen (Fanin et al., 2012).

Darüber hinaus wurden drei Polymorphismen (V368I, V605L und M647V) beschrieben. Diese verursachen selbst keinen CPT II-Mangel, führen aber im Falle einer Kombination mit anderen *CPT2*-Mutationen zu einer weiteren Minderung der Enzymaktivität (Taroni et al., 1992; Wataya et al., 1998; Bonnefont et al., 2004).

Einen Überblick über die identifizierten Mutationen des humanen *CPT2*-Gens bietet Tabelle 1 im Anhang.

1.3.4.5. Phänotyp-Genotyp-Korrelation

Der CPT II-Mangel präsentiert sich als eine komplexe Erkrankung mit heterogenem Phänotyp (Taroni et al., 1992).

Im Vergleich zur neonatalen und infantilen Form wurde über die sogenannte muskuläre Form viel häufiger berichtet. Es scheint einen Zusammenhang zwischen bestimmten Mutationen und den Krankheitsformen des CPT II-Mangels zu geben. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass einige milde Mutationen, am häufigsten S113L, in ihrem homozygoten Zustand eindeutig mit der adulten Form des CPT II-Mangels assoziiert sind (Taroni et al., 1993). Es konnte ebenfalls ein Zusammenhang mancher anderer Mutationen (z. B. Y628S oder P227L) mit der infantilen hepatocardiomuskulären- bzw. mit der neonatalen Form festgestellt werden (Joshi et al., 2012).

Im Vergleich aller bekannten Mutationen konnte aber der Schweregrad der Krankheit nicht auf bestimmte Genotypen bezogen werden. Die muskuläre Form präsentiert sich klinisch in einem weiten Spektrum. Auf der einen Seite stehen jene Patienten, die wenig oder überhaupt keine Myoglobinurie-Episoden in ihrem Leben erfahren. Auf der anderen Seite stehen jene, die häufig unter rhabdomyolytischen Attacken und deren Folgen, z. B. Niereninsuffizienz zu leiden haben (Fanin et al., 2012).

Bezüglich des Verlaufs der Erkrankung bei Patienten mit *compound*-heterozygotem Genotyp mit einer milden und einer schweren *CPT2*-Mutation ist nur sehr wenig bekannt. Es wurden bei verschiedenen Kombinationen von unterschiedlichen Mutationen bei *compound*-heterozygotem Genotyp variable Phänotypen der CPT II-Mangelerkrankung beobachtet: Die schwere Q413fs-Mutation, die bei homozygotem Vorliegen tödlich sein kann, manifestiert sich klinisch im *compound*-heterozygoten Zustand in Verbindung mit der milden S113L-Mutation als eine adulte Form (Vladutiu et al., 2002a). Es wurde ebenfalls über einen Fall einer *compound*-heterozygoten 413fs-Mutation in Verbindung mit der milden P50H-Mutation berichtet. Diese Kombination führte klinisch zu einem atypischen *lateonset*-infantilen Phänotyp (Vladutiu et al., 2002b). Die milde S113L-Mutation zeigte sich in Kombination mit der schweren Y628-Mutation ebenso als eine intermediäre *lateonset*-infantile Form (Thuillier et al., 2000).

HANDIG et al. haben über vier Cousinsen mit homozygoter S113L-Mutation berichtet. Während drei von ihnen Symptome von CPT II-Mangel zeigten, war eine völlig asymptomatisch. Alle Patienten in dieser Familie konnten auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgeführt werden (Handig et al., 1996).

Störungen des Energiestoffwechsels zeigen generell sogar innerhalb einer Familie erheblich unterschiedliche Symptome bei verschiedenen Patienten. Es wird zunehmend über gleichzeitige Teildefekte in mehr als einem Enzym oder einer Funktion berichtet. Für diese Situation wurde der Begriff „synergistische Heterozygotie“ geprägt, um gleichzeitig vorkommende partielle Defekte verschiedener Funktionen zu beschreiben (Kendler, 1986). Als Beispiel sind Beeinträchtigungen im Energiestoffwechsel der Skelettmuskulatur zu nennen, ebenso CPT II-, Myoadenylatdesaminase- (MAD), Myophosphorylase-, Phosphofruktokinase- (PFK, McKusick 232800) oder milde Atmungsketten-Defekte (Kendler, 1986; Vladutiu, 2001; Olpin et al., 2003).

Bei unklaren Diagnosen wird empfohlen, sorgfältiger auch nach Defekten anderer Enzyme zu suchen. Beispielsweise wurde berichtet, dass eine Kombination von heterozygotem CPT II-Mangel mit MAD-Mangel weit häufiger vorkommt als ein homozygot- oder *compound*-heterozygoter CPT II-Mangel (Olpin et al., 2003).

Wie aus oben genannten Beispielen deutlich wird, kann die Beurteilung der Phänotyp/Genotyp-Korrelation bei CPT II-Erkrankungen entscheidend für die Vorhersage der potentiellen Risiken bei den Patienten sein.

1.3.4.6. Differentialdiagnose

Die Differentialdiagnosen des CPT II-Mangels umfassen die Abgrenzung weiterer Ursachen der Myoglobinurie und damit u.a. die metabolischen- und exogen-toxischen Myopathien. Als ein Beispiel unter anderen ist der Myophosphorylase-mangel (McArdle-Myopathie), auch als Glykogenspeicherkrankheit Typ V (GSD5) bezeichnet, zu nennen. Diese Erkrankung und der CPT II-Mangel zeigen ähnliche Symptome nach intensiver körperlicher Bewegung. Die McArdle-Krankheit entsteht durch einen Defekt in der Glykogenolyse. Bei beiden Krankheiten treten Symptome zunächst vorwiegend bei jungen Erwachsenen im zweiten oder dritten

1. Einleitung

Lebensjahrzehnt auf. Während bei Morbus McArdle die Attacke in der Regel innerhalb von 15 Minuten nach Übungsstart beginnt, erscheinen die Symptome beim CPT II-Mangel später (Faigel and Harris, 1995). Weiterhin sollten auch medikamentös oder toxisch ausgelöste Myoglobinurien, z.B. durch Statine bedacht werden (Omar and Wilson, 2002).

Carnitin/Acylcarnitin-Translokase (CACT)-Mangel ist eine sehr selten vorkommende Erkrankung, die ebenfalls als Differentialdiagnose für den CPT II-Mangel in Frage kommt. Patienten mit diesem Mangel zeigen ein ähnliches Acyl-L-carnitin-Spektrum im Blutserum und Plasma (al Aqeel et al., 1999). Die Messung der CACT- bzw. CPT II-Aktivität im peripheren Blut bzw. der Muskelbiopsie oder die gezielte Suche nach Mutationen in den kodierenden Genen können in diesem Fall Wegweiser für die richtige Diagnose sein.

1.3.4.7. Therapie des CPT II-Mangels

Eine spezifische Therapie für den CPT II-Mangel gibt es noch nicht.

Die bekannten Auslösefaktoren, wie lang anhaltende körperliche Belastungen, Fasten sowie Kälteexposition sollten möglichst vermieden werden. Es wird empfohlen, die Aufnahme langkettiger Fettsäuren zu reduzieren und zumindest unter Belastung vermehrt Kohlenhydrate und mittelkettige Fettsäuren aufzunehmen (Jerusalem and Zierz, 2003). Beim Auftreten von Myalgien oder Paresen sollten die Patienten über die Gefahr von Rhabdomyolyse-Attacken informiert und ggf. zur Vorbeugung oder Behandlung eines Nierenversagens stationär beobachtet werden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

CPT II-Mangel wird als der häufigste Defekt des Fettstoffwechsels angesehen (McGarry and Brown, 1997).

Die bisherigen Studien über CPT II beruhen auf Experimenten mit CPT II aus Wirbeltieren (Hsiao et al., 2006; Rufer et al., 2006) oder auf Studien mit menschlichen Zelllysaten. Die Zelllysate wurden durch Produktion der humanen CPT II (Wildtyp

1. Einleitung

und die Varianten) in Fibroblasten- (Thuillier et al., 2003; Orngreen et al., 2005), Lymphoblasten- (Thuillier et al., 2003) oder Myoblastenkulturen (Djouadi et al., 2003; Djouadi et al., 2005; Bonnefont et al., 2009) und in transfizierten COS-Zellen (Taroni et al., 1992; Taroni et al., 1993; Yao et al., 2008) gewonnen.

Die größte Schwierigkeit bei der Erforschung der biochemischen und proteinchemischen Grundlagen des CPT II-Defektes ist, dass es keinen empfindlichen Aktivitätstest gibt, der die Aktivität des inneren (CPT II) und des äußeren Enzyms (CPT I) unterscheiden kann. Die experimentellen Bedingungen, unter denen die Aktivität der CPT untersucht wird, sind daher kritisch.

In der vorliegenden Arbeit soll im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen mit humanem, gereinigtem, rekombinantem CPT II-Protein gearbeitet werden, um die Eigenschaften der CPT II getrennt von anderen Einflüssen zu untersuchen.

Die S113L-Mutation konnte bei etwa 90% der Patienten mit muskulärem CPT II-Mangel auf mindestens einem Allel identifiziert werden (Joshi et al., 2014).

Die folgenden Hypothesen über die biochemischen Folgen der Mutation S113L sind umstritten und sollen in dieser Arbeit untersucht werden:

(1) Reduzierte Enzymaktivität mit normalem oder reduziertem Proteingehalt (Olpin et al., 2003).

(2) Abnorme Regulation des Enzyms anstatt einer reduzierten katalytischen Aktivität (Zierz, 1994).

(3) Verringerte Stabilität des Proteins. Die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Proteolyse trotz der normalen Proteinsynthese wurde als ein grundlegender Auslöser der Symptome vorgeschlagen. Unter diesem Aspekt würden die Proteine mit mildereren Mutationen, die im optimalen Zustand eine katalytische Aktivität zeigen, nicht abgebaut (Taroni et al., 1993).

(4) Reduzierte Thermostabilität (Olpin et al., 2003).

Um der ersten Hypothese nachzugehen, wird die Aktivität der rekombinanten Enzyme spektrophotometrisch bestimmt (Abschnitt 2.2.3.3.). Für diesen Zweck muss ein bereits in der Arbeitsgruppe etablierter Enzymassay optimiert werden.

1. Einleitung

Präinkubation-Experimente mit verschiedenen Effektoren (z.B. Malonyl-CoA) werden durchgeführt (Abschnitte 2.2.3.4.1. und 2.2.4.), um die regulatorischen Eigenschaften des mutierten Enzyms im Vergleich mit dem Wildtyp zu untersuchen.

Zur dritten Hypothese wird in der vorliegenden Arbeit keine Stellung genommen.

Um die Hypothese über reduzierte Thermostabilität zu überprüfen, werden Experimente der Thermoinaktivierung durch Präinkubation der rekombinanten Proteine bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.4.).

Die Versuche mit S113L-Variante von CPT II, die bei etwa 90% der Patienten mit der muskulären Form des CPT II-Mangels vorliegt, sollen ein besseres Verständnis des Pathogenese-Mechanismus dieser Erkrankung ermöglichen.

Die Durchführung der Computergestützten Simulationsmethoden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl soll ebenfalls eine Erklärung für den Pathogenese-Mechanismus der Erkrankung liefern (Abschnitt 2.2.5.).

2. Materialien und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Antibiotika, Substrate

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acetyl-L-carnitin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agar-Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bacto TM Trypton	Becton Dickinson & Co., USA
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Decanoyl-L-carnitin-chlorid	LGC Standards GmbH, Wesel
D-Glukose	AppliChem GmbH, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Hexanoyl-L-carnitin-chlorid	LGC Standards GmbH, Wesel
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isobutyryl L-carnitin-chlorid	LGC Standards GmbH, Wesel
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem GmbH, Darmstadt

2. Material und Methoden

Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kanamycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Lauroyl-L-carnitin-chlorid	LGC Standards GmbH, Wesel
L-Carnitin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Leupeptin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Malonyl-Coenzyme A, lithiumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Myristoyl-L-carnitin-chlorid	LGC Standards GmbH, Wesel
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Nickel(II)-sulfat-hexahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
n-Octyl- β -D-glukopyranosid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Octanoyl-L-carnitin-chlorid	LGC Standards GmbH, Wesel
Palmitoyl-Coenzym A, Lithiumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Palmitoyl-L-carnitin-chlorid	LGC Standards GmbH, Wesel
Pepstatin A	AppliChem GmbH, Darmstadt
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Rotiphorese Gel A	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Rotiphorese Gel B	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

2. Material und Methoden

Tris(2-carboxyethyl)phosphine-hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween-20	Merck KGaA, Darmstadt
Valeryl-L-carnitin-chlorid	LGC Standards GmbH, Wesel

Bakterienstämme und Plasmide

<i>Escherichia coli</i> BL21 Gold DE3	Stratagene, USA
pET-28a(+)	Novagen (Merck KGaA), Darmstadt

Enzyme und sonstige

Lysozym (20000 U/mg)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Säulen und Säulenmaterialien

HighLoad 26/60 Superdex	GE Healthcare, Europe
HighLoad Q-Sepharose 26/10	GE Healthcare, Europe
HisTrap™ HP Columns	GE Healthcare, Europe

Konzentratoren

Vivaspin 20 MWCO 10000	Sartorius AG, Göttingen
------------------------	-------------------------

Küvetten

PMMA 1,5 ml Plastikkuvetten	Brand GmbH+CO KG, Wertheim
-----------------------------	----------------------------

2. Material und Methoden

2.1.2. Lösungen, Medien, Puffer

Chromatographie-Puffer

Aufschlusspuffer	50 mM HEPES; 0,15 M NaCl, 3 mM TCEP; 10 mM MgCl ₂ ; 3 mM Benzamidin; 1 µg/ml Leupeptin; 0,7 µg/ml Pepstatin A; pH 8,0
Ni-NTA-Äquibrierpuffer 1	50 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,15 M NaCl; 3 mM TCEP; 3 mM Benzamidin; 1 g/ml Leupeptin; 0,7 µg/ml Pepstatin A; 0,1 % Triton X-100 [v/v]; pH 8,0
Auftragungspuffers/Elutionspuffer A	50 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,15 M NaCl; 3 mM TCEP; 3 mM, Benzamidin, 1 % [w/v] nOG; 1 µg/ml Leupeptin; 0,7 µg/ml Pepstatin A; 40 mM Imid- azol, pH 8,0
Ni-NTA-Elutionspuffer B	50 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,15 M NaCl; 3 mM TCEP; 3 mM Benzamidin, 1 % [w/v] nOG; 1 g/ml Leupeptin; 0,7 µg/ml Pepstatin A; 500 mM Imidazol, pH 8,0
Ni-NTA-Vorlagepuffer	Ni-NTA Auftragungspuffer/ Elutionspuffer A + 20 % [v/v] Glycerin, pH 8,0
Gelfiltrationspuffer	25 mM Tris/HCl; 0,15 M NaCl; 2 mM TCEP; 1 % [w/v] nOG, pH 8,0
Gelfiltration-Vorlagepuffer	Gelfiltrationspuffer + 20 % [v/v] Glycerin, pH 8,0
Anionenaustauschpuffer	25 mM Tris/HCl; 50 mM NaCl; 2 mM TCEP; 1 % [w/v] nOG, pH 8,0
Anionenaustausch-Vorlagepuffer	Anionenaustauschpuffer + 20 % [v/v] Glycerin, pH 8,0

andere Puffer

KP-Puffer	50 mM KH ₂ PO ₄ , 120 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,4
-----------	--------------------------------------------------------------------------

2. Material und Methoden

SDS-PAGE

5x SDS-PAGE-Probenpuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 4,8 % (w/v) SDS; 16 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol
SDS-PAGE-Trenngel (10 %)	10 ml Rotiphorese TM Acrylamid/Bisacrylamid; 12,3 ml Wasser bidest; 11,25 ml Tris/HCl pH 8,8; 75 μ l 20 % SDS; 20 μ l TEMED; 300 μ l 10 % APS
SDS-PAGE-Sammelgel (5 %)	2010 μ l Rotiphorese TM Acrylamid/Bisacrylamid; 9225 μ l Wasser bidest; 3750 μ l Tris/HCl pH 6,8; 150 μ l 10 % SDS; 15 μ l TEMED; 150 μ l 10 % APS
10 x SDS-PAGE-Laufpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 8,3; 1,87 M Glycerin; 1 % [w/v] SDS
SDS-PAGE-Färbelösung	40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 1 g/l Coomassie R250
SDS-PAGE-Entfärbelösung	40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Medien

LB-Medium	1 % [w/v] Trypton, 1 % [w/v] NaCl, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt
LB-Kanamycin-Medium	LB-Medium + 30 μ g/ml Kanamycin
Fermentationsmedium	50 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l Ammoniumchlorid, 5 g/l Glukose, 0,68 g/l Magnesiumsulfat und 11 g/l di-Kaliumhydrogenphosphat
Fermentation- <i>feeding</i> -Medium	300 g/l Hefeextrakt; 125 g/l Glukose

2. Material und Methoden

2.1.3. Geräte und software

Autoklav Systec V-95	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wetttenberg
Fermenter Biostat C–DCU 3	B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen
FPLC–System AKTA Purifier	GE Healthcare, Europe
Gaulin Hochdruckhomogenisator	APV Homogeniser GmbH, Unna
Inkubationsschüttler Buhler SM-30	Edmund Bühler GmbH & Co KG, Hechingen
PAGE-Elektrophoresekammer	Hofer, Inc., USA
PCR-Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter, Microprocessor PMX 3000	WTW GmbH. Weilheim
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraturrax T25	Jahnke & Klinkel IKA Labortechnik, Staufen
UV–Vis–Spektrophotometer DU800	Beckman Instruments Inc., USA

Zentrifugen

Avanti J20	Beckman Instruments Inc., USA
Beckman L8–60M Ultrazentrifuge	Beckman Instruments Inc., USA
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Universal 30 RF	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

Software

Endnote V7.0	Thomson ISI ResearchSoft, USA
KaleidaGraph V4.0	Synergy Software, USA
Microsoft Excel V2010	Microsoft, USA

2.2. Methoden

Die molekularbiologischen, proteinchemischen und analytischen Methoden wurden mit einigen kleinen Variationen analog zu den etablierten Methoden von KNAPE (Knappe, 2012) durchgeführt.

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation in chemokompetente *E. coli* –Zellen

Die in Vektor pET-28a subklonierten *CPT2*-Gene (Wildtyp, S113L-Variante) mit dem inserierten Hexahistidin-*tag* (*His₆-tag*) wurde freundlicherweise von KNAPE (Knappe, 2012) zur Verfügung gestellt. Für die Transformation wurde ein Aliquot chemokompetenter *E. coli* (BL21 Gold DE3) auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA (20 ng/l) versetzt und vorsichtig vermischt. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 30 Sek bei 42 °C in einem Wasserbad erhitzt und sofort danach für weitere 2 min wieder auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 80 µl SOC-Medium (Invitrogen, USA) versetzt und für 60 Min bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt.

Danach wurden die transformierten *E. coli* Kulturen auf LB-Agarplatten (2 % [w/v] Agar-Agar) bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator über Nacht kultiviert. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch die Gegenwart des Antibiotikums Kanamycin (30 µg/ml) in den Platten.

2.2.2. Proteinchemische Methoden

2.2.2.1. Ansetzen der Vor- und Hauptkultur

Einzelkolonien von der über Nacht inkubierten Platte dienten zum Animpfen der sterilen LB-Kanamycin Kulturen (2 ml), die bei 220 rpm und 37 °C über Nacht geschüttelt wurden. Für die Inokulation der Hauptkultur wurden die Zellen der zwei

2. Material und Methoden

2 ml-Gefäße durch eine 20minütige Zentrifugation bei 4000 rpm geerntet. Das Pellet wurde in zwei 1 Liter-Kolben mit frischem LB-Kanamycin-Medium resuspendiert und über Nacht bei 220 rpm inkubiert.

2.2.2.2. Fermentation

Der Fermentationsprozess wurde in einem Bioreaktor (Biostat C–DCU, B. Braun, Biotech International GmbH, Melsungen) im 6-Liter Maßstab und bei 20 °C durchgeführt.

Während die automatische Titration mit 10 %iger KOH bzw. 10 %iger Phosphorsäure für die Konstanthaltung des pH-Werts bei 7,0 sorgte, diente eine 50 %ige [v/v] Polypropylenglykollösung als Antischaummittel. Der Sauerstoffpartialdruck wurde in der Fermentationslösung durch eine Kaskadenregelung von Rührer (bis max. 1200 rpm), Luftfluss bis 25 Standard Liter pro Minute (slpm) und reiner Sauerstoff-Zugabe bei 30 % konstant gehalten. Die Werte der einzelnen Parameter wurden durch entsprechende Elektroden und Sensoren gemessen. Diese wurden vom digitalen Regelsystem des Fermenters erfasst und reguliert. Die Fermentation erfolgte bei 20 °C.

Nach Autoklavieren des Fermenters und des Mediums wurden die 1 Liter Hauptkulturen (Abschnitt 2.2.2.1.) in den Fermenter überführt und dem Fermenter steriles Kanamycin (30 µg/ml) hinzugegeben. Die Bestimmung der optischen Zelldichte wurde regelmäßig durchgeführt.

Bei einer OD_{600} von 10-15 wurde das *feeding*-Medium Computer-gesteuert zugeetzt.

Die Induktion der Expression erfolgte innerhalb der *feeding*-Phase bei einer Zelldichte (OD_{600}) von 80-100 mit 1 mM sterilfiltriertem IPTG. Vier Stunden nach Beginn der Induktion wurden die Zellen durch eine 15minütige Zentrifugation (Avanti J20, Beckman Instruments Inc., USA) mit 6000 rpm geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3. Aufschluss und Proteinreinigung

Der Aufschluss und Reinigung von Wildtyp und S113L-Variante erfolgten auf gleiche Weise. Zu diesem Zweck wurden etwa 250 g Biofeuchtmasse aus der Fermentation (Abschnitt 2.2.2.2.) in 500 ml Aufschlusspuffer (s. Abschnitt 2.1.2.) in Gegenwart von 0,05mg/ml Lysozym bei Raumtemperatur aufgetaut. Das Aufschließen der Zellen erfolgte dann mittels einmaliger Passage durch eine French-Press-Zelle [Gaulin Hochdruckhomogenisator APV Homogeniser GmbH, Unna] und anschließender Homogenisierung mit Hilfe eines Homogenisators (Ultraturrax T25, Jahnke & Kinkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) auf Eis. Im nachfolgenden Schritt wurde 1,2 U/ml Benzonase™ Nuclease und 0,1 % [v/v] Triton X-100 zwecks Nucleinsäureverdaus zugegeben und für 45 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Entfernung der unlöslichen Membran- und Zellwandbestandteile erfolgte durch eine 45 minütige Ultrazentrifugation bei 35000 rpm mittels einer Beckman L8-60M Ultrazentrifuge (Beckman Instruments Inc., USA) bei 4 °C.

Die Reinigungsschritte der His₆-fusionierten Proteine (Wildtyp, S113L-Variante) sind in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

2.2.2.3.1. Ni-NTA Chromatographie

Für die Reinigung der mit N-terminalem His₆-tag exprimierten rekombinanten Proteine wurde der Überstand nach der Zentrifugation (Abschnitt 2.2.2.3.) auf 5 ml Ni-NTA Säulen (3×5 ml HisTrap™ HP Columns) aufgetragen. Diese waren zuvor mit dem Ni-NTA-Äquilibrierpuffer 1 (s. Abschnitt 2.1.2) äquilibriert worden. Danach wurden die Säulen mit 3 Säulenvolumina Ni-NTA-Äquilibrierpuffer 1 gewaschen und mit 5 Säulenvolumina des Ni-NTA Auftragungspuffers/Elutionspuffer A (s. Abschnitt 2.1.2.1) umgepuffert.

Durch einen linear ansteigenden Gradienten von 0 bis 100 % Elutionspuffer B (s. Abschnitt 2.1.2.) über 8 Säulenvolumina, bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min wurde das gebundene His₆-tag-Protein eluiert und als Fraktionen von 1,5 ml in 2 ml-Eppendorfgefäßen mit 300 µl Vorlagepuffer gesammelt. Die Elution

2. Material und Methoden

des gebundenen Proteins wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Protein-haltige-Fraktion wurde vereinigt.

Sämtliche Chromatographieschritte erfolgten bei 5 °C- 10 °C. Alle verwendeten Puffer wurden durch 0,22 µm Millex®-GS (0,22 µm) Spritzenaufsatzfilter bzw. Nalgene Flaschenaufsatzfilter bestückt mit Filtermembranen der Firma Pall (0,45 µm bzw. 0,22 µm) filtriert.

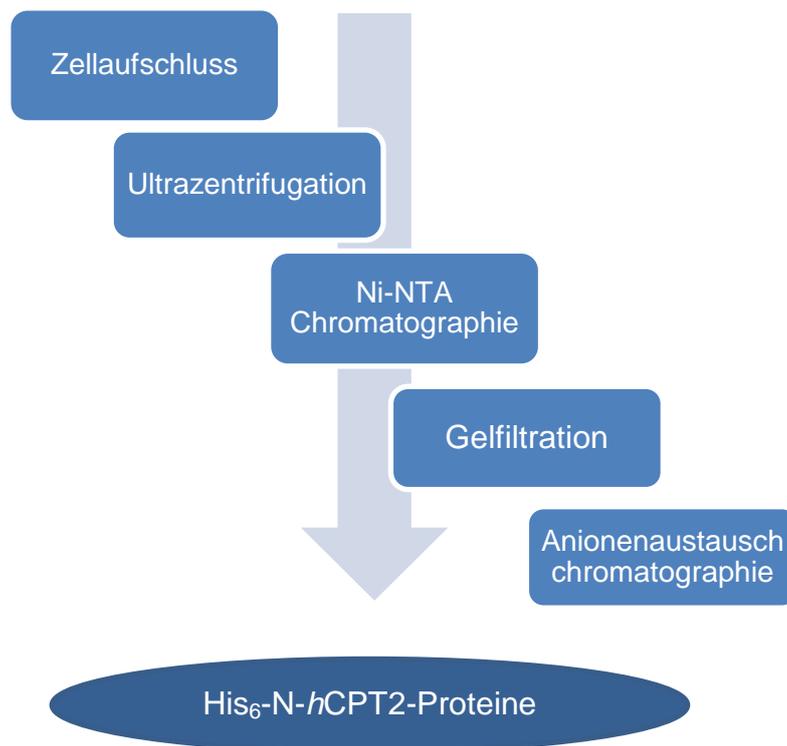


Abb. 2.1. Schema für die Reinigung von His₆-fusionierten CPT II-Proteinen (Wildtyp und Variante S113L).

