

1. Einleitung

Zur Aufrechterhaltung der Versorgung des Organismus mit Energie spielt die Energiegewinnung aus Fettsäuren eine wichtige Rolle. Insbesondere bei körperlicher Aktivität, bei Krankheit, Hunger oder Stress wird die Verstoffwechslung von Fettsäuren im menschlichen Skelettmuskel gesteigert. Speziell die Skelett- und Herzmuskulatur, aber auch die Leber sind dafür mit verschiedenen Enzymen ausgestattet, mit deren Hilfe die Energie der Fettsäureester optimal genutzt werden kann.

1. 1 Aufnahme und Aktivierung der Fettsäuren

Durch Lipolyse oder Aufnahme aus dem Extrazellularraum gelangen die Fettsäuren ins Zytosol, wo sie mit Hilfe einer Acyl-CoA-Synthetase verestert werden. Die Aufnahme der, meist an Albumin gebundenen Fettsäuren, aus dem Plasma erfolgt entweder mittels gewebespezifischen FABP (fatty acid transport/ binding proteins) oder durch Diffusion [39;60]. Von den FABP gibt es drei Unterformen [34]: FABP der Plasmamembran [94;95], FAT (fatty acid translocase) [40] und FATP (Fettsäure-Transport-Proteine) [93].

Die Aktivierung der Fettsäuren zu einem Acyl-CoA-Ester erfolgt durch die Acyl-CoA-Synthetase, welche in der äußeren Mitochondrienmembran [76] (siehe *Abb.1*), in Peroxisomen [89] und im Endoplasmatischen Retikulum vorhanden ist [55]. Es existieren verschiedene Isoformen der Acyl-CoA-Synthetase, die sich nach ihrer subzellulären Lokalisation, der Gewebeexpression und der Spezifität für verschiedene Fettsäuren unterscheiden [35;36;51;79;100;103;111]. Ebenso zeigen verschiedene Mitglieder der FATP-Familie eine Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität [18;41]. Coleman et al. vermuten eine weitere Acyl-CoA-Synthetase, die mit der Mitochondrienmembran assoziiert ist und für eine direkte Einschleusung der Acyl-CoA-Ester in die mitochondriale β -Oxidation verantwortlich sein könnte [43;54;56;73]. Dies könnte durch die Tatsache bestätigt werden, dass die Aktivität dieser Synthetase zwischen der inneren und der äußeren Mitochondrienmembran zusammen mit der CPT I und der CPT II lokalisiert ist [51;79]. Hoppel et al. vermuten einen FOAT (fat oxidation-activation transport) Komplex, der mit beiden mitochondrialen Membranen assoziiert ist und eine weitere Alternative für die Passage der Acyl-CoA-Ester durch die Mitochondrienmembran darstellt. [53] Nach einem Modell von Campbell et al. übernimmt die FAT langkettige Fettsäuren aus dem Zytosol von Fettsäure-bindenden Proteinen und gibt sie an die Acyl-CoA-Synthetase weiter [14]. Nach der Aktivierung erfolgt dann der Transport durch die Mitochondrienmembran mit Hilfe der CPT I, der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase und der CPT II (siehe *Abb.1*).

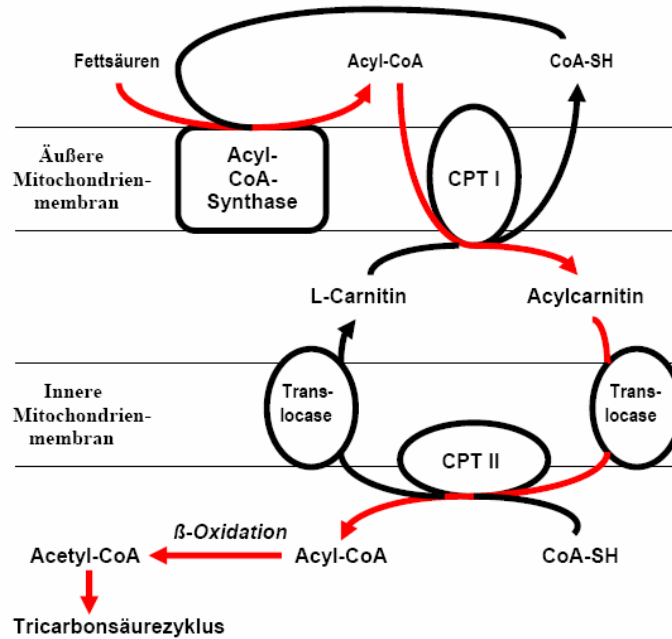


Abb.1: Schematische Darstellung des Transports von Fettsäuren über die mitochondrialen Membranen aus dem Zytoplasma in die Mitochondrienmatrix und deren anschließende metabolische Verwertung im Rahmen von β -Oxidation und Tricarbonsäurezyklus (CoA-SH: freies CoenzymA) [59].

Die Regulation der CPT I durch Malonyl-CoA, dem ersten Zwischenprodukt der Lipogenese, ist von vorrangiger Bedeutung für die Richtung des Energieflusses. Sowohl die genetische Regulation der verschlüsselnden DNA, als auch die biochemischen Eigenschaften lassen eine zentrale Rolle dieses Enzyms im Energiestoffwechsel vermuten. Im Gegensatz dazu scheint der Einfluss der CPT II eher nebensächlich zu sein. Allerdings kann die Veränderung in der Aufnahme der Fettsäuren bei gesteigertem Energiebedarf durch die CPT I allein nicht vollständig begründet werden. So zum Beispiel erklärt die Regulation der CPT I durch Malonyl-CoA nicht die Zunahme der β -Oxidation bei leichterer bis mittlerer körperlicher Anstrengung [23;77]. Auch die Abnahme der β -Oxidation bei schwerster körperlicher Tätigkeit kann nicht allein durch die Malonyl-CoA modulierte CPT I-Aktivität erklärt werden [78]. Bei der Hemmung der Fettsäure-Translokase durch den spezifischen Hemmstoff SSO (sulfo-N-succimidyl oleate) [58;99] kam es zur Abnahme der Aufnahme und Oxidation von Palmityl-CoA, während die Oxidation von Oktanyl-CoA unbeeinflusst blieb [78]. Dies zeigt, dass die FAT einen Teil der langkettigen Fettsäuren, eventuell in Verbindung mit der CPT I durch die Mitochondrienmembran schleust [14]. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Aktivierung der Fettsäuren einen regulativen Einfluss auf die β -Oxidation hat. Diese

potentielle Kontrolle erfolgt durch die Bereitstellung der Substrate und den Abtransport der Produkte. So beeinflusst das Vorhandensein von CoASH die Aktivität der Synthetase [80] und auch ein Mangel an ATP hat einen negativen Effekt auf die Enzymaktivität und den Fluss der β -Oxidation [80]. Die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase hat, wie neue Studien zeigen, ebenfalls einen Einfluss auf den Umsatz der β -Oxidation. Acylcarnitin hemmt die Aktivität der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase und hat somit ebenfalls modulierende Eigenschaften [27].

