

# **Struktur und Funktion humaner**

## **Acyl-CoA Dehydrogenasen**

Untersuchungen zum " Sudden Infant Death Syndrome"

Franz-Georg Kräutle

**Struktur und Funktion humaner  
Acyl-CoA Dehydrogenasen**

Untersuchungen zum " Sudden Infant Death Syndrome "

DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN  
GRADES DES DOKTORS DER  
NATURWISSENSCHAFTEN

an der Universität Konstanz, Fakultät für Biologie

Vorgelegt von  
FRANZ-GEORG KRÄUTLE

Dissertation der Universität Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 2001

1. Referent: Prof. Dr. Sandro Ghisla

2. Referent: Prof. Dr. Winfried Boos

## Vorbemerkung

Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden zwischen 1990 und 1994 unter der Leitung von Herrn Prof. Ihab Rasched am Lehrstuhl für Proteinbiochemie der Universität Konstanz erstellt. Es sollte hierbei untersucht werden, inwieweit sich die beim „Plötzlichen Kindstod“ typischerweise diagnostizierte mutante Form K<sup>304</sup> → E der humanen mittelketten-spezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase von der nativen wt-Form unterscheidet. Eine ständige Zusammenarbeit sowie wesentliche Teile der Betreuung erfolgten während dieser Zeit durch Herrn Prof. Sandro Ghisla.

Mit dem Tod von Herrn Prof. Rasched im Herbst 1996 und der Aufnahme einer beruflichen Tätigkeit zum Juli 1995 ruhte die Fertigstellung und der Abschluß der Arbeit.

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden in den Jahren 1991 bis 1997 publiziert und können nach dem heutigen Erkenntnisstand als abgeschlossen gelten. Eine ausgiebige Literaturrecherche bezüglich der K<sup>304</sup> → E-MCADh ergibt zum jetzigen Zeitpunkt keine zusätzlichen Erkenntnisse. Vielmehr beschäftigt sich die Forschung mit der Untersuchung weiterer Mutationen verschiedener Acyl-CoA Dehydrogenasen.

Folgende Publikationen basieren auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit:

**Bross, P., Kräutle, F., Stiemke, J., Ghisla, S. and Rasched, I.** (1991) Biochemical Characterization of a mutant human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase present in patients having deficient activity. In: B. Curti, S. Ronchi and G. Zanetti (Ed.) "Flavins and Flavoproteins 1990". Berlin, Walter deGruyter, 895-900,

**Bross, P., Jensen, T., Kräutle, F., Winter, V., Andresen, B.S., Engst, S., Bolund, L., Kølvrå, S., Ghisla, S., Rasched, I. and Gregersen, N.** (1992) Characterization of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) with a point mutation associated with MCAD deficiency. In: P. M. Coates and K. Tanaka (Ed.) "New Developments in Fatty Acid Oxidation". New York, Wiley-Liss., **375** 473-478,

- Bross, P., Andresen, B.S., Winter, V., Kräutle, F., Jensen, T.G., Nandy, A., Kølvrå, S., Ghisla, S., Bolund, L. and Gregersen, N.** (1993) Co-overexpression of bacterial GroESL chaperonins partly overcomes non-productive folding and tetramer assembly of E. coli-expressed human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) carrying the prevalent disease-causing K304E mutation. *Biochem. Biophys. Acta* **1182** 264-274
- Nandy, A., Bross, P., Kräutle, F., Rasched, I. and Ghisla, S.** (1994) Long-chain specific enzyme from medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase. In K. Yagi (Ed.), *Flavins and Flavoproteins 1993* (pp. 327-330). Berlin New York: Walter deGruyter & Co.
- Bross, P., Jespersen, C., Jensen, T.G., Andresen, B.S., Kristensen, M.J., Winter, V., Nandy, A., Kräutle, F., Ghisla, S., Bolund, L., Kim, J.-J. and Gregersen, N.** (1995) Effects of two mutations detected in medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficient patients on folding, oligomer assembly and stability of MCAD enzyme. *J. Biol. Chem.* **270** (17), 10284-10290
- Nandy, A., Kieweg, V., Kräutle, F.-G., Vock, P., Küchler, B., Bross, P., Kim, J.-J., Rasched, I. and Ghisla, S.** (1996) Medium-Long-Chain chimeric human Acyl-CoA Dehydrogenase: Medium-Chain enzyme with the active center base arrangement of Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase. *Biochemistry* **35** (38) 12402-12411
- Kieweg, V., Kräutle, F.G., Nandy, A., Engst, S., Vock, P., Abdel-Ghany, A.-G., Bross, P., Gregersen, N., Rasched, I., Strauss, A. and Ghisla, S.** (1997) Biochemical Characterization of purified, human recombinant Lys 304 Glu medium-chain acyl-CoA dehydrogenase containing the common disease-causing mutation and comparison with the normal enzyme. *Eur. J. Biochem.* **246** 548-556
- Eder, M., Kräutle, F., Dong, Y., Vock, P., Kieweg, V., Kim, J.-J.P., Strauss, A.W. and Ghisla, S.** (1997) Characterization of human and pig kidney long-chain-acyl-CoA dehydrogenases and their role in  $\beta$ -oxidation. *Eur. J. Biochem.* **245** (3) 600-607

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Grundzüge metabolischer Phänomene	1
1.2	Die mitochondriale $\beta$ -Oxidation	2
1.3	Die peroxisomale $\beta$ -Oxidation	7
1.4	Flavoproteine	9
1.5	Die Mittelketten-spezifische Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD)	11
1.5.1	Expression und Assembly	11
1.5.2	Grundlagen molekularer Defekte der Mittelketten-spezifischen-Acyl-CoA-Dehydrogenase	12
1.5.3	Dreidimensionale Struktur	15
1.6	Die humane langketten-spezifische Acyl-CoA-Dehydrogenase (LCAD)	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
2.1	Chemikalien und Geräte	19
2.2	Bakterienstämme und Plasmide	21
2.2.1	Bakterienstämme	21
2.2.2	Plasmide	21
2.3	Molekularbiologische Arbeitstechniken	22
2.3.1	Präparation kompetenter Zellen	22
2.3.2	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid DNA	22
2.3.3	Zellanzucht und Wachstumsbedingungen	23
2.4	Biochemische Arbeitstechniken	23
2.4.1	Zellernte und Aufschluß	23
2.4.2	Ammoniumsulfat-Präzipitation	24
2.4.3	Proteinbestimmung	25
2.4.4	Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon$ für wt-Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase und K <sup>304</sup> →E-MCADh	25
2.4.5	Tricine-Gelelektrophorese	26
2.4.6	Isoelektrische Focussierung (IEF)	27
2.4.7	N-terminale Aminosäuresequenzanalyse von wt-MCADh, K <sup>304</sup> →E-MCADh, wt-LCADh und GroEL	27
2.4.8	Aktivitätsbestimmung	29
2.4.9	Temperaturstabilitätsprofil und Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Katalyse	29
2.4.10	Bestimmung der Aktivierungsenergie $E_a$ nach Arrhenius für wt-MCADh und K <sup>304</sup> →E-MCADh	30

2.4.11	Tryptische Fragmentierung von wt-MCADh und K <sup>304</sup> →E-MCADh	30
2.5	Chromatographische Reinigungsverfahren	31
2.5.1	Reinigung der Mutante K <sup>304</sup> →E der humanen Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase	31
2.5.2	Gelpermeationschromatographie	32
2.5.3	Chromatographie über Hydroxyl-Apatit	32
2.6	Reinigung humaner Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase aus <i>E. coli</i>	33
2.6.1	Reinigung des Chaperons GroEL aus wt-LCADh/GroEL doppel-transformierten <i>E. coli</i> Zellen	33
2.6.2	Entsalzung und Umpufferung von Proteinlösungen	34
2.7	Immunbiochemische Arbeitsmethoden	35
2.7.1	Gewinnung polyklonaler Antikörper	35
2.7.2	Western-Blot-Analyse	36
2.7.3	Dot-Blot-Analyse	37
2.7.4	Inhibitions ELISA Test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	37
2.8	Färbemethoden	38
2.8.1	Coomassie Blue Färbung	38
2.8.2	Coomassie Blue-Färbung für IEF-Gele	38
2.8.3	Silbernitratfärbung	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
3.1	Vorbemerkung	41
3.2	Expression von wt-MCADh und K <sup>304</sup> →E-MCADh in den Plasmiden pBMCK <sup>2-</sup> p985-41	42
3.3	Quantifizierung von wt-MCADh und K <sup>304</sup> →E-MCADh im kompetitiven ELISA-Test	45
3.4	Biochemische Charakterisierung von K <sup>304</sup> →E-MCADh	47
3.4.1	Reinigung von MCADh aus <i>E. coli</i>	47
3.4.2	Molekulargewichtsbestimmung nativer, humaner K <sup>304</sup> →E-MCADh	53
3.4.3	Charakterisierung hochmolekularer Aggregate – Assoziation mit GroEL	54
3.5	Katalytische Eigenschaften der K <sup>304</sup> →E-Acyl-CoA Dehydrogenase	56
3.5.1	Substratspezifität und katalytische Effizienz $V_{max}/K_m$	56
3.5.2	Michaelis-Menten Kinetik; $K_m$ -Werte	57
3.5.3	Spektrale Eigenschaften; Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon$ für K <sup>304</sup> →E-MCADh und Reaktion mit Substraten verschiedener Kettenlänge	61
3.5.4	Titrationsskurvenanalyse: pI-Bestimmung und analytischer Nachweis der Konformationsvariabilität	63

## Inhaltsverzeichnis

---

3.6	Temperatur/Temperaturstabilität	65
3.6.1	Bestimmung der Aktivierungsenergie $E_a$ von wt- und K <sup>304</sup> →E-MCADh	66
3.6.2	Tryptische Fragmentierung von wt- und K <sup>304</sup> →E-MCADh	68
3.7	Die langkettenspezifische Acyl-CoA Dehydrogenase	70
3.7.1	Reinigung der humanen langketten-spezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase aus <i>E. coli</i>	70
3.8	Molekulargewichtsbestimmung humaner Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase	74
3.9	Spektrale Eigenschaften der Long-Chain Acyl CoA Dehydrogenase	75
3.10	Katalytische Eigenschaften der humanen langkettenspezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase	76
3.10.1	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz für Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase	82
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>83</b>
4.1	Aufgabenstellung und Vorbemerkung	83
4.2	Beurteilung der Reinigung rekombinanter Formen humaner Acyl-CoA Dehydrogenasen aus <i>E. coli</i>	84
4.3	Katalytische Eigenschaften	87
4.3.1	Lage der katalytisch aktiven Zentren	88
4.4	Stabilität des assemblierten Enzyms	92
4.5	Temperatursensitive Synthese versus temperatursensitive Faltung	93
4.6	Zur Rolle molekularer Chaperone	98
4.6.1	Oligomerisierung versus Faltung	101
4.7	Oligomerisierung - Faltung - Konformation	102
4.8	Bedeutung der $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> Gruppe des Lys <sup>304</sup> . Spielt NH <sub>2</sub> eine Rolle bzw. kann der Effekt des 304-Phänotyps durch Ersatz mit einer anderen aa mit einer Desaminierung gleichgesetzt werden?	104
4.9	Ausblick	106
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>



### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Transport aktivierter Fettsäuren in das Mitochondrium:	3
Abbildung 1-2	Die mitochondriale $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren.	4
Abbildung 1-3	Die reduktive Halbreaktion.	10
Abbildung 1-4	Oxidative Halbreaktion	10
Abbildung 1-5	Dimeren-Paar der humanen MCAD	15
Abbildung 1-6	Dreidimensionale Struktur der humanen MCAD.	17
Abbildung 3-1	Expressionsplasmide pBMCK <sup>2-</sup> ; pTrc wt-MCADh pTrc K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E-MCADH-MCADh.	42
Abbildung 3-2	Expressionsnachweis plasmidcodierter wt-MCADh (pBMCK <sup>2-</sup> ) und K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E-MCADh (p985-41) in <i>E. coli</i> Rohzelleextrakten.	43
Abbildung 3-3	Inhibitions-ELISA zur Quantifizierung von MCAD	46
Abbildung 3-4	Elutionsdiagramm der K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E-MCADh über Anionenaustauschchromatographie.	50
Abbildung 3-5	Elutionsdiagramm der K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E MCADh Reinigung von OH-Apatit (Fluka Hydroxy Apatite Fast Flow).	51
Abbildung 3-6	Elektrophoretischer Reinheitsnachweis der Trennung von K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E-MCADh.	51
Abbildung 3-7	Eichgerade für Superdex 200 HR 10/30	53
Abbildung 3-8	Dot Blot einzelner Fraktionen der K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E-MCADh nach Anionenaustauschchromatographie.	55
Abbildung 3-9	Immunologischer Nachweis der Co-Elution von K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E-MCADh und GroEL während AIEX.	55
Abbildung 3-10	Substratkettenspezifität humaner wt- und K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E-MCAD.	56
Abbildung 3-11	Kettenlängenabhängigkeit von $V_{\max}/K_m$ für K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E-MCADh.	57
Abbildung 3-12	Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten $K_m$ und $V_{\max}$ für K <sup>304</sup> $\rightarrow$ E-MCADh in Abhängigkeit der Substratkettenlänge.	59

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

---

Abbildung 3-13	Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten der K <sup>304</sup> → E-MCADh.	61
Abbildung 3-14	Absorptionsspektren von wt-MCADh und K <sup>304</sup> → E-MCADh nach Reaktion mit Substraten unterschiedlicher Kettenlänge	62
Abbildung 3-15	Titrationsskurvenanalyse von wt- und K <sup>304</sup> → E-MCADh im pH Intervall von 3–9.	64
Abbildung 3-16	Theoretische Bestimmung des isoelektrischen Punktes von wt-MCADh (pI 7,04) und K <sup>304</sup> → E-MCADh (pI 6,04)	65
Abbildung 3-17	Temperaturstabilitätsprofil von wt-MCADh und K <sup>304</sup> → E-MCADh	66
Abbildung 3-18	Arrhenius-Auftragung zur Ermittlung der apparenten Aktivierungsenergie von wt- und K <sup>304</sup> → E-MCADh.	67
Abbildung 3-19	Western-Blot nach 2,5 stündigem, tryptischen Verdau (37° C) gereinigter wt-MCADh und K <sup>304</sup> → E-MCADh aus <i>E. coli</i> .	68
Abbildung 3-20	Elutionsdiagramm der wt-LCADh nach Anionenaustausch-Chromatographie.	71
Abbildung 3-21	Elutionsdiagramm der wt-LCADh nach OH-Apatit Chromatographie.	72
Abbildung 3-22	Reinigungsverlauf der humanen <i>Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase</i> .	73
Abbildung 3-23	Molekulargewichtsbestimmung der humanen LCAD über Superdex 200pg XK 26/60	74
Abbildung 3-24	Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten für wt- LCADh	76
Abbildung 3-25	Vergleich der Substratspezifitäten	77
Abbildung 3-26	Vergleich der Substratspezifitäten von wt-MCADh und wt-LCADh. verschiedener LCADs.	77
Abbildung 3-27	Bestimmung der Michaelis-Konstanten K <sub>m</sub> und V <sub>max</sub> für wt-LCADh in Abhängigkeit der Substratkettenlänge.	79
Abbildung 4-1	Ladungsverteilung innerhalb der Helix H in direkter Nachbarschaft der aa-304 der K <sup>304</sup> → E-MCADh.	98
Abbildung 4-2	Vereinfachtes Modell zur Entstehung von Inclusion bodies bzw. der korrekten Faltung von Proteinen.	99
Abbildung 4-3	Ladungsverteilung innerhalb der Helices H und I der humanen Acyl-CoA Dehydrogenase in unmittelbarer Nachbarschaft von K <sup>304</sup>	106

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Verteilung der <sup>985</sup> A → G Mutation, sowie weiterer varianter Allele aus 55 nichtverwandten MCAD-defizienten Patienten	13
Tabelle 1-2	Klinische Merkmale der MCAD-Defizienz	14
Tabelle 2-1	Verwendete Zellstämme	21
Tabelle 2-2	Verwendete Plasmide	21
Tabelle 3-1	Reinigungs- und Aktivitätsschema der humanen wt- und K <sup>304</sup> → E-MCAD	45
Tabelle 3-2	Reinigungstabelle der K <sup>304</sup> → E-MCADh aus <i>E. coli</i>	52
Tabelle 3-3	Physikalische Eigenschaften der humanen wt- und K <sup>304</sup> → E-MCADh; Vergleich mit MCAD aus Schweineniere.	60
Tabelle 3-4	Spektrale und physikochemische Eigenschaften verschiedener MCADs.	62
Tabelle 3-5	Reinigungstabelle humaner LCADh	73
Tabelle 3-6	Vergleich der spektralen Eigenschaften verschiedener LCADh aus unterschiedlichen Organismen.	75
Tabelle 3-7	Vergleich der spezifischen Aktivitäten verschiedener LCAD und MCADh	78
Tabelle 3-8	Katalytische Eigenschaften humaner wt-LCAD; Vergleich der Aktivitäten	81
Tabelle 4-1	Reinigungsschema humaner wt- und K304E-MCAD	96

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

---

# Abkürzungen

---

## Abkürzungen

<b>A(x)</b>	Absorption bei der Wellenlänge x
aa	Aminosäure
Ab	Antikörper
abs.	absolut (100%)
AIEX	Anionenaustauscher ( <i>Anion exchange</i> )
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP / AMP	Adenosintriphosphat / Adenosinmonophosphat
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-chloro-indolyl-Phosphat
Bis	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<b>C<sub>xx</sub>-CoA</b>	Coenzym-A der Kettenlänge xx
°C	Grad Celsius
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-Propansulfonsäure
Cam	Chloramphenicol
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1propansulfonat
cFA	Freund's complete Adjuvant
CT	Charge-Transfer-Komplex
<b>D</b>	Dalton
DCPIP	Dichlorophenol-Indophenol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
dyt	Double yeast tryptone Medium
<b>E</b>	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ETF	Elektronen-transferierendes Flavoprotein

## Abkürzungen

---

ETNH <sub>2</sub>	Ethanolamin
ETOH	Ethanol
eq	Äquivalent
<b>FAD</b>	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FCPF <sub>6</sub>	Kaliumhexacyanoferrat
FPLC®	Fast Performance Liquid Chromatography
<b>g</b>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
Δ G <sup>0</sup>	Freie Enthalpie
<b>HAc</b>	Essigsäure
<b>IEF</b>	Isoelektrische Fokussierung
IEC	Chromatofokussierung
iFA	incomplete Freund's Adjuvant
Ig(G)	Immunglobulin der Klasse G
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IVD	Isovaleryl-CoA Dehydrogenase
<b>kD</b>	kiloDalton
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphat-(Puffer)
<b>LB</b>	(Luria Bertoni) Medium
LCAD(h)	Humane Long-Chain Acyl CoA Dehydrogenase
LCAD(p)	Schweine Long-Chain Acyl CoA Dehydrogenase
LCAD(r)	Ratten Long-Chain Acyl CoA Dehydrogenase
<b>MCAD(h)</b>	Humane Acyl-CoA Dehydrogenase (medium-chain)
MCAD(p)	Schweine Acyl-CoA Dehydrogenase (medium-chain)
MCAD(r)	Ratten Acyl-CoA Dehydrogenase (medium-chain)
MEEO	Medium-Electro-Endoosmosis
MeOH	Methanol
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
<b>n. b.</b>	nicht bestimmt

## Abkürzungen

---

NaOH	Natriumhydroxid
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphat
NBS	<i>Newborn calf serum</i>
NBT	Nitro Blue Tetrazolium (Na-Salz)
NC	Nitrocellulose
<b>OD</b> <sub>xx</sub>	Optische Dichte (Absorption) bei der Wellenlänge xx
OH-Apatit	Hydroxyl-Apatit
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
pI	Isoelektrischer Punkt
PMS	Phenazinmethosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POP	Phosphatase
POX	Peroxidase
ppt xx %	Präzipitation entsprechend einer Ammoniumsulfatsättigung zu xx %
PVDF	Polyvinylidifluorid
<b>R</b>	Gaskonstante (8,32 J/mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
R <sub>f</sub>	Relative Mobilität Verhältnis Bandenmitte [cm] zu Laufmittelfront [cm]
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (ca. 22 °C)
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SCAD	Short-chain Acyl-CoA Dehydrogenase
SIDS	Sudden infant death syndrome (plötzlicher Kindstod)
STREP	Streptavidin
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyl-Ethylen-Diamin
Tricine	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## Abkürzungen

---

UV	Ultraviolett
UV/VIS	Spektrum vom sichtbaren bis in den ultravioletten Wellenlängenbereich
$V_{\max}$	Maximale Substratumsatzgeschwindigkeit
VLCAD	Very long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase
$V_t$	Gesamt-Säulenvolumen
wt	Wildtyp
w/w	Massenanteil der Komponente x bezogen auf die Gesamtmasse
w/v	Massenanteil der Komponente x bezogen auf das Gesamtvolumen
yt	Yeast Tryptone

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundzüge metabolischer Phänomene

Lebende Organismen befinden sich nicht im Gleichgewicht. Vielmehr bedürfen sie, um ihre lebenserhaltenden Funktionen aufrechtzuerhalten, der ständigen Zufuhr freier Enthalpie. Der Metabolismus – die Gesamtheit aller katabolischen und anabolischen Stoffwechselfvorgänge– beschreibt die Prozesse der Energieumwandlung lebender Systeme. Katabolismus und Anabolismus laufen gleichzeitig in einer Serie exergonischer Nährstoffoxidation und daran gekoppelter endergonischer Reaktionen der Biosynthese innerhalb der Zelle ab. Die freie Energie, die in Form der Hauptedukte Kohlenhydrat, Lipid und Protein<sup>1</sup> chemisch gebunden ist, wird dabei in der kovalenten Bindung der terminalen Phosphatgruppe eines Adenosintriphosphatmoleküls (ATP) bzw. in der Reduktion von Nicotinamid-Adenosin-Diphosphat (NADP<sup>+</sup>) zu NADPH gespeichert<sup>2</sup>. Obgleich es eine vergleichbar große Anzahl an Stoffwechselwegen für die unterschiedlichsten Variationen des Substratauf- und Abbaus gibt, läßt sich die Anzahl der dabei entstehenden gemeinsamen Intermediate auf einige wenige beschränken. Eine zentrale Stellung nimmt hierbei Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) ein, welches als gemeinsames Zwischenprodukt des Kohlehydrat-, Protein-, und Lipidstoffwechsels dient. Das im Zuge der einzelnen Abbauewege gebildete Acetyl-CoA wird schließlich durch die enzymatischen Reaktionen des Tricarbonsäurezyklus und der oxidativen Phosphorylierung zu Kohlendioxyd (CO<sub>2</sub>) und Wasser oxidiert.

Neben dem glycolytischen Abbau der Kohlenhydrate und deren weiterer Oxidation durch Tricarbonsäurezyklus und oxidative Phosphorylierung, kommt den Fettsäuren und deren intramitochondrialem Abbau eine ebenso bedeutende Stellung zu. Ein Vergleich der Energiebilanzen der einzelnen Substratabbauewege zeigt, daß aufgrund des geringeren Oxidationszustandes der meisten Fettsäuren eine um das Doppelte erhöhte Energieausbeute gegenüber Kohlehydraten und Proteinen erzielt werden kann. Zieht man darüber hinaus die den Fetten eigene Speicherform als Triacylglycerine (bzw. Triglyceride) mit in Betracht, so ergibt sich im Vergleich zu den stark hydratisierten

---

<sup>1</sup> Der Energiegehalt von Lipiden, Proteinen und Kohlehydraten beträgt bezogen auf ein Gramm Trockensubstanz jeweils 9,46, 4,32 und 4,18 kcal.

<sup>2</sup> Es wird hier, soweit nicht ausdrücklich erwähnt, auf chemoautotrophe Organismen Bezug genommen.

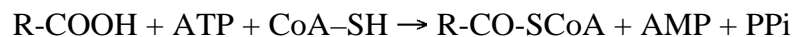
Kohlenhydraten, welche in Form von Glykogen und Stärke vorliegen, sogar ein um den Faktor sechs erhöhtes Energieäquivalent.

## 1.2 Die mitochondriale $\beta$ -Oxidation

Bereits im Jahre 1904 kam der deutsche Biochemiker Franz Knoop [Knoop, 1904] zu dem Ergebnis, daß der oxidative Angriff im Verlauf des Fettsäureabbaus am  $\beta$ -C-Atom erfolgen müsse. Aufgrund seiner Markierungsexperimente (vermutlich den ersten überhaupt) schloß er, daß eine sukzessive Abspaltung von  $C_2$ -Fragmenten in der Form eines Essigsäuremoleküls stattfindet. Diese Folgerungen führten Knoop schließlich zum Postulat der  $\beta$ -Oxidation.

Fettsäuren werden aufgrund ihrer sehr geringen Löslichkeit (ca.  $10^{-6}$  M) entweder gebunden an Serumalbumin, oder als Triacylglycerin-Komponenten der Lipoproteine im Organismus transportiert. Innerhalb der Zelle erfolgt der Transport zum Teil durch zell- und ligandenspezifische Fettsäurebindeproteine, FABPs (*Fatty acid binding proteins* bzw. ACBPs *Acyl-CoA binding proteins*), um die detergenzähnlichen Eigenschaften (Micellenbildung) freier Fettsäuren zu minimieren [Matarese *et al.*, 1989; Veerkamp *et al.*, 1991].

Bevor es zum Abbau der Fettsäuren kommt, bedarf es zunächst einer ATP-abhängigen Aktivierung durch die Bildung einer Thioesterbindung zwischen Fettsäure und daran zu koppelndem Coenzym A (CoA). Dieser Schritt erfolgt durch verschiedene kettenlängenspezifische Acyl-CoA-Synthetasen (Thiokinase), die jedoch stets die gleiche Reaktion nach folgendem Schema katalysieren:



Entsprechend der Kettenlänge der unterschiedlichen Fettsäuren variiert auch deren Lokalisation der Aktivierung mit CoA. Die Aktivierung kurzkettiger Fettsäuren (Acetyl- und Propionylreste) erfolgt im Cytosol, mittelkettige Fettsäuren werden durch die in der mitochondrialen Matrix lokalisierte *Medium-chain Acyl-CoA Synthetase* aktiviert, während längerkettige ( $C_{10}$  -  $C_{18}$ ) Fettsäuren durch die in der äußeren Mitochondrienmembran gebundene *Long-chain Acyl-CoA Synthetase* aktiviert werden

[Schulz, 1991]. Ein weiterer Schritt des Transports langkettiger Fettsäuren in die mitochondriale Matrix besteht in der Carnitin-abhängigen Translokation über die innere Mitochondrienmembran. Hierbei kommt es zunächst zu einer Trans-Esterifizierungsreaktion durch das Enzym Carnitin-Palmitoyl-Transferase I (CPT I), das der cytosolischen Seite der inneren Mitochondrienmembran zugewandt ist. Unter Bildung von Acylcarnitin wird der an CoA gebundene Acylrest auf die Hydroxylgruppe eines Carnitin übertragen. Die anschließende Translokation über die innere Mitochondrienmembran erfolgt durch das Enzym Carnitin-Acylcarnitin Translocase [Pande, 1975]. Auf der Matrixseite wird die Acylgruppe durch die Carnitin Palmitoyl Transferase II (CPT II) wieder auf intramitochondriales CoA übertragen. Im Gegenzug wird während der Translokation freigesetztes Carnitin aus der Matrix gegen Acylcarnitin ausgetauscht (Abb. 1-1). Kurz- und mittelkettige Fettsäuren sind nicht zwingend abhängig von einer Translokation mittels Carnitin. Sie können die äußere und innere Membran durch Diffusion permeieren und unterliegen somit keiner geregelten Aufnahme durch die Zelle.

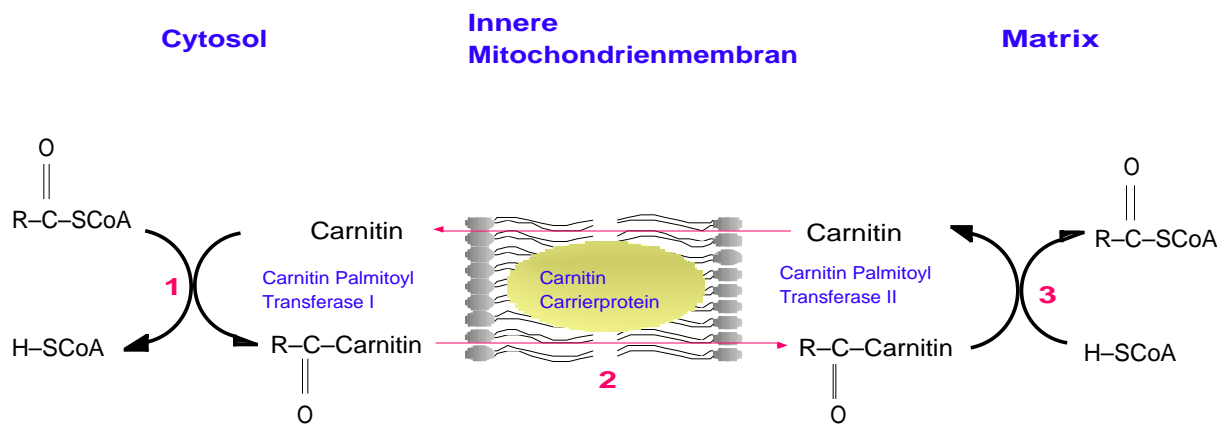


Abbildung 1-1 Transport aktivierter Fettsäuren in das Mitochondrium:

- (1) Übertragung der Acyl-Gruppe des cytosolischen Acyl-CoAs auf Carnitin unter Zurücklassen des HS-CoA Restes auf der cytosolischen Seite.
  - (2) Transport des Acyl-Carnitin -Komplexes in die mitochondriale Matrix
  - (3) Übertragung der Acyl-Gruppe auf mitochondriales CoA
- (nach Voet & Voet, 1990)

Durch eine wiederkehrende Sequenz von vier aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten erfolgt nun die Kettenverkürzung gesättigter Fettsäuren und deren Abbau zu Acetyl-CoA (Abb. 1-2).

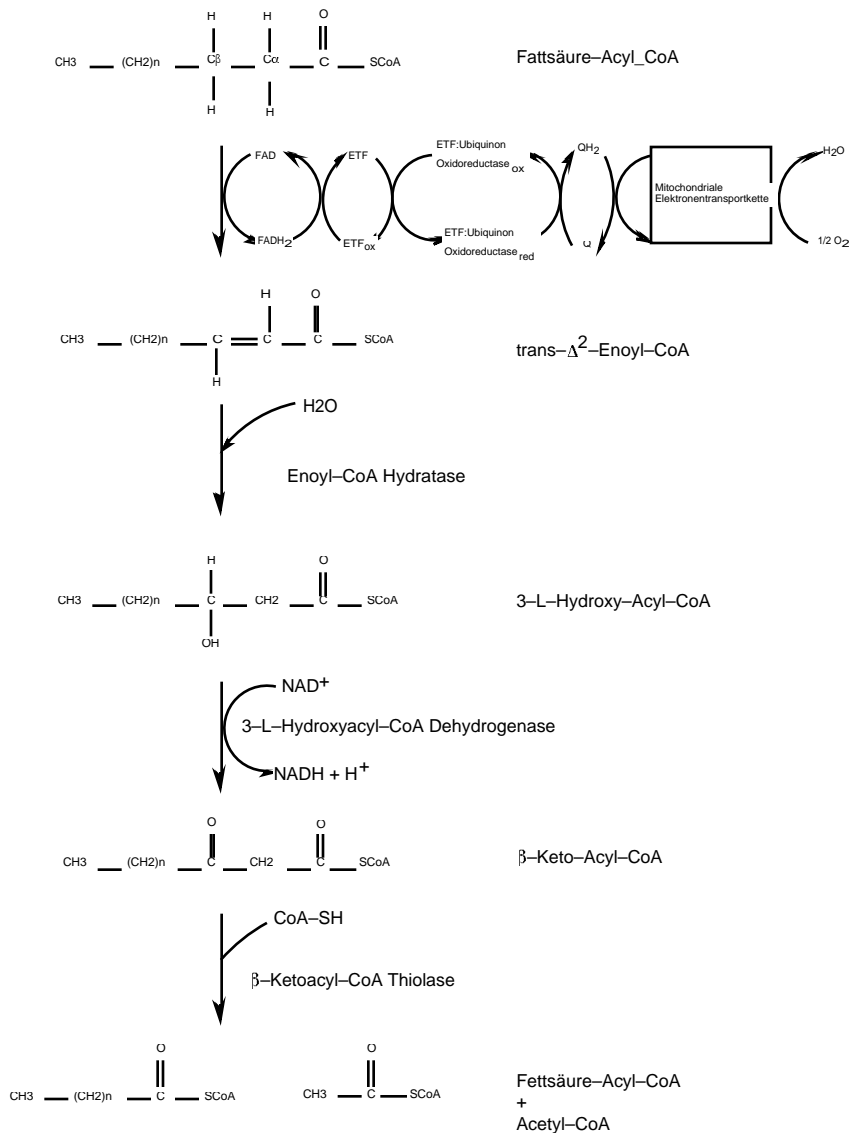


Abbildung 1-2 Die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren.  
(nach Voet & Voet, 1990)

I. Im ersten – für die Gesamtreaktion geschwindigkeitsbestimmenden Schritt – kommt es zur Oxidation des Acyl-CoA in  $\alpha,\beta$ -Position und der Ausbildung einer trans- $\alpha,\beta$ -Doppelbindung, dem trans- $\Delta^2$ -Enoyl-CoA. Dieser Schritt wird durch eine von mehreren kettenlängenspezifischen Acyl-CoA-Dehydrogenasen katalysiert, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird. Aufgrund des für diese Reaktion niedrigen  $\Delta G$ -Wertes

dient das nicht-kovalent an das Enzym gebundene Flavinadeninucleotid (FAD) als Akzeptor der dabei freigesetzten Elektronen<sup>3</sup>.

Die Reoxidation der prosthetischen FADH<sub>2</sub>-Gruppe der reduzierten erfolgt ihrerseits durch Elektronenübertragung auf ein zweites, FAD-enthaltendes Elektronentransfer Flavoprotein (ETF) [Ghisla *et al.*, 1991; Crane *et al.*, 1956a, 1956b; Ruzicka *et al.*, 1977; Lehman *et al.*, 1992]. Dabei wird jeweils ein Elektron der reduzierten Dehydrogenase auf ETF übertragen [Frerman & Turnbull, 1990]. ETF wird in einem anschließenden Schritt durch ETF-Ubiquinon Oxidoreductase, einem Eisen-Schwefelprotein der inneren Mitochondrienmembran, reoxidiert. Von dort gelangen die Elektronen durch Reduktion des Coenzyms Q (Ubichinon) in die mitochondriale Atmungskette. Die Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser durch die Elektronentransportkette resultiert schließlich in der Bildung von zwei Molekülen ATP pro transportiertem Elektronenpaar, bzw. pro reduziertem FADH<sub>2</sub>.

**II.** Im zweiten Schritt der Kettenverkürzung erfolgt die stereospezifische Hydratisierung des trans- $\Delta^2$ -Enoyl CoA zum L-3-Hydroxyacyl-CoA durch das Enzym Enoyl-CoA-Hydratase<sup>4</sup>. Durch Anlagerung eines Moleküls Wasser kommt es zur Ausbildung einer Doppelbindung zwischen dem C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Atom. Enoyl-CoA-Hydratase ist ein lösliches Matrixprotein und besteht aus sechs identischen Untereinheiten [Fong & Schulz, 1981; Furuta *et al.*, 1980].

**III.** Der dritte Reaktionsschritt in der Spirale der  $\beta$ -Oxidation bewirkt die Oxidation des L-3-Hydroxyacyl-CoA zum 3-Keto-Acyl-CoA. Diese Reaktion wird von der L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysiert, einem homodimeren Protein, mit einer NAD<sup>+</sup>-Bindedomäne am aminoterminalen Ende [Birktoft *et al.*, 1987]. Dabei erfolgt die Oxidation spezifisch nur mit dem L-Isomer des Hydroxy-Acylsubstrates. L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase ist vermutlich mit einem weiteren Protein der inneren Mitochondrienmembran assoziiert [Kispal *et al.*, 1986], welches seinerseits die Reoxidation des NADH zum NAD durch die Atmungskette katalysiert. Da die Dehydrogenaseaktivität für 3-Hydroxyhexadecanoyl-CoA nur ca. 6 % ihrer Aktivität für mittelkettige Hydroxy-Intermediate beträgt, existiert vermutlich eine in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Long-chain 3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase [El-Fakhri *et al.*, 1982]. Diese katalysiert die in den ersten Zyklen der  $\beta$ -Oxidation noch relativ langkettigen Hydroxy-Acyl-CoA Intermediate.

---

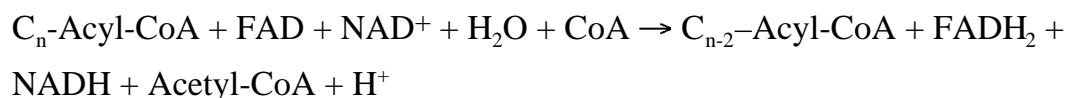
<sup>3</sup> Formell handelt es sich bei dieser Reaktion um den Transfer eines Protons vom C $\alpha$ -Atom, sowie der Übertragung eines Hydridions vom C $\beta$ .

<sup>4</sup> Enoyl-CoA-Hydratase wird auch als Crotonase bzw. 3-Hydroxyacyl-CoA-Hydrolyase bezeichnet.

**IV.** Im vierten und letzten Schritt der Oxidationsspirale erfolgt die thiolytische Spaltung des 3-Keto-Acyl-CoA Thioesters durch Anlagerung eines zweiten Moleküls CoA-SH. Diese Reaktion wird von zwei unterschiedlichen Varianten der  $\beta$ -Keto-Acyl-CoA Thiolase (Thiolase I und Thiolase II) katalysiert, welche sich im Umsatz unterschiedlich langer Substrate unterscheiden [Middleton, 1975; Staack *et al.*, 1978; Miyazawa *et al.*, 1981]. Während Thiolase-I die thiolytische Spaltung aller Substratkettenslängen von Acetoacetyl-CoA bis zum langkettigen 3-Ketoacyl-CoA katalysiert, wird von der Thiolase-II lediglich Acetoacetyl-CoA als Substrat erkannt. Mit der Reaktion der 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase wird ein kompletter Durchgang der Oxidationsspirale abgeschlossen. Dabei entsteht Acetyl-CoA und ein um zwei Kohlenstoffatome verkürztes Acyl-CoA. Das verkürzte Acyl-CoA kann dann in einem erneuten Zyklus beginnend mit der Reaktion der Acyl-CoA-Dehydrogenase weiter abgebaut werden, bis letzten Endes nach vollständigem Abbau und Erreichen der Bildung des Acetoacetyl-CoA, zwei Moleküle Acetyl-CoA gebildet werden.

Zusammenfassend lässt sich folgende Energiebilanz der Oxidation von (geradzahligen) Fettsäuren ziehen:

Pro Reaktionszyklus entsteht aus einem Molekül Acyl-CoA ein Molekül Acetyl-CoA und ein um zwei Kohlenstoffatome verkürztes Acyl-CoA. Dabei entsteht weiterhin jeweils ein Molekül  $\text{FADH}_2$  sowie ein Molekül NADH.



Exemplarisch kann für die vollständige Oxidation eines Moleküls Palmitoyl-CoA ( $\text{C}_{16}$ -CoA) folgende Bilanzierung getroffen werden:

Aus der Reoxidation eines Moleküls  $\text{FADH}_2$  entstehen in der Atmungskette zwei Moleküle ATP, weitere drei Moleküle ATP liefert die Oxidation von NADH zu NAD. Acetyl-CoA, welches im weiteren Verlauf in den Citratzyklus eingeschleust wird, liefert bei vollständiger Oxidation weitere zwölf Moleküle ATP pro Molekül. Damit entstehen nach sieben zu durchlaufenden Zyklen für den Abbau von Palmitoyl-CoA insgesamt 131 Moleküle ATP. Nach Abzug zweier ATPs, die bei der Aktivierung des Palmitats verbraucht werden, verbleiben schließlich 129 Moleküle ATP als Nettobilanz.

### 1.3 Die peroxisomale $\beta$ -Oxidation

Als gleichbedeutend mit der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation kann der Abbau langkettiger Fettsäuren durch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation angesehen werden. Die Existenz dieses fettsäureabbauenden Systems wurde erstmals 1976 von Lazarow und deDuve beschrieben [Lazarow & deDuve, 1976]. Obgleich der peroxisomale Abbau in den gleichen chemischen Modifikationen des abzubauenen Substrates resultiert, ergeben sich einige fundamentale Unterschiede zum mitochondrialen Abbau. Prinzipiell erfolgt die Oxidation im peroxisomalen System in der gleichen Weise, wie für das mitochondriale System beschrieben. In einem ATP-abhängigen Schritt erfolgt zunächst die Aktivierung der Fettsäuren durch die Reaktion der Acyl-CoA Synthetase [Shindo *et al.*, 1978; Hashimoto, 1982]. Im Gegensatz zum mitochondrialen System, handelt es sich hierbei um zwei verschiedene Synthetasen, die sich in der Aktivierung verschieden langer Fettsäurereste ( $C_{16}$  bzw.  $C_{24}$ ) unterscheiden [Singh *et al.*, 1988]. Während in Mitochondrien und Peroxisomen die gemeinsam vorkommende Palmitoyl-CoA Ligase (Synthetase) die der cytoplasmatischen Seite zugewandte Aktivierung der Fettsäuren katalysiert, erfolgt diese im peroxisomalen System zusätzlich durch die luminale Aktivierung mit Hilfe der Lignoceryl-CoA Ligase [Lazo *et al.*, 1990]. Der Transport freier oder aktivierter Fettsäuren in den peroxisomalen Innenraum erfolgt vermutlich nicht über ein Carnitin-abhängiges Translokationssystem, sondern unterliegt eher der freien Diffusion [Singh, 1992]. Dennoch kann die Abhängigkeit von einem Carnitin-Carrier nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da sowohl Carnitin-Acetyl-Transferase, als auch die ausschließlich in Peroxisomen vorkommende Carnitin-Octanoyl-Transferase aus Homogenaten isoliert werden konnten [Miyazawa *et al.*, 1983]. Die aus der Reaktion der mit den entsprechenden Carnitin-Transferasen hervorgehenden Carnitin-Ester gelten als Endprodukte der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation und können als Acetyl-Carnitin bzw. Octanoyl-Carnitin passiv ins Cytoplasma zurückdiffundieren [Tolbert, 1981]. Eine mögliche Hauptaufgabe der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation besteht somit im Abbau sehr langkettiger Fettsäurereste ( $> C_{22}$ ) und der Bereitstellung geeigneter Substrate des mitochondrialen Abbaufweges.