2.2.2.3.2. Größenausschluss-Chromatographie

Zur weiteren Reinigung sowie zur Umpufferung wurde eine Größenausschluss-Chromatographie angeschlossen.

Zu diesem Zweck wurde eine HighLoad 26/60 Superdex 200-Säule (GE Healthcare, Europe) mit Gelfiltrationspuffer (s. Abschnitt 2.1.2.) äquilibriert. Die vereinigten Fraktionen wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die

Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,2 ml/min über 1,5 Säulenvolumina mit Gelfiltrationspuffer. Dabei wurden Fraktionen mit einem Volumen von 8 ml in 15 ml-Gefäßen (Greiner, Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland), die 1 ml Gelfiltrations-Vorlagepuffer enthielten, bis zum Ende des Laufes gesammelt. Durch die Messung der Absorption bei 280 nm wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und mittels Anionenaustauschchromatographie weiter gereinigt.

2.2.2.3.3. Anionenaustauschchromatographie

Nach Äquilibrierung einer Q-Sepharose 26/10-Säule (GE Healthcare, Europe) mit Anionenaustausch-Puffer wurden die vereinigten Fraktionen aus dem Gelfiltrationsschritt bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min auf die Säule appliziert.

Das Protein wurde mit Anionenaustausch-Puffer eluiert. Der Durchfluss, der das Protein enthält wurde im Volumen von 20 ml mit 5 ml Anionenaustausch-Vorlagepuffer Inhalt, gesammelt.

Die gewonnenen Fraktionen aller Chromatographie-Schritte wurden mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.2.3.1.) überprüft.

2.2.2.3.4. Aufkonzentrierung

Das Aufkonzentrieren der Proteinlösung erfolgte unter Verwendung von Vivaspin-Konzentratoren (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mit einer Membran mit 10 kD Massenausschlussgrenze. Die Endkonzentration betrug circa 1 mg/ml.

2.2.2.3.5. Lagerung

Die aufkonzentrierte Proteinlösung aus dem letzten Abschnitt (2.2.2.3.4.) wurde schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3. Analytische Methode

2.2.3.1. SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE in einer Elektrophoresekammer nach LAEMMLI (Laemmli, 1970).

Proteinproben wurden mit 5x Probenpuffer im Verhältnis 1:5 versetzt und circa 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteine wurden in einem 5 %igen Sammelgel bei 40 mA und 80 V konzentriert und im 10%igen Trenngel aufgetrennt. Die Gele wurden über Nacht in Färbelösung angefärbt und mit Entfärbelösung anschließend entfärbt.

2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Theorie

Die Proteinkonzentrationen wurden ausschließlich photometrisch bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Bouguer, 1729; Lambert, 1760; Beer, 1852) ist es möglich, die Konzentration eines Proteins über die Extinktion (E) zu ermitteln (Gleichung 2.1).

Gleichung 2.1

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

E_{λ}	Extinktion bei der Wellenlänge λ
ε_{λ}	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
c	Konzentration
d	Schichtdicke

Die Absorption des Lichtes durch aromatische Aminosäuren, Peptidbindungen und Disulfide im ultravioletten Bereich führt zu charakteristischen Proteinspektren (Galla and Müller, 1988). Die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan absorbieren bei 280 nm, wobei Tryptophan in der Absorptionsstärke dominiert und der Beitrag von Phenylalanin bei dieser Wellenlänge

2. Material und Methoden

(ϵ_{280} : $0,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) vernachlässigt werden kann. Demzufolge kann der molare Extinktionskoeffizient eines Proteins anhand der Gleichung 2.2 abgeschätzt werden (Pace et al., 1995).

Gleichung 2.2

$$\epsilon_{280} [M^{-1}cm^{-1}] = (5500 \times \sum Trp) + (1490 \times \sum Tyr) + (125 \times \sum Disulfid)$$

ϵ_{280}	Molarer Extinktionskoeffizient
$\sum Trp$	Anzahl der Tryptophane
$\sum Tyr$	Anzahl der Tyrosine
$\sum Disulfid$	Anzahl der Disulfidbrücken

Da der berechnete Absorptionskoeffizient von den gemessenen Werten von KNAPE (Knappe, 2012) nur gering abwich, wurden zur Berechnung der Proteinkonzentration die experimentell bestimmten Werte von KNAPE angewandt.

Die Absorptionsspektren wurden im Bereich von 240 nm bis 340 nm mit UV-Vis-Beckman Spektrophotometer: DU800 (Beckman Instruments Inc., USA) im Anionenaustausch-Puffer in Quartzküvetten mit 1 cm Schichtdicke (Hellma, Müllheim/Baden, Deutschland) aufgenommen. Die Grundlage für diese Berechnung ist das Lambert-Beersche Gesetz.

Die Proteinkonzentrationen wurden durch drei unabhängige Messungen ermittelt.

2.2.3.3. Aktivitätstest

Test-Hintergrund

Die bei der CPT II-Reaktion (Gleichung 2.3) freigesetzten SH-Gruppen des CoA-SH reagieren unter Freisetzung von Mercaptid-Anionen mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) (Bieber et al., 1972).

Gemessen wurde, wie von KNAPE (Knappe, 2012) beschrieben, die Zunahme der Extinktion des resultierenden photometrisch detektierbaren Farbkomplexes mittels

2. Material und Methoden

UV-Vis-Spektrophotometer (DU800, Beckman Instruments Inc., USA) bei einer Wellenlänge von 410 nm über einen Zeitraum von zwei Minuten. Dabei wurden L-Carnitin und Palmitoyl-CoA als Akzeptor bzw. Donor der Acyl-Reste in Gegenwart von in absolutem Ethanol gelöstem DTNB (mit einem Extinktionskoeffizient von $13600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), (Ellman, 1959) in KP-Puffer (Abschnitt 2.1.2.) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ für eine Minute in PMMA-Halbmikroküvetten (Brand GmbH & Co KG, Wertheim) inkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe des rekombinanten Enzyms in einer Endkonzentration von 15 nM.

Die Konzentration des DTNB in absolutem Ethanol betrug 1 mM.

Gleichung 2.3



Das Protokoll von KNAPE (Knappe, 2012) wurde hinsichtlich der Konzentrationen von Akzeptor und Donor (Palmitoyl-CoA und L-Carnitin) optimiert.

2.2.3.4. Thermoinaktivierung der Enzyme

Theorie

Die Stabilisierung des nativen Zustands eines Proteins erfolgt durch Faktoren wie den hydrophoben Effekt, Wasserstoffbrücken, Disulfidbindungen, ionische Bindungen und van-der-Waals Kräfte (Pace et al., 2004). Die thermodynamische Stabilität ΔG^0 wird als Differenz der freien Energie von dem nativen, gefalteten (N) und dem denaturierten, ungefalteten (U) Zustand definiert (Pace, 1990). Die native, dreidimensionale Struktur eines Proteins ist der thermodynamisch günstigste Zustand. Je größer der ΔG^0 -Wert eines Proteins ist, umso stabiler ist das Protein und umso geringer die Tendenz reversiblen Entfaltung.

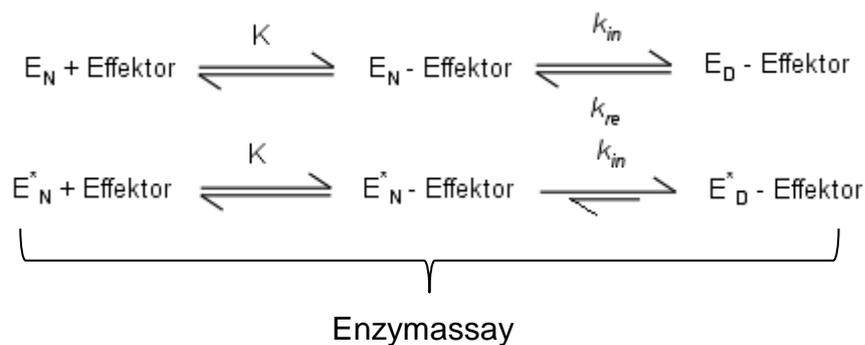
Eine Veränderung der Umgebungsparameter, wie z.B. der Temperatur- oder des pH-Wertes kann die stabilisierenden Faktoren beeinflussen und dadurch zu einer Entfaltung und Inaktivierung des Proteins führen. Die Wahrscheinlichkeit für die

2. Material und Methoden

Rückfaltung in die native Form hängt von der Proteinstabilität und dem Inaktivierungsmechanismus ab.

Laut Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel (RGT-Regel) zeigen die meisten Enzyme beim Temperaturanstieg eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Diese Regel ist allerdings nur für moderate Temperaturen gültig und ab 45 °C fällt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder. Daher wurde zur Untersuchung der Thermostabilität der Enzyme die Enzymaktivität nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt.

Daten der Temperatur-induzierte Entfaltung / Inaktivierung wurden nach Schema I unter Berücksichtigung einer vernachlässigten Reaktivierung des inaktivierten Enzyms untersucht.



Schema I. Effektor-vermittelte Inaktivierung und temperaturinduzierte Denaturierung von CPT-II (unter Berücksichtigung nur einer Bindungsstelle des Effektors).

E Enzym Wildtyp

E* für die Variante S113L

E_N Enzym im nativen Zustand

E_D Enzym im denaturierte Zustand

K ist die Gleichgewichtskonstante des ersten Enzym-Effektor Komplexes

k_{in} Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung

k_{re} Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Reaktivierung

Aufgrund der Irreversibilität der Reaktion wurde die Abnahme der enzymatischen Aktivität nach einer Reaktion erster Ordnung unter Verwendung der exponentiellen

2. Material und Methoden

(Gleichung 2.4) analysiert. Restaktivitäten wurden im Offset der Anpassungsroutine berücksichtigt.

Gleichung 2.4

$$A = A_0 \cdot \exp(-k^{app} \cdot t) + n$$

$$k^{app} = k_{in} + k_{re}$$

A Restaktivität des Enzyms gemessen zum Zeitpunkt t der Inaktivierung

A_0 Anfangsaktivität des Enzyms

k_{in} Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung

k^{app} Scheinbare Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung

k_{re} Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Reaktivierung

n Offset repräsentiert die endgültige Restaktivität

Die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung wurde durch Anpassen der Verlaufzeit, der Veränderung der enzymatischen Aktivitäten gemäß Gleichung 2.4 unter Verwendung des Programms Kaleidagraph™ bestimmt.

Zur Auswertung wurden die Daten zunächst hinsichtlich der Gesamtaktivität normiert. *Fitting*-Parameter werden mit Fehler angezeigt.

Die Rest-Aktivitäten der His₆-N-*h*CPT2-Proteine (Wildtyp und S113L-Variante) wurden nach Inkubation bei 4 °C, 30 °C, 40 °C und 45 °C spektrophotometrisch (Abschnitt 2.2.3.3.) bestimmt. Dabei kamen 15 nM His₆-N-*h*CPT2, 1 mM DTNB, 30 µM Palmitoyl-CoA und 12 mM L-Carnitin im Testansatz zur Anwendung. Um das Kondensieren der Proben am Deckel des Reaktionsgefäßes zu vermeiden, wurde ein PCR-Cycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Deutschland) mit einer Deckelheizung (106 °C) benutzt.

2.2.3.4.1. Der Einfluss von Substraten auf die CPT II-Aktivität

Das Y-förmige aktive Zentrum von CPT II enthält drei Bindestellen, für L-Carnitin, CoA und die Acyl-Einheit (Rufer et al., 2006).

Die Bildung eines Komplexes von Enzym mit nur einem dieser Substrate könnte Konformationsveränderungen verursachen und dadurch die thermodynamische Stabilität des Enzyms beeinflussen. Daher wurde der Effekt von verschiedenen Substraten auf die kinetische Stabilität der Enzyme untersucht.

Der pH Wert der Substratlösungen wurde auf 7,4 eingestellt.

2.2.3.4.1.1. Palmitoyl-CoA

Bei diesen Experimenten wurden vor der Aktivitätsmessung die jeweilige Menge Palmitoyl-CoA mit His₆-N-*hCPT2* oder His₆-N-*hCPT2/S113L* bei 30 °C, bzw. 40 °C oder 45 °C präinkubiert und die Aktivitätsveränderung nach unterschiedlichen Zeiträumen beobachtet.

2.2.3.4.1.2. L-Carnitin und Acyl-L-carnitine

Um dem Effekt von L-Carnitin auf die Enzymaktivität nachzugehen, wurde bei der Aktivitätsmessung die jeweilige Menge L-Carnitin vor der Zugabe von Palmitoyl-L-carnitin mit His₆-N-*hCPT2* oder His₆-N-*hCPT2/S113L* bei 30 °C, bzw. 40 °C oder 45 °C präinkubiert.

Den Effekt simultaner Inkubation von Palmitoyl-L-carnitin und anderen Substraten im Enzymassay wurde bei Raumtemperatur untersucht. Dabei wurde die Aktivitätsbestimmung (Abschnitt 2.2.3.3.) in Gegenwart von 25 µM Palmitoyl-L-carnitin durchgeführt.

In einem weiteren Experiment wurden 25 µM Acyl-L-carnitine unterschiedlicher Kettenlänge (Tabelle 2.1) mit den rekombinanten Proteinen bei 45 °C präinkubiert. Die Aktivitätsmessung erfolgte nach verschiedenen Präinkubationszeiten.

2. Material und Methoden

Die Acyl-L-carnitine mit dem besten Effekt auf die Thermostabilität wurden bei 40 °C mit den rekombinanten Enzymen präinkubiert. Die Aktivität der Enzyme (Abschnitt 2.2.3.3.) wurde nach verschiedenen Zeiten gemessen.

Die Endkonzentration von Palmitoyl-CoA und L-Carnitin bei allen durchgeführten Experimenten in diesem Abschnitt betrug 30 µM bzw. 12 mM. Um das Kondensieren der Proben am Deckel des Reaktionsgefäßes zu vermeiden, wurde bei allen Präinkubationsexperimenten ein PCR-Cycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Deutschland) mit einer Deckelheizung (106 °C) verwendet.

Tabelle 2.1. Bezeichnung der verwendeten Acyl-L-carnitin-Derivate

Bezeichnung	Acyl-L-carnitin-Derivat
C2	Acetyl-L-carnitin-hydrochlorid
C4	Isobutyryl-L-carnitin
C5	Valeryl-L-carnitin-chlorid
C6	Hexanoyl-L-carnitin-chlorid
C8	Octanoyl-L-carnitin-chlorid
C10	Decanoyl-L-carnitin-chlorid
C12	Lauroyl-L-carnitin-chlorid
C14	Myristoyl-L-carnitin-chlorid
C16	Palmitoyl-L-carnitin-chlorid

2.2.4. Hemmungsstudien

2.2.4.1. Malonyl-CoA als Hemmstoff

Bei dieser Serie von Experimenten wurde die Hemmbarkeit von CPT II durch Malonyl-CoA als Inhibitor untersucht.

Zuerst erfolgte die Aktivitätsmessung (Abschnitt 2.2.3.3.) in Gegenwart von 100 µM bzw. 200 µM Malonyl-CoA in der Küvette. In weiteren Experimenten wurde die Restaktivität des Enzyms nach der Präinkubation mit 10 µM, 100 µM oder 200 µM Malonyl-CoA bei 4 °C bzw. 30 °C gemessen. Um die Verdunstung der Proben in den Gefäßen bei 30 °C zu verhindern, kam einen PCR-Cycler (Master-

cycler Gradient, Eppendorf, Deutschland) mit Deckelheizung (106 °C) zum Einsatz.

2.2.4.2. Malonsäure (Malonat) als Hemmstoff

Analog zu letztem Experiment wurde in einer weiteren Serie Malonsäure (Malonat) statt Malonyl-CoA eingesetzt um zu prüfen, ob der Hemmeffekt vom CoA- oder Malonat-Teil des Effektors abhängig ist.

2.2.4.3. Reversibilität der Hemmung

Anschließend wurde die Reversibilität der Hemmung von Malonyl-CoA bzw. Malonsäure im aktivierten Zustand des Enzyms untersucht. Dafür wurden, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, zunächst die rekombinanten Proteine (Wildtyp und S113L-Variante) mit 10 µM, 100 µM oder 200 µM Malonyl-CoA bzw. Malonsäure bei 30 °C präinkubiert. Bei Aktivitätstest-Ansätzen (Abschnitt 2.2.3.3.) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten erfolgte jeweils die Zugabe von Palmitoyl-CoA in die Küvette erst 60 Sekunden nach dem Reaktionsstart. Als Kontrolle wurde der gleiche Vorgang für die Enzyme (Wildtyp und S113L-Variante) ohne Präinkubation mit Malonyl-CoA bzw. Malonsäure durchgeführt.

2.2.4.4. Malonyl-CoA als Substrat der CPT II

Um herauszufinden, ob Malonyl-CoA durch CPT II als Substrat gespalten wird, wurden die His₆-N-*h*CPT2-Proteine bei 30 °C mit 10 µM, 100 µM oder 200 µM Malonyl-CoA präinkubiert. Die Aktivitätsmessung (Abschnitt 2.2.3.3.) erfolgte in Abwesenheit von Palmitoyl-CoA in der Küvette.

Die Datenauswertung erfolgt wie bei den Versuchen zu Temperatur-induzierter Entfaltung unter Verwendung der Gleichung 2.4 (Abschnitt 2.2.3.4.). Die endgültigen Restaktivitäten wurden im Offset der Anpassungsroutine berücksichtigt.

2.2.5. Computergestützte Simulationsmethoden

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten bioinformatischen Methoden wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Sippl, Institut für Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg durchgeführt.

2.2.5.1. Homologie-Modelling

Unter Verwendung des MOE-Modellierungspakets (Dettmer and Trendelenburg, 2005) beim Sequenzalignment der humanen und Ratten CPT II (aa 32-658) konnte eine Sequenzidentität von 95,2% festgestellt werden.

Zum Erstellen eines Homologie-Modells der humanen CPT II wurde die bereits bekannte Kristallstruktur der Ratten-CPT II (PDB-Code 2DEB) (Rufer et al., 2006) als Vorlage benutzt. Das Homologie-Modell und das Modell der Variante S113L wurden mit Hilfe des Programms MODELLER9v11 (Sali and Blundell, 1993) erzeugt.

2.2.5.2. Moleküldynamik (MD)

Das in AMBER12 enthaltene Modul *Sander* wurde für die Energieminimierungsschritte angewendet. Das *particle mesh ewald molecular dynamics* (PMEMD)-Programm, ein Modul im Programmpaket AMBER12, wurde für die MD-Simulation eingesetzt.

Particle mesh ewald (PME)-Summation (Darden et al., 1993) wurde zur Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkung verwendet.

Ein *cutoff*-Radius bis zu 10 Å wurde für die nichtbindenden Wechselwirkungen berücksichtigt.

Die Vorbereitung der Eingabedateien wurde wie folgt durchgeführt: Das Kraftfeld AMBER (GAFF) mit AM1-BCC (AM1 mit *bond-charge-correction*) wurde angewandt, um Atomtypen an die Liganden (Palmitoyl-L-carnitin) anzuordnen. Das Amber03-Kraftfeld wurde für das Protein eingesetzt.

2. Material und Methoden

Das Protein oder Protein-Acyl-L-carnitin-Komplexe wurden in einem oktaedrischen TIP3P (*three-point-transferable-interaction-potential*)-Wassermodell solvatisiert, um eine möglichst physiologische Umgebung zu erreichen. Der Abstand zwischen dem Komplex und der Boxgrenze betrug dabei 13 Å. Die Gegenionen wurden zugegeben um das System zu neutralisieren.

Das solvatisierte System wurde dann in einem Dreischrittverfahren Energieminimiert. Zuerst erfolgte die Minimierung in 1600 Schritten (800 Schritte *steepest descent*-, 800 Schritte *conjugate-gradient*-Minimierung). Dabei wurde die Struktur unter einer Kraftkonstante von $10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ fixiert. Es folgten 1600 weitere Schritte (800 Schritte *steepest-descent*-, 800 Schritte *conjugate-gradient*-Minimierung), während die Struktur durch eine Kraft von $2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ fixiert gehalten wurde.

Schließlich wurde das gesamte System einer 2000-Schritte-Minimierung (1000 Schritte *steepest-descent*-, 1000 Schritte *conjugate-gradient*-Minimierung) unterzogen. Das System wurde nach und nach auf die untersuchten Temperaturen (277 K, 299 K und 313 K) über einen Zeitraum von 100 ps erhitzt. Anschließend lief die Simulation für 22 ns im Isobar-Isothermen (NPT)-Ensemble bei einem Druck von 1,0 bar und einer Temperatur von 300 K.

Während MD wurden alle kovalente Bindungen, an denen Wasserstoffatome beteiligt waren, mittels des SHAKE-Algorithmus (Ryckaert et al., 1977) festgehalten. Die Länge der Zeitschritte betrug 2 fs.

Die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) der Gerüstatome des Proteins wurde mit Hilfe der Eingangsstruktur als Referenz berechnet. Der B-Faktor für das Rückgrat der Proteine wurde mittels einer MD-Simulation von 22 ns mit dem Programm *ptraj* (AMBER12) berechnet.

2.2.5.3. *docking*-Studien

Das humane CPT II-Homologie-Modell wurde für molekulare *docking*-Studien verwendet. Zunächst wurde geprüft, ob es mittels *docking*-Programm GOLD möglich ist, die kokristallisierten Liganden in der CPT II- und L-Carnitin-Acetyltransferase-Kristallstrukturen aus der Proteindatenbank (2RCU, 4EP9,

2. Material und Methoden

1TQ7) erneut anzudocken. Dabei wurde eine gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und *docking*-Strukturen mit einem RMSD-Wert von weniger als 1,5 Å erzielt. Malonyl-CoA und Malonat konnten in zwei Stellen (Acyl-L-carnitin; Stelle (I) und CoA: Stelle (II)) des Enzyms angedockt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Transformation in chemokompetente *E. coli*-Zellen

Zur Expression der *CPT2*-Gene wurden diese, wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, in chemokompetente *E. coli*-Zellen (BL21 Gold DE3) transformiert. Durch die Verwendung von Kanamycin wurde die Selektion der Zellen mit dem transformierten Plasmid und integriertem Antibiotika-Resistenzgen gewährleistet.

3.2. Proteinchemische Methoden

Beim Fermentieren der Hauptkulturen von transformierten *E. coli*-Zellen (Abschnitt 2.2.1.1) diente IPTG zur Induktion der Enzyymbildung gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Die His₆-N-*hCPT2*-Proteine wurden nach dem Aufschluss der *E. coli*-Zellen und Solubilisierung mit Triton X-100 und nOG durch mehrere Chromatographie-Schritte (Abb. 2.1) gereinigt.

3.2.1. Chromatographie-Schritte

Durch Fusionieren der Hexahistidin-Reste (His₆-tag) am C-Terminus der His₆-N-*hCPT2*-Proteine (Wildtyp und der Variante S113L) ließen sich die rekombinanten Enzyme mittels Ni-NTA-Affinitätssäulen aufreinigen. Während die His₆-tags an die Ni-NTA-Agarose stark binden, zeigen andere Proteine nur schwache oder keine Affinität zum Ni-NTA und können durch Waschschrte entfernt werden. Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Proteine aus der Matrix durch Imidazol.

Durch Gelfiltration werden Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen hydrodynamischen Volumina und Permeationsverhalten getrennt. Während die kleineren Moleküle in die Poren der porösen Matrix eindringen können, eluieren die größeren Moleküle sehr schnell.

3. Ergebnisse

Die vereinigten Fraktionen aus dem letzten Schritt wurden zur Entfernung der verbliebenen Nukleinsäuren durch Anionenaustauschchromatographie weiter gereinigt.

Bei diesem Schritt konnten die His₆-N-*hCPT2*-Proteine, durch starke Bindung der negativ geladenen Nukleinsäuren an die positiv geladene Matrix, im Durchlauf gesammelt werden.

3.3. Analytische Methoden

3.3.1. SDS-PAGE

Durch anschließende Analyse der vereinigten Fraktionen aus jedem Chromatographie-Schritt mittels SDS-PAGE konnte der Erfolg des Reinigungsprozesses bestätigt werden (Abb. 3.1).

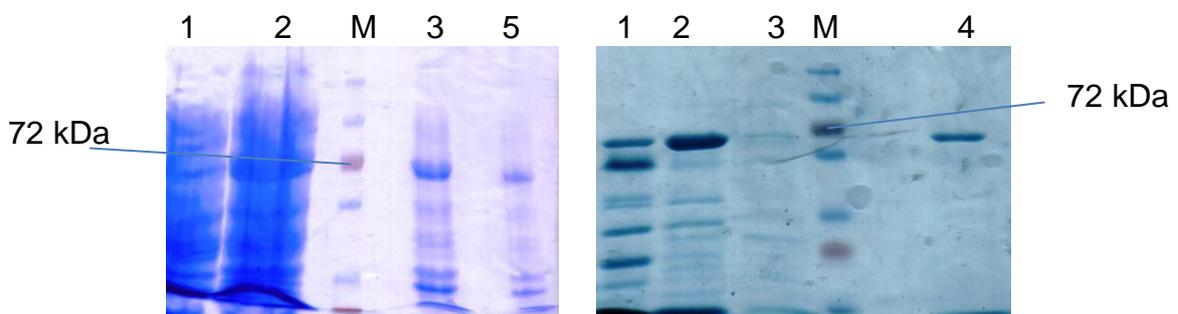


Abb. 3.1. SDS-PAGE der entnommenen Proben aus den Reinigungsschritten der His₆-N-*hCPT2*-Proteine. Links: M: Proteinmarker, 1, 2: Überstand nach Ultrazentrifugation, 3, 5: Elutionsfraktionen der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. Rechts: 1-3: Elutionsfraktionen nach Gelfiltration, M: Proteinmarker, 4: Durchlaufraktionen der Anionenaustauschchromatographie.