1.2 Familie der Carnitin-Acyltransferasen

Die Carnitin-Palmityltransferase, die Carnitin-Oktanyltransferase sowie die Carnitin-Acetyltransferase gehören zur Familie der Acylcarnitin-Transferasen, die im Fettstoffwechsel bei der β -Oxidation eine Schlüsselfunktion einnehmen. Von der CPT kennt man zwei Isoformen, die CPT I und die CPT II, welche auf verschiedenen Genen verschlüsselt sind [28;113]. Von der CPT I gibt es drei weitere Isoformen, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert werden und in ihrer Regulation abweichende Eigenschaften zeigen. So wird die Leberform der CPT I (L-CPT I) in Leber, Niere, Pankreas, Intestinaltrakt und im Gehirn, die Muskelform (M-CPT I) in Muskelgewebe, Herzmuskel, Hoden und braunem Fettgewebe synthetisiert [11]. Auch eine Isoform, die für das Gehirn spezifisch ist, die CPT I-c wird exprimiert [82]. Die L-CPT I besteht aus 773, die M-CPT I aus 772 Aminosäuren und auf der Ebene der Aminosäuresequenz sind sie in 63 Prozent identisch [113]. Des Weiteren könnte das m-RNA-Transskript der M-CPT I auf verschiedene Weisen gespliced werden, sodass weitere Unterformen der M-CPT I exprimiert würden [114-116]. Die CPT II befindet sich in der mitochondrialen Matrix und ist mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert [110]. Von ihr existieren keine gewebespezifischen Isoformen.

Tab.1: Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten in den verschiedenen Kompartimenten

Kompartiment	Name	Substrat (Kettenlänge)	Malonyl-CoA sensitiv	Membran- gebunden	Quellen
Mitochondrium	CPT I		+	+	[110]
	CPT II		-	+	[110]
		C16-C18			
	COT	C6-C10	+	-	[29]
	CAT	C4-C8	?	-	[4;117]
Peroxisomen	COT	C6-C10	+	+	[8]
	COT/AT	C16	-	-	[91]
	CAT	C4-C8	?	-	[4;117]
Mikrosomen	AT		+	+	[57]
	AT		-	-	[74;75]
		C16-C18			

Die COT, die sich hauptsächlich in den Peroxisomen befindet, zeigt für mittellangkettige Fettsäuren die größte Carnitin-Acyltransferase-Aktivität [29]. In den Peroxisomen findet die β -Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren bis zur Stufe von mittel- und kurzkettigen Fettsäuren statt. Diese werden dann durch die COT in Carnitinerester umgewandelt und letztendlich der mitochondrialen β -Oxidation zugeführt [30;83]. In den Peroxisomen existieren vermutlich zwei Fraktionen der Carnitin-Acyltransferasen, wobei die eine Malonyl-CoA-sensitiv und mit der peroxisomalen Membran assoziiert [8], die andere unempfindlich für die Hemmung durch Malonyl-CoA und im peroxisomalen Lumen lokalisiert ist [91].

Auch in den Mikrosomen findet sich eine an die Mikrosomenmembran gebundene Malonyl-CoA-sensitive Carnitin-Acyltransferase mit einer Aktivität für mittel- bis langkettige Fettsäuren. Diese wird sehr stark durch Malonyl-CoA gehemmt und bei hohen Konzentrationen an Palmitoyl-CoA kommt es zur Substrathemmung. Diese Substrathemmung ist stärker als die der CPT I (K_i : $11\mu\text{M}$), sodass es sich nicht um ein und dasselbe Enzym handeln kann [57].

Im Lumen der Mikrosomen wird ein Protein mit einer Masse von etwa 54 kDa vermutet, welches ebenfalls eine Carnitin-Acyltransferase-Aktivität besitzt, jedoch nicht durch Malonyl hemmbar ist [74;75].

Die Carnitin-Acetyltransferase gehört ebenfalls zur Familie der Carnitin-Acyltransferasen, sie katalysiert die Umesterung des Acetyl-CoA auf Acetylcarnitin. Die CAT der Peroxisomen dient zur Steuerung des Carnitin-Puffers, indem das in den Peroxisomen vorliegende Acetylcarnitin bei gesteigertem Bedarf in Carnitin umgewandelt wird und dieses der β -Oxidation in den Mitochondrien zugeführt wird [4;117].

Die bisher beschriebenen Transferaseaktivitäten wurden bei verschiedenen Spezies gefunden, inwieweit diese auch im menschlichen Skelettmuskel vorkommen, ist noch nicht erforscht.

1.3 Defekte im Carnitin-Palmitoyltransferasesystem

Störungen der Aufnahme von Fettsäuren ins Mitochondrium können die CPT I, CPT II und die Carnitin-Acetylcarnitin-Translokase betreffen. Am häufigsten finden sich Mutationen der CPT II, Defekte der CPT I wurden bisher nur an der Leberform dieses Enzyms beobachtet.

Diese insgesamt sehr seltenen Erkrankungen führen, besonders bei gesteigerter Lipolyse, zu schweren Symptomen.

1.3.1 Störungen der Carnitin-Palmityltransferase I

Eine seltene Störung des Fettsäuremetabolismus findet sich bei Mutationen der Leberform der CPT I, die zu einer verminderten Aktivität dieses Enzyms führen. Bei einer gestörten Aktivität der CPT I ist die Aufnahme der Fettsäuren ins Mitochondrium behindert, woraus klinisch und biochemisch eine Stress- bzw. Hungerintoleranz resultiert. Klinische Symptome können durch fieberhafte Infekte oder gastrointestinale Erkrankungen ausgelöst werden. Es können drei verschiedene Phänotypen unterschieden werden:

- Hepatische Enzephalopathie: Besonders bei Kindern auftretender Symptomenkomplex aus hypoketotischer Hypoglykämie, plötzliches Leberversagen und hepatische Enzephalopathie ausgelöst durch Fieber oder Hunger.
- Myopathie des Erwachsenenalters
- Akute Fettleber in der Schwangerschaft: Der Fetus ist hierbei homozygot für die L-CPT I Mutation

Durch Vermeidung längerer Nahrungskarenz und schnelle Behandlung von Hypoglykämien kann das Auftreten der Symptome vermieden werden. Bisher erfolgt die Behandlung des L-CPT I Defektes nur symptomatisch [3].