Der peroxisomale  $\beta$ -Oxidationszyklus folgt schematisch der mitochondrialen Oxidation der Fettsäuren unter Beteiligung folgender Enzyme:

**I.** Im ersten – ebenfalls geschwindigkeitsbestimmenden – Schritt der Oxidationsspirale kommt es durch Oxidation langkettiger Fettsäure-Acyl-CoA Substrate zur Bildung von trans- $\Delta^2$ -Enoyl-CoA. Diese Reaktion wird durch die peroxisomale Acyl-CoA-Oxidase, einem ebenfalls FAD-abhängigen Flavoprotein, katalysiert. Acyl-CoA-Oxidase kommt als

Isoenzym in zwei verschiedenen Formen vor, welche durch alternatives *splicing* des entsprechenden Genes hervorgeht [Miyazawa *et al.*, 1987; Osumi *et al.*, 1987]. Das reife Protein wird als 75kD Polypeptidkette synthetisiert (A-Komponente), welche proteolytisch in eine 55 kD (B-Komponente) sowie eine 22 kD Kette (C-Komponente) prozessiert wird. Die Komposition des nativen Enzyms repräsentiert die drei verschiedenen Formen A<sub>2</sub>, ABC und B<sub>2</sub>C<sub>2</sub> [ Osumi *et al.*, 1980]. Schepers und Mitarbeiter berichteten darüber hinaus über das Vorhandensein einer weiteren, dritten Form der peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase [Schepers *et al.*, 1990].

Im Gegensatz zum mitochondrialen System werden die vom Substrat abstrahierten Elektronen nicht über ein Elektronen-transportierendes Flavoprotein (ETF) der oxidativen Phosphorylierung zugeführt, sondern werden unter Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen. In einer Catalase-vermittelten Reaktion disproportioniert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub>. Da dieser Schritt nicht mit einer Energiegewinnung durch die Atmungskette verbunden ist, gilt die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation als ineffizient bzw. unvollständig.

**II.** Entsprechend der Reaktionssequenz des mitochondrialen Abbauweges erfolgt im zweiten Schritt der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation die Bildung von L-3-Hydroxy-Acyl-CoA, sowie dessen anschließende Oxidation zum  $\beta$ -Keto-Acyl-CoA. Dieser Schritt wird von einem bifunktionellen Enzym katalysiert, welches sowohl Enoyl-CoA-Hydratase- als auch L-3-Hydroxy Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität innerhalb einer Polypeptidkette besitzt. Dabei scheint die Hydratase-Aktivität in der N-terminalen Domäne determiniert zu sein, während der C-terminalen Domäne die Dehydrogenase-Aktivität zugeordnet werden kann [Ishii *et al.*, 1987]. Die Oxidation des Zwischenproduktes L-3-Hydroxy-Acyl-CoA ist wie im mitochondrialen System an die Reduktion von NAD<sup>+</sup> gekoppelt. Im Vergleich zu den mitochondrialen Pendanten sind jedoch die spezifischen Aktivitäten sowohl der Hydratase- als auch der Dehydrogenase-Funktion deutlich geringer. Palosaari und Hiltunen [Palosaari & Hiltunen, 1990] konnten diesem Enzym zusätzlich eine weitere Funktion als  $\Delta^3\Delta^2$ -Enoyl-CoA-Isomerase zuordnen. Diese ist zusammen mit der Hydratase-Aktivität in der N-terminalen Domäne lokalisiert.

**III.** Den letzten Schritt der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation stellt die thiolytische Spaltung des 3-Keto-Acyl-CoA durch Anlagerung eines weiteren Moleküls Coenzym A (CoA-SH) dar. Wie im mitochondrialen System wird diese Reaktion von der 3-Keto-Acyl-CoA-Thiolase katalysiert, die sich von der mitochondrialen Form jedoch in der Zusammensetzung der Untereinheiten, sowie im Umsatz verschieden langer Substrate unterscheidet. Darüber hinaus existieren zwei verschiedene Gene der peroxisomalen Thiolase, wovon eines einer konstitutiven Expression unterliegt, während das zweite induzierbar ist [Hijikata *et al.*, 1990]. Wie im mitochondrialen System entsteht in dieser

Reaktion ein um zwei C-Atome verkürztes Acyl-CoA sowie ein Molekül Acetyl-CoA. Im Gegensatz dazu ist die peroxisomale Thiolase nicht in der Lage, Acyl-CoA Substrate mit einer Kettenlänge von mehr als acht C-Atomen zu spalten [Tolbert, 1981]. Die verbleibenden Metabolite Acyl-CoA, Acetyl-CoA und NADH diffundieren anschließend entweder passiv durch die peroxisomale Membran oder werden möglicherweise– im Falle der Acyl-CoA Intermediate– als Carnitin-Derivate ins Cytoplasma geschleust, um letzten Endes durch die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation vollständig abgebaut zu werden.

Aufgrund ihres unvollendet ablaufenden Reaktionszyklus gilt die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation als unvollständig bzw. ineffizient. Ihre Hauptaufgabe scheint somit im Abbau sehr langkettiger oder ungewöhnlicher Substrate zu liegen, sowie in der Bereitstellung geeigneter Acyl-Derivate für die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation [Masters & Crane, 1984; Schulz, 1991]. Darüber hinaus wird der Abbau einer Reihe weiterer Substanzen wie ungesättigte Fettsäuren, Prostaglandine, Dicarboxylsäuren oder trans-Fettsäuren durch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation katalysiert.

## 1.4 Flavoproteine

Gelbe Pigmente, von denen man heute weiß, daß sie mit Riboflavin (Vitamin B2) identisch oder zumindest verwandt sind, spielen in zahlreichen (als Flavoproteinen) bekannten Enzymen, eine katalytisch entscheidende Rolle. Ihre zentrale Bedeutung liegt vor allem in der Vielfalt der von ihnen katalysierten Reaktionen. Zusammenfassend können sie alle als Elektronen-transferierende Enzyme mit FAD oder FMN (bzw. verschiedener Derivate davon) als prosthetischer Gruppe bezeichnet werden [Singer *et al.*, 1978]. Hierbei katalysieren sie Redoxreaktionen, bei denen der Isoalloxazinring des Flavinrestes entweder ein oder zwei Elektronen aufnehmen kann. Die der Oxidation des Substrates entstammenden Elektronen werden bei gleichzeitiger Reoxidation des Flavins auf einen geeigneten Elektronenakzeptor übertragen.

Im Fall der Acyl-CoA-Dehydrogenasen können zwei voneinander getrennte chemische Schritte unterschieden werden. Im ersten Schritt – der reduktiven Halbreaktion oder Dehydrogenierung – wird der C $_{\beta}$ -Wasserstoff als Hydrid auf die N(5)-Position des oxidierten Flavinmoleküls übertragen (Abbildung 1-3), während der C $_{\alpha}$ -Wasserstoff als Proton abgespalten wird [Ghisla *et al.*, 1984; Pohl *et al.*, 1986]. Für die Mittelketten-spezifische Acyl-CoA-Dehydrogenase konnte gezeigt werden, daß hierbei die an Position

376 des reifen Proteins lokalisierte Glutaminsäure als Protonen-abstrahierende Base wirkt [Fendrich & Abeles, 1982; Powell & Thorpe, 1988].

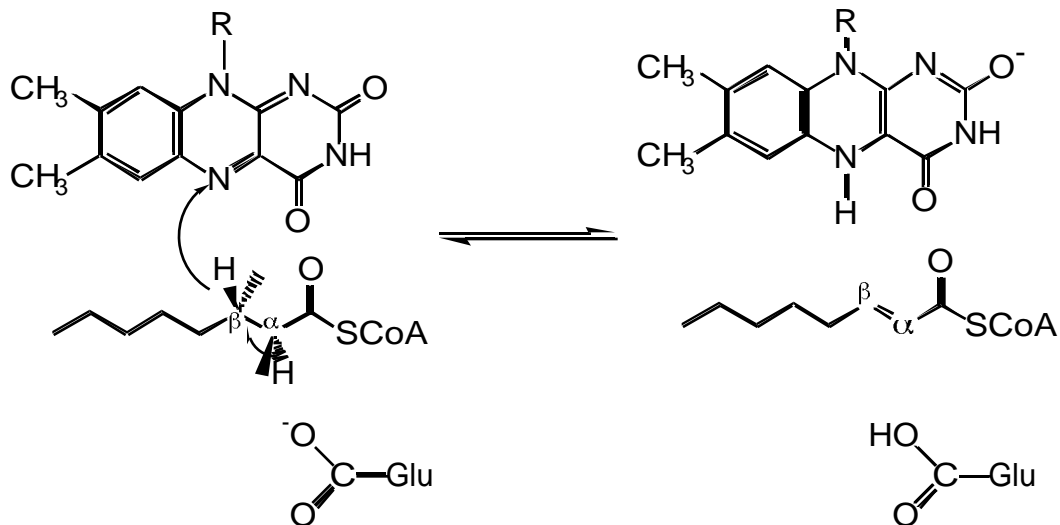


Abbildung 1-3 Die reduktive Halbreaktion.  
Übertragung des C<sub>3</sub> Wasserstoffes als Hydrid auf die N(5)-Position des oxidierten Flavinrestes.

Durch den Transfer der Reduktionsäquivalente auf FAD wird C<sub>x</sub>-Acyl-CoA schließlich zu Enoyl-CoA oxidiert. Dieses bleibt am Enzym gebunden bis im zweiten Schritt – der oxidativen Halbreaktion – das vollständig reduzierte FAD-Molekül durch zwei Ein-Elektronen-Übertragungen auf ETF wieder vollständig oxidiert wird (Abbildung 1-4).

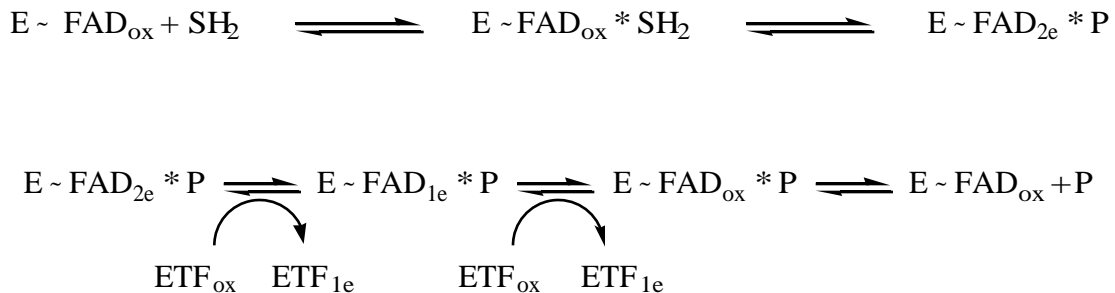


Abbildung 1-4 Oxidative Halbreaktion

## 1.5 Die Mittelketten-spezifische Acyl-CoA-Dehydrogenase

### 1.5.1 Expression und Assembly

Den Grundstein aller Arbeiten über die Mittelketten-spezifische Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD) legten Erwin Haas und Otto Warburg im Jahr 1938 mit der "Isolierung eines neuen gelben Ferments" [Haas, 1938], sowie der "Bemerkung über gelbe Fermente" [Warburg & Christian, 1938a]. Zahlreiche Arbeiten trugen seither wesentlich zum Verständnis von Struktur und Funktion des Enzyms bei, so daß MCAD inzwischen sowohl auf genetischer als auch auf biochemischer Ebene als außerordentlich gut charakterisiert gelten kann.

Matsubara und Mitarbeiter [Matsubara *et al.*, 1986] konnten das für MCAD codierende Gen (ACADM) auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 1 lokalisieren. Das 44 kb umfassende Gen setzt sich aus zwölf Exons zusammen, die durch elf Introns unterbrochen werden [Zhang *et al.*, 1992]. Die MCAD-mRNA umfaßt eine 1263 bp codierende Region, sowie einen 738 bp langen, 3'-nicht-translatierten Bereich [Kelly *et al.*, 1987]. Als Nucleus-codiertes Gen erfolgt die Expression der MCAD in Abhängigkeit des gewebespezifischen und energetischen Status der Zelle [Kelly *et al.*, 1989; Carter *et al.*, 1993]. Die Hauptsyntheseorte sind vor allem Gewebe wie Herz, Leber, Niere und Skelettmuskel, deren Energiebedarf hauptsächlich aus dem Abbau aktivierter Fettsäuren gedeckt wird. Die Translation der MCAD erfolgt an freien cytoplasmatischen Polysomen zunächst als 421 aa umfassendes Vorläuferprotein, dessen 25 aminoterminalen Reste die vergleichsweise basische Signalsequenz<sup>5</sup> darstellen [Matsubara *et al.*, 1987]. Der cytoplasmatischen Translation folgt der Import des Vorläuferproteins in die mitochondriale Matrix durch die Bindung des Vorläufers an die äußere Mitochondrienmembran. Die Translokation in die mitochondriale Matrix selbst ist von einer elektrischen Potentialdifferenz ( $\Delta\Psi$ ) abhängig und erfolgt unter Abspaltung der Signalsequenz auf der Matrixseite. Ebenso findet dort das Assembly der Monomere sowie die Oligomerisierung zum nativen, tetrameren Enzym statt [Ikeda *et al.*, 1987]. Saijo und Mitarbeiter [1994] konnten zeigen, daß das intramitochondriale Assembly durch die sequentielle Bindung des Vorläuferenzym an die mitochondrialen Hitzeschock-Proteine

---

<sup>5</sup> Das 25 aa umfassende Signalpeptid enthält vier Arginin-Reste sowie einen Lysin-Rest. Gemäß der Eisenberg'schen Hydrophobizitätsskala (Eisenberg *et al.*, 1984) besitzt es eine Konsensus-Hydrophobizität von -0,19 und entspricht somit der für mitochondriale Proteine durchschnittlichen Hydrophobizität.

Hsp70 und Hsp60 erfolgt. Es findet zunächst eine ATP-abhängige, transiente Bindung des Vorläuferproteins an mitochondriales Hsp70 statt. Möglicherweise kann dies als (zusätzliche) treibende Kraft des Imports angesehen werden, da die Bildung des Hsp70-Protein-Komplexes nicht zwingend mit der Freisetzung des nativen, tetrameren Enzyms verbunden ist [Schatz, 1992]. Im darauffolgenden (schnellen) Schritt kommt es zur Übertragung des *precursors* auf mitochondriales Hsp60. Sehr wahrscheinlich stellt dieser Schritt der Bindung und anschließenden (ATP-abhängigen) Freisetzung des Enzyms aus dem Hsp60-MCAD-Komplex den korrekten Abschluß sowohl des Assembly, als auch der Oligomerisierung zum tetrameren Enzym dar [Saijo *et al.*, 1994]. Damit folgt die Faltung zum nativen Enzym dem von Mannig-Krieg und Mitarbeitern vorgeschlagenen Mechanismus zur Faltung mitochondrialer Proteine [Mannig-Krieg *et al.*, 1991].

### **1.5.2 Grundlagen molekularer Defekte der Mittelketten-spezifischen-Acyl-CoA-Dehydrogenase**

Mit zunehmendem Wissen über die molekularen Grundlagen der mitochondrialen Oxidation von Fettsäuren wurden in den letzten ca. 20 Jahren eine beträchtliche Anzahl damit verbundener Stoffwechseldefekte aufgeklärt. Etwa der Hälfte aller am Abbau und Transport von Fettsäuren beteiligten Enzyme kann heute inzwischen ein genetischer Defekt zugeschrieben werden [Coates & Tanaka, 1992]. Kølvråa und Mitarbeiter [Kølvråa *et al.*, 1982] erbrachten 1982 erstmals Hinweise auf das Vorhandensein eines Defektes der Mittelketten-spezifischen oder "generellen" Acyl-CoA-Dehydrogenase. Unabhängig davon konnten in der Folge von mehreren Arbeitsgruppen die Ursachen sowie die Folgen des zugrundeliegenden Defektes der MCAD-Defizienz analysiert und beschrieben werden [Ding *et al.*, 1990; Gregersen *et al.*, 1991; Kelly *et al.*, 1990; Matsubara *et al.*, 1990; Yokota *et al.*, 1990; Yokota *et al.*, 1991]. Unter allen bisher bekannten Defekten nimmt die Häufigkeit der mittelkettigen Acyl-CoA-Dehydrogenase eine besondere Stellung ein. Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über bisher bekannte Defekte der MCAD.

Tabelle 1-1 Verteilung der <sup>985</sup>A → G Mutation, sowie weiterer varianter Allele aus 55 nichtverwandten MCAD-defizienten Patienten [nach Yokota *et al.*, 1992].

<p>A. Genotypen des MCAD-Locus</p> <p>Von 55 untersuchten nicht-verwandten, MCAD-defizienten Patienten:</p> <p>44 homozygot für <sup>985</sup>A → G</p> <p>10 heterozygot für <sup>985</sup>A → G und anderer varianter Allele</p> <p>1 Patient ohne <sup>985</sup>A → G Austausch</p>	
<p>B. Häufigkeit verschiedener Varianten der MCAD-Allele</p>	
<p>1. <sup>985</sup>A → G (Lys<sup>329</sup> → Glu)</p>	<p><b>98/110</b></p>
<p>2. <sup>799</sup>G → A (Gly<sup>267</sup> → Arg)</p>	<p><b>2/110</b></p>
<p>3. <sup>1124</sup>T → C (Ile<sup>375</sup> → Arg)</p>	<p><b>1/110</b></p>
<p>4. 13 -Base pair Wiederholung von <sup>999</sup>T → <sup>1011</sup>C (Vorzeitiges Stop-Codon nach Tyr-337)</p>	<p><b>1/110</b></p>
<p>5. <sup>730</sup>T → C (Cys<sup>244</sup> → Arg)</p>	<p><b>1/110</b></p>
<p>6. <sup>447</sup>G → A (Met<sup>149</sup> → Ile)</p>	<p><b>1/110</b></p>
<p>7. Transkriptionsfehler</p>	<p><b>1/110</b></p>
<p>8. Nicht identifiziert</p>	<p><b>5/110</b></p>
<p>Zahlenwerte, welche den entsprechenden Aminosäurepositionen zugeordnet sind, beziehen sich auf das Vorläuferprotein.</p>	

Die molekulare Grundlage der schlechthin als MCAD-Defizienz beschriebenen Anomalie besteht im Austausch eines Adenin (A) gegen Guanin (G) an Nucleotidposition 985 (A<sup>985</sup>→G) des für MCAD codierenden cDNA-Stranges [Kølvraa *et al.*, 1982]. Dies bewirkt auf Proteinebene den Austausch eines natürlich vorkommenden Lys-Restes gegen Glu an Position 304 des reifen, prozessierten Enzyms (MCAD-K<sup>304</sup> → E)<sup>6</sup>. Die Häufigkeit für das Vorhandensein des Allels <sup>985</sup>G beträgt ca. 90 % aller bisher bekannten, varianten Allele [Yokota *et al.*, 1991]. MCAD-Defizienz gilt als autosomal rezessiv vererbbar [Gregersen *et al.*, 1991] und tritt mit einer Häufigkeit von bis zu 1 unter 10.000 Neugeburten auf<sup>7</sup>. Untersuchungen zur ethnischen Häufigkeitsverteilung ergaben

<sup>6</sup> Unter Berücksichtigung der 25aa umfassenden Signalsequenz entspricht dies Aminosäureposition 329 des Vorläuferproteins.

<sup>7</sup> Für das Auftreten der <sup>985</sup>A → G Mutation werden unterschiedliche Zahlenwerte genannt. Die Angaben schwanken hierbei zwischen 1:5.000 bis 1:25.000.

ausschließlich Träger kaukasischen Ursprungs. Möglicherweise kann dieses Phänomen mit der Hypothese eines sogenannten *founder effect*, dem Zurückführen einer Punktmutation auf ein- und dieselbe Person, erklärt werden [Yokota *et al.*, 1992].

Typischerweise tritt bei Patienten mit MCAD-Defizienz eine ausgeprägte Symptomatik lediglich in den ersten zwei bis drei Lebensjahren in Erscheinung. Der für das Krankheitsbild der betroffenen Patienten manifestierte Phänotyp ist in Tabelle 1-2 dargestellt.

Tabelle 1-2 Klinische Merkmale der MCAD-Defizienz [nach Coates, 1992c]

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Auftreten der Krankheit innerhalb der ersten zwei Lebensjahre</li><li>- Episodische, durch Fastenperioden verursachte Krankheitsanfälle</li><li>- Lethargie, Erbrechen, hypoglycämisches Koma</li><li>- Hepatomegalie, Steatosis</li><li>- Reye-Syndrom-ähnliche Symptomatik</li><li>- Plötzlicher und (unerwarteter)<sup>8</sup> Tod des Patienten (<i>sudden infant death syndrome</i>)</li></ul> <p>Laborbefunde:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Hypoglycämie, Hypoketonämie</li><li>- Acidurie aufgrund erhöhter Werte mittelkettiger Dicarbonsäuren (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)</li><li>- Leichte Acidose</li><li>- Erhöhte Transaminase-Werte im Blut, Hyperammonämie</li><li>- Verminderte Carnitin-Werte in Plasma und Geweben</li></ul> |
|--|

Verschiedene Untersuchungen zur Aufklärung der Auswirkungen des Nucleotid- bzw. Aminosäureaustausches erbrachten auf Ebene der mRNA vergleichbar hohe Transkriptionsraten sowie Stabilitätswerte für Wildtyp und Mutante [Whelan *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1992]. Ebenso scheint der Austausch des Nucleotides Adenin gegen Guanin die Translationseffizienz nicht zu beeinflussen [Ikeda *et al.*, 1986]. Aus nahezu allen Versuchen, die zum Nachweis der mutanten Form des MCAD-Proteins in Fibroblastenzellen betroffener Patienten dienten, ergaben sich jedoch Hinweise auf drastisch reduzierte Enzymkonzentrationen, bzw. meßbarer Aktivitäten varianter MCAD [Gregersen *et al.*, 1991; Inagaki *et al.*, 1990; Whelan *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1992].

---

<sup>8</sup> Aufgrund neuerer (postnataler) Diagnosemethoden zum Nachweis der mittelkettigen Acyl-CoA Variante (<sup>985</sup>A → G) wird in diesem Zusammenhang nicht mehr vom "unerwarteten" Tod des Kindes gesprochen.

Aufgrund der Lokalisation der in diesem Kapitel beschriebenen Punktmutation, die sich in der Umkehr der Ladungsverhältnisse (Lys<sup>304</sup>→Glu) von positiv nach negativ manifestiert, wurden vor allem folgende Möglichkeiten für das Fehlen einer nachweisbaren Aktivität des Enzyms diskutiert:

1. eine gegenüber dem wt erhöhte proteolytische Suszeptibilität.
2. ein inkorrektes Assembly der einzelnen Monomeren zu nativen tetrameren Enzym aufgrund hoher lokaler Ladungsdichten.

### 1.5.3 Dreidimensionale Struktur

Erste Daten zur Analyse der Röntgenstruktur der Mittelketten-spezifischen Acyl-CoA-Dehydrogenase aus Schweineleber konnten von Kim und Mitarbeitern ermittelt werden [Kim *et al.*, 1984; Kim & Wu, 1988]. Die Analyse neuerer Daten erlaubt die Bestimmung der räumlichen Struktur im oxidierten (d.h. in Abwesenheit von Substrat) sowie im Substrat-komplexierten Zustand durch Auflösung bei 2,4 Å [Kim *et al.*, 1993].

MCAD liegt in ihrer nativen Form als homotetrameres Enzym vor, deren Untereinheiten jeweils nicht-kovalent mit einem Molekül Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) verbunden sind. Aufgrund unterschiedlich starker Bindungskräfte, die die Monomeren entlang ihrer Symmetrieachsen aufweisen, kann eine Unterteilung des Enzyms als Tetramer zweier Dimere angesehen werden [Kim *et al.*, 1992]. Jedes Monomer kann seinerseits in drei verschiedene Domänen unterteilt werden:



Abbildung 1-5 Dimeren-Paar der humanen MCAD

1. die aminoternale Domäne, bestehend aus den antiparallelen  $\alpha$ -Helices A bis F
2. eine zentrale Domäne, welche zwei orthogonale  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen aufweist
3. das carboxyterminale Ende, welches die Helices G bis L umfasst und sowohl die Substratbindestelle, als auch das katalytisch aktive Zentrum beinhaltet.

Im tetrameren Enzym erstrecken sich sowohl die amino-, als auch die carboxyterminalen Enden eines Dimers in die gegenüberliegenden Untereinheiten des benachbarten Dimers. Die Kontaktstellen, welche zwischen einem dimeren Paar und den benachbarten Untereinheiten des nächsten Dimers liegen, werden durch die in der C-terminalen Domäne lokalisierten Helices H und I gebildet. Die beiden Dimere werden somit durch Helix-Helix-Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen Helices H und I der einzelnen Protomere miteinander verbunden. Der FAD-Ring eines Monomers liegt hierbei in der Spalte zwischen zentraler  $\beta$ -Faltblatt-Domäne und C-terminalem Ende einer Untereinheit, während der Adenosindiphosphat-Rest am Übergang zwischen der C-terminalen Domäne (Helix G und H) und der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der benachbarten Untereinheit zu liegen kommt (Abbildung 5). Die Bindung des Substrates erfolgt zwischen den Helices E und G, die gleichermaßen eine hydrophobe "Bindungstasche", bestehend aus den Seitenketten der Aminosäuren Glu<sup>376</sup>, Tyr<sup>375</sup>, Val<sup>259</sup>, Thr<sup>168</sup>, Leu<sup>103</sup>, Ala<sup>100</sup>, Glu<sup>99</sup> und Thr<sup>96</sup>, darstellen. Dabei kommt die C <sub>$\alpha$</sub> -C <sub>$\beta$</sub> -Bindung des Acyl-CoA Substrats in einer sandwichartigen Anordnung zwischen der Glutamatfunktion an Aminosäureposition 376 und der N(5)-Position des Flavinrings zu liegen. Glu<sup>376</sup> stellt das aktive Zentrum des Enzyms dar [Powell & Thorpe, 1988], das die Oxidation des Substrats durch Protonenabstraktion vom C <sub>$\alpha$</sub> -Kohlenstoffatom des Acyl-Substrats katalysiert [Ghisla *et al.*, 1984].

Die Position des Lys-Restes 304 liegt im nativen Enzym zentral innerhalb der C-terminalen Helix-H. Wie aus den Daten der Röntgenstrukturanalyse zu entnehmen ist, befindet sich dieser Rest in einer Entfernung von ca. 20 Å außerhalb des katalytisch aktiven Zentrums (Glu<sup>376</sup>). Außerdem ist eine Beteiligung an der Bindung des Cofaktors FAD, sowie an der Bindung des Acyl-CoA Substrats nicht nachweisbar. Innerhalb des Tetramers nimmt Lys<sup>304</sup> eine Position im Zentrum der *inter-subunit* Kontakte zweier Dimere ein. Vermutlich spielt hierbei die Lage der positiv geladenen Seitenkette des Lysinrests eine entscheidende Rolle. Für das native Enzym konnte die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lys<sup>304</sup> (Helix-H) und der  $\gamma$ -Carbonylgruppe des benachbarten Gln<sup>342</sup> innerhalb Helix-I nachgewiesen werden. Obwohl durch die Einführung der Lys<sup>304</sup>→Glu<sup>304</sup>-Mutation die Ladung der Seitenkette an der entsprechenden Position umgekehrt wird, scheint die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der  $\gamma$ -Carboxylatgruppe der Glutaminsäure<sup>304</sup> und der  $\gamma$ -Amido-NH<sub>2</sub>-Gruppe des Glutamins an Position 342 prinzipiell möglich.

Entscheidend macht sich jedoch vermutlich der Einfluß der Ladungen benachbarter Seitenketten bemerkbar. Die unmittelbare Nachbarschaft der Aminosäureposition 304 wird jeweils von einem Asp-Rest an den Positionen 300 (innerhalb Helix-H) und 346 (innerhalb Helix-I) in einer Distanz von ca. 6 Å zur  $\gamma$ -Carboxylatgruppe belegt. Im nativen Enzym wird durch Ausbildung einer Ionenpaar-Bindung zwischen Asp<sup>300</sup> und Arg<sup>383</sup> des benachbarten Dimers eine direkte Wechselwirkung zwischen den beiden Dimeren hergestellt [Kim *et al.*, 1992]. Durch die Einführung eines negativ geladenen Seitenkettenrestes anstelle eines positiv geladenen Lys-Restes in Position 304 des mutanten Proteins kommt es zu einem Überschuß, bzw. einer lokalen Akkumulation negativer Ladungen (s. auch Abb. 4-3).

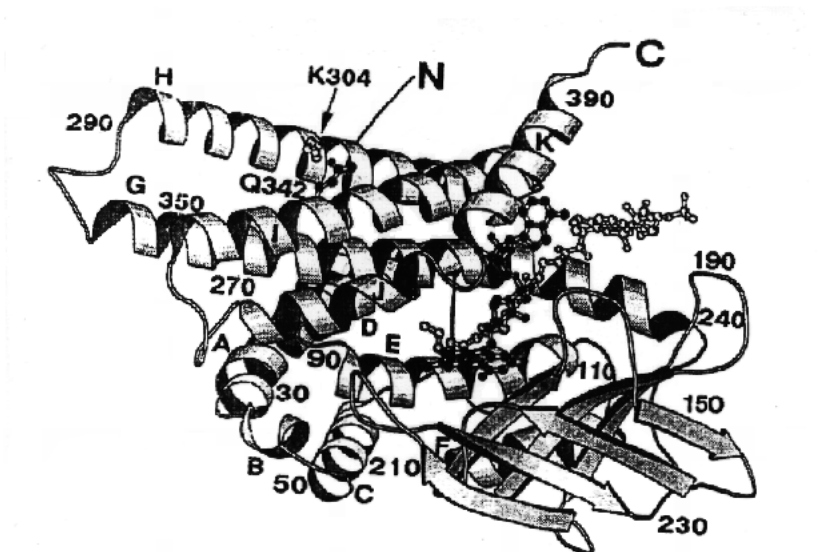


Abbildung 1-6 Dreidimensionale Struktur der humanen MCAD [nach Kim, 1993]. Der Austausch der aa Lys gegen Glu erfolgt in Helix H und ist an der Kontaktstelle zweier Untereinheiten lokalisiert.

## 1.6 Die humane langketten-spezifische Acyl-CoA-Dehydrogenase (LCAD)

Die langketten-spezifische Acyl-CoA-Dehydrogenase (E.C. 1.3.99.13) wurde erstmals 1956 von Hauge beschrieben und gehört mit MCAD (E.C. 1.3.99.3), SCAD (1.3.99.2), VLCAD und IVD zur Klasse der (mitochondrialen) Acyl-CoA-Dehydrogenasen [Hauge *et al.*, 1956]. Funktionell zeichnen sich alle Acyl-CoA-Dehydrogenasen prinzipiell durch den gleichen Reaktionstypus – die Entfernung des C<sub>α</sub>- und C<sub>β</sub>-Wasserstoffs aus den entsprechenden geradekettigen Acyl-CoA Substraten– mit anschließendem Transfer der Reduktionsäquivalente auf den natürlichen Elektronenakzeptor ETF aus. Alle Enzyme dieser Spezies unterscheiden sich vor allem in der Effizienz zur Oxidation unterschiedlich langer Acyl-CoA Substrate. So katalysiert die LCADh präferentiell die Oxidation von geradzahligen Acyl-CoA Substraten zwischen C<sub>10</sub>- und C<sub>14</sub>-CoA Substraten [Eder *et al.*, 1997], während Substrate mit einer Kettenlänge zwischen C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> vorwiegend von MCAD umgesetzt werden. Sequenzvergleiche verschiedener Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus unterschiedlichen Organismen zeigen darüberhinaus ein sehr großes Maß an Homologie zwischen den einzelnen Enzymen, sodaß hieraus Rückschlüsse über die dreidimensionale Struktur bzw. katalytisch aktive Zentren gezogen werden können [Djordjevic *et al.*, 1994]. Ein primärer Sequenzvergleich zeigt jedoch, daß im langketten-spezifischen Enzym die katalytisch aktive Base nicht mit der Position und aa des mittelketten-spezifischen Enzyms gleichgesetzt werden kann. Während für MCAD der Glutamatrest an Position 376 als Aktivzentrumsbase ausgemacht werden konnte [Powell & Thorpe, 1988], entspricht dieser Funktion die Carboxylat-Funktion der aa Glu an Position 261 im LCADh-Enzym [Djordjevic *et al.*, 1994].

LCADh setzt sich gleichermaßen aus vier identischen Monomeren zusammen, deren Untereinheiten als 430 aa umfassende Vorläuferproteine synthetisiert und unter Abspaltung der 30 aa langen Signalsequenz in die mitochondriale Matrix translociert werden [Ikeda *et al.*, 1987]. Das reife 178,4 kD schwere Protein entspricht dem Tetramer aus den jeweils 400 aa langen Untereinheiten mit je einem Molekül FAD pro Monomer.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Geräte

#### Amicon

Centricon-30

#### Applied Biosystems

Pulsed Liquid Sequencer, Modell 477A/120A

#### BioMol

IPTG, BCIP (Di-Natrium Salz)

#### BioRad Laboratories

Molekulargewichtsmarker für die SDS-Gelelektrophorese (low; SDS electrophoresis grade), Trans-Blot Blottingmembran (PVDF, 0,2µm), BioGel A 1.5

#### Boehringer, Mannheim

Ampicillin, BSA, Chloramphenicol, Lysozym aus Hühnereiweiß, Restriktionsendonucleasen, PMSF, Trypsin (sequencing grade; *bovine pancreas*)

#### Fluka

Hydroxyl-Apatit «Fast Flow»; MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)

#### Greiner

ELISA-Platte F-Form (96-wells), Küvetten (macro; halbmicro)

#### Merck

Hydroxyl-Apatit (15µm), Hydroxyl-Apatit Superformance 75-5, DMAE  
Lichrospher, Kaliumphosphat, Natriumphosphat.

#### Millipore

Immobilon-P-Blottingmembran 0.45µm (PVDF), Milli-Q®-Wasser

**Pharmacia Fine Chemicals**

Agarose-IEF für PhastGel™-Pufferstreifen, Fast Desalting Column HR 10/10 (Sephadex G-25 Superfine), HiTrap™-Chelating (1ml), PhastGele: (Gradient 8–25; Gradient 4–15; Gradient 10–15; IEF 3–9; IEF 4–6,5; IEF 5–8), pI-Markerproteine (IEF 3–10), Mono-Q (HR 10/10 und HR 5/5), Resource-Q (6ml); Sephadex G-25 Fine, Q-Sepharose Fast Flow (FF), Superdex 200 pg (XK 26/60), NAP-25 und PD-10 Entsalzungssäulen, Leersäulen: HR 10/10, XK 16/20, XK 50/30, XK 26/40, C oder S-Säule 20/40, Resource-Q (6ml), FPLC™, PhastSystem™, FPLC.

**PIERCE**

BCA-Protein-Standard, Biotin/Streptavidin, Pierce-Coomassie Plus Protein Assay Reagent®, *HRP-conjugated antibodies*

**Roth**

Acrylamid (für SDS-PAGE): Rotiphorese Gel A (30%ige Lösung); Agarose MEEO, Ammoniumsulfat, Bisacrylamid Rotiphorese Gel B (2 %ige Lösung), DTT, Ethanol p.a., Methanol, Tricine, Pepton aus Casein, Hefeextrakt, NaCl, Tricine, Silbernitrat (Proteicolor®), Tris.

**Schleicher & Schuell**

Membranfilter BA 83/20 0,2 µm, Nitrocellulose-Blottingmembran 0,45 µm, Filterzuschnitte für Western-Blots

**Serva**

Blue-Dextran, Coomassie Blau R-250, SERVA Blau R, Gel-Fix® for PAGE, FAD (Di-Natrium-Salz), TEMED, Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Alkalische Phosphatase konjugiert), SDS, NBT.

**Sigma**

Agarose (Rotigarose® MEEO), NBS, Acyl-Coenzym A (C<sub>4</sub>-CoA – C<sub>20</sub>-CoA)

## 2.2 Bakterienstämme und Plasmide

### 2.2.1 Bakterienstämme

Tabelle 2-1 Verwendete Zellstämme

<b>E. coli Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
TG 1	supE hsd $\Delta$ 5 thi $\Delta$ (lac-proAB)	Gibson, 1984
JM 109	F <sup>'</sup> [traD36 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15] recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi $\Delta$ [lac-proAB]	Yannisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
BI 21 (DE 3)	hsdS gal(lcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)	Studier & Moffat, 1986

### 2.2.2 Plasmide

Tabelle 2-2 Verwendete Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Referenz</b>
pBMCK <sup>2-</sup> wt-MCADh	Gregersen <i>et al.</i> , [1991]
p985-41 K304E-MCADh	Bross <i>et al.</i> , [1993]
pTrc wt-MCADh	A. Nandy, Dissertation Konstanz, [1996]
pTrc K304E MCADh	A. Nandy, Dissertation Konstanz, [1996]
pGroESL	mit freundl. Genehmigung von A.A. Gatenby überlassen. Goloubinoff <i>et al.</i> , [1989a]
pET (11a) K304E	A. Nandy, Dissertation Konstanz, [1996]
pET wt-LCADh	mit freundl. Genehmigung von A.W. Strauss überlassen.

## 2.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken

### 2.3.1 Präparation kompetenter Zellen

[Maniatis *et al.*, 1982; modifiziert]

Die Präparation transformationskompetenter Zellen erfolgte durch Inokulation von ca. 20 ml Kulturmedium mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Wirtsstammes. Nach Erreichen einer optischen Dichte von  $OD_{578} = 0,2-0,5^1$  wurde für 10–15 min auf Eis abgekühlt. Durch einen sich anschließenden Zentrifugationsschritt wurden Zellen und Medium voneinander getrennt und das sich daraus resultierende Zellpellet in der Hälfte des Ausgangsvolumens eiskalter, steriler 75 mM  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 20–120 min auf Eis wurde wiederum abzentrifugiert und das Zellpellet schließlich in 1/10 des Ausgangsvolumens aufgenommen.

Die mit dieser Methode präparierten Zellen wurden fakultativ für weitere 12–24 h bei 4° C gehalten<sup>2</sup>.

### 2.3.2 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid DNA

[Maniatis *et al.*, 1982]

200 µl einer wie unter 2.3.1 beschrieben präparierten kompetenten Zellsuspension wurde vorsichtig mit Plasmid-DNA<sup>3</sup> gemischt und für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen sich anschließenden Temperatursprung auf 42° C für zwei Minuten wurde die Plasmid-DNA in die Zelle eingeschleuft. Zur Expression der Resistenzgene erfolgte anschließend die Zugabe von 800 µl LB-Flüssigmedium mit darauffolgender Inkubation für ca. 60 min bei 37° C. Der gesamte Ansatz –aliquotiert zu 100–200 µl wurde daraufhin auf selektiven Agarplatten ausplattiert und bei 37° C bis zur gewünschten Koloniedichte bebrütet.

---

<sup>1</sup> Die Zellen befinden sich bei dieser OD gewöhnlicherweise in der logarithmischen Phase. Je nach Wirtsstamm variiert hierbei jedoch der Titer.

<sup>2</sup> Die maximale Transformationseffizienz hängt dabei stark von der Zelldichte zum Zeitpunkt der Zelleinte sowie der Inkubationsdauer in  $CaCl_2$ -Lösung ab.

<sup>3</sup> Üblicherweise werden DNA-Endkonzentrationen von bis zu 40 ng pro Transformationsansatz eingesetzt.

### 2.3.3 Zellanzucht und Wachstumsbedingungen

Generell erfolgte die Anzucht größerer Zellkulturen durch Überimpfen mit einer Vorkultur im Verhältnis 1:100. Dabei wurden die Wachstumsbedingungen so gewählt, daß eine Temperatur von 28° C nicht überschritten wurde. Die Induktionsdauer betrug für die Lys<sup>304</sup> → Glu Mutante dabei in der Regel maximal fünf Stunden.

## 2.4 Biochemische Arbeitstechniken

### 2.4.1 Zellernte und Aufschluß

[Nach Cull and McHenry, 1990, modifiziert]

Zellen, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase (Wildtyp) befanden, beziehungsweise eine Induktionsdauer von maximal fünf Stunden erreicht hatten (Lys → Glu-Mutante K<sup>304</sup> → E-MCADh), wurden in einer auf 4° C vorgekühlten Zentrifuge bei 5000 rpm für 30 min abzentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wurde in einem dreifachen Volumen eiskaltem Lysepuffer – bezogen auf das Nassgewicht der Zellen – aufgenommen.

#### Lysepuffer pH 7,6

Tris	50 mM
NaCl	200 mM
DTT	1 mM
EDTA	10 mM
FAD	1–2 µM
PMSF	1 mM

Fakultativ wurde die Zellfraktionierung durch die Zugabe von 300 µg/ml Lysozym gestartet und nach 30–60 min auf Eis mit 20 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 20 µl DNase I-Lösung (1 mg/ml) pro Gramm Zellmasse versetzt.

Nach vollständiger Resuspension des Zellpellets in Lysepuffer, erfolgte der Aufschluß mit Hilfe von Ultraschall (Branson Sonifier B-30)<sup>4</sup>. In Abhängigkeit des Probenvolumens wurden mehrmals 1–3-minütige Pulsraten gegeben, die von kurzen Pausen unterbrochen waren, um die Probe nicht zu stark zu erwärmen. Dabei wurde der gesamte Ansatz stets auf Eis gekühlt.

## 2.4.2 Ammoniumsulfat-Präzipitation

Ammoniumsulfat wurde stets in fein zermahlener, kristalliner Form zur Präzipitation und Konzentrierung größerer Mengen von Proteinen eingesetzt. Alle Fällungen wurden auf Eis unter sehr vorsichtigem Rühren durchgeführt. Dabei wurden fortdauernd kleine Mengen zugegeben und solange gerührt, bis sich das Salz vollständig löste<sup>5</sup>. Zur vollständigen Äquilibration mit Ammoniumsulfat wurde anschließend für mindestens zwei Stunden bis maximal über Nacht auf Eis gerührt. Zur Stabilisierung wurde allen Proben FAD zu einer Endkonzentration von 2 µM zugegeben.

Die Trennung des Protein-Niederschlages aus der Lösung erfolgte durch Zentrifugation. Als Richtwert galt  $10^5$  g \* Minute (z.B. 10.000 g für 10 min). Das hieraus erhaltene Proteinpellet wurde im Anschluß daran entweder sofort weiterverarbeitet, oder bis zum Gebrauch bei -20° C eingefroren.