3.3.2. Aktivitätstest

Durch die rekombinante Herstellung der His₆-N-*hCPT2*-Proteine war es möglich, die kinetischen Eigenschaften dieser Enzyme (Wildtyp, S113L) *in vitro* mittels eines Aktivitätstests zu untersuchen (Knappe, 2012). Zur Optimierung dieses Aktivitätstests wurde die Konzentration der Substrate zum Erreichen der Höchstaktivität bestimmt. Zu diesem Zweck wurde zunächst die bei KNAPE (Knappe,

3. Ergebnisse

2012) beschriebene optimale L-Carnitin-Konzentration von 12 mM für den Wildtyp (12 mM) für die beiden His₆-N-*h*CPT2-Proteine (Wildtyp und S113L) festgesetzt und die Palmitoyl-CoA Konzentration variiert. Unter diesen Bedingungen, wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, war die höchste Aktivität für beide Proteine (Wildtyp und S113L) bei 30 µM Palmitoyl-CoA zu beobachten. Im nächsten Schritt wurde bei Festsetzung der Palmitoyl-CoA Konzentration auf diesen Wert (30 µM) die Konzentration des L-Carnitins variiert. Die Ergebnisse zeigten in diesem Fall keine große Abweichung zur vorgeschlagenen Optimalkonzentration von KNAPE (Knappe, 2012). Es konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Verwendung von 10 mM oder 12 mM L-Carnitin für die S113L-Variante festgestellt werden. Daher wurden für alle weiteren Aktivitätsbestimmungen der His₆-N-*h*CPT2-Proteine (Wildtyp und S113L) 12 mM L-Carnitin und 30 µM Palmitoyl-CoA eingesetzt.

Dabei haben beide Proteine (His₆-N-*h*CPT2 und His₆-N-*h*CPT2/S113L) ähnliche Aktivitäten gezeigt (mindestens 39 U/mg bzw. 34 U/mg).

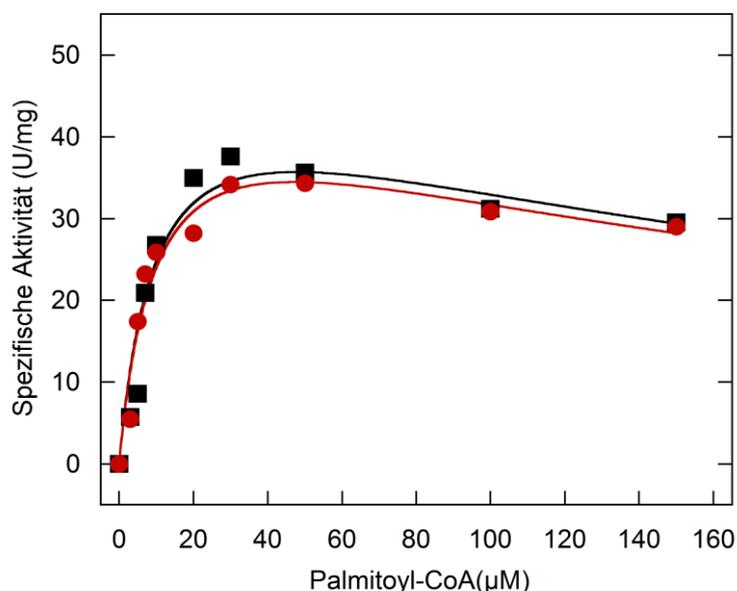


Abb. 3.2. v/S-Charakteristika der His₆-N-*h*CPT2 (schwarz) und His₆-N-*h*CPT2/S113L (rot) zum Ermitteln der Optimalkonzentration des Pal-CoA als variierendes Substrat und L-Carnitin im Überschuss. Die Experimente wurden durchgeführt, wie im Abschnitt 2.2.3.3. definiert.

3.4. Experimente zur Thermostabilität der CPT II-Enzyme

3.4.1. Thermoinaktivierung der Enzyme

Die Thermolabilität des mutierten Enzyms wurde beim CPT II-Mangel als Pathogenesemechanismus diskutiert. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden die rekombinanten Proteine (Wildtyp, S113L-Variante) bei 4 °C (auf Eis), 30 °C, 40 °C und 45 °C präinkubiert. Die Präinkubation bei 40 °C sollte die Fiebersituation im Körper simulieren, die bei CPT-II-Patienten häufig zur Auslösung von Attacken führt. Für die meisten Enzyme sinkt beim Überschreiten von 45 °C die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms aufgrund der zunehmenden Denaturierung (Gärtner, 2009; Knappe, 2012).

Die Temperatur-Erhöhung von 40 °C auf 45 °C führte zu einem sehr raschen Aktivitätsverlust bei dem mutierten Enzym. Im Vergleich zum Wildtyp wurde die S113L-Variante deutlich schneller sowohl bei 40 °C als auch bei 45 °C inaktiviert (Abb. 3.3, Tabelle 3.1). Diese Ergebnisse bestätigen die vorgeschlagene Thermolabilitäts-Theorie des Variante S113L.

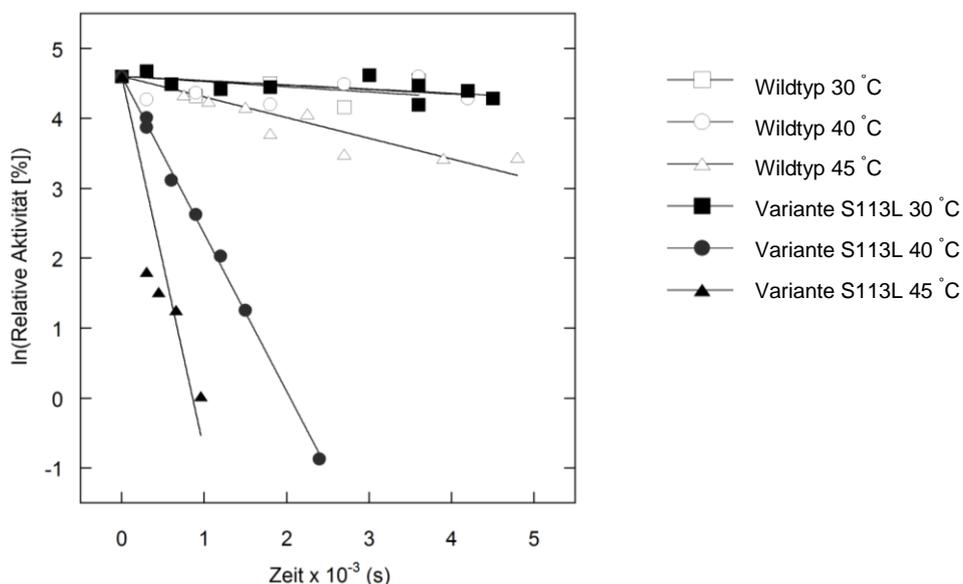


Abb. 3.3. Thermoinaktivierung der His₆-N-*h*CPT2 His₆-N-*h*CPT2/S113L bei verschiedenen Temperaturen (30 °C bzw. 40 °C oder 45 °C). Die Daten sind dargelegt als lineare Regression der in natürlichen Logarithmus transformierten relativen Aktivität (%) gegenüber der Zeit. Die Versuche wurden, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.1. Scheinbare Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung der rekombinanten *hCPT2*-Proteinen in Gegenwart von Substraten bei verschiedenen Temperaturen.

Effektor		Konzentration (μM)	His ₆ -N- <i>hCPT2</i>		His ₆ -N- <i>hCPT2</i> /S113L	
Name	Anzahl der Kohlenstoff- atome der Acylkette		$k^{\text{app}} 10^{-5} (\text{s}^{-1})$ bei 40 °C	$k^{\text{app}} 10^{-5} (\text{s}^{-1})$ bei 45 °C	$k^{\text{app}} 10^{-5} (\text{s}^{-1})$ bei 40 °C	$k^{\text{app}} 10^{-5} (\text{s}^{-1})$ bei 45 °C
kein Effektor			6,4 ± 3,3	29,5 ± 2,4	225,2 ± 2,7	534,9 ± 58,1
Palmitoyl-CoA	16	30	3,1 ± 1,9	118,1 ± 7,9	680,1 ± 113,2	> 700
L-Carnitin	keine Acyl-Reste	12000	3,6 ± 0,7	9,9 ± 2,2	78,7 ± 5,9	271,5 ± 16,5
Acetyl-L-carnitin	2	25	n.d.	32,6 ± 1,7	n.d.	46,8 ± 21,4
Isobutyryl-L-carnitin	4	25	n.d.	27,9 ± 1,8	n.d.	54,5 ± 19,7
Valeryl-L-carnitin	5	25	n.d.	28,1 ± 2,0	n.d.	173,2 ± 20,7
Hexanoyl-L-carnitin	6	25	n.d.	23,2 ± 0,7	n.d.	56,0 ± 19,4
Octanoyl-L-carnitin	8	25	n.d.	13,7 ± 0,1	n.d.	22,8 ± 0,9
Decanoyl-L-carnitin	10	25	0,29 ± 0,02	3,0 ± 0,2	0,24 ± 0,02	3,3 ± 0,2
Lauroyl-L-carnitin	12	25	0,26 ± 0,02	2,7 ± 0,3	0,18 ± 0,02	3,1 ± 0,2
Myristoyl-L-carnitin	14	25	0,24 ± 0,02	2,7 ± 0,2	0,24 ± 0,01	3,3 ± 0,2
Palmitoyl-L-carnitin	16	25	0,27 ± 0,02	4,0 ± 0,3	0,23 ± 0,01	4,4 ± 0,3

Enzyme wurden mit dem jeweiligen Substrat bei den angegebenen Temperaturen präinkubiert. Die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung wurden bei der Anpassung der zeitabhängigen Abnahme der Enzymaktivität, wie im Methodenteil beschrieben, bestimmt. n.d. nicht bestimmt

3. Ergebnisse

Tabelle 3.2. Scheinbare Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung der rekombinanten *hCPT2*-Proteinen in Gegenwart von Effektoren bei verschiedenen Temperaturen.

Effektor	Konzentration (μM)	His ₆ -N- <i>hCPT2</i>				His ₆ -N- <i>hCPT2</i> /S113L			
		bei 4 °C		bei 30 °C		bei 4 °C		bei 30 °C	
		$k^{app} 10^{-5}$ (s ⁻¹)	Restaktivität (%)	$k^{app} 10^{-5}$ (s ⁻¹)	Restaktivität (%)	$k^{app} 10^{-5}$ (s ⁻¹)	Restaktivität (%)	$k^{app} 10^{-5}$ (s ⁻¹)	Restaktivität (%)
Malonyl-CoA	10	39,9 ± 10,9	72	111,0 ± 17,1	72	26,8 ± 3,5	40	38,1 ± 4,4	40
	100	56,0 ± 24,8		126,4 ± 1,8		66,8 ± 8,2		110,7 ± 24,6	
	200	79,9 ± 18,1		191,6 ± 116,6		81,5 ± 6,7		113,3 ± 6,4	
Malonsäure (Malonat)	10	11,3 ± 5,6	73	43,3 ± 12,4	73	9,9 ± 5,7	5	18,7 ± 2,0	5
	100	26,9 ± 12,3		72,1 ± 28,8		30,8 ± 2,4		129,6 ± 14,5	
	200	40,5 ± 17,3		146,1 ± 27,9		21,9 ± 3,7		197,9 ± 14,0	

Enzyme wurden mit dem jeweiligen Effektor bei den angegebenen Temperaturen präinkubiert. Die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung wurden bei der Anpassung der zeitabhängigen Abnahme der Enzymaktivität, wie im Methodenteil beschrieben, bestimmt.

3.5. Der Effekt der Substrate auf Aktivität der Enzyme

Durch Röntgenkristallstrukturanalyse des Rattenzym (mit 91,2 % Homologie zum humanen Enzym) zeigte sich, dass sich in dem Y-förmigen aktiven Zentrum von CPT II drei Bindungsstellen für Carnitin, Acyl- und CoA-Derivate befinden (Hsiao et al., 2006; Rufer et al., 2006). Die alleinige Bindung eines der Substrate an einer dieser Stellen könnte die Stabilität des Enzyms beeinflussen. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde der Effekt der Substrate auf die Aktivität der Proteine (His₆-N-*hCPT2* und His₆-N-*hCPT2/S113L*) untersucht.

3.5.1. Acyl-CoA

Die Präinkubation von His₆-N-*hCPT2* und His₆-N-*hCPT2/S113L* mit dem nativen Substrat Palmitoyl-CoA vor der Zugabe von L-Carnitin erhöhte insgesamt die Geschwindigkeitskonstante der Thermo-Inaktivierung bei 40 °C und 45 °C. Dieser Effekt war bei 40 °C für den Wildtyp weniger ausgeprägt (Abb. 3.4, Tabelle 3.1).

Im Unterschied zu Palmitoyl-CoA führte die Präinkubation mit L-Carnitin zu einer höheren Thermostabilität der beiden Proteine (Wildtyp, Variante S113L) bei 45 °C. Für das mutierte Enzym zeigte sich dieser Effekt auch bei 40 °C.

3.5.2. L-Carnitin und Acyl-L-carnitine

Sowohl der Wildtyp als auch die S113L-Variante zeigten eine höhere kinetische Stabilität nach der Präinkubation mit L-Carnitin bei 40 °C und 45 °C (Abb. 3.5, Tabelle 3.1).

Um den Effekt von Palmitoyl-L-carnitin auf die Enzym-Aktivität (Abschnitt 2.2.3.3.) zu analysieren, wurde die Aktivität der Proteine (His₆-N-*hCPT2* und His₆-N-*hCPT2/S113L*) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen dieses nativen Substrats gemessen.

In Anwesenheit von 25 µM Palmitoyl-L-carnitin zusätzlich im Assay-Ansatz blieb die Aktivität der Enzyme unbeeinflusst. Die gleichzeitige Zugabe von höheren Konzentrationen Palmitoyl-L-carnitin des Reaktionsprodukts führte zu einer progressiven Hemmung beider Enzyme nach einer Reaktion erster Ordnung. Diese

3. Ergebnisse

Hemmung war jedoch viel stärker ausgeprägt für die Variante S113L im Vergleich zum Wildtyp. Die Restaktivität der Variante S113L bei der Zugabe von 200 μM Palmitoyl-L-carnitin betrug nur 60% des Wildtyps unter den gleichen Bedingungen.

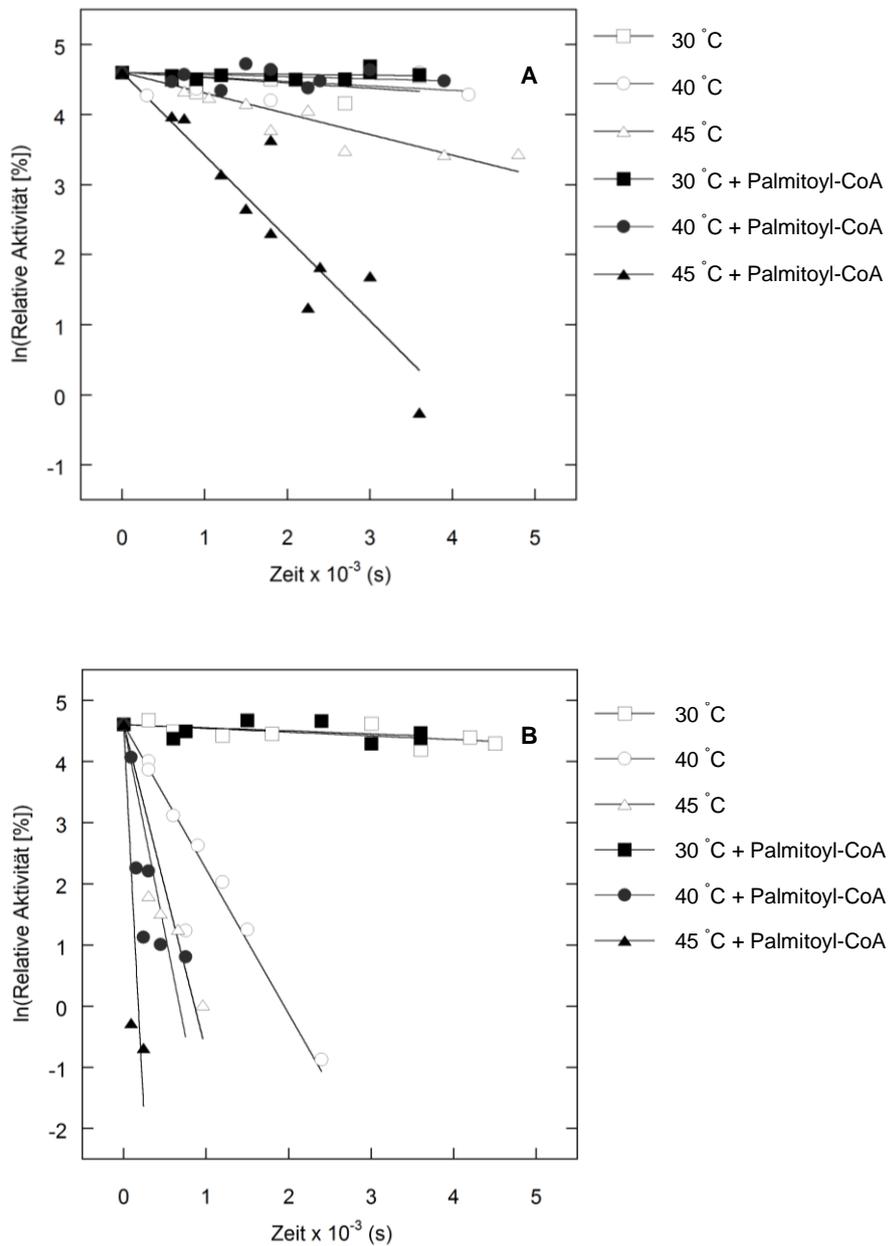


Abb. 3.4. Beschleunigung der Thermoinaktivierung der rekombinanten Proteine durch Palmitoyl-CoA bei verschiedenen Temperaturen (A) His₆-N-hCPT2 (B) His₆-N-hCPT2/S113L.

Die Daten sind dargestellt als lineare Regression der mit dem natürlichen Logarithmus transformierten relativen Aktivität (%) gegenüber der Zeit. Die Versuche wurden durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben.

3. Ergebnisse

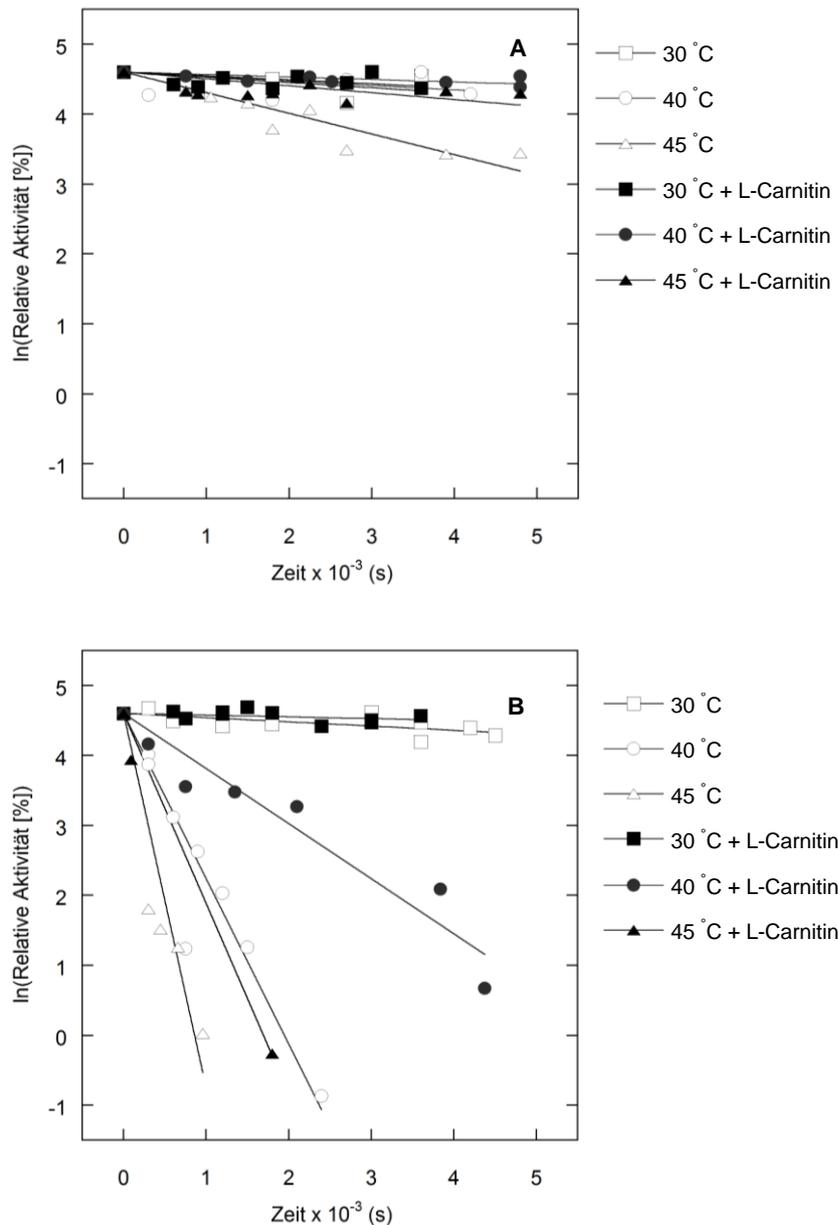


Abb. 3.5. Verlangsamung der Thermoaktivierung der rekombinanten Proteine durch L-Carnitin bei verschiedenen Temperaturen (A) His₆-N-hCPT2 (B) His₆-N-hCPT2/S113L.

Die Daten sind dargestellt als lineare Regression der mit dem natürlichen Logarithmus transformierten relativen Aktivität (%) gegenüber der Zeit. Die Versuche wurden durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben.

Aufgrund dieser Ergebnisse erschien es sinnvoll, herauszufinden, ob die Acyl-L-carnitin-Derivate auch einen ähnlichen Effekt der Thermostabilisierung wie L-Carnitin zeigen würden. Dafür wurden die rekombinanten Enzyme (His₆-N-hCPT2 und His₆-N-hCPT2/S113L) mit den Acyl-L-carnitin-Derivaten unterschiedlicher Ket-

3. Ergebnisse

tenlänge bei 45 °C präinkubiert. Die Aktivitätsmessungen erfolgten nach verschiedenen Inkubationszeiten.

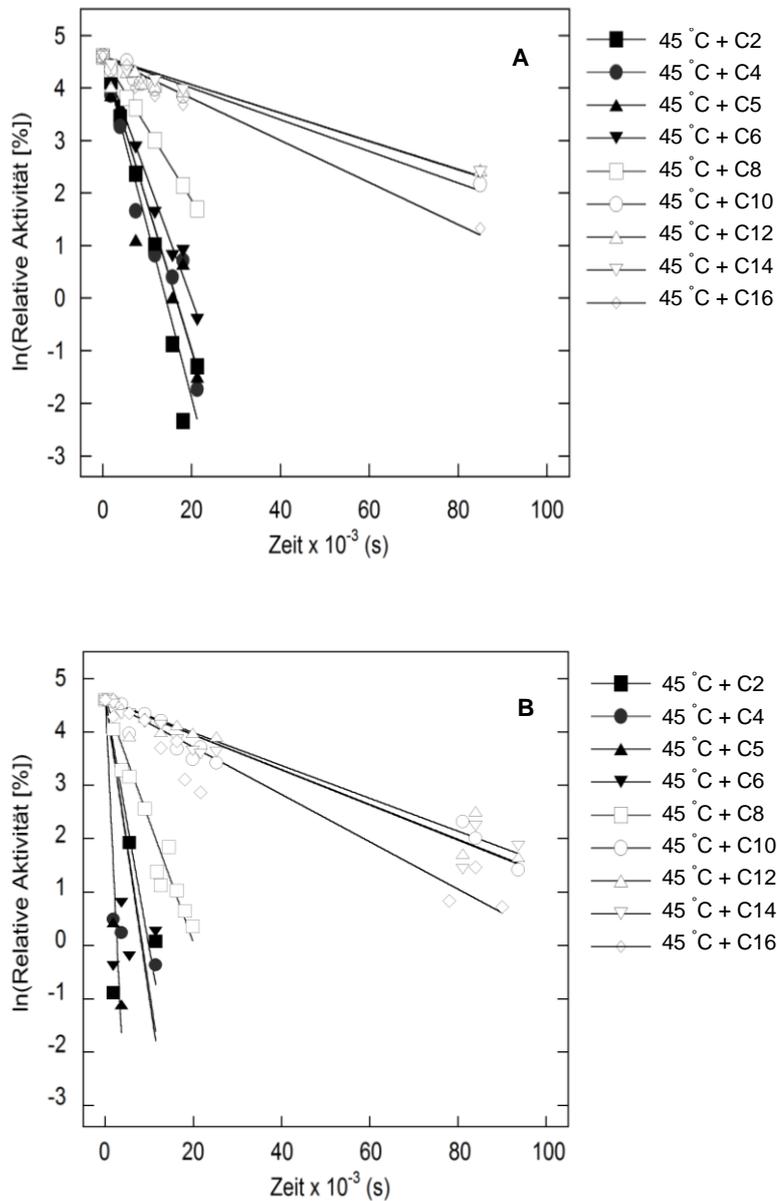


Abb. 3.6. Thermostabilisierung von His₆-N-hCPT2 (A) und His₆-N-hCPT2/S113L (B) durch die Präinkubation mit Acyl-L-carnitinen bei 45 °C.