1.3.2 Defekte der Carnitin-Palmityltransferase II

Mutationen der CPT II können zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führen. Unterschieden werden drei Phänotypen: eine letale neonatale Form, eine infantile hepatokardiomuskuläre Form und eine benigne myopathische Form. Der neonatale CPT II Defekt wurde bisher bei 13 Familien beschrieben und der infantile hepatokardiomuskuläre Typ bei über 20 Familien. Die myopathische Form des CPT II Mangels ist mit mehr als 200 veröffentlichten Fällen der häufigste Phänotyp [102].

1.3.2.1 Neonataler CPT II-Mangel

Diese tödlich verlaufende neonatale Form des CPT II-Mangels ist gekennzeichnet durch eine reduzierte Aktivität (auf weniger als 10%) der CPT II in verschiedenen Organen, sowie niedrigen Carnitinkonzentrationen. Die Konzentration von langkettigen Acylcarnitinen und Lipiden ist hingegen erhöht. Symptome wie Leberversagen, hypoketotische Hypoglykämie, metabolische Azidose, Krampfanfälle, Kardiomyopathie, Herzrhythmusstörungen, Atemnot [90;105] und dysplastische Nierenfehlbildungen [90] treten innerhalb weniger Tage nach Geburt auf. Die Prognose ist infaust und endet nach Tagen bis Monaten letal [90;105].

1.3.2.2 Infantiler Carnitin Palmityltransferase II-Mangel (hepatokardiomuskulärer Typ)

Diese Form des CPT II-Defektes kann sich in klinischen Symptomen wie Leberversagen, Kardiomyopathie, hypoketotische Hypoglykämie, Myopathie des Skelettmuskels, aber auch durch Kopf- und Bauchschmerzattacken innerhalb des ersten Lebensjahres manifestieren. Kardiale Arrhythmien können während der Kindheit zum plötzlichen Versterben führen [7;105;112].

1.3.2.3 Benigner myopathischer Typ des CPT II-Mangels

Diese häufigste Form des CPT II-Defektes führt zu Attacken, die klinisch charakterisiert sind durch Muskelschmerzen, Muskelschwäche, Muskelkrämpfe, Paresen, Rhabdomyolyse und paroxysmale Myoglobinurien mit bräunlich verfärbtem Urin bis hin zum Nierenversagen durch interstitielle Nephritis und Tubulusnekrosen [50]. Auslösende Faktoren sind lang andauernde körperliche Anstrengungen, Infektionen, Kälteexposition, Medikamente oder Nahrungskarenz. Inwieweit die Individuen betroffen sind variiert stark, oft ist die Symptomatik nur mild und zwischen den Attacken sind die meisten Menschen asymptomatisch [24].

Das männliche Geschlecht scheint häufiger betroffen zu sein, allerdings leiden erkrankte Frauen seltener an Myoglobinurien, sodass die Erkrankung bei Frauen eventuell öfter unentdeckt bleibt [108]. Insgesamt wurden 60 verschiedene Mutationen der CPT II gefunden, die eine Erkrankung auslösen können [44]. Die häufigste Mutation zeigt einen Austausch der Aminosäure Serin 113 gegen Leucin (S113L) und ist bei 60-80% der Erkrankten zu finden [101]. Eine ebenfalls häufige Änderung der Aminosäuresequenz ist die Q413fs Mutation [98] (Abb.2).

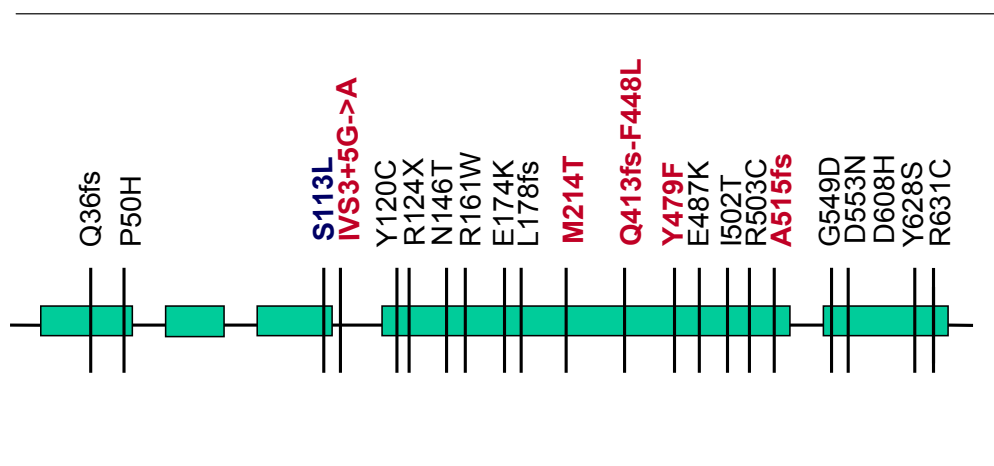


Abb.2: Mutationen des muskulären CPT II Mangels.

1.3.3 Defekt der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT-Defekte)

Diese sehr selten auftretende Störung des Fettsäuretransportes durchs Mitochondrium ist eine der schwersten und meist letal endenden Erkrankungen des Fettsäurestoffwechsels. Kurz nach der Geburt kommt es zu Krampfanfällen, Arrhythmien, Hypoglykämien und Hyperammonämien [107].

1.4 Funktion und Regulation der Carnitin-Acyltransferasen

Die verschiedenen Transferasen katalysieren die An- und Abkoppelung eines Acylesters an L-Carnitin, wobei der Acylcarnitinester mit Hilfe eines weiteren Transferproteins, der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase, durch die Mitochondrienmembran geschleust wird.

Die Umesterung der Acyl-CoA-Ester auf Acylcarnitinester folgt dem Reaktionsmechanismus einer Säure-Basen-Katalyse, bei der die Carboxylgruppe des Acyl-CoA-Esters mit der Hydroxylgruppe des Carnitins reagiert und die Aminosäure Histidin als Protonendonator bzw. -akzeptor fungiert. Diese Katalyse ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der β -Oxidation und deshalb ihre Regulation von entscheidender Bedeutung für vor- und nachgeschaltete Reaktionsschritte.

