

4 Diskussion

Fettsäuren nehmen im menschlichen und tierischen Organismus eine Reihe wichtiger Funktionen ein. Mengenmäßig stehen dabei die gesättigten und ungesättigten linearen aliphatischen Carbonsäuren im Vordergrund, die insbesondere als Bestandteile von Membranlipiden sowie als Energiereserve in Form von Triglyceriden eine zentrale Rolle spielen. Zur chemischen Substanzklasse der Carbonsäuren gehören aber auch komplexere Moleküle, wie bspw. α -Hydroxysäuren oder Hormone, wie Prostaglandine, andere Eikosatriene oder Retinsäure.

Die β -Oxidation linearer Fettsäuren zur Energiegewinnung ist bei höheren Eukaryoten fast ausschließlich auf die Mitochondrien beschränkt. Inzwischen hat sich jedoch herausgestellt, daß auch die sogenannten Peroxisomen über einen analogen β -Oxidationsweg verfügen, der sich in einigen Punkten vom mitochondrialen Abbauweg unterscheidet. Einer der wesentlichen Unterschiede ist, daß bei der Oxidation der Acyl-CoAs die Reduktionsäquivalente nicht über eine Dehydrogenase auf die Atmungskette übertragen werden, sondern, in einer für Peroxisomen typischen Reaktion, durch eine Oxidase auf molekularen Sauerstoff. Dabei kommt es zur Bildung von H_2O_2 , das dann durch Katalase in H_2O und O_2 disproportioniert wird.

Vor allem aber sind Peroxisomen im Gegensatz zu Mitochondrien in der Lage, auch komplexere Fettsäuren zu oxidieren, z.B. solche mit Kettenlängen von mehr als 22 C-Atomen, langkettige Dicarbonsäuren oder methylverzweigte Fettsäuren. Peroxisomen dienen damit weniger der Energiegewinnung als vielmehr der zellulären „Müllverbrennung“.

Methylverzweigte Fettsäuren werden nicht nur von einer Vielzahl verschiedener Organismen synthetisiert (Jakob, 1976), wie beispielsweise den Mycobakterien (Asselineau, 1966), sondern entstehen auch beim Abbau von Isoprenoiden. Den quantitativ bedeutendsten Vertreter stellt hier sicher die Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) dar, die aus Phytol (3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-en-1-ol), einer Seitenkette des Chlorophylls, über die Nahrung in den menschlichen Stoffwechsel gelangt. Der Abbau von Phytansäure in den Peroxisomen kann aufgrund der β -ständigen Methylverzweigung nicht über die β -Oxidation erfolgen.

Statt dessen muß zuerst durch α -Oxidation die Carboxylgruppe oxidativ abgespalten werden, bevor die, um eine Methylengruppe verkürzte Pristansäure (2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure) über die β -Oxidation weiter abgebaut werden kann, da sich die betreffende Methylgruppe der Pristansäure jetzt in α -Stellung befindet.

Ein wesentliches Problem beim Abbau α -methylverzweigter Fettsäuren ist ihre Stereochemie. Phytansäure kommt natürlicherweise als (3*R*,7*R*,11*R*)- und (3*S*,7*R*,11*R*)-Diastereomer vor (Ackman, 1967). Da die α -Oxidation die Position des β -ständigen Wasserstoffatoms nicht verändert (Avigan *et al.*, 1966; Fingerhut *et al.*, 1993), fällt die daraus resultierende sowie auch die natürlich vorkommende Pristansäure als Gemisch von zwei verschiedenen Stereoisomeren an, der (2*R*,6*R*,10*R*)- und (2*S*,6*R*,10*R*)-Pristansäure (Lough, 1973). Die am weiteren Abbau beteiligten mitochondrialen Acyl-CoA-Dehydrogenasen und peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidasen können stereospezifisch nur Substrate mit einer β -Methylgruppe in (*S*)-Konfiguration umsetzen (Schmitz & Conzelmann, 1997). Für die Oxidation methylverzweigter Fettsäuren ist deswegen die Existenz von Enzymen notwendig, die in der Lage sind, die Stereoisomere von der (*R*)- in die (*S*)-Konfiguration zu überführen. 1994 konnte aus Rattenleber eine spezifische α -Methylacyl-CoA-Racemase isoliert werden, die die α -methylverzweigten Fettsäuren als Coenzym A-Thioester isomerisiert (Schmitz *et al.*, 1994).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst die α -Methylacyl-CoA-Racemase aus humanem Gewebe isoliert und im Vergleich zu dem entsprechenden Enzym aus Rattenleber biochemisch charakterisiert. Anschließend wurde die Racemase parallel zu den Enzymhomologen von Ratte und Maus molekularbiologisch analysiert. Substratspezifität und subzelluläre Lokalisation waren für die physiologische Rolle der Racemase hierbei von besonderem Interesse.

Reaktionsmechanismus und Aktivitätsbestimmung

Die α -Methylacyl-CoA-Racemase katalysiert unter Umkehr der Konfiguration am Stereozentrum den Austausch des Acyl- α -Protons gegen ein Proton aus H₂O (Schmitz *et al.*, 1994).

Analog des postulierten Reaktionsmechanismus für die Methylmalonyl-CoA-Racemase (Stabler *et al.*, 1985), könnte der Austausch über die Abstraktion des α -Protons durch eine basische Gruppe und der Bildung eines resonanzstabilisierten Carbanions erfolgen (Mazumder, 1962), wobei der schnelle Austausch auf einen Mechanismus schließen läßt, an dem zwei Basen beteiligt sind.

Basierend auf dem schnellen Austausch des α -Protons, wurde, entsprechend der Aktivitätsbestimmung der Methylmalonyl-CoA-Racemase (Stabler *et al.*, 1985), durch den Einsatz von [α - ^3H]- α -Methylacyl-CoAs eine radiometrische [^3H]H₂O-Meßmethode für die α -Methylacyl-CoA-Racemase entwickelt (Schmitz *et al.*, 1994). Bei dieser indirekten Aktivitätsbestimmung der α -Methylacyl-CoA-Racemase mußte zunächst sichergestellt werden, daß die [^3H]H₂O-Bildung in erster Linie auf die Racemaseaktivität selbst und nicht auf die Aktivität konkurrierender Enzyme zurückgeht. Beispielsweise zeigte Rhead für die [^3H]H₂O-Bildung aus [2,3- ^3H]Butyryl-CoA einen signifikanten Einfluß der beteiligten Oxidasen und Dehydrogenasen (Rhead *et al.*, 1981). Für die α -Methylacyl-CoA-Racemase aus Ratte wurde hingegen nachgewiesen, daß die Aktivität der peroxisomalen α -Methylacyl-CoA-Oxidase und mitochondrialen α -Methylacyl-CoA-Dehydrogenase in keinem quantitativen Zusammenhang zur Freisetzung von [^3H]H₂O aus [2- ^3H]Pristanoyl-CoA steht (Schmitz *et al.*, 1994). Wie hier gezeigt wurde, geht in menschlichen Geweben die [^3H]H₂O-Bildung aus [2- ^3H]Pristanoyl-CoA fast ausschließlich auf die Aktivität der α -Methylacyl-CoA-Racemase zurück. In Immunpräzipitationstests wurde mit Antikörpern gegen die Racemase eine vollständige Hemmung des Protonenaustauschs in Humanleberextrakten erreicht (2.2.6.2). Daneben konnte bei der Trennung von Racemase und Dehydrogenase gezeigt werden, daß der Anteil der Dehydrogenase an der Bildung von [^3H]H₂O vernachlässigbar gering ist (Schmitz *et al.*, 1994).