Die Daten sind dargestellt als lineare Regression der mit dem natürlichen Logarithmus transformierten relativen Aktivität (%) gegenüber der Zeit. Die Versuche wurden, wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die kurzkettigen Acyl-L-carnitine (C2, C4, C5 und C6) zeigten einen sehr geringen Effekt der Thermostabilisierung bei beiden Proteinen (His₆-N-*h*CPT2 und His₆-N-*h*CPT2/S113L) (Abb. 3.6, Tabelle 3.1)

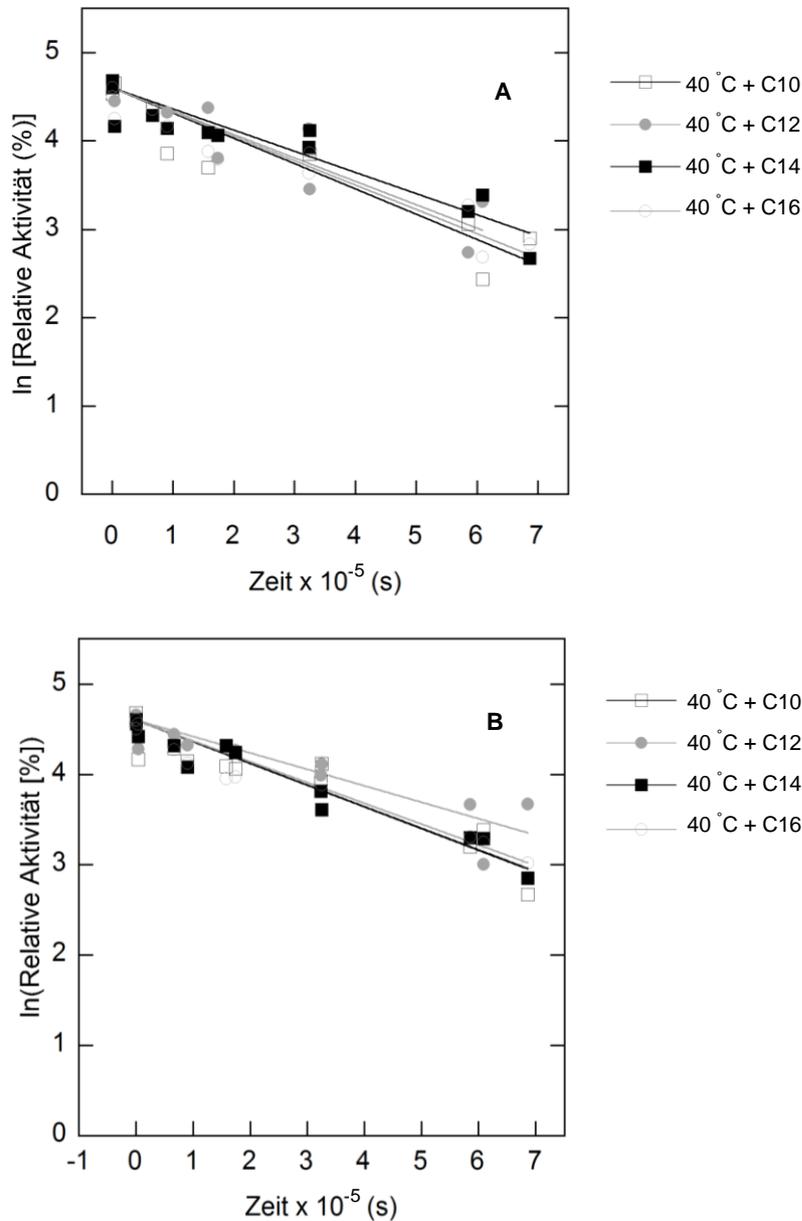


Abb. 3.7. Thermostabilisierung der rekombinanten Proteine durch die Präinkubation mit mittelkettigen Acyl-L-carnitinen und Palmitoyl-L-carnitin bei 40 °C. (A) His₆-N-*h*CPT2, (B) His₆-N-*h*CPT2/S113L.

Die Daten sind dargestellt als lineare Regression der mit dem natürlichen Logarithmus transformierten relativen Aktivität (%) gegenüber der Zeit. Die Versuche wurden durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben.

3. Ergebnisse

Beide Proteine zeigten nach der Präinkubation mit den drei mittelkettigen Acyl-L-carnitinen (C10, C12, C14) und C16 bei 45 °C ein deutlich stabileres Verhalten. In diesem Fall waren die gemessenen Aktivitäten des mutierten Enzyms ähnlich der Wildtyp-Aktivität. Die Inaktivierungskonstanten (k) der Proteine (His₆-N-*h*CPT2 und His₆-N-*h*CPT2/S113L) bei der Präinkubation mit Octanoyl-L-carnitin lagen zwischen den Werten der kurz- und mittelkettigen Acyl-L-carnitine (Abb. 3.6, Tabelle 3.1).

Um diesen Aspekt detaillierter analysieren zu können, wurden die Präinkubations-Experimente mit C10-C16 bei 40 °C durchgeführt. Demzufolge hat sich die Thermostabilität des Wildtyps und der Variante S113L um den Faktor 24 bzw. 1000 verbessert. Dabei wiesen beide Proteine (His₆-N-*h*CPT2 und His₆-N-*h*CPT2/S113L) sehr ähnliche Profile der Thermo-inaktivierung auf (Abb. 3.7, Tabelle 3.1).

3.5.2.1. Moleküldynamische Studien

MD-Studien, durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl an CPT II im Komplex mit Palmitoyl-L-carnitin zeigten ein ähnliches Verhalten des Wildtyps und der Variante S113L in Bezug auf die Temperatur.

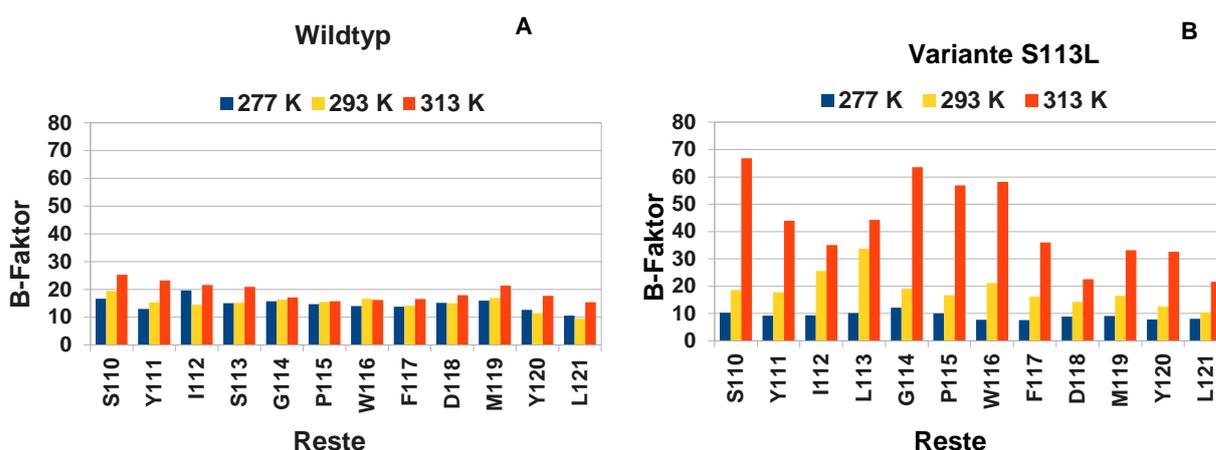


Abb. 3.8. Der B-Faktor der Reste S110-L121 wurde berechnet über eine 22 ns MD-Simulation für (A) Wildtyp und (B) S113L-Variante bei 277 K, 293 K und 313 K. Der erhöhte B-Faktor zeigt eine erhöhte Flexibilität der Reste S110-L121 der Variante S113L bei 313 K (40 °C) im Vergleich zum Wildtyp. Die Abbildung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl angefertigt.

3. Ergebnisse

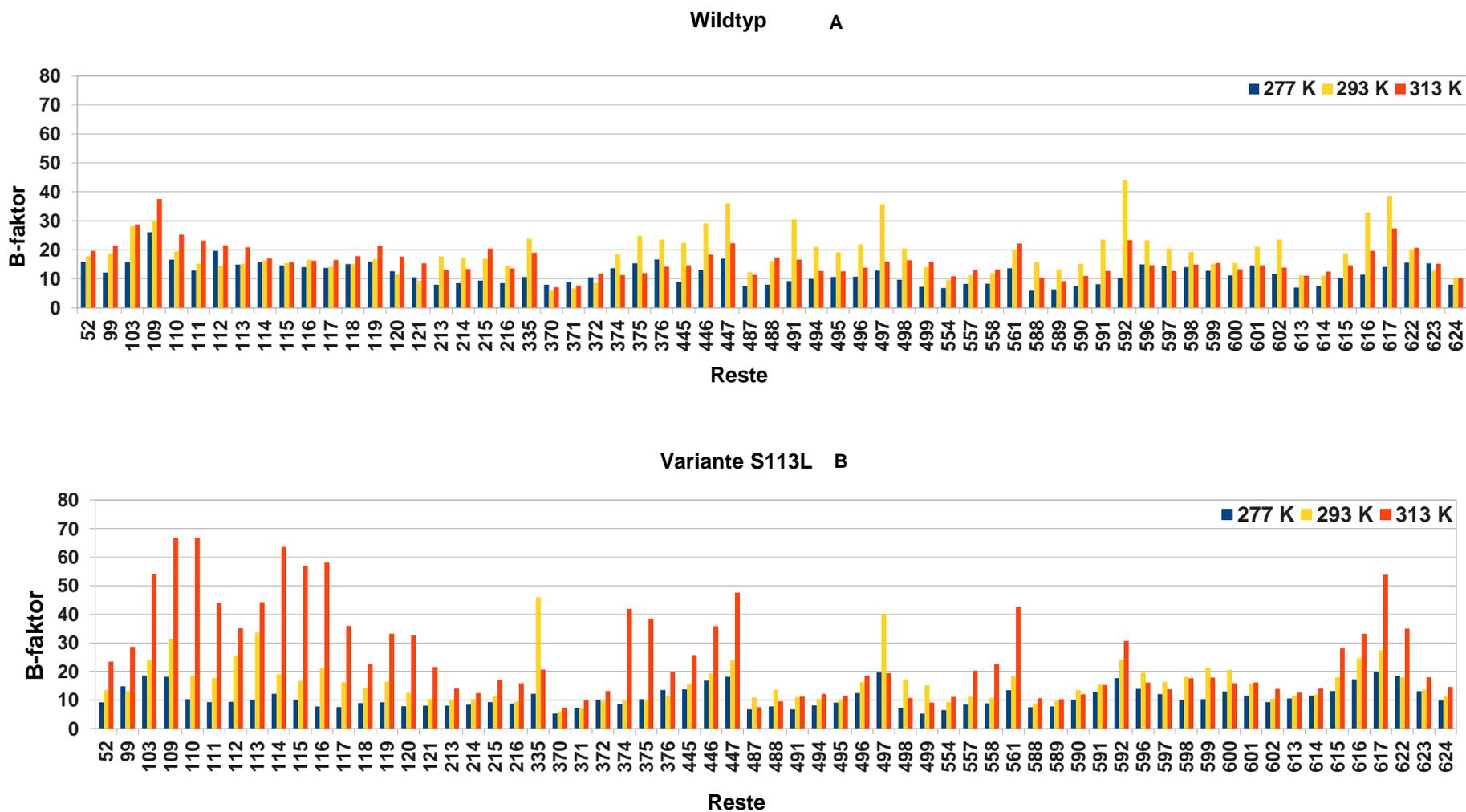


Abb. 3.9. Der B-Faktor der Reste entlang der Acyl-L-carnitin-Bindungsstelle und die Rückstände innerhalb von 8 Å der Mutationsstelle S113L, berechnet über eine 22 ns MD-Simulation für (A) Wildtyp und (B) Variante S113L bei 277 K, 293 K und 313 K. Der erhöhte B-Faktor zeigt eine erhöhte Flexibilität der Reste der Variante S113L bei 313 K (40 °C) im Vergleich zum Wildtyp. Die Abbildung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl angefertigt.

3. Ergebnisse

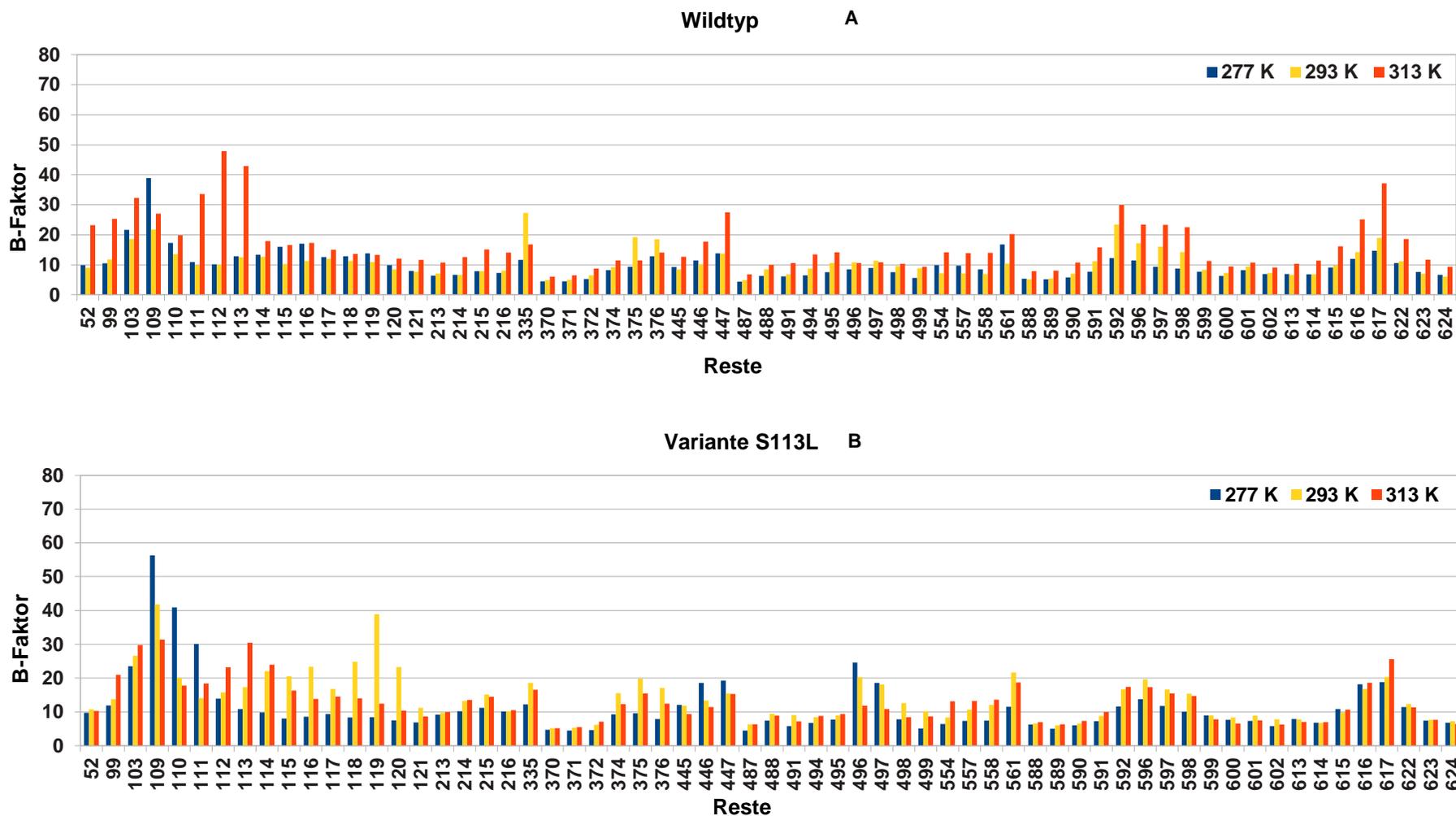


Abb 3.10. Der B-Faktor der Reste entlang der Acyl-L-carnitin-Bindungsstelle und die Rückstände innerhalb von 8 Å der Mutationsstelle S113L, berechnet über einer 22 ns MD-Simulation für (A) Wildtyp und (B) Variante S113L im Komplex mit Palmitoyl-L-carnitin bei 277 K, 293 K und 313 K. Im Komplex mit Acyl-L-carnitin zeigen die Reste der Variante S113L keine erhöhte Flexibilität bei 313 K (40 °C) im Vergleich zum Wildtyp. Die Abbildung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl angefertigt.

3. Ergebnisse

Bei der S113L-Variante zeigte der B-Faktor der Reste in der Umgebung der Mutationsstelle keinen Anstieg bei der höheren Temperatur von 313 K (40 °C) (Abb. 3.8.). Die Flexibilität der Mutationsstelle (S110-L121), der Acyl-L-carnitin-Bindungsstelle (Abbildungen 3.9 und 3.10) sowie des gesamten Proteins (Abb. 3.11) war bei 313 K niedriger für den Komplex (S113L-Variante mit Palmitoyl-L-carnitin) als für die Variante S113L.

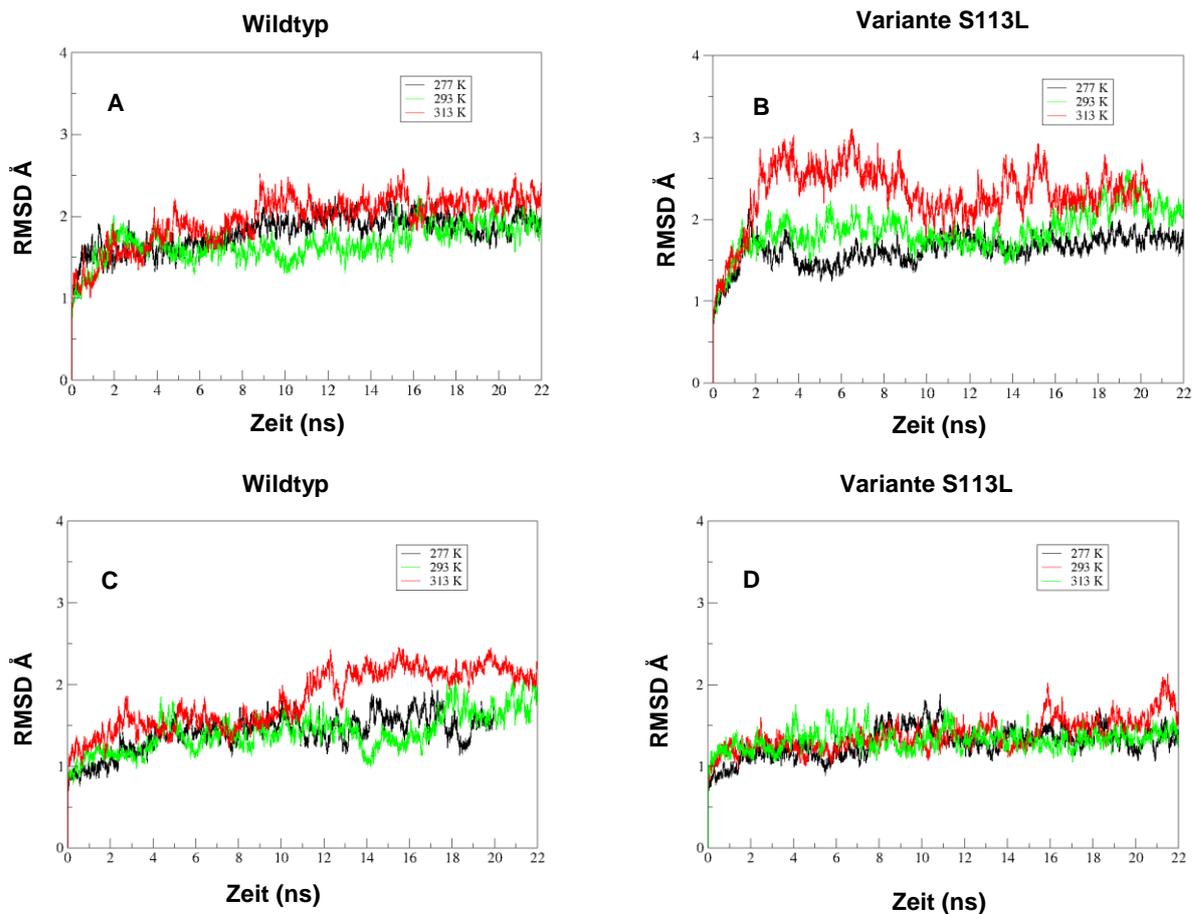


Abb. 3.11: RMSD der Atome des Proteinrückgrats ($C\alpha$, N , C) bei unterschiedlichen Temperaturen mit Bezug auf die Eingangsstruktur. (A) CPT II Wildtyp. (B) Variante S113L von CPT II. (C) CPT II Wildtyp im Komplex mit Palmitoyl-L-Carnitin. (D) Variante S113L im Komplex mit Palmitoyl-L-carnitin. Die Abbildung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl angefertigt.

3.6. Hemmungsstudien

3.6.1. Malonyl-CoA

Um die mögliche Inhibierung der CPT II durch Malonyl-CoA tiefer zu ergründen, wurde der Effekt von Malonyl-CoA auf die rekombinanten CPT II-Enzyme untersucht.

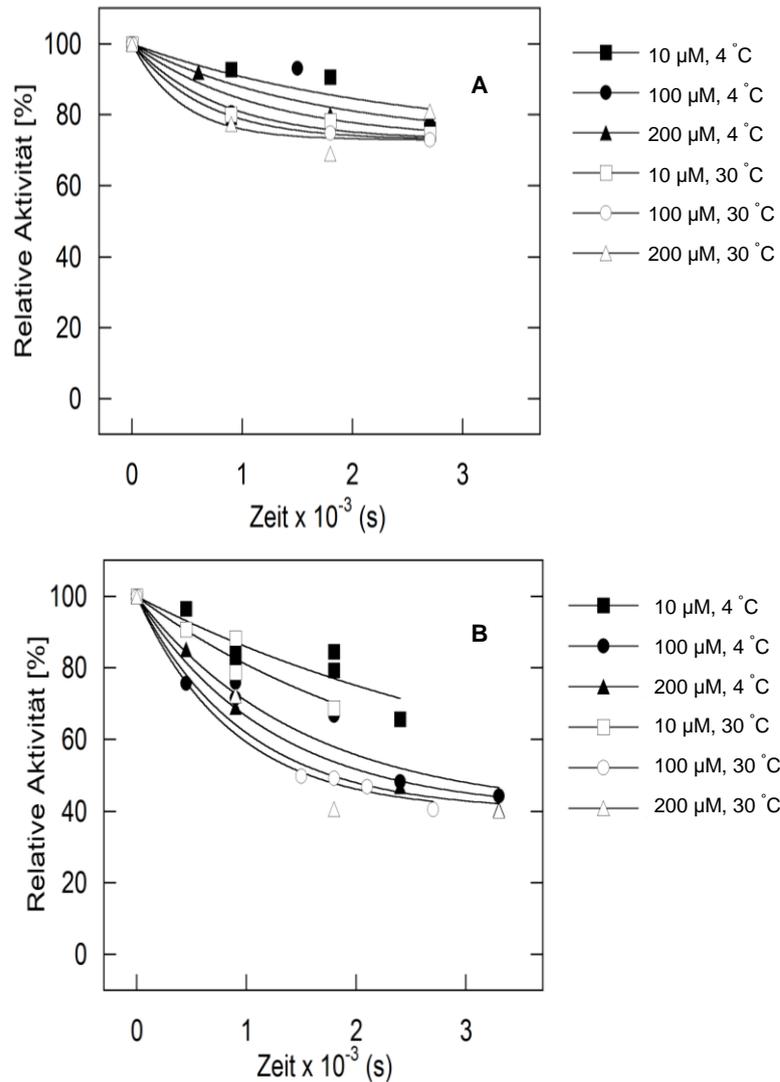


Abb. 3.12. (A) Die Inaktivierung des His₆-N-hCPT2 bei verschiedenen Temperaturen beeinflusst von Malonyl-CoA. (B) Inaktivierung von His₆-N-hCPT2/S113L bei verschiedenen Temperaturen beeinflusst von Malonyl-CoA. Variante S113L wird im Vergleich zum Wildtyp stärker durch Malonyl-CoA gehemmt.

Die Daten sind dargestellt als relative Aktivität (%) gegenüber der Zeit. Die Versuche wurden durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben.

3. Ergebnisse

Dafür wurde zunächst in einer Serie von Simultan-Experimenten der DTNB-Aktivitätstest (Abschnitt 2.2.3.3.) in Gegenwart von Malonyl-CoA in der Küvette durchgeführt. Hierbei konnte keine Aktivitätsänderung dokumentiert werden.

Anschließend wurden die Proteine (His₆-N-*hCPT2* und His₆-N-*hCPT2/S113L*) mit verschiedenen Konzentrationen von Malonyl-CoA (10 µM, 100 µM oder 200 µM) bei 4 °C bzw. 30 °C präinkubiert. Die Aktivitätsmessungen (Abschnitt 2.2.3.3.) nach unterschiedlichen Zeiträumen zeigten, dass 10 µM Malonyl-CoA weder Wildtyp noch Variante S113L bei 4 °C und 30 °C hemmen. Durch die Präinkubation mit 100 µM oder 200 µM Malonyl-CoA bei 4 °C jedoch wurde die Variante S113L leicht gehemmt (Tabelle 3.2). Die Präinkubation des mutierten Enzyms bei 30 °C mit 100 µM oder 200 µM Malonyl-CoA führte jedoch im Vergleich mit dem Wildtyp zu einem ausgeprägten Hemmungseffekt. Wie in der Abbildung 3.12 zu sehen ist, war dieser Aktivitätsverlust zeitabhängig.

3.6.2. Malonsäure

Um herauszufinden, ob der Hemmungseffekt mit dem CoA- oder Malonat-Teil zusammenhängt, wurden die oben beschriebenen Experimente statt mit Malonyl-CoA mit Malonsäure durchgeführt. Die Ergebnisse der Hemmung mit 10 µM Malonsäure bei 4 °C und 30 °C waren ähnlich wie die mit Malonyl-CoA. Der Hemmungseffekt von 100 µM bzw. 200 µM Malonsäure war aber viel stärker als von Malonyl-CoA bei dieser Konzentration. Infolgedessen zeigte das mutierte Enzym nach 60 minütiger Präinkubation mit diesen Konzentrationen bei 30 °C einen kompletten Aktivitätsverlust (Abb. 3.13 und Tabelle 3.2). Der Hemmungseffekt dieser Konzentrationen in der Präinkubation war bei 4 °C vergleichbar mit dem Effekt von Malonyl-CoA.

3.6.3. Reversibilität der Hemmung

Das Ziel dieser Versuchsserie war zu ermitteln, ob Palmitoyl-CoA als Co-Substrat in der Lage ist, das gehemmte Enzym zu reaktivieren. Dazu wurden die Enzyme (His₆-N-*hCPT2* und His₆-N-*hCPT2/S113L*) bei 30 °C mit 10 µM, 100 µM oder 200 µM Malonyl-CoA bzw. Malonsäure präinkubiert. Nach verschiedenen Inkuba-

3. Ergebnisse

tionszeiten wurde die Aktivität des präinkubierten Enzyms gemessen. Der Reaktionsstart erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.3.3. beschrieben, durch Zugabe des Enzyms. 30 μM Palmitoyl-CoA wurde allerdings erst 60 Sekunden nach Reaktionsbeginn der Küvette hinzugefügt.