Koppelung des Carnitins an eine Acylgruppe

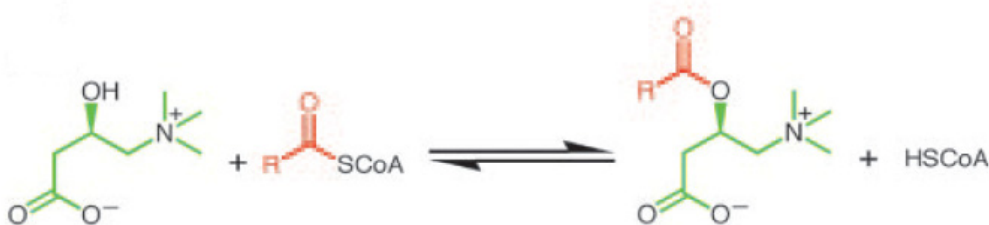


Abb.3: Dargestellt ist die Umesterung des Acyl-CoenzymA-Esters in einen Acylcarnitinester, bei der CoenzymA frei wird [48].

Der Fluss der hepatischen β -Oxidation wird durch verschiedene Effektoren reguliert, die hemmend auf die Aktivität der L-CPT I wirken. So zum Beispiel hemmt Malonyl-CoA, ein Ausgangsstoff der Fettsäurebiosynthese, die L-CPT I [65].

Um den Einfluss auf die β -Oxidation objektivieren zu können wurde der „flux control coefficient“ ermittelt [26;92]. Umsatz-limitierende Enzyme haben einen Koeffizienten von nahezu 1, umsatz-kontrollierende Enzyme zeigen einen Koeffizienten von 0,5-1. Bei Koeffizienten $<0,5$ besteht kein Einfluss auf den Umsatz.

Es konnte bei Ratten L-CPT1 ein hoher „flux control coefficient“ in Bezug auf den Umsatz

der β -Oxidation gefunden werden. Änderungen der physiologischen Bedingungen wie die Palmitylkonzentration oder der Ernährungszustand haben keinen wesentlichen Einfluss auf den „flux control coefficient“ der CPT I [92].

Die Regulation der Muskel- und Herz-CPT I wird durch körperliche Arbeit, ATP sowie durch NADH und Acetyl-CoA gewährleistet. Erstere steigern die oxidative Phosphorylierung und den Tricarbonsäure-Zyklus, NADH und Acetyl-CoA hemmen die β -Oxidation. Auch hier findet sich eine Regulation auf der Ebene der CPT I, jedoch bestehen große Unterschiede zwischen den Isoformen der CPT I.

Die M-CPT I ist wesentlich empfindlicher als die L-CPT I für eine Hemmung durch Malonyl-CoA. Der KM-Wert der M-CPT I für Carnitin ist wesentlich größer (10-15 fach) als bei der L-CPT I [61].

Die Herz-Isoform liegt mit ihren kinetischen Eigenschaften zwischen der L- und M-CPT I, da in diesem Gewebe beide Isoformen mit, sich im Verlauf der Entwicklung verändernden, Anteilen exprimiert werden [13;106].

Sowohl im Skelettmuskel, als auch im Herzmuskel finden sich enorm hohe Malonyl-CoA-Konzentrationen, sodass die Möglichkeit, dass die CPT I-Aktivität Umsatz limitierend ist, einer dennoch ablaufenden β -Oxidation kontrovers gegenüber steht. Erklärungsansätze wären eine Malonyl-CoA unempfindliche CPT I Aktivität, ein hauptsächlich intramitochondriales Vorkommen des Malonyl-CoA oder eine nicht Umsatz-limitierende CPT I im Muskel [27].

Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Verhalten der CPT I ist jedoch das Vorhandensein einer weiteren Bindungsstelle für Malonyl-CoA, die die inhibitorischen Effekte des Malonyl-CoA modifiziert und so die Veresterung der Fettsäuren auch bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen ermöglicht [66]. Langkettige Fettsäuren beeinflussen die Aktivität der CPT, indem sie die Expression der CPT I steigern. Dies geschieht wahrscheinlich über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR- α durch Fettsäuremetabolite. Weiterhin können Schilddrüsenhormone die Expression der CPT beeinflussen.

Die AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) stimuliert die CPT I und hemmt die Acetyl-CoA-Carboxylase, wodurch die Bildung von Malonyl-CoA vermindert wird. Somit aktiviert die AMPK die CPT I auf direktem und indirektem Weg [104]. Auch die Fettsäure-Translokase (FAT: fatty acid translocase / CD 36) wirkt modulierend auf den Fluss der β -Oxidation [14].

1.5 Struktur der Acylcarnitin-Transferasen

1.5.1 CPT I

Die Carnitin-Palmityltransferase I ist ein integrales Protein der äußeren Mitochondrienmembran, das durch zwei transmembranale Abschnitte, die von den ersten 130 Aminosäuren gebildet werden, verankert wird. Es ist insgesamt aus 773 Aminosäuren zusammengesetzt und zeigt sowohl mit dem N-, als auch mit dem C-Terminus zum Zytosol [33]. Von Morillas et al. (2004) wurde auf der Basis der kristallinen CAT-Struktur ein 3D-Modell der Ratten L-CPT I entwickelt. Es beinhaltet die Aminosäuren 166-772, die ersten 165 Aminosäuren konnten nicht mit erfasst werden, da diese bei der CAT nicht vorkommen. Aufgrund der ähnlichen Aminosäuresequenz zwischen CAT und CPT kann eine vermutete Sekundärstruktur erstellt werden [72].

Lokalisation und Bindung von Carnitin, CoenzymA und Palmityl

Für die Substratbindung entscheidend sind die Aminosäuren Arg655, Ser687, Thr686, His473, Asp477, Asp567 und Gly590. Die positive Ladung des Arginin 655 interagiert eventuell mit der negativen Ladung der Carboxylgruppe des Carnitins, indem sich eine Salzbrücke ausbildet. Des Weiteren findet sich in allen Carnitin-Acyltransferasen ein Ser-Thr-Ser Motiv (in der L-CPT I Ser685-Thr686-Ser687), wobei scheinbar nur die beiden letzten Aminosäuren eine Rolle spielen. Seronin 687 befindet sich in der Nähe der Hydroxylgruppe des Carnitins und bestimmt die Konformation des Enzyms während der Katalyse (Stabilisierung des Übergangszustandes) ähnlich der Funktion des entsprechenden Seronins in COT [21]. Seronin selbst wiederum wird von einem Threoninrest (Thr686) in der richtigen Konformation gehalten [72](Abb.4).