---

<sup>4</sup> Die Einstellung der Pulsintensität erfolgte je nach Wahl der verwendeten Spitze. Für kleinere Volumina wurde die "Microtip" bei Einstellung 7 verwendet, größere Volumina wurden mit maximaler Intensität mit der "Macrotip" aufgeschlossen.

<sup>5</sup> Die Molarität einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung beträgt: 3,90M, 4,04M und 4,1M bei 0° C, 20° C und 25° C. Die Konzentrierung größerer Proteinmengen bzw. Volumina, beispielsweise einzelner Fraktionen aus diversen Säulenchromatographischen Schritten, erfolgte stets mit einem Ammoniumsulfat-Sättigungsgrad von 80%.

### 2.4.3 Proteinbestimmung

[Bradford, 1976, modifiziert]

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem "Coomassie Plus Protein Assay Reagent." Als Referenz-Eichlösung diente Rinder-Serumalbumin (BSA) das entsprechend auf die Konzentrationen 1; 2,5; 5; 10; 12,5; 15; 20 und 25 µg/ml verdünnt wurde. Zur Durchführung des "Micro Assays" wurden je 500 µl verdünnter BSA-Lösung mit 500 µl "Assay Reagent" gemischt und sofort bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Leerwert gemessen.

Angereicherte Proteinlösungen unbekannter Konzentration wurden zuvor mit demselben Puffer/Lösungsmittel verdünnt und in Doppel- beziehungsweise Dreifachbestimmungen den bekannten Absorptionswerten der Eichgeraden zugeordnet.

### 2.4.4 Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon$ für wt-Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase und $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh

Die Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten für Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase basierte auf der Berechnung des freien FAD-Gehaltes nach vollständiger Dissoziation des gereinigten Enzyms mittels einer 20%-igen SDS-Lösung. Hierzu wurde das Enzym zunächst gegen 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,6 umgepuffert, um eine Präzipitation eventuell noch vorhandenen Kaliums zu verhindern. Nach Aufnahme des Spektrums des nativen Enzyms (250–750 nm), wurde SDS sowohl in der Mess- als auch in der Referenzküvette zu einer Endkonzentration von 1% (v/v) zugegeben. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 210 min in 30-minütigem Abstand solange die spektralen Eigenschaften photometrisch verfolgt, bis sich keine Absorptionsänderungen im Bereich um 450 nm mehr ergaben. Mit Hilfe des bekannten Extinktionskoeffizienten für "freies" FAD, der mit  $\epsilon_{450} = 11,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  angegeben ist, [Whitby, 1953], wurde daraus auf die Konzentration bzw. auf den Absorptionskoeffizienten nativer LCADh zurückgerechnet<sup>6</sup>. Als Kontrolle wurde mit gereinigtem Enzym aus Schweineniere (MCADp) in der gleichen Weise verfahren und mit dem in der Literatur beschriebenen Wert verglichen

---

<sup>6</sup> Die Berechnung für  $\epsilon$  basierte auf den folgenden Annahmen:

a.) der vollständigen Dissoziation des Enzyms durch SDS

[Thorpe *et al.*, 1979]. Für das Schweinenierenenzym wurde in Übereinstimmung mit Thorpe ein  $\epsilon_{446}$ -Wert von  $15,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ermittelt.

Die Aufnahme aller Spektren erfolgte bei einer Temperatur von  $25^\circ \text{C}$ .

### 2.4.5 Tricine-Gelelektrophorese

[Schägger & von Jagow, 1987]

Elektrophoretische Auftrennungen komplexer Proteingemische sowie Reinheits- und Identitätsanalysen erfolgten nach der von Schägger und von Jagow beschriebenen Methode der Tricine-Gelelektrophorese. Die Auflösung der zu trennenden Proteine lag hierbei in einem Bereich zwischen 1 kD und ca. 100 kD.

Die mit "T" und "C" bezeichneten prozentualen Angaben beziehen sich auf die Gesamt-Acrylamidkonzentration (T), sowie den am Gesamtvolumen enthaltenen Anteil des *crosslinkers* Bisacrylamid (C). Zur Herstellung eines Geles wurde folgendes Pipettierschema eingehalten.

	<b>Sammelgel</b> 4% T, 3% C	<b>Spacergel</b> 10% T, 3% C	<b>Trenngel</b> 16,5% T, 3% C
49,5% T, 3% C	0,5 ml	3,05 ml	5 ml
Gelpuffer (3M Tris pH 8,45; 0,3% SDS)	1,55 ml	5 ml	5 ml
Glycerin	—	—	2 g
H <sub>2</sub> O	4,2 ml	6,95 ml	3,25 ml
APS (10%)	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$

Trenngel und Spacergel wurden gemeinsam gegossen und nach Polymerisation mit dem Sammelgel überschichtet.

Alle Proben wurden vor Applikation im Verhältnis 2:1 (Probe : Probenpuffervolumen) in zweifach konzentriertem Probenpuffer (100 mM Tris pH 6,8; 8% SDS; 24% Glycerin; 4% DTT; 0,02% Serva Blue G) aufgenommen und für 3–5 min gekocht.

Als Laufpuffer der Kathodenseite diente 100 mM Tris, 100 mM Tricine pH 8,25 und 0,1% SDS. Auf der Anodenseite wurde 200 mM Tris pH 8,9 als Laufpuffer verwendet. Die Trennung für ein Gel (90 x 90 x 1 mm) erfolgte nach Migration durch das Sammelgel bei 50–70 Volt bei einer konstanten Spannung von 200–230 Volt beziehungsweise 50 Volt über Nacht.

#### 2.4.6 Isoelektrische Focussierung (IEF)

Die Ermittlung der isoelektrischen Punkte (pI) gereinigter Enzymproteine, wurde mittels Focussierung in immobilisierten pH-Gradienten durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in einem sechs pH-Einheiten umfassenden Gradienten zwischen pH 3–9 (PhastGel IEF 3–9, Pharmacia), welcher durch einen Vorfocussierungsschritt aufgebaut wurde.

Zur Probenvorbereitung wurden die entsprechenden Enzyme, soweit erforderlich, zunächst mit niedermolaren (Tris bzw.  $KP_i$ -Puffer bis maximal 50 mM) Pufferlösungen umgepuffert und ohne weitere Vorbehandlung zwischen Kathoden- und Anodenseite appliziert<sup>7</sup>.

#### 2.4.7 N-terminale Aminosäuresequenzanalyse von wt-MCADh, $K^{304}$ → E-MCADh, wt-LCADh und GroEL

Für die Ermittlung N-terminaler Aminosäuresequenzen wurden alle Proben zunächst einer Elektrophorese im 16,5%-igen Polyacrylamidgel (Kapitel 2.4.5) unterzogen. Alle zur Herstellung des Gels benötigten Chemikalien entsprachen der höchsten Reinheitsstufe und wurden in Milli-Q Wasser gelöst.

---

<sup>7</sup> Zur technischen Durchführung wird auf das PhastSystem™ *Separation Technique Fil No. 100 (IEF and electrophoretic titration curve analysis)* verwiesen.

Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte der Transfer auf eine PVDF-TransBlot-Membran. Die Vorbehandlung von Gel und Transfer-Membran wurde folgendermaßen durchgeführt:

Nach Benetzung der Blottingmembran in Methanol p.a. für 20 min, wurden Membran und Gel für ca. fünf min in Transferpuffer äquilibriert. Dabei wurde, um eventuell auftretende Hintergrundsignale durch im Transferpufferenthaltene Glycin zu minimieren, mit 3-(Cyclohexamino)-1-Propansulfonsäure (CAPS) äquilibriert und anschließend transferiert [nach Towbin *et al.*, 1979].

### **Transferpuffer für Elektroblots zu sequenzierender Proteine**

CAPS	10 mM pH 11
Methanol	10 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)

Gel und Membran wurden wie unter 2.7.2 beschrieben zwischen zwei ebenfalls in Transferpuffer getränkten Filterkartons zu einem Sandwich übereinandergelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 45 min bei 250 mA im Semitrocken-Modus. Anschließend wurden die geblotteten Proteinbanden folgendermaßen detektiert:

<b>Schritt</b>	<b>Puffer</b>	<b>Dauer</b>
Waschen der Membran	Milli-Q Wasser	10 min
Benetzen	MeOH abs.	30 sec
Färbung	50 % MeOH, 7,5 % HAc, 0,1 % Serva-Blue R-250	1 – 2 min
Zweimalige Entfärbung	50 % MeOH	ca. 5 min
Zweimaliges Waschen	Milli-Q Wasser	ca. 2 min
Trocknen		RT

Die hierdurch visualisierten Proteinbanden wurden vorsichtig ausgeschnitten und im *Pulsed Liquid Sequencer* nach dem von Edman [1950] entwickelten Verfahren automatisch sequenziert.

### 2.4.8 Aktivitätsbestimmung

[Lehman *et al.*, 1990a; 1990b]

Alle Enzym-Assays wurden nach der von Lehman und Mitarbeitern [1990] beschriebenen Methode durchgeführt, bei der FCPF<sub>6</sub> als einziger terminaler Elektronenakzeptor dient. Als Reaktionspuffer diente stets 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6. Abweichend von der von Lehman [1990] beschriebenen Rezeptur wurde auf die Zugabe von EDTA verzichtet.

Standard-Assays wurden in einem Gesamtvolumen von 700 µl durchgeführt und durch die Zugabe von 30 µM (Endkonzentration) der entsprechenden CoA-Thioester-Substrate nach Erreichen einer stabilen Basislinie gestartet. Alle Assays wurden bei einer Temperatur von 25° C durchgeführt. Die Berechnung enzymatischer Aktivitäten erfolgte mittels Absorptionsänderung bei 300 nm durch die Reduktion von Ferriceniumhexafluorophosphat. Der molare Absorptionskoeffizient für FCPF<sub>6</sub> beträgt bei 300 nm 4300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### 2.4.9 Temperaturstabilitätsprofil und Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Katalyse

Der Einfluß der Temperatur auf die Stabilität von Wildtyp und mutanter K<sup>304</sup> → E Acyl-CoA Dehydrogenase wurde mit Hilfe eines Temperaturstabilitätsprofils analysiert. Hierzu wurden jeweils 20 µl gereinigter Enzymlösung mit einer Flavinabsorption von A<sub>450</sub> = 0,15 für 15 min bei Temperaturen zwischen 25° C und 62° C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Messung der verbleibenden Aktivität mit Hilfe des Ferricenium Assays (s. 2.4.8). Alle Aktivitätsmessungen wurden in 100 mM KP<sub>i</sub>-Puffer pH 7,6 bei 25° C durchgeführt. Als Substrat diente jeweils Octanoyl-CoA mit einer Endkonzentration von 34 µM.

#### 2.4.10 Bestimmung der Aktivierungsenergie $E_a$ nach Arrhenius für wt-MCADh und $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh

Für die Bestimmung des "Temperaturoptimums"<sup>8</sup> wurde die enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur bestimmt. Für die Aufrechterhaltung der Reaktionstemperatur in der Meßküvette sorgte eine eigens dafür vorgesehene thermostatisierbare Küvettenaufnahme. Die für die Aktivitätsmessungen benötigten Pufferlösungen wurden ebenfalls im Wasserbad thermostatisiert und vor jeder Messung durch Adjustierung des pH-Wertes auf die jeweilige Meßtemperatur neu eingestellt. Aufgrund seiner hohen pH-Konstanz über weite Temperaturbereiche wurde MOPS in einer Konzentration von 100 mM mit einem pH-Wert von 7,6 als Reaktionspuffer gewählt. Alle Messungen erfolgten durch zehnmünütige Vorinkubation der Reaktanden in der Küvette, welche sowohl Ferricenium als auch Substrat enthielt. Der Start der Aktivitätsmessung erfolgte durch Zugabe des Enzyms in die temperierte Küvette. Die Enzymkonzentrationen für Wildtyp und Mutante wurden durch Absorptionsmessungen auf gleiche Flavinabsorption von 0,15 eingestellt. Alle Messungen wurden stets unter substratsättigenden Bedingungen durchgeführt. Im Anschluß an jede Messung wurde die Reaktionstemperatur mit Hilfe eines Digitalthermometers überprüft.

Die Durchführung aller temperaturabhängigen Aktivitätsbestimmungen erfolgte prinzipiell nach der in Abschnitt 2.4.8 beschriebenen Methode nach Lehman.

#### 2.4.11 Tryptische Fragmentierung von wt-MCADh und $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh

Je 30 µg der nativen Enzyme wt und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh wurden in 100 mM Tris pH 8,5 mit 0,5 µg Trypsin (*sequencing grade*) für 2,5 h bei 37° C verdaut. In einem parallelen Ansatz wurde die gleiche Menge Enzym:Protease in Gegenwart von 0,05% SDS inkubiert. Als Referenz dienten jeweils die nativen, in Abwesenheit von Protease inkubierten Enzyme. Zum Abstoppen der tryptischen Proteolyse wurden die Reaktionsansätze in Elektrophoresepuffer aufgenommen und anschließend gekocht. Die Evaluation der

---

<sup>8</sup> Der Bezeichnung "Temperaturoptimum" kommt in diesem Zusammenhang eher eine theoretische Bedeutung zu. In der Regel befinden sich Enzyme bei der als Optimum bestimmten Temperatur bereits in einem durch thermische Destabilisierung sehr labilen Zustand.

tryptischen Verdauung erfolgte durch eine 8–25%ige SDS Gradienten-Gelelektrophorese mit Hilfe des Phast Systems und darauffolgendem *Western Blotting*. Dabei wurden die geblohteten Protein- und Peptidbanden mit Hilfe von affinitätschromatographisch gereinigten anti-Schweineniere-MCAD Antikörpern sichtbar gemacht.

## 2.5 Chromatographische Reinigungsverfahren

### 2.5.1 Reinigung der Mutante K<sup>304</sup> → E der humanen Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase

Als Ausgangsmaterial zur Reinigung der Mutante K<sup>304</sup> → E humaner Medium-chain Acyl CoA Dehydrogenase (K<sup>304</sup> → E-MCADh) dienten mit dem Plasmid pTrc K<sup>304</sup> → E-MCADh transformierte *E. coli* TG 1 Kulturen.

Nach Aufnahme des Zellpellets in Lysepuffer wurden die Zellen durch fünffache Ultraschall Pulsgabe von jeweils zwei min fraktioniert. Lösliche und nichtlösliche Bestandteile wurden anschließend durch sechzigminütige Zentrifugation bei 9000 rpm (GSA) voneinander getrennt. Der daraus resultierende Rohextrakt (d.h. der Überstand aus der Zentrifugation) wurde mit Ammoniumsulfat präzipitiert. Dabei wurde zunächst ein Sättigungsgrad von 30% gewählt. Zu dem zu 30% gesättigten Überstand wurde nach Abtrennung des Präzipitats schließlich Ammoniumsulfat bis zu einem Sättigungsgrad von 80% zugegeben und für weitere 5 h gerührt. Die aus der Lösung ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation separiert.

Das resultierende, zwischen 30 und 80% Ammoniumsulfatsättigung präzipitierte, Protein wurde anschließend in 50 mM Tris-Puffer pH 7,6 (eisgekühlt) aufgenommen und über eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Sephadex G-25 Gelfiltrationssäule (Pharmacia XK 50/30) entsalzt. Die Flußrate betrug 9,1 cm/h. Das entsalzte Eluat wurde dann quantitativ auf eine ebenfalls mit 50 mM Tris pH 7,6 voräquilibrierte Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose FF) aufgetragen. Der Probenauftrag erfolgte mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Pharmacia P-1) bei einer Flußrate von 28,6 cm/h, das anschließende Spülen beziehungsweise die Elution wurde mit 47,7 cm/h durchgeführt. Eluiert wurde mit 800 ml (entsprechend ca. 8 Säulenvolumen) eines linearen Natriumchlorid-Gradienten von 0–350 mM NaCl. Die Detektion eluierender Proteine erfolgte kontinuierlich bei 280 nm. Das gesamte Eluat wurde in Fraktionen zu je 15 ml gesammelt und jede einzelne Fraktion auf die Anwesenheit von MCADh mittels Dot-Blot-

Analyse (2.7.3) untersucht. Entsprechend der Stärke der im Dot-Blot erhaltenen Signale wurde aus mehreren Einzelfraktionen eine Poolfraktion gebildet, die zu 80% mit Ammoniumsulfat gesättigt wurde.

### 2.5.2 Gelpermeationschromatographie

Das nach Zentrifugation im Präzipitat angereicherte Protein wurde in 100 mM KPi pH 7,6 resuspendiert und anschließend mit einer Flußrate von 8,5 cm/h über eine Gelfiltrationssäule (Pharmacia Superdex 200 prep grade, XK 26/60) aufgetrennt. Als Laufpuffer diente ebenfalls 100 mM KPi-Puffer pH 7,6, der zur Stabilisierung des mutanten Proteins mit 2  $\mu$ M FAD (Endkonzentration) supplementiert war.

Die Analyse der zu poolenden Fraktionen (Fraktionsgröße 2 min entsprechend 1,5 ml) erfolgte mittels Dot-Blot sowie aufgrund der spektralen Reinheit. Als zusätzliches Kriterium diente das der Kalibrierung entsprechende Elutionsvolumen von ca. 170 ml.

### 2.5.3 Chromatographie über Hydroxyl-Apatit

Im letzten Schritt der Reinigung mutanter Medium-chain Acyl CoA-Dehydrogenase ( $K^{304} \rightarrow E$ ) wurde das nach 80%-iger Ammoniumsulfat-Präzipitation und anschließender Entsalzung<sup>9</sup> gegen den Auftragspuffer erhaltene Proteingemisch auf eine Hydroxyl-Apatit Säule aufgetragen (Merck Superformance 75-5). Als Startpuffer diente 5 mM  $KP_i$  pH 6,8. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 76,5 cm/h in einem linearen Kaliumphosphat-Gradienten von 5–350 mM  $KP_i$  pH 6,8 in 20 ml (entsprechend ca. 13 Säulenvolumen).

Die Reinheitsanalyse der einzelnen Fraktionen erfolgte mit Hilfe elektrophoretischer Trennverfahren (Kapitel 2.4.5). Spektral und elektrophoretisch reine Fraktionen wurden gepoolt und im Centricon-30 bei zweimaliger Zugabe von 1 ml 100 mM  $KP_i$  pH 7,6 aufkonzentriert.

---

<sup>9</sup> Die Entsalzung kleinerer Volumina erfolgte über Pharmacia PD-10 Säulen.

## 2.6 Reinigung humaner Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase aus *E. coli*

Zur Reinigung humaner Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase dienten mit dem Plasmid pET LCADh transformierte Zellen des *E. coli* Stammes BL 21. Die Techniken des Aufschlusses sowie der Ammoniumsulfat-Präzipitation erfolgten analog zur Reinigung humaner MCADh-K<sup>304</sup> → E.

Das zu 30–80% mit Ammoniumsulfat gefällte Proteinpellet wurde nach Entsalzung gegen 50 mM Tris / 5  $\mu$ M FAD pH 7,6 auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule aufgetragen (Pharmacia, Resource-Q; 6 ml). Nach dem *Flow-through* und Erreichen der Basislinie wurde ein linearer NaCl-Gradient (in 50 mM Tris, 5  $\mu$ M FAD) von 0–350 mM in 90 ml (entsprechend 15 Säulenvolumen) angelegt. Zur vollständigen Elution noch gebundener Proteine wurde von 350 mM–1M NaCl in weiteren 10 ml gespült.

Die in den entsprechenden Fraktionen vorhandene LCADh-Aktivität wurde mit Hilfe des Ferricenium-Assays sowie durch Western-Blot nachgewiesen. Die Aktivitäten mehrerer Läufe wurden vereinigt und mit Ammoniumsulfat zu 80% über Nacht gefällt. Die anschließende Entsalzung über NAP-25 erfolgte gegen 5 mM  $KP_i$  / 5  $\mu$ M FAD pH 6,8.

Die gefällte und entsalzte Aktivität des ersten chromatographischen Reinigungsschrittes wurde anschließend auf eine mit Hydroxyl-Apatit gefüllte Säule aufgetragen.

### 2.6.1 Reinigung des Chaperons GroEL aus wt-LCADh/GroEL doppeltransformierten *E. coli* Zellen

Die Reinigung des Chaperons GroEL, das zur Stabilisierung der Expression nativer Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase coexprimiert wurde, wurde parallel zur Reinigung des humanen LCADh Enzyms im ersten chromatographischen Schritt durchgeführt.

Abweichend zur oben beschriebenen Vorgehensweise der Reinigung für LCADh – die in Abwesenheit zusätzlich transformierten GroEL/S exprimiert wurde – erfolgte die Isolation des Chaperons aus LCADh / GroEL/S doppeltransformierten Zellen. Dabei wurde in Abwandlung zu 2.6 folgendermaßen vorgegangen:

Ein zuvor zwischen 35 und 85% Ammoniumsulfatsättigung gefällter Rohextrakt wurde nach Umpufferung gegen 100 mM Tris pH 7,8 auf eine mit Q-Sepharose FF gefüllte

Säule aufgetragen (Pharmacia, XK 16/20). Nach Probenauftrag (Flußrate: 15 cm/h) und Spülen (Flußrate: 22,5 cm/h) der Säule wurde die Elution in einem linearen NaCl-Gradienten zunächst in 230 ml von 0–0,5 M NaCl durchgeführt. Die weitere Elution erfolgte von 0,5–1M NaCl in 60 ml.

Das mittels Elektrophorese in den einzelnen Fraktionen visualisierte GroEL-Protein wurde zu einer Sammelfraktion vereinigt und auf einen Ammoniumsulfat-Sättigungsgrad von 70% gebracht. Nach Aufnahme des Präzipitats und Entsalzung gegen 25 mM Tris / Cl<sup>-</sup> pH 7,6 wurde das gesamte Protein einer zweiten Chromatographie mittels Anionenaustausch (Mono-Q HR5/5) unterworfen. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten von 0–0,5 M NaCl in 50 ml bei einer Flußrate von 76,5 cm/h. In weiteren 10ml wurde der Gradient auf 1 M NaCl erhöht. GroEL-enthaltende Fraktionen, die bei einer NaCl-Konzentration zwischen 300–400 mM eluierten, wurden wiederum vereinigt und einer erneuten Ammoniumsulfatfällung zwischen 50–70% Sättigung unterzogen. Nach einem weiteren Reinigungsschritt des zu 50–70% gefällten Proteins über Mono-Q HR5/5, bei halbiertem Elutionsvolumen (in 25 ml von 0–0,5 M NaCl), ansonsten aber identischen Laufparametern, galt das Protein als gereinigt.

Der analytische Nachweis von reinem GroEL erfolgte über native Gelelektrophorese sowie N-terminale Aminosäuresequenzanalyse.

## 2.6.2 Entsalzung und Umpufferung von Proteinlösungen

Proteinlösungen die – beispielsweise nach Ammoniumsulfatfällungen– einen sehr hohen Salzgehalt aufwiesen, bzw. gegen Puffer anderer Ionenstärke und Zusammensetzung ausgetauscht werden sollten, wurden entweder unter mehrmaligem Wechsel des auszutauschenden Puffers dialysiert, oder mittels Gelfiltration chromatographiert. Als Gelmatrix diente hierbei Sephadex G-25 der Qualitätsstufen zwischen Superfine (FastDesalting™) und Fine (Pharmacia PD-10 Fertigsäulen<sup>10</sup>; Pharmacia Sephadex G-25). Automatische Entsalzungen mittels FPLC wurden mit Hilfe eines Konduktometers auf Vollständigkeit überprüft. Das maximal applizierte Probenvolumen betrug bei säulenchromatographischen Entsalzungen 25–30% des zur Verfügung stehenden Säulenvolumens ( $V_t$ ).

---

<sup>10</sup> Entsalzungen über PD-10 Säulen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Probenauftragsvolumen betrug 2,5 ml. Die Elution erfolgte mit 3,5 ml Eluens nach vollständigem Einsinken der Probe in das Gelbett.

## 2.7 Immunbiochemische Arbeitsmethoden

### 2.7.1 Gewinnung polyklonaler Antikörper

[Harlow & Lane]

Immunisierungen zur Gewinnung der entsprechenden Antiseren wurden in der Tierforschungsanlage der Universität Konstanz unter veterinärmedizinischer Betreuung durch Dr. F. Gruber durchgeführt.

Die zu immunisierenden Kaninchen wurden vor der ersten Verabreichung des entsprechenden Antigens auf eventuell bereits vorhandene spezifische Antikörper getestet. Hierzu wurde ca. 1 ml "Nullblut" aus der Ohrvene der Tiere entnommen und in Röhrchen für 30–60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Coagulation des Blutkuchens wurde für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand –das Nullserum– wurde für weitere Analysen bei -20° C eingefroren.

Die Erstimmunisierung mit gereinigtem GroEL-Protein erfolgte durch Emulgieren von 100 µl steriler GroEL-Lösung (2mg/ml) in 500 µl cFA und anschließender subcutaner Injection. Nach 14 Tagen wurde dem Tier erneut Blut entnommen und wie oben beschrieben präpariert. Aus derselben GroEL-Stammlösung wurde mit 200 µl im gleichen Volumen iFA *geboostet*. Nach weiteren 14 Tagen wurde diese Prozedur durch *Boosten* mit 0,2 mg GroEL in iFA wiederholt. Im weiteren Abstand von je acht Tagen wurde jeweils Blut zur Serumgewinnung entnommen und das Tier schließlich ausgeblutet. Die Gewinnung des gesamten anti-GroEL-Antiserums erfolgte durch 2-stündige Coagulation des Blutkuchens bei RT mit anschließender Zentrifugation bei 5000 rpm (GSA, 4° C). Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20° C verwahrt.

Zur Gewinnung von Antiserum gegen LCADh wurden 100 µl Antigen-Lösung zunächst mit Elektrolytlösung auf ein Volumen von 0,5 ml aufgefüllt. Zusätzlich wurden 500 µl RAS3 Adjuvans-Lösung zugegeben und dem Tier schließlich subcutan gespritzt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Die Vorgehensweise zur Serumgewinnung war identisch zu der für GroEL beschriebenen Methodik.

## 2.7.2 Western-Blot-Analyse

[Towbin *et al.*, 1979]

Der spezifische Nachweis auf die Präsenz verschiedener Acyl-CoA Dehydrogenasen erfolgte durch Western Blot Analyse nach Towbin.

Schritt	Puffer	Dauer
Benetzen der Membran	MeOH abs.	5min
Äquilibrieren	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10% MeOH; 0,1% SDS	10 min
Elektrophoretischer Transfer	s. Schritt 2	20 min bei 5mA/cm <sup>2</sup>
Waschen	20 mM Na-Phosphat pH 7,5; 160 mM NaCl; 0,05% Tween-20 (PBS)	3 x 5 min
Absättigen	2-3% NBS in PBS	30 – 60min
Waschen	PBS (Harlow & Lane)	3 x 5min
Immunodekoration mit primärem Ab	Antiserum in PBS (Verdünnung 1:50.000 – 1:500.000)	1 h – über Nacht
Waschen	PBS	3 x 5min
Immunodekoration mit sekundärem Ab (Phosphatase-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-Ab)	Antiserum in PBS (Verdünnung 1:50.000 – 1:500.000)	1h – über Nacht
Waschen	PBS	3 x 5min
Waschen	100 mM Glycin pH 9,6; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM ZnCl <sub>2</sub> ; (Glycinpuffer)	3 x 2min
Entwickeln	10 mg/ml NBT; 5 mg/ml BCIP (je 1:100 in Glycinpuffer)	bis zum Sichbarwerden der Proteinbanden; abstoppen mit H <sub>2</sub> O

Nach Auftrennung der Proteingemische im SDS-PAGE erfolgte der Transfer auf PVDF-Membranen. Die Proteine wurden hierbei im semi-trocken Modus zwischen zwei

transferpuffergetränkten Filterkartons für 20 min bei 5mA/cm<sup>2</sup> unter ständiger Kühlung transferiert.

Die immunbiologische Entwicklung wurde gemäß der obigen Tabelle durchgeführt.

### 2.7.3 Dot-Blot-Analyse

In Analogie zur oben beschriebenen Western Blotting Technik wurden Dot Blot Analysen durchgeführt.

Hierbei wurde jedoch auf eine elektrophoretische Auftrennung im ersten Schritt verzichtet und die entsprechenden Proben direkt auf Nitrocellulose aufgetragen. Pro Dot wurde üblicherweise ein Volumen von 1–5 µl appliziert. Die weitere Vorgehensweise des *Immunostaining* erfolgte wie unter 2.7.2 beschrieben.

### 2.7.4 Inhibitions ELISA Test (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Die quantitative Analyse vermeintlich inaktiver Mutanten der *Medium-chain Acyl CoA Dehydrogenase* erfolgte durch Antikörperkompetition mit gereinigtem Schweineleberenzym. Zur Ermittlung der Antigenkonzentration in Zellextrakten diente ein Inhibitionsverfahren mittels ELISA-Technik.

In jede Vertiefung einer Microtiterplatte wurden je 100 µl einer Lösung gereinigter MCAD aus Schweineleber (10 µg/ml) pipettiert. Als Kopplungspuffer diente 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 9,4. Die Antigen gecoateten Platten wurden anschließend entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach Absaugen und fünfmaligem Waschen der *wells* mit PBS-Puffer wurde die verbleibende Bindungskapazität mit 300 µl einer 2%-igen BSA-Lösung in PBS abgesättigt. In Eppendorfgefäßen wurden währenddessen definierte Mengen gereinigter MCAD (0,5 ng/ml–750 µg/ml) sowie verschiedener Verdünnungsstufen Antigen-enthaltender Zellextrakte mit einem gleichen Volumen anti-MCAD Antiserum vorinkubiert. Dabei wurden alle Verdünnungen in PBS-Puffer durchgeführt, der zu einer Endkonzentration von 2% mit BSA supplementiert war. Nach einer Inkubationszeit von 2 h im Eppendorfgefäß wurde abzentrifugiert, der verbleibende Überstand in die jeweiligen, mit gereinigtem Enzym vorgecoateten, *wells* pipettiert und für weitere 2 h inkubiert. Nach Waschen und

Absaugen der nicht-adsorbierten Antikörper erfolgte die Zugabe des sekundären, Phosphatase-conjugierten Ziege-anti-Kaninchen Antikörpers. Dieser wurde zur Conjugatbildung für weitere 2 h in den *wells* belassen. Nach erneutem Absaugen und Waschen erfolgte das *Immunostaining*. Dazu wurde mit jeweils 100 µl Substratpuffer (50 mM Glycin pH 10,5; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5,5 mM p-Nitrophenylphosphat) inkubiert. Die Entwicklung der Farbreaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm (Titertek multiscan, Pharmacia LKB) detektiert.

## 2.8 Färbemethoden

### 2.8.1 Coomassie Blue Färbung

Die Visualisierung des Proteinbandenmusters nach SDS-PAGE erfolgte durch Färbung mit Coomassie Blue. Als Färbelösung diente 0,1% Serva Blue R-250 in 50% Methanol / 7,5% HAc. Je nach Dicke des zu färbenden Gels wurde zwischen 30 und 60 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Zur Entfärbung wurde die gleiche Lösung ohne Farbstoffzusatz verwendet. Unter mehrmaligem Lösungsmittelwechsel wurde bis zur vollständigen Reduktion des Hintergrundes entfärbt.

Alternativ dazu wurde über Nacht in 0,003%-igem Serva Blue-R in 45% Methanol / 10% Essigsäure in einem einzigen Schritt gefärbt.

### 2.8.2 Coomassie Blue-Färbung für IEF-Gele

Die Coomassie-Färbung von IEF-Gelen erfolgte entsprechend der Anleitung laut *Technical File No. 100* (Pharmacia, Fine Chemicals®). Hierfür wurden die im Gel nach elektrophoretischer Auftrennung separierten Proteinbanden für ca. zehn min mit 20% TCA-Lösung präzipitiert. Das Gel wurde anschließend in einer Lösung aus 30% MeOH und 10% HAc für weitere 10 min gewaschen. Die Färbung erfolgte mit 0,02% Serva-R Blue in 30% MeOH / 10% HAc und 0,1% Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bis zum Sichtbarwerden der Banden.

Nach Visualisierung der Proteinbanden wurde abschließend bis zu Entfärbung des Hintergrundes mit 30% MeOH / 10% HAc gewaschen.

### 2.8.3 Silbernitratfärbung

[Rabilloud *et al.*, 1988, modifiziert]

Diese Methode diente der Steigerung der Sensitivität bei der Detektion von Proteinen nach Auftrennung im SDS-PAGE und wurde entweder anstelle der unter 2.8.1 beschriebenen Coomassie Färbung, oder im Anschluß daran durchgeführt. Abweichend von der durch Rabilloud und Mitarbeitern [1988] beschriebenen Methode wurde folgendermaßen vorgegangen.

Schritt	Solvens	Dauer
1. Fixierung	50% MeOH / 10% HAc	30 min
2. Quellen	5% MeOH / 7% HAc	30 min
3. Waschen	H <sub>2</sub> O bidest.	2 x 15 min
4. Sensitivieren	0.02% Natriumthiosulfat	1 min
5. Waschen	H <sub>2</sub> O bidest.	2 x 1 min
6. Färben	0,1–0.2% AgNO <sub>3</sub> 1 mM Formaldehyd	30 min
7. Waschen	H <sub>2</sub> O bidest.	1 min
8. Entwickeln	6% Natriumcarbonat 6 mM Formaldehyd	bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden
9. Stoppen	2,3 M Citronensäure	5–10 min
10. Waschen	H <sub>2</sub> O bidest.	

Die Nachweisgrenze der hierdurch visualisierten Proteinbanden liegt bei ca. 0,1 ng.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vorbemerkung

Die mittelkettenspezifische oder "generelle" Acyl-CoA Dehydrogenase wurde erstmals 1956 durch Crane und Mitarbeiter [Crane *et al.*, 1956] aus Mitochondrien der Schweineleber isoliert. Weitere Versuche zur Isolation des Enzyms aus verschiedenen Organismen wurden später von mehreren Gruppen dokumentiert [Hall & Kamin, 1975; Thorpe *et al.*, 1979; Ikeda *et al.*, 1983; Dommès & Kunau, 1984; Ikeda *et al.*, 1985; Finocchiaro *et al.*, 1987]. Mit der vorliegenden Arbeit sollte eine alternative Isolationsmethode für humane mittel- und langkettenspezifische Acyl-CoA Dehydrogenase etabliert werden, die durch kontrollierte Expression im prokaryontischen System eine vom Spenderorganismus unabhängige Extraktion des Enzyms erlauben würde. Damit sollte eine Grundlage geschaffen werden, die biochemische Analyse natürlich vorkommender sowie gezielt mutagenisierter Enzyme durch Überexpression und verbesserter anschließender Reinigung zu vereinfachen. Das besondere Interesse galt hierbei der Isolation der in den Kapiteln 1.5.1 – 1.5.3 beschriebenen mutanten Form  $K^{304} \rightarrow E$  der humanen Acyl-CoA Dehydrogenase.

Bross und Mitarbeitern [1990; 1991] sowie der Arbeitsgruppe um Gregersen [Gregersen *et al.*, 1991] gelang es, die Gene für wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh, und die als Aktivzentrum-Mutante bekannte Form  $E^{376} \rightarrow G$ -MCADh der humanen MCAD zu klonieren, und in *E. coli*-Zellen zu exprimieren. Ausgehend von den Plasmiden pBMCK<sup>2-</sup> (codierend für wt-MCADh) und p985-41 (codierend für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh) sollte eine schnelle und effiziente Methode zur Reinigung der Expressionsprodukte erstellt werden. Aufgrund der hohen Homologiegrade auf Ebene der Aminosäuresequenzen der humanen MCAD und der MCAD aus Schweineleber sollte die Reinigung zunächst in Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Methodik durchgeführt werden.

### 3.2 Expression von wt-MCADh und K<sup>304</sup> → E-MCADh in den Plasmiden pBMCK<sup>2-</sup> und p985-41

Die Expression der wt-MCADh, sowie der mutanten Form K<sup>304</sup> → E-MCADh, erfolgte zunächst in den von Bross und Mitarbeitern [Bross *et al.*, 1991] konstruierten Plasmidsystemen pBMCK<sup>2-</sup> (codierend für wt-MCADh) und p985-41 (codierend für K<sup>304</sup> → E-MCADh). In beiden Plasmiden erfolgte die Expression durch die Kontrolle des lac-Operator / Promotors durch die Induktion mit Hilfe des artifiziellen Induktors IPTG.

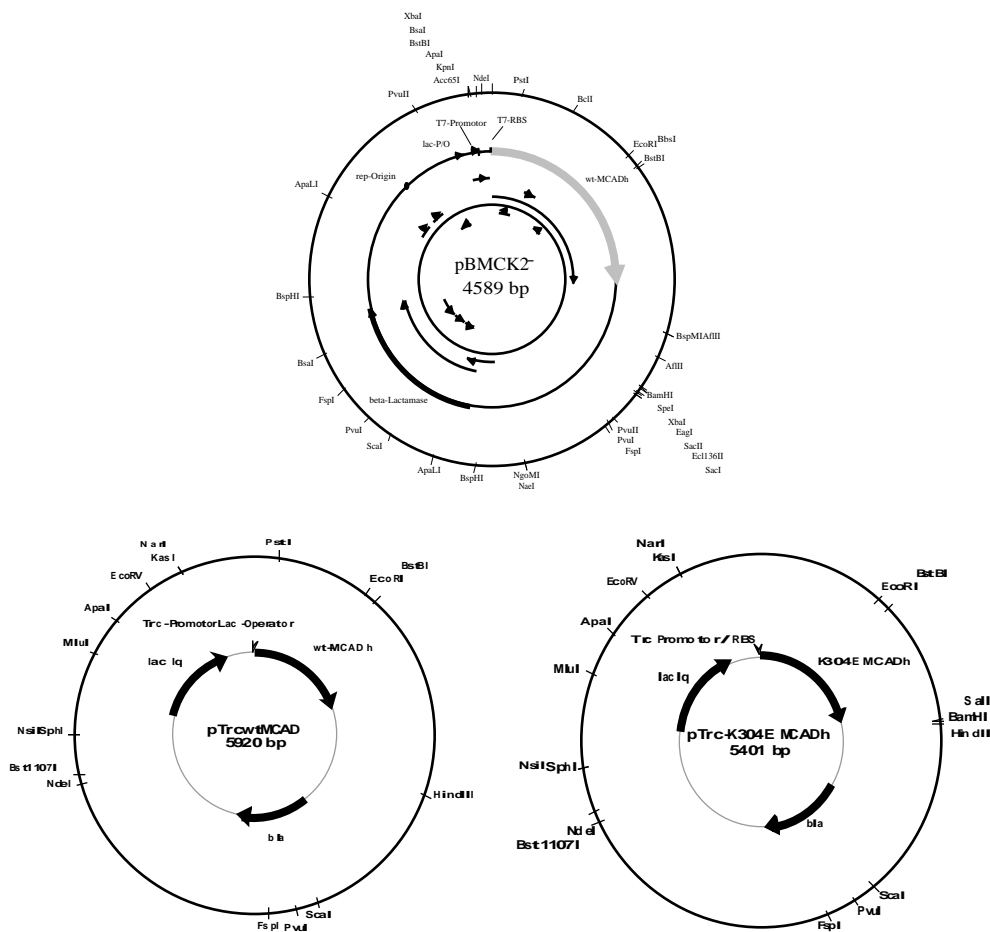


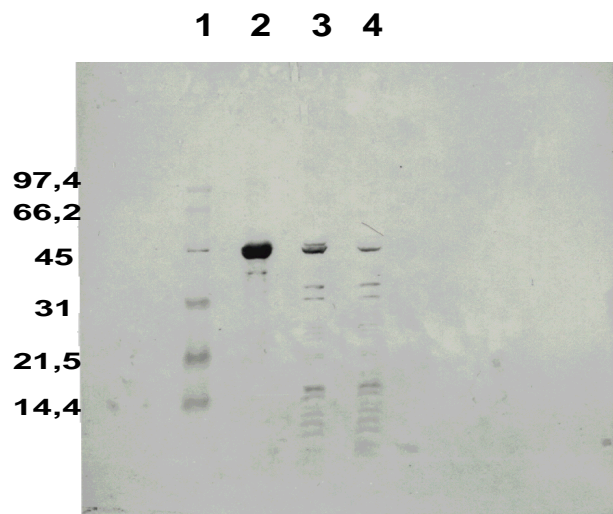
Abbildung 3-1 Expressionsplasmide pBMCK<sup>2-</sup>; pTrc wt-MCADh und pTrc K<sup>304</sup> → E-MCADh. [Bross *et al.*, 1991; Nandy, Dissertation Konstanz 1996]

Die Anwesenheit humaner MCADh in *E. coli*-Zellextrakten wurde zunächst durch elektrophoretische Trennung des Rohextraktes und anschließende immunologische Entwicklung mit affinitätschromatographisch gereinigten anti-Schweinenieren-MCAD Antikörpern nachgewiesen. Nach Expression der beiden Plasmide pBMCK<sup>2-</sup> sowie p985-41 zeigten die daraus gewonnenen Rohextrakte im Western-Blot jeweils eine als MCADh identifizierbare, immunreaktive Proteinhauptbande von korrekter Größe (43,6 kD). Zusätzlich ergab sich bei beiden Enzymen ein in der Intensität und Quantität vergleichbares Muster an Degradationsbanden. Dabei zeigten sich jedoch zwischen wt und K<sup>304</sup> → E-Mutante bei Auftragung der gleichen Gesamtproteinmenge markante Differenzen bezüglich der Intensitäten der Hauptbanden (Abb. 3.2). Diese Banden wurden durch Vergleich mit gereinigtem wt-Enzym bekannter Konzentration aus Schweineniere densitometrisch quantifiziert. Die erhaltenen Werte wurden auf die im Zellextrakt enthaltene prozentuale MCADh-Konzentration extrapoliert. Daraus ließ sich für das in pBMCK<sup>2-</sup> exprimierte wt-Enzym ein Anteil von ca. 3,7% an der Gesamtproteinmenge bestimmen, während die in p985-41 exprimierte Mutante K<sup>304</sup> → E-MCADh lediglich einen prozentualen Anteil von 0,8% repräsentierte (densitometrische Auswertung).

Eine exakte Quantifizierung, wie sie beispielsweise mit Hilfe geeigneter Aktivitätsmessungen hätte bestimmt werden können, mußte aufgrund fehlender bzw. nicht messbarer Aktivitäten entfallen.