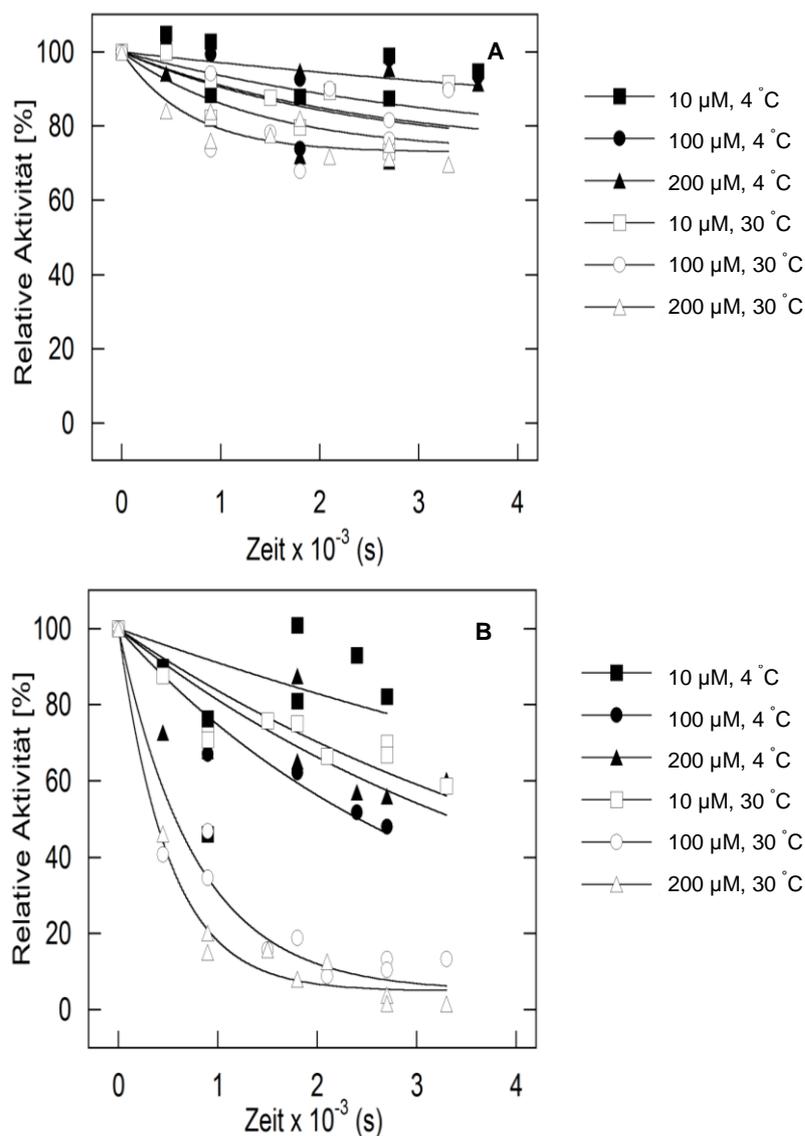


Abb. 3.13. (A) Inaktivierung von His₆-N-hCPT2 bei unterschiedlichen Temperaturen beeinflusst von Malonsäure (Malonat). (B) Die Inaktivierung von His₆-N-hCPT2/S113L bei unterschiedlichen Temperaturen beeinflusst durch Malonsäure (Malonat). Variante S113L wird im Vergleich zum Wildtyp viel stärker durch Malonsäure (Malonat) gehemmt.

Die Daten sind dargestellt als relative Aktivität (%) gegenüber der Zeit. Die Versuche wurden durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben.

3. Ergebnisse

Der mit verschiedenen Malonyl-CoA-Konzentrationen präinkubierte Wildtyp konnte sogar nach der verzögerten Zugabe von Palmitoyl-CoA die normale Aktivität erreichen. Das mutierte Enzym, das mit 10 μM Malonyl-CoA präinkubiert wurde, zeigte das gleiche Verhalten. Im Falle der Präinkubation mit 100 μM oder 200 μM Malonyl-CoA bzw. Malonsäure war jedoch Palmitoyl-CoA nicht in der Lage, die Hemmung des mutierten Enzyms unwirksam zu machen.

3.6.4. Malonyl-CoA als Substrat

Diese Versuchsserie wurde durchgeführt um herauszufinden, ob Malonyl-CoA als Donor der CoA-SH Gruppe Palmitoyl-CoA ersetzen könnte. In einer Messreihe der Proteine (His₆-N-*h*CPT2 und His₆-N-*h*CPT2/S113L) wurde bei der Messung der Aktivität (Abschnitt 2.2.3.3.) statt Palmitoyl-CoA, Malonyl-CoA in der Küvette eingesetzt. In diesen Experimenten konnte weder bei dem Wildtyp noch bei der Variante S113L eine Aktivität nachgewiesen werden.

3.6.5. *docking*-Studien

Mit Hilfe eines Homologie-Modells der humanen CPT II (Abschnitt 2.2.7.1.) wurden mögliche Bindungsstellen von Malonyl-CoA an CPT II in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl ermittelt. Das Homologie-Modell der humanen CPT II sowie die Röntgenstruktur von CPT II aus der Ratte besitzen einen Y-förmigen Tunnel, bestehend aus Bindungsstellen für Acyl-, CoA- und L-Carnitin-Einheiten (Rufer et al., 2006; Abb. 3.15).

Bei beiden Komplexen bevorzugt die Carboxylatgruppe von Malonyl-CoA eine Wechselwirkung mit polaren Resten der Bindungstasche. Im Fall der Bindung an die CoA-Bindestelle (Abb. 3.14 B) kann L-Carnitin dennoch an seiner, von Kristallstrukturen der Carnitin-Analoga mit CPT II (2RCU.pdb) bekannten Bindungsstelle binden.

Ein Vergleich der Bindung von Malonyl-CoA an CPT II gegenüber der Bindung von Palmitoyl-CoA in Zusammenhang mit der L-Carnitin-Bindung ist in den Abbildungen 3.15 und 3.17 schematisch dargestellt.

3. Ergebnisse

Malonat wurde ebenfalls in die Kristallstruktur von CPT II andockt. Die Wechselwirkung mit Malonat war ähnlich der beobachteten Interaktion mit der Carboxylat-Kopfgruppe des Malonyl-CoAs (Daten nicht gezeigt).

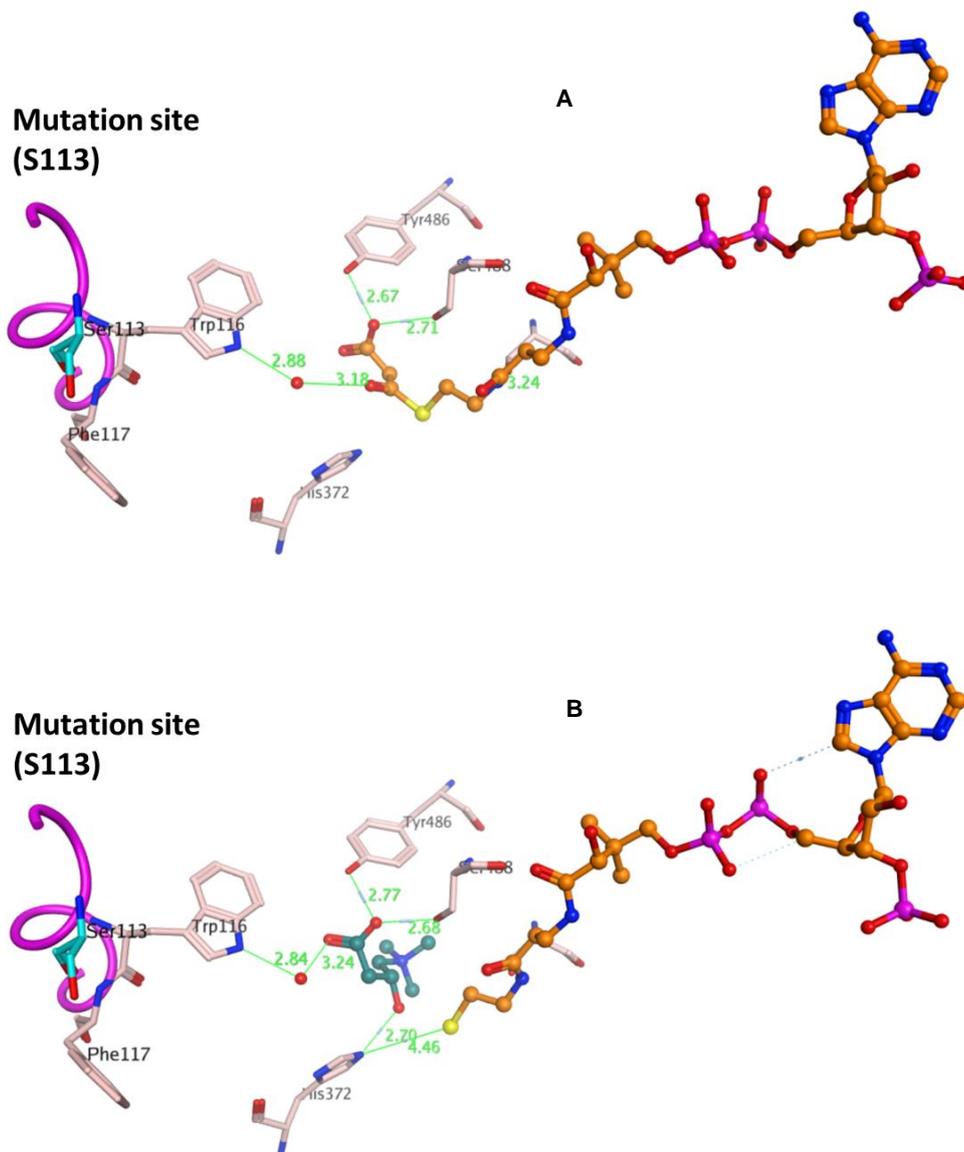


Abb. 3.14. (A) Interaktion von Malonyl-CoA (orange) mit dem aktiven Zentrum der CPT II (B) Die Wechselwirkung von L-Carnitin (dunkelgrün) und CoA (orange) mit CPT II.

Das konservierte Wassermolekül W88 wurde als rote Kugel dargestellt. Die α -Helix mit der S113L-Mutation ist als Schleife in magenta dargestellt. Zur besseren Übersicht sind nur Reste des aktiven Zentrums gezeigt. Wasserstoffbrücken sind als Linien dargestellt und Abstände wurden in Angström angegeben.

Die Abbildung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl angefertigt.

3. Ergebnisse

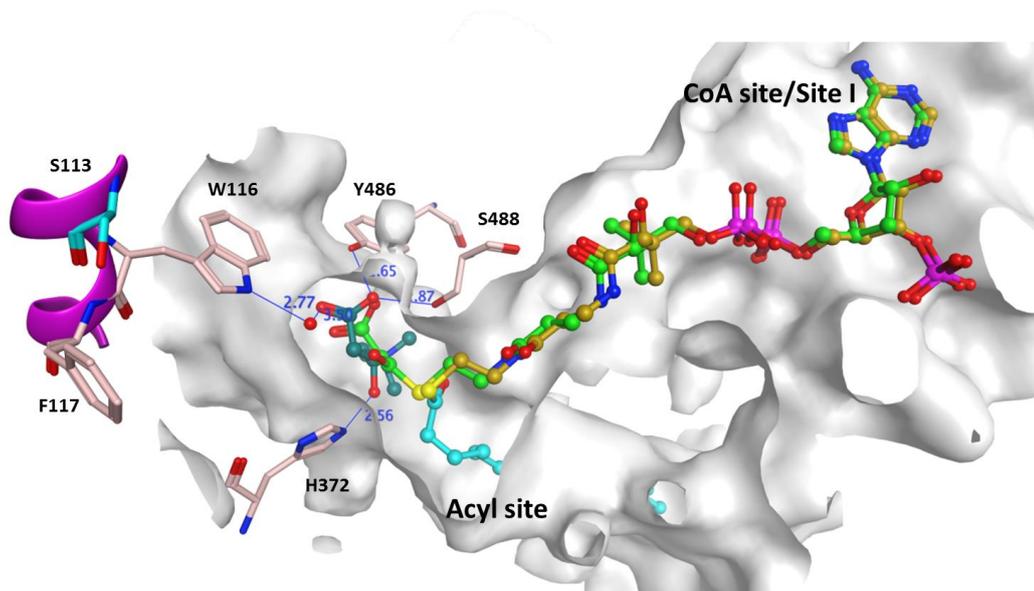


Abb. 3.15. Vergleich der Interaktion von Malonyl-CoA mit L-Carnitin und Palmitoyl-CoA an der Stelle I. Palmitoyl-CoA ist in hellbraun und cyan (Palmitoyl-Teil), Malonyl-CoA in grün und L-Carnitin in dunkelgrün dargestellt. Wasserstoffbrücken sind als blaue Linien (Abstände in Å angegeben) gezeigt. Die alpha-Helix, die die Mutation S113L beherbergt, ist als Farbband in magenta gezeigt. Die molekulare Oberfläche der Stelle I ist in weiß dargestellt.

Die Abbildung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl angefertigt.

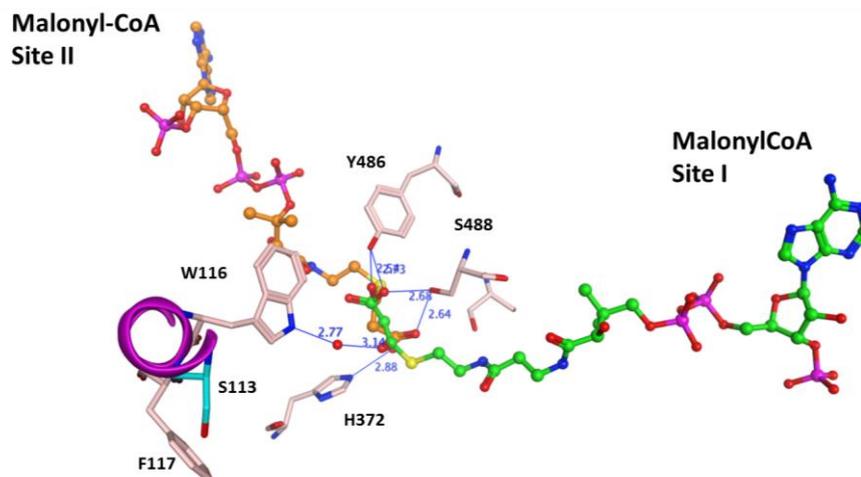


Abb. 3.16. Vergleich der beiden Bindungsstellen für Malonyl-CoA. Während das Malonyl-CoA gebunden an die Stelle II orange gefärbt ist, wurde das gebundene Malonyl-CoA an die Stelle I in grün dargestellt.

Das konservierte Wassermolekül W88 wurde als rote Kugel dargestellt. Die α -Helix mit der Mutation S113L wird als Schleife in magenta dargestellt. Zur besseren Übersicht sind nur Reste des aktiven Zentrums gezeigt. Wasserstoffbrücken sind als Linien dargestellt und Abstände wurden in Angström angegeben.

Die Abbildung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl angefertigt.

3. Ergebnisse

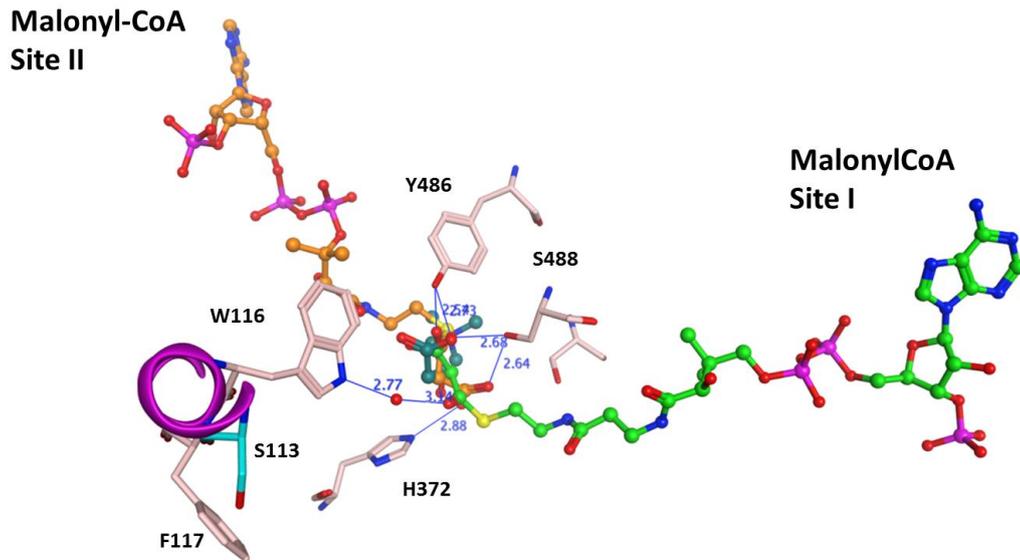


Abb. 3.17. Vergleich der Interaktion von Malonyl-CoA an den Stellen I und II. Malonyl-CoA an der Stelle I ist in grün und an der Stelle II in orange dargestellt. L-Carnitin ist dunkelgrün gefärbt. Die Wechselwirkung von L-Carnitin ist an beiden Standorten überlappend mit der Malonyl-CoA-Interaktion. Wasserstoffbrücken sind als blaue Linien (Abstände in Å angegeben) gezeigt. Die alpha-Helix, die die Mutation S113L beherbergt, ist als Farbband in magenta gezeigt. Die molekulare Oberfläche der Stelle I ist in weiß dargestellt.

Die Abbildung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl angefertigt.

4. Diskussion

4.1. Aktivitätstest

4.1.1. Optimierung des Aktivitätstests

Laut KNAPE (Knappe, 2012) soll bei höheren Konzentrationen des Co-Substrates Palmitoyl-CoA eine Substratüberschusshemmung der CPT II-Enzymaktivität eintreten.

Unter Berücksichtigung dieser Daten und der von anderen Autoren verwendeten Konzentrationen beim CPT II-Aktivitätstest wurde zur Optimierung des Tests die Optimal-Konzentrationen der Substrate erneut überprüft.

Zu diesem Zweck wurde in einer Messreihe das erste Substrat, L-Carnitin, im Überschuss eingesetzt. Beim anschließenden Variieren der Palmitoyl-CoA-Konzentration konnte ein Effekt der Substratüberschusshemmung bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Daten von KNAPE (Knappe, 2012) konnte dieser Effekt allerdings erst bei etwa 10-fach höheren Konzentrationen von Palmitoyl-CoA festgestellt werden.

4.1.2. Aktivität der Variante S113L

Patienten mit der muskulären Form des CPT II-Mangels erleben im Gegensatz zu Patienten mit L-Carnitin-Mangel nur die Rhabdomyolyse-Attacken und keine persistente oder sogar progressive Muskelschwäche (Jerusalem and Zierz, 2003).

Außerdem tritt die muskuläre Form des CPT II-Mangels häufig erst im frühen Erwachsenenalter auf (Jerusalem and Zierz, 2003).

Diese klinischen Beobachtungen bei Patienten mit CPT II-Mangel könnten ein Hinweis auf ein enzymatisch aktives CPT II-Protein sein, das unter extremen Bedingungen wie Fieber, Kälteexposition, Infektionen oder Fasten jedoch abnorm reguliert wird.

Die Aktivitätsmessung der rekombinanten Enzyme (His₆-N-*h*CPT2 und His₆-N-*h*CPT2/S113L) mittels optimierten DTNB-Tests (Abschnitt 2.2.3.3.) führte zu ähnli-

chen Aktivitätswerten der beiden Proteine. Dies ist eine Bestätigung für Präsenz eines enzymatisch aktiven Enzyms in Patienten mit S113L-Mutation.

4.1.3. Der Effekt der S113L-Mutation

Anhand der Kristallstruktur der Ratten-CPT II, zeigte sich, dass Serin 113 am Aminoterminal der $\alpha 5$ -Helix nahe der Domänen-Schnittstelle (Isackson et al., 2006; Rufer et al., 2006). Trp116 bildet zusammen mit Tyr486, Ser488 und einem gebundenen Wassermolekül ein Wasserstoffbrückennetzwerk in der L-Carnitin-Bindungstasche. Die Mutation von Serin113 zu einem größeren, hydrophoben Leucin verändert die Wechselwirkung mit dem benachbarten Phe117. Diese Veränderung kann die Lage und Umgebung von katalytisch wichtigen Resten wie Trp116 und S486 beeinflussen.

4.2. Thermoinstabilität

Bei Patienten mit CPT II-Mangel wurde häufig das Auftreten von Rhabdomyolyse-Attacken nach körperlichen Belastungen oder Fieber beschrieben. Daher wurde eine Thermoinstabilität des mutierten Enzyms von einigen Arbeitsgruppen als Auslöser für diese Probleme vorgeschlagen (Olpin et al., 2003; Chen et al., 2005; Yao et al., 2011; Kubota et al., 2012).

Olpin et. al konnten die Thermoinstabilität des S113L mutierten Enzyms in Fibroblasten der CPT II-Patienten nachweisen. Dabei wurden die Fibroblasten der CPT II-Patienten und Kontrollen drei Wochen bei 37 °C bzw. 41 °C kultiviert. Nach dieser Zeit wurde die CPT II-Aktivität unter der Hemmung von CPT I durch 0,2 % Tween-20 bei diesen beiden Temperaturen bestimmt (Olpin et al., 2003).

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden die Experimente der Thermoinaktivierung durch Präinkubation der rekombinanten Proteine bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Die Präinkubation von His₆-N-*h*CPT2/S113L bei 40 °C im Vergleich zum Wildtyp hat zu einem viel schnelleren Aktivitätsverlust geführt. Dieser Effekt war bei 45 °C noch stärker ausgeprägt. Dabei konnte die Thermolabilität der S113L-Variante im Vergleich zum Wildtyp bestätigt werden.

4. Diskussion

Die mögliche Thermoinstabilität der CPT II bei Patienten wurde auch als Auslösefaktor für Fälle von Influenza assoziierter Enzephalopathie (IAE) vorgeschlagen (Chen et al., 2005; Yao et al., 2008).

IAE ist eine schwere neurologische Komplikation der Influenzainfektion. IAE ist charakterisiert durch hohes Fieber innerhalb von 12 bis 48 Stunden, verbunden mit Fieberkrämpfen, schweren Hirnödemen, Multiorganversagen und einer hohen Mortalitätsrate (Chen et al., 2005; Yao et al., 2008). Chen et al. konnten bei 41.2 % der IAE-Patienten im Serum eine Erhöhung der C16:0+C18:1/C2-Rate während der Fieberkrämpfe nachweisen. Dieser Wert war bei Patienten mit schweren klinischen Folgen in der Fieber-Phase sehr hoch. Besonders bemerkenswert ist, dass sich das veränderte Acyl-L-carnitin-Spektrum in der Fieberphase nach Abklingen der Fiebertemperatur bei allen Patienten, die erneut untersucht wurden, normalisiert hatte (Chen et al., 2005). Die charakteristische Erhöhung dieser Rate (C16:0+C18:1/C2) wurde auch im Serum von CPT II-Patienten beobachtet (Gempel et al., 2002).

Die IAE-Patienten ohne CPT II-Mangel im Vergleich zu anderen mit dem Mangel, zeigen einen relativ milden klinischen Verlauf (Kubota et al., 2012). Die verringerte enzymatische Aktivität der CPT II-Varianten während eines hohen Fiebers und das dadurch in den Mitochondrien entstehende Energiedefizit könnte eine wichtige Rolle in der ätiopathologischen Entwicklung der Hirnödeme bei den betroffenen IAE-Patienten mit CPT II-Mangel spielen (Yao et al., 2008).

Die Thermoinstabilität des mutierten CPT II-Enzyms könnte auf eine strukturell destabilisierende Wirkung hinweisen (Isackson et al., 2006).

Diese Hypothese stimmt mit den Ergebnissen der MD-Simulation der S113L-Variante überein. Dabei konnte eine Erhöhung der Flexibilität einiger Seitenketten des mutierten Enzyms, insbesondere der Reste die die Mutation beinhalten, bei 40 °C gezeigt werden.

4.3. Der Effekt der Substrate

Mehrere Autoren betrachten Acyl-L-carnitin-Derivate, insbesondere die langkettiger Fettsäuren, als Hemmstoffe der CPT-Enzyme und machen sie damit verant-

4. Diskussion

wortlich für die Reduzierung der Fettsäureoxidation (Fritz and Marquis, 1965; McGarry and Foster, 1973; Zierz et al., 1993).

Allerdings wurde gezeigt, dass die Ursache für diese Fettsäureoxidations-Minderung nicht auf der CPT-Ebene liegt, sondern eher auf einer Hemmung der dritten Komponente dieses Systems, CACT, zurückzuführen ist (Baillet et al., 2000).

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Einnahme von mittelkettigen Fettsäuren zur Verringerung der Häufigkeit der Attacken bei Patienten mit CPT II-Mangel hilfreich sind (Bonfont et al., 2004; Angelini et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit führte die simultane Zugabe von Palmitoyl-L-carnitin zum Assay (Abschnitt 2.2.3.3.) zu einer progressiven Aktivitätsminderung beider Proteine (Wildtyp, S113L-Variante). Der in dieser Arbeit angewandte Assay (Abschnitt 2.2.3.3.) misst die durch Konvertieren der Acyl-CoAs zu Acyl-L-carnitin freigewordenen SH-Gruppen des CoA-SH. Mit der Messung der Aktivität in Gegenwart von Palmitoyl-L-carnitin in der Assay-Mischung sollte also die Auswirkung eines Produktes der gemessenen Reaktion auf die Enzymaktivität geklärt werden.

Diese Aktivitätshemmung war allerdings bei der Variante S113L im Vergleich zum Wildtyp viel stärker ausgeprägt. Die Enzyme zeigten dabei ein ähnliches Verhalten wie im von Zierz und Engel (Zierz and Engel, 1985) vorgeschlagenen Profil. Die Restaktivität der Variante S113L nach Zugabe von 200 μ M Palmitoyl-L-carnitin zum Assay betrug nur 60% der Restaktivität des Wildtyps unter gleichen Bedingungen. Dieses unterschiedliche Verhalten der Variante S113L könnte an einer abnormen Regulierung dieses Enzyms liegen.

Laut den Ergebnissen dieser Arbeit beschleunigt Palmitoyl-CoA als natives Substrat die Thermoinaktivierung der CPT II-Proteine besonders bei 40 °C.

Im Gegensatz dazu führt die Präinkubation der Proteine (His₆-N-*h*CPT2 und His₆-N-*h*CPT2/S113L) mit L-Carnitin bzw. dessen Acyl-Derivaten sogar zu einer Thermostabilisierung beider Enzyme.

Dieser stabilisierende Effekt war besonders bei Präinkubation der Variante S113L mit den drei mittelkettigen Acyl-L-carnitinen (C10, C12, C14) und C16 bei 45 °C

deutlich zu erkennen. In Anwesenheit dieser Acyl-L-carnitine zeigte die S113L-Variante eine ähnliche Aktivität wie der Wildtyp.

Es wurde gezeigt, dass bei der Vermeidung von Fasten, einer Beschränkung der Aufnahme von langkettigen Fettsäuren und einer vermehrten Aufnahme von mittelkettigen Fettsäuren, die Krankheitsattacken von CPT II-Mangel-Patienten reduziert wurden (Bonfont et al., 2004). Bei den, durch körperliche Aktivität ausgelösten Fällen wurde empfohlen, einen Bolus von mittelkettigen Fettsäuren kurz vor der lang dauernden körperlichen Belastung aufzunehmen (Thuillier et al., 2000; Angelini et al., 2006; Spiekerkoetter, 2007; Magoulas and El-Hattab, 2012). Dies hilft nicht nur, die erforderliche Energie zu liefern, sondern nach unseren Ergebnissen, dient es auch der Stabilisierung des Enzyms gegenüber der Erhitzung im Muskel bei Belastung.