Während der Reaktion befindet sich das Palmityl-CoA in einer hydrophoben Tasche des Enzyms. Bei der Rekonstruktion des L-CPT I Modells (Aminosäuren 166-772) konnte gezeigt werden, dass sich das Substrat Palmityl so ausrichtet, dass der Palmitylrest in Richtung des hydrophoben Bereiches der Tasche zeigt, der von der α -Helix 12 und dem β -Faltblatt 14 gebildet wird (siehe Abb.5) .

Auch der Zugang zu dieser Tasche wird von einer, in L- und M-CPT I gleichen, Aminosäurenkonformation bestimmt. Es liegen sich am Eingang der Tasche die hydrophoben Reste der α -Helix 12 mit drei Glycinresten (709-711) des β -Faltblattes 14 gegenüber.

So ist es langkettigen Fettsäuren möglich in die Tasche aufgenommen zu werden. Im Gegensatz hierzu besitzt die CAT keine Glycinreste, sondern größere Aminosäuren (Val-Met-Phe), sodass die Katalyse auf kurzkettige Fettsäuren beschränkt bleibt.

Carnitin und Coenzym A umgebende Aminosäuren in der Ratten L-CPT I

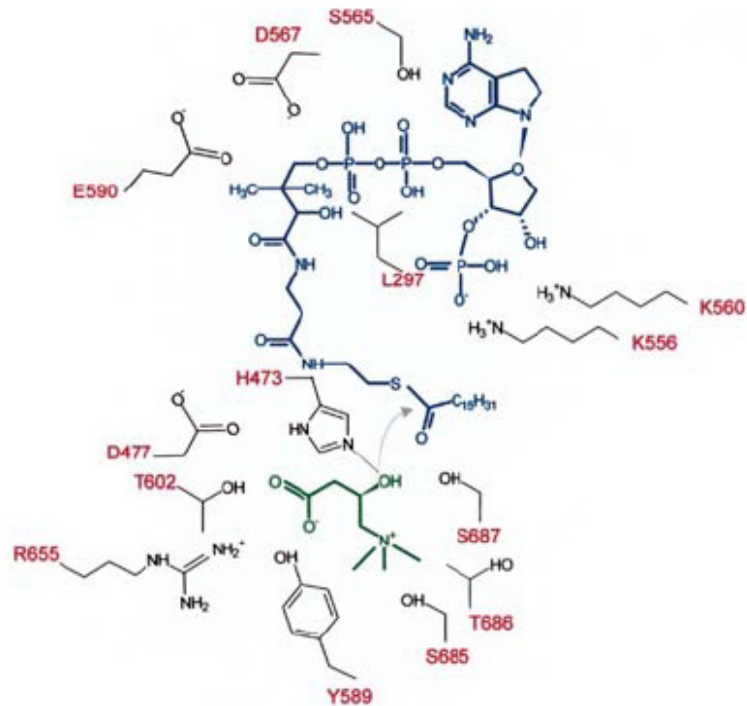


Abb.4: Dargestellt sind die Aminosäuren im Radius von 5\AA um Coenzym A und Carnitin, die wahrscheinlich an der Katalyse teilnehmen. Carnitin ist in grün und Acyl-CoA in blau gezeichnet [72].

Modell des katalytischen Zentrums der CPT I

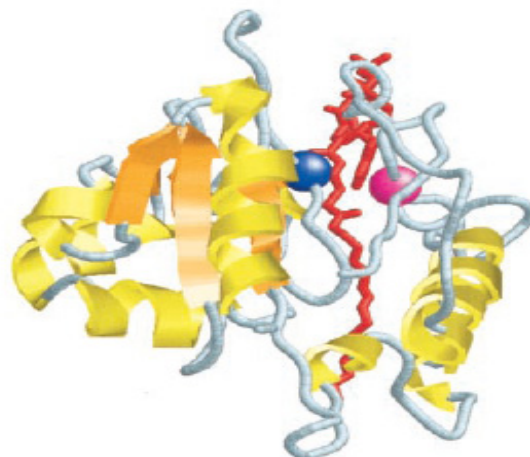


Abb.5: Abgebildet ist die Sekundärstruktur der CPT I: β -Faltblätter sind in orange, α -Helices in gelb dargestellt. In der Mitte befindet sich ein Molekül Palmitoyl-CoA, die Position der Aminosäuren His473 (blau) und Ala381 (magenta) ist ebenfalls gekennzeichnet [70]

Außerdem findet man in den Isoformen der CPT I noch eine weitere Schleife (vor dem Valinrest 706), die in der CAT auch nicht vorhanden ist.

Diese Gegebenheiten weisen darauf hin, dass bei der CPT I bevorzugt Palmityl gebunden wird und bei der CAT das wesentlich kleinere Acetyl als Substrat dient.

Katalytisch wichtige Aminosäuren

Die Säure-Basen-Katalyse wird durch die besondere Struktur der Acyltransferasen ermöglicht. Der Reaktionsmechanismus der Carnitin-Acyltransferasen ähnelt dem der Lipasen, Proteasen, Acetylcholinesterasen und anderer Gruppen übertragender Enzyme [25;86;96]. So findet man in vielen verschiedenen Hydrolasen und Transferasen die katalytische Triade der Aminosäuren Histidin, Aspartat und Seronin [25].

Der Reaktionsmechanismus ist bei den verschiedenen Acyltransferasen geringfügig unterschiedlich. Gründe hierfür könnten Länge der Kohlenstoffketten der einzelnen Acyl-CoA-Reste, die abweichende Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA und die unterschiedliche Lokalisation sein [72]. Das aktive Zentrum wird bei der CPT I von etwa 200 Aminosäuren gebildet (AS 368-567) und beinhaltet die Palmityl-CoA bindende Region, die aus 6 α -Helices und 4 β -Faltblättern gebildet wird [70]. Die Bindungsstelle des Palmityl-CoA bei der CPT I könnte sich zwischen den Aminosäureresten 381-481 befinden [22].

Besonders wichtig erscheint in der L-CPT I das Histidin 473, welches bei der Katalyse nahe dem Schwefelatom des CoenzymA A liegt [72]. Es findet sich bei allen Acylcarnitin-Transferasen und bei seiner Mutation zu Alanin erlischt die Enzymaktivität vollständig. Das His473 fungiert bei der Reaktion als Base und katalysiert die Deprotonierung der 3-Hydroxygruppe des Carnitins, nach der das His473 eine positive Ladung erhält, welche wiederum vom Asp 477 stabilisiert wird [70]. Das entstehende Oxyanion am Carnitin ermöglicht einen direkten nucleophilen Angriff an der Carboxylgruppe des Acyl-CoA-Esters [11](Abb.6).