Die radiometrische Messung der [^3H]H₂O-Freisetzung zur Bestimmung der Racemaseaktivität ist aus mehreren Gründen vorteilhaft. Im Gegensatz zur direkten Methode anhand einer gaschromatographischen Produktanalyse ist sie sehr schnell durchführbar und äußerst empfindlich. Selbst in subzellulären Fraktionen sowie in Homogenaten von Fibroblasten und fetalen Zellen, in denen nur eine geringe Racemaseaktivität zu verzeichnen ist, läßt die hohe Empfindlichkeit dieser Messung eine zuverlässige Aussage zu. Da auch geringe Mengen von [^3H]H₂O noch genau gemessen werden können, kann die Inkubationszeit kurz gehalten werden. Die [^3H]H₂O-Austauschmethode ist deswegen weniger störanfällig gegenüber inhibierenden Faktoren.

Bei Messungen in Rohextrakten bzw. nur wenig angereicherten Präparaten ist die Messung der $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Freisetzung gegenüber der direkten Produktbestimmung insofern von Vorteil, als daß das Ergebnis vom weiteren Abbau des Produkts nicht beeinflußt wird.

Die Aktivitätsbestimmung über die radiometrische Messung der $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Bildung konnte aus diesen Gründen nicht nur zur Verfolgung der Proteinreinigung und der Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften des humanen Enzyms, sondern daneben auch für diagnostische Zwecke eingesetzt werden. Die exakte Bestimmung der Racemaseaktivität in Zellen fetaler Herkunft, wie Chorionzyten und Amnionzyten, ermöglichte darüber hinaus den Einsatz dieser Meßmethode in der Pränataldiagnostik (siehe 3.3.9).

Biochemische Charakterisierung

Die α -Methylacyl-CoA-Racemase wurde aus Humanleber zur Homogenität gereinigt. Die mittels SDS-Gelelektrophorese und Gelfiltration ermittelten Molekulargrößen der α -Methylacyl-CoA-Racemasen liegen mit 47 kDa für das humane Enzym und 45 kDa für das Rattenenzym dicht beieinander. Da durch Gelfiltration und SDS-PAGE innerhalb der Meßgenauigkeit dieselbe Größe ermittelt wurde, muß die Racemase als Monomer vorliegen. Dementsprechend zeigte das gereinigte Enzym in der SDS-PAGE auch nur eine einzige Bande.

Gegenüber Temperaturerhöhungen über die physiologischen 37°C ist die humane Racemase äußerst empfindlich, bei einer Temperatur von 50°C liegt die Halbwertszeit bei 15 min, das Rattenhomolog zeigt dagegen auch nach 30 min noch keinen Aktivitätsverlust.

Die Racemasen aus Mensch und Ratte besitzen beide ein ähnliches pH-Profil, das pH-Optimum des menschlichen Enzyms ist mit einem Wert von pH 8 allerdings etwas alkalischer als das Optimum des Rattenenzym mit pH 7. Etwa 80 % der maximalen Aktivität der humanen Racemase werden im Bereich von pH 6.5 – 9.0 erreicht. Bei pH-Werten unter 5.0 zeigt das Enzym keine Aktivität, bei einem pH-Wert über 9.5 kann die Aktivität aufgrund der schnellen Hydrolyse der Thioestersubstrate unter alkalischen Bedingungen nicht mehr gemessen werden. Der isoelektrische Punkt der α -Methylacyl-CoA-Racemase aus humanem Gewebe liegt mit einem Wert von pH 5.8 sehr dicht an dem pI der Ratten-Racemase mit einem pH-Wert von 6.1.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen kinetischen Konstanten des menschlichen Enzyms sind in Tab. 4- 1 denen des Enzyms aus Rattenleber (Schmitz *et al.*, 1994) gegenübergestellt. Während

sich die k_M -Werte etwa in derselben Größenordnung bewegen, sind die Wechselzahlen des Rattenenzym offensichtlich wesentlich höher. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß amphiphile Substanzen, wie Acyl-CoAs, in wässriger Lösung Micellen bilden. Die Größe und Struktur solcher Aggregate und damit ihre Zugänglichkeit für das Enzym, wie auch die damit im Gleichgewicht stehenden Konzentration an Monomeren, hängen von zahlreichen Faktoren ab, u.a. von pH und Ionenstärke, so daß derartige Vergleiche nur mit Vorbehalt möglich sind (Tanford *et al.*, 1967).

		Mensch	Ratte
k_M [μM]	Pristanoyl-CoA	172	76
	THCA-CoA	31,6	60
V_{\max} [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$]	Pristanoyl-CoA	0,1	3,5
	THCA-CoA	0,3	31

Tab. 4- 1: Kinetische Konstanten der α -Methylacyl-CoA-Racemase aus Mensch und Ratte.

Im Westernblot ließ sich in Humanleberextrakten mit einem polyklonalen Kaninchen-Antiserum gegen die Racemase aus Rattenleber eine Bande, entsprechend eines Molekulargewichts von 45 kDa, anfärben. Mit diesem monospezifischen Antiserum konnte in einem Immunpräzipitationstest in Rohextrakten aus Human- und Rattenleber sowohl die Freisetzung von $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ aus $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Pristanoyl-CoA}$ und $[24,25\text{-}^3\text{H}]\text{Trihydroxycoprostanoyl-CoA}$ als auch die Racemisierung von (2*R*) und (2*S*)-2-Methylmyristoyl-CoA verhindert werden. Neben der Kreuzreaktivität zwischen dem menschlichen und dem Rattenenzym konnte damit gleichzeitig nachgewiesen werden, daß beide Aktivitäten, also sowohl die $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ -Freisetzung als auch die Racemisierung, zum selben Enzym gehören.

Die Aktivität der α -Methylacyl-CoA-Racemase ist nicht nur auf die Racemisierung von α -methylverzweigten Acyl-CoAs, wie Pristanoyl-CoA und einiger seiner β -Oxidationsprodukte (2,6,10-Trimethylundecanoyl-CoA und 2,6-Dimethylpentanoyl-CoA) (Schmitz *et al.*, 1994) beschränkt, sondern umfaßt alle Arten α -methylverzweigter Isoprenoinderivate. Inhibitionsstudien mit verschiedenen Acyl-CoAs (Abb. 3-18) zeigten eine signifikante kompetitive Inhibition der humanen Racemase mit 2-Methylacyl-CoAs mit einer Kettenlänge von mindestens acht C-Atomen. Neben den Coenzym A-Thioestern verzweigtkettiger Säuren (2-Methylmyristinsäure, Pristansäure) werden auch CoA-Ester von Steroidderivaten (THCA, DHCA) und aromatischer

Phenylpropionsäuren (Ibuprofenoyl-CoA) umgesetzt. Als Substrate der Racemase kommen ausschließlich α -Methylacyl-Coenzym A-Thioester in Frage, freie Fettsäuren, geradkettige oder β -methylverzweigte Acyl-CoAs, wie z.B. Palmitoyl-CoA bzw. Phytanoyl-CoA werden nicht gebunden (Schmitz & Conzelmann, 1997).