4.3.1. Moleküldynamische Untersuchungen

Der stabilisierende Effekt von Acyl-L-carnitin konnte ebenfalls anhand der MD-Studien durch die Berechnung des thermischen B-Faktors bestätigt werden.

Dieser Faktor, der die Beweglichkeit der einzelnen Reste charakterisiert, ist für die Reste der Variante S113L in der Umgebung der Mutationsstelle im Komplex mit Palmitoyl-L-carnitin bei höherer Temperatur 313 K (40 °C) nicht gestiegen. Dieser Komplex zeigte dabei ein ähnliches Verhalten wie der des Wildtyps (Abb. 3.8).

Die RMSD Werte zeigen ebenfalls eine niedrigere Flexibilität der Mutationsstelle (S110-L121), der Acyl-L-carnitin-Bindungsstelle (Abbildungen 3.9 und 3.10) sowie des gesamten Proteins (Abb. 3.11) bei 313 K für diesen Komplex (Variante S113L mit Palmitoyl-L-carnitin) im Gegensatz zur freien Variante S113L.

4.4. Hemmungsstudien

4.4.1. Malonyl-CoA-Hemmung

4.4.1.1. Die Bedeutung

Malonyl-CoA steht im Mittelpunkt vieler zellulärer Vorgänge, einschließlich der Fettsäure-Biosynthese und -Oxidation. Es gilt als ein intrazelluläres Signal, das die Energie-Partitionierung in verschiedenen Geweben reguliert (Joly et al., 2005).

Malonyl-CoA hat drei bekannte Funktionen in tierischen Zellen: 1) Es wird als der Kohlenstoff-Lieferant von der Fettsäure-Synthetase benutzt. 2) Es ist für die Fettsäure-Elongation im endoplasmatischen Retikulum erforderlich und 3) es steuert die mitochondriale Oxidation von Fettsäuren durch seine Wechselwirkung mit dem Carnitin-Palmitoyltransferase-System (Voilley et al., 1999).

Darüber hinaus konnte ein Einfluss von Malonyl-CoA auf die Kontrolle der Insulinsekretion in Verbindung mit der Insulinsensitivität und deren Auswirkungen auf bestimmte Hypothalamus-Kerne für die Steuerung der Nahrungsaufnahme beobachtet werden (Joly et al., 2005).

Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes ist durch Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und einen erhöhten Plasma-FFA (*free-fatty-acids*)-Spiegel charakterisiert, sowie durch eine verminderte Fähigkeit zur Oxidation von Fett und Fett-Ablagerungen im Skelettmuskel. Diese Erhöhung des Muskelfettgehaltes ist stark von der Insulinresistenz abhängig (Kelley and Mandarino, 1990; Pan et al., 1997; Rasmussen et al., 2002). Daher könnte eine bessere Erforschung der Mechanismen, die zu diesen metabolischen Veränderungen führen, zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten für Typ-2-Diabetes-Patienten hilfreich sein.

CPT I katalysiert den ersten Schritt im Transport von langkettigen Fettsäuren aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien-Matrix, wo die Oxidation stattfindet. CPT I wird durch ihren physiologischen Inhibitor Malonyl-CoA genau reguliert (Lopez-Vinas et al., 2007).

Es ist bekannt, dass Malonyl-CoA nicht in die oder aus den Mitochondrien transportiert werden kann. Aus diesem Grund könnte über die Existenz von Malonyl-CoA in den Mitochondrien diskutiert werden.

In den Mitochondrien schützt MCD die wichtigen Enzyme, wie Methylmalonyl-CoA-Mutase vor der Hemmung durch Malonyl-CoA. Das intramitochondriale Malonyl-CoA wird als Produkt der *low-level*-Carboxylierung von Acetyl-CoA durch Propionyl-CoA-Carboxylase erzeugt (Courchesne-Smith et al., 1992; FitzPatrick et al., 1999).

Bei der Urin-Untersuchung von Patienten mit MCD-Mangel konnte Methylmalonazidurie nachgewiesen werden. Als Grund hierfür wird die Hemmung des mitochondrialen Enzyms Methylmalonyl-CoA-Mutase durch Malonyl-CoA angegeben (Courchesne-Smith et al., 1992; FitzPatrick et al., 1999).

Diese Erkenntnis könnte eine Bestätigung für die Existenz Malonyl-CoAs in Mitochondrien sein (FitzPatrick et al., 1999).

4.4.1.2. Hemmbarkeit der CPT II durch Malonyl-CoA

Obwohl die CPT II in der Literatur überwiegend als gegenüber Malonyl-CoA unempfindliches Enzym beschrieben wird (McGarry et al., 1978; Bonnefont et al., 1999; Kerner and Hoppel, 2000; Bonnefont et al., 2004), wird in einigen Publikationen das Gegenteil postuliert. Dort wurden reduzierte Gesamtaktivitäten (CPT I + CPT II) durch Malonyl-CoA-Hemmung von CPT II in bestimmten Situationen beschrieben (Ghadiminejad and Saggerson, 1990; Ghadiminejad and Saggerson, 1991). Andere sehen die Minderung der Gesamtaktivität eher als Folge der erhöhten Hemmbarkeit der CPT I durch Malonyl-CoA (Mynatt et al., 1994)

Es wurde ebenfalls über eine abnormale Hemmung des mutierten Enzyms durch Malonyl-CoA berichtet. Dieses Konzept wird erfolgreich bei der etablierten Methode von ZIERZ und ENGEL (Zierz and Engel, 1985) zur Diagnosestellung von CPT II-Patienten verwendet.

Prinzip der Methode

Bei dieser Methode werden die Aktivitäten der CPT I und CPT II nach der sogenannten Isotopen-Vorwärtsreaktion bestimmt (Gleichung 4.1).

Gleichung 4.1



Dabei wird die Entstehung des radioaktiv markierten Palmitoyl-L-carnitins im Muskelhomogenat gemessen. Neben der Bestimmung der Gesamtaktivität wird in parallelen Reaktionsansätzen die CPT I durch Malonyl-CoA gehemmt und der der CPT II zugeschriebene Teil der Aktivität prozentual berechnet. Zu diesem Zweck wird eine entsprechende Menge Malonyl-CoA dem Reaktionsansatz zugesetzt und bei 30 °C für 10 Minuten inkubiert. Während in der Regel ein Aktivitätsanteil von weit über 25 % für CPT II erreicht wird, liegt im Falle einer Mutation dieser Wert unter dieser Grenze (Zierz and Engel, 1985; Zierz and Engel, 1987). Diese fast vollständige Hemmung der Gesamtaktivität CPT (CPT I + CPT II) durch Malonyl-CoA im Muskelhomogenat von Patienten wurde entweder als Fehlen einer aktiven CPT II oder eine abnorme Empfindlichkeit der CPT II-Varianten gegenüber Malonyl-CoA interpretiert (Zierz and Engel, 1985).

In der vorliegenden Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, dass nicht nur CPT I, sondern auch CPT II von Malonyl-CoA gehemmt wird. Diese Inhibition ist bei der CPT II-Variante S113L viel stärker ausgeprägt als beim Wildtyp.

Während eine 60 minütige Präinkubation des Wildtyps mit Malonyl-CoA bei 30 °C vor dem enzymatischen Assay zu einer ca. 20%igen Reduzierung der Aktivität führte, wurde die Variante S113L unter gleichen Bedingungen um etwa 45% gehemmt (Tabelle 3.2).

Kürzlich wurde in einer Studie in einer großen Gruppe von Patienten mit klinischem und molekularem Nachweis eines CPT II-Mangels (mit homozygoten oder *compound*-heterozygoten Mutationen) die normalen CPT-Gesamtaktivitätswerte (CPT I + CPT II) bestätigt. Die Rest-Aktivität von CPT II nach Hemmung mit Malonyl-CoA war jedoch bei den Patienten, verglichen mit den Kontrollen, äußerst reduziert (Joshi et al., 2012). In dieser Studie wurde ebenfalls über das späte Auftreten der Symptome bei einem professionellen Tennisspieler und einem Amateur-Marathonläufer berichtet. Bei beiden Patienten wurde die S113L-Mutation heterozygot nachgewiesen. Sie zeigten eine normale CPT-Gesamtaktivität

(CPT I + CPT II). Die Restaktivität (CPT II) nach der Hemmung mit Malonyl-CoA lag bei diesen Patienten interessanterweise zwischen den Werten von Patienten mit homozygoten- bzw. *compound*-heterozygoten Mutationen und denen der Kontrollen (Joshi et al., 2012).

Laut den Ergebnissen dieser Arbeit beruht die normale Gesamtaktivität (CPT I + CPT II) von CPT II-Patienten darauf, dass die mutierten Proteine unter Standardbedingungen eine ähnliche enzymatische Aktivität wie der Wildtyp zeigen. Nach der Hemmung mit Malonyl-CoA jedoch wird die Variante im Vergleich zum Wildtyp viel stärker gehemmt. Als Resultat kommt es in Falle der homozygoten bzw. *compound*-heterozygoten Mutationen zu einer fast kompletten Hemmung der CPT-Enzyme durch Malonyl-CoA.

Bei Patienten mit heterozygoten CPT II-Mutationen wird die Variante im Vergleich zum intakten Enzymanteil stärker von Malonyl-CoA gehemmt, welche zu der intermediären Restaktivität (CPT II) bei diesen Patienten führt.

Rekombinant hergestelltes CPT II-Protein von Ratten wurde als nichthemmbar durch Malonyl-CoA bezeichnet (Woeltje et al., 1990b). Dies könnte allerdings den Assay-Bedingungen für die Bestimmung der Aktivität zuzuschreiben sein. Bei den durchgeführten Messungen in Gegenwart von 50 μ M Malonyl-CoA wurde die Reaktion nach 4 Minuten gestoppt (Woeltje et al., 1990a; Woeltje et al., 1990b). Nach unseren Ergebnissen ist die Hemmung von humanen CPT II durch Malonyl-CoA zeit- und konzentrationsabhängig. Der Hemmeffekt von Malonyl-CoA auf die CPT II ist bei der oben genannten Konzentration und in vierminütiger Reaktionszeit noch nicht zu beobachten.

4.4.1.3. Hemmbarkeit der CPT II durch Malonsäure (Malonat)

Es wurde vorgeschlagen, dass die CoA-Einheit von Malonyl-CoA und nicht der Malonanteil für die Hemmung von CPT I verantwortlich ist (Mills et al., 1983). Es wurde jedoch in anderen Studien gezeigt, dass auch Malonsäure CPT I hemmen kann. Unter dieser Prämisse wurde die CoA-Einheit dann als ein Faktor betrachtet, der das Potential des Inhibitors erhöht (Cook et al., 1994).

4. Diskussion

Zur Untersuchung dieses Aspekts wurden die Experimente zur Hemmung von CPT II anstelle mit Malonyl-CoA mit Malonsäure (Malonat) durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten eine viel stärkere Hemmwirkung von Malonat auf mutierte CPT II als von Malonyl-CoA (Abbildungen 3.12 und 3.13). Das gilt sowohl für den Wildtyp als auch für die Variante S113L.

4.4.1.4. *docking*-Studien

4.4.1.4.1. Die Hemmung von CPT I durch Malonyl-CoA

Für CPT I steht noch keine Röntgenkristallstruktur zur Verfügung. Es wurden viele Versuche unternommen, um die Domänen von CPT I zu identifizieren, an denen Malonyl-CoA bindet (Lopez-Vinas et al., 2007).

Dabei wird über putative Bindungsstellen für Malonyl-CoA diskutiert.

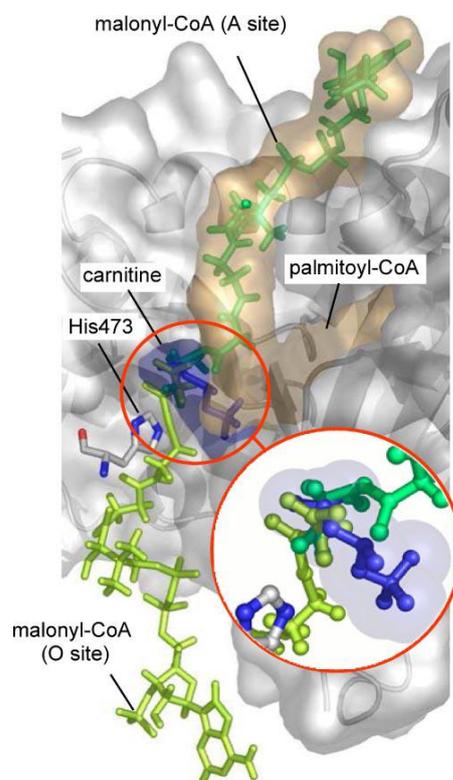


Abb. 4.1. Diese Abbildung von LOPEZ-VINAS et al. (Lopez-Vinas et al., 2007) stellt die beiden putativen Bindestellen für Malonyl-CoA in dem Längsschnitt der L-CPT I-Struktur dar. Die CoA-Stelle „A site“ (dunkelgrün) und Carnitin-Stelle „O site“ (hellgrün) wurden im Zusammenhang mit den Position der Substrate Palmitoyl-CoA (dunkelgelb) und L-Carnitin (blau) dargestellt. Die Position der katalytischen Rest His473 ist ebenfalls angegeben (Lopez-Vinas et al., 2007).

LOPEZ-VINAS et al. haben anhand von computergestützten *docking*-Analysen am Model von Ratten-L-CPT I zwei Bindungsstellen für Malonyl-CoA vorgeschlagen:

Die sogenannte „CoA“ und die „Gegenüber-CoA“-Domäne. Die Anwesenheit von Malonyl-CoA an diesen Protein-Ligand-Wechselwirkungsdomänen verhindert die Positionierung von L-Carnitin und hemmt damit die CPT I. Diese Theorie ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt (Lopez-Vinas et al., 2007).

4.4.1.4.2. Die Hemmung von CPT II durch Malonyl-CoA

Mit Hilfe der *docking*-Studien in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl ist es gelungen, auch für CPT II zwei ähnliche Malonyl-CoA-Bindestellen zu finden, wie es für CPT I vorgeschlagen wurde.

Das Homologie-Modell des humanen CPT II besitzt einen Y-förmigen Tunnel, bestehend aus Bindungsstellen für die Acyl-, CoA- und L-Carnitin-Einheiten.

Wie in Abbildung 3.16 schematisch dargestellt, konnte Malonyl-CoA an zwei verschiedenen Stellen (CoA- und Carnitin-Bindestellen) binden und ähnlich wie bei CPT I mit den Substraten konkurrieren. Die Bindung von Malonyl-CoA an eine oder beide dieser Hemmungsstellen, könnte die Bindung von L-Carnitin und Acyl-L-carnitinen verhindern und dadurch das Enzym hemmen.

4.4.1.4.3. Abnormale Hemmung der Variante S113L durch Malonyl-CoA

Die abnorme Hemmung der Variante S113L im Vergleich zum Wildtyp konnte ebenfalls mit Hilfe der durchgeführten *docking*-Studien in der Arbeitsgruppe von Prof. Sippl geklärt werden. S113 liegt am Aminoterminus der $\alpha 5$ -Helix in der Nähe der Domänen-Schnittstelle (*interface domain*), die etwa 12 Å von der L-Carnitin-Bindungsstelle entfernt ist (Isackson et al., 2006; Rufer et al., 2006). Somit ist eine direkte Wirkung der Mutation S113L auf die Architektur der Bindungstasche unwahrscheinlich. Trp116 bildet zusammen mit Tyr486, Ser488 und einem konservierten Wassermolekül ein Wasserstoffbrückennetzwerk in der L-Carnitin-Bindungstasche. Die Mutation von S113 zu der hydrophoben Aminosäure Leucin ändert die Wechselwirkung mit dem benachbarten Phe117. Diese Veränderung kann jedoch die Lage und Position der katalytisch wichtigen Reste, wie Trp116, Tyr486 und Ser488 beeinflussen. Die Wechselwirkung der Carboxylatgruppe von

Malonyl-CoA bzw. Malonat mit Tyr486, Ser488 und Wassermolekül W88 ist stark und wird nicht durch die Mutation S113L beeinflusst. Die Affinität für die nativen Substrate L-Carnitin und Acyl-L-carnitin könnte jedoch als Resultat der Veränderungen an diesen Resten verringert werden. Als Folge kann L-Carnitin, das Malonyl-CoA oder Malonat nicht vollständig ersetzen. Auf diese Weise können Malonyl-CoA bzw. Malonat das mutierte Enzym stärker als den Wildtyp hemmen.

4.4.1.5. Inhibierungsmechanismus von CPT II durch Malonyl-CoA

Hintergrund

Inhibitoren werden nach ihrem katalytischen Wirkmechanismus in drei Gruppen eingeteilt (Illanes et al., 2013).

1) Die kompetitiven Inhibitoren

Wenn der Inhibitor eine ähnliche Struktur wie das Substrat besitzt und eine Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms erfolgen kann, wird die Hemmung als kompetitiv bezeichnet. Die Wirkung des kompetitiven Inhibitors ist abhängig von seiner Konzentration im Vergleich zu der des Substrats und der Stärke der Bindung des Enzyms an den Inhibitor bzw. an das Substrat (Kent, 2000).

2) Die nicht-kompetitiven Inhibitoren

Bei dieser Hemmung bindet der Inhibitor nicht an das aktive Zentrum des Enzyms, sondern reagiert mit einer anderen Stelle des Enzyms. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der Form des aktiven Zentrums. Diese verhindert, dass das normale Substrat an das aktive Zentrum binden kann (Kent, 2000).

3) Die unkompetitiven Hemmstoffe

Neben kompetitiven und nichtkompetitiven Inhibitoren gibt es auch gelegentlich diese Form der Inhibierung (Schellenberger, 1989). Der Inhibitor bindet nicht an

4. Diskussion

das Enzym, sondern an den Enzym-Substrat-Komplex. Das Substrat wird im aktiven Zentrum blockiert und Produkte können nicht gebildet werden (Kent, 2000).

Inhibitoren aller Typen können abhängig von der Art ihrer Reaktion mit dem Enzym entweder als reversibel oder irreversibel unterschieden werden (Kent, 2000).

1) Reversible Inhibitoren reagieren und blockieren dadurch entweder das aktive Zentrum des Enzyms oder verursachen eine Konformationsveränderung des Enzyms. Diese Veränderungen können dann zu einer Verminderung der Enzymaktivität führen (Schellenberger, 1989). Diese Gruppe von Hemmstoffen bindet in der Regel mit schwachen Bindungen wie Wasserstoffbindungen, die leicht zu brechen sind, an ein Enzym. Sobald diese Inhibitoren gelöst sind, kann das Enzym wieder normal funktionieren (Kent, 2000).

2) Irreversible Inhibitoren interagieren mit dem Enzym mit starken kovalenten Bindungen, die nur schwer ohne Beschädigung des Enzyms gelöst werden können. Folglich ist der Effekt eines irreversiblen Inhibitors permanent (Kent, 2000).

Weil keine Hemmung von CPT II durch Malonyl-CoA bisher beschrieben wurde, ist eine Erklärung über den Mechanismus nicht bekannt.

Laut den in der Arbeitsgruppe von Herrn. Prof. Sippl durchgeführten *docking*-studien könnte Malonyl-CoA an zwei Stellen der CPT II, der CoA- und der Carnitin-Bindestelle, binden (Abb. 3.16).

Die Blockierung der Carnitin-Bindestelle durch Malonyl-CoA könnte die Bindung des L-Carnitins verhindern und zur Hemmung des Enzyms führen.

Da das Malonyl-CoA eine ähnliche Struktur wie Palmitoyl-CoA besitzt, könnte seine Bindung an der CoA-Bindestelle ebenfalls zur Hemmung der CPT II führen.

Die Blockierung des aktiven Zentrums an den zwei erwähnten Stellen spricht für eine kompetitive Hemmung als Mechanismus.

4. Diskussion

Bei weiteren Versuchen wurde untersucht, ob Malonyl-CoA auch als Substrat für CPT II angenommen werden und ob CoA auch von Malonyl-CoA auf Carnitin übertragen werden könnte (Abschnitt 2.2.4.4.).

Bei der Verwendung von Malonyl-CoA statt Palmitoyl-CoA zeigte das Enzym keine Aktivität. Das bedeutet, dass Malonyl-CoA nicht als Substrat in Frage kommt.

Um die Art der Hemmung weiter aufzuklären, wurde untersucht ob durch die Zugabe des Substrats Palmitoyl-CoA die Hemmung der Enzyme rückgängig gemacht werden kann (Abschnitt 2.2.4.3.). Obwohl der Wildtyp dadurch wieder eine normale Aktivität zeigte, konnte das mutierte Enzym in diesem Fall nicht wieder reaktiviert werden. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass es sich bei dem Wildtyp und dem mutierten Enzym um unterschiedliche Mechanismen der Inhibition handelt. Während bei dem Wildtyp eine reversible Hemmung in Frage kommt, könnte im Falle des mutierten Enzyms auf Grund seines Verhaltens eine irreversible (bzw. quasi-irreversible) Hemmung vermutet werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit, konnten einige Aspekte bezüglich der Hintergründe des klinischen Erscheinungsbildes der muskulären Form des CPT II-Mangels aufgeklärt werden.

Zu diesem Zweck wurden die humane CPT II in der Wildtyp-Form und in der Variante S113L rekombinant durch Überexpression der jeweiligen Gene in einem prokaryotischen Wirt (*E. coli*) hergestellt und durch übliche Chromatographie-Techniken gereinigt. Die Identität der Expressionsprodukte wurde massenspektrometrisch bestätigt. Die strukturelle Integrität der Proteine wurde durch den Nachweis der katalytischen Aktivität bestätigt.

Die rekombinant hergestellte Variante S113L (His₆-N-*hCPT2*/S113L) zeigte bei der Aktivitätsmessung ähnliche Werte wie das Wildtyp-Protein (His₆-N-*hCPT2*). Die Variante S113L zeigte jedoch eine verminderte Thermostabilität, welche mit dem klinischen Bild dieser Erkrankung korreliert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass im Gegensatz zu der noch vorherrschenden Meinung auch CPT II und nicht nur CPT I durch Malonyl-CoA gehemmt wird. Diese Inhibierung ist jedoch viel stärker bei Patienten mit Mutationen im *CPT2*-Gen ausgeprägt. Die fast vollständige Hemmung der CPT - Gesamtaktivität (CPT I + CPT II) durch Malonyl-CoA im Muskelhomogenat von Patienten konnte so erklärt werden.

Mit Hilfe der *docking*-Studien konnte die Bindung des Malonyl-CoAs an zwei Stellen der CPT II simuliert werden.

Die stärkere Hemmung von Variante S113L durch Malonyl-CoA bzw. Malonsäure (Malonat) deutet auf eine abnorme Regulierbarkeit der Enzym-Varianten hin.

Bei Präinkubations-Experimenten waren Acyl-L-carnitine mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen in der Lage, das mutierte Enzym zu stabilisieren. Die Erhöhung der langkettigen Acyl-L-carnitine kann als ein guter Marker zur Identifizierung der Patienten mit der muskulären Form des CPT II-Mangels verwendet werden.

Die MD-Studien haben eine höhere strukturelle Flexibilität für Variante S113L im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Weniger Flexibilität für die Variante im Komplex mit

5. Zusammenfassung

Acyl-L-carnitin deutet auf eine stabilere Struktur in Gegenwart dieser Substanzen hin.

Der stabilisierende Effekt durch Acyl-L-carnitine könnte ein Wegweiser für mögliche Therapiestrategien sein.

6. Ausblick

CPT II ist ein Membranprotein. Eine Solubilisierung von rekombinanter CPT II mit n-Octylglucosid in der vorliegenden Arbeit kann die native Umgebung des in die Membran integrierten Proteins imitieren. Für eine bessere Einschätzung der Rolle der Membran-Inkorporation für Aktivität und Stabilität könnte die Löslichkeit des Proteins in Gegenwart von Phospholipiden ein Thema für zukünftige Untersuchungen sein.

Darüber hinaus könnte die rekombinante Herstellung von Varianten mit anderen bekannten Mutationen, die typisch für andere Phänotypen des CPT II-Mangels und Vergleich der Thermostabilität dieser Varianten mit dem Wildtyp für eine bessere Phänotyp-Genotyp-Erklärung hilfreich sein.

Weitere Analysen mit den Methoden der computergestützten Simulation könnten zur Erforschung von neuen Stabilisierungseffektoren dienen und damit eine Basis für das erweiterte Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge sein, die in Zukunft vielleicht sogar Therapie-Möglichkeiten dieser mitochondrialen Erkrankung liefern.

Literaturverzeichnis

- Abu-Elheiga, L., Almarza-Ortega, D.B., Baldini, A., Wakil, S.J., 1997. Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem.* 272, 10669-77.
- Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., Wakil, S.J., 2000. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 1444-9.
- Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Kordari, P., Oh, W., Shaikenov, T., Gu, Z., Wakil, S.J., 2005. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 12011-6.
- al Aqeel, A.I., Rashed, M.S., Wanders, R.J., 1999. Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency is a treatable disease. *J Inherit Metab Dis.* 22, 271-5.
- Angelini, C., Federico, A., Reichmann, H., Lombes, A., Chinnery, P., Turnbull, D., 2006. Task force guidelines handbook: EFNS guidelines on diagnosis and management of fatty acid mitochondrial disorders. *Eur J Neurol.* 13, 923-9.
- Anichini, A., Fanin, M., Vianey-Saban, C., Cassandrini, D., Fiorillo, C., Bruno, C., Angelini, C., 2011. Genotype-phenotype correlations in a large series of patients with muscle type CPT II deficiency. *Neurological research.* 33, 24-32.
- Baddiley, J., Thain, E.M., Novelli, G.D., Lipmann, F., 1953. Structure of coenzyme A. *Nature.* 171, 76.
- Baillet, L., Mullur, R.S., Esser, V., McGarry, J.D., 2000. Elucidation of the mechanism by which (+)-acylcarnitines inhibit mitochondrial fatty acid transport. *J Biol Chem.* 275, 36766-8.
- Beard, D.A., Qian, H., 2008. *Chemical biophysics: quantitative analysis of cellular systems*, Cambridge University Press.
- Beer, A., 1852. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik.* 162, 78-88.
- Bennett, M.J., Rinaldo, P., Strauss, A.W., 2000. Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 37, 1-44.
- Bieber, L.L., Abraham, T., Helmrath, T., 1972. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem.* 50, 509-18.
- Bonnefont, J.P., Taroni, F., Cavadini, P., Capanec, C., Brivet, M., Saudubray, J.M., Leroux, J.P., Demaugre, F., 1996. Molecular analysis of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatocardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 58, 971-8.

