

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. Stephan Zierz



Carnitin-Palmitoyltransferase und Carnitin-Oktanyltransferase:
Substratspezifität der Carnitin-Acyltransferasen im nativen menschlichen
Skelettmuskelhomogenat und nach Trennung durch Ultrazentrifugation.

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

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

Von Franziska Zerbaum
Geboren am 14.05.1982 in Merseburg

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 13.11.2007
Datum der Verteidigung: 03.06.2008

Gutachter: Prof. Horstkorte
Prof. Reichmann

urn:nbn:de:gbv:3-000013787

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013787>]

Im menschlichen Skelettmuskel wird der Transport von Fettsäureestern zwischen den Kompartimenten und dem Zytoplasma durch verschiedene Carnitin-Acyltransferasen katalysiert. Im Mittelpunkt des Transports von langkettigen Fettsäureestern steht die Carnitin-Palmityltransferase, die auf Grund ihrer Spezifität für Palmityl-CoA diesen Namen erhielt. Des Weiteren existiert eine Carnitin-Oktanyltransferase, die den Transfer von mittellangkettigen Fettsäuren durch die Peroxisomen und Mikrosomen katalysiert. Wird die Aktivität der Acyltransferasen am menschlichen Skelettmuskel in vivo mittels Isotopen-Vorwärts-Reaktion bestimmt, so setzt sich die gemessene enzymatische Aktivität anteilig aus verschiedenen Transferaseaktivitäten zusammen.

Ziel dieser Arbeit war die Substratspezifitäten der verschiedenen Carnitin-Acyltransferasen des Skelettmuskels in vivo zu beschreiben und herauszufinden inwieweit sich die Aktivitäten der Transferasen überlappen. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen, in der diagnostischen Praxis der Bestimmung des CPT II-Mangels gegebenen, um die erhaltenen Ergebnisse in Verbesserungen der Diagnostik einfließen zu lassen. Es sollte das Substrat mit der größten Spezifität für die beiden Transferasen (CPT und COT) bestimmt werden, da nach einer Arbeit von Schaefer et al. die CPT die größte enzymatische Aktivität für Lauryl-CoA (12 C-Atome) besitzen soll [85]. Die Sensitivität der Acyltransferasen für eine Inhibition durch Malonyl-CoA sollte untersucht werden, um herauszufinden welcher Anteil der Hemmung durch die CPT I beziehungsweise durch die COT ausgemacht wird.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Substratspezifitäten der COT und der CPT für Fettsäureester mit einer Kettelänge von 8-18 Kohlenstoffatomen überlappen, sodass bei der Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität am gesamten Muskelhomogenat immer beide Enzyme gemessen werden. In allen untersuchten Fraktionen zeigten die Transferasen die größte Affinität zum Substrat Palmityl-CoA. Der Anteil der CPT an der Gesamtaktivität überwiegt den der COT für dieses Substrat bei Weitem, sodass es nicht unbedingt nötig ist, die COT vor der Bestimmung abzutrennen. Sowohl die CPT als auch die COT zeigten für das Substrat Lauryl-CoA die geringste Affinität und schlechteste katalytische Effizienz. Die CPT und die COT sind Malonyl-CoA sensitiv, wobei die CPT-Aktivität um 45% gehemmt wird, während die COT-Aktivität nur zu circa 20 % hemmbar ist. Die Ergebnisse unterstützen die bisherige Annahme, dass die CPT den Fettsäureester Palmityl-CoA spezifisch umsetzt und dieser zur Untersuchung von CPT-Defekten in Patientenmuskel das Substrat der ersten Wahl ist.

Zerbaum, Franziska: Carnitin-Palmityltransferase und Carnitin-Oktanyltransferase: Substratspezifität der Carnitin-Acyltransferasen im nativen menschlichen Skelettmuskelhomogenat und nach Trennung durch Ultrazentrifugation. Halle, Univ., Med. Fak., Dissertation, 72 Seiten, 2007.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Aufnahme und Aktivierung der Fettsäuren	1
1.2 Familie der Carnitin-Acyltransferasen	3
1.3 Defekte im Carnitin-Palmityltransferasesystem	4
1.3.1 Störungen der Carnitin-Palmityltransferase I	5
1.3.2 Defekte der Carnitin-Palmityltransferase II	5
1.3.2.1 Neonataler CPT II-Mangel	5
1.3.2.2 Infantiler Carnitin Palmityltransferase II-Mangel (hepatokardiomuskulärer Typ)	6
1.3.2.3 Benigner myopathischer Typ des CPT II-Mangels	6
1.3.3 Defekt der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT-Defekte)	7
1.4 Funktion und Regulation der Carnitin-Acyltransferasen	7
1.5 Struktur der Carnitin-Acyltransferasen	9
1.5.1 CPT I	9
1.5.2 CPT II	15
1.5.3 COT	15
2. Themenstellung	18
3. Material und Methoden	20
3.1 Reagenzien	20
3.2 Geräte	20
3.3 Muskelbiopsien	20
3.4 Aufarbeitung der Muskelbiopsien	21
3.5 Messung der Enzymaktivität	21
3.6 Herstellung der Lösungen	22
3.7 Testansatz	23
3.8 Radioaktivität der Carnitinlösung	23
3.9 Durchführung	23
3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration	26
3.11 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse	27
3.12 Kinetik der Carnitin-Acyltransferasen für die verschiedenen Acyl-CoA-Ester im Gesamthomogenat, Sediment und Überstand	27
3.12.1 Oktanyl-CoenzymA	27
3.12.2 Dekanyl-CoenzymA	28

3.12.3	Lauryl-CoenzymA	28
3.12.4	Myristyl-CoenzymA	29
3.12.5	Palmityl-CoenzymA	29
3.12.6	Stearyl-CoenzymA	29
3.13	Hemmbarkeit durch Malonyl-CoenzymA	30
3.14	Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante	30
3.15	Berechnung der Hemmkonzentration I_{50}	30
3.16	Berechnung der katalytischen Effizienz des Substratumsatzes	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Oktanyl-CoenzymA	32
4.2	Dekanyl-CoenzymA	33
4.3	Lauryl-CoenzymA	34
4.4	Myristyl-CoenzymA	35
4.5	Palmityl-CoenzymA	36
4.6	Stearyl-CoenzymA	37
4.7	Hemmbarkeit durch Malonyl-CoenzymA	38
4.7.1	Lauryl-CoenzymA	38
4.7.2	Palmityl-CoenzymA	39
4.8	Michaelis-Menten-Konstante K	40
4.9	Hemmkonzentration I_{50}	40
4.10	Maximalen Umsatzgeschwindigkeit	40
4.11	Katalytischen Effizienz des Substratumsatzes	41
5.	Diskussion	42
5.1	Michaelis-Menten-Konstanten	42
5.2	Hemmkonzentration I_{50}	44
5.3	Maximale Umsatzgeschwindigkeiten	46
5.4	Katalytische Effizienzen	47
5.5	Hemmung der Carnitin-Acyltransferasen durch Malonyl-CoenzymA	50
5.6	Zusammenfassende Gegenüberstellung von Gesamthomogenat, Sediment und Überstand	52
6.	Zusammenfassung	56

7.	Literaturverzeichnis	57
8.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	71
9.	Thesen	72