Durch die Reaktion der aktivierten Hydroxylgruppe des Carnitins mit dem Carboxyl-Kohlenstoffatom des Acyl-CoA kann die Umesterung ohne eine Acyl-Enzym-Zwischenstufe ablaufen [21].

Des Weiteren findet sich bei allen Acyl-Carnitintransferasen, die mittel- und langkettige Fettsäuren verstoffwechseln, ein Alaninrest (Ala381 bei CPT I und Ala238 bei COT), der bei der Acetyltransferase und der Cholintransferase durch ein Glycinrest ersetzt ist.

Enzymatische Katalyse der CPT I

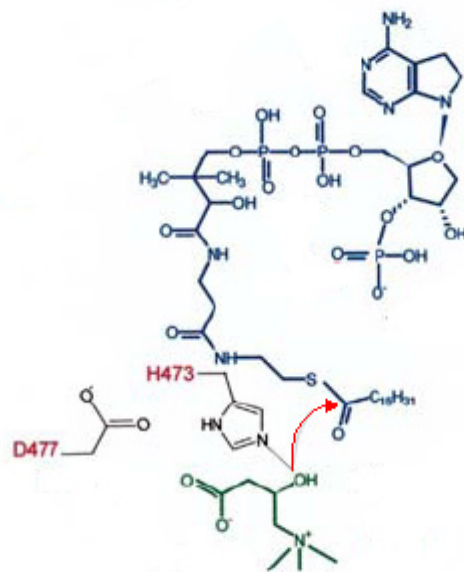


Abb.6: Deprotonierung der 3-OH-Gruppe des Carnitins und nucleophiler Angriff des entstehenden Oxyanions auf die Carboxylgruppe des Palmityl-CoA (roter Pfeil) [aus Morillas et al., geändert].

Position des Palmityls bei Interaktion mit der CPT I

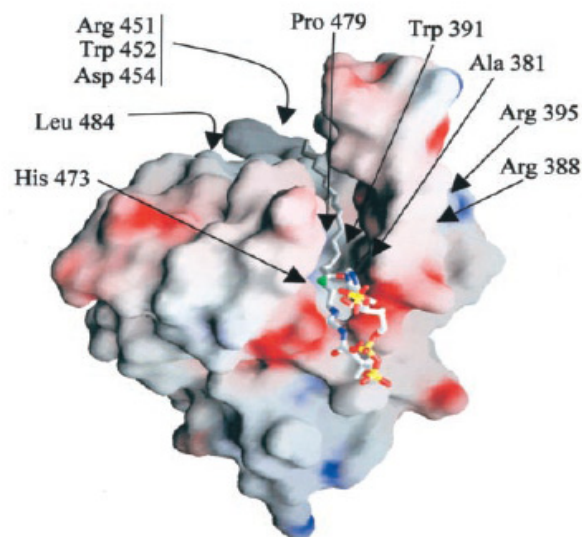


Abb.7: Dargestellt ist die schematische Struktur des aktiven Zentrums. Bei Mutation der, mit Pfeilen markierten, Aminosäuren kommt es zur Verminderung der Aktivität. Besonders hervorzuheben ist die Nähe der Aminosäuren His473 und Ala381 zum Schwefelatom des CoenzymA (grün) [70].

Obwohl dieser Alaninrest in der Aminosäuresequenz vom His473 weit entfernt liegt, ist er im Strukturmodell eng benachbart. Bei CPT- und COT-Mutanten mit der Mutation A381D (CPT I) bzw. A238D (COT) kam es zu einer veränderten Kinetik. Dabei stieg der K_m -Wert für Acyl-CoA stark an (6,8-8,4fach). Die Maximalgeschwindigkeit verringerte sich nur leicht, was auf die Bedeutung dieses Alaninrestes für die Positionierung des Substrates im katalytischen Zentrum hinweisend sein könnte. Dieser Alaninrest (Ala381) ist bei der CPT I (L- und M-Isoform), CPT II und COT konserviert und könnte auch für die Substratspezifität oder die unterschiedliche enzymatische Aktivität dieser Acyltransferasen verantwortlich sein [15;81](Abb.7).

Bindung des Malonyl-CoA

Die Sensivität der CPT I für die Malonyl-CoA-Hemmung ist entscheidend für die Möglichkeit der Regulation des Enzyms. Die CPT II und auch die CAT zeigen diese Hemmbarkeit nicht [61], die COT hingegen ist ebenfalls für Malonyl-CoA empfindlich [69]. Es wurde gezeigt, dass Malonyl-CoA im aktiven Zentrum nicht an der gleichen Stelle wie Palmityl-CoA bindet, obwohl es sich um eine kompetitive Hemmung handelt [10;19;37;62;67;84]. Es werden für die Malonyl-Bindung zwei Bereiche angenommen, die mit unterschiedlicher Affinität binden [87;88]. Die Bindungsstelle niedrigerer Affinität in der Nähe des Acyl-CoA-Bindungsbereiches nimmt Einfluss auf diesen, die Hemmung ist hier allerdings auch abhängig vom Vorhandensein eines CoenzymA-Restes [1;120]. Es wird angenommen, dass an diesem Bereich auch Acyl-CoA-Ester binden können [66]. Jedoch ist diese Bindungsstelle nicht identisch mit dem katalytischen Zentrum, da bei Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums zwar die Aktivität verringert wurde, die Malonylsensitivität aber unbeeinflusst blieb [71].

Der Bereich mit hoher Affinität für Malonyl liegt getrennt von der Acyl-CoA-Bindungsstelle nahe des N-terminalen Endes und die Hemmung durch Bindung an diesen Bereich ist unabhängig von dem CoA-Rest [5;6;20;52;119]. Es wurde lange vermutet, dass die Bindung mit Malonyl-CoA nur nahe dem -COOH Ende statt findet [46;97], jedoch beeinflusst auch das NH₂- Ende die Malonylsensitivität [87;97]. Bei Interaktion des Malonyl-CoA mit der N-terminalen Bindungsstelle (mit höherer Affinität zum Malonyl-CoA) kommt es zur allosterischen Hemmung [6;20;52]. Malonyl-CoA agiert hierbei negativ modifizierend, indem die Acyl-CoA-Sättigungskurve zu höheren Konzentrationen verschoben wird. Außerdem ist die Malonyl-CoA-Sensitivität abhängig von der Konzentration des Carnitins. So konnte gezeigt werden, dass die CPT I bei hohen Carnitin-Konzentrationen stärker durch Malonyl-CoA gehemmt wurde [32]. Auch die mikrosomale Carnitin-Acyltransferase ist durch Carnitin

hemmbar, dies tritt allerdings schon bei physiologischen Konzentrationen ein, bei denen die mitochondriale CPT I noch nicht gehemmt wird. So könnte man vermuten, dass an dieser Stelle die Verteilung der Acyl-CoA-Ester zwischen den Kompartimenten stattfindet [2].