- Bonnefont, J.P., Demaugre, F., Prip-Buus, C., Saudubray, J.M., Brivet, M., Abadi, N., Thuillier, L., 1999. Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol Genet Metab.* 68, 424-40.
- Bonnefont, J.P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A., Bastin, J., 2004. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med.* 25, 495-520.
- Bonnefont, J.P., Bastin, J., Behin, A., Djouadi, F., 2009. Bezafibrate for an inborn mitochondrial beta-oxidation defect. *N Engl J Med.* 360, 838-40.
- Bougneres, P.F., Saudubray, J.M., Marsac, C., Bernard, O., Odievre, M., Girard, J., 1981. Fasting hypoglycemia resulting from hepatic carnitine palmitoyl transferase deficiency. *J Pediatr.* 98, 742-6.
- Bouguer, P., 1729. *Essai d'optique, sur la gradation de la lumiere*, Claude Jombert.
- Britton, C.H., Schultz, R.A., Zhang, B., Esser, V., Foster, D.W., McGarry, J.D., 1995. Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 1984-8.
- Britton, C.H., Mackey, D.W., Esser, V., Foster, D.W., Burns, D.K., Yarnall, D.P., Froguel, P., McGarry, J.D., 1997. Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPT1A and CPT1B). *Genomics.* 40, 209-11.
- Bruno, C., Bado, M., Minetti, C., Cordone, G., DiMauro, S., 2000. Novel mutation in the CPT II gene in a child with periodic febrile myalgia and myoglobinuria. *J Child Neurol.* 15, 390-3.
- Chen, Y., Mizuguchi, H., Yao, D., Ide, M., Kuroda, Y., Shigematsu, Y., Yamaguchi, S., Yamaguchi, M., Kinoshita, M., Kido, H., 2005. Thermolabile phenotype of carnitine palmitoyltransferase II variations as a predisposing factor for influenza-associated encephalopathy. *FEBS Lett.* 579, 2040-4.
- Cook, G.A., Mynatt, R.L., Kashfi, K., 1994. Yonetani-Theorell analysis of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I inhibition indicates two distinct inhibitory binding sites. *J Biol Chem.* 269, 8803-7.
- Corti, S., Bordoni, A., Ronchi, D., Musumeci, O., Aguenouz, M., Toscano, A., Lamperti, C., Bresolin, N., Comi, G.P., 2008. Clinical features and new molecular findings in Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *J Neurol Sci.* 266, 97-103.
- Courchesne-Smith, C., Jang, S.H., Shi, Q., DeWille, J., Sasaki, G., Kolattukudy, P.E., 1992. Cytoplasmic accumulation of a normally mitochondrial malonyl-CoA decarboxylase by the use of an alternate transcription start site. *Arch Biochem Biophys.* 298, 576-86.

- Darden, T., York, D., Pedersen, L., 1993. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics*. 98, 10089.
- Daugherty, M., Polanuyer, B., Farrell, M., Scholle, M., Lykidis, A., de Crecy-Lagard, V., Osterman, A., 2002. Complete reconstitution of the human coenzyme A biosynthetic pathway via comparative genomics. *J Biol Chem*. 277, 21431-9.
- Demaugre, F., Bonnefont, J.P., Colonna, M., Capanec, C., Leroux, J.P., Saudubray, J.M., 1991. Infantile form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatomuscular symptoms and sudden death. Physiopathological approach to carnitine palmitoyltransferase II deficiencies. *J Clin Invest*. 87, 859-64.
- Deschauer, M., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Biekmann, E., Pourfarzam, M., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Zierz, S., 2003. A splice junction mutation in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab*. 79, 124-8.
- Dettmer, U., Trendelenburg, M., 2005. *Intensivkurs Biochemie: mit 93 Tabellen*, Elsevier, Urban und Fischer.
- DiMauro, S., DiMauro, P.M., 1973. Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science*. 182, 929-31.
- Djouadi, F., Bonnefont, J.P., Munnich, A., Bastin, J., 2003. Characterization of fatty acid oxidation in human muscle mitochondria and myoblasts. *Mol Genet Metab*. 78, 112-8.
- Djouadi, F., Aubey, F., Schlemmer, D., Bastin, J., 2005. Peroxisome proliferator activated receptor delta (PPARdelta) agonist but not PPARalpha corrects carnitine palmitoyl transferase 2 deficiency in human muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 90, 1791-7.
- Dutta-Roy, A.K., 2000. Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 57, 1360-72.
- Eaton, S., Bartlett, K., Pourfarzam, M., 1996. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J*. 320 (Pt 2), 345-57.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 82, 70-7.
- Faigel, H.C., Harris, C., 1995. Carnitine palmitoyltransferase deficiency in a college athlete: a case report and literature review. *J Am Coll Health*. 44, 51-4.
- Fanin, M., Anichini, A., Cassandrini, D., Fiorillo, C., Scapolan, S., Minetti, C., Cassanello, M., Donati, M.A., Siciliano, G., D'Amico, A., Lilliu, F., Bruno, C., Angelini, C., 2012. Allelic and phenotypic heterogeneity in 49 Italian patients with the muscle form of CPT-II deficiency. *Clin Genet*. 82, 232-9.

- Finocchiaro, G., Taroni, F., Rocchi, M., Liras Martin, A., Colombo, I., Tarelli, G.T., DiDonato, S., 1991. cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of human carnitine palmitoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 10981.
- FitzPatrick, D.R., Hill, A., Tolmie, J.L., Thorburn, D.R., Christodoulou, J., 1999. The molecular basis of malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 65, 318-26.
- Fix, J.A., Engle, K., Porter, P.A., Leppert, P.S., Selk, S.J., Gardner, C.R., Alexander, J., 1986. Acylcarnitines: drug absorption-enhancing agents in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 251, G332-40.
- Fritz, I.B., Schultz, S.K., Srere, P.A., 1963. Properties of partially purified carnitine acetyltransferase. *J Biol Chem.* 238, 2509-17.
- Fritz, I.B., Marquis, N.R., 1965. The role of acylcarnitine esters and carnitine palmitoyltransferase in the transport of fatty acyl groups across mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 54, 1226-33.
- Galla, H.-J., Müller, H.-J., 1988. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Thieme.
- Gärtner, H., 2009. *Biologie-Grundwissen und Gesetze*, Compact Verlag.
- Gellera, C., Witt, D.R., Verderio, E., Cavadini, P., DiDonato, S., Taroni, F., 1992. Molecular study of lethal neonatal carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 51, A168.
- Gellera, C., Verderio, E., Florida, G., Finocchiaro, G., Montermini, L., Cavadini, P., Zuffardi, O., Taroni, F., 1994. Assignment of the human carnitine palmitoyltransferase II gene (CPT1) to chromosome 1p32. *Genomics.* 24, 195-7.
- Gempel, K., Kiechl, S., Hofmann, S., Lochmuller, H., Kiechl-Kohlendorfer, U., Willeit, J., Sperl, W., Rettinger, A., Bieger, I., Pongratz, D., Gerbitz, K.D., Bauer, M.F., 2002. Screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency by tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis.* 25, 17-27.
- Ghadiminejad, I., Saggerson, E.D., 1990. Carnitine palmitoyltransferase (CPT2) from liver mitochondrial inner membrane becomes inhibitable by malonyl-CoA if reconstituted with outer membrane malonyl-CoA binding protein. *FEBS Lett.* 269, 406-8.
- Ghadiminejad, I., Saggerson, D., 1991. Cholate separates the catalytic and malonyl-CoA-binding components of carnitine palmitoyltransferase from liver outer mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1083, 166-72.
- Greene, J.G., Greenamyre, J.T., 1995. Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem.* 64, 430-6.

- Hamilton, C., Saggerson, E.D., 2000. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes. *Biochem J.* 350 Pt 1, 61-7.
- Handig, I., Dams, E., Taroni, F., Van Laere, S., de Barse, T., Willems, P.J., 1996. Inheritance of the S113L mutation within an inbred family with carnitine palmitoyltransferase enzyme deficiency. *Hum Genet.* 97, 291-3.
- Ho, J.K., Duclos, R.I., Jr., Hamilton, J.A., 2002. Interactions of acyl carnitines with model membranes: a (^{13}C) -NMR study. *J Lipid Res.* 43, 1429-39.
- Hsiao, Y.S., Jogl, G., Esser, V., Tong, L., 2006. Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II). *Biochem Biophys Res Commun.* 346, 974-80.
- Ijlst, L., Hendriksen, A.G., Ruiten, J.P.N., Wanders, R.J., 1999. Molecular basis of CPT II deficiency: identification of 9 novel mutations. *J. Inher. Metab. Dis.* 22 (Suppl. 1), A53.
- Illanes, A., Wilson, L., Vera, C., 2013. *Problem Solving in Enzyme Biocatalysis*, John Wiley & Sons.
- Indiveri, C., Tonazzi, A., Palmieri, F., 1994. The reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria: evidence for a transport mechanism different from that of the other mitochondrial translocators. *Biochim Biophys Acta.* 1189, 65-73.
- Isackson, P.J., Bennett, M.J., Vladutiu, G.D., 2006. Identification of 16 new disease-causing mutations in the CPT2 gene resulting in carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab.* 89, 323-31.
- Isackson, P.J., Bennett, M.J., Lichter-Konecki, U., Willis, M., Nyhan, W.L., Sutton, V.R., Tein, I., Vladutiu, G.D., 2008. CPT2 gene mutations resulting in lethal neonatal or severe infantile carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab.* 94, 422-7.
- Jerusalem, F., Zierz, S., 2003. *Muskelerkrankungen*, Georg Thieme Verlag.
- Joly, E., Bendayan, M., Roduit, R., Saha, A.K., Ruderman, N.B., Prentki, M., 2005. Malonyl-CoA decarboxylase is present in the cytosolic, mitochondrial and peroxisomal compartments of rat hepatocytes. *FEBS letters.* 579, 6581-6586.
- Jones, L.L., McDonald, D.A., Borum, P.R., 2010. Acylcarnitines: role in brain. *Prog Lipid Res.* 49, 61-75.
- Joshi, P.R., Deschauer, M., Zierz, S., 2012. Clinically symptomatic heterozygous carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *Wien Klin Wochenschr.* 124, 851-4.
- Joshi, P.R., Young, P., Deschauer, M., Zierz, S., 2013. Expanding mutation spectrum in CPT II gene: identification of four novel mutations. *J Neurol.* 260, 1412-4.

- Joshi, P.R., Deschauer, M., Zierz, S., 2014. Carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency: genotype-phenotype analysis of 50 patients. *J Neurol Sci.* 338, 107-11.
- Jung, D., Abu-Elheiga, L., Ayuzawa, R., Gu, Z., Shirakawa, T., Fujiki, Y., Nakatsuji, N., Wakil, S.J., Uesugi, M., 2012. Mislocalization and inhibition of acetyl-CoA carboxylase 1 by a synthetic small molecule. *Biochem J.* 448, 409-16.
- Kaneoka, H., Uesugi, N., Moriguchi, A., Hirose, S., Takayanagi, M., Yamaguchi, S., Shigematsu, Y., Yasuno, T., Sasatomi, Y., Saito, T., 2005. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency due to a novel gene variant in a patient with rhabdomyolysis and ARF. *Am J Kidney Dis.* 45, 596-602.
- Karakoç, E., Erdem, S., Sökmensüer, C., Kansu, T., 2006. Encephalopathy due to carnitine deficiency in an adult patient with gluten enteropathy. *Clinical neurology and neurosurgery.* 108, 794-797.
- Katsuya, H., Misumi, M., Ohtani, Y., Miike, T., 1988. Postanesthetic acute renal failure due to carnitine palmitoyl transferase deficiency. *Anesthesiology.* 68, 945-8.
- Kelley, D.E., Mandarino, L.J., 1990. Hyperglycemia normalizes insulin-stimulated skeletal muscle glucose oxidation and storage in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 86, 1999-2007.
- Kendler, B.S., 1986. Carnitine: an overview of its role in preventive medicine. *Prev Med.* 15, 373-90.
- Kent, M., 2000. *Advanced biology*, Oxford University Press.
- Kerner, J., Hoppel, C., 2000. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1486, 1-17.
- Knape, M., 2012. *In vitro- und in vivo-Charakterisierung der humanen Carnitin-Palmitoyltransferase 2*, Dissertation: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Kubota, M., Chida, J., Hoshino, H., Ozawa, H., Koide, A., Kashii, H., Koyama, A., Mizuno, Y., Hoshino, A., Yamaguchi, M., Yao, D., Yao, M., Kido, H., 2012. Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children. *Brain Dev.* 34, 20-7.
- Kunau, W.H., Dommes, V., Schulz, H., 1995. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res.* 34, 267-342.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-5.

- Laforet, P., Vianey-Saban, C., 2010. Disorders of muscle lipid metabolism: diagnostic and therapeutic challenges. *Neuromuscul Disord.* 20, 693-700.
- Lambert, J.H., 1760. *Photometria: sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrarum.*
- Lavrentyev, E.N., Matta, S.G., Cook, G.A., 2004. Expression of three carnitine palmitoyltransferase-I isoforms in 10 regions of the rat brain during feeding, fasting, and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 315, 174-8.
- Leonardi, R., Zhang, Y.M., Rock, C.O., Jackowski, S., 2005. Coenzyme A: back in action. *Prog Lipid Res.* 44, 125-53.
- Lipmann, F., 1945. Acetylation of sulfanilamide by liver homogenates and extracts. *Journal of Biological Chemistry.* 160, 173-190.
- Longo, N., Amat di San Filippo, C., Pasquali, M., 2006. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 142C, 77-85.
- Lopaschuk, G.D., Belke, D.D., Gamble, J., Itoi, T., Schonekess, B.O., 1994. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1213, 263-76.
- Lopez-Vinas, E., Bentebibel, A., Gurunathan, C., Morillas, M., de Arriaga, D., Serra, D., Asins, G., Hegardt, F.G., Gomez-Puertas, P., 2007. Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Biol Chem.* 282, 18212-24.
- Magoulas, P.L., El-Hattab, A.W., 2012. Systemic primary carnitine deficiency: an overview of clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J Rare Dis.* 7, 68.
- Martin, M.A., Rubio, J.C., del Hoyo, P., Garcia, A., Bustos, F., Campos, Y., Cabello, A., Culebras, J.M., Arenas, J., 2000. Identification of novel mutations in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Mutat.* 15, 579-80.
- McGarry, J.D., Foster, D.W., 1973. Acute reversal of experimental diabetic ketoacidosis in the rat with (+)-decanoylcarnitine. *J Clin Invest.* 52, 877-84.
- McGarry, J.D., Leatherman, G.F., Foster, D.W., 1978. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J Biol Chem.* 253, 4128-36.
- McGarry, J.D., Foster, D.W., 1980. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem.* 49, 395-420.
- McGarry, J.D., Mills, S.E., Long, C.S., Foster, D.W., 1983. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the

- presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J.* 214, 21-8.
- McGarry, J.D., Woeltje, K.F., Kuwajima, M., Foster, D.W., 1989. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev.* 5, 271-84.
- McGarry, J.D., Brown, N.F., 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* 244, 1-14.
- Mills, S.E., Foster, D.W., McGarry, J.D., 1983. Interaction of malonyl-CoA and related compounds with mitochondria from different rat tissues. Relationship between ligand binding and inhibition of carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem J.* 214, 83-91.
- Mishra, P.K., Drucehammer, D.G., 2000. Coenzyme A Analogues and Derivatives: Synthesis and Applications as Mechanistic Probes of Coenzyme A Ester-Utilizing Enzymes. *Chem Rev.* 100, 3283-3310.
- Morris, A.A., Olpin, S.E., Brivet, M., Turnbull, D.M., Jones, R.A., Leonard, J.V., 1998. A patient with carnitine-acylcarnitine translocase deficiency with a mild phenotype. *J Pediatr.* 132, 514-6.
- Mynatt, R.L., Greenhaw, J.J., Cook, G.A., 1994. Cholate extracts of mitochondrial outer membranes increase inhibition by malonyl-CoA of carnitine palmitoyltransferase-I by a mechanism involving phospholipids. *Biochem J.* 299 (Pt 3), 761-7.
- Neely, J.R., Morgan, H.E., 1974. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu Rev Physiol.* 36, 413-59.
- Nyman, L.R., Cox, K.B., Hoppel, C.L., Kerner, J., Barnoski, B.L., Hamm, D.A., Tian, L., Schoeb, T.R., Wood, P.A., 2005. Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab.* 86, 179-87.
- Olpin, S.E., Afifi, A., Clark, S., Manning, N.J., Bonham, J.R., Dalton, A., Leonard, J.V., Land, J.M., Andresen, B.S., Morris, A.A., Muntoni, F., Turnbull, D., Pourfarzam, M., Rahman, S., Pollitt, R.J., 2003. Mutation and biochemical analysis in carnitine palmitoyltransferase type II (CPT II) deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 26, 543-57.
- Omar, M.A., Wilson, J.P., 2002. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother.* 36, 288-95.
- Orngreen, M.C., Duno, M., Ejstrup, R., Christensen, E., Schwartz, M., Sacchetti, M., Vissing, J., 2005. Fuel utilization in subjects with carnitine palmitoyltransferase 2 gene mutations. *Ann Neurol.* 57, 60-6.
- Pace, C.N., 1990. Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem Sci.* 15, 14-7.

- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T., 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411-23.
- Pace, C.N., Trevino, S., Prabhakaran, E., Scholtz, J.M., 2004. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359, 1225-34; discussion 1234-5.
- Pan, D.A., Lillioja, S., Kriketos, A.D., Milner, M.R., Baur, L.A., Bogardus, C., Jenkins, A.B., Storlien, L.H., 1997. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes.* 46, 983-8.
- Pande, S.V., 1975. A mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72, 883-7.
- Price, N., van der Leij, F., Jackson, V., Corstorphine, C., Thomson, R., Sorensen, A., Zammit, V., 2002. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics.* 80, 433-42.
- Ramsay, R.R., Tubbs, P.K., 1975. The mechanism of fatty acid uptake by heart mitochondria: an acylcarnitine-carnitine exchange. *FEBS Lett.* 54, 21-5.
- Rasmussen, B.B., Holmback, U.C., Volpi, E., Morio-Liondore, B., Paddon-Jones, D., Wolfe, R.R., 2002. Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *J Clin Invest.* 110, 1687-93.
- Rebouche, C.J., Panagides, D.D., Nelson, S.E., 1990. Role of carnitine in utilization of dietary medium-chain triglycerides by term infants. *Am J Clin Nutr.* 52, 820-4.
- Rinaldo, P., Matern, D., Bennett, M.J., 2002. Fatty acid oxidation disorders. *Annual review of physiology.* 64, 477-502.
- Rinaldo, P., Cowan, T.M., Matern, D., 2008. Acylcarnitine profile analysis. *Genetics in Medicine.* 10, 151-156.
- Ross, N.S., Hoppel, C.L., 1987. Partial muscle carnitine palmitoyltransferase-A deficiency. Rhabdomyolysis associated with transiently decreased muscle carnitine content after ibuprofen therapy. *JAMA.* 257, 62-5.
- Rubio-Gozalbo, M.E., Bakker, J.A., Waterham, H.R., Wanders, R.J., 2004. Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects. *Mol Aspects Med.* 25, 521-32.
- Rufer, A.C., Thoma, R., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., De Roo, E., Banner, D.W., Mueller, F., Chomienne, O., Hennig, M., 2006. The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment. *Structure.* 14, 713-23.
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., Berendsen, H.J., 1977. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular

- dynamics of n-Alkanes. *Journal of Computational Physics*. 23, 327-341.
- Sacksteder, K.A., Morrell, J.C., Wanders, R.J., Matalon, R., Gould, S.J., 1999. MCD encodes peroxisomal and cytoplasmic forms of malonyl-CoA decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J Biol Chem*. 274, 24461-8.
- Saggerson, D., 2008. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr*. 28, 253-72.
- Sali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 234, 779-815.
- Sambandam, N., Steinmetz, M., Chu, A., Altarejos, J.Y., Dyck, J.R., Lopaschuk, G.D., 2004. Malonyl-CoA decarboxylase (MCD) is differentially regulated in subcellular compartments by 5'AMP-activated protein kinase (AMPK). Studies using H9c2 cells overexpressing MCD and AMPK by adenoviral gene transfer technique. *Eur J Biochem*. 271, 2831-40.
- Schellenberger, A., Fischer, G., Hübner, G. & Ulbrich, R., 1989. *Enzymkatalyse–Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme*. Springer Verlag.
- Schimmenti, L.A., Crombez, E.A., Schwahn, B.C., Heese, B.A., Wood, T.C., Schroer, R.J., Bentler, K., Cederbaum, S., Sarafoglou, K., McCann, M., Rinaldo, P., Matern, D., di San Filippo, C.A., Pasquali, M., Berry, S.A., Longo, N., 2007. Expanded newborn screening identifies maternal primary carnitine deficiency. *Mol Genet Metab*. 90, 441-5.
- Sigauke, E., Rakheja, D., Kitson, K., Bennett, M.J., 2003. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical, and molecular review. *Lab Invest*. 83, 1543-54.
- Smeets, R.J., Smeitink, J.A., Semmekrot, B.A., Scholte, H.R., Wanders, R.J., van den Heuvel, L.P., 2003. A novel splice site mutation in neonatal carnitine palmitoyl transferase II deficiency. *J Hum Genet*. 48, 8-13.
- Spiekerkoetter, U., 2007. Effects of a fat load and exercise on asymptomatic VLCAD deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 30, 405.
- Stanley, C.A., Hale, D.E., Berry, G.T., Deleeuw, S., Boxer, J., Bonnefont, J.P., 1992. Brief report: a deficiency of carnitine-acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane. *N Engl J Med*. 327, 19-23.
- Storey, K.B., 2004. *Functional metabolism: regulation and adaptation*, John Wiley & Sons, Inc.: New York.
- Taggart, R.T., Smail, D., Apolito, C., Vladutiu, G.D., 1999. Novel mutations associated with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Mutat*. 13, 210-20.

- Taroni, F., Verderio, E., Fiorucci, S., Cavadini, P., Finocchiaro, G., Uziel, G., Lamantea, E., Gellera, C., DiDonato, S., 1992. Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 8429-33.
- Taroni, F., Verderio, E., Dworzak, F., Willems, P.J., Cavadini, P., DiDonato, S., 1993. Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients. *Nat Genet.* 4, 314-20.
- Taroni, F., Gellera, C., Cavadini, P., 1994. Lethal carnitine palmitoyltransferase (CPT) II deficiency in newborns: a molecular-genetic study. *American Journal of Human Genetics.* 55.
- Tein, I., Demaugre, F., Bonnefont, J.P., Saudubray, J.M., 1989. Normal muscle CPT1 and CPT2 activities in hepatic presentation patients with CPT1 deficiency in fibroblasts. Tissue specific isoforms of CPT1? *J Neurol Sci.* 92, 229-45.
- Thuillier, L., Sevin, C., Demaugre, F., Brivet, M., Rabier, D., Droin, V., Aupetit, J., Abadi, N., Kamoun, P., Saudubray, J.M., Bonnefont, J.P., 2000. Genotype/phenotype correlation in carnitine palmitoyl transferase II deficiency: lessons from a compound heterozygous patient. *Neuromuscul Disord.* 10, 200-5.
- Thuillier, L., Rostane, H., Droin, V., Demaugre, F., Brivet, M., Kadhom, N., Prip-Buus, C., Gobin, S., Saudubray, J.M., Bonnefont, J.P., 2003. Correlation between genotype, metabolic data, and clinical presentation in carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) deficiency. *Hum Mutat.* 21, 493-501.
- Tonazzi, A., Giangregorio, N., Indiveri, C., Palmieri, F., 2009. Site-directed mutagenesis of the His residues of the rat mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: implications for the role of His-29 in the transport pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1787, 1009-15.
- Traina, G., 2011. Update on critical evidence for use of carnitine analogs in clinical practice in CNS disorders. *Nutr. Diet. Suppl.* 3, 77-87.
- Uziel, G., Taroni, F., Di Donato, S., 1995. Fatty acid oxidation disorders. *Metabolic Encephalopathies: Therapy and Prognosis: Postgraduate Course of the Pierfranco E Luisa Mariani Foundation, Milan Milan State University, 1-3 March 1994.* 4, 11-23.
- Verderio, E., Cavadini, P., Pandolfo, M., DiDonato, S., Taroni, F., 1993. Two novel sequence polymorphisms of the human carnitine palmitoyltransferase II (CPT1) gene. *Human molecular genetics.* 2, 334-334.
- Verderio, E., Cavadini, P., Montermini, L., Wang, H., Lamantea, E., Finocchiaro, G., DiDonato, S., Gellera, C., Taroni, F., 1995. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: structure of the gene and characterization of two novel disease-causing mutations. *Hum Mol Genet.* 4, 19-29.

- Vladutiu, G.D., 2001. Heterozygosity: an expanding role in proteomics. *Mol Genet Metab.* 74, 51-63.
- Vladutiu, G.D., Bennett, M.J., Fisher, N.M., Smail, D., Boriack, R., Leddy, J., Pendergast, D.R., 2002a. Phenotypic variability among first-degree relatives with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Muscle Nerve.* 26, 492-8.
- Vladutiu, G.D., Quackenbush, E.J., Hainline, B.E., Albers, S., Smail, D.S., Bennett, M.J., 2002b. Lethal neonatal and severe late infantile forms of carnitine palmitoyltransferase II deficiency associated with compound heterozygosity for different protein truncation mutations. *J Pediatr.* 141, 734-6.
- Voilley, N., Roudit, R., Vicaretti, R., Bonny, C., Waeber, G., Dyck, J.R., Lopaschuk, G.D., Prentki, M., 1999. Cloning and expression of rat pancreatic beta-cell malonyl-CoA decarboxylase. *Biochem J.* 340 (Pt 1), 213-7.
- Vorgerd, M., Deschauer, M., 2013. Metabolische und mitochondriale Myopathien. *Zeitschrift für Rheumatologie.* 72, 242-254.
- Wakil, S.J., Abu-Elheiga, L.A., 2009. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 50 Suppl, S138-43.
- Wataya, K., Akanuma, J., Cavadini, P., Aoki, Y., Kure, S., Invernizzi, F., Yoshida, I., Kira, J., Taroni, F., Matsubara, Y., Narisawa, K., 1998. Two CPT2 mutations in three Japanese patients with carnitine palmitoyltransferase II deficiency: functional analysis and association with polymorphic haplotypes and two clinical phenotypes. *Hum Mutat.* 11, 377-86.
- Wieser, T., Deschauer, M., Zierz, S., 1997. Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: three novel mutations. *Ann Neurol.* 42, 414.
- Wieser, T., Deschauer, M., Olek, K., Hermann, T., Zierz, S., 2003. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency Molecular and biochemical analysis of 32 patients. *Neurology.* 60, 1351-1353.
- Witt, D.R., Theobald, M., Santa-Maria, Packman, S., Townsend, S., Sweetman, L., Goodman, S., Rhead, W., Hoppel, C.L., 1991. Carnitine palmitoyltransferase-type 2 deficiency. *American Journal of Human Genetics.* 49 (Suppl. 4).
- Woeltje, K.F., Esser, V., Weis, B.C., Cox, W.F., Schroeder, J.G., Liao, S.T., Foster, D.W., McGarry, J.D., 1990a. Inter-tissue and inter-species characteristics of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. *J Biol Chem.* 265, 10714-9.
- Woeltje, K.F., Esser, V., Weis, B.C., Sen, A., Cox, W.F., McPhaul, M.J., Slaughter, C.A., Foster, D.W., McGarry, J.D., 1990b. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase II. *J Biol Chem.* 265, 10720-5.