Entscheidend für eine Racemisierung ist demzufolge das Strukturmerkmal einer α -Methylcarbonsäure. Für die Erkennung und spezifische Bindung der α -Methylgruppe spricht, daß weder das lineare Palmitoyl-CoA noch das β -methylverzweigte Phytanoyl-CoA als Substrate bzw. kompetitive Inhibitoren akzeptiert werden. Da darüber hinaus ausschließlich CoA-Thioester umgesetzt werden, muß man von einer festen Bindung sowohl der α -Methylgruppe als auch des Coenzym A ausgehen. Die Tatsache, daß die Racemase sowohl verzweigte und cyclische aliphatische als auch aromatische Seitenketten akzeptiert, deutet darauf hin, daß der Rest hinter dem α -C-Atom nicht spezifisch gebunden wird. Der Kohlenwasserstoffrest ist jedoch nicht ganz ohne Einfluß auf die Substratbindung, da für eine Inhibition der Enzymreaktion eine Kettenlänge von mindestens acht C-Atomen erforderlich ist (siehe 3.3.7).

Der Vergleich der Proteinsequenz der Racemase mit den Sequenzen anderer CoA-bindender Proteine erbrachte nicht, wie erhofft, einen Hinweis auf konservierte Sequenzmotive. Von fünfzehn derartigen Enzymen ist bislang die 3 D-Struktur aufgeklärt. Der Vergleich dieser Strukturen ergab zwar gewisse Ähnlichkeiten in der Art der Substratbindung – so ist die 3'-Phosphatgruppe zur wässrigen Phase gerichtet - aber keine konservierten Bereiche für die Interaktion von Protein und Coenzym A (zur Übersicht siehe Engel & Wierenga, 1996). Für die CoA-Bindung werden somit anscheinend keine sequenziell homologen Aminosäuresequenzmotive benutzt, vielmehr sind die Aminosäurereste, die mit dem Substrat interagieren, zum Teil weit über das Protein verteilt.

Aus pharmakologischer Sicht ist die Rolle, die die α -Methylacyl-CoA-Racemase im Stoffwechsel von Ibuprofen und ähnlichen analgetischen und entzündungshemmenden Substraten des 2-Arylpropionsäuretyps spielt, von großem Interesse. Wie hier bei Inhibitionsstudien gezeigt werden konnte, ist der CoA-Ester der 2-Arylpropionsäure Ibuprofen, der auch als α -Methylarylessigsäurederivat angesehen werden kann, in der Lage, die Racemaseaktivität stark zu inhibieren.

Daneben wurde auch eine direkte Isomerisierung von Ibuprofenoyl-CoA durch die gereinigte α -Methylacyl-CoA-Racemase nachgewiesen (Schmitz *et al.*, 1994). *In vivo* konnte die Racemisierung von Ibuprofen (Kaiser *et al.*, 1976) und ihre pharmakologische Bedeutung (Adams *et al.*, 1976) schon 1976 gezeigt werden. Daß die Aktivierung zum CoA-Ester eine notwendige Voraussetzung für die Isomerisierung von Ibuprofen ist, wurde von Knihinicki und Chen nachgewiesen (Chen *et al.*, 1991; Knihinicki *et al.*, 1989). 1993 konnte das diese Reaktion katalysierende Enzym als „2-Arylpropionyl-CoA-Racemase“ aus Rattenleber gereinigt werden (Shieh & Chen, 1993). 1997 wurde die Racemase aus Rattenleber von C. Reichel und Mitarbeitern als „2-Arylpropionyl-CoA-Epimerase“ genauer charakterisiert (Reichel *et al.*, 1997).

Biologische Funktion

Die α -Methylacyl-CoA-Racemase kann CoA-Derivate sehr unterschiedlicher α -Methylcarbonsäuren als Substrate akzeptieren. Mittlerweile kristallisiert sich heraus, daß die Racemase nicht nur beim Abbau exogener verzweigt-kettiger Fettsäuren, wie Pristansäure, eine wichtige Rolle spielt, sondern auch für die Biosynthese von Gallensäuren von entscheidender Bedeutung ist. Ihre Beteiligung an der Gallensäurebiosynthese stellt wahrscheinlich die Hauptaufgabe der α -Methylacyl-CoA-Racemase dar (Schmitz *et al.*, 1994).

Die Gallensäure-Intermediate THCA ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Trihydroxy- 5β -cholestan-26-säure) und DHCA ($3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- 5β -cholestan-26-säure) können nur als (25*S*)-Ester stereospezifisch zu den jeweiligen Gallensäuren Cholsäure bzw. Desoxycholsäure weiter oxidiert werden (Pedersen *et al.*, 1996; Van Veldhoven *et al.*, 1996). Natürlicherweise liegen Di- und Trihydroxycoprostan-säure jedoch zunächst als (25*R*)-Isomere vor, da bei der mitochondrialen Hydroxylierung der Cholesterinseitenkette ausschließlich das (25*R*)-Stereoisomer anfällt (Batta *et al.*, 1983; Shefer *et al.*, 1978). Voraussetzung für eine weitere Umsetzung der Gallensäure-Intermediate ist somit die Racemisierung dieser Isomere.

1997 konnte gezeigt werden, daß die α -Methylcarbonsäuren THCA und DHCA als Substrate von der α -Methylacyl-CoA-Racemase akzeptiert werden (Schmitz & Conzelmann, 1997). In Zelllinien von Patienten mit einem generalisierten peroxisomalen Defekt (Zellweger-Syndrom), in denen nur noch eine geringe Restaktivität der Racemase vorliegt, wurde in der vorliegenden Arbeit eine starke Reduktion der H₂O₂-Bildung aus [24,25-³H]THCA-CoA nachgewiesen.

(25*R*)- und (25*S*)-THCA werden in der Ratte (Gustafsson, 1980) und im Menschen (Swell *et al.*, 1981) in gleichem Maße zu Cholsäure umgesetzt. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß eine schnelle Racemisierung des (25 *R*)- zum (25 *S*)-Isomer erfolgt.

Bisher ist nicht bekannt, ob es außer den Intermediaten der Gallensäurebiosynthese noch andere endogene Substrate der α -Methylacyl-CoA-Racemase gibt. Ein gewisses Indiz in diese Richtung ergibt sich aus einigen pathobiochemisch/ klinischen Beobachtungen, die bei Patienten gemacht wurden, die an einer angeborenen Stoffwechselstörung der β -Oxidation verzweigtkettiger Fettsäuren leiden, wie einem Defekt des MFE-II (multifunktionelles Enzym 2). MFE-II ist für die peroxisomale β -Oxidation von 2-Methylacyl-CoAs notwendig, es handelt sich hierbei um ein trifunktionelles Enzym mit Enoyl-CoA-Hydratase-, 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase- und Enoyl-CoA-Isomerase-Aktivität. Bei Patienten mit einem MFE-II-Defekt kommt es neben den erwarteten hepatischen Dysfunktionen von Geburt an zu schweren neurologischen Ausfallerscheinungen (Suzuki *et al.*, 1997; van Grunsven *et al.*, 1998). Es müssen also auch verzweigtkettige Substrate endogenen Ursprungs existieren, die über diesen Weg in allen Geweben verstoffwechselt werden und für deren Abbau die Racemase zumindest zum Teil notwendig sein sollte. Es konnte gezeigt werden, daß die Racemase in allen untersuchten menschlichen Geweben exprimiert wird. Allerdings ist ihre Aktivität gewebsspezifisch ausgeprägt. In Leber und Niere ist eine besonders hohe Enzymaktivität zu finden, siehe 3.4.3.