Abbildung 3-2 Expressionsnachweis plasmidcodierter wt-MCADh (pBMCK<sup>2-</sup>) und K<sup>304</sup> → E-MCADh (p985-41) in *E. coli* Rohzellextrakten. Die Immunfärbung erfolgte mit affinitätsgereinigten anti-Schweineniere-MCAD Antikörpern.

Spur 1: Proteinstandard (MW in kD)  
 Spur 2: MCAD aus Schweineniere  
 (2,1 µg reines Enzym)  
 Spur 3: Zellextrakt aus pBMCK<sup>2-</sup>  
 (12,4 µg Gesamtprotein)  
 Spur 4: Zellextrakt aus p985-41  
 (12,4 µg Gesamtprotein)



Da sich beide Plasmidkonstrukte, bedingt durch die Einführung der Punktmutation A<sup>985</sup> → G im Plasmid p985-41, lediglich in ihrem 3'-nicht-translatierten Bereich unterschieden, während Operator/Promotor Sequenzen identisch waren, mußte entweder von einer erhöhten proteolytischen Suszeptibilität, respektive einer reduzierten Faltungskompetenz des mutanten Enzyms ausgegangen werden. Diese Annahmen wurden vor allem gestützt durch vergleichende Bestimmungen der spezifischen Aktivitäten in den entsprechenden Rohzellextrakten. Aufgrund reduzierter Syntheseraten sowie einer nicht-messbaren Aktivität des varianten K<sup>304</sup> → E-MCADh-Proteins, die durch die Expression ausgehend vom Plasmid p985-41 erzielt wurden, mußte ursprünglich von einer generellen und vollständigen Inaktivität des mutanten Enzyms ausgegangen werden [Bross *et al.*, 1991; Bross *et al.*, 1992]. Beide Formen (sowohl wt als auch Mutante) der in *E. coli* plasmidcodierten und exprimierten Enzyme zeigten jedoch nach elektrophoretischer Trennung des Rohextraktes und immunbiochemischer Entwicklung im Western-Blot eine der nativen Form entsprechende Proteinbande (Abb. 3-3). Prinzipiell erbrachte der Vergleich der immunreaktiven MCAD-Proteine eine deutlich erhöhte Expression des wt-Enzyms gemessen an der Expression der Mutante K<sup>304</sup> → E. Parallel damit war ein höherer Anteil Acyl-CoA (C<sub>8</sub>-CoA) reduzierender Aktivität bei Expression pBMCK<sup>2-</sup>-codierter wt-MCADh meßbar.

Tabelle 3-1 Reinigungs- und Aktivitätsschema der humanen wt- und K<sup>304</sup> → E-MCAD

	wt-MCADh (aus pTrc / TG1) <sup>b</sup>	K304E-MCADh (aus pTrc / TG1)	K304E-MCADh (aus p985-41 / JM 109)
Aktivität im Rohextrakt (µmol/min * mg) <sup>a</sup>	1,6	1,3	0,02 <sup>c</sup>
Aktivität des reinen Enzyms (µmol/min * mg)	41,3	28,3	6 <sup>d</sup>
% Anteil MCADh im Gesamtrohextrakt	3,8	4,6	≈ 0,3
Reinigungsfaktor	25,5	22,1	n.b.
Ausbeute (%)	58	9,5	n.b.

- a.) Alle Aktivitätsbestimmungen wurden mittels Ferricenium Assay unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Anzuchttemperaturen betragen durchweg 28° C ohne die Co-Expression zusätzlichen GroEl/ES.
- b.) Die für wt-MCADh ermittelten Werte sind einem repräsentativen Reinigungsprotokoll von V. Kieweg entnommen.
- c.) Aus Bross *et al.*, 1995; diese Werte sind teilweise den dortigen Graphiken entnommen und entsprechen insofern nur näherungsweise den absoluten Werten, da keine zahlenmäßigen Angaben über Aktivitäten gemacht wurden. Die dort entnommenen Werte wurden auf µg/min \* mg umgerechnet.
- d.) Aus Bross *et al.*, 1993.

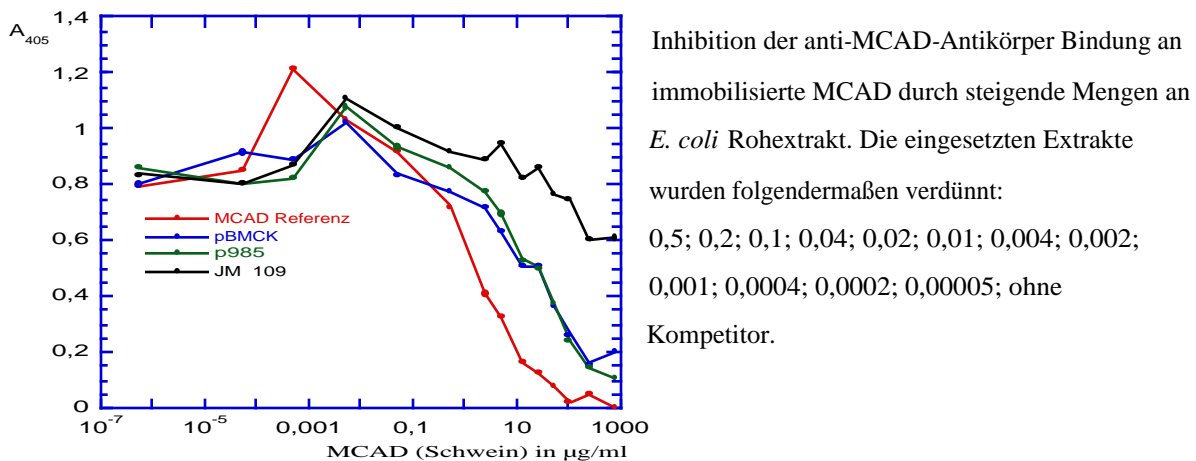
### 3.3 Quantifizierung von wt-MCADh und K<sup>304</sup> → E-MCADh im kompetitiven ELISA-Test

Eine grundlegende Voraussetzung zur Reinigung von Proteinen ist deren eindeutiger Nachweis sowie deren Quantifizierung. Zwar konnten wt- und K<sup>304</sup> → E-MCADh qualitativ in den Rohzellextrakten aus pBMCK<sup>2-</sup> und p985-41 transformierten Zellen nachgewiesen werden, eine quantitative Bestimmung und damit die eindeutige Zuordnung einer spezifischen biologischen Aktivität war jedoch in keinem der anfänglichen Experimente möglich.

Durch die Verwendung eines kompetitiven ELISA Assays wurde es möglich, eine quantitative Bestimmung humaner MCADh selbst bei sehr geringen Konzentrationen in völliger Abwesenheit einer messbaren biologischen Aktivität durchzuführen (Abb. 3-3). Die im Rohextrakt vorhandene Menge an MCADh wurde hierbei in verschiedenen

Verdünnungsstufen durch Bindung an anti-MCAD-Antikörper vorinkubiert und der gesamte Ansatz mit der verbleibenden Menge an anti-MCAD-Antikörpern auf MCAD-beschichtete ELISA Platten aufgetragen. Die Quantifizierung einer unbekannt Menge MCAD erfolgte durch photometrischen Vergleich und Extrapolation mit einer bekannten Menge an MCAD.

Abbildung 3-3 Inhibitions-ELISA zur Quantifizierung von MCAD



Interessanterweise ergaben sich für beide Enzymformen nahezu identische Mengen im Rohzelleextrakt. Für beide Formen konnte eine Konzentration von ca. 75 µg/ml bestimmt werden, was einem Anteil von ungefähr 3% der Gesamtproteinmenge des Rohextraktes entsprach. Die Quantifizierung von kreuzreagierenden Substraten konnte wie in Abb. 3-3 gezeigt durch eine Parallelbestimmung plasmiddefizienter Stämme ausgeschlossen werden. Vergleichbar hohe Konzentrationen von wt- und K<sup>304</sup>→E-MCADh sind hierbei insofern möglich, als daß durch die Verwendung polyklonalen Serums stets auch diverse Abbauprodukte detektiert werden, die sich als falsch positives Signal bemerkbar machen. Dies gilt natürlich in der gleichen Weise für hochmolekulare Enzym/Proteinaggregate.

Ein entscheidender Schluß bezüglich der Synthese der mutanten Form der humanen MCAD konnte jedoch bereits aus diesen Ergebnissen gezogen werden: ungeachtet vermeintlicher Instabilitäten oder erhöhter proteolytischer Suszeptibilitäten der mutanten Form K<sup>304</sup>→E konnten für beide Proteine identische Konzentrationen der beiden rekombinanten Proteine bestimmt werden. Damit konnte gezeigt werden, daß das Ausbleiben der enzymatischen Aktivität nicht zwangsweise mit einer verminderten Translationsrate oder

erhöhtem proteolytischen Abbau korrelieren muß, sondern verschiedene weiterreichende Ursachen haben kann.

### 3.4 Biochemische Charakterisierung von K<sup>304</sup> → E-MCADh

#### 3.4.1 Reinigung von MCADh aus *E. coli*

Einen zentralen Bestandteil dieser Arbeit stellte die Isolierung humaner Acyl-CoA Dehydrogenasen aus *E. coli* dar. Die Isolation der mittelkettenspezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase aus Mitochondrien der Schweineiere wurde erstmals 1956 von Crane und Mitarbeitern beschrieben [Crane *et al.*, 1956; Beinert, 1962]. Darüber hinaus wurden in den folgenden Jahren verschiedene Methoden zur Isolation unterschiedlicher Acyl-CoA Dehydrogenasen verschiedener Spezies beschrieben [Hall & Kamin, 1975; Hall *et al.*, 1976; Thorpe *et al.*, 1979; Ikeda *et al.*, 1983; Dommès & Kunau, 1984; Ikeda *et al.*, 1985]. Eine erste Reinigung humaner MCADh wurde 1987 von Finocchiaro und Mitarbeitern [1987] publiziert. Die Literatur wies bis 1997 jedoch keinerlei Referenzen über die Reinigung rekombinanter Acyl-CoA Dehydrogenasen aus *E. coli* aus.

Präparative Ansätze zur Isolation der MCADh aus *E. coli* erfolgten üblicherweise ausgehend von ca. 120 g *E. coli* -Zellmaterial (Feuchtgewicht). Die Präparation des Rohzellextraktes folgte dabei der unter Punkt 2.4.1 beschriebenen Vorgehensweise. Die Wahl des Aufschlußpuffers erfolgte hierbei vor allem nach folgenden Kriterien:

Entsprechend den innerhalb der bakteriellen Zelle vorherrschenden Bedingungen bezüglich Oxidationszustand, Ionenstärke, pH-Wert und Proteinkonzentrationen, sollten die Bedingungen für den Aufschluß möglichst denen des intrazellulären Milieus nahekommen. Daher wurde eine Ionenstärke von ca. 200 mM bei einem pH-Wert von 7,5 gewählt. Als reduzierendes Agens wurde dem Aufschlußpuffer 1 mM DTT beigefügt [Scopes, 1982].

Die Effizienz des Aufschlusses und der Ertrag löslicher MCADh konnte wesentlich durch zweimaliges Aufschließen mittels Ultraschall gesteigert werden. Es ergaben sich hierbei – abhängig von der Aufschlußdauer und Intensität– Steigerungswerte, die bis zu 55% der

Gesamtaktivität entsprachen. Beide Aufschlüsse wurden vereinigt und als Gesamtrohextrakt weiterverarbeitet. Die im Zellaufschluß üblicherweise ermittelten Aktivitäten ergaben Werte zwischen 1,3 und 2,6 U/mg Gesamtprotein. Bezogen auf den Substratumsatz des gereinigten Enzyms (sowohl wt als auch  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh) konnte hierbei ein Anteil zwischen 3% bis maximal 7-8% [Kieweg *et al.*, 1997] des Zielproteins im Rohextrakt ermittelt werden. Bezüglich der absoluten Mengen löslicher MCADh konnten im Rohextrakt nach Expression im pTrc Plasmidsystem bei 28° C Inkubationstemperatur keine signifikanten Mengenunterschiede zwischen wt- und mutanter MCADh festgestellt werden. Hier mußte jedoch im Verlauf der experimentellen Arbeit eine drastische Einschränkung gemacht werden. Wurde die MCADh direkt im Anschluß an die Aufzucht der Zellen präpariert, so waren die im Rohzelleextrakt durch Extrapolation berechneten Mengen an  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh durchaus mit denen des wt-Enzyms vergleichbar (Tabelle 3-1). Darauf folgende Präparationen aus derselben Charge zeigten jedoch drastische Mengeneinbußen, wenn die entsprechenden Zellpellets nach Einfrieren verarbeitet wurden.

Den ersten Reinigungsschritt stellte die fraktionierte Präzipitation mit AS dar. Hierbei wurde in einem ersten Schritt bis zu einem Sättigungsgrad von 30% As und der resultierende Überstand nach Zentrifugation zu 80% gefällt. Alle Fällungsschritte wurden generell auf Eis für die Dauer von minimal 2 h durchgeführt. Die daraus resultierenden Proteinpellets wurden anschließend in einem minimalen Volumen von 50 mM Tris/HCl pH 7,6 aufgenommen und entsalzt. Aus Zeitgründen und aufgrund der besseren Kontrollierbarkeit mittels parallel verlaufender konduktometrischer Bestimmung, erfolgte die Abtrennung von Ammoniumsulfat über Sephadex G-25 (Fine) Gelfiltration. (Das maximal applizierte Probenvolumen betrug hierbei 25% des Gesamtsäulenvolumens  $V_t$ ). Obgleich die bei diesem Schritt eluierbaren Mengen des aufgetragenen Gesamtproteins im Idealfall nahezu vollständig wiedergewonnen werden konnten, wurde bei der Mehrzahl der Versuche eine beträchtliche Einbuße bezüglich der Gesamtaktivität beobachtet. Nach spektrophotometrischer Analyse der im Gesamtsäulenvolumen ( $V_t$ ) eluierenden Flavinabsorption mußten daher zwei mögliche Ursachen in Betracht gezogen werden:

1. Einer durch die Überexpression von MCADh parallel verlaufenden Synthese von freiem FAD, welches bedingt durch die Verwendung entsprechenden Gelmaterials natürlicherweise im Gesamtsäulenvolumen eluiert, oder
2. einem signifikanten Verlust enzymgebundenen Flavins.

Da aufgrund des Reinheitsgrades zu Beginn der Reinigung keine eindeutige spektralphotometrische Quantifizierung von applizierter zu eluierender Flavinabsorption und

damit keine Zuordnung der Herkunft des im  $V_i$  eluierenden FADs vorgenommen werden konnte, mußte sich die Erklärung dieses Phänomens auf die qualitative Aussage beschränken. Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten, die in Tabelle 3-2 wiedergegeben sind, läßt jedoch den Schluß einer Interaktion des Gelmaterials mit dem Chromophor zu. Dies galt insbesondere der der Hydroxyl-Apatit Chromatographie vorausgehenden Entsalzung gegen Phosphat-Puffer geringer Ionenstärke (5 mM  $KP_1$ -Puffer). Darüber hinaus wurde über den Verlust enzymgebundenen FADs bereits von mehreren Arbeitsgruppen berichtet [Hall & Kamin, 1975; Thorpe *et al.*, 1979; Ikeda *et al.*, 1983]. Verschiedene Versuche der Entsalzung in Gegenwart von bis zu 5  $\mu$ M FAD im Elutionspuffer konnten diesen Verlust jedoch nicht kompensieren. Auf eine Zugabe von FAD wurde daher verzichtet. Ein weiterer Grund, der gegen den Einsatz von FAD im Elutionspuffer sprach, war die Bindung freien FADs an die funktionellen Gruppen der im ersten Reinigungsschritt verwendeten Anionenaustauschersäule.

Das zwischen 30 und 80% Ammoniumsulfatsättigung gefällte und vollständig entsalzte Eluat wurde im ersten chromatographischen Reinigungsschritt auf eine mit dem gleichen Puffer (50 mM Tris/Cl<sup>-</sup>, pH 7,6) voräquilibrierte Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose FF) aufgetragen. Für semipräparative Maßstäbe wurde Q-Sepharose FF durch Resource-Q 6ml ersetzt. Nach Probenapplikation wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit Startpuffer gewaschen, um nicht-adsorbierte Bestandteile quantitativ zu eluieren. Die Elution gebundener Proteine erfolgte dann durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten in 50 mM Tris/Cl<sup>-</sup> pH 7,6. Hierbei erwies sich, unabhängig von der Verwendung des Gelmaterials (Q-Sepharose-FF, Resource-Q, Mono-Q), ein acht Säulenvolumina umfassender Gradient von 0-350 mM NaCl als ausreichend und wirkungsvoll.  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh eluierte unter diesen Bedingungen stets bei einer NaCl-Konzentration entsprechend ca. 200 mM. Dieser Wert korrelierte mit einer Leitfähigkeit von 12,4 mS/cm, was nach vorausgegangener Kalibrierung einem Wert von 19,4% (100% Leitfähigkeit bezogen 1 M NaCl in 50 mM Tris pH 7,6 bei 6,5° C) entsprach. Analog zu den Ergebnissen diverser Entsalzungsschritte, mußte auch hierbei ein drastischer Verlust (enzymgebundenen) FADs in Kauf genommen werden. Wurde MCADh nach Probenapplikation stets als deutlich gelbe Proteinbande im oberen Drittel der Säule lokalisiert, so trennte sich diese Bande nach Anlegen des NaCl-Gradienten bereits bei niedrigen Salzkonzentrationen in zwei distinkte Banden auf. Die Elution der bei "niedrig Salz" eluierenden Bande erfolgte bereits bei einer NaCl-Konzentration von ca. 95 mM entsprechend einer Leitfähigkeit von 7,2 mS/cm. Obgleich die spektralen Eigenschaften denen des FAD glichen, konnte den entsprechenden Fraktionen keine Dehydrogenase-Aktivität zugeordnet werden.

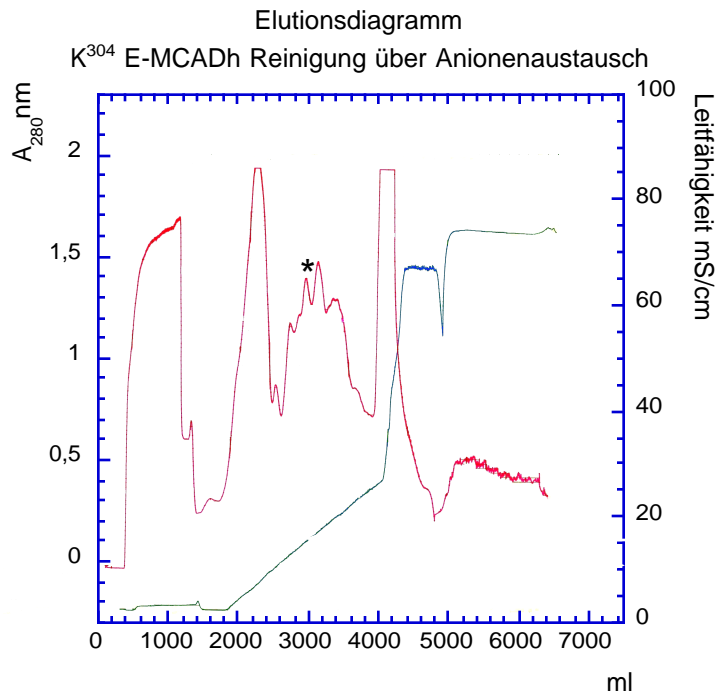


Abbildung 3-4

Elutionsdiagramm der K<sup>304</sup> → E-MCADh über Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose FF; XK 16/20). Der Gradient erfolgte über 8 Säulenvolumen von 0-350 mM NaCl. Der mit \* gekennzeichnete Peak markiert die Hauptfraktion der MCADh-Aktivität.

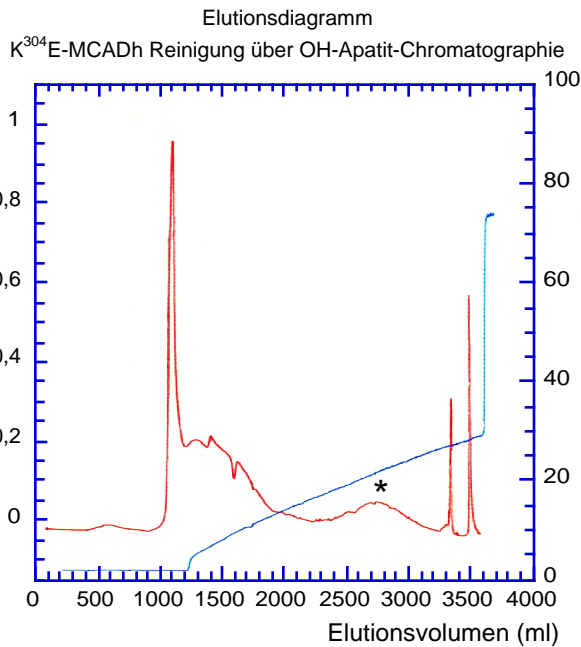


Abbildung 3-5

Elutionsdiagramm der  $K^{304} \rightarrow E$  MCADh Reinigung von OH-Apatit (Fluka Hydroxy Apatite Fast Flow). Säule XK 26/60 Pharmacia, Probenmenge: 533 mg in 5 mM KPi pH 6,8; Gradient 5–350 mM KPi in 1885 ml (10 CV). Der mit \* markierte Bereich entspricht der Hauptelutionsbande der  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh.

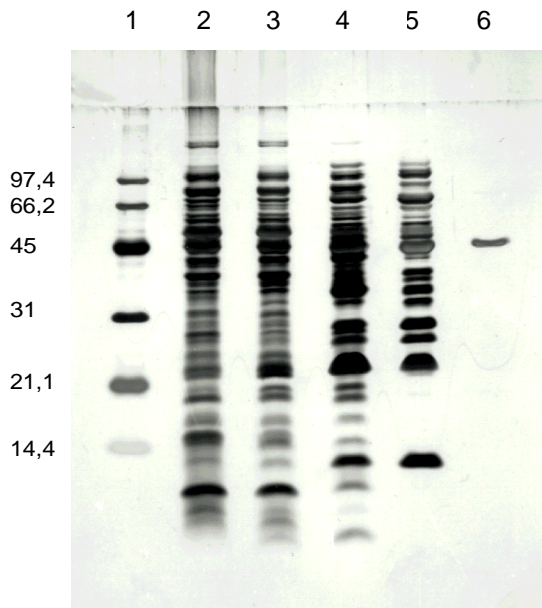


Abbildung 3-6 Elektrophoretischer Reinheitsnachweis der Trennung von  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh

- Spur 1: Eichstandard
- Spur 2: Zellaufschluß (2,5 µg Gesamtprotein)
- Spur 3: Proteinpellet nach 30-80% AS-Präzipitation (2,5 µg Gesamtprotein)
- Spur 4: Poolfraktion nach Anionenaustausch (2,5 µg Gesamtprotein)
- Spur 5: Poolfraktion nach Gelfiltration (2,5 µg Gesamtprotein)
- Spur 6: Gereinigtes Enzym nach OH-Apatit Chromatographie (0,5 µg Gesamtprotein)

(Silberfärbung nach Rabilloud *et al.*, 1988)

Der Nachweis und die Reinheit isolierter MCADh erfolgte üblicherweise durch elektrophoretische Trennung im Tricin-Gel.  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh sowie wt-MCADh zeigten im silbergefärbten Gel eine einzelne Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 45 kD (Abbildung 3-6).

Als Ausgangsmaterial, das für die Reinigung humaner Acyl-CoA-Dehydrogenasen verwendet wurde, erwiesen sich die in den pTrc-Plasmid Derivaten klonierten und in den *E. coli*-Stamm TG1 transformierten Kulturen als am effizientesten (Tabelle 2-1 und 2-2). Von entscheidender Bedeutung war die Wahl der Anzuchttemperatur, die sich auf die Stabilität und somit auf die Ausbeute an aktivem Enzym positiv auswirkte [Browner *et al.*, 1991; Ayoub, 1992; Nandy, Dissertation Konstanz]. Alle Kulturen wurden daher bei einer Wachstumstemperatur von 26–28° C angezogen und nach Induktion mit 0,5–1 mM IPTG für ca. 24 h induziert.

Tabelle 3-2 Reinigungstabelle der K<sup>304</sup> → E-MCADh aus *E. coli*

Schritt	Konzentration (mg/ml)	Volumen (ml)	Gesamt protein (mg)	Aktivität (U/mg; Ferricen)	Gesamt Units	Faktor	Ertrag (%)
Rohextrakt	20,8	430	8944	1,28 ± 0,09	11450	1	100
Ammoniumsulfat-sättigung (30-80%) vor Entsalzung	38,9	151	5874	2,83 ± 0,95	16620	2,2	145
Ammoniumsulfat-sättigung (30-80%) nach Entsalzung	20,1	280	5628	2,46 ± 0,25	13840	1,92	120,8
Anion exchange (Q-Seph.-FF) Pool Fraktion vor Entsalzung	16,6	47	733	8,34 ± 0,45	6110	6,5	53,3
Anion exchange (Q-Seph.-FF) Pool Fraktion nach Entsalzung	4,9	112	533	6,33 ± 0,33	3500	4,94	30,5
Hydroxyl Apatit Pool Fraktion; vor Entsalzung	5,6	6,9	38,6	28,3 ± 1,3	1092	22,1	9,5

Um eventuelle Aktivitätseinbußen so gering wie möglich zu halten, wurden alle Reinigungsschritte bei 4° C durchgeführt. Aufgrund der Instabilität des FAD gegenüber Lichtexposition wurde außerdem darauf geachtet, alle Reinigungsschritte durch Abdunkeln der Säulen mittels Aluminiumfolie durchzuführen.

### 3.4.2 Molekulargewichtsbestimmung nativer, humaner K<sup>304</sup> → E-MCADh

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen K<sup>304</sup> → E-MCADh erfolgte durch analytische Gelfiltration über Superdex 200 (HR 10/30). Für das assemblierte tetramere Enzym ergab sich hierbei ein apparentes MW von ca. 155 kD. Ein weiterer Hinweis auf die Molekulargewichte der Monomeren ergab sich aus der SDS-Polyacrylamid - Gelelektrophorese. Demnach konnte den einzelnen Untereinheiten ein apparentes MW von ca. 45 kD zugeordnet werden. Da für das native Monomer ein Wert von 44,47 kD errechnet werden kann (GeneWorks, IntelliGenetics), muß davon ausgegangen werden, daß die Monomere in ihrer natürlichen Größe vorlagen und somit keiner vorzeitigen Proteolyse unterlegen sind.

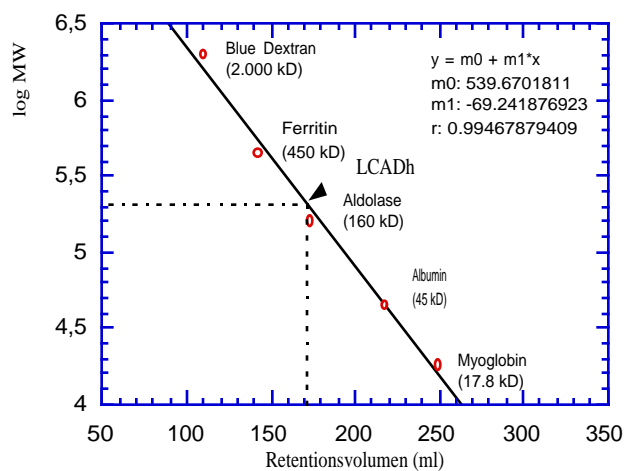


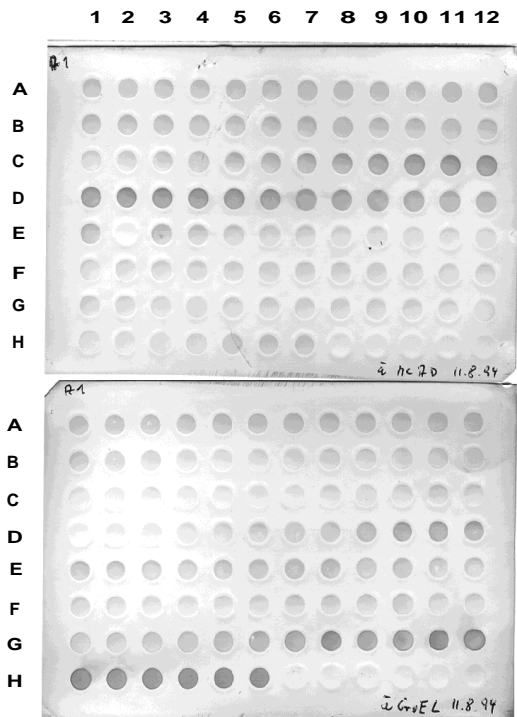
Abbildung 3-7 Eichgerade für Superdex 200 HR 10/30 in 150 mM KP<sub>i</sub> + 1 μM FAD pH 7.8 Aufgetragen wurden 100 μl einer Mischung aus Thyroglobulin (2mg/ml), Aldolase aus Kaninchenmuskel (2 mg/ml), Ovalbumin (5 mg/ml) und Myoglobin (2 mg/ml). Der Pfeil entspricht dem für LCAD-MCADh bestimmten Elutionsvolumen.

### 3.4.3 Charakterisierung hochmolekularer Aggregate – Assoziation mit GroEL

Eine unmittelbare Auswirkung des K<sup>304</sup> → E Aminosäureaustausches der humanen MCAD wurde mehrfach im Auftreten hochmolekularer "Aggregate" beobachtet [Yokota *et al.*, 1992b; Bross *et al.*, 1993]. Neben einer Aggregation unvollständig assemblierter Monomere bzw. Oligomere der varianten Form humaner MCADh wurde vor allem die Assoziation des Enzyms mit molekularen Chaperonen Hsp 70 und Hsp 60 diskutiert [Saijo *et al.*, 1994]. Ebenso konnte im prokaryotischen System die Beteiligung des zu Hsp 60 homologen Chaperons GroEL zumindest qualitativ nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger Inkubation der gegen MCAD (affinitätsgereinigt) sowie GroEL gerichteten Antikörper ergab die immunologische Entwicklung entsprechender Fraktionen aus dem ersten Reinigungsschritt ein für beide Proteine signifikantes und in den entsprechenden Fraktionen gleichzeitig nachweisbares Signal (Abb. 3-8). Aufgrund der Tatsache, daß beide Proteine bei Vorliegen des nativen Zustandes eindeutig durch Anionenaustauschchromatographie voneinander separierbar sind<sup>1</sup>, muß somit der Schluß auf eine Assoziation von K<sup>304</sup> → E-MCADh mit GroEL gezogen werden. Eine direkte Assoziation konnte im Verlauf der Anionenaustauschchromatographie nachgewiesen werden. So eluierte GroEL erst bei sehr hohen NaCl-Konzentrationen von ca. 800–900 mM, einer, für die Elution von MCADh stark überhöhten NaCl-Konzentration. Abbildung 3-9 (Spur 7) zeigt jedoch, daß zumindest ein gewisser Anteil an K<sup>304</sup> → E-MCADh erst bei derartig hohen NaCl-Konzentrationen in Gegenwart von GroEL eluiert.

---

<sup>1</sup> Die zur Elution der MCADh bzw. GroEL von den verwendeten Anionenaustauschmaterialien erforderlichen NaCl-Konzentrationen betragen ca. 200 mM bzw. 400 mM.

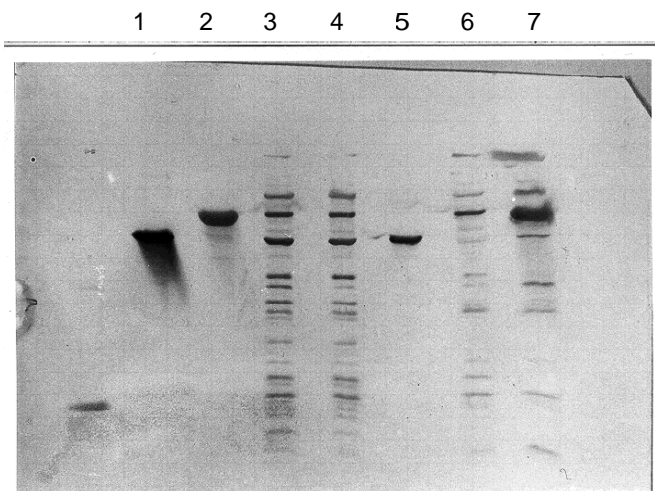


Die in den einzelnen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie zwischen ca. 500–1000 mM NaCl auf MCADh-Aktivität untersuchten Aliquots wiesen durchweg keine Aktivitäten auf. Dies deutet klar auf einen nicht-nativen Zustand des Enzyms hin.

Abbildung 3-8 Dot Blot einzelner Fraktionen der  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh nach Anionenaustauschchromatographie. Dargestellt ist die immunologische Entwicklung mit anti-MCADh-Antikörpern (oben) sowie mit anti-GroEL Antikörpern (unten).

Abbildung 3-9 Immunologischer Nachweis der Co-Elution von  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh und GroEL während AIEX.

- Spur 1: wt-MCAD
- Spur 2: GroEL
- Spur 3: Rohzellextrakt nach Aufschluß  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh
- Spur 4: Proteinpellet  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh nach 30-80% AS-Präzipitation
- Spur 5: Poolfraktion aktiver  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh nach Anionenaustauschchromatographie (Resource-Q; Gradientenfraktionen 6–91)
- Spur 6: Poolfraktion unmittelbar vor und nach Dehydrogenase-aktiver Fraktionen (Gradientenfraktionen 80–85 und 92–110)
- Spur 7: Haupt GroEL-Fraktion (Fraktion 105)



### 3.5 Katalytische Eigenschaften der $K^{304} \rightarrow E$ -Acyl-CoA Dehydrogenase

#### 3.5.1 Substratspezifität und katalytische Effizienz $V_{\max}/K_m$

Ein Vergleich der Kettenlängenspezifitäten von wt-MCADh und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCAD zeigt für beide Enzyme ein breites Substratspektrum (Abb. 3-10). Im Vergleich mit früheren Ergebnissen aus verschiedenen tierischen Organen, ergibt sich für wt-MCADh allerdings eine sehr viel stärkere Präferenz für längererkettige Substrate mit einer Kettenlänge zwischen  $C_{10}$  –  $C_{16}$ . Ebenso ist die mutante Form  $K^{304} \rightarrow E$  über den bestimmten Kettenlängenbereich katalytisch aktiv. Auffallend ist hierbei jedoch der reduzierte Substratumsatz mit Decanoyl-CoA ( $C_{10}$ -CoA) sowie ein weiteres Maximum für Dodecanoyl-CoA ( $C_{12}$ -CoA).

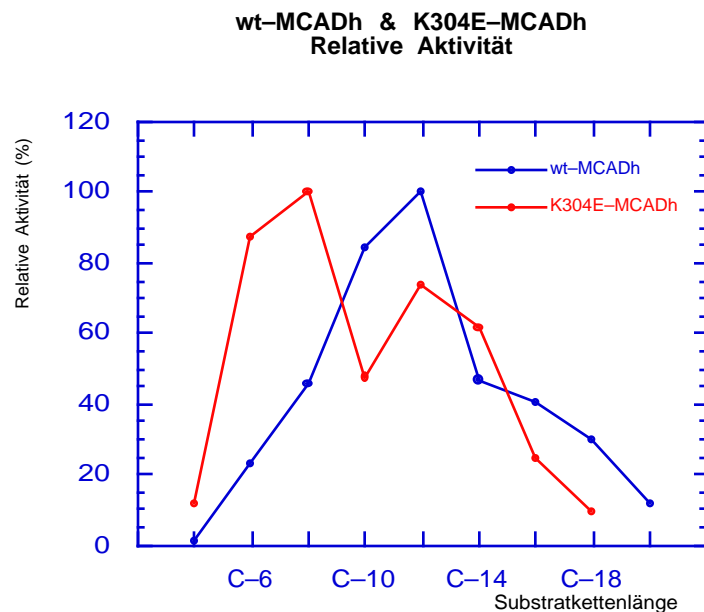


Abbildung 3-10 Substratkettenspezifität humaner wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCAD.  
(Alle Aktivitätsbestimmungen wurden mittels Ferricenium Assay durchgeführt (Lehmann *et al.*, 1990b))

Die Bestimmung der katalytischen Effizienz ( $V_{\max}/K_m$ ) weist jedoch der mutanten Form eindeutig Langkettencharakter zu. Hierbei unterscheiden sich beide Enzyme markant

voneinander (Abb. 3-11). Während beide Formen mit Substraten gleicher Kettenlänge enzymatisch aktiv sind, zeigt  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh die höchste Effizienz im Umsatz von  $C_{12}$ -CoA und weist sich somit als präferentiell länger-kettige Substrate bevorzugend aus. Zusätzliche Hinweise hierauf ergeben sich auch aus Beobachtungen durch Bleichungsexperimente mit langkettigen Substraten (Abb. 3-14). Ebenso ergibt sich bedingt durch einen um die Hälfte kleineren  $K_m$ -Wert für den Umsatz von Hexanoyl-CoA ( $C_6$ -CoA) ein höherer  $V_{max}/K_m$ -Wert.

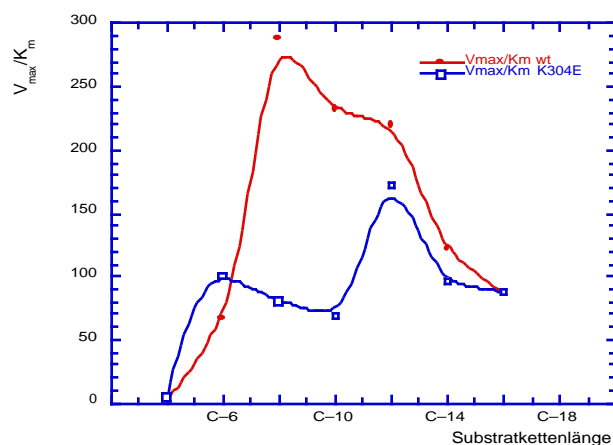


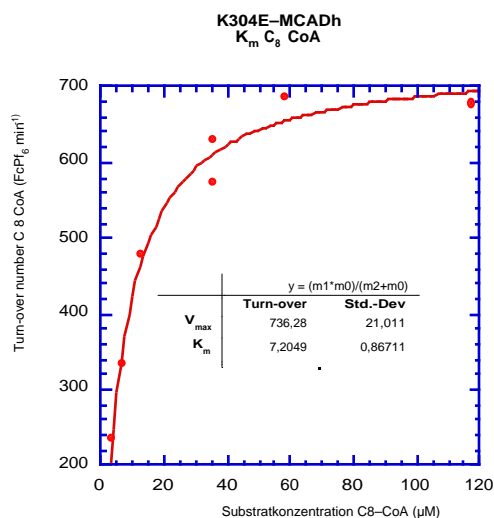
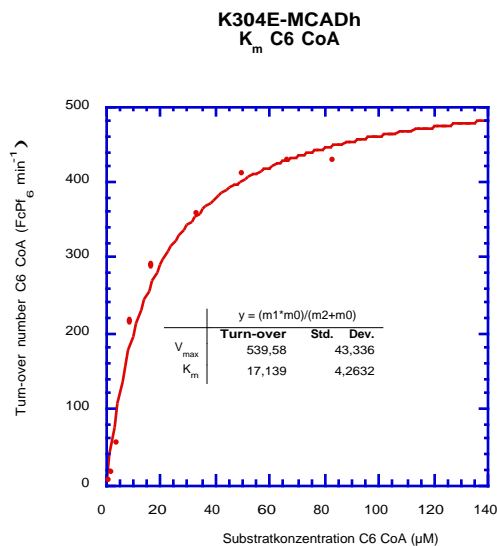
Abbildung 3-11 Kettenlängenabhängigkeit von  $V_{max}/K_m$  für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh. Die Bestimmung der  $K_m$  bzw.  $V_{max}$ -Werte erfolgte ausschließlich mittels Ferricenium Assay.

### 3.5.2 Michaelis-Menten Kinetik; $K_m$ -Werte

Entgegen vorangegangener Bemühungen konnte mit der vorliegenden Arbeit erstmals eine Aktivität für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh nachgewiesen und ermittelt werden.

Die für die  $K_m$ -Bestimmung der  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh eingesetzten Konzentrationen der verschiedenen CoA-Ester unterschiedlicher Kettenlänge lagen generell im Bereich zwischen 1 und ca. 120  $\mu$ M. Alle kinetischen Messungen wurden nach vorausgegangener Zentrifugation der Enzymlösung in Centricon-30 Ultrafiltrationsgefäßen durchgeführt, um eventuell vorhandenes, freies FAD als Fehlerquelle der spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung des einzusetzenden Enzyms auszuschließen.

$K^{304} \rightarrow E$ -MCADh katalysiert die Oxidation von Acyl-CoA-Substraten mit einer Kettenlänge zwischen  $C_4$  und  $C_{18}$ . In Abhängigkeit der Substratkettenlänge erreichten die hierbei ermittelten maximalen Substratumsatzraten diejenige des wt nur zu ca. 60–80%, während für längererkettige Acylsubstrate zum Teil höhere  $V_{\max}$ -Werte bestimmt werden konnten (Tabelle 3-3). Obwohl die maximalen Umsatzraten der  $K^{304} \rightarrow E$ -Mutante teilweise mit dem wt identisch, teilweise sogar höher bestimmt werden konnten, unterschieden sich die  $K_m$ -Werte beider Spezies jedoch markant voneinander. Für die katalytische Effizienz  $V_{\max}/K_m$  ergab sich dadurch für beide Enzyme ein unterschiedliches Muster. Während wt-MCADh ein deutliches Maximum im Umsatz von  $C_8$ -CoA aufweist, entspricht  $C_{12}$ -CoA dem bevorzugten Substrat der  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh. Auffallend hierbei ist die offenbar geringste katalytische Effizienz der  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh mit Substraten der Kettenlänge  $C_8$  und  $C_{10}$ . Allerdings gelten diese Aussagen lediglich für den artifiziellen Elektronenakzeptor Ferriceniumhexafluorophosphat.