- Wu, X., Prasad, P.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., 1998. cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun.* 246, 589-95.
- Wu, X., Huang, W., Prasad, P.D., Seth, P., Rajan, D.P., Leibach, F.H., Chen, J., Conway, S.J., Ganapathy, V., 1999. Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J Pharmacol Exp Ther.* 290, 1482-92.
- Xue, J., Peng, J., Zhou, M., Zhong, L., Yin, F., Liang, D., Wu, L., 2012. Novel compound heterozygous mutation of MLYCD in a Chinese patient with malonic aciduria. *Mol Genet Metab.* 105, 79-83.
- Yamamoto, S., Abe, H., Kohgo, T., Ogawa, A., Ohtake, A., Hayashibe, H., Sakuraba, H., Suzuki, Y., Aramaki, S., Takayanagi, M., Hasegawa, S., Niimi, H., 1996. Two novel gene mutations (Glu174-->Lys, Phe383-->Tyr) causing the "hepatic" form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Genet.* 98, 116-8.
- Yamazaki, N., Shinohara, Y., Shima, A., Yamanaka, Y., Terada, H., 1996. Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *Biochim Biophys Acta.* 1307, 157-61.
- Yang, B.-Z., Ding, J.-H., Dewese, T., Roe, D., He, G., Wilkinson, J., Day, D.W., Demaugre, F., Rabier, D., Brivet, M., 1998a. Identification of four novel mutations in patients with carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *Molecular genetics and metabolism.* 64, 229-236.
- Yang, B.Z., Ding, J.H., Roe, D., Demaugre, F., Brivet, M., Roe, C.R., 1977. Carnitin palmitoyltransferase II deficiency: Clinical forms and mutations. *Proceedings, International Congress of Inborn Errors of Metabolism Vienna, Austria.* May 21–25, 202.
- Yang, B.Z., Ding, J.H., Roe, D., Dewese, T., Day, D.W., Roe, C.R., 1998b. A novel mutation identified in carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab.* 63, 110-5.
- Yao, D., Mizuguchi, H., Yamaguchi, M., Yamada, H., Chida, J., Shikata, K., Kido, H., 2008. Thermal instability of compound variants of carnitine palmitoyltransferase II and impaired mitochondrial fuel utilization in influenza-associated encephalopathy. *Hum Mutat.* 29, 718-27.
- Yao, D., Yao, M., Yamaguchi, M., Chida, J., Kido, H., 2011. Characterization of compound missense mutation and deletion of carnitine palmitoyltransferase II in a patient with adenovirus-associated encephalopathy. *J Med Invest.* 58, 210-8.
- Zammit, V.A., 2008. Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function. *IUBMB Life.* 60, 347-54.

- Zierz, S., Engel, A.G., 1985. Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle. *Eur J Biochem.* 149, 207-14.
- Zierz, S., Engel, A.G., 1987. Are there two forms of carnitine palmitoyltransferase in muscle? *Neurology.* 37, 1785-90.
- Zierz, S., Neumann-Schmidt, S., Jerusalem, F., 1993. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase in normal human skeletal muscle and in muscle of patients with carnitine palmitoyltransferase deficiency by long- and short-chain acylcarnitine and acyl-coenzyme A. *Clin Investig.* 71, 763-9.
- Zierz, S., 1994. Limited trypsin proteolysis renders carnitine palmitoyltransferase insensitive to inhibition by malonyl-CoA in patients with muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Clin Investig.* 72, 957-60.

Abkürzungen

Σ Disulfid	Anzahl der Disulfidbrücken
Σ Trp	Anzahl der Tryptophane
Σ Tyr	Anzahl der Tyrosine
A	Restaktivität des Enzyms gemessen zum Zeitpunkt t der Inaktivierung
Å	Angström ($1 = 10^{-10}$ m)
A_0	Anfangsaktivität des Enzyms
Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
AM1-BCC	(AM1 mit <i>bond-charge correction</i>)
ATP	Adenosintriposphat
B-CPT I	Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 aus Gehirn
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CACT	Carnitin/Acylcarnitin-Translokase
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CK	Creatinkinase
CoA	Coenzym A
CoASH	Coenzym A
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
CPT I	Carnitin-Palmitoyltransferase 1
CPT II	Carnitin-Palmitoyltransferase 2
<i>CPT2</i>	Gen der Carnitin-Palmitoyltransferase 2
CT	Carnitin-Transporter
d	Schichtdicke
D	Enzym im denaturierte Zustand
del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungen

DTNB	5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
E	Enzym Wildtyp
E*	Enzym Variante S113L
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Komplex	Enzym-Substrat-Komplex
E_{λ}	Extinktion bei der Wellenlänge λ
FAS	Fettsäure-Synthetase
FFA	<i>free-fatty-acids</i>
fs	Femtosekunde (1 fs = 10^{-15} s)
fs	<i>frameshift</i>
h	Stunde
<i>hCPT2</i>	humane CPT2
His ₆	Hexahistidin
His ₆ -N- <i>hCPT2</i>	humane Carnitin-Palmitoyltransferase 2 mit N-terminalem Hexahistidin- <i>tag</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Gleichgewichtskonstante des Enzyms
k^{app}	Scheinbare Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung
k_{in}	Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Inaktivierung
k_{re}	Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Reaktivierung
LB	Luria-Bertani
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCAD	<i>long-chain</i> -Acyl-CoA-Dehydrogenase
LCFA	Longkettige Fettsäuren
L-CPT I	Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 aus Leber
M	Marker
Mal-CoA	Malonyl-CoA
MCACD	<i>medium-chain</i> -Acyl-Coenzym A -Dehydrogenase
MCD	Malonyl-Coenzym A-Decarboxylase

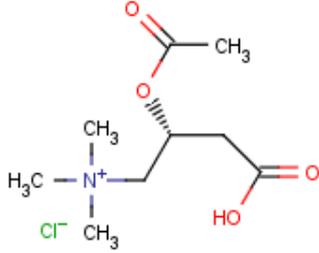
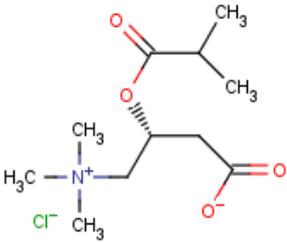
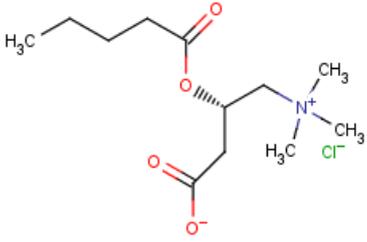
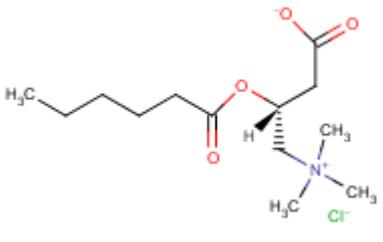
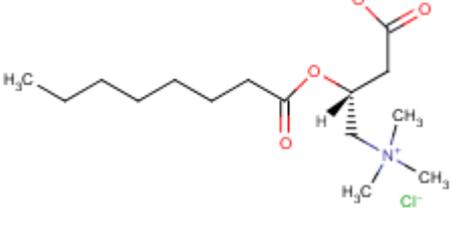
Abkürzungen

M-CPT I	Isoenzym der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 aus Muskel
MD	Moleküldynamik
min	Minute
MOE	<i>molecular-operating-environment</i>
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular-weight-cut-off</i>
N	Enzym im nativen Zustand
n	Offset, repräsentiert die endgültige Restaktivität
nOG	n-Oktyl-β-D-glukopyranosid
ns	nanosekunde (1 ns = 10 ⁻⁹ s)
OCTN2	Natrium-abhängiger organischer Kationtransporter 2
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OMIM	<i>online-mendelian-inheritance-in-man</i>
PME	<i>particle-mesh-ewald</i>
PMEMD	<i>particle-mesh-ewald-molecular-dynamics</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
ps	Picosekunde (1 ps = 10 ⁻¹² s)
rCPT2	CPT2 aus <i>Rattus norvegicus</i>
RMS	<i>root-mean-square</i>
RMSD	mittlere quadratische Abweichung der Atomkoordinaten
rpm	<i>rounds-per-minute</i>
SCACD	<i>short-chain-Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
slpm	Standard Liter pro Minute
TCA	Zitronensäurezyklus
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine-hydrochlorid
TIP3P	<i>three point transferable interaction potential</i>
UV-Vis	Ultraviolett-Visuell
v	Umsatzgeschwindigkeit
v/S	Umsatzgeschwindigkeit/Substrat-Charakteristik

Abkürzungen

VLCACD	<i>very-long-chain</i> -Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase
z.B.	zum Beispiel
ϵ_{λ}	Molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

Anhang

Bezeichnung	Acyl-L-carnitin-Derivat	Chemische Struktur
C2	Acetyl-L-carnitin-hydrochlorid	
C4	Isobutyryl-L-carnitin-chlorid	
C5	Valeryl-L-carnitin-chlorid	
C6	Hexanoyl-L-carnitin-chlorid	
C8	Octanoyl-L-carnitin-chlorid	

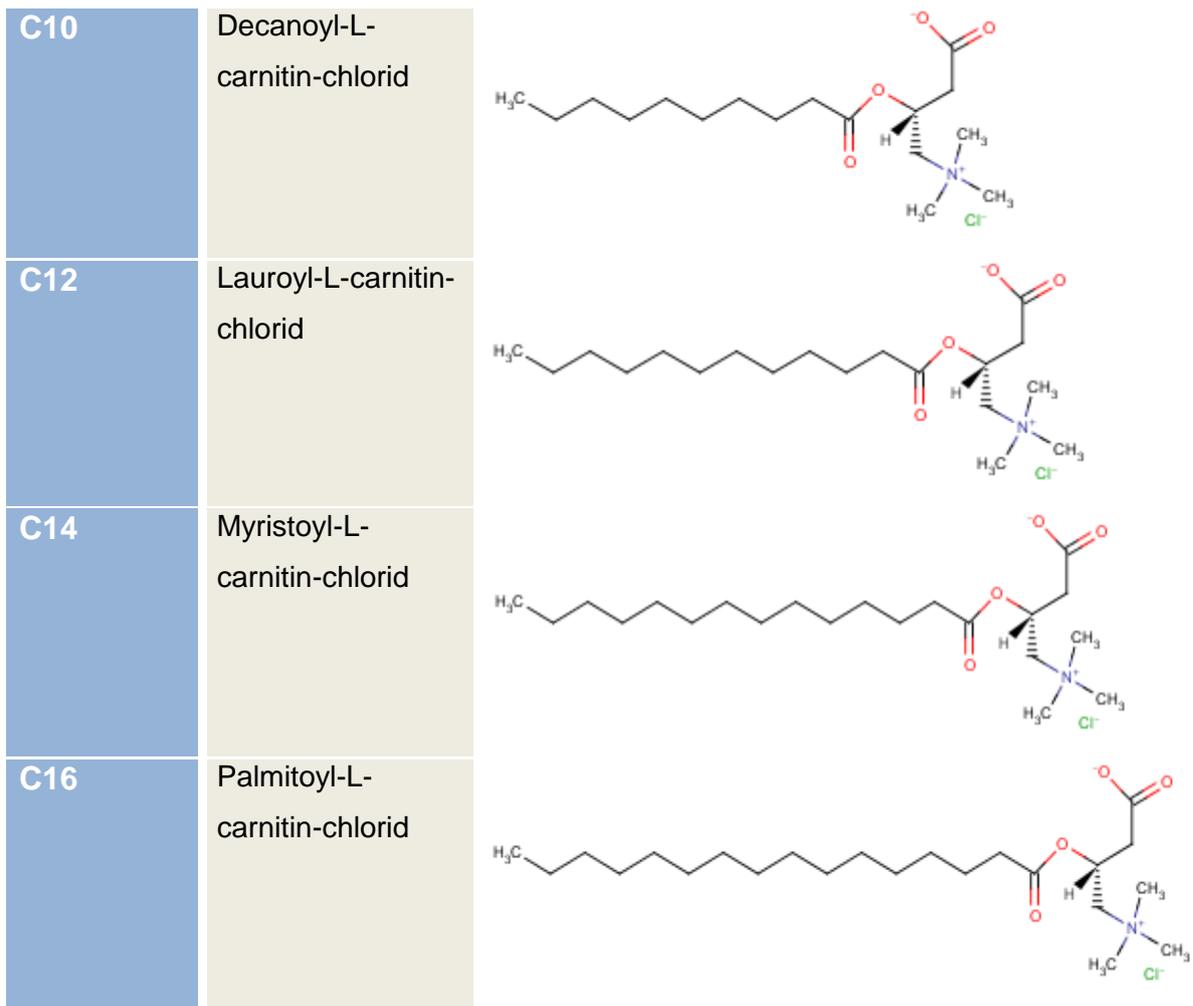


Abb. 1. Die verwendeten Acyl-L-carnitine in der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 1. die identifizierte Mutationen der humane CPT II.

Exon	Mutation	Nukleotid-Änderung	Referenz
1	G13fs	38delG	(Isackson et al., 2006)
1	A15fs	36-43dupGGGCCCG	(Isackson et al., 2006)
1	Q33RfsX40	98delA	(Fanin et al., 2012)
1	S38fs	112_113dupGC	(Martin et al., 2000)
1	P50H	149C>A	(Verderio et al., 1995)
2	P55R	164C>G	(Isackson et al., 2008)
2	P61fs	182_203del22	(Joshi et al., 2013)
2	L72F	216G>C	(Ijlst et al., 1999)
Intron 2	P78fs	c.234-1G>A	(Smeets et al., 2003)
3	C84R	250T>C	(Isackson et al., 2006)
3	S86fs	256_257delAG	(Isackson et al., 2006)
3	A101V	302C>T	(Isackson et al., 2006)
3	S113L	338C>T	(Taroni et al., 1993)
Intron 3	G114fs	IVS3+1G>A	(Joshi et al., 2013)
Intron 3	G114fs	IVS3+5G>A	(Deschauer et al., 2003)
4	Y120C	359A>G	(Martin et al., 2000)
4	L121Q	362T>A	(Fanin et al., 2012)
4	R124X	370C>T	(Yang et al., 1998b)
4	R124Q	371G>A	(Thuillier et al., 2003)
4	N146T	437A>C	(Thuillier et al., 2003)
4	R151Q	452G>A	(Yang et al., 1998a)
4	R151W	451C>T	(Corti et al., 2008)
4	R161W	481C>T	(Thuillier et al., 2003)
4	K164X	490A>T	(Ijlst et al., 1999)
4	P173S	517C>T	(Fanin et al., 2012)
4	E174K	520G>A	(Yamamoto et al., 1996)
4	L178F; N179_186del	533-534insT; 534_558del	(Yang et al., 1998a)
4	Y210D	628T>G	(Ijlst et al., 1999)
4	D213G	638A>G	(Orngreen et al., 2005)
4	M214T	641T>C	(Wieser et al., 2003)

4	P227L	680C>T	(Taroni et al., 1994)
4	R231W	691A>T	(Isackson et al., 2006)
4	R247W	739A>T	(Corti et al., 2008)
4	K274M	821A>T	(Ijlst et al., 1999)
4	Y290X	890C>A/G	(Ijlst et al., 1999)
4	R296X	906C>T	(Ijlst et al., 1999)
4	R296Q	907G>A	(Ijlst et al., 1999)
4	L302fs	907-918dup	(Gellera et al., 1992)
4	G310G (stille Mutation)	930C>T	(Isackson et al., 2006)
4	C326Y	977G>A	(Fanin et al., 2012)
4	D328G	983A>G	(Thuillier et al., 2003)
4	F352C(Polimorphism)	1055T>G	(Wataya et al., 1998)
4	V368I (Polimorphism)	1102G>A	(Verderio et al., 1993)
4	R382K	1145G>A	(Yang et al., 1977)
4	F383Y	1148T>A	(Yamamoto et al., 1996)
4	S408fs	1223_1224delCT	(Kaneoka et al., 2005)
4	Q413fs	1238_1239delAG	(Taggart et al., 1999)
4	Q416Q (stille Mutation)	1239G>A	(Anichini et al., 2011)
4	K414TfsX7	1239_1240delGA	(Fanin et al., 2012)
4	T425fs	1273_1274delAC	(Isackson et al., 2006)
4	F448L	1342T>C	(Wieser et al., 1997)
4	R450X	1348A>T	(Anichini et al., 2011)
4	G451E	1352G>A	(Joshi et al., 2013)
4	E454X	1360G>T	(Orngreen et al., 2005)
4	K457X	1369A>T	(Isackson et al., 2006)
4	Y479F	1436A>T	(Wieser et al., 2003)
4	G480R	1438G>A	(Isackson et al., 2006)
4	T482fs	1444_1447delACAG	(Isackson et al., 2006)
4	E487K	1459G>A	(Bruno et al., 2000)
4	I502T	1505T>C	(Martin et al., 2000)
4	R503C	1507C>T	(Taggart et al., 1999)

4	P504L	1511C>T	(Isackson et al., 2006)
4	A515fs	1543_1546delGCCT	(Deschauer et al., 2003)
4	F516S	1547T>C	(Anichini et al., 2011)
4	H523fs	1569_1570delCA	(Isackson et al., 2006)
4	E545del	1634_1636delAAG	(Isackson et al., 2006)
4	G549D	1646G>A	(Taggart et al., 1999)
5	Q550R	1649A>G	(Yang et al., 1998a)
5	D553N	1657G>A	(Verderio et al., 1995)
5	R554X	1660C>T	(Corti et al., 2008)
5	R560Q	1679G>A	(Isackson et al., 2008)
5	L575P	1724T>C	(Anichini et al., 2011)
5	D576G	1727A>G	(Corti et al., 2008)
5	S588C	1763C>G	(Isackson et al., 2006)
5	S590N	1796C>A	(Joshi et al., 2013)
5	P595fs	1782delC	(Isackson et al., 2008)
5	G600R	1798G>A	(Ijlst et al., 1999)
5	P604S	1810C>T	(Yang et al., 1998a)
5	V605L	1813G>C	(Yao et al., 2008)
5	V606fs	1816_1817delGT	(Isackson et al., 2006)
5	D608H	1823G>C	(Thuillier et al., 2003)
5	Y628S	1883A>C	(Bonfont et al., 1996)
5	R631C	1891C>T	(Taroni et al., 1992)
5	E641fs	1923_1935del	(Isackson et al., 2008)
5	E645RfsX4	1932_1933insA	(Corti et al., 2008)
5	M647V (Polymorphism)	2040A>G	(Verderio et al., 1993)

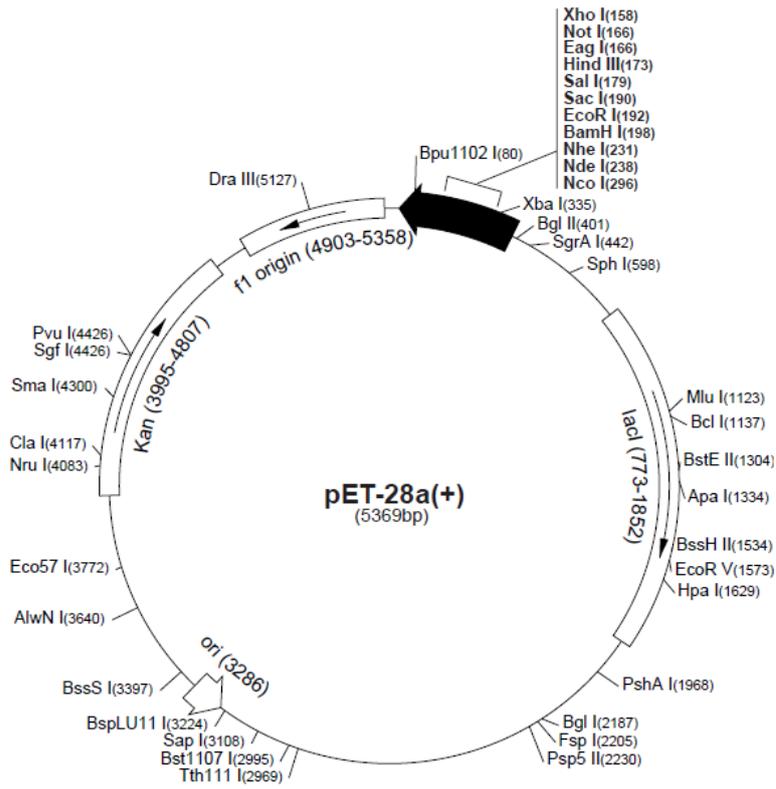


Abb. 2. Die Plasmidkarte des Vektors pET-28a(+) der Firma Novagen (Merck KGaA), Darmstadt entnommen aus <http://www.merckmillipore.de>.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die Anteil am Entstehen dieser Arbeit hatten.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stephan Zierz für die Betreuung und Unterstützung sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft bedanken. Ohne seine Fachexpertise wäre die Bearbeitung dieses interessanten Themas nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert danke ich für seine wertvolle Beratung und ständige Unterstützung. Mein Dank gilt auch seiner Arbeitsgruppe besonders Elfi Busse, Sandy Naumann und Annett Schröter, die mir jederzeit tatkräftig und herzlich entgegen gekommen sind.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens und seiner Arbeitsgruppe für das produktive Zusammenarbeiten und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, insbesondere für die Durchführung der Fermentations- und Reinigungsschritte.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Sippl bedanke ich mich für die großartige Unterstützung bei der Durchführung moleküldynamischer Studien in seiner Arbeitsgruppe. Mein herzlichen Dank auch an Frau Dr. Dina Robaa für das Gelingen dieser Experimente und für die wertvollen Diskussionen.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Ralph Golbik, der mir immer mit Rat und Tat bei inhaltlichen sowie methodischen Fragen zu Seite stand und Mut gemacht hat.

Bei Frau Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger bedanke ich mich für die kritischen und äußerst konstruktiven sowie wertvollen inhaltlichen Anmerkungen.

Herrn Prof. Dr. Marcus Deschauer danke ich für die fachliche Begleitung und seine Unterstützung.

Besonderen Dank auch an alle Mitarbeiter, Ärzte und Oberärzte der neurologischen Klinik der MLU für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft. Besonders möchte ich den Kollegen vom Muskellabor, Pushpa Joshi, Beate Meinhardt, Thekla Wangemann und Kathleen Zietz danken, die mich auch in angespannten und gestressten Situationen ertrugen. Vielen Dank an das Sekretariat, Frau Kerstin Nickel und Frau Cornelia Pabst, die mir viele lästige Verwaltungsaufgaben abgenommen haben und für die netten Gespräche.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Anja Hauburger, die ich ganz oft mit meinen Fragen gefordert habe, die aber immer einen passenden Rat parat hatte.

Danksagung

Allen Freunden, die mich bei der Fertigstellung der Dissertation unterstützt haben, danke ich. Besonders möchte ich mich bei Franziska Gehle und ihrer Familie, Dr. Eva Herzfeld, Diana Lehmann und Dr. Sibylle Plunger bedanken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freunde und meiner Familie für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben. Ganz großer Dank geht dabei an meine Eltern und an Martina sowie an Tobias-Till. Meiner Tochter Melina danke ich ebenfalls für die unendliche Geduld, die durch ihr Verständnis, die Entstehung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.

Lebenslauf:

Persönliche Angaben

Name: Leila Motlagh
Anschrift: Viktor-Scheffel-Straße 4
06114 Halle (Saale)
Geb. am: 19.09.1978, in Teheran/ Iran

Ausbildung

1992 - 7/ 1996 Oberschule Iran (Abschluss: Abitur, im Vergleich zu deutschen Schulsystem)

9/ 1996 - 4/ 2002 Abgeschlossenes Zahnmedizinstudium an der Universität für medizinische Wissenschaften Babol (Babol/Iran)
Thema der Abschlussarbeit: *Analgesia effect of piperine, a comparative study using formalin test vs. hotplate*

10/ 2008 – 11/ 2010 Studium: „Pharmaceutical Biotechnology“ an der Martin-Luther-Universität Halle
Masterarbeit in Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert an der Martin-Luther-Universität Halle mit dem Thema „Untersuchung der Penetration der drei Modellwirkstoffe und des Myritols PC als Marker der lipophilen Bestandteile aus drei O/W-Modellemulsionen mit verschiedenen Lipidanteilen in die menschliche Haut an der Franz-Diffusionszelle zur Validierung der Liberationsstudien“

Seit 2/ 2011 Promotionsarbeit am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Beruflicher Werdegang

4/ 2002 - 11/ 2003 Beschäftigung als Zahnärztin in medizinischem Zentrum für Gesundheit Polsefid/Iran

11/ 2003 – 3/ 2006 Beschäftigung als Zahnärztin in verschiedenen zahnärztlichen Praxen und Kliniken in Teheran

Seit 2/ 2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Muskellabor der Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Halle

Publikationen

Motlagh, L., Lange, S., Polak G., Kalhoelfer, V., Göbel A., Wohlrab, J., Neubert, R.H., 2012. Penetration studies of active model substances from an O/W emulsion – influence of the lipophilicity of the formulation in human skin. *IFSCC Magazine*. 15, 175–183.

Naumann, S., Lange, S., Polak, G., Kalhoelfer, V., Motlagh, L., Goebel, A., Wohlrab, J., Neubert, R.H., 2014. Penetration Studies of an Extremely Lipophilic Active Model Substance from an Oil-in-Water Emulsion: Influence of the Lipophilicity of the Formulation in Human Skin - Part 2. *Skin Pharmacol Physiol*. 27, 97-105.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und dass diese Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Ich versichere weiterhin, dass ich die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.