Zur genaueren Klärung der physiologischen Rolle der α -Methylacyl-CoA-Racemase und der Konsequenzen eines möglichen Enzymdefekts kann das zur Zeit etablierte transgene Mausmodell mit einem α -Methylacyl-CoA-Racemase-Defekt weitere Aufschlüsse bringen. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand würde ein Ausfall der Racemase sowohl die Gallensäurebiosynthese als auch den Pristansäureabbau blockieren. Allerdings wurden bisher keine eindeutigen Racemase-Defekte beim Menschen beschrieben. In einigen Fällen, z.B. bei isolierter THCA/DHCA-Speicherung in Fibroblasten (Wanders *et al.*, 1991) oder gleichzeitiger Erhöhung des Serumspiegels von THCA/DHCA und Phytansäure (Christensen *et al.*, 1990) wurde ein Defekt der α -Methylacyl-CoA-Racemase diskutiert. Eine isolierte Pristansäurespeicherung wurde noch nicht beschrieben.

cDNA-Sequenzanalyse

Die cDNA-Sequenz der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase besteht aus 2039 Nukleotiden mit einem offenen Leseraster von 1146 Nt. Die unterschiedlichen Größen der cDNA-Sequenzen von 2039 Nt beim Menschen, 1749 Nt der Ratte und 1532 Nt der murinen Sequenz, beruhen auf den unterschiedlichen untranslatierten Bereichen an den 5'- und 3'-Enden. Die humane 5'-UTR-Sequenz besteht aus 88 Nukleotiden, bei der Ratte wurde eine Sequenz von 197 Nt ermittelt werden (Schmitz *et al.*, 1997). Die cDNA der Maus besitzt dagegen eine kürzere untranslatierte Region am 5'-Ende. Im translatierten Bereich fehlt der murinen cDNA ein komplettes Basentriplett von Position 124-126 bp (Schmitz *et al.*, 1997). Der C-Terminus beim Menschen endet mit der Sequenz –KASL und unterscheidet sich damit nur unwesentlich von dem Sequenzmotiv –KANL von Ratte und Maus, das als sogenanntes PTS I-Motiv (*peroxisomal targeting signal*) schon von vielen Säugetier-Katalasen bekannt ist (Purdue & Lazarow, 1996) und auf das später noch näher eingegangen wird. Zwischen den untersuchten Spezies herrscht große Übereinstimmung hinsichtlich der cDNA-Sequenz der α -Methylacyl-CoA-Racemase. Wie in Abb. 4- 1 gezeigt wird, liegt zwischen den Nagetieren Ratte und Maus eine Sequenzidentität von 86,5 % vor. Im Vergleich zum Menschen sind zur Ratte immerhin noch 79,5 % und zur Maus 79,3 % Identität vorhanden.

Ratte cDNA	-109GTGGAAACT
Ratte cDNA	-100	AGTTTTTCAGG	GCTGCGAGGG	AGACACCCAG	TGGACTACCA	CAGCCTTTGG
Ratte cDNA	-50	TCTAAGTAGT	GAGGTGCTTG	GGTACCTTTA	GTCACGTAGT	GCGGGGTGAG
		10	20	30	40	50
Mensch cDNA	1	GGCGCCGGGA	TTGGGAGGGC	TTCTTGCAGG	CTGCTGGGCT	GGGGCTAAGG
Maus cDNA	
Ratte cDNA		AGTAAGGATT	CAGGCCGCGC	AGTGAGAGTG	TCAGAAGAGG	ACCCGCACAA
		60	70	80	90	100
Mensch cDNA	51	GCTGCTCAGT	TTCCTTCAGC	GGGGCACTGG	GAAGCGCCAT	GGCACTGCAG
Maus cDNA		A*C**A*	*GCTG***AT	G*TG***GT
Ratte cDNA		CACGGGGTTG	TCAAGGTCCG	GAGA*CG*A*	*GTTG***AT	G**G***GT
		110	120	130	140	150
Mensch cDNA	101	GGCATCTCGG	TCATGGAGCT	GTCCGGCCTG	GCCCCGGGCC	CGTTCTGTGC
Maus cDNA		***G**AG**	*TG*****	*G*A*****	*****G*	*****C*G
Ratte cDNA		***G**AG**	*TC*****	*G*A*****	*****A**G*	*****C*G
		160	170	180	190	200
Mensch cDNA	151	TATGGTCCTG	GCTGACTTCG	GGGCGCGTGT	GGTACGCGTG	GACCGGCCCG
Maus cDNA		A*****	**G*****	*C**CGAG**	***G*****	A*****TG*
Ratte cDNA		G**A*****	**G*****	*C**CGAG**	***G*T****	***A*A*TG*
		210	220	230	240	250
Mensch cDNA	201	GCTCCCGCTA	CGACGTGAGC	CGCTTGGGCC	GGGGCAAGCG	CTCGCTAGTG
Maus cDNA		*****--AC	G*G**A**AT	TTTC***C**	*A*****	*****C*
Ratte cDNA		*****GTGA*	*C**CCC**T	*A*C***C**	*A*****	*****G*C*
		260	270	280	290	300
Mensch cDNA	251	CTGGACCTGA	AGCAGCCGCG	GGGAGCCGCC	GTGCTGCGGC	GTCTGTGCAA
Maus cDNA		*****	***GCT*T*A	*****T*A*G	***T*****	*CA*****GC
Ratte cDNA		*****	***G*T*T*C	*****G	***T*****	*CA*****GC