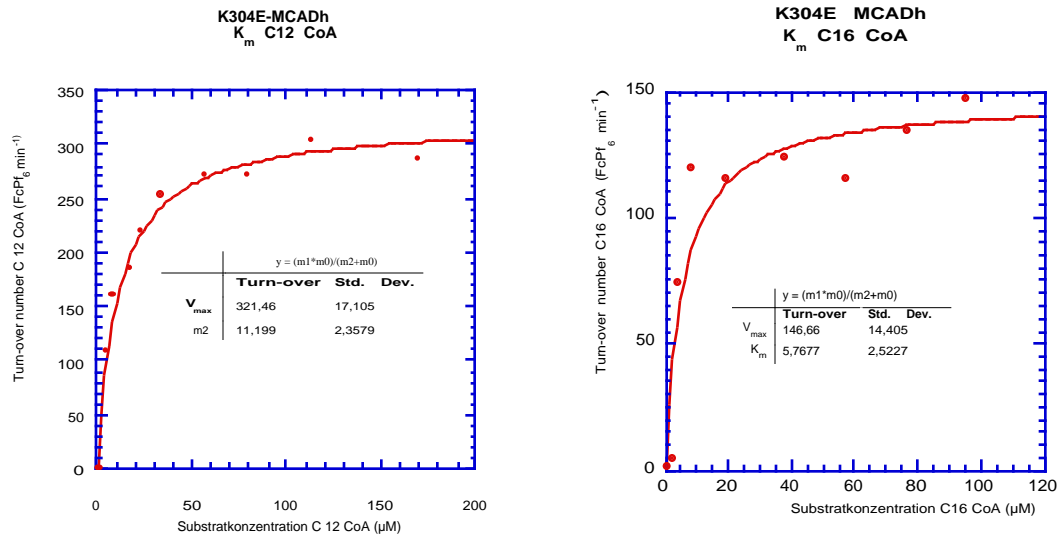


Abbildung 3-12 Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten  $K_m$  und  $V_{max}$  für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh in Abhängigkeit der Substratkettenlänge.  
Alle  $K_m$  und  $V_{max}$ -Werte wurden bei fixen Enzymkonzentrationen mit dem Ferricenium-Standard-Aktivitätstest nach Lehman durchgeführt.

Tabelle 3-3 Physikalische Eigenschaften der humanen wt- und K<sup>304</sup>→E-MCADh; Vergleich mit MCAD aus Schweineniere. Alle Messungen erfolgten bei 25° C in 50 mM KPi-Puffer pH 7,6. (z. Teil übernommen aus Kieweg *et al.*, 1997)

Enzyme	Substrat	ETF	ETF / DCPIP	Elektronen Acceptoren					
				PMS / DCPIP			Ferricenium		
		V <sub>max</sub> (min <sup>-1</sup> )	V (min <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (min <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (min <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (min <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (min <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> )
<b>humane wt-MCADH</b>	<b>C4-CoA</b>	-	100 (104 μM) 340 (700 μM)	130	173 ± 60	0,75	500	175	3
	<b>C6-CoA</b>	-	330 (104 μM)	100	0,7 ± 0,3	145	1010	15	67
	<b>C8-CoA</b>	1500 (60 μM)	350 (104 μM)	150	< 1	> 150	1200	3,4	353
	<b>C10-CoA</b>		260 (100 μM)				580	2,5	232
	<b>C12-CoA</b>		280 (100 μM)				550	2,5	220
	<b>C14-CoA</b>		165 (100 μM)				280	2,3	122
	<b>C16-CoA</b>		130 (100 μM)				140	2,4	58
<b>K304E-MCADH</b>	<b>C4-CoA</b>	n.d.						260 ± 60	
	<b>C6-CoA</b>	n.d.					540	18 ± 4	30
	<b>C8-CoA</b>	580 (60 μM)					730	6,9 ± 0,7	105
	<b>C12-CoA</b>	n.d.					321	11,2 ± 2,3	28,6
	<b>C16-CoA</b>	n.d.					146	5,7 ± 2,5	25,6
<b>pig kidney MCADH</b>	<b>C4-CoA</b>		100 (104 μM) 300 (700 μM)	75	50	1,5	380 (750 μM)	90	4
	<b>C6-CoA</b>		240 (104 μM)	130	≈ 1	≈ 130	1250 (70 μM)	9	140
	<b>C8-CoA</b>	400 ± 50 (Diss Engst)	300 (104 μM)	180	< 1	> 150	1100 (85 μM)	3,5	315

### 3.5.3 Spektrale Eigenschaften; Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon$ für $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh und Reaktion mit Substraten verschiedener Kettenlänge

$K^{304} \rightarrow E$ -MCADh weist das typische Spektrum der Acyl-CoA Dehydrogenasen mit Maxima bei 275 nm, 371 nm und 444 nm auf. Das Verhältnis der einzelnen Maxima zueinander wurde mit  $A_{275} : A_{371} : A_{444}$  7,8 / 0,76 / 1 bestimmt (Tabelle 3-4). Eine mögliche Ursache für das relativ hohe Verhältnis von 275 nm/444 nm kann im mehrfach dokumentierten Verlust von enzymgebundenen Flavin liegen.

Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh und wt-LCADh wurde in Anlehnung an die von Thorpe beschriebene Methode bestimmt [Thorpe *et al.*, 1979]. Als denaturierendes Agens wurde jedoch, im Gegensatz zur dort beschriebenen Methode, SDS in einer Endkonzentration von 1% eingesetzt. Die Berechnung freigesetzten Flavins basierte auf dem für freies FAD berechneten molaren Absorptionskoeffizienten von  $\epsilon_{450} = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [Warburg & Christian, 1938b; Whitby, 1953] nach vollständiger Freisetzung des enzymgebundenen Chromophors (Abb. 3-13). Hierbei wurde für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh ein  $\epsilon_{450}$ -Wert von  $15,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ermittelt.

Abbildung 3-13  
Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten der  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh.  
Die Messung erfolgte in 20 mM NaP<sub>i</sub> pH 7,6 bei 25° C.  
Die Abbildung zeigt das Spektrum nach Konstanz der Flavinabsorption.

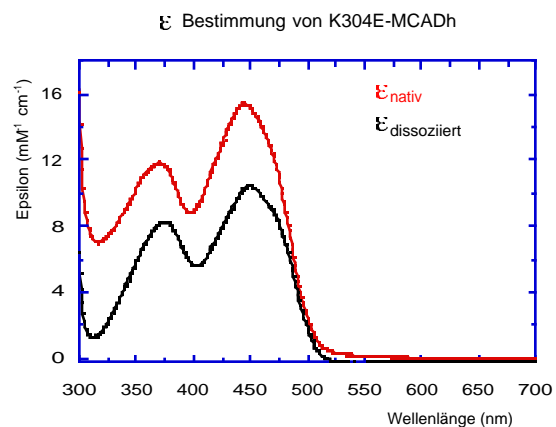


Tabelle 3-4 Spektrale und physikochemische Eigenschaften verschiedener MCADs.

MCADH, Quelle	human wt	human K304E Mutante	Schweineniere <sup>d</sup>
$E_{ox}, \lambda_{max}$	272 / 373 / 444	275 / 371 / 444	272 / 373 / 446 <sup>d</sup>
$\epsilon_{272}/\epsilon_{448}$ ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	81 / 14,9	105 / 15,4	76 / 15,4 <sup>e</sup>
$E_{OX}, \epsilon$ ratios	6,1 / 0,6 / 1,0	7,8 / 0,76 / 1	5,7 / 0,65 / 1,0 <sup>d</sup>
$E_{red}, \epsilon_{448}$ ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	2,5 <sup>f</sup>	3,0 <sup>f</sup>	3,2 <sup>d</sup>
Bleaching $C_4/C_8/C_{16}$	73 / 85 / 49	74 / 80 / 70 <sup>f</sup>	70 / 79 / 37 <sup>d</sup>
Redox potential (mV)	-114 <sup>a</sup>	-115 <sup>b</sup>	-145 <sup>e</sup>

a,b.) Mancini-Samuelson *et al.*, 1996

c.) Johnson *et al.*, 1995

d.) Thorpe, 1979

e.) Lau, 1986

f.) Kieweg *et al.*, 1997

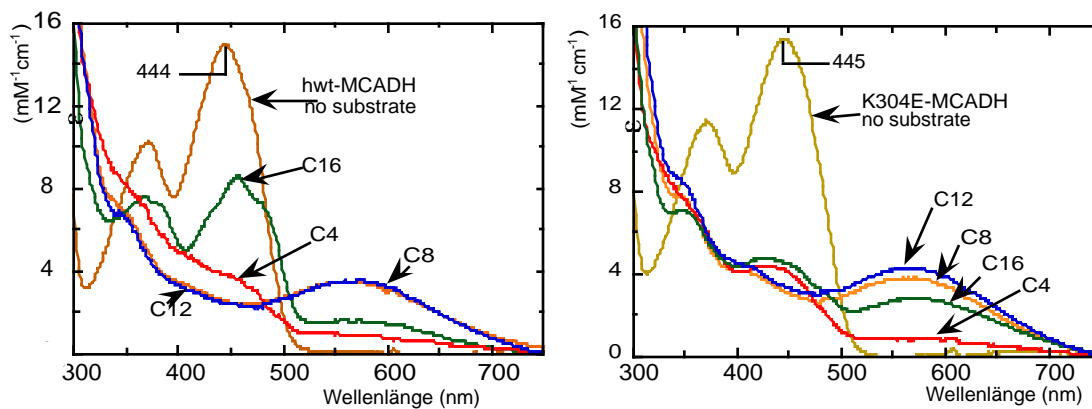


Abbildung 3-14 Absorptionsspektren von wt-MCADh und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh nach Reaktion mit Substraten unterschiedlicher Kettenlänge [aus Kieweg *et al.*, 1997].

wt-MCADh: 18  $\mu\text{M}$  Enzym in 100 mM  $\text{KP}_i$  pH 8,0; 25° C

Reaktion mit  $C_4$  (2,4 eq),  $C_8$  (29 eq),  $C_{12}$  (5 eq),  $C_{16}$  (16 eq)

$K^{304} \rightarrow E$ -MCADh: 12  $\mu\text{M}$  in 100 mM  $\text{KP}_i$  pH 7,6; 25° C

Reaktion mit  $C_4$  (5 eq),  $C_8$  (30 eq),  $C_{12}$  (5eq),  $C_{16}$  (15eq)

Abbildung 3-14 zeigt die Spektren der reduzierten und produktkomplexierten Enzyme. Sowohl wt- als auch  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh weisen in Abhängigkeit der Substanzkettenlänge das typische Spektrum des charge transfer-Komplexes mit Absorptionsmaxima um 560 nm auf.

Dabei ergaben sich für kurzkettige Substrate ( $C_4$ – $C_8$ ) bei beiden Enzymen nahezu identische Veränderungen der spektralen Eigenschaften. Das Ausbleichen der Flavinoxidation  $A_{448}$  nach Zugabe von Butyryl-CoA erfolgte zu jeweils 73 % für wt-MCADh bzw. 74% für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh. Etwas deutlichere Unterschiede zeigten sich in der Abnahme der  $A_{448}$  nach Addition von Octanoyl-CoA, dessen Bleichungseffekte mit 85% für den wt, jedoch nur 80% für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh bestimmt wurden. Wie sich bereits aus der  $V_{max}/K_m$ -Auftragung ergab, zeigten sich die markantesten Unterschiede in der Oxidation langkettiger Substrate. So zeigte sich auch hierbei eine wesentlich stärker ausgeprägte CT-Bande für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh nach Addition von  $C_{12}$  bzw.  $C_{16}$ -CoA. Die jeweiligen  $\epsilon_{567}$ -Werte wurden mit  $4,23 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für  $C_{12}$  respektive  $2,74 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für  $C_{16}$  bestimmt, während wt-MCADh lediglich Werte von  $3,46 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bzw.  $1,66 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  aufwies. Damit zeichnete sich ähnlich wie für die katalytische Effizienz, eine möglicherweise festere Bindung langkettiger Substrate an  $K^{304} \rightarrow E$  ab.

### 3.5.4 Titrationskurvenanalyse: pI-Bestimmung und analytischer Nachweis der Konformationsvariabilität

wt-MCADh und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh wurden zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) und der bestehenden Möglichkeit einer ladungsinduzierten Modifikation der Tertiär- und Quartärstruktur einer Titrationskurvenanalyse unterzogen [Rosengreen *et al.*, 1977; Righetti *et al.*, 1978]. Rechtwinklig zur IEF im pH-Intervall von 3–9, wurde in der zweiten Dimension entlang der Iso-pH Linien die Elektrophorese durchgeführt. Bei Auftragung beider Enzyme in ihrer vollständig gefalteten, nativen Konformation, ergab sich unter Einhaltung identischer Laufparameter für beide Enzyme ein isoelektrischer Punkt von 4,9. Damit konnten die von Finocchiaro und Mitarbeitern [1987] sowie von Frerman [1980] und Ikeda [1985] bestimmten pI-Werte von 4,9 bzw. 4,4 bestätigt werden. Außerdem wiesen beide Enzyme im angegebenen pH-Intervall die gleichen elektrophoretischen Mobilitäten sowohl in Richtung auf die Kathoden-, als auch auf die Anodenseite auf, was sich bei Überlagerung beider Kurven bzw. bei gleichzeitiger Applikation beider Enzyme identischer Konzentration in einem nach Form und Migrationsdistanz deckungsgleichen sigmoidalen Kurvenverlauf äußerte (Abb. 3-15).

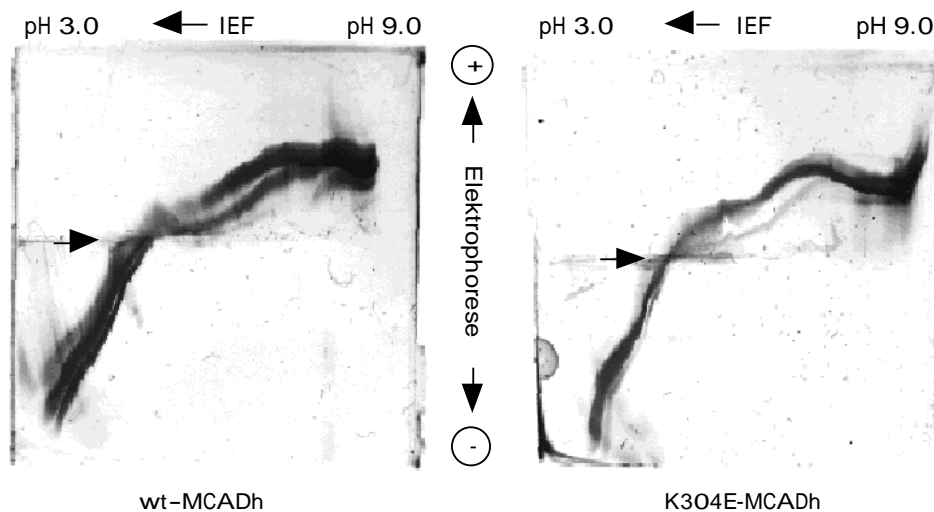


Abbildung 3-15 Titrationskurvenanalyse von wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh im pH Intervall von 3–9. (Pharmacia PhastGel IEF 3–9; Die Färbung erfolgte nach der in Kapitel 2.7.3 beschriebenen Methode)

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß der Ladungswechsel beim Austausch  $K^{304} \rightarrow E$  zumindest keine meßbaren Konformationsunterschiede bewirkt, die sich durch eine Parallelverschiebung beider Kurven aufgrund der Differenz zweier Nettoladungen zumindest für die Untereinheit abzeichnen würde [Righetti *et al.*, 1978; 1980]. Aufgrund des Unvermögens, die in "subunit-contacts" involvierten Aminosäuren zu titrieren, kann hieraus geschlossen werden, daß beide Enzyme durch korrekte Oligomerisierung der einzelnen Untereinheiten zum Tetramer assembliert sind. Selbstverständlich kann sich diese Aussage lediglich auf das im nativen Zustand vorliegende Tetramer und nicht auf die Mechanismen, die zu dessen Bildung führen, beziehen. Ein Konformationsunterschied, der sich somit aus einer Verschiebung der Kurven abzeichnen würde, scheint somit nicht gegeben.

Die theoretische Bestimmung der isoelektrischen Punkte weist beiden Proteinen deutlich höhere pI-Werte zu, wobei sich der Aminosäureaustausch von Lys nach Glu durch einen sichtlich acideren pI-Wert für  $K^{304} \rightarrow E$  bemerkbar machen würde (Abb. 3-17)<sup>2</sup>. Die Tatsache, daß sich diese Differenz nicht in Form eines modifizierten Laufverhaltens ausdrückt, spricht zusätzlich für das Vorhandensein identischer Konformationen.

<sup>2</sup> Die Berechnung erfolgte unter der Annahme des Fehlens jeglicher Modifikationen von N-Terminus, C-Terminus oder Seitenketten.

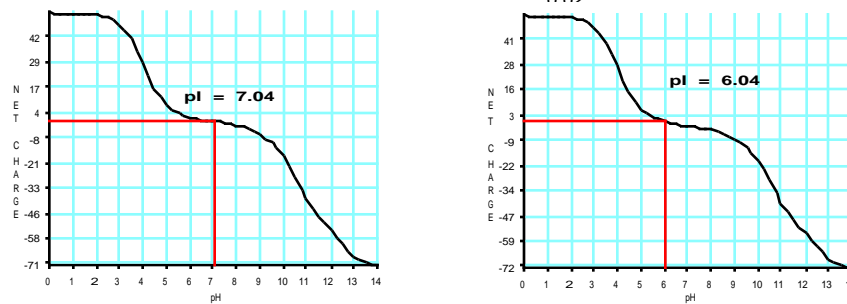


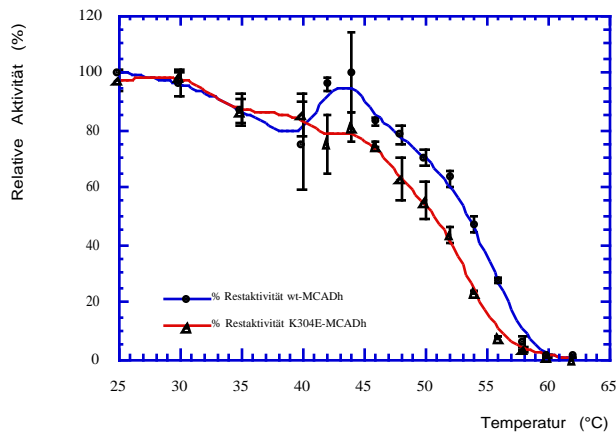
Abbildung 3-16 Theoretische Bestimmung des isoelektrischen Punktes von wt-MCADh (pI 7,04) und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh (pI 6,04) (GeneWorks® 2.4, IntelliGenetics)

### 3.6 Temperatur/Temperaturstabilität

Die thermische Inaktivierung von wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh wurde durch 15-minütige Inkubation der gereinigten Enzyme gleicher Konzentrationen (bezogen auf die Flavinoxidation) bestimmt. Die verbleibenden spezifischen Aktivitäten wurden durch einen Ferricenium Assay bei konstanten Substratkonzentrationen von  $100 \mu\text{M C}_8\text{-CoA}$  errechnet.

Wie der Abb. 3-17 zu entnehmen ist, ergaben sich hierbei zwei deutlich voneinander unterscheidbare Stabilitätsbereiche. Innerhalb eines Temperaturintervalls zwischen  $25^\circ\text{C}$  und ca.  $40^\circ\text{C}$ , erwiesen sich beide Enzyme bezüglich ihrer thermischen Stabilität als identisch. Unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen betrug die Abweichung der verbleibenden Enzymaktivitäten von der auf  $25^\circ\text{C}$  normierten Bezugstemperatur für beide Enzyme lediglich ca. 10%. Mit Überschreiten einer kritischen Inkubationstemperatur oberhalb von  $40\text{--}45^\circ\text{C}$  setzte für beide Enzyme gleichermaßen der Übergang zur thermischen Inaktivierung ein. Hierbei unterschied sich das mutante  $K^{304} \rightarrow E$ -Protein jedoch deutlich von dem des wt. Während  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh eine um 50% reduzierte Enzymaktivität bei einer Inkubationstemperatur von ca.  $51^\circ\text{C}$  erreichte, betrug diese für das wt-Enzym etwa  $53,5^\circ\text{C}$ . Damit konnten die von Bross und Mitarbeitern ermittelten Temperaturstabilitätswerte für wt- und Mutante in Rohzellextrakten aus *E. coli* bestätigt werden [Bross *et al.*, 1995]. Typisch für beide Enzyme war jedoch das Einsetzen der Inaktivierungsphase bei identischen Temperaturen, sowie der gleiche, wenn auch zu geringfügig niedrigeren Temperaturen – im Falle der  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh– verschobene Kurvenverlauf. In keinem Falle konnte jedoch eine Unterscheidung innerhalb physiologisch relevanter Temperaturbereiche getroffen werden.

Abbildung 3-17



Temperaturstabilitätsprofil von wt-MCADh und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh.

Gezeigt sind die verbleibenden prozentualen Enzymaktivitäten (bezogen auf die Anfangsaktivität) nach 15-minütiger Inkubation der gereinigten Enzyme bei den angegebenen Temperaturen. Die Flavinabsorption beider Testansätze betrug jeweils 0,19.

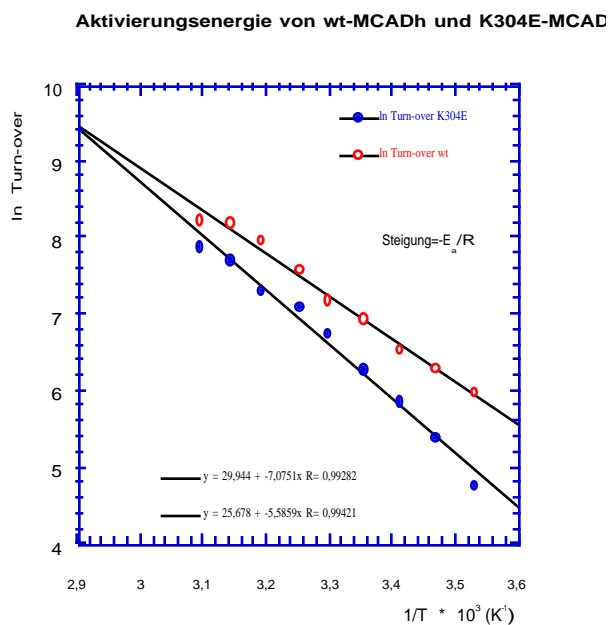
### 3.6.1 Bestimmung der Aktivierungsenergie $E_a$ von wt- und $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh

Als weiteres Kriterium zur Analyse der Stabilität von wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh diente die Bestimmung der Aktivierungsenergie des Übergangszustandes nach Arrhenius. Hierzu wurde die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Katalyse von wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh in einem Temperaturbereich zwischen 10° C und 62° C bestimmt. Wie in Abbildung 3-18 gezeigt, folgte die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit in einem Temperaturintervall zwischen 10 bis ca. 45–50° C einer linearen Beziehung. Die Aktivierungsenergien beider Enzyme wiesen jedoch lediglich eine, mit zunehmender Temperatur ansteigende, lineare Beziehung auf, ohne daß sich hierbei zusätzliche Steigungswerte in Abhängigkeit der Temperatur ergeben hätten. Einer thermodynamisch bedingten Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb dieses Temperaturbereiches folgte die thermische Inaktivierung durch einen abrupten Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit oberhalb dieser Temperatur. Beide Enzyme zeigten somit dasselbe apparente Temperaturoptimum. Dennoch ergaben sich für den angegebenen Temperaturbereich verschiedene Steigungswerte bei der Auftragung nach Arrhenius und daraus resultierend unterschiedliche Aktivierungsenergien. Der Temperaturkoeffizient ( $Q_{10}$ ) für wt-MCADh berechnete sich hieraus mit 1,9, derjenige für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh wurde mit 2,42 bestimmt. Für wt-MCADh wurde hierbei eine Aktivierungsenergie  $E_a$  von 46,4 kJ mol<sup>-1</sup> berechnet, während  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh mit 58,6 kJ mol<sup>-1</sup> einen deutlich höheren Wert aufwies. Aufgrund der für beide Enzyme beobachteten

unterschiedlichen *Single slopes* können hierbei möglicherweise unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten einzelner Reaktionsschritte, Wärmekapazitätswerte oder thermisch induzierte Konformationsänderungen für die beiden Enzyme verantwortlich gemacht werden.

Innerhalb dieses Temperaturintervalls konnte jedoch für beide Enzyme eine lineare Beziehung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur ermittelt werden.

Hieraus wurde für beide Enzyme die apparente Aktivierungsenergie  $E_a$  nach Arrhenius folgendermaßen berechnet:



$$-E_a = \frac{\Delta \ln V}{\Delta (1/T)} \times R$$

$E_a$  = Aktivierungsenergie (kJ mol<sup>-1</sup>)

R = Gaskonstante (8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

T = absolute Temperatur (Kelvin)

V = Turn-over Zahl (min<sup>-1</sup>)

Abbildung 3-18 Arrhenius-Auftragung zur Ermittlung der apparenten Aktivierungsenergie von wt- und K<sup>304</sup> → E-MCADh. Aufgetragen ist die Reaktionsgeschwindigkeit der MCADh-vermittelten Katalyse von Octanoyl Coenzym A zu trans- $\Delta^2$ -Octenoyl CoA in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur. ○ wt-MCADh, ● K<sup>304</sup> → E-MCADh. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden unter sättigenden Substratkonzentrationen bestimmt.

### 3.6.2 Tryptische Fragmentierung von wt- und K<sup>304</sup> → E-MCADh

Als ein wesentliches Kriterium, das zunächst in einen kausalen Zusammenhang mit verminderten Aktivitäten und Konzentrationen der varianten Form K<sup>304</sup> → E-MCADh in verschiedenen Zellsystemen gebracht wurde, galt die erhöhte proteolytische Abbaubarkeit [Whelan *et al.*, 1993; Bross *et al.*, 1991; Coates *et al.*, 1992b]. Die Suszeptibilität der nativen Konformationen von wt sowie K<sup>304</sup> → E-MCADh gegenüber proteolytischen Enzymen wurde daher als Hinweis der Stabilitäten der entsprechenden Konformationen *in vivo* gewertet. Die Proteaseresistenz, bzw. die relative Integrität eines Proteins gegenüber proteolytischem Abbau, kann durch das Vorliegen des Proteins in seiner nativen, vollständig assemblierten Form betrachtet werden. Native Proteine zeigen in der Regel eine gegenüber der entfalteten Konformation erhöhte Proteaseresistenz.

Wt- und K<sup>304</sup> → E-MCADh wurden daher als gereinigte Proteine in ihrer nativen, tetrameren Form tryptisch verdaut (Kapitel 2.4.11). Parallel dazu diente ein zweiter Ansatz gleicher Enzym/Protease-Verhältnisse, dem SDS zugefügt wurde, als Kontrolle der entfalteten Konformationen. Trypsin wurde aufgrund der Häufigkeit entsprechender Schnittstellen beider Dehydrogenasen sowie seines natürlichen Vorkommens im eukaryontischen Organismus verwendet. Während wt-MCADh 50 Schnittstellen aufweist, besitzt K<sup>304</sup> → E-MCADh durch den Lys → Glu Austausch eine Schnittstelle weniger.



Abbildung 3-19

Western-Blot nach 2,5 stündigem, tryptischen Verdau (37° C) gereinigter wt-MCADh und K<sup>304</sup> → E-MCADh aus *E. coli*. Die immunologische Entwicklung erfolgte mit affinitätschromatographisch gereinigten Antikörpern gegen Schweinenieren-MCAD.

Spur 1: Referenz, wt-MCADh unverdaut (0,75 µg Gesamtprotein)

Spur 2: Referenz, K<sup>304</sup> → E-MCADh unverdaut (0,75 µg Gesamtprotein)

Spur 3: wt-MCADh tryptisch verdaut (0,75 µg Gesamtprotein)

Spur 4: K<sup>304</sup> → E-MCADh tryptisch verdaut (0,75 µg Gesamtprotein)

Spur 5: wt-MCADh tryptisch verdaut in Anwesenheit von 0,05% SDS (0,75 µg Gesamtprotein)

Spur 6: K<sup>304</sup> → E-MCADh tryptisch verdaut in Anwesenheit von 0,05% SDS (0,75 µg Gesamtprotein)

Abbildung 3-19 zeigt das Ergebnis der proteolytischen Spaltung beider Enzyme nach elektrophoretischer Trennung und Western-Blotting. Bei Auftragung gleicher Enzymmengen (bezogen auf die Flavinabsorption) in Abwesenheit von Trypsin zeigte sich für die Mutante  $K^{304} \rightarrow E$  der humanen MCAD ein deutlich ausgeprägteres Abbaumuster als für den wt. Neben der Hauptbande um ca. 44 kD, die dem Molekulargewicht des Monomers zuzuordnen ist, wies die  $K^{304} \rightarrow E$ -Mutante ein an Intensität und Anzahl der apparenten Abbaubanden deutlich komplexeres Muster auf. Demgegenüber verhielten sich bei Inkubation in Anwesenheit von Trypsin beide Enzyme gleich. Für keines der beiden nativen Enzyme konnte nach Immunodekoration mit affinitätsgereinigten anti-Schweineniere-MCAD-Antikörpern ein signifikanter tryptischer Abbau nachgewiesen werden. Vergleicht man die Intensitäten der Hauptbanden der Ansätze mit und ohne Trypsin, die unter identischen Bedingungen inkubiert wurden, so kann davon ausgegangen werden, daß möglicherweise das Vorhandensein verunreinigender Abbaubanden im  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh Testansatz zu einem ausgeprägteren Abbaumuster führten. Wäre das Auftreten vermehrter Abbaubanden der  $K^{304} \rightarrow E$ -Mutante alleine auf thermische Labilität (die Inkubation erfolgte für alle Ansätze bei 37° C) zurückzuführen, so sollte sich sowohl im nicht-verdauten, als auch im tryptisch verdauten Ansatz zumindest ein Intensitätsverlust der Monomerbande bemerkbar machen. (Aufgrund der Anwesenheit von Trypsin im Verdauungsansatz, können hier möglicherweise keine Abbaubanden detektiert werden, da diese gegebenenfalls vollständig abgebaut werden. Insofern muß ein Trypsin-enthaltender Ansatz keine Abbaubanden aufweisen, die auf thermische Labilität zurückzuführen sind) Ein Vergleich der Daten aus Abb. 3-18 zur Temperaturstabilität unterstützt diese Annahme, da im physiologischen Bereich um 37° C hier lediglich marginale Stabilitätsunterschiede festzustellen waren. Ähnliche Ergebnisse zur Stabilität konnten von Bross und Mitarbeitern bestätigt werden [Bross *et al.*, 1995].

Im zweiten Kontrollansatz, der durch die dissoziierende Wirkung von SDS die proteolytische Zugänglichkeit beider Proteine erhöhen und dadurch eine auf dem Weg des *assembly* leicht degradierbare Form beider Enzyme darstellen sollte, ergaben sich entsprechende Ergebnisse. Beide dem Molekulargewicht des Monomers zuzuordnenden Hauptbanden verschwanden nahezu vollständig. Stattdessen konnte beiden verdauten Enzymen ein identisches Muster an Degradationsbanden zugewiesen werden.

## 3.7 Die langkettenspezifische Acyl-CoA Dehydrogenase

### 3.7.1 Reinigung der humanen langketten-spezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase aus *E. coli*

Die Reinigung der humanen, langketten-spezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase erfolgte in Analogie zum mittelkettenspezifischen Enzym. Ausgangsmaterial hierfür war jedoch nicht das im Plasmid pTrc klonierte Enzym, sondern das von Djordjevic und Mitarbeitern beschriebene pET-Plasmidsystem<sup>3</sup> [Djordjevic *et al.*, 1994; Studier & Moffat, 1986], das im *E. coli* - Stamm BL 21 zur Expression gebracht wurde. Die Reinigung erfolgte hier lediglich im semipräparativen Maßstab, ausgehend von 18 g Zellmaterial (Naßgewicht).

Abweichend von der für MCADh beschriebenen Aufschlußmethode wurde dem Aufschlußpuffer FAD in einer Endkonzentration von 2 µM zugesetzt. Ebenso wurde in Anbetracht der vergleichsweise geringen Ausgangsmengen primär feinkörniges Gelmaterial verwendet. Der für MCADh beschriebene Q-Sepharose FF-Schritt wurde durch Resource-Q 6 ml ersetzt, desgleichen wurde der in Kapitel 2.5.3 beschriebene Reinigungsschritt über Hydroxyl-Apatit durch den Einsatz einer semipräparativ-analytischen Calcium-Phosphat - Säule (Superformance 75-5) ersetzt.

Aufgrund der zu erwartenden höheren Trennschärfe erfolgte die Elution der LCADh von Resource-Q durch Anlegen eines 15 Säulenvolumina (entsprechend 90ml) umfassenden NaCl-Gradienten von 0–350 mM NaCl in 50mM Tris/Cl<sup>-</sup> pH 7,6. Die Elution der LCADh erfolgte entsprechend einer NaCl-Konzentration von ca 10% NaCl, korrelierend mit einer Leitfähigkeit von ca. 11,5 mS/cm (Abb. 3-20) (100% Leitfähigkeit bezogen 1 M NaCl in 50 mM Tris pH 7,6 bei RT). Die im Vergleich zur MCADh deutlich frühere Elution der LCADh bei geringeren NaCl-Konzentrationen, ist möglicherweise auf einen um ca. 0,65 pI-Einheiten höheren isoelektrischen Punkt zurückzuführen. Obwohl für LCADh aufgrund der Aminosäurekomposition aus theoretischen Berechnungen [Sillero & Ribeiro, 1989] für das entfaltete Protein ein isoelektrischer Punkt von ca. pH 7,69 berechnet werden kann, muß dieser Wert aufgrund der experimentellen Daten in Frage gestellt werden. Hierbei konnte für das native Enzym ein isoelektrischer Punkt von ca. 5,7 ermittelt werden. Entsprechend dieses

---

<sup>3</sup> Auf die Co-Expression der Chaperone GroEL/ES, welche ursprünglich zur Steigerung der Expressions-effizienz in *E. coli* BL 21 co-translatiert wurden (Yu-Dong, persönliche Mitteilung), wurde in diesem Reinigungsansatz verzichtet.

pI-Wertes der LCADh wäre bei gegebenem pH-Wert (7,6) des Auftragungspuffers der Anionenaustauschchromatographie eine deutlich stärkere Bindung an das verwendete Gelmaterial zu erwarten gewesen. Ähnliche Ergebnisse einer vergleichsweise schwachen Bindung an DEAE-Cellulose konnten von Djordjevic und Mitarbeitern bestätigt werden [Djordjevic *et al.*, 1994].

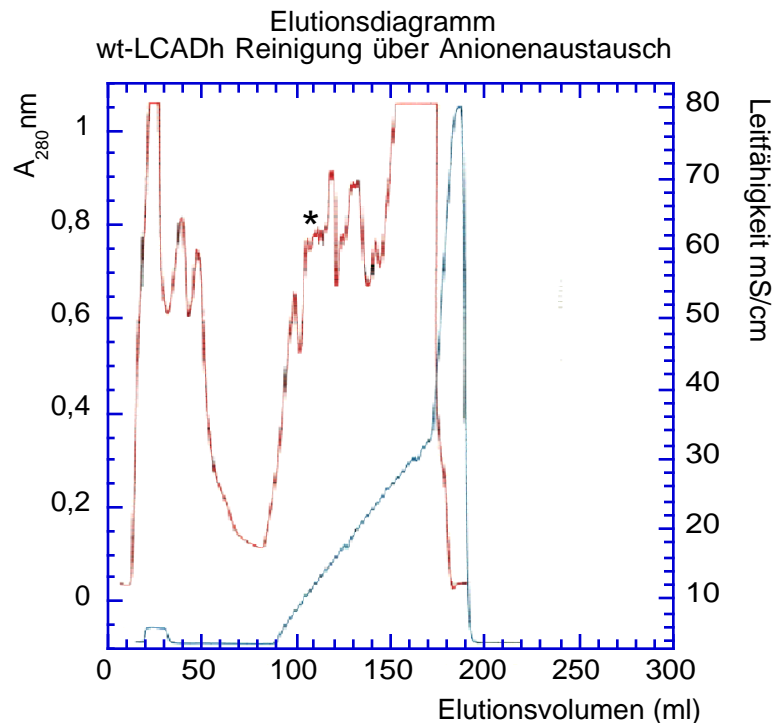


Abbildung 3-20 Elutionsdiagramm der wt-LCADh nach Anionenaustausch-Chromatographie (Resource-Q 6 ml). Aufgetragen wurden ca. 180 mg Gesamtprotein. Die Elution erfolgte in 8 CV von 0–350 mM NaCl.

Der mit \* gekennzeichnete Peak markiert die Hauptelutionsbande.

Die im ersten chromatographischen Schritt separierten, aktiven Fraktionen wurden miteinander vereinigt und zu 80% mit Ammoniumsulfat gesättigt. Das resultierende Proteinpräzipitat wurde nach Zentrifugation in 1 ml 5 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer pH 6,8 resuspendiert und gegen denselben Puffer mittels NAP-10-Säulen entsalzt. Das entsaltzte Eluat wurde anschließend auf eine Hydroxyl-Apatit Säule (Superformance 75-5) aufgetragen. Zur Elution wurde ein 20 Säulenvolumina (30 ml) umfassender  $\text{KP}_i$ -Gradient von 5–400 mM angelegt.

Unter diesen Bedingungen eluierte LCADh bei einer  $KP_i$ -Konzentration von ca. 240mM als hochaufgelöster einzelner Peak (Abb. 3-21 und Abb. 3-22). Das Absorptionsverhältnis der in diesem chromatographischen Schritt isolierten LCADh konnte mit  $A_{278} : A_{446} = 10,9$  für die vereinigten aktiven Fraktionen bestimmt werden.

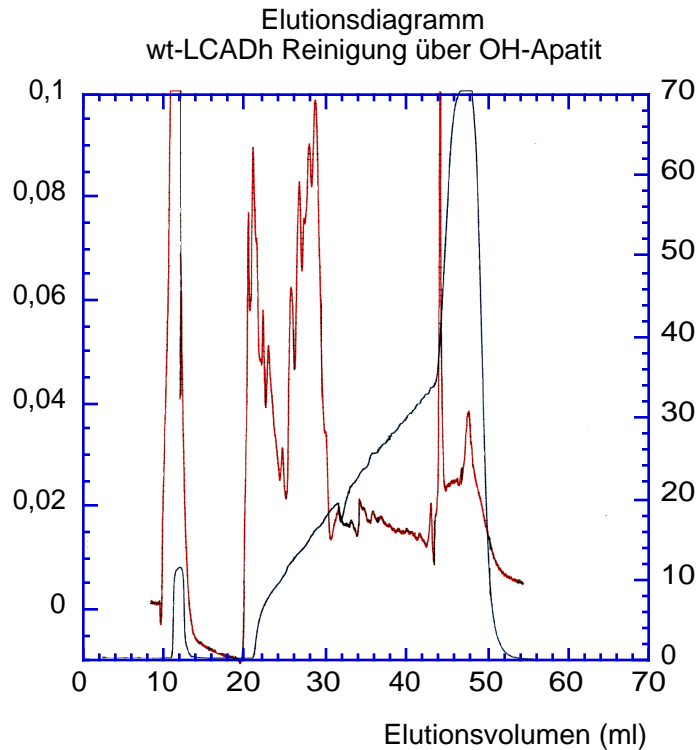
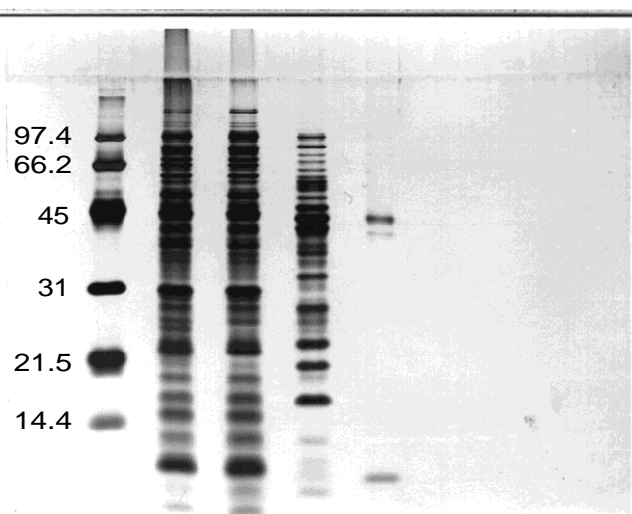


Abbildung 3-21 Elutionsdiagramm der wt-LCADh nach OH-Apatit Chromatographie (Merck OH-Apatit Superformance). Der Gradient erfolgte über 20 CV von 5–350 mM  $KP_i$  pH 6,8.

Tabelle 3-5 Reinigungstabelle humaner LCADh

Schritt	Konzentration (mg/ml)	Gesamtprotein (mg)	Gesamtvolumen (ml)	Aktivität (U/mg)	Gesamtaktivität (Units)	Faktor	Ertrag (%)
Rohextrakt	6,8	380	56	0,7	266	1	100
Ammonium-sulfat (30-80%) entsalzt	13,8	303	22	0,77	233	1,1	87,5
Pool Resource-Q	5,9	9,4	1,6*	(6,9)	(64,8)	(9,8)	(24,3)
Pool Hydroxyl-Apatit	1,75mg/ml 12,7 µM pool	1,6 mg	0,9	15,9	(25,4)	22,7	(9,5)

\* Dieses Volumen schließt die Gesamtaktivität nach Entsalzung über PD-10 aus zwei Resource-Q Läufen ein

Abbildung 3-22 Reinigungsverlauf der humanen *Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase*.

Spur 1: Markerproteine

Spur 2: Rohzelleextrakt

Spur 3: 30/80% AS-Pellet entsalzt

Spur 4: Pool aus AIEX (Resource-Q)

Spur 5: Gereinigtes Enzym nach Hydroxyl-

### 3.8 Molekulargewichtsbestimmung humaner Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase

Der langketten-spezifischen oder "Palmitoyl CoA"-Dehydrogenase kann ein aus theoretischen Berechnungen abgeleitetes Molekulargewicht von 47,6 kD pro Untereinheit zugeordnet werden. Ein vergleichbarer Wert konnte mittels SDS-Gelelektrophorese für die Untereinheit ermittelt werden (Abb. 3-23). Die Bestimmung des nativen Molekulargewichts humaner LCADh aus *E. coli* erfolgte mittels Gelfiltration über Superdex pg 200 (XK 26/60) in 50 mM  $KP_i$  pH 7,8. Das hierbei ermittelte Retentionsvolumen für LCADh betrug 172,7 ml korrelierend mit einem nativen Molekulargewicht von 199,5 kD.