Bei Abtrennung der Aminosäuren 19-40 stieg die Hemmbarkeit durch Malonyl an, sodass davon ausgegangen werden kann, dass dieser erste Terminus (noch vor der ersten Transmembranregion) für die Modulation der Malonylhemmung entscheidend ist [46;45].

Morillas et al. (2002) definierten ein Modell für die Bindungsstelle des Malonyl-CoA an COT und CPT I, die für die Hemmung eventuell verantwortlich ist. In der CPT I gehören die Aminosäuren von Ala478 bis His483 zu diesem Bereich, der sich nahe dem katalytischen Zentrum befindet.

Das Vorhandensein des Malonyls in dieser Tasche führt zu einer Interaktion mit der CPT I, sodass das Substrat Palmitoyl-CoA nicht mehr richtig gebunden werden kann. Dem Modell nach besteht eine Konkurrenz um denselben Abschnitt am Enzym, jedoch ausgehend von zwei verschiedenen Bindungsbereichen [71](Abb.8).

Strukturmodell der CPT I

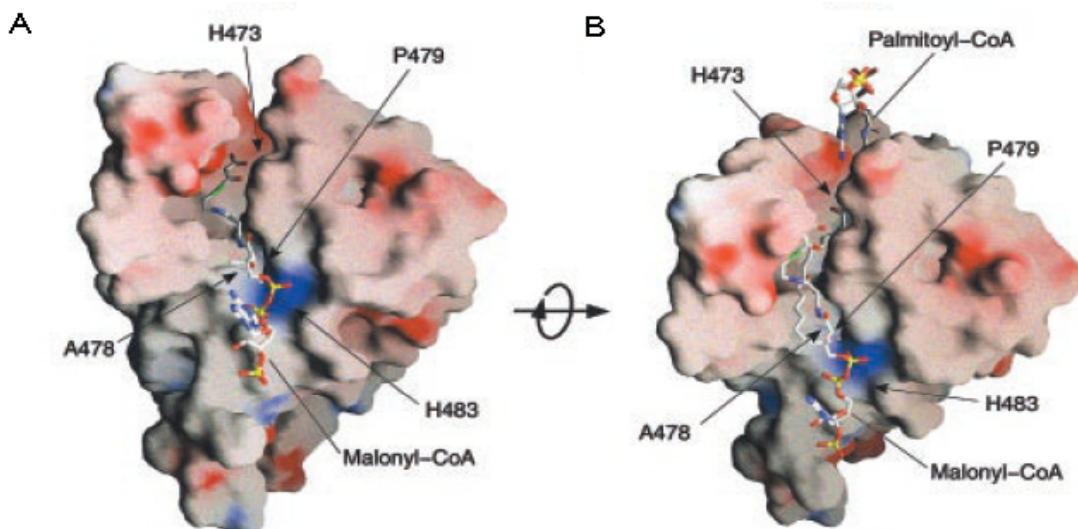


Abb.8: Dargestellt ist ein dreidimensionales Modell des katalytischen Tunnels der CPT I. In Abbildung A bindet ein Molekül Malonyl-CoA; in B ist die Interaktion zwischen Malonyl-CoA und Palmitoyl-CoA dargestellt [71].

Für die Hemmbarkeit der CPT I scheinen die Aminosäuren His277 und Ala478 eine Bedeutung zu haben. Ein entsprechender Alaninrest findet sich bei allen Carnitin-Acyltransferasen, die durch Malonyl gehemmt werden können. Bei den Malonyl unempfindlichen Acyltransferasen findet sich dieses Alanin nicht. Ala478 ist eventuell für die Bindung des Malonyl entscheidend, nicht jedoch für die katalytische Aktivität, da bei

Mutation dieses Alaninrestes sich diese nicht verändert. His277 ist wahrscheinlich für die allosterische Hemmung durch Malonyl wichtig [71].

Einen weiteren Einfluss auf die Hemmbarkeit des Enzyms hat seine Konformation, die wiederum abhängig von der Konzentration des Enzyms ist. So findet sich in der äußeren Mitochondrienmembran eine geringe CPT I-Konzentration und an der Kontaktstelle im intermembranalen Raum eine hohe CPT I-Konzentration.

Die Hemmbarkeit der CPT I ist stark beeinflussbar durch physiologische Gegebenheiten, die wiederum mit der Zusammensetzung der Membranen korrelieren [118]. Durch hohe Enzymkonzentrationen könnte es zu Änderungen des zytosolischen, katalytisch aktiven -COOH Endes kommen, wodurch die Histidinreste für Malonyl erschwert zugänglich würden [71].

1.5.2 CPT II

CPT II besteht aus insgesamt 658 Aminosäuren [31;63] und hat keine transmembranären Domänen [109], allerdings gibt es Hinweise auf Domänen, die mit der inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran in Kontakt treten [109]. Somit ist sie mit der inneren Mitochondrienmembran nur assoziiert [64;110] und auch nicht durch Malonyl-CoA hemmbar [28]. Auf Ebene der mRNA bestehen große Unterschiede zur CPT I, so zum Beispiel besitzt die mRNA der CPT II eine Zielsequenz, die das Enzym zur Aufnahme ins Mitochondrium adressiert. Diese Zielsequenz, mit der die CPT II eine Größe von 74,119 kDa hätte, geht beim Import ins Mitochondrium verloren. Das fertige Enzym hat dann eine molare Masse von nur noch circa 70 kDa [109]. Die Aminosäuresequenz hingegen ist in vielen Bereichen bei der CPT I, CPT II und COT konserviert [28]. Man nimmt an, dass in diesen Bereichen die Bindungsstellen für Carnitin, Acylcarnitin, Acyl-CoA und CoenzymA liegen [109]. Die 25 Aminosäuren am NH₂-terminalen Ende verschieben sich während der Translokation zur inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran [12;31].