Mensch	cDNA	301	310	320	330	340	350
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			GCGGTCGGAT	GTGCTGCTGG	AGCCCTTCCG	CCGCGGTGTC	ATGGAGAAAC
			A**CG****C	***T*****	*****	*T*****	*****
			A**CG****C	***T*****	*****	TT*****	*****
Mensch	cDNA	351	360	370	380	390	400
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			TCCAGCTGGG	CCCAGAGATT	CTGCAGCGGG	AAAATCCAAG	GCTTATTAT
			*****T**	G*****C*	**A*T**A**	*C*****A	***C**C**
			*****T**	G*****C*	**A*G**A**	*C*****A	***C**C**
Mensch	cDNA	401	410	420	430	440	450
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			GCCAGGCTGA	GTGGATTTGG	CCAGTCAGGA	AGCTTCTGCC	GGTTAGCTGG
			*****	*C*****	***A**G**	*TT***C*A	AAG*****
			*****	*****	*****G**	*TT***C*A	AAG*****
Mensch	cDNA	451	460	470	480	490	500
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			CCACGATATC	AACTATTTGG	CTTTGTCAGG	TGTTCTCTCA	AAAATGGCA
			T**C**	**	***A*****	C*****G**	**G*****
			T**C**	**G**	*****	**C**G**	**G*****
Mensch	cDNA	501	510	520	530	540	550
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			GAAGTGGTGA	GAATCCGTAT	GCCCCGCTGA	ATCTCCTGGC	TGACTTTGCT
			C**	***C**C**C	C*A*****	*****	*****GC
			*G**C*****	***C**A**C	C*T**C****	*C*****	C*****G*
Mensch	cDNA	551	560	570	580	590	600
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			GGTGGTGGCC	TTATGTGTGC	ACTGGGCATT	ATAATGGCTC	TTTTTGACCG
			*****A****	*C*****CA*	*****	G*GC*****	*C*****A**
			C***	*C*****CA*	*T*****	T*GC*****	*C**C**A**
Mensch	cDNA	601	610	620	630	640	650
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			CACACGCACT	GACAAGGGTC	AGGTCATTGA	TGCAAATATG	GTGGAAGGAA
			*****T**	*G*CGA**G*	**A***C**	*T***GC***	*****G*
			G**GT**	*G*CTA**G*	**	***G**C***	*****
Mensch	cDNA	651	660	670	680	690	700
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			CAGCATATTT	AAGTTCTTTT	CTGTGGAAAA	CTCAGAAATC	GAGTCTGTGG
			*T*****C**	*****C	*****	*C***CCCAT	*G*****
			*G*****C**	***A***C	*****	***GCCAT	*G*****
Mensch	cDNA	701	710	720	730	740	750
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			GAAGCACCTC	GAGGACAGAA	CATGTTGGAT	GGTGGAGCAC	CTTTCTATAC
			A**CAG****	*****A**	***C**A***	**C**T****	*****C**
			*C*CAG****	***G**A**	*C***A***	**C**G****	*****C**
Mensch	cDNA	751	760	770	780	790	800
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			GACTTACAGG	ACAGCAGATG	GGGAATTCAT	GGCTGTTGGA	GCAATAGAAC
			A**C****A*	**G*****C*	***G*****	*****A**T	**C*****
			A**C****A*	**C*****	***G*****	*****A**T	*****
Mensch	cDNA	801	810	820	830	840	850
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			CCCAGTTCTA	CGAGCTGCTG	ATCAAAGGAC	TTGGACTAAA	GTCTGATGAA
			*****	T*CA*****	C*T*****	*****CG*	*****G**
			*****	*ACA*****	C*T*****	*****TG*	*****G**
Mensch	cDNA	851	860	870	880	890	900
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			CTTCCCTCTC	AGATGAGCAC	GGATGATTGG	CCAGAAATGA	AGAAGAAGTT
			C***C*	*****T*	A*CA*****	*****G****	*****A**
			C*AGC*	*****T*	A**A*****	*****	*****A**
Mensch	cDNA		910	920	930	940	950
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			TGCAGATGTA	TTTGCAAAGA	AGACGAAGGC	AGAGTGGTGT	CAAATCTTTG
			*****G	*****	***T*****	***A*****C	**G*****
			*****G	*****G**	***T*****	*****C	**G*****
Mensch	cDNA	951	960	970	980	990	1000
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			ACGGCACAGA	TGCCTGTGTG	ACTCCGGTTC	TGACTTTTGA	GGAGGTTGTT
			G**	***G*****	**C**A**G*	***G*****	***CC**C
			G**	***A*****	**C**A**G*	***C*****	***CC**C
Mensch	cDNA	1001	1010	1020	1030	1040	1050
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
			CATCATGATC	ACAACAAGGA	ACGGGGCTCG	TTTATCACCA	GTGAGGAGCA
			CCC**G*	*****GA**	*****C***C	**C*****TG	A**G*****
			CCC**G*	*****GA**	*****C	**C*****TG	A*****

Mensch	cDNA	1051	1060	1070	1080	1090	1100
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1101	1110	1120	1130	1140	1150
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1151	1160	1170	1180	1190	1200
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1201	1210	1220	1230	1240	1250
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1251	1260	1270	1280	1290	1300
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1301	1310	1320	1330	1340	1350
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1351	1360	1370	1380	1390	1400
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1401	1410	1420	1430	1440	1450
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1451	1460	1470	1480	1490	1500
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1501	1510	1520	1530	1540	1550
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1551	1560	1570	1580	1590	1600
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1601	1610	1620	1630	1640	1650
Maus	cDNA						
Ratte	cDNA						
Mensch	cDNA	1651	1660	1670	1680	1690	1700
Maus	cDNA						
Mensch	cDNA	1701	1710	1720	1730	1740	1750
Mensch	cDNA	1751	1760	1770	1780	1790	1800
Mensch	cDNA	1801	1810	1820	1830	1840	1850
Mensch	cDNA	1851	1860	1870	1880	1890	1900
Mensch	cDNA	1901	1910	1920	1930	1940	1950
Mensch	cDNA	1951	1960	1970	1980	1990	2000
Mensch	cDNA	2001	2010	2020	2030	2040	2050

Abb. 4- 1: Vergleich der cDNAs der α -Methylacyl-CoA-Racemasen von Mensch, Maus und Ratte (Start- und Stopcodons sind durch Fettdruck markiert).

Innerhalb des translatierten Bereichs ist die Sequenz der α -Methylacyl-CoA-Racemase hoch konserviert. Die humane Proteinsequenz verbindet mit den Sequenzen der Ratten- und Maus-Racemase 78 % identische zuzüglich 9 % homologe Aminosäuren (Abb. 4- 2). Der Vergleich der Proteinsequenzen von Ratte und Maus zeigt eine Sequenzidentität von 90 %, zusätzlich liegen noch ca. 3 % physiko-chemisch nahverwandte Aminosäuren vor. Ein detaillierter Vergleich der cDNA-Sequenzen und der daraus resultierenden Aminosäuresequenzen der Racemasehomologen aus Mensch, Ratte und Maus ist im Anhang dargestellt.

Die berechneten Molekulargrößen der Racemase aus Ratte (41,8 kDa), Maus (41,7 kDa) und Mensch (42,4 kDa) liegen dicht beieinander. Bei den isoelektrischen Punkten stellt man jedoch größere Differenzen fest, die von einem pI des Mausenzym von 7.0 über 6.4 bei der Ratte zu einem pI von 6.1 beim Menschen reichen. Die mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese bestimmte Größe von 47 kDa liegt mit 9,8 % etwas über der theoretisch bestimmten Größe von 42,4 kDa. Diese Abweichung läßt sich wahrscheinlich auf ein etwas verändertes Laufverhalten im SDS-Gel zurückführen, ein Phänomen, das auch schon für das Rattenzym beobachtet wurde (Schmitz *et al.*, 1997). Die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinen, auch wenn sie mit einem ionischen denaturierenden Detergenz wie SDS beladen sind, ist nur in erster Näherung proportional zur Molmasse (Johnson, 1983).

Beim Vergleich geeigneter DNA- (EMBL, GenBank, DDBJ, PDB) und Protein- (SwissProt, PDP, PIR, CDS translations, *S. cerevisiae*) Sequenzdatenbanken wurden neben den beiden homologen Enzymen in Ratte und Maus (Schmitz *et al.*, 1997) keine Übereinstimmungen der α -Methylacyl-CoA-Racemase mit bekannten Proteinen gefunden.

Einige bakterielle Enzyme, wie die Carnitin-Dehydratase von *Archaeoglobus fulgidus* und *Escherichia coli* und die Formyl-CoA-Transferase von *Oxalobacter formigenes* verfügen über einen ähnlichen Reaktionsmechanismus, wie er für die Racemase postuliert wird. Auch hier wird das Acyl- α -Proton gegen ein Proton aus H₂O ausgetauscht (Schmitz *et al.*, 1994).

Die Sequenzhomologien zur Racemase sind jedoch eher gering. Die L-Carnitin-Dehydratase von *E. coli* hat in mehreren kurzen Regionen bei einer Gesamtlänge des Proteins von 176 Aminosäuren 45 identische sowie zusätzlich 16 homologe Aminosäuren, die Identität zur humanen Sequenz beträgt ca. 25 % (Abb. 4- 2).

Aufgrund der Beteiligung der α -Methylacyl-CoA-Racemase an der Gallensäurebiosynthese war zu vermuten, daß sie in Organismen verbreitet ist, die über einen Cholesterinstoffwechsel verfügen, und somit neben höheren Eukaryoten auch in parasitisch lebenden Organismen vorkommen sollte. Tatsächlich bestätigte sich diese Annahme aufgrund entsprechender genetischer Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Spezies. Weder bei Prokaryoten, mit Ausnahme einiger pathogener Bakterien, noch bei dem niederen eukaryotischen Organismus *Sacchomyces cerevisiae* konnten sequenzielle Übereinstimmungen zur α -Methylacyl-CoA-Racemase festgestellt werden. In den humanpathogenen Mycobakterien *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*, die in der Lage sind, methylverzweigte Fettsäuren zu synthetisieren, konnten dagegen ähnliche hypothetische Proteine aus Sequenzierungen möglicher translatisierter Bereiche identifiziert werden (Abb. 4- 2). Hierzu zählen zwei Proteine von *M. tuberculosis* (EMBL-Acc.-Nr.: Z95584|MTCI65 und AL022004|MTV043), ein Protein von *M. leprae* (EMBL-Acc.-Nr.: Z94723|MLCB33) sowie zwei hypothetische Proteine des eukaryotischen *Caenorhabditis elegans* (ZK892.4 auf dem Cosmid ZK892, Chromosom III und C24A3.3 auf Cosmid C24A3), siehe Abb. 4- 2. Die Sequenzen von *C.elegans* wurden aus möglichen Exons abgeleitet, die aus genomischer DNA durch Exon erkennende Algorithmen identifiziert wurden, dieses Vorgehen ist naturgemäß nur von begrenzter Zuverlässigkeit. Tatsächlich war auch erst durch den Vergleich der EST-Sequenzen, die eine Korrektur der Exongrenzen ermöglichten, eine verlässliche Aussage über die genomische Struktur der *C.elegans*-Gene möglich (vgl. Abb. 4- 5). Für ZK892.4 sind die Sequenzen C55642 und C66345 eingesetzt worden, für das hypothetische Protein C24A3.3 die Sequenzen C35941 und C47779. Die Proteine ZK892.4 und C24A3.3 haben mit 340 bzw. 343 Aminosäuren eine ähnliche Größe wie die α -Methylacyl-CoA-Racemase. Die cDNA-Sequenzen der codierenden Bereiche stimmen zwischen den *C. elegans*-Genen zu 75 % miteinander überein, sie enthalten im Leseraster sechs Introns an genau den gleichen Positionen. Das hypothetische Protein ZK892.4 zeigt bei 340 Aminosäuren 137 identische und 51 homologe Aminosäuren zur Racemase. Das entspricht einer Sequenzidentität von 40 % und einer Homologie von 55 %. C24A3.3 verfügt bei einer Gesamtlänge von 343 Aminosäuren über 141 identische sowie 57 homologe Aminosäuren und besitzt damit eine Identität von 41 % und eine Homologie von 58 %. Am 3'-Ende von C24A3.3 liegt ein peroxisomales *targeting* Signal -SKL vom Typ I (PTS I).

Der Sequenzvergleich unterschiedlichster Spezies zeigt, daß die cDNA-Sequenz der α -Methylacyl-CoA-Racemase hoch konserviert ist. Es ist nicht nur eine ausgeprägte Homologie zwischen den Vertretern der Mammalia zu erkennen, sondern auch zu Proteinen niederer Organismen wie *C. elegans* und humanpathogener Bakterien. Die α -Methylacyl-CoA-Racemasen scheinen zu einer eigenen Enzymklasse zu gehören, die nur in höheren Eukaryoten sowie einigen pathogenen Prokaryoten vorkommen. Verwandte Gene konnten nicht gefunden werden, neben den zwei Proteinen aus *C. elegans* trat in keinem Organismus mehr als ein α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gen auf. Es ist vorstellbar, daß die Racemasen der pathogenen Prokaryoten im Laufe der Entwicklung über ihren Wirt ins bakterielle Genom gelangten.

```

hRACE  -----MALQGISVMELSGLAPGPFCCAMVLADFGARVVRVDRPG-----SRYDVSRLCRGKRSLVLDLKOP
mRACE  -----MVLRGVRVVELAGLAPGPFCCMVLADFGAEVVRVNRRLG-----STIGEN-FLARGKRSLALDLKRS
RRACE  -----MALRGVRVLELAGLAPGPFCCMVLADFGAEVVLVDRLG-----SVNHPSELARGKRSLALDLKRS
CERA1  ----MYRFLSGIKVVEIAGLAPVPHCGMMLADFGADVTVIDKKN----PAIEQ-RLNRGKTMKQLDLKNP
CERA2  ----MSRLLSGIKVVELGGLAPVPHCGMMLADFGADVTVIDKKN----PTVEQ-RLNRGKSMKEFDLRKS
MtMCR  ----MAGPLSGLRVVELAGICPGPHAAAMLCDLGDADVVRIDRPS--SVDGISRDAMLRNRRIVTADLKSD
MtFAR  --MTTGPLAGKVIIEELGGICPGPHAGMVLADLGDADVVRVRRPGGLTMPSEDRDLLHRGKRIVDLDVKTQ
MlMCR  MAATLNGPLSGLRVVELAGICPGPHAAAMLCDLGDADVVRVDRPT-KSGGGVVKDAMLRNRRIVTADLKSD
EcCDH  MDHLPMPKFGPLAGLRVVFSGIETAGPFAGOMFAEWGAEVTLWLENVAWADTIRVQPNYPQLSRRLHALSLNL

```

```

hRACE  -----RGAAVLRRRLCKRSVLLLEPFRRGVMEKQLQLGPEILLQRENPRLIYARLSGFGQSGSFICRLAGHDIN
mRACE  -----QGVTVLRRMRCARADVLLLEPFRRGVMEKQLQLGPEILLQDNPKLIYARLSGFGQSGIFSKVAGHDIN
RRACE  -----PGAAVLRRMRCARADVLLLEPFRRGVMEKQLQLGPEILLQDNPKLIYARLSGFGQSGIFSKVAGHDIN
CERA1  -----EDIKKVRDLQOTSDVLLDPYRPGTLEKMGDPSLWNNNKGLIICKISGYGQTERMSQETGHDIN
CERA2  -----EDIKKVRDLQRTSDVLLDPYRPGTLEKMGDPLSLWNDNKGLIICRISGYGQTERMSQBAGHDIN
MtMCR  -----QGLELALKLIKADVLEGYRPGVTERLGLGPECAKVNDRLIYARMTGWGQTERMSQBAGHDIN
MtFAR  -----P--QAMLELAAKADVLLDCFRPGTCERLGIGPDDCASVNPRLIETARITGWGQDGPLASTAGHDIN
MlMCR  -----AGRELVLTLVARADALTEGYRPGVTERLGLGPEHCAEVNDRIVYARMTGWGQTERMSQBAGHDIN
EcCDH  NIFKDEGREAFKMETTDIFTEASKGPAFARR-GITDEVLWQHNPKLVIAHLSGFGQYGTETNTLPAYNT

```

```

hRACE  -YLALSGVLSKI-GRSGENPYAPLNLLADFAAGGLMCLGIIIMALEDRTRTD-KGQVIDADMVEGTAYLS
mRACE  -YLALSGVLSKI-GRSGENPYEPLNLLADFAAGGLMCLGIVLALFERTRSG-RGQIIDSSMVEGTAYLS
RRACE  -YVALSGVLSKI-GRSGENPYEPLNLLADFAAGGLMCLGILLALFERTRSG-IGQVIDANMVEGTAYLS
CERA1  -YVALSGMLPTFSGVNPATRPWPPANMLADFAAGGLSAAFGLISATYARSHNGGKGLLDCSMLEGVAYLS
CERA2  -YVAMSGMLPTFAGAEASRPWPPVNMMLADFAAGGLSAAFGLIVSATHARTHNGGQGVLDSCSMLEGVAYLA
MtMCR  -YVAMSGILHAI-GRGDERPVPEPLNLVGDFAAGGSMFLLVGILAAALWERQSSG-KGQVVDAAMVDGSSVLI
MtFAR  -YLSQTGALAAF-GYADRPPMPPLNLVADFAAGGSMFLVLGIVVALYERERSG-VGQVVDAAMVDGVSVLA
MlMCR  -YISLNGVLHAI-GRVNERPVPTLNLVGDFAAGGSMFLLVGILAAALWERQTSG-KGQVVDAAMVDGSSVLG
EcCDH  IAQAFSGYLIQN-GDVDQ-PMPAFPYVADYFSG-LTATTAALAAALHKVRETG-KGESIDIAMVEVMLRMG

```

```

hRACE  SFLWKTQKSSLWEAPRGQNMLDGGAPFYTTYRTADGEFMAVGAIEPQFYELLIKGLGLKSDLEPSQMSSTD
mRACE  SFLWKTQPMGLWKQPRGQNMLDGGAPFYTTYRTADGEFMAVGAIEPQFYALLIKGLGLESEELPSQMSSTA
RRACE  SFLWKTQAMGLWAQPRGQNMLDGGAPFYTTYRTADGEFMAVGAIEPQFYILLIKGLGLESEELPSQMSSTIE
CERA1  SFVQHYDQPNLEFTDK-YALFSGECPIYRTYKTKDDKFAVAVGAVEPKFYQNLKLLNVDGRDLFVNPG--
CERA2  SFVQYYEYQSHLEFTDK-YAAFTGECPIYRTYKTKDDKFAVAVGAVEPKFYQNLKLLNVDGRDLFVNPG--
MtMCR  QMMWAMRATGMWTDTRGANMLDGGAPFYDYECADGRYVAVGAIIEPQFYAAMLAGLGLDAAELPPQNDRA
MtFAR  QMMWTKMGIGSLRDQRESFLDGGAPFYRCYETSDDGKYMAVGAIEPQFIFAALLSGLGLSAADVETQLDVA
MlMCR  QMMWAMRASGMWSDTGGTNMLDGGAPFYDAYECADGGYVAVGAIIEPQFIFAALLSGLGLSAADVETQLDVA
EcCDH  QYFMMDYFNGGEMCPFRMSKGDPPYAGCGLYKQADGYIVMELVGITQIEECFKD-IGLAHLLGTPGIEPE

```

```

hRACE  DWPEMKKKFADVFAKKTKAEWCQIFDGTDACVTPVLTFFEEVHHHDHNERGSFITSE--EQDVSPRPAPL
mRACE  DWPEMKKKFADVFAKKTKAEWCQIFDGTDACVTPVLTFFEEALHHQHNRERASFITDG--EQLSPRPAPL
RRACE  DWPEMKKKFADVFAKKTKAEWCQIFDGTDACVTPVLTFFEEALHHQHNRERGSFITDE--EQHACPRPAQ
CERA1  ---KIT-EDLESREFLQKTRDKWANIFKGGQCCVTPVLDIHEVGSYGQHVDRNSFTKTS---SNWIANPSP
CERA2  ---RIT-KVLEETFLQKTRDEWSSIFEGQCCVTPVLDIHEVGTYGQHVDRQNF TKNDKFGSTWIAKPSP
MtMCR  RWPELRALLTEAFASHDRDHWGAVFANSDACVTPVLAFCGEVHNEPHI IERNTFYEAN--G-GWQMPAPR
MtFAR  GYPQMYDIFAERFASRTRDEWTRVFAAGTDACVTPVLAWSEAAANNDEHKARSTVILTAH--G-VQQAAPAPR
EcCDH  GTQLTHRIECPYGPLVEEKLDAWLATHITAEVVKERFAELNIA CAKVLTVPELESNPQYVARE SITQWQTM

hRACE  LLNTPAIPSPFKRDPFTIGEHTTEILEEFGFSREETIYQLNSDKIIESNKKVKSAL
mRACE  LSRTPAVPSAKRDPFVSGEHTVEVLRREYGFSSQEEILQLHSDRIVESDKLKANL
RRACE  LSRTPAVPSAKRDPFVSGEHTVEVLRKDYGFSSQEEIHQLHSDRIIESNKKLKANL
CERA1  RVWTQDELAALSSKK
CERA2  RVKTPEELFAARSKL
MtMCR  FSRTPASSQ--PRPPAATIDIEAVLTDWDG
MtFAR  FSRTPAGP--VRPPAATPIDEIN-W
EcCDH  DGRITCKGPNIMPKFKNNPGQIWRGMPSHGMDTAAILLKNIGYSENDIQELVSKGLAKVED

```

Abb. 4- 2: Proteinsequenzvergleich der humanen α -Methylacyl-CoA Racemase mit homologen Proteinen. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: hRACE: humane α -Methylacyl-CoA-Racemase; RRACE: Ratten- α -Methylacyl-CoA-Racemase; mRACE: murine α -Methylacyl-CoA-Racemase; CERA1: erstes α -Methylacyl-CoA-Racemase Homologes von *C. elegans* (ZK892.4); CERA2: zweites α -Methylacyl-CoA-Racemase Homologes von *C. elegans* (C24A3.3); MtMCR: α -Methylacyl-CoA Racemase-Homologes von *M. tuberculosis* (Z95584/MTCI65); MtFAR: *M. tuberculosis* "fatty acyl-CoA racemase" (AL022004/MTV043); MtMCR: α -Methylacyl-CoA-Racemase Homologes von *M. leprae* (Z94723/MLCB33); EcCDH: *E.coli* L-Carnitin-Dehydratase.

Alternative Polyadenylierung

Bei einem Sequenzvergleich des 3'-Endes der cDNA der humanen Racemase mit den zur Verfügung stehenden EST-Klonen wurden überraschenderweise auch cDNA-Sequenzen mit einem verkürzten 3'-Ende gefunden. Die EST-Klone werden vom poly A-Ende aus sequenziert, so daß die verschieden langen 3'-Enden nicht auf einen Sequenzierabbruch zurückzuführen sind.

Von den dargestellten Sequenzen enden sieben nach 1662-1675 Nukleotiden bzw. nach einem kurzen poly A-Schwanz (fünf Sequenzen enden nach 1662 Nt, eine weitere nach 1666 Nt sowie nach 1675 Nukleotiden).

Die cDNA-Sequenz von vier weiteren Klonen reicht dagegen bis zum bekannten 3'-Ende der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase nach 2039 Nukleotiden (Abb. 4- 3). Ein ausführlicher Sequenzvergleich mit der Beschreibung der verwendeten Klone ist im Abschnitt 3.4.1.5 zu finden.

Bei der Analyse der entsprechenden EST-Sequenzen zeigten sich zwei mögliche Polyadenylierungsstellen. Bei 2020 Nt liegt mit der Sequenz AAUAAA ein typisches Polyadenylierungssignal, auf das die Polyadenylierung nach einem Abstand von 20 Basenpaaren nach den Nukleotiden CA erfolgt. Weiter aufwärts liegt an den Positionen 1640-1650 bp mit der nahverwandten Sequenz GAUAAA ein schwächeres Signal, nach welchem die Polyadenylierung nach GA beginnt.

Unterschiedlich starke Polyadenylierungssignale für Proteine, die zu verschiedenen langen 3'-Enden führen können, sind seit längerem bekannt (Sheets *et al.*, 1990). Die mögliche Signalsequenz GAUAAA liegt zwischen den Nukleotiden 1641 und 1647, vor ihr befindet sich eine Uracil-reiche Region (95 UTPs von 245 NTPs = 40,4 %). Daran anschließend folgt eine G/U-reiche Region (75 % der nächsten 36 Nukleotide sind GTP (11) oder UTP (16)). Eine charakteristische Signalsequenz fehlt diesem schwachen Polyadenylierungssignal. Durch den korrekten Abstand von 20 bp zum U₄-Element zum folgenden GA könnte aber dennoch eine Polyadenylierung erfolgen, obwohl die Schnittstelle nicht die gewöhnlich verwendete Sequenzfolge CA darstellt (Chou, 1994). Tatsächlich kommt die Polyadenylierung nach GA in ungefähr 7-8 % aller mRNAs vor (Sheets, 1990).

Eine alternative Polyadenylierung ist anscheinend ein relativ weit verbreitetes Phänomen. Bei der Untersuchung einer großen Zahl von EST-Clustern konnten Gautheret und Mitarbeiter 1998 einen deutlichen Beweis für den Einsatz verschiedener Polyadenylierungsstellen erbringen. Von 1000 analysierten Clustern lag in fast 20 % von 189 untersuchten Fälle eine alternative Polyadenylierung vor, wobei die unterschiedliche Polyadenylierung zum Teil gewebesabhängig zu sein schien (Gautheret, 1998).

Bei den EST-Sequenzen der menschlichen α -Methylacyl-CoA-Racemase wurde die kurze Form in Gehirn (H19272) und Niere (AA996010, AI244669, AI245832, AA969459) gefunden, während die längere Variante in Lymphknoten (AI468850), Uterus (AI369058), Darm (AA534857) und Neuronen (AA666340) auftritt (Abb. 4- 3). Die geringe Anzahl der EST-Sequenzen ließ allerdings keinen eindeutigen Schluß über eine gewebsspezifische Ausprägung der humanen Racemase zu.

	1650	1660	1670	1680	1690
RACEMASE.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTGCATCCA	GGCCTTTTGT
AA779728.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTGC AAA
AA996010.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAAA
AI244669.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAA
AI245832.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAA
AA969459.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAAAAAA
AI288257.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAGT GAA
H 19272.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAGCAG			
AI080267.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTGCATCCA	GGCCTTTTGT
AI369058.SEQ	TGATANAAGT	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTGCATCCA	GGCCTTTTGT
AA534857.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTGCATCCA	GGCCTTTTGT
AI468850.SEQ	TGATAAAAGT	CACGTGAAAC	AGAGTGATTG	GTTGCATCCA	GGCCTTTTGT
	//				
	2010	2020	2030	2040	2050
Racemase.SEQ	CACACAGCAA	CATCCAGAAA	TAAAGATCTC	AGGACCCCCC	AA
AI080267.SEQ	CACACAGCAA	CATCCAGAAA	TAAAGATCTC	AGGACCCCCC	A
AI369058.SEQ	CACACAGCAA	CATCCAGAAA	TAAAGATCTC	AGGACCCCCC
AA534857.SEQ	CACACAGCAA	CATCCAGAAA	TAAAGATCTC	AGGACCCCCC	AACAAAAAAA
AI468850.SEQ	CACACAGCAA	CATCCAGAAA	TAAAGATCTC	AGGACCCCCC	AAAAAAA

Abb. 4- 3: Alternative Polyadenylierung verschiedener EST-Klone.

Anhand einer Northern Blot-Analyse konnte zwar gezeigt werden, daß die humane α -Methylacyl-CoA-Racemase gewebsspezifisch exprimiert wird, allerdings ist dabei die Expression aller Transkripte gleichermaßen betroffen (Abb. 3-33).

In peroxisomenreichen Geweben, wie Leber und Niere, wurde eine signifikante Expression der Racemase-mRNA nachgewiesen, im Gegensatz dazu fiel die Expression in anderen menschlichen Geweben, wie Herz, Gehirn, Skelettmuskel und Pankreas, deutlich niedriger aus. In Plazenta und Lunge wird die Racemase nur in äußerst geringem Umfang exprimiert. Die Banden im Northern Blot entsprachen, wie erwartet, Transkripten der Größen 1,6 und 2,0 kb. Allerdings ist darüber hinaus eine Bande bei 3,1 kb zu erkennen, für deren Existenz noch eine Erklärung gefunden werden muß. Eine gewebshängige Polyadenylierung, wie 1998 von Gautheret beschrieben, scheint im Fall der α -Methylacyl-CoA-Racemase nicht vorzuliegen, denn obwohl die Expression in den einzelnen Geweben unterschiedlich stark ausfällt, liegt keine spezifische Expression eines einzelnen Transkripts vor.

Subzelluläre Lokalisation

Die Aktivität der α -Methylacyl-CoA-Racemase ist nicht nur gewebsspezifisch unterschiedlich ausgeprägt, sondern in den untersuchten Spezies auch subzellulär verschieden verteilt. In Rattenleber ist die Racemase zu über 90 % in den Mitochondrien zu finden, während sie bei der Maus und dem chinesischen Zwerghamster zu gleichen Teilen mitochondrial und peroxisomal lokalisiert ist (Schmitz *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 1997). Mit subzellulären Fraktionierungen von humanen Zellen (Hautfibroblasten und Hep G2-Zellen) konnte hier gezeigt werden, daß die Aktivität der humanen Racemase ebenfalls bimodal verteilt ist, wobei ihre Hauptaktivität peroxisomal lokalisiert ist. 80 – 90 % der Enzymaktivität trat in den Peroxisomen auf, wohingegen in den Mitochondrien nur eine Aktivität von 10 – 20 % nachgewiesen werden konnte.

Einen weiteren Hinweis auf die duale Kompartimentierung der humanen Racemase lieferte die Beobachtung, daß bei Peroxisomen-defizienten Zellen (Zellweger-Syndrom) nur noch eine Restaktivität von 10 - 20 % festgestellt werden konnte, entsprechend der Aktivität des mitochondrialen Enzyms, und daß diese Aktivität auch tatsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist.

Die bimodale Verteilung der α -Methylacyl-CoA-Racemase beruht vermutlich auf der physiologischen Rolle, die das Enzym beim Abbau exogener verzweigt-kettiger Fettsäuren und der Synthese von Gallensäuren spielt (Schmitz *et al.*, 1994). Während letztere peroxisomal lokalisiert ist (Prydz *et al.*, 1986), sind an der