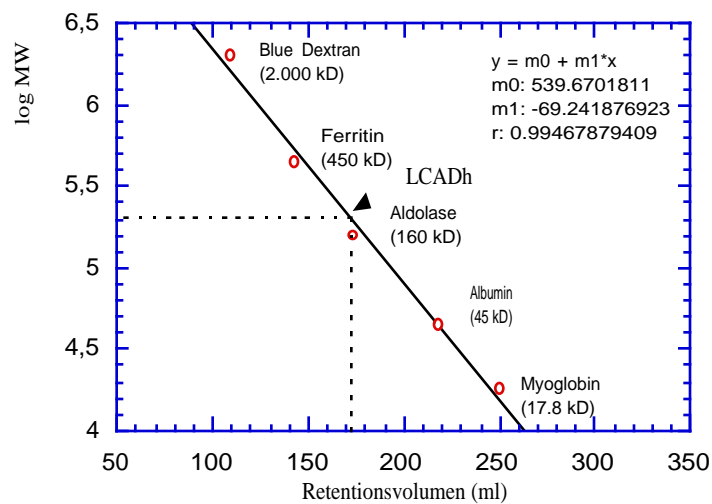


Abbildung 3-23 Molekulargewichtsbestimmung der humanen LCAD über Superdex 200pg XK 26/60

### 3.9 Spektrale Eigenschaften der Long-Chain Acyl CoA Dehydrogenase

Der molare Absorptionskoeffizient der langkettenspezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase wurde in Analogie zur  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh mittels Dissoziation durch SDS bestimmt. Das Spektrum des nativen wt-Enzyms zeigte das typische Spektrum des Flavoenzyms mit Absorptionsmaxima bei 274 nm, 371 nm und 445 nm. Das Absorptionsverhältnis  $A_{274} : A_{371} : A_{445}$  betrug 8,6 / 0,71 / 1 und ist damit vergleichbar mit demjenigen der LCAD aus Schweineleber. Ein Vergleich der Daten mit Djordjevic [1994] zeigt allerdings eine stärkere Ausprägung des Maximums bei 371 nm wobei das Absorptionsverhältnis  $A_{275} : A_{447}$  in dieser Präparation mit 7,0 angegeben wird. Möglicherweise reflektiert dies einen Verlust enzymgebundenen FADs.

Für das humane Enzym wurde ein Absorptionskoeffizient  $\epsilon_{445}$  von  $14,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt (Abb. 3-24).

Tabelle 3-6 Vergleich der spektralen Eigenschaften verschiedener LCADh aus unterschiedlichen Organismen.

Quelle	Spektrale Maxima $\lambda$ (nm)	$\epsilon_{\text{ox 445nm}}$ ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	$\epsilon_{\text{ox 274nm}}$ ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	Referenz
wt-LCADh	274 / 371 / 445 8,6 : 0,71 : 1	14,1 <i>13,3 (<math>\epsilon_{450}</math>)</i>	121,38	diese Arbeit <i>Djordjevic et al., 1994</i>
E261Q LCADh	275 / 371 / 447 7 : 0,8 : 1	<i>13,3 (<math>\epsilon_{450}</math>)</i>		<i>Djordjevic et al., 1994</i>
Rinderherz LCAD	275 / 360 / 448 6,3 : 0,74 : 1	n. b.		Hall <i>et al.</i> , 1976
Schweineleber LCAD	275 / 365 / 442 8,1 : 0,74 : 1	n. b.		Beinert, 1962
Rattenleber LCAD	275 / 365 / 443 10,1 : 0,75 : 1	n. b.		<i>Ikeda et al.</i> , 1985

Kursiv gedruckte Werte beziehen sich auf die von Djordjevic und Mitarbeitern publizierten Werte der humanen Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase.

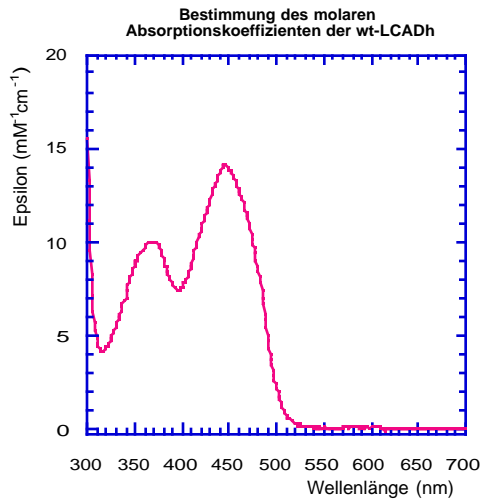


Abbildung 3-24 Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten für wt-LCADh.

### 3.10 Katalytische Eigenschaften der humanen langkettenspezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase

Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase katalysiert den Umsatz längerkettiger Acyl-Substrate im Bereich von  $C_6$ -CoA bis  $C_{20}$ -CoA mit einem deutlichen Aktivitätsmaximum bei  $C_{12}$ -CoA (Abb. 3-25). Aufgrund starker Micellenbildung war eine exakte Bestimmung längerkettiger Substrate ( $C > 18$ ) nicht möglich und entspricht insofern nur gemittelten Werten.

Vergleicht man die maximalen Umsatzraten der wt-Formen von MCADh und LCADh, so entsprechen sich die jeweiligen  $V_{\max}$ -Werte näherungsweise in ihren jeweils besten Substraten. Demgegenüber wurden ca. fünffach höhere Aktivitätswerte für wt-LCADh im Vergleich zu Djordjevic [1994] bestimmt. Eine mögliche Ursache hierfür kann im Verlust enzymgebundenen Flavins gesehen werden, das in Abhängigkeit der Präparation zu falschen Konzentrationsbestimmungen führen kann. Obgleich eine direkte Gegenüberstellung mit

früheren Daten aufgrund unterschiedlicher Messverfahren nicht erfolgte, scheint es sich bei den hier ermittelten Aktivitätswerten um die tatsächlichen Größen zu handeln, wie sich im Vergleich zu unabhängig erfolgten Präparationen zeigte [Eder *et al.*, 1997; Nandy *et al.*, 1996].

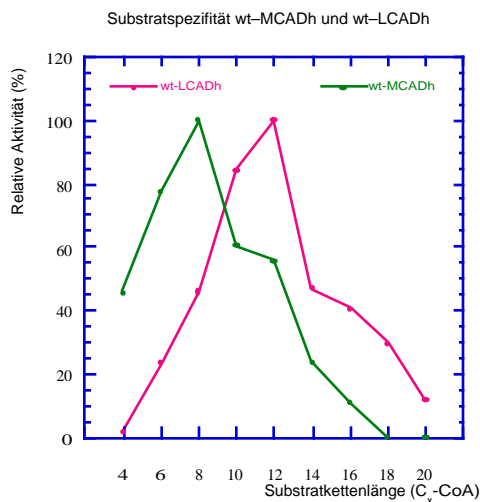


Abbildung 3-25 Vergleich der Substratspezifitäten von wt-MCADh und wt-LCADh. Alle Messungen erfolgten mittels Ferricenium Assay unter sättigenden Substratkonzentrationen bei 25° C.

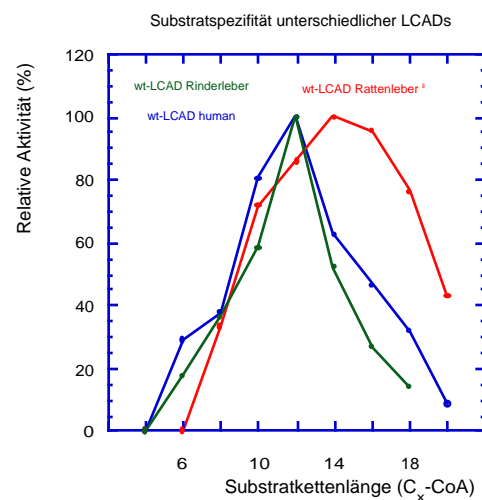


Abbildung 3-26 Vergleich der Substratspezifitäten verschiedener LCADs.  
a.) Daten nach Ikeda *et al.*, 1985

Der Vergleich der relativen Aktivitäten in Relation zur Substratkettlänge zeigte für verschiedene LCADs aus unterschiedlichen Organismen ein nahezu homogenes Profil (Abb. 3-26) mit Ausnahme des entsprechenden Enzyms aus Rattenleber [Ikeda *et al.*, 1985; Nandy *et al.*, 1994]. Allerdings besteht hier die Möglichkeit, daß aufgrund unterschiedlicher Messverfahren unterschiedliche Aktivitäten erzielt wurden (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7 Vergleich der spezifischen Aktivitäten verschiedener LCAD und MCADh

Substrat	LCADh (min <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LCAD (Schweineniere) (min <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	LCAD (Ratte) (U/mg) <sup>b</sup>	MCADh (min <sup>-1</sup> )
<b>C4-CoA</b>		50	0	500
<b>C6 - CoA</b>	215	215	0	851
<b>C8 - CoA</b>	255	320	0,7	1101
<b>C10 - CoA</b>	754	650	1,5	665
<b>C12 - CoA</b>	626	620	1,8	613
<b>C14 - CoA</b>	331	570	2,1	259
<b>C16 - CoA</b>	194	565	2,0	116
<b>C18 - CoA</b>	n.d	585	1,6	0
<b>C20 - CoA</b>	n.d.	70	0,9	0

- a.) Ferricenium Assay; die jeweiligen Substratkonzentrationen betragen 50 µM  
b.) PMS/DCIP Assay; Ikeda et al., 1985  
c.) Eder *et al.*, 1997

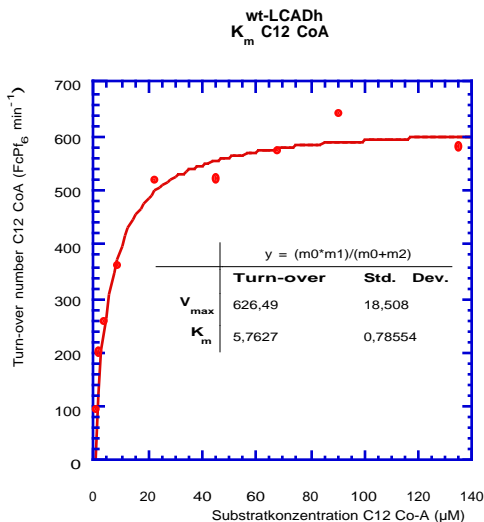
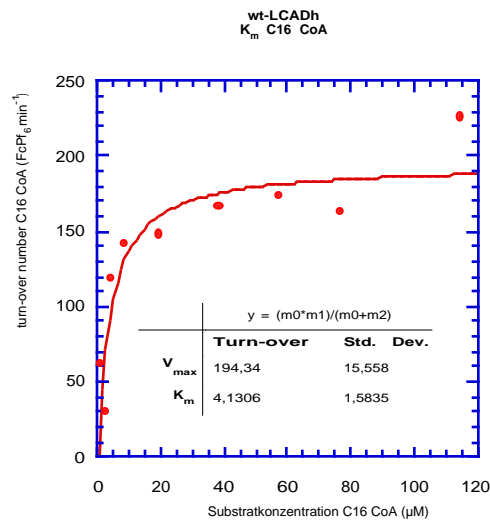
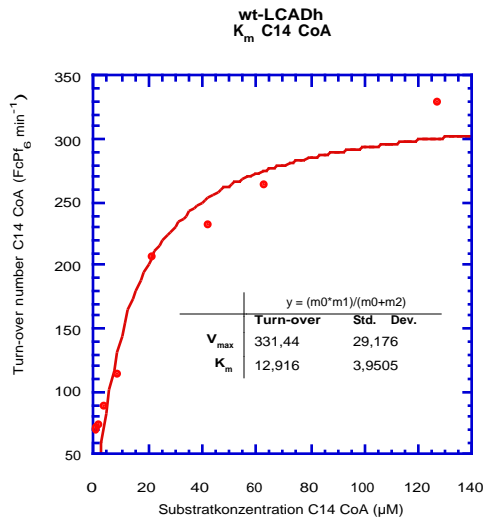
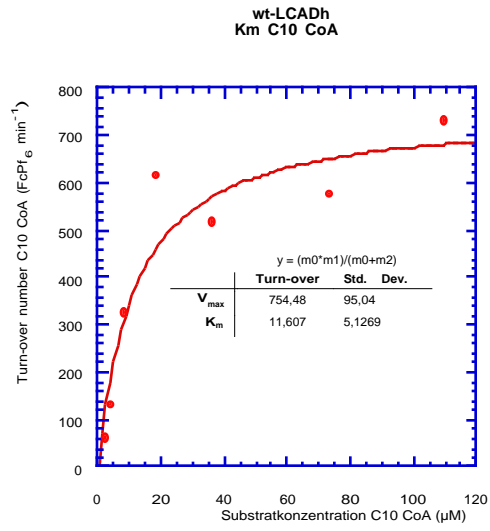
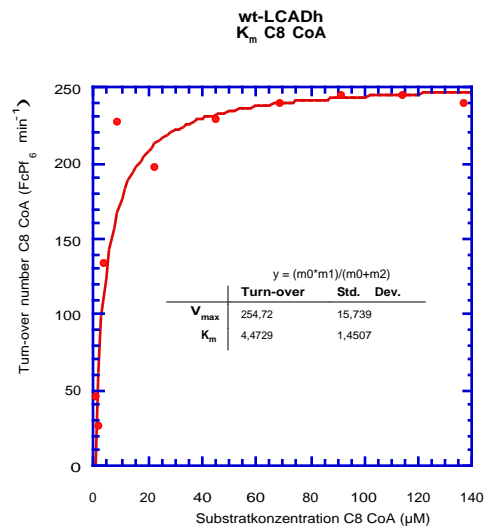


Abbildung 3-27 Bestimmung der Michaelis-Konstanten  $K_m$  und  $V_{max}$  für wt-LCADh in Abhängigkeit der Substratkettlänge. Alle Messungen erfolgten bei konstanten Enzymkonzentrationen

Erstaunlicherweise besitzt humane wt-LCAD im Vergleich zum korrespondierenden Enzym aus der Schweineleiere fast durchweg höhere  $K_m$ -Werte bei gleichzeitig höherem  $V_{max}$ . Ebenso fallen im Vergleich zu MCADh bei vergleichbaren  $V_{max}$ -Werten höhere  $K_m$ -Werte auf (Tabelle 3-8). Das am effizientesten umgesetzte Substrat ( $V_{max}/K_m$ ) aller wt-LCADs aus verschiedenen Organismen entspricht somit  $C_{12}$ -CoA, während für wt-MCADh  $C_8$ -CoA ermittelt wurde. Aufgrund der Tatsache, dass für wt-LCAD deutlich höher bestimmten  $K_m$ -Werte, ergeben sich daraus insgesamt für die katalytische Effizienz der wt-LCADh entsprechend reduzierte Werte.

Tabelle 3-8 Katalytische Eigenschaften humaner wt-LCAD; Vergleich der Aktivitäten

	Substrat	$V_{\max}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}/K_m$ ( $\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ )	(U/mg) <sup>b</sup>
<b>Humane LCAD</b>					
	C <sub>8</sub> - CoA	255	4,5	56,6	
	C <sub>10</sub> - CoA	755	11,6	63	
	C <sub>12</sub> - CoA	627	5,8	108	
	C <sub>14</sub> - CoA	331	12,9	25,6	
	C <sub>16</sub> - CoA	194	4,1	47,3	
	C <sub>18</sub> - CoA	n. b.	n. b.	n. b.	
<b>Humane MCAD</b>					
	C <sub>4</sub> - CoA	500	175	3	
	C <sub>6</sub> - CoA	1010	15	67	
	C <sub>8</sub> - CoA	1200	3,4	353	
	C <sub>10</sub> - CoA	580	2,5	232	
	C <sub>12</sub> - CoA	550	2,5	220	
	C <sub>14</sub> - CoA	280	2,3	122	
	C <sub>16</sub> - CoA	140	2,4	58	
<b>LCAD (Ratte) (mitochondrial)</b>					
	C <sub>4</sub> - CoA				0
	C <sub>6</sub> - CoA				0
	C <sub>8</sub> - CoA				0,7
	C <sub>10</sub> - CoA				1,5
	C <sub>12</sub> - CoA				1,8
	C <sub>14</sub> - CoA				2,1
	C <sub>16</sub> - CoA				2,0
	C <sub>18</sub> - CoA				1,6
	C <sub>20</sub> - CoA				0,9
<b>LCAD (Schweiniere)<sup>c</sup></b>					
	C <sub>4</sub> - CoA	50	n. d.	n. d.	
	C <sub>6</sub> - CoA	215	6,3	34	
	C <sub>8</sub> - CoA	320	3,3	100	
	C <sub>10</sub> - CoA	650	2,2	300	
	C <sub>12</sub> - CoA	620	1,5	410	
	C <sub>14</sub> - CoA	570	2,3	250	
	C <sub>16</sub> - CoA	565	3,6	160	
	C <sub>18</sub> - CoA	585	3,7	160	
	C <sub>20</sub> - CoA	70	n. d.	n. d.	

<sup>a</sup>) Alle Assays wurden mit der nach Lehman & Thorpe [1990] beschriebenen Methode in 100 mM KP<sub>i</sub>-Puffer pH 7,6 bei 25° C durchgeführt.

<sup>b</sup>) PMS/DCIP Assay; Werte nach Ikeda *et al.*, 1985

<sup>c</sup>) Eder *et al.*, 1997

### 3.10.1 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz für Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase

Die Bestimmung der aminoterminalen Sequenz der "reifen" LCADh erfolgte wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben. Obgleich die für LCADh codierende cDNA-Sequenz bekannt ist [Indo *et al.*, 1991], muß hierbei jedoch angemerkt werden, daß die exakte aminoterminalen Sequenz des reifen Proteins nach Abspaltung der Signalsequenz im menschlichen Organismus bisher nicht eindeutig bekannt ist [Indo *et al.*, 1992]. Aus diesem Grund, und aus Gründen der Klonierungsstrategie, kann insofern lediglich die vermeintlich aminoterminalen Sequenz wiedergegeben werden.

Zur Identifikation des gereinigten Proteins wurden sechs Sequenzierschritte durchgeführt. Dabei konnte folgende Sequenz ermittelt werden:

**(M) - S - G - G - E - E - R -**

Wie aus der bestimmten aa-Sequenz zu ersehen ist, war eine eindeutige Zuordnung der N-terminalen Aminosäure nicht ohne weiteres möglich. Sowohl Met als auch Ser waren als N-terminal erste Aminosäure des ersten Edman Reaktionszyklus´ in vergleichbarer Intensität identifizierbar. Dies hieße, daß möglicherweise zwei Populationen an LCADh mit unterschiedlichen N-Termini ansequenziert wurden. Aufgrund der *Codon-usage*, die den Transkriptionsstart durch ein ATG-Codon, bzw. Met-Rest auf Proteinebene determiniert, kann diese Aminosäure als N-Terminus ausgeschlossen werden. Damit entspräche die ermittelte Aminosäuresequenz S - G - G - E - E - R vollständig der von Indo und Mitarbeitern aus der cDNA abgeleiteten Proteinsequenz der vermeintlich reifen LCADh [Indo *et al.*, 1992].

## 4 Diskussion

### 4.1 Aufgabenstellung und Vorbemerkung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine schnelle und äußerst effiziente Methode zur Reinigung rekombinanter Acyl-CoA Dehydrogenasen aus *E. coli* beschrieben. Frühere Methoden der Reinigung varianter Acyl-CoA Dehydrogenasen aus prokaryotischen Systemen wurden von verschiedenen Autoren dokumentiert [Bross *et al.*, 1990; Becker *et al.*, 1993; Engel & Massey, 1971; Engel, 1981]. Die Mehrzahl aller bisher publizierten Reinigungsverfahren unterschiedlicher Acyl-CoA Dehydrogenasen beschränkte sich jedoch auf die Extraktion aus verschiedenen Organen bzw. Mitochondrien eukaryontischer Organismen [Beinert, 1962; Hall & Kamin, 1975; Hall *et al.*, 1976; Hall, 1981; Ikeda *et al.*, 1983; Dommès & Kunau, 1984; Izai *et al.*, 1992; Uchida *et al.*, 1992].

Gregersen und Mitarbeitern gelang es 1991 erstmals, die Gene für wt und K304E-MCAD der humanen mittelkettenspezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase zu klonieren und im prokaryotischen System zu exprimieren [Gregersen *et al.*, 1991]. Damit sollte eine entscheidende Grundlage für die biochemische Charakterisierung sowohl nativer als auch varianter Formen gelegt werden, da eine umfassende Beschreibung biochemischer Parameter nur bei Vorhandensein einer ausreichenden Enzymmenge gewährleistet ist.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die ersten Versuche zur Reinigung humaner Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit Hilfe der von Bross konstruierten Plasmide pBMCK<sup>2</sup> (codierend für wt-MCADh) sowie p985-41 (codierend für K<sup>304</sup> → E-MCADh).

Wurde hierbei der Anteil aktiver wt-MCADh mit ca. 4% am Gesamtanteil löslicher Proteine im Rohextrakt bestimmt, so erreichte der Gehalt des mutanten Proteins lediglich Werte zwischen 0,1–0,8% (durch densitometrischen Vergleich mit gereinigtem Enzym aus Schweineleber (Abb. 3-2)). Diese Werte spiegelten sich gleichfalls in den im Rohextrakt messbaren Aktivitäten wider. Die Aktivität des wt wurde mit ca. 1,6  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  bestimmt, während K<sup>304</sup> → E-MCADh aus p985-41 keine messbare Aktivität – trotz Expressionsnachweis über Gelelektrophorese und anschließender immunbiochemischer Entwicklung durch affinitätsgereinigte Antikörper – aufwies [Bross *et al.*, 1992]. Gregersen und Mitarbeiter bestätigten diese Ergebnisse bei Expression humaner MCADh im *E. coli* Zellsystem [Gregersen *et al.*, 1991]. Ebenso führte die Expression beider Formen in eukaryontischen Zellen zunächst nur zu

einer an MW zwar vergleichbaren, an Aktivität und intrazellulären Konzentrationen jedoch deutlich geringeren Mengen an varianter  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh [Jensen *et al.*, 1992]. Parallel dazu wurde  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh zu einem großen Teil in Form hochmolekularer Aggregate detektiert. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Ikeda und Mitarbeitern [Ikeda *et al.*, 1986] legte dies den vielfach diskutierten Schluß nahe, daß die Ursache für die reduzierte Aktivität sowie Konzentration an korrekt gefalteter  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh in einer gegenüber Proteasen erhöhten proteolytischen Suszeptibilität der mutanten Form, bzw. einer nahezu vollständigen Inaktivität des Enzyms aufgrund inkorrekt gefalteter oder Oligomerisierung zum Tetramer zu sehen sei.

Aufgrund der extrem geringen Ausbeuten, sowie des Fehlens jeglicher Aktivität aus den Extrakten der mit pBMCK<sup>2</sup> bzw. p985-41 transformierten Zellen erschien die biochemische Analyse zunächst aussichtslos. Alle Ergebnisse der ersten Reinigungsversuche deuteten, wie bereits mehrfach beschrieben, auf eine drastisch reduzierte, bis nicht-meßbare Aktivität hin. Dennoch sprach der Nachweis beider Enzyme im Western-Blot eindeutig für das Vorhandensein geringer Mengen MCADh. Inwiefern hierbei die Stabilität gegenüber Proteasen bzw. die Faltung der Monomere und/oder das Assembly derselben zum nativen Protein eine Rolle spielten bzw. welchen Einfluß das verwendete Expressionssystem ausübte bleibt Gegenstand von Spekulationen.

Eine spürbare Verbesserung, die eine Reinigung und Charakterisierung beider Enzyme im großen Maßstab erlaubte, erbrachte erst das von A. Nandy konstruierte Expressionsplasmid pTrc-  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh, das bei Expression in *E. coli* TG 1 bei Anzuchttemperaturen von ca. 28° C ausreichende Mengen an MCADh, sowohl in der wt- als auch in der mutanten Form produzierte [Nandy, 1996 Dissertation Konstanz].

## **4.2 Beurteilung der Reinigung rekombinanter Formen humaner Acyl-CoA Dehydrogenasen aus *E. coli***

Obleich bereits mehrere Versuche zur Reinigung v.a. der Mutante  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh in der Vergangenheit unternommen wurden, scheiterte eine umfassende biochemische Analyse mutanter Formen aufgrund der teils extrem geringen Mengen der Zielproteine im Rohzelleextrakt. Einen ersten Einstieg in die Reinigung von  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh stellte

diese Arbeit sowie Publikationen von Gregersen und Mitarbeitern dar [Gregersen *et al.*, 1991].

Als oberstes Ziel galt die Erstellung eines Standardprotokolles zur Darstellung humaner Acyl-CoA Dehydrogenasen aus *E. coli* in möglichst wenigen Reinigungsschritten unter vollständiger Erhaltung der biologischen Aktivität. Hierbei war es zunächst wichtig, in einem ersten "Capture"-Schritt durch fraktionierte Fällung mit AS das Ausgangsvolumen des Zellaufschlusses auf ein handhabbares Maß zu reduzieren. In Anbetracht der sehr hohen Ausbeuten bzw. spezifischen Enzymaktivitäten schien dieser Schritt ideal geeignet zur Abtrennung grober Verunreinigungen. Erträge nahe 90% (bezogen auf den Rohzellextrakt) bei einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 2–3 konnten hierbei für gewöhnlich erzielt werden.

Wenngleich sich gereinigte MCADh und LCADh als AS-Suspension über einen langen Zeitraum als äußerst stabil erwiesen, erfolgten alle weiteren Reinigungsschritte direkt im Anschluß an die Fällung. Diese Maßnahme erschien notwendig, da sich bei der Verarbeitung tiefgefrorener Proben z.T. drastische Aktivitätseinbußen zeigten.

Bei der Wahl des Puffers für die AIEX wurde darauf geachtet, die Ladung der puffernden Substanz (Tris, pK 8,06) gleich der der verwendeten Säule zu wählen. Aus diesem Grund und aus Gründen einer effizienteren Pufferung wurde der klassische Puffer  $KP_i$  (pK<sub>2</sub> 7,2) bei allen Ionenaustauscherschritten gegen Tris ersetzt. Ebenso wurde die Wahl des Trägermaterials nach Kriterien einer hohen Flußrate bei entsprechend hoher Kapazität getroffen.

Als kritisch zeigten sich jeweils die einzelnen Entsalzungsschritte über Sephadex G-25. Wie aus den Tabellen 3-1 und 3-4 zu entnehmen ist, mußten hierbei erhebliche Aktivitäts- und Ertragseinbußen in Kauf genommen werden. Dieser Verlust kann auf zwei mögliche Ursachen zurückgeführt werden:

- 1.) ein Verlust enzymgebundenen Flavins (diese Beobachtung wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen dokumentiert [Ikeda *et al.*, 1983; Domes & Kunau, 1984; Hall & Kamin, 1975]. Um diesen vermeintlichen Verlust so gering wie möglich zu halten, wurden alle Gelfiltrations- und Entsalzungsschritte in Gegenwart von bis zu 5  $\mu$ M FAD durchgeführt.
- 2.) einer unspezifischen Adsorption der Enzyme an das Trägermaterial.

Ebenso konnten bei der Elution von den eingesetzten Ionenaustauschermaterialien gelegentlich zwei voneinander verschiedene Flavinbanden getrennt werden, die bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen eluierten. Vermutlich ist dieser Effekt auf die Bindung freien FADs an das Gelmaterial zurückzuführen, da in keinem der

beobachteten Fälle eine Dehydrogenaseaktivität in der bei geringen Salzkonzentrationen (ca. 9 mS/cm) eluierenden Bande im Ferricenium Aktivitätstest festzustellen war. Es ist nicht auszuschließen, daß es sich hierbei zumindest partiell um ursprünglich enzymgebundenes FAD handelte.

Auch wenn die Bindung des Enzyms an die verwendete Gelfiltrationsmatrix eher unwahrscheinlich ist, muß diese zweite Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Da die Elution aller MCADhs und LCADhs bei NaCl-Konzentrationen nahe 18–20% (1 M NaCl entspricht 100%) von den jeweiligen Ionenaustauschersäulen erfolgte, wurde auf die Zugabe der ansonsten üblichen 15% NaCl (entsprechend ca. 150 mM) im Laufpuffer der vorausgehenden Gelfiltrationssäulen verzichtet, um eine vorzeitige Elution von der entsprechenden AIEX-Säule zu verhindern. Dialysemethoden wurden generell vermieden, da dies oft mit einer Präzipitation des entsprechenden Proteins verbunden war.

Das Absorptionsverhältnis  $A_{275} : A_{444}$  der vereinigten Fraktionen nach dem ersten chromatographischen Trennungsschritt betrug für gewöhnlich ca. 25–30 und erreichte nach der Hydroxyl-Apatit-Chromatographie ein Verhältnis von ca. 7–8 für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh, was einem Reinheitsgrad von über 90% entsprach. Diese Reinheit genügte für die Mehrzahl der kinetischen Experimente, konnte jedoch durch eine abschließende Größenausschlußchromatographie bei Bedarf noch weiter gesteigert werden. Sowohl MCADh als auch LCADh zeigten im silbergefärbten Tricine-SDS-Gel jeweils eine einzelne Monomer-Bande mit den entsprechenden Molekulargewichten von 43,7 kD für MCADh bzw. 47,6 kD für LCADh (Abb. 3-6 und 3-22). Daraus konnte ein Molekulargewicht von 155 kD bzw. 199,5 kD für die nativen Enzyme ermittelt werden.

Peterson und Mitarbeiter beschrieben eine alternative Reinigung rekombinanter MCADh aus *E. coli* BL 21 zur Gewinnung von ca. 100–150 mg aus 80 l Zellkultur [Peterson *et al.*, 1995]. Für die Reinigung von  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh scheint dieses System jedoch aufgrund sehr geringer Ausbeuten weniger geeignet. Vergleicht man das hier vorgestellte Reinigungsverfahren zur Darstellung sämtlicher rekombinanter MCADhs mit dem ursprünglich von Bross [1990] und Mitarbeitern mit dem von Peterson beschriebenen Verfahren, so konnte eine ca. 25-fache Ertragssteigerung gegenüber dem von Bross beschriebenen Verfahren und eine 12-fach gesteigerte Effizienz gegenüber dem von Peterson beschriebenen System erreicht werden. Die deutliche Ertragssteigerung gegenüber beiden Systemen resultierte in der Reinigung von bis zu 900 mg reinen Enzyms aus 40 l Kulturmedium und war im Wesentlichen auf die Verwendung der Expressionsplasmide pTrc-MCADh sowie die Anzucht bei 28° C zurückzuführen [Kieweg *et al.*, 1997].

In Anbetracht der geringen Erträge von ca. 10% bis maximal 20% für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh erscheint diese Methode beinahe ineffizient. Vergleicht man jedoch frühere Reinigungsverfahren zur Darstellung von MCAD und LCAD aus natürlichen Quellen mit rekombinant hergestellten Proteinen, so kann festgestellt werden, daß keine der bisherigen Methoden die Trennung in zwei Schritten erlaubt, bzw. die hier erzielten Aktivitäts- und Reinheitswerte erreichte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, daß intrazelluläre Aggregationsphänomene der mutanten Form  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh, welche wiederholt Gegenstand für Spekulationen um eine gegenüber dem Wildtyp-Enzym drastisch reduzierte Enzymaktivität waren [Gregersen *et al.*, 1991; Bross *et al.*, 1992; Whelan *et al.*, 1993], zumindest bei permissiven Temperaturen um 28° C lediglich eine untergeordnete Rolle spielen. Die weitaus höchsten Stabilitätswerte konnten, wie in Tabelle 4-1 gezeigt, unter Aufrechterhaltung sehr hoher Proteinkonzentrationen, wie beispielsweise nach Zellaufschluß beziehungsweise in sehr hochkonzentrierten Ammoniumsulfat-Suspensionen beibehalten werden. Im Vergleich zum Wildtyp wird ein Ausbleiben der Aggregation daher um so mehr deutlich, als daß derartige Phänomene durch inter- und intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen naszierender respektive entfalteter Proteine präferentiell in hochkonzentrierten Proteinlösungen stattfinden können (Kiefhaber *et al.*, 1991; Hartl *et al.*, 1994; Schein, 1989).

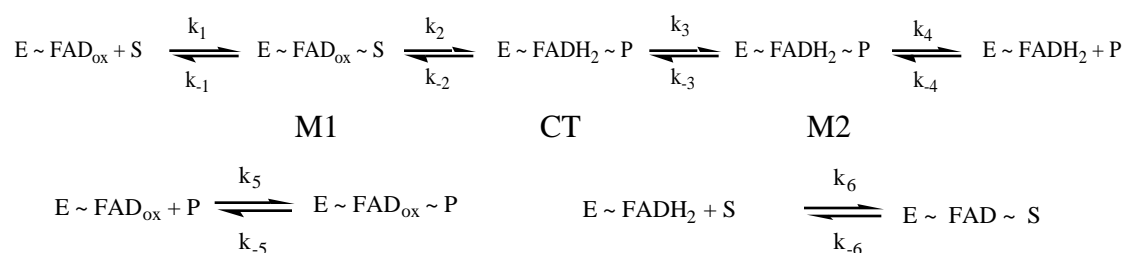
### 4.3 Katalytische Eigenschaften

Mehrere Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, der varianten Form  $K^{304} \rightarrow E$  der menschlichen Acyl-CoA Dehydrogenase wenn nicht gleiche, so doch zumindest sehr ähnliche katalytische Eigenschaften wie denjenigen des wt-Enzyms zuzuschreiben. Bei Betrachtung der Substratkettenspezifität fällt allerdings die markante Präferenz zur Oxidation längerkettiger Acyl-CoA Substrate auf. Während die größte Effizienz ( $V_{\max}/K_m$ ) des Substratumsatzes für den wt im Umsatz von Octanoyl-CoA liegt, erfährt  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh eine deutliche Verschiebung hin zu längerkettigen Substraten. Eine mögliche Erklärung könnte in der von Kim und Mitarbeitern beschriebenen strukturellen Basis der Substratspezifität liegen [Kim *et al.*, 1994]. Für wt-MCADh konnte gezeigt werden, daß die Bindung unterschiedlich langer Substrate mit diversen Konformationsänderungen der aa  $Glu^{376}$ ,  $Tyr^{375}$ ,  $Glu^{99}$  und  $Leu^{103}$  einhergeht. Außerdem kommt es bei Bindung der jeweiligen Substrate zur geordneten Ausschleusung von

Wassermolekülen im katalytischen Zentrum. Die Anzahl der Wassermoleküle, die hierbei verdrängt werden ist abhängig von der Substratkettlänge. Obwohl die  $K^{304} \rightarrow E$ -Mutation nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zum katalytisch aktiven Zentrum liegt [Kim *et al.*, 1993, 1994] wäre es denkbar, daß die Mutation in der Art und Weise eine strukturelle Modifikation bewirkt, die die Bindung längerer Substrate begünstigt oder erleichtert bzw. das am "Grund" der Substratbindetasche liegende Geflecht aus Wasserstoffbrücken innerhalb der Mutante gelockert ist.

### 4.3.1 Lage der katalytisch aktiven Zentren

Das flavinoxidierte Enzym ( $EFL_{ox}$ ) bindet unterschiedlich lange Acyl-CoA Substrate unter darauffolgender Reduktion des Flavin-Cofaktors und Ausbildung des Enzym-Produkt Komplexes (Enoyl-CoA) [Beinert & Page, 1957; Thorpe *et al.*, 1979]. Dabei kann es zur Ausbildung eines *charge-transfer Komplexes* kommen, der sich durch spektrale Veränderungen der Flavinhauptbande und das Auftreten einer zusätzlichen Bande mit Absorptionsmaxima um ca. 550-560 nm auszeichnet. Das Ausmaß dieser spektralen Veränderungen ist stark abhängig von der Substratkettlänge und spiegelt den Anteil des CT-Komplexes bestehend aus flavinreduziertem Enzym und dem Produkt Enoyl-CoA wider [Schopfer *et al.*, 1988; Thorpe *et al.*, 1979]. Darüberhinaus gibt es eine sehr große Variabilität, was die Bindungsstärke der einzelnen Substrate in Abhängigkeit der Kettenlänge anbelangt [Steyn-Parvé & Beinert, 1958]. Ein Modell, das die Lage entsprechender Gleichgewichte repräsentiert wurde von Schopfer und Mitarbeitern vorgeschlagen:



E=Enzym (ACDH); S=Substrat (Acyl-CoA); P=Produkt (Enoyl-CoA)

M1 ist der Michaelis-Menten-Komplex aus oxidiertem Enzym und Substrat.

CT entspricht dem Charge-Transfer-Komplex.

M2 stellt den Michaelis-Menten-Komplex aus reduziertem Enzym und Produkt dar.

(Nach Thorpe *et al.*, 1979 & Schopfer *et al.*, 1988)

Auffallend sind die extremen Bleichungseffekte der Mutante mit länger-kettigen Substraten v.a.  $C_{12}$ -CoA und  $C_{16}$ -CoA, sowie das Auftreten der sehr ausgeprägten *charge-transfer* Bande. Die Konkurrenz der Komponenten Acyl-CoA und Enoyl-CoA um das reduzierte Enzym allein bestimmt noch nicht letzten Endes den Anteil des CT-Komplexes. Vor allem die Schritte  $k_1/k_{-1}$  und  $k_2/k_{-2}$  bestimmen die Affinität des oxidierten Enzyms  $E\sim FAD_{ox}$  gegenüber bestimmten Acyl-CoA Substraten und dadurch den Anteil von CT. Dieser wiederum ist maßgeblich an der Reaktion beteiligt, da davon auszugehen ist, daß er mit dem natürlichen Substrat ETF wechselwirkt und damit das Reaktionsgleichgewicht entscheidend beeinflusst.

Folgendes, nach Schopfer abgeleitetes Modell kann hier entwickelt werden: Falls durch das Verhältnis von  $k_2/k_{-2}$  die Bildung von CT durch ein spezifisches Substrat begünstigt wird, kann  $MC_1$  sofort zu CT weiterreagieren. Dieser Schritt äußert sich spektrophotometrisch im Auftreten der typischen Charakteristika des flavinreduzierten Enzyms bzw. anhand der CT-Bande.

Unter der Annahme, daß die Redoxpotentiale Acyl / trans-2-Enoyl für verschiedene Substrate gleich sind in freier Lösung, postulierte Thorpe und Mitarbeiter, daß das unterschiedliche Ausmaß der Bleichung, bzw. das Auftreten der CT-Bande auf eine unterschiedlich starke Bindung der verschiedenen Substrate zurückzuführen sei [Thorpe *et al.*, 1979].

Vergleicht man die katalytischen Eigenschaften von wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh miteinander, so stellt man durchweg höhere  $K_m$ -Werte für die Mutante bei ungefähr gleichen  $V_{max}$ -Werten fest [Kieweg *et al.*, 1997]. Schopfer und Mitarbeiter beobachteten für länger-kettige Substrate (Kettenlänge  $> C_{14}$ ) generell eine sehr starke Bindung an oxidierte MCAD die jedoch mit sehr geringen Bleichungseffekten einhergehen. Entsprechend den Aussagen des oben angeführten Modells deutet dies auf sehr kleine Werte für  $k_2/k_{-2}$  hin, was bedeuten würde, daß das Gleichgewicht deutlich auf die Seite des  $M_1$ -Komplexes hin verschoben ist. Dagegen weisen die Ergebnisse der  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh deutliche Bleichungseffekte auf. Im Gegensatz zum wt scheint hier das Gleichgewicht eindeutig bei CT zu liegen. Diese Ergebnisse in Verbindung mit der katalytischen Effizienz (Abb. 3-11) deuten in Übereinstimmung mit dem von Schopfer und Thorpe postuliertem Modell klar auf eine sehr viel stärkere Bindung langkettiger Substrate. Möglicherweise kann dies durch die Lage des katalytischen Zentrums bzw. des katalytisch aktiven FAD-Restes innerhalb des Moleküls erklärt werden:

Es stellt sich hier die Frage, inwiefern die modifizierten katalytischen Eigenschaften eine strukturelle Umorganisation des Moleküls reflektieren. Prinzipiell muß davon ausgegangen werden, daß die  $K^{304} \rightarrow E$ -Mutation keinen direkten Einfluß auf das katalytisch aktive Zentrum ausübt, da sie nicht in unmittelbarer Nachbarschaft

desselben liegt, sondern ca. 20 Å davon entfernt [Kim *et al.*, 1992; 1993]. Der Hinweis auf eine vergleichbar starke Bindung langkettiger Substrate ( $C > 12$ ) bei dennoch hohen Substratumsatzraten<sup>1</sup> läßt schließen, daß es keine grundlegenden Unterschiede in der Oxidation von Acyl-CoA Fettsäureestern gibt. Vielmehr schließt sich hier die Vermutung an, daß es durch die Einführung der Punktmutation  $K^{304} \rightarrow E$  zu einer Lockerung der Bindungen zwischen den Untereinheiten eines Dimeren-Paares kommt. Durch die lokale Konzentration negativer Ladungen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu  $Glu^{304}$  liegen ( $Asp^{300}$  in der Helix-H des benachbarten Dimers und  $Asp^{346}$  in der Helix-I) kommt es zu einem Ladungsüberschuss, der sich durch gegenseitige Abstoßung äußern könnte (Abb. 4-1). Allerdings reicht dieser nicht aus, um das tetramere Molekül in zwei Dimere zu trennen, sondern lediglich um eine Lockerung zu bewirken. Dies wäre auch eine Möglichkeit, die Bindung und den Umsatz langkettiger Substrate zu erklären. Kim und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Konformation des CoA-Restes bei  $C_8$ ,  $C_{10}$  und  $C_{12}$ -CoA Substraten in Bezug auf die Bindung des CoA-Anteils jeweils gleich geartet sind, daß jedoch mit wachsender Kohlenwasserstoffkette der Alkylrest tiefer in die Substratbindetasche eindringt [Kim *et al.*, 1992]. Deren "Boden" wird aus H-Brückenbindungen zwischen den aa-Resten  $Tyr^{372}$ ,  $Tyr^{375}$ ,  $Thr^{96}$ ,  $Glu^{99}$  und  $Gln^{95}$  gebildet. Die Entfernung des terminalen Methyl-Restes eines  $C_{12}$ -CoA liegt im Abstand von ca. 4 Å zu den Seitenketten dieser aa-Reste. Die Bindung längerer Reste ( $C > 12$ ) würde daher bedeuten, daß entweder diese H-Brücken gelöst werden müßten, oder aber der Alkylrest entsprechend ausweichen muß. Unterstellt man der Mutante  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh einen aufgrund der Mutation zumindest gelockerten Zusammenhalt der einzelnen Protomere, so wäre durchaus denkbar, daß sich dadurch mögliche Konsequenzen für die Bindung längerer Substrate ergeben. Daß sich durch die Einführung von Mutationen mögliche strukturelle Konsequenzen ergeben können, wurde bereits von Lee und Mitarbeitern für die Doppelmutante  $Glu^{376} \rightarrow Gly / Thr^{255} \rightarrow Glu$  der humanen M(L)CAD gezeigt [Lee *et al.*, 1996]. Durch die Einführung der Doppelmutation kommt es zu einer Aufweitung der Substratbindetasche (8,5 Å vs. 5,1 Å) wodurch die Bindung langkettiger Substrate mit einem Ausweichen der Alkylkette quittiert wird. Die Einnahme dieser Konformation des Substrates unterscheidet sich von derjenigen, die für die Substratbindung des wt beschrieben ist.

Unter physiologischen Bedingungen wird das flavinreduzierte Enzym durch das *Electron Transfer Flavin Protein* (ETF) reoxidiert und die Reduktionsäquivalente letzten Endes über die mitochondriale Elektronentransportkette auf Sauerstoff übertragen (Abb. 1-2). Als wichtige Voraussetzung zur Reoxidation des MCADh-gebundenen FADs' via ETF gilt das korrekte Binden / Andocken beider Enzyme

---

<sup>1</sup> Standard-Aktivitätstest nach Lehman & Thorpe, 1990

aneinander, so daß die Flavinreste beider Enzyme in möglichst geringer räumlicher Entfernung zueinander stehen. Eine Konformationsänderung aufgrund von Sequenzvariationen in einem der beiden Enzyme könnte somit durchaus bewirken, daß die maximal zulässige räumliche Distanz der jeweiligen Flavinreste zueinander überschritten wird. Roberts und Mitarbeiter [Roberts *et al.*, 1996] konnten einen optimalen bzw. minimalen Abstand von ca. 19,5 Å zwischen den Flavinresten von MCAD und ETF modellieren. Bei Überschreiten dieser (minimalen bzw. optimalen) Distanz aufgrund von Konformationsänderungen ist es also durchaus denkbar, daß eine Übertragung der Elektronen von MCADh auf ETF trotz eines gewissen Maßes an Flexibilität nur eingeschränkt oder aber gar nicht mehr möglich ist.

Dies könnte möglicherweise die Diskrepanz zwischen den Aktivitäten des künstlichen Akzeptors Ferricenium und dem natürlichen Akzeptor ETF bei der Übertragung der Elektronen erklären. Zwar konnte für das wt-MCADh-Protein ein gewisses Maß an Flexibilität bzw. Beweglichkeit nachgewiesen werden, allerdings bleibt der genaue Mechanismus der Bindung bzw. die exakte Orientierung beider Enzyme während des Elektronentransfers von ETF zu MCAD unbekannt. Für beide Enzyme setzt dies jedoch eine native Konformation voraus. Im Aktivitätstest mit dem physiologischen Elektronenakzeptor ETF zeigt K<sup>304</sup> → E-MCADh jedenfalls durchweg geringere Substratumsatzraten als der wt [Kieweg *et al.*, 1997]. Es stellt sich somit die Frage, ob mit der Einführung der Mutation K<sup>304</sup> → E eine Konformationsänderung des Enzyms verbunden ist wodurch der natürliche Akzeptor ETF sterisch gehindert wird, in der üblichen Art und Weise an sein Substrat - MCADh - zu binden. Die Übertragung der Reduktionsäquivalente von MCADh auf ETF setzt eine Bindung beider Moleküle in der Art und Weise voraus, in der für beide Enzyme ein minimaler Abstand beider FAD-Moleküle zueinander erreicht werden kann [Roberts *et al.*, 1996].

## 4.4 Stabilität des assemblierten Enzyms

Die aus dem Arrheniusdiagramm ermittelten Aktivierungsenergien stellen für gewöhnlich eine aus verschiedenen Teilprozessen ermittelte Größe dar. Jeder dieser einzelnen Prozesse korreliert somit auch mit einer ihm eigenen Temperatur, so daß bei kontinuierlicher Temperatursteigerung gegebenenfalls verschiedene Teilprozesse geschwindigkeitsbestimmend werden können. Infolgedessen wären zumindest zwei, beziehungsweise mehrere Bereiche unterschiedlicher Steigung im Arrheniusdiagramm zu erwarten. Aufgrund der Tatsache, daß bei beiden Enzymen über den ermittelten Temperaturbereich lediglich *eine* lineare Abhängigkeit ermittelt werden konnte, kann bei beiden Enzymen auf einen einzelnen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt geschlossen werden. Hierbei unterschieden sich jedoch beide Enzyme deutlich voneinander, was durch verschiedene Steigungen von Wildtyp und Mutante zum Ausdruck kam. Möglicherweise spiegeln sich darin zwei voneinander verschiedene Prozesse der thermischen Inaktivierung wider. Es bleibt zu bedenken, daß sich in Abhängigkeit der Temperatur die pK-Werte einzelner Seitenketten stark voneinander unterscheiden können. Ein Aspekt stellt hierbei die Ionisation verschiedener aa-Seitenketten dar, wodurch verschiedene Einflüsse auf das unterschiedliche thermische Verhalten eines einzelnen Proteins denkbar wären. Der Vergleich aller bzgl. Stabilitäten ermittelten Ergebnisse wie z.B. Aktivierungsenergien nach Arrhenius, Temperaturstabilitäten sowie Proteaseresistenzen könnte insofern einen Hinweis auf eine modifizierte Konformation des mutanten Enzyms geben. Dies muß jedoch nicht zwangsweise eine Instabilität oder proteolytisch sensitivere Konformation des Proteins widerspiegeln, sondern deutet lediglich auf eine vom wt verschiedene Situation hin. Es ist insgesamt nicht zweifelsfrei zu klären, welchen Einfluß der Austausch der aa Lys gegen Glu auf das isolierte tetramere und native K<sup>304</sup> → E-MCADh-Protein wirklich ausübt. Einerseits konnte gezeigt werden, daß sich das zeitliche Abbauverhalten der Mutante in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur zumindest im Rohzellextrakt deutlich vom wt unterscheidet [Nandy, Dissertation Konstanz 1996]. Auf der anderen Seite zeigten beide reinen Formen der Enzyme sowohl bei proteolytischen, als auch bei Temperaturstabilitätsexperimenten nur marginale Unterschiede. Hierbei ist zu bemerken, daß vor allem das Temperaturstabilitätsprofil (Abb. 3-18) keinerlei Unterschiede innerhalb des physiologisch relevanten Bereiches aufweist. Ebenso konnten bei Inkubation beider Formen mit Trypsin keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies könnte zumindest als Hinweis gelten, daß sich die zum nativen Enzym assemblierte K<sup>304</sup> → E-MCADh nicht notwendigerweise sensitiver gegenüber

Proteasen verhält als der wt. Ob sich letzten Endes die Mutation  $K^{304} \rightarrow E$  wirklich als instabil erweist, bleibt ungeklärt.

#### 4.5 Temperatursensitive Synthese versus temperatursensitive Faltung

Anhand der spezifischen Aktivitäten der in pTrc klonierten und in *E. coli* TG 1 exprimierten humanen Acyl-CoA-Dehydrogenasen wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh, kann für beide Enzyme von einer gleichermaßen effizienten Transkriptions- sowie Translationsrate ausgegangen werden. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits für das mitochondriale *sorting* von verschiedenen Autoren [Yokota *et al.*, 1992; Nagao & Tanaka, 1992; Whelan *et al.*, 1993] gezeigt werden. Legt man beiden Enzymen die in den entsprechenden Rohextrakten ermittelten Aktivitäten zugrunde und vergleicht diese mit denen für die homogenen Enzyme bestimmten Werte, so ergeben sich die jeweiligen Anteile löslichen MCAD-Proteins am gesamtlöslichen Protein mit 3,8 % für wt-MCADh, bzw. 4,6 % für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh zu nahezu gleichen Teilen. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits durch Quantifizierung beider Enzyme mittels kompetitiven ELISA-Test gezeigt werden (Abb. 3-3). Im Gegensatz zu bisher publizierten Daten [Coates *et al.*, 1992b; Bross *et al.*, 1995] konnte sogar für die mutante Form  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh ein gegenüber dem wt-Enzym leicht erhöhter Anteil löslichen K304E-Proteins im Rohzelleextrakt bestimmt werden (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1 Reinigungsschema humaner wt- und K304E-MCAD

	<b>wt-MCADh</b> (aus <i>E. coli</i> TG 1/pTrc) <sup>b</sup>	<b>K304E-MCADh</b> (aus <i>E. coli</i> TG 1/pTrc)	<b>K304E-MCADh</b> (aus <i>E. coli</i> JM 109/p985-41)
Aktivität im Roh- extrakt ( $\mu\text{mol}/\text{min} * \text{mg}$ ) <sup>a</sup>	1,6	1,3	0,02 <sup>c</sup>
Aktivität des reinen Enzyms ( $\mu\text{mol}/\text{min} * \text{mg}$ )	41,3	28,3	6 <sup>d</sup>
% Anteil MCADh im Gesamtrohex- trakt	3,8	4,6	$\approx 0,3$
Reinigungsfaktor	25,5	22,1	
Ausbeute (%)	58	9,5	

- a.) Alle Aktivitätsbestimmungen wurden mittels Ferricenium Assay unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Anzuchttemperaturen betragen durchweg 28° C ohne die Co-Expression zusätzlichen GroEl/ES.
- b.) Die für wt-MCADh ermittelten Werte sind einem repräsentativen Reinigungsprotokoll von V. Kieweg entnommen.
- c.) Aus Bross *et al.*, 1995; diese Werte sind teilweise den dortigen Graphiken entnommen und entsprechen insofern nur näherungsweise den absoluten Werten, da keine zahlenmäßigen Angaben über Aktivitäten gemacht wurden. Die dort entnommenen Werte wurden auf  $\mu\text{g}/\text{min} * \text{mg}$  umgerechnet.
- d.) Aus Bross *et al.*, 1993.

Die Expression klonierter Gene verursacht bei der Synthese des Zielproteins in Fremdzellen nicht selten die Akkumulation des betreffenden Polypeptids als Aggregat nicht-nativer Strukturen, die sich phänotypisch in Form sogenannter *inclusion bodies* äußern [Kiefhaber *et al.*, 1991]. *In vitro* sowie *in vivo* stellen diese Strukturen vermutlich Intermediate eines ansonsten produktiven Faltungsweges dar. [Cleland, J.L. & Wang, D.I., 1990]. Verschiedene Faktoren wurden in direkten Zusammenhang mit diesen Aggregationsphänomenen gebracht, deren wichtigster –zumindest für die Expression eukaryontischer Gene in *E. coli*– in der Anzuchttemperatur der betreffenden Zellen zu sehen ist. Mitraki und Mitarbeiter sowie Goldenberg und King konnten durch Versuche zur Faltung bzw. Aggregation des Adsorptionsproteins des *Salmonella*-Phagen P22, den Mutantentypus einer temperatursensitiven Faltung (tsf) nachweisen [Mitraki *et al.*, 1991; Goldenberg & King, 1981]. Ausschlaggebend für eine erfolgreiche, bzw. abortive Faltung, scheint hierbei die zur Expression des mutanten Zielproteins gewählte Inkubationstemperatur zu sein. (Durch gezielte *Second-site*-Mutagenese läßt sich dieser Genotypus erfolgreich supprimieren). Das zum nativen

Protein assemblierte tsf-Protein, das sich in der Mehrzahl der untersuchten Fälle durch einen einzelnen Aminosäureaustausch vom Wildtyp unterscheidet [Goldenberg & King, 1981], entspricht in seinem Thermostabilitätsprofil vollkommen dem des Wildtyps.

Hier stellt sich die Frage, inwiefern K<sup>304</sup> → E-MCADh dem Geno- und Phänotypus der tsf-Mutation entspricht. Bross und Mitarbeiter konnten zeigen, daß in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur sowohl für plasmidcodierte K<sup>304</sup> → E-MCADh aus *E. coli*, als auch für homo- und heterozygot exprimierte MCADh aus Lymphoblastoidzellen eine Korrelation der Faltung mit der entsprechenden Temperatur einherzugehen scheint [Bross *et al.*, 1995; A. Nandy, persönliche Mitteilung). Zwar kann dies als markanter Hinweis einer tsf-Mutation dienen, da zumindest *ein* Schritt auf dem Weg zur Faltung humaner K<sup>304</sup> → E-MCADh temperaturabhängig zu sein scheint [Bross *et al.*, 1995; Saijo *et al.*, 1994). Dennoch kann K<sup>304</sup> → E-MCADh diesem Genotyp nicht zweifelsfrei zugeordnet werden. Entscheidend hierfür sind die für das homogene K<sup>304</sup> → E-Protein im Vergleich zum Wildtyp bestimmten Stabilitäts- sowie Aktivitätsparameter. Wie sich aus den Temperaturstabilitätsprofilen der betreffenden Enzyme zeigte, ergab sich hier eine deutliche Verschiebung zu niedrigeren Stabilitätswerten für die K<sup>304</sup> → E-Mutation. Ebenso erreichte die spezifische Aktivität des gereinigten K<sup>304</sup> → E-Enzyms die Aktivität des Wildtyp-Enzyms nur zu ca. 60% – 80% (respektive ca. 40% für den natürlichen Elektronenakzeptor ETF). Folgt man der Definition der tsf-Mutation - eine die Faltung bzw. den Faltungsweg des jeweiligen Proteins betreffende Mutation *ohne* phänotypische Auswirkung auf das assemblierte Endprodukt - so stehen diese Beobachtungen in klarem Widerspruch dazu. So scheint sich gerade bei K<sup>304</sup> → E-MCADh der Phänotypus eines thermolabilen Endproduktes ebenfalls für das assemblierte Protein zu bewahrheiten und beschränkt sich somit keinesfalls nur auf diejenigen Schritte, die zu dessen Bildung notwendig sind. Dabei tritt die Mutation in spezieller Form bezüglich der Aktivitäten mit dem natürlichen Elektronenakzeptor ETF in Erscheinung.

K304E-MCADh  
Helices H (aa-Position 292-318)

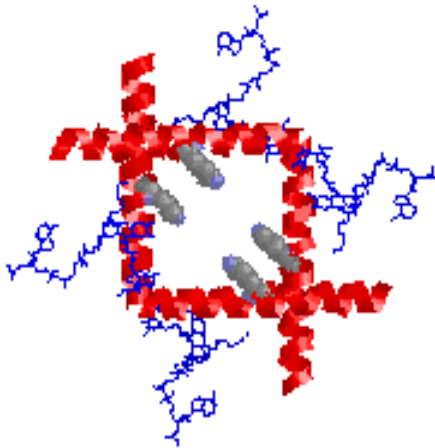


Abbildung 4-1

Ladungsverteilung innerhalb der Helix H in direkter Nachbarschaft der aa-304 der K<sup>304</sup> → E-MCADh. Die beiden negativ geladenen aa der Helix-H <sup>304</sup>E und <sup>300</sup>E liegen unmittelbar beieinander.

Proteinaggregation ist die häufigste Nebenreaktion auf dem Weg der Faltung zum nativen Protein. Die Endprodukte dieser

abortiven Faltung äußern sich *in vivo* oft als dichte, meist unlösliche *inclusion bodies* [Mitraki, A. & J. King, 1989; Haase-Pettingell & King, 1988]. Ähnlich der Situation *in vitro* kann *in vivo* ebenso davon ausgegangen werden, daß Aggregationsprozesse mit korrektem Assembly bzw. korrekter Faltung zum nativen Protein kompetieren [Kiefhaber *et al.*, 1991]. Eine eindeutige Abhängigkeit wie beispielsweise Hydrophobizität, Größe oder Struktur einzelner Untereinheiten, die zur Bildung von *inclusion bodies* führen, ist hierbei jedoch nicht nachweisbar. Als einzig gesichertes Kriterium zur Unterdrückung inkorrekt gefalteter Polypeptidketten gilt allgemein die Erniedrigung der Wachstums- bzw. Expressionstemperatur [Schein, 1989; Schein, 1988; Thatcher & Hitchcock, 1994].

In verschiedenen, von A. Nandy durchgeführten Studien zur Expression der humanen Acyl-CoA Dehydrogenasen konnte eine optimale Wachstumstemperatur von 28° C ermittelt werden [Nandy, 1996; Dissertation Konstanz]. Nach den heute gültigen Modellen zur Bildung von *inclusion bodies* bzw. zur korrekten Proteinfaltung, können diese Ergebnisse folgendermaßen interpretiert werden:

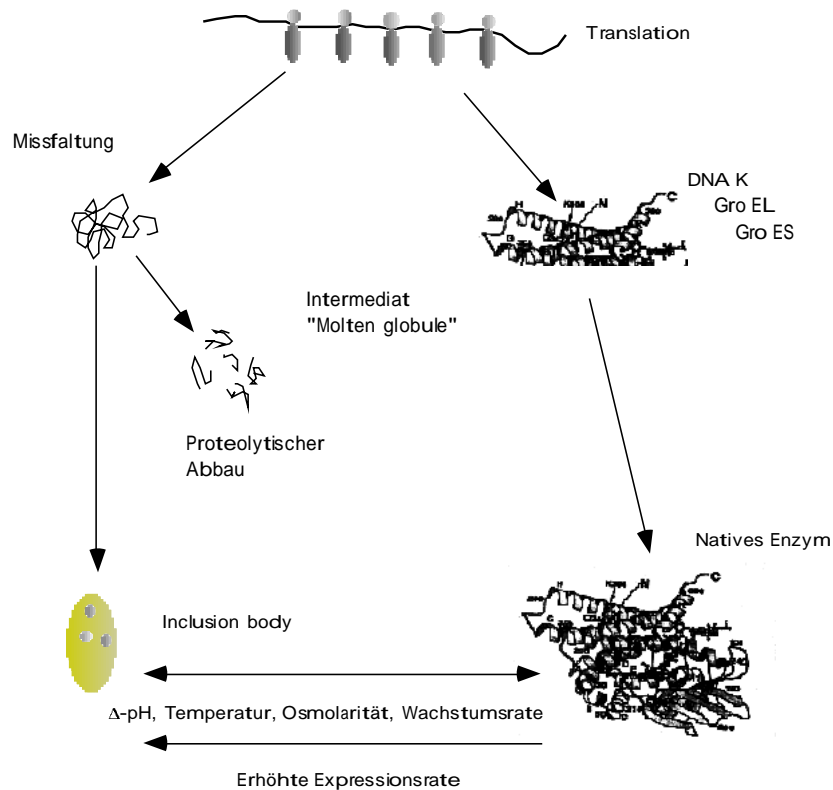


Abbildung 4-2 Vereinfachtes Modell zur Entstehung von Inclusion bodies bzw. der korrekten Faltung von Proteinen.  
(nach Thatcher & Hitchcock, 1994, modifiziert)

Der Ertrag an korrekt gefaltetem Protein wird - nach *in vivo* Studien - hauptsächlich durch zwei kompetitierende Prozesse beeinflusst:

- I. einer Reaktion erster Ordnung, die in der Faltung zum nativen Protein (-oligomer) resultiert.
- II. einer Reaktion zweiter (oder höherer) Ordnung, die sich in der Aggregation von *non-native* Peptiden äußert.

Nach den heute gültigen Modellen zur Faltung nascierender Proteine müssen verschiedene Vor- oder Zwischenstadien durchlaufen werden, bevor das betreffende Protein als vollständig gefaltet gelten kann [Jaenicke, 1999]. Zusammenfassend gilt für diese, als Intermediate  $I_1 - I_N$  bezeichneten Zustände, das Vorhandensein unterschiedlicher Sekundärstrukturen. Erst bei Vorliegen distinkter Sekundärstrukturen kann eine Bindung durch molekulare Chaperone erfolgen, die durch ihre Assoziation mit dem nascierenden Protein ihre protektive oder faltungsunterstützende Rolle entfalten.

Als Reaktion zweiter oder höherer Ordnung ist die Aggregation nicht-nativer Polypeptidketten abhängig von der Konzentration der Edukte und somit in

hochkonzentrierten Lösungen stark favorisiert. Dies gilt vor allem für Proteine, die unter der Kontrolle starker Promotoren synthetisiert bzw. überexprimiert werden und daher als nicht- oder nur partiell gefaltete Polypeptidketten zunächst in sehr hoher Kopienzahl in der Zelle vorliegen [Price, 1994]. Zieht man den Enthalpie-Term  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  aus thermodynamischen Überlegungen mit in Betracht, wird eine Aggregation naszierender Polypeptidketten aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit steigender Temperatur um so wahrscheinlicher. Aufgrund dieser Überlegungen und aufgrund der Anwesenheit des starken T7-Promotors in einigen Plasmidkonstrukten erschien die Anzucht und Expression rekombinanter Acyl-CoA-Dehydrogenasen bei Temperaturen unterhalb der physiologischen Temperatur als der am meisten geeignete und am einfachsten zu manipulierende Parameter zur Erzielung maximaler Ausbeuten an rekombinantem Protein.

## 4.6 Zur Rolle molekularer Chaperone

Bochkareva und Mitarbeiter [Bochkareva *et al.*, 1988] konnten anhand des Vorläuferproteins der periplasmatischen  $\beta$ -Lactamase erstmals nachweisen, daß in *E. coli* für exportierte bzw. sezernierte Proteine eine transiente Bindung molekularer Chaperone an die naszierende und entfaltete Polypeptidkette besteht. In gleicher Weise konnte in der Folge für eine Vielzahl von kompartimentierten Proteinen, ein Chaperon-abhängiger oder zumindest -unterstützter Transport- bzw. Translokationsmechanismus mit anschließend abhängiger Faltung zum nativen Protein nachgewiesen werden. Insbesondere gilt dies auch für den Import mitochondrialer Proteine und deren anschließende, ebenfalls Chaperon-unterstützte, Faltung zum nativen Enzym [Neupert und Pfanner, 1993; Stuart *et al.*, 1994; Martinus *et al.*, 1995]. Als cytosolisch synthetisiertes Protein, dessen Bestimmungs- und Wirkungsort in der mitochondrialen Matrix liegt, scheint MCADh diesem Translokations- und Faltungsmechanismus durch molekulare Chaperone in der gleichen Weise zu gehorchen [Saijo *et al.*, 1994].

Neuere Ergebnisse zeigen, daß das Auftreten diverser Krankheiten mit einer gestörten Proteinfaltung in Zusammenhang gebracht werden kann [Thomas *et al.*, 1995]. Entscheidend hierbei ist nicht allein das Vorhandensein der oft als Ursache geltenden Mutationen, Deletionen oder ähnlichen Defekten auf DNA/Proteinebene, sondern einzig die Inkompetenz, den natürlichen Faltungsweg einzuschlagen. Die

vollständig assemblierten varianten Formen sind in ihrer Funktion und Struktur dabei nicht zwingend verschieden vom Wildtyp, sondern sind im Idealfall von diesem in ihrer Aktivität nicht unterscheidbar und unter physiologischen Bedingungen katalytisch wirksam, wie beispielsweise das CFTR-Protein (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) im Fall der cystischen Fibrose [Thomas *et al.*, 1992; Denning *et al.*, 1992].

Eine Beteiligung durch das *E. coli*-eigene Chaperon GroEL konnte im Rahmen dieser Arbeit zumindest für die mutante Form K<sup>304</sup> → E-MCADh nachgewiesen werden (Abb. 3-8 und Abb. 3-9). Hierbei wurde bei permissiven Wachstums- und Expressionstemperaturen von 28° C der immunbiochemische Nachweis von GroEL in verschiedenen Reinigungsstadien erbracht. Im Gegensatz zu der von Bross beschriebenen Methodik, [Bross *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1995] konnte hier jedoch gänzlich auf die Co-Expression von plasmidcodiertem GroEL/GroES verzichtet werden. Folgt man den Erklärungen, die eingangs zur Bildung von *inclusion bodies* gemacht wurden, so läßt sich diese Beobachtung mit den zur Optimierung der Expression getroffenen Parametern einfach erklären:

Auf die Bereitstellung von zusätzlichem GroEL/S kann bei Temperaturen unterhalb von 37° C verzichtet werden, da die Expressionsrate humaner Acyl-CoA Dehydrogenase genügend langsam verläuft, um einerseits eine Anhäufung– und damit Aggregation– des naszierenden Peptides zu verhindern, zum anderen wird die Wahrscheinlichkeit der Isomerisierung, d.h. der Ausbildung distinkter Sekundärstrukturen, erhöht. Die intrinsische Expressionsrate *E. coli*-eigenen GroELs´ stellt bei den genannten Bedingungen im verwendeten Expressionssystem (*E. coli* TG1; pTrc-K<sup>304</sup> → E-MCADh; 28° C Inkubationstemperatur) genügend Chaperone zur Verfügung, um eine Mißfaltung mit eventuell anschließender Aggregation weitgehend zu verhindern. Dabei scheint die intrazelluläre Konzentration verschiedener heat shock Proteine durch die absolute Menge an entfaltetem Protein reguliert zu werden [Nilsson & Anderson, 1991; Parsell & Sauer 1989]. Die Optimumtemperatur von 28° C unterdrückt zusätzlich die Aggregation aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Die Untersuchungen von A. Nandy bezüglich der Konzentrationen des artifiziellen Induktors IPTG und der somit kontrolliert langsamen Expressionsraten untermauern diese Hypothese [Nandy, A. 1996; Dissertation Konstanz].

Zweifellos scheint die Beteiligung zellulärer Faktoren (Chaperone) bei der Faltung der Acyl-CoA Dehydrogenasen eine wichtige Rolle zu spielen. Dies wurde von verschiedenen Autoren mehrfach berichtet [Yokota *et al.*, 1992; Bross *et al.*, 1993; Bross *et al.*, 1998; Saijo *et al.*, 1994; Wynn *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1995]. Unklar ist jedoch noch, auf welche Weise diese in die Mechanismen, die zu einer korrekten

Faltung führen eingreifen. So wurden verschiedene Interaktionen mutanter Proteine mit molekularen Chaperonen auch bei einer Reihe unterschiedlicher Krankheiten entdeckt. Es ist jedoch nicht geklärt, ob diese Modifikationen die Konsequenz oder aber die Ursache darstellen, die dazu führen, daß ein betreffendes Protein falsch gefaltet wird.

Aufgrund der vergleichbar hohen Aktivitäten, sowie der absoluten Mengen von wt und Mutante nach Aufschluß im Rohzellextrakt (Tabelle 3-1), erscheint es nicht gerechtfertigt, der mutanten Form K<sup>304</sup> → E-MCADh eine gegenüber Proteasen labilere Konformation, oder der Tendenz zur Aggregation eine größere Bedeutung beizumessen. Zusätzliche Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich Temperaturstabilität, Proteaseresistenz untermauern dies. Beiden entfalteten Formen des naszierenden Enzyms kann sehr wahrscheinlich unabhängig von vermeintlich destabilisierenden Mutationen wie z.B. K<sup>304</sup> → E die gleiche protektive Wirkung durch Chaperone und/oder andere zelluläre Faktoren zugeschrieben werden. Dies wird insofern deutlich, als daß die Bindung der Mehrzahl molekularer Chaperone nicht zwingend mit definierten Aminosäuresequenzen verknüpft ist, sondern ungeachtet sequenzieller Präferenzen mit zahlreichen Polypeptiden interagiert [Gething & Sambrook, 1992; Ellis, 1993]. Aus dem gleichen Grund scheint daher auch die Effizienz, mit der beide Enzyme zum nativen, tetrameren Enzym gefaltet und assembliert werden, identisch .

Aus Gründen die eine Klassifizierung als tsf-Mutante in Frage stellen, ist die Definition einer "Faltungsmutante" ebenso kritisch zu betrachten. So erfolgt die Bindung an molekulare Chaperone nicht notwendigerweise *per se*, sondern ist an das Vorhandensein distinkter Sekundärstrukturen, d.h. an Strukturen mit Domänencharakter gebunden [Landry *et al.*, 1992; Shinde und Inouye, 1993; Hartl *et al.*, 1994]. Die mutante Form K<sup>304</sup> → E-MCADh muß also, um ins Mitochondrion translociert zu werden, prinzipiell in der Weise eine faltungskompetente Konformation einnehmen können, um durch die Ausbildung domänenhafter Strukturen die Bindung an (cytosolisches) Hsp70 zu ermöglichen. Saijo und Mitarbeiter konnten zeigen, daß K<sup>304</sup> → E-MCADh diesem vektorialen Transport in die mitochondriale Matrix in der gleichen Weise folgt, wie dies für den Wildtyp beschrieben ist [Saijo *et al.*, 1994]. Sowohl die Bindung des K<sup>304</sup> → E -Vorläuferproteins an Hsp70<sub>mit</sub>, als auch dessen anschließender Transfer auf Hsp60<sub>mit</sub> erfolgen mit der gleichen Effizienz wie für das Vorläuferprotein beschrieben. Markante Unterschiede ergeben sich jedoch hinsichtlich der Verweildauer der Bindung an Hsp60<sub>mit</sub>. Während die Dauer der Bindung des wt-Enzyms mit wenigen Minuten angegeben wird, beträgt diese für die Mutante deutlich länger. Obgleich der genaue Vorgang der Faltung nicht einfach im zellfreien System zu untersuchen ist, scheint es als sehr wahrscheinlich, daß Hsp60<sub>mit</sub> eher am Assembly als an der Faltung des Polypeptides selbst beteiligt zu sein. Aufgrund der Tatsache, daß sich

die Dauer der Bindung beider Moleküle an Hsp60<sub>mit</sub> deutlich voneinander unterscheidet, kann gefolgert werden, daß die Umorganisation der Mutante K<sup>304</sup> → E durch Hsp60<sub>mit</sub> einem anderen Mechanismus wie den für den wt folgt bzw. mehrere Bindungszyklen an mitochondriale Chaperone erfordert. Das Produkt der Bindung an mitochondriales Hsp60 ist dabei in jedem Fall das vollständig assemblierte, tetramere Protein. Inwiefern sich hierbei strukturelle Unterschiede für die nativen Moleküle ergeben kann lediglich aus den kinetischen Daten abgeleitet werden. Allein die Tatsache, daß K<sup>304</sup> → E-MCADh eine längere Verweildauer der Bindung an GroEL aufweist, läßt jedoch noch nicht den Schluß auf eine andersgeartete Konformation zu. Der alleinige Nutzen der Bindung an GroEL besteht letzten Endes nicht in der Beschleunigung der Faltung, sondern lediglich in der Steigerung der Faltungseffizienz sowie des Ertrages an nativ gefaltetem Protein [Martin & Hartl, 1994].

Die Effizienz der Faltung zum nativen Protein scheint also nicht in der Bindung an mitochondriale Chaperone allein zu liegen, sondern wird offensichtlich bereits vorher durch die Abfolge der aa-Sequenz determiniert, die sich in der Ausbildung domänenhafter Strukturen manifestiert.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse muß also geschlossen werden, daß nicht die Faltung der Monomere an sich, sondern das Assembly der einzelnen Monomere zum nativen Tetramer zumindest vom wt verschieden ist. Eine Hypothese, die sich aus diesen Ergebnissen ableiten läßt, weist demnach der K<sup>304</sup> → E-MCADh-Mutation eher den Status einer "Assembly-Mutante", als den einer Faltungsmutante zu. Damit bestätigt sich die Vermutung, daß die Ladungskonstellation an Position 304 und die in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden geladenen Seitengruppen einen gravierenden Effekt auf das Assembly zum tetrameren Protein ausüben. Möglicherweise liegt in dieser verzögerten Tetramerisierung die Ursache der Detektion geringerer Mengen an nativem K<sup>304</sup> → E-MCADh-Protein.

#### 4.6.1 Oligomerisierung versus Faltung

Saijo und Mitarbeiter [1994] konnten zeigen, daß für wt- und K<sup>304</sup> → E-MCADh der Import in die mitochondriale Matrix auf dieselbe Art und Weise erfolgt. Einem gerichteten Transport, der zunächst über die Bindung an mitochondriales Hsp70 erfolgt, folgt die weitere Bindung der nicht-assemblierten Untereinheiten an mitochondriales Hsp60. Dabei scheint es bei der Bindung an Hsp70<sub>mit</sub> zwischen beiden Proteinen keine

Unterschiede zu geben. Ebenso sind die Produkte der daraus resultierenden Interaktion nicht messbar voneinander verschieden. Für beide Enzyme konnte hierbei ein mit der monomeren Form korrelierendes Molekulargewicht zugeordnet werden. Aufgrund der Tatsache, daß in den dort durchgeführten Gelfiltrationsexperimenten jeweils identische  $M_w$ 's festgestellt wurden, muß davon ausgegangen werden, daß beide Formen jeweils das nativ gefaltete Monomer repräsentieren.

Weiterhin scheint auch die sich anschließende Übertragung auf Hsp60<sub>mit</sub> für beide Enzyme identisch abzulaufen. Allerdings schließt sich für K<sup>304</sup> → E-MCADh eine sehr viel längere Verweildauer an Hsp60<sub>mit</sub> an, die ebenfalls mit dem Entlassen des tetrameren Enzyms abschließt. Ob hierbei lediglich mehrere Bindungszyklen an Hsp60<sub>mit</sub> oder aber ein separater Faltungsmechanismus zugrunde liegen, kann nicht mit Sicherheit geschlossen werden. Da für den ersten Schritt – der Bindung der Vorläuferproteine an Hsp 70 – offensichtlich für beide Enzyme die gleiche zeitliche Kinetik gilt, liegt somit der Schluß nahe, daß Faltung und Assembly für beide Formen voneinander zu trennen sind. Der wesentliche Unterschied auf dem Weg zum Erreichen einer nativen Konformation liegt somit möglicherweise in der zeitlichen Sequenz aller notwendigen Schritte zum Assembly. Eine mögliche Ursache dafür könnte beispielsweise in einer Umorganisation bestimmter H-H-Brücken gesehen werden. Schließlich ergaben sich für den Umsatz und die Bindung bzw. die katalytische Effizienz unterschiedlich langer Substrate markante Differenzen im Vergleich zum wt. Da sich die Lokalisation der Acyl-CoA Reste bei Bindung an das Enzym teilweise auf die Kontaktstellen zwischen zwei Dimeren-Paaren ausdehnt, ist eine modifizierte Form einer Substratbindetasche prinzipiell denkbar.

## 4.7 Oligomerisierung - Faltung - Konformation

Verschiedene Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, daß das Einführen einer Punktmutation an Aminosäureposition 304 der humanen MCAD vermutlich weniger drastische Effekte/Folgen mit sich bringt, als bisher vermutet.

Wie aus den Ergebnissen der Titrationskurvenanalyse interpretiert werden kann, scheinen die nativen Konformationen sowohl des wt-MCADh Tetramers, als auch des K<sup>304</sup> → E-MCADh Tetramers nicht meßbar voneinander verschieden zu sein. Aufgrund des Unvermögens, die in "*subunit-contacts*" involvierten Aminosäuren zu titrieren, kann hieraus geschlossen werden, daß beide Enzyme durch korrekte Oligomerisierung der

einzelnen Untereinheiten zum Tetramer assembliert sind. Für diese Annahme spricht der für die jeweiligen Untereinheiten von wt- und K<sup>304</sup> → E-MCADh identische Kurvenverlauf entlang der Iso-pH Linien. Demgegenüber ergäbe sich für die vollständig entfalteten Untereinheiten ein deutlich voneinander verschiedener isoelektrischer Punkt, welcher sich durch eine Parallelverschiebung beider Kurven für die denaturierten Untereinheiten in der Titrationskurvenanalyse bemerkbar machen würde [Righetti *et al.*, 1976]. Dieser beträgt nach theoretischer Berechnung [GeneWorks Version 2.4 "Protein and DNA Analysis" Software Programm) für die Untereinheit des mutanten K<sup>304</sup> → E-MCADh Proteins 6,04 , während für die Wildtyp-Form ein Wert von 7,04 berechnet wird (jeweils inclusive der N-terminalen Met-Reste; eventuelle posttranslationale Modifikationen sind hierbei ausgeschlossen). Ähnliche Werte konnten für die vollständig denaturierten monomeren Formen humaner MCADh nach Expression in *E. coli* von Bross und Mitarbeitern experimentell bestätigt werden [Bross *et al.*, 1994]. Aus der Überlegung experimenteller Daten heraus kann gefolgert werden, daß zwei Proteine mit sehr ähnlichen isoelektrischen Punkten, beziehungsweise elektrophoretischen Mobilitäten nur sehr schwierig respektive gar nicht zu trennen sind. Andererseits ist es für zwei voneinander verschiedene Proteine, selbst wenn deren Sequenzen einander ähnlich sind, unmöglich, exakt gleiche Titrationskurven aufzuweisen.

Aus den Titrationskurven von wt- und K<sup>304</sup> → E-MCADh, welche bei Überlappung absolut deckungsgleich sind, muß zwangsläufig auf das Vorhandensein der gleichen Konformation geschlossen werden. Abweichend zum Kurvenverlauf der vollständig assemblierten Tetramere wären ansonsten zwei deutlich voneinander abgesetzte, jedoch parallele Kurvenverläufe zu beobachten, welche aus einem zweifachen Ladungswechsel resultierten. Selbstverständlich kann sich diese Aussage lediglich auf die im nativen Zustand vorliegenden Tetramere und nicht auf die Mechanismen, die zu deren Bildung führen, beziehen.

#### 4.8 Bedeutung der $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> Gruppe des Lys<sup>304</sup>. Spielt NH<sub>2</sub> eine Rolle bzw. kann der Effekt des 304-Phänotyps durch Ersatz mit einer anderen aa mit einer Desaminierung gleichgesetzt werden?

Bross und Mitarbeiter konnten durch die Konstruktion der Doppelmutante E<sup>300</sup> → K / K<sup>304</sup> → E zeigen, daß mit der Wiederherstellung der Ladungskonstellation in unmittelbarer Nachbarschaft der Aminosäureposition 304, eine Suppression der phänotypischen Auswirkungen der K<sup>304</sup> → E-MCADh -Mutation nicht zwingend verbunden ist [Bross *et al.*, 1995]. Entgegen den Erwartungen, durch Angleichung der Nettoladungsverhältnisse eine der Wildtyp-Situation vergleichbare Umgebung zu schaffen, erschien sowohl die Faltung als auch das *Assembly* zum tetrameren Enzym nicht positiv beeinflussbar zu sein. Der Austausch beider Aminosäuren scheint die reduzierte Kompetenz zu einer korrekten Faltung und Oligomerisierung eher zu verstärken. Aufgrund dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, daß die simple Erhaltung der Nettoladung, nicht zwingend einen positiven Einfluß auf den Erhalt der Faltungskompetenz innerhalb der K<sup>304</sup> → E-MCADh -Mutante besitzt. Viel bedeutender erscheint dadurch die Ausbildung der Salzbrücke zwischen den aa Glu<sup>300</sup> und Arg<sup>383</sup> deren Formierung sich direkt auf das *Assembly* der Monomeren auswirkt während die Interaktion zwischen den aa Glu<sup>304</sup> und Arg<sup>383</sup> von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint.

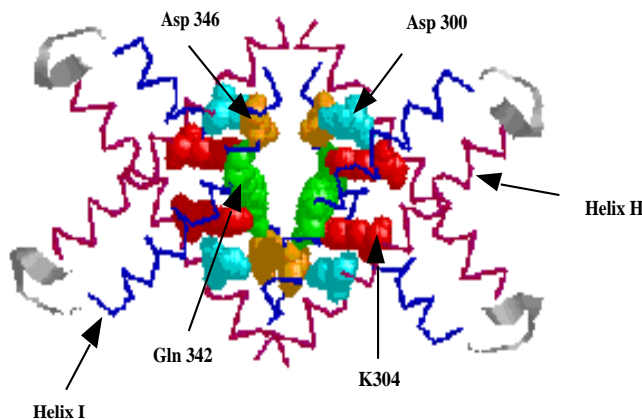


Abbildung 4-3 Ladungsverteilung innerhalb der Helices H und I der humanen Acyl-CoA Dehydrogenase in unmittelbarer Nachbarschaft von K<sup>304</sup>.

Die zu K<sup>304</sup> benachbarten, negativ geladenen Seitenketten Asp 300, Gln 342 und Asp 346 sind entsprechend farblich abgesetzt.

Ebenso wenig scheint die Einführung der Doppelmutation  $K^{304} \rightarrow E/D^{346} \rightarrow K$  die Ladungseffekte gänzlich zu kompensieren. Obwohl im Vergleich zur  $K^{304} \rightarrow E$ -Mutation offensichtlich größere Mengen in den entsprechenden Extrakten messbar sind, besteht auch hier eine starke Abhängigkeit von der Anwesenheit molekularer Chaperone. Yokota und Mitarbeiter [1992b] konnten zeigen, daß unabhängig von der Ladung an aa-Position 304 zumindest die Vorläuferproteine korrekt in das Mitochondrium importiert und dort zum nativen Monomer gefaltet werden. Sowohl die Faltung zum nativen Monomer, als auch das anschließende Assembly zum tetrameren Protein scheinen durch den Erhalt einer positiven Ladung unbeeinflusst zu sein. Durch Einbau eines Arg-Restes anstelle eines Lys in Position 304 ist durch den Erhalt einer positiven Ladung an der aa-Position 304 eine der wt-Situation vergleichbare Umgebung geschaffen. Damit ist nicht der Erhalt der Nettoladung in unmittelbarer Nachbarschaft von aa 304, sondern explizit das Vorhandensein einer positiven Ladung an aa-Position 304 essentiell. Versuche von Bross und Mitarbeitern [1995] unterstützen diese Hypothese durch Studien mit ungeladenen aa an Position 304, deren Phänotyp mit dem der  $K^{304} \rightarrow E$ -Mutation durchaus vergleichbar ist.

Um die Einflüsse der Ladung auf das native, tetramere Enzym zu testen und um vermeintliche Instabilitäten zu bestätigen böte sich in Bezug auf das obengenannte folgender Versuch an:

Unter allen, bei physiologischen pH-Werten geladenen Aminosäuren, stellt die Imidazoliumseitengruppe des His mit einem pK-Wert von ca. 6,0 die einzige ionisierbare Aminosäure innerhalb physiologisch relevanter pH-Intervalle dar. Das bedeutet, daß bei einem entsprechenden pH von 6,0 die Imidazoliumgruppe nur zu ca. 50% in positiv geladener Form vorliegt. Eine Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich hat damit zur Folge, daß sich die Ladung des His von positiv nach neutral verschiebt. Dadurch ergäbe sich, bei Einbau eines His anstelle von Lys, eine sehr einfache Möglichkeit, in Abhängigkeit des pH-Wertes die Stabilität des entsprechenden Proteins zu *in vitro* modulieren.

## 4.9 Ausblick

Trotz erfolgreicher Reinigung verschiedener menschlicher Acyl-CoA Dehydrogenasen aus *E. coli* stellt sich die Frage, inwiefern das vorgeschlagene Schema modifiziert bzw. verbessert werden kann. Da eine Reduktion auf weniger chromatographische Schritte nicht ohne weiteres möglich erscheint, sind verschiedene Ansatzmöglichkeiten beispielsweise in der Art und Weise der Klonierung zu sehen. Ein gängiges Konzept könnte die Klonierung der entsprechenden Gene in Form verschiedener Fusionsproteine vorsehen, die, nach geeigneter Behandlung mit spezifischen Proteasen, die Freisetzung des (nativen) Proteins erlauben. Eine Beibehaltung von lediglich zwei chromatographischen Schritten wäre hierbei durchaus denkbar.

Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung mehrerer Entsalzungsschritte bietet die einfache Verdünnung der Probe auf Leitfähigkeitswerte, die dem Startpuffer des jeweils nächsten chromatographischen Schrittes entsprechen. In Anbetracht der ansonsten robusten Reinigungsprozedur scheint dies die einfachste Möglichkeit, eventuelle Verluste durch Umpufferungsschritte zu kompensieren. Denkbar ist auch der umgekehrte Fall, durch Zugabe von AS einen chromatographischen Reinigungsschritt mittels hydrophober Interaktionschromatographie einzuschieben um dadurch den ohnehin hohen Salzgehalt nach fraktionierter Präzipitation durch einen absteigenden AS-Gradienten zu minimieren. Bei geeigneter Wahl der Pufferzusammensetzung sowie des Trägermaterials kann die Elution des Zielproteins im günstigsten Falle nahezu salzfrei erfolgen, d.h. die drastischen Aktivitätseinbußen durch Entsalzung nach AS-Präzipitation wären damit hinfällig.

Als letzte Möglichkeit kann die Verwendung der sog. *Expanded bed adsorption* in Betracht gezogen werden. Diese Technik nutzt die unterschiedliche Dichte einzelner Chromatographie *Beads*, um das Gelbett (bei Auftragung in der Gegenrichtung; Chromatographie "von unten nach oben") zu expandieren und dadurch extreme Zwischenräume zwischen den einzelnen *Beads* zu generieren. Der Vorteil dieser Technik besteht zum einen in der Verwendung extrem hoher Flußraten, zum anderen kann der ungeklärte Rohzellextrakt ohne weitere Vorbereitung direkt appliziert werden. Hinsichtlich der großen Volumina und der dadurch entstehenden langen Chromatographiezeiten wäre sowohl eine Verkürzung als auch eine Effizienzsteigerung der gesamten Prozedur durchaus denkbar. Möglicherweise kann hierbei sogar auf eine fraktionierte Präzipitation verzichtet werden.

## 5 Zusammenfassung

Ausgangspunkt und Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer effizienten und ökonomischen Isolationsmethode rekombinant hergestellter, nativer und mutanter Formen der humanen Acyl-CoA Dehydrogenase mit unterschiedlichen Kettenlängenspezifitäten. Das besondere Interesse galt dabei der Charakterisierung der am häufigsten anzutreffenden Mutation der mittelkettenspezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh, die hauptsächlich im Zusammenhang mit dem "plötzlichen Kindstod" (SIDS) steht.

Bedingt durch die Einführung der aa Glu anstelle des natürlich vorkommenden Lys-Restes, ergibt sich für das mutante Enzym ein Ladungswechsel von positiv zu negativ, der vermutlich mit einer Destabilisierung des Enzyms einhergeht. Frühere Versuche zur Charakterisierung des Enzyms scheiterten daher aufgrund des Unvermögens,  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh in ausreichender Menge in nativer Form zu isolieren. Ein häufig auftretendes Phänomen, welches unabhängig vom verwendeten Organismus stets beobachtet werden konnte, war einerseits das Vorliegen des Enzyms in Form inaktiver Aggregate, andererseits das völlige Fehlen des Proteins aufgrund vorzeitiger Degradation bzw. Instabilität.

Durch die Etablierung eines Verfahrens, das auf der Detektion und Quantifizierung durch monospezifische Antikörper basierte, konnte unabhängig von der enzymatischen Aktivität der Nachweis, sowie eine Konzentrationsbestimmung rekombinanter MCADh im Rohzellextrakt erbracht werden. Es konnte gezeigt werden, daß wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh durchaus in vergleichbaren Mengen in der Zelle vorliegen können, sich aber hinsichtlich ihrer Aktivitäten und möglicherweise auch in ihren Konformationen unterscheiden. Damit konnte die ansonsten ausschließlich spektralphotometrisch erfolgende Konzentrationsbestimmung umgangen, und eine näherungsweise Quantifizierung der entsprechenden Proteine beispielsweise im Rohzellextrakt durchgeführt werden.

Ein wesentlicher Beitrag, der zu einer gesteigerten Expression der rekombinanten Enzyme im verwendeten Zellsystem führte, bestand in den von A. Nandy durchgeführten Klonierungs- und Expressionsstudien. Mit Hilfe verbesserter Expressionsvektoren gelang es schließlich, wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh bei geeigneten Anzuchtbedingungen in einem für weitere Experimente ausreichenden Maßstab zu exprimieren. Der maßgebliche Anteil dieser Arbeit an der Charakterisierung humaner wt- und  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh bestand in der Etablierung eines optimierten Reinigungsprotokolles zur Darstellung der nativen Enzyme. Eine Standardmethode, die im Idealfall mit zwei bis maximal drei säulenchromatographischen

Schritten auskam, konnte schließlich für die Isolation verschiedener Acyl-CoA Dehydrogenasen erarbeitet werden. Hierbei gelang es erstmals, die mutante Form  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh als reines Enzym darzustellen und eingehend biochemisch zu charakterisieren. Ebenso konnte die humane langkettenspezifische Acyl-CoA Dehydrogenase (LCADh) als rekombinant exprimiertes Enzym isoliert und charakterisiert werden. Im Verlauf der Isolation der  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh konnte zumindest eine transiente Bindung der mutanten Form an molekulare Chaperone nachgewiesen werden. Durch den spezifischen Nachweis mit anti-GroEL und anti-MCADh-Antikörpern konnte somit ein beträchtlicher Anteil des rekombinanten Proteins in Form hochmolekularer Aggregate bzw. Proteinkomplexe detektiert werden. Zweifellos dient dies als wichtiger Hinweis einer Chaperon-abhängigen, oder zumindest unterstützten Faltung auf dem Weg zum nativen Protein.

Entgegen früherer Arbeiten konnte für  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh in kinetischen Untersuchungen eine dem wt nahezu vergleichbare katalytische Aktivität mit dem artifiziellen Elektronenakzeptor Ferriceniumhexafluorophosphat zugeordnet werden. Hierbei ergaben sich jedoch hinsichtlich der Effizienz des Umsatzes sowie der Präferenz zum Umsatz unterschiedlich langer Acyl-Substrate markante Unterschiede.  $K^{304} \rightarrow E$ -MCADh zeigte die größte Effizienz in der Oxidation von  $C_{12}$ -Substraten im Gegensatz zum wt mit  $C_8$ -Substraten. Ein weiterer Hinweis, der auf ein modifiziertes Bindungsverhalten schließen ließ, ergab sich aus Bleichungsexperimenten mit Substraten unterschiedlicher Kettenlänge. Dabei wurden die in den kinetischen Experimenten ermittelten Daten bezüglich der Substratpräferenzen bestätigt. Während sich mit dem artifiziellen Elektronenakzeptor  $FcPf_6$  kinetisch ähnliche Daten im Vergleich zum wt ergaben, zeigten Ergebnisse mit dem natürlichen Akzeptor ETF deutliche Unterschiede. Es konnte letzten Endes nicht geklärt werden, wodurch diese Differenzen hervorgerufen werden. Wahrscheinlich ist jedoch, daß zwar trotz Austausch der aa Lys gegen Glu ein Assembly zum nativen Protein möglich ist, eine insgesamt aber modifizierte Konformation im Vergleich zum wt vorliegt. Möglicherweise führt diese Modifikation dazu, daß der natürliche Akzeptor ETF in seiner Bindung an das Enzym gestört oder sterisch gehindert wird.

In Analogie zur mittelketten-spezifischen Acyl-CoA Dehydrogenase wurde die humane langkettenspezifische Acyl-CoA Dehydrogenase isoliert. LCADh wurde als tetrameres Enzym mit einem MW von 199,5 kD isoliert. Es gelang erstmals, anhand rekombinant hergestellter humaner LCAD, katalytische und substratspezifische Untersuchungen durchzuführen und in direkten Vergleich mit dem mittelketten-spezifischen Enzym zu stellen. Infolge dieser Untersuchungen konnte eine Röntgenstrukturanalyse der wt-LCADh

durchgeführt werden [Kim *et al.*, 1994], die mit der Aufklärung katalytisch relevanter aa-Reste abgeschlossen wurde [Djordjevic *et al.*, 1994].



- Ayoub, A.** (1992) Untersuchungen zur Optimierung der Expression der menschlichen Acyl-CoA Dehydrogenase in *Escherichia coli*. Diplomarbeit Konstanz, 1992
- Becker, D.F., Fuchs, J.A., Banfield, D.K., Funk, W.D., MacGillivray, R.T.A. and Stankovich, M.** (1993) Characterization of wild-type and active-site mutant in *Escherichia coli* of short-chain acyl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochemistry* **32** 10736-10742
- Beinert, H.** (1962) Acyl Dehydrogenases from Pig and Beef Liver and Beef Heart. *Meth. Enz.* **5** 546-557
- Beinert, H., and Page, E.** (1957) On the mechanism of dehydrogenation of fatty acyl derivatives of coenzyme. *A J. Biol. Chem.* **225** 479-497
- Birktoft, J.J., Holden, H.M., Hamlin, R., Xuong, N.H. and Banaszak, L.J.** (1987) Structure of L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase: preliminary chain tracing at 2,8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (23), 8262-8266
- Bochkareva, E.S., Lissin, N.M. and Girshovich, A.S.** (1988) Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature* **336** 254-257
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72** 248-254
- Bross, P., Andresen, B.S. and Gregersen, N.** (1998) Impaired folding and subunit assembly as disease mechanism: the example of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **58** 301-337
- Bross, P., Andresen, B.S., Winter, V., Kräutle, F., Jensen, T.G., Nandy, A., Kølvråa, S., Ghisla, S., Bolund, L. and Gregersen, N.** (1993) Co-overexpression of bacterial GroESL chaperonins partly overcomes non-productive folding and tetramer assembly of *E. coli*-expressed human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) carrying the prevalent disease-causing K304E mutation. *Biochem. Biophys. Acta* **1182** 264-274
- Bross, P., Engst, S., Strauss, A.W., Kelly, D.P., Rasched, I. and Ghisla, S.** (1990) Characterization of wild-type and an active site mutant of human medium chain acyl-CoA dehydrogenase after expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265** (13) 7116-7119

- Bross, P., Jensen, G., Andresen, B.S., Kjeldsen, M., Nandy, A., Kølvråa, S., Ghisla, S., Rasched, I., Bolund, L. and Gregersen, N.** (1994) Characterization of Wild-Type Human Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) and Mutant Enzymes Present in MCAD-Deficient Patients by Two-Dimensional Gel Electrophoresis: Evidence for Post-Translational Modification of the Enzyme. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **52** 36-44
- Bross, P., Jensen, T., Kräutle, F., Winter, V., Andresen, B.S., Engst, S., Bolund, L., Kølvråa, S., Ghisla, S., Rasched, I. and Gregersen, N.** (1992) Characterization of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) with a point mutation associated with MCAD deficiency. In: P. M. Coates and K. Tanaka (Ed.) *New Developments in Fatty Acid Oxidation*. New York, Wiley-Liss., **375** 473-478,
- Bross, P., Jespersen, C., Jensen, T.G., Andresen, B.S., Kristensen, M.J., Winter, V., Nandy, A., Kräutle, F., Ghisla, S., Bolund, L., Kim, J.-J. and Gregersen, N.** (1995) Effects of two mutations detected in medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficient patients on folding, oligomer assembly and stability of MCAD enzyme. *J. Biol. Chem.* **270** 10284-10290
- Bross, P., Kräutle, F., Stiemke, J., Ghisla, S. and Rasched, I.** (1991) Biochemical Characterization of a Mutant Human Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase Present in Patients Having Deficient Activity. In: B. Curti, S. Ronchi and G. Zanetti (Ed.) *Flavins and Flavoproteins* 1990. Berlin, New York, Walter de Gruyter, 895-900
- Carter, M.E., Gulick, T., Raisher, B.D., Caira, T., Ladias, J.A., Moore, D.D. and Kelly, D.P.** (1993) Hepatocyte nuclear factor-4 activates medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene transcription by interacting with a complex regulatory element. *J. Biol. Chem.* **268** (19) 13805-13810
- Cleland, J.L., and Wang, D.I.** (1990) Refolding and aggregation of bovine carbonic anhydrase ; quasi-elastic light scattering analysis. *Biochemistry* **29** (50), 11072-11078
- Coates, P. M. and Tanaka, K.** (1992a) Molecular basis of mitochondrial fatty acid oxidation defects. *J. Lipid Res.* **33** (8) 1099-1110
- Coates, P.M.** (1992b) Historical perspective of medium-chain acyl-CoA deficiency: A decade of discovery. In: P. M. Coates and K. Tanaka (Ed.) *New Developments in Fatty Acid Oxidation*. New York, Wiley-Liss., **375** 409-423,

- Coates, P.M., Indo, Y., Young, D., Hale, D.E. and Tanaka, K.** (1992c) Immunochemical characterization of variant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase in fibroblasts from patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* **31** (1), 34-8
- Crane, F.L. and Beinert, H.** (1956b) On the mechanism of dehydrogenation fatty acyl derivatives of coenzyme A: II. The electron transferring flavoprotein *J. Biol. Chem.* **218** 717-731
- Crane, F.L., Mii, S., Hauge, J.G., Green, D.E. and Beinert, H.** (1956a) On the mechanism of dehydrogenation of fatty acyl derivatives of Coenzyme-A.I. The general fatty Acyl Coenzyme A dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **218** 701-716
- Cull, M. and McHenry, C.S.** (1990) Preparation of extracts from prokaryotes. *Meth. Enz.* **182** 147-153
- Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E. and Welsh, M.J.** (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358** (6389), 761-764
- Ding, J.-H., Roe, C.R., Chen, Y.-T., Matsubara, Y. and Narisawa, K.** (1990) Mutations in medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Lancet* **336** 748-749
- Djordjevic, S., Dong, Y., Paschke, R., Frerman, F.E., Strauss, A.W. and Kim, J.-J.** (1994) Identification of the Catalytic Base in Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenase. *Biochemistry* **33** 4258-4264
- Dommes, V. and Kunau, W.H.** (1984) Purification and properties of acyl coenzyme A dehydrogenases from bovine liver. Formation of 2-trans,4-cis-decadienoyl coenzyme-A. *J. Biol. Chem.* **259** (3) 1789-1797
- Eder, M., Kräutle, F., Dong, Y., Vock, P., Kieweg, V., Kim, J.-J.P., Strauss, A.W. and Ghisla, S.** (1997) Characterization of human and pig kidney long-chain-acyl-CoA dehydrogenases and their role in  $\beta$ -oxidation. *Eur. J. Biochem.* **245** (3), 600-607
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. and Wall, R.** (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179** 125-142
- El-Fakhri, M. and Middleton, B.** (1982) The existence of an inner-membrane bound, long acyl-chain-specific 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* **713** (2), 270-279

- Ellis, R.J.** (1993) The General Concept of Molecular Chaperones. *Phil. Trans. Royal Soc. London* **339** (1289) 257-261
- Engel, P.C.** (1981) Butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Meth. Enz.* **71** 359-366
- Engel, P.C. and Massey, V.** (1971) The Purification and Properties of Butyryl-Coenzyme A Dehydrogenase from *Peptostreptococcus elsdenii*. *Biochem. J.* **125** 879-887
- Fendrich, G. and Abeles, R.H.** (1982) Mechanism of Action of Butyryl-CoA Dehydrogenase: Reactions with Acetylenic, Olefinic, Fluorinated Substrate Analogues. *Biochemistry* **21** 6685-6695
- Finocchiaro, G., Ito, M. and Tanaka, K.** (1987) Purification and properties of short chain acyl-CoA, medium chain acyl-CoA, and isovaleryl-CoA dehydrogenases from human liver. *J. Biol. Chem.* **262** (17) 7982-7989
- Fong, J.C. and Schulz, H.** (1981) Short-chain and long-chain enoyl-CoA hydratase from pig heart muscle. *Meth. Enz.* **71** 390-398
- Frerman, F.E. and Turnbull, D.** (1990) Interaction of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase with substrate and electron transfer flavoprotein. *Prog. Clin. Biol. Res.* **321** 79-89
- Frerman, F.E., Kim, J.J., Huhta, K. and McKean, M.C.** (1980) Properties of the general acyl-CoA dehydrogenase from pig liver. *J. Biol. Chem.* **255** (5) 2195-8
- Furuta, S., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T. and Ui, N.** (1980) Properties of mitochondria and peroxisomal enoyl-CoA hydratases. *J. Biochem.* **88** (4), 1059-1070
- GeneWorks 2.4** IntelliGenetics (1993), Apple Macintosh
- Gething, M.J. and Sambrook, J.** (1992) Protein Folding in the Cell. *Nature* **355** (6355) 33-45
- Ghila, S., Thorpe, C. and Massey, V.** (1984) Mechanistic studies with general acyl-CoA dehydrogenase and butyryl-CoA dehydrogenase: evidence for the transfer of the beta-hydrogen to the flavin N(5)-position as a hydride. *Biochemistry* **23** (14) 3154-3161
- Gibson, T.J.** (1984). Studies on the Epstein-Barr virus genome Ph.D., Cambridge University, England,

- Goldenberg, D.P. and King, J.** (1981) Temperature sensitive mutants blocked in the folding or subunit assembly of bacteriophage P22 tail spike protein. II. Active mutant proteins matured at 30° C. *J. Mol. Biol.* **145** 633-651
- Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A. and Lorimer, G.H.** (1989a) Reconstitution of active dimeric ribulosebisphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* **342** 884-889
- Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. and Lorimer, G.H.** (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* **337** 44-47
- Gregersen, N., Andresen, B.S., Bross, P., Winter, V., Rüdiger, N., Engst, S., Christensen, E., Kelly, D., Strauss, A.W., Kølvråa, S., Bolund, L. and Ghisla, S.** (1991) Molecular characterization of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: identification of a lys<sup>329</sup> to glu mutation in the MCAD gene, and expression of inactive mutant enzyme protein in *E. coli*. *Hum Genet* **86** (6) 545-551
- Haas, E.** (1938) Isolierung eines neuen gelben Ferments. *Biochem. Zeitschr.* **298** 379-390
- Haase-Pettingell, C.A. and King, J.** (1988) Formation of Aggregates from a thermolabile in vivo folding intermediate in P 22 Teilspike maturation. *J. Biol. Chem.* **263** (10), 4977-4983
- Hall, C.** (1981) Acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria. *Meth. Enz.* **71** 375-385
- Hall, C.L. and Kamin, H.** (1975) The purification and some properties of electron transfer flavoprotein and general fatty acyl coenzyme A dehydrogenase from pig liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **250** (9) 3476-3486
- Hall, C.L., Heijkenskjöld, L., Bártfai, T., Ernster, L. and Kamin, H.** (1976) Acyl Coenzyme A Dehydrogenases and Electron-Transferring Flavoprotein from Beef Heart Mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **177** 402-414
- Harlow, E. and Lane, D.** (1999) Using antibodies: a laboratory manual Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press (Ed.)
- Hartl, F.U., Hlodan, R. and Langer, T.** (1994) Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *TIBS* **19** 20-25
- Hashimoto, T.** (1982) Individual peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes. *Ann. New York Acad. Sci.* **386** 5-12

- Hauge, J.G., Crane, F.L. and Beinert, H.** (1956) On the mechanism of dehydrogenation of fatty acyl derivatives of coenzyme A;III. Palmityl CoA Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **218** 727-733
- Hijikata, M., Wen, J.-K., Osumi, T. and Hashimoto, T.** (1990) Rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase gene. Occurrence of two closely related but differentially regulated genes. *J. Biol. Chem.* **265** 4600-4606
- Ikeda, Y. and Tanaka, K.** (1983) Purification and Characterization of Isovaleryl Coenzyme A Dehydrogenase from Rat Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **258** (2) 1077-1085
- Ikeda, Y., Dabrowski, C. and Tanaka, K.** (1983) Separation and properties of five distinct acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. Identification of a new 2-methyl branched chain acyl-CoA dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **258** (2) 1066-1076
- Ikeda, Y., Hale, D.E., Keese, S.M., Coates, P.M. and Tanaka, K.** (1986) Biosynthesis of variant medium chain acyl-CoA dehydrogenase in cultured fibroblasts from patients with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* **20** (9) 843-847
- Ikeda, Y., Keese, S.M., Fenton, W.A. and Tanaka, K.** (1987) Biosynthesis of four rat liver mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases: in vitro synthesis, import into mitochondria, and processing of their precursors in a cell-free system and in cultured cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **252** (2) 662-674
- Ikeda, Y., Okamura-Ikeda, K. and Tanaka, K.** (1985) Purification and Characterization of Short-chain, Medium-chain, and Long-chain Acyl-CoA Dehydrogenases from Rat Liver Mitochondria. Isolation of the Holo- and Apoenzymes and Conversion of the Apoenzyme to the Holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **260** (2) 1311-1325
- Inagaki, T., Ohishi, N., Bachmann, C., Ghisla, S., Tsukagoshi, N., Udaka, S. and Yagi, K.** (1990) Immunochemical and Molecular Analysis of Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **8** 1-8
- Indo, Y., Yangfeng, T., Glassberg, R. and Tanaka, K.** (1991) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of cDNAs Encoding Human Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase and Assignment of the Location of Its Gene (ACADL) to Chromosome-2. *Genomics* **11** (3), 609-620

- Indo, Y., Yang-Feng, T., Glassberg, R. and Tanaka, K.** (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding human long chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of its gene to chromosome 2. *Prog Clin Biol. Res* **375** 161-167
- Ishii, N., Hijikata, M., Osumi, T. and Hashimoto, T.** (1987) Structural organization of the gene for rat enoyl-CoA hydratase:3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme. *J. Biol. Chem.* **262** (17), 8144-50
- Izai, K., Uchida, Y., Orii, T., Yamamoto, S. and Hashimoto, T.** (1992) Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **267** (2) 1027-1033
- Jaenicke, R.** (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71** 155-241
- Jensen, T.G., Andresen, B.S., Bross, P., Jensen, U.B., Holme, E., Kølvråa, S., Gregersen, N. and Bolund, L.** (1992) Expression of wild-type and mutant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) cDNA in eucaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1180** (1) 65-72
- Jensen, T.G., Bross, P., Andresen, B.S., Lund, T.B., Kristensen, T.J., Jensen, U.B., Winther, V., Kølvråa, S., Gregersen, N. and Bolund, L.** (1995) Comparison between medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase mutant proteins expressed in bacterial and mammalian cells. *Human Mutation* **6** 226-231
- Kelly, D.P., Gordon, J.I., Alpers, R. and Strauss, A.W.** (1989) The tissue-specific expression and developmental regulation of two nuclear genes encoding rat mitochondrial proteins. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase and mitochondrial malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264** (32) 18921-18925
- Kelly, D.P., Kim, J.J., Billadello, J.J., Hainline, B.E., Chu, T.W. and Strauss, A.W.** (1987) Nucleotide sequence of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase mRNA and its expression in enzyme-deficient human tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (12) 4068-4072
- Kelly, D.P., Whelan, A.J., Ogden, M.L., Alpers, R., Zhang, Z.F., Bellus, G., Gregersen, N., Dorland, L. and Strauss, A.W.** (1990) Molecular characterization of inherited medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (23) 9236-9240

- Kemeny, D.M.** (1991) A practical guide to ELISA. (1 ed.). Pergamon Press.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.H. and Buchner, J.** (1991) Protein Aggregation in vitro and in vivo - A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Bio-Technology* **9** (9) 825-829
- Kieweg, V., Kräutle, F.-G., Nandy, A., Engst, S., Vock, P., Abdel-Ghany, A.-G., Bross, P., Gregersen, N., Rasched, I. and Ghisla, S.** (1997) Biochemical characterization of purified, human recombinant Lys304Glu medium-chain acyl-CoA dehydrogenase containing the common disease-causing mutation and comparison with the normal enzyme. *Eur. J. Biochem.* **246** 548-556
- Kim, J.J. and Wu, J.** (1988) Structure of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria at 3-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (18) 6677-6681
- Kim, J.J., Vollmer, S.H. and Frerman, F.E.** (1984) Crystallization and preliminary X-ray data for the general acyl-CoA dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **259** (5) 3318-3319
- Kim, J.J., Wang, M. and Paschke, R.** (1993) Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (16) 7523-7527
- Kim, J.-J., Wang, M., Djordjevic, R. and Paschke, R.** (1992) The three dimensional structure of acyl-CoA dehydrogenases. In: P. M. Coates and K. Tanaka (Ed.) New Developments in Fatty Acid Oxidation. New York, Wiley-Liss., **375** 111-126
- Kim, J.J.P., Wang, M., Djordjevic, S., Paschke, R., Bennett, D.W. and Vockley, J.** (1994) Three dimensional structures of acyl-CoA dehydrogenases: structural Basis of substrate specificity. In: Wiley-Liss (Ed.) "Flavins and Flavoproteins".
- Kispal, G., Sumegi, B. and Alkonyi, I.** (1986) Isolation and characterization of 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase-binding protein from pig heart inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **261** (30), 14209-14213
- Knoop, F.** (1904) Beitr. chem. Physiol. u. Path. **6** 150
- Kølvraa, S., Gregersen, N. and Hobolth, N.** (1982) *In vitro* fibroblast studies in a patient with C6-C10 dicarboxylic aciduria: Evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta* **126** 53-67

- Küchler, B., Abdel-Ghany, A.-G., Bross, P., Nandy, A., Rasched, I. and Ghisla, S.** (1999) Biochemical Characterization of a variant human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase with a disease-associated mutation localized in the active site. *Biochemical Journal* **337** 225-230
- Landry, S.J., Jordan, R., McMacken, R. and Gierasch, L.M.** (1992) Different Conformations for the Same Polypeptide Bound to Chaperones DnaK and GroEL. *Nature* **355** (6359) 455-457
- Lazarow, P.B. and deDuve, C.** (1976) Fatty Acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **73** 2043-2046
- Lazo, O., Contreras, M. and I. Singh** (1990) Topographical localization of peroxisomal acyl-CoA ligases. Different localization of palmitoyl-CoA and lignoceryl-CoA ligases. *Biochemistry* **29** 3981-3986
- Lee, H.-J.K., Wang, M., Paschke, R., Nandy, A., Ghisla, S. and Kim, J.-J.P.** (1996) Crystal structures of the wild type and the Glu367Gly / Thr255Glu mutant of human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase: influence of the location of the catalytic base on substrate specificity. *Biochemistry* **35** 12412-12420
- Lehman, T.C. and Thorpe, C.** (1992) A new form of mammalian electron-transferring flavoprotein. *Source (Bibliographic Citation): Arch. Biochem. Biophys.* **292** (2), 594-599
- Lehmann, T.C. and Torpe, C.** (1990a) Alternate electron acceptors for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase: use of ferricenium salts. *Biochemistry* **29** (47), 10594-10602
- Lehmann, T.C., Hale, D.E., Bahla, A. and Thorpe, C.** (1990b) An acyl-coenzyme A dehydrogenase assay utilizing the ferricenium ion. *Anal. Biochem.* **186** 280-284
- Mannig-Krieg, U., Scherer, P.E. and Schatz, G.** (1991) Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. *EMBO J.* **10** 3273-3280
- Martin, J. and Hartl, F.U.** (1994) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Bioessays* **16** (9) 689-692
- Martinus, R.D., Ryan, M.T., Naylor, D.J., Herd, S.M., Hoogenrad, N.J. and Høj, P.B.** (1995) Role of chaperones in the biogenesis and maintenance of the mitochondrion. *FASEB* **9** 371-378

- Masters, C. and Crane, D.** (1984) The role of peroxisomes in lipid metabolism. *TIBS* July 314-317
- Matarese, V., Stone, R.L., Waggoner, D.W. and Bernlohr, D.A.** (1989) Intracellular fatty acid trafficking and the role of cytosolic lipid binding proteins. *Prog. Lipid Res.* **28** 245-272
- Matsubara, Y., Kraus, J.P., Ozasa, H., Glassberg, R., Finocchiaro, G., Ikeda, Y., Mole, J., Rosenberg, L.E. and Tanaka, K.** (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the entire precursor of rat liver medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **262** (21) 10104-10108
- Matsubara, Y., Kraus, J.P., Yang, F.T., Francke, U., Rosenberg, L.E. and Tanaka, K.** (1986) Molecular cloning of cDNAs encoding rat and human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human chromosome 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (17) 6543-6547
- Matsubara, Y., Narisawa, K., Miyabayashi, S., Tada, K., Coates, P.M., Bachmann, C., Elsas, L.2., Pollitt, R.J., Rhead, W.J. and Roe, C.R.** (1990) Identification of a common mutation in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **171** (1) 498-505
- Middleton, B.** (1975) 3-Ketoacyl-CoA thiolases of mammalian tissue. *Meth. Enz.* **35** 128-13
- Mitraki, A. and King, J.** (1989) Protein folding intermediates and inclusion body formation. *BioTechnology* **7** 690-697
- Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J. and King, J.** (1991) Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science* **253** 54-58
- Miyazawa, S., Furuta, S., Osumi, T., Hashimoto, T. and Ui, N.** (1981) Properties of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase from rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **90** (2), 511-519
- Miyazawa, S., Hayashi, H., Hijikata, M., Ishii, N., Furuta, S., Kagamiyama, H., Osumi, T. and Hashimoto, T.** (1987) Complete nucleotide sequence of cDNA and predicted amino acid sequence of rat acyl-CoA oxidase. *J. Biol. Chem.* **262** (17), 8131-8137

- Miyazawa, S., Ozasa, H., Osumi, T. and Hashimoto, T.** (1983) Purification and properties of carnitine Octanoyltransferase and Carnitine palmitoyltransferase from rat Liver. *J. Biochem.* **94** 529-542
- Nagao, M. and Tanaka, K.** (1992) FAD-dependent regulation of transcription, translation, post-translational processing, and post-processing stability of various mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases and of electron transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation. *J. Biol. Chem.* **267** (25) 17925-32
- Nandy, A.** (1996) Acyl-CoA Dehydrogenasen; Substratspezifität, molekulare Evolution und plötzlicher Kindstod. Dissertation Konstanz, 1996
- Nandy, A., Bross, P., Kräutle, F., Rasched, I. and Ghisla, S.** (1994) Long-chain specific enzyme from medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase. In: K. Yagi (Ed.) "Flavins and Flavoproteins 1993". Berlin New York, Walter deGruyter & Co., 327-330,
- Nandy, A., Kieweg, V., Kräutle, F.-G., Vock, P., Küchler, B., Bross, P., Kim, J.-J., Rasched, I. and Ghisla, S.** (1996) Medium-Long-Chain chimeric human Acyl-CoA Dehydrogenase: Medium-Chain enzyme with the active center base arrangement of Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase. *Biochemistry* **35** (38) 12402-12411
- Neupert, W. and Pfanner, N.** (1993) Roles of molecular chaperones in protein targeting to mitochondria. *Phil. Trans. Royal Soc. London* **339** (1289) 355-362
- Nilsson, B. and Anderson, S.** (1991) Proper and Improper Folding of Proteins in the Cellular Environment. *Ann. Rev. Microbiol.* **45** 607-635
- Osumi, T., Hashimoto, T. and Ui, N.** (1980) Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **87** (6), 1735-1746
- Osumi, T., Ishii, N. and Hashimoto, T.** (1987) Isolation and structural characterization of the rat acylCoA oxidase gene. *J. Biol. Chem.* **262** (17), 8138-8143
- Palosaari, P.M. and Hiltunen, J.K.** (1990) Peroxisomal bifunctional protein from rat liver is a trifunctional enzyme possessing 2-enoyl-CoA dehydrogenase, and delta 3, delta 2-enoyl-CoA isomerase activities. *J. Biol. Chem.* **265** (5), 2446-2449
- Parsell, D.A. and Sauer, R.T.** (1989) Induction of a heat-shock like response by unfolded protein in Escherichia coli : dependence on protein level not protein degradation. *Genes and Development* **3** 1226-1232

- Parsell, D.A. and Sauer, R.T.** (1989) The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* **264** (13) 7590-7595
- Peterson, K.L., Sergienko, E.E., Wu, Y., Kumar, N.R., Strauss, A.W., Oleson, A.E., Muhonen, W.W., Shabb, J.B. and Srivastava, D.K.** (1995) Recombinant human liver medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase: purification, characterization, and the mechanism of interactions with functionally diverse C<sub>8</sub>-CoA molecules. *Biochemistry* **34** 14942-14953
- Pohl, B., Raichle, T. and Ghisla, S.** (1986) Studies on the reaction mechanism of general acyl-CoA dehydrogenase. Determination of selective isotope effects in the dehydrogenation of butyryl-CoA. *Eur. J. Biochem.* **160** (1), 109-115
- Powell, P.J. and Thorpe, C.** (1988) 2-octynoyl coenzyme A is a mechanism-based inhibitor of pig kidney medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase: isolation of the target peptide. *Biochemistry* **27** (21) 8022-8028
- Price, N.C.** (1994) Assembly of multi-subunit structures In R. H. Pain (Ed.), Mechanisms of protein folding. (pp. 160-193). Oxford, New York: IRL Press.
- Rabilloud, T., Carpentier, G. and Tarroux, P.** (1988) Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9** 288-291
- Righetti, P.G. and Gianazza, E.** (1980) pH-mobility curves of proteins by isoelectric focusing combined with electrophoresis at right angles. In: B. J. Radola (Ed.) "Electrophoresis '79." Berlin, deGruyter, 23-38
- Righetti, P.G., Gianazza, E. and Labie, D.** (1978) Protein Titration Curves by Combined Isoelectric Focussing Electrophoresis with Hemoglobin Mutants as Models. *J. Chromatogr.* **166** 455-460
- Roberts, D.L., Frerman, F.E. and Kim, J.J.-P.** (1996) Three dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 14355-14360
- Rosengreen** (1977) In: Radola and Graesslin (Ed.) "Electrophoresis and Isotachophoresis". WdeG, 165-171,
- Ruzicka, F.J. and Beinert, H.** (1977) A new iron-sulfur flavoprotein of the respiratory chain. A component of the fatty acid beta oxidation pathway. *J. Biol. Chem.* **252** (23), 8440-8445

- Saijo, T., Welch, W.J. and Tanaka, K.** (1994) Intramitochondrial folding and assembly of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD). Demonstration of impaired transfer of K304E-variant MCAD from its complex with hsp60 to the native tetramer. *J. Biol. Chem.* **269** (6) 4401-4408
- Schägger, H. and von Jagow, G.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166** 368-379
- Schatz, G.** (1992) Protein Import by Yeast Mitochondria. In: P. M. Coates and K. Tanaka (Ed.) *New Developments in Fatty Acid Oxidation*. New York, Wiley-Liss, Inc., **375** 1-8,
- Schein, C.H.** (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio-Technology* **7** 1141-1149
- Schein, C.H. and Noteborn, M.H.M.** (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favoured by lower growth temperature. *Bio/Technology* **6** 291-294
- Schepers, L.V.V., P.P., Casteels, M., Eyssen, H.J. and Mannaerts, G.P.** (1990) Presence of three acyl-CoA oxidases in rat liver peroxisomes. An inducible fatty acyl-CoA oxidase, and a noninducible trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J. Biol. Chem.* **265** (9), 5242-2546
- Schulz, H.** (1991) Beta oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1081** 109-120
- Scopes, R.K.** (1982) *Protein Purification*, New York: Springer Verlag.
- Shinde, U. and Inouye, M.** (1993) Intramolecular chaperones and protein folding. *TIBS* **18** 442-446
- Shindo, Y. and Hashimoto, T.** (1978) Acyl-coenzyme A synthetase and fatty acid oxidation in rat liver peroxisomes. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **84** (5), 1177-1181
- Sillero, A. and Ribeiro, J.M.** (1989) Isoelectric Points of Proteins: Theoretical Determination. *Anal. Biochem.* **179** (2) 319-325
- Singer, T.P. and Edmondson, D.E.** (1978) Flavoproteins (Overview). *Meth. Enz.* **53** 397-518,
- Singh, I.** (1992) Peroxisomal Activation, Transport and Oxidation of Fatty Acids: Implications to Peroxisomal Disorders. In: P. M. Coates and K. Tanaka (Ed.) *New Developments in Fatty Acid Oxidation*. New York, Wiley-Liss., **375** 211-222,

- Singh, I., Bhushan, A., Relan, N.K. and Hashimoto, T.** (1988) Acyl CoA ligases from rat brain microsomes. An immunochemical study. *Biochem. Biophys. Acta* **963** 509-514
- Staack, H., Binstock, J.F. and Schulz, H.** (1978) Purification and properties of a pig heart thiolase with broad chain length specificity and comparison of thiolase from pig heart and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **253** 1827-1831
- Steyn-Parvé, E.P. and Beinert, H.** (1958) On the Mechanism of Dehydrogenation of Fatty Acyl Derivatives of Coenzyme A VI. Isolation and Properties of Stable Enzyme-Substrate Complexes. *J. Biol. Chem.* **233** (4) 843-852
- Stuart, R.A., Cyr, D.M., Craig, E.A. and Neupert, W.** (1994) Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. *TIBS* **19** 87-92
- Studier, F.W. and Moffat, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7-RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189** 113-130
- Thomas, P.J., Qu, B.-H. and Pedersen, P.L.** (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *TIBS* **20** (November), 456-459
- Thomas, P.J., Shenbagamurthi, P., Sondek, J., Hullihen, J.M. and Pedersen, P.** (1992) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Effects of the most common cystic fibrosis-causing mutation on the secondary structure and stability of a synthetic peptide. *J. Biol. Chem.* **267** (9), 5727-5730
- Thorpe, C., Matthews, R.G. and Williams, C.J.** (1979) Acyl-coenzyme A dehydrogenase from pig kidney. Purification and properties. *Biochemistry* **18** (2) 331-337
- Tolbert, N. E.** (1981) Metabolic Pathways in Peroxisoms and Glyoxisoms. *Ann. Rev. Biochem.* **50** 133-157
- Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** 4350-4353
- Uchida, Y., Izai, K., Orii, T. and Hashimoto, T.** (1992) Novel fatty acid  $\beta$ -oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase / 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / 3-ketoacyl thiolase trifunctional protein. *J. Biol. Chem.* **267** (2) 1034-1041

- Veerkamp, J.H., Peeters, R.A. and Maatman, R.G.H.J.** (1991) Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1081** 1-24
- Voet, D. and Voet, J.G.** (1990) Biochemistry Wiley & Sons.
- Warburg, O. und Chhristian, W.** (1938) Bemerkung über gelbe Fermente. *Biochem. Zeitschr.* **298** 369-377
- Warburg, O. und Christian, W.** (1938b) *Biochem. Zeitschr.* **296** 294
- Whelan, A.J., Strauss, A.W., Hale, D.E., Mendelsohn, N.J. and Kelly, D.P.** (1993) Expression and characterization of human mutant (glutamic acid<sup>304</sup>) medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase in mammalian cells. *Pediatr. Res.* **34** (5) 694-697
- Whitby, L.G.** (1953) A New Method for Preparing Flavine-adenine Dinucleotide. *Biochemistry J.* **54** 437-442
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33** 103-119
- Yokota, I., Coates, P.M., Hale, D.E., Rinaldo, P. and Tanaka, K.** (1991) Molecular survey of a prevalent mutation, <sup>985</sup>A-to-G transition, and identification of five infrequent mutations in the medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene in 55 patients with MCAD deficiency. *Am J Hum Genet* **49** (6) 1280-1291
- Yokota, I., Coates, P.M., Hale, D.E., Rinaldo, P. and Tanaka, K.** (1992a) The molecular basis of medium chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: survey and evolution of <sup>985</sup>A→G transition, and identification of five rare types of mutation within the medium chain Acyl-CoA dehydrogenase gene. In: P.M. Coates and K. Tanaka (Ed.) *New Developments in Fatty Acid Oxidation*. New York, Wiley-Liss. Inc., **375** 425-440
- Yokota, I., Indo, Y., Coates, P.M. and Tanaka, K.** (1990) Molecular basis of medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. An A to G transition at position 985 that causes a lysine-304 to glutamate substitution in the mature protein is the single prevalent mutation. *J Clin Invest* **86** (3) 1000-1003
- Yokota, I., Saijo, T., Vockley, J. and Tanaka, K.** (1992b) Impaired tetramer assembly of variant medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase with a glutamate or aspartate substitution for lysine 304 causing instability of the protein. *J. Biol. Chem.* **267** (36) 26004-26010

**Zhang, Z.F., Kelly, D.P., Kim, J.J., Zhou, Y.Q., Ogden, M.L., Whelan, A.J. and Strauss, A.W.** (1992) Structural organization and regulatory regions of the human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Biochemistry* **31** (1) 81-89

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt posthum meinem Doktorvater Herrn Prof. Ihab Rasched, dessen reges Interesse stets dem Gelingen dieser Arbeit gewidmet war. Seine Diskussionsbereitschaft und sein allezeit vorhandenes Verständnis ließen diese Arbeit einen glücklichen Abschluß nehmen.

Herrn Prof. Sandro Ghisla danke ich für die Überlassung des herausfordernden Themas. Durch seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse konnten viele neue Einsichten in die Geheimnisse der Acyl-CoA Dehydrogenase gewonnen und publiziert werden. Nicht zuletzt danke ich für seine überstrapazierte Geduld, was die Fertigstellung dieser Arbeit anbelangt.

Bei allen Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgruppen Rasched, Ghisla und Pette bedanke ich mich nicht nur für wertvolle Anregungen, sondern auch für die freundschaftliche Atmosphäre in- und außerhalb des Labors:

Ahmed Ayoub, Leonardo Cobianchi, Heike Endemann, Stefan Engst, Bernd Frey, Valerie Gailus, Meera Gandbhir, Sigfried Heinhold, Mahmoud Ibrahim, Anette Karle, Volker Kieweg, Bert Klebl, Bernhard Kraus, Andreas Kremser, Burkhard Kuchler, Thomas Leeuw, Helga Mutzel, Andreas Nandy, Heidi Peuker, Bettina Rampf, Christian Rohrer, Wolfram Schumacher, Michael Schuler, Peter Schwind, Sabine Stassny, Margret Sappelt, Andreas Uber, Petra Vock  
sei an dieser Stelle gedankt.

Frau Heike Endemann danke ich besonders für die Korrektur des Manuskripts.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner lieben Frau Andrea, die mich mit allen erdenklichen Mitteln unterstützte und aufmunterte und mich mit viel Energie, Geduld und Toleranz begleitete.

Meinen Eltern und Geschwistern für jegliche Hilfe und Unterstützung über all die Jahre.