1.5.3 COT

Von Jogl et al. wurde aus kristalliner Maus-COT ein dreidimensionales Modell entwickelt. Die COT besteht aus insgesamt 612 Aminosäuren, die in der Sekundärstruktur insgesamt 20 α -Helices und 16 β -Faltblätter bilden. Es kann eine C- und eine N-Domäne unterschieden werden, wobei die Aminosäuren 102-393 zur N-Domäne und die Aminosäuren 394-612 sowie 11-101 zur C-Domäne gehören. Beide Domänen teilen sich das gleiche Grundgerüst, bestehend aus einem zentralen β -Faltblatt und verschiedenen seitlich gelegenen α -Helices [48]. Das aktive Zentrum liegt zwischen beiden Domänen und in der Nähe des Zentrums

befindet sich ein Histidinrest (His327), der dem der CPT I entspricht. Das katalytische Zentrum ist durch zwei Tunnel, die sich in der Mitte treffen, von gegenüberliegenden Seiten des Enzyms zugänglich (*Abb.9*). In einem der Tunnel kommt Carnitin, im anderen Coenzym A zu liegen. Ein dritter Tunnel erstreckt sich zum Zentrum der N-Domäne, in diesem findet die Bindung der mittelkettigen Acylester statt. Die Anwesenheit einer Acylgruppe behindert dabei nicht die Bindung des Carnitins, da die Position des Carnitins, mit oder ohne Acylgruppe, die gleiche ist.

Katalytisches Zentrum der COT

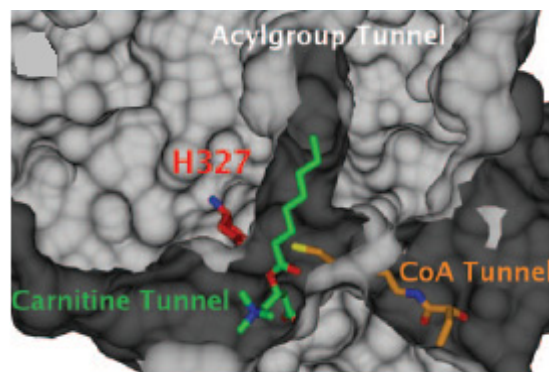


Abb.9: Abgebildet ist ein dreidimensionales Modell der drei Substrattunnel der COT (Maus), im Modell ist Oktanylester gebunden [48].

Die Bindung des Carnitins erfolgt über Wasserstoffbrücken und Ionenpaarbindungen, dabei interagiert ein extra Wassermolekül mit der Carboxylgruppe des Carnitins. Die Trimethylammoniumgruppe wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit umgebenden Aminosäuren gebunden und die positive Ladung dieser Gruppe stabilisiert eventuell den Übergangszustand des Enzyms während der Katalyse. Auch die Carboxylgruppe des Oktanylesters wird mit Hilfe eines zusätzlichen Wassermoleküls gebunden, indem sich eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hauptkette des Alanin 332 ausbildet. Dieses Wassermolekül könnte die Hydrolyse der gebundenen Acylcarnitine über einen nucleophilen Angriff starten [48]. Die Oktanylestergruppe wird in einem Bereich des Enzyms gebunden, der mit hydrophoben Aminosäureresten ausgekleidet ist, sodass eine zylindrische, enge Tasche entsteht, in die die Acylgruppe gut hineinpasst. Diese Tasche ist im Oktanylester freien Zustand schon vorgeformt. Auch in der COT findet sich das konservierte Ser-Thr-Ser-Motiv, welches wahrscheinlich das entstehende Oxyanion des Carnitins im Übergangszustand stabilisiert [21;47].

Substratspezifität

Für die Substratspezifität der COT ergaben Studien, dass die Konformation des Methionin 335 und des Cystein 323 eine Rolle spielen. Es gibt zwei Möglichkeiten der Ausrichtung der Seitenketten, wobei eine Konformation des Met335 mit relativer Nähe zur Kohlenwasserstoffkette des Oktanyl einhergeht. In der anderen Konformation ist die Seitenkette des Methionins weiter entfernt, sodass eine größere Tasche für die Acylgruppenbindung entsteht (Abb.10). Bei der letzteren Variante ergibt sich also die Möglichkeit der Bindung von längererkettigen Acylestern. Bei der CPT ist dieser Methioninrest durch die kleinere Aminosäure Valin ersetzt, sodass diese Vermutung bestärkt wird. Met335 könnte also den Zugang zum aktiven Zentrum kontrollieren [48].

Bindungsbereich der Acylgruppe

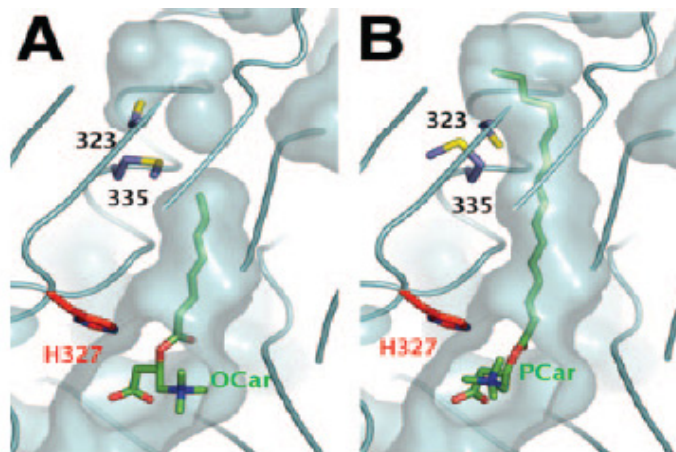


Abb.10: Dargestellt ist die Tasche für die Bindung der Acylgruppe des Oktanoylcarnitins (A) und die erweiterte Tasche für Palmitoylcarnitins (B). Das katalytisch aktive His327 ist rot markiert, das jeweilige Substrat ist grün gezeichnet [48].

Hemmung durch Malonyl-CoA

Auch bei der COT existieren zwei separate Bindungsbereiche für Malonyl-CoA [1]. Eine davon ist nahe dem katalytischen Zentrum gelegen und kompetitiert mit dem Substrat um die Bindung ähnlich der kompetitiven Hemmung durch andere Acyl-CoA-Ester. Eine weitere Bindungsstelle höherer Affinität führt bei Bindung des Malonyl-CoAs zu allosterischen Effekten. Mit dieser Stelle können andere Acyl-CoA-Ester nicht interagieren. Für die Bindung des Malonyls werden die Histidinreste 131 und 340 verantwortlich gemacht, da bei Mutation eines dieser Histidinreste keine Inhibition mehr stattfindet. Morillas et al. fanden heraus, dass dieser Bereich der Malonyl-Bindung an der COT mit dem der CPT I identisch ist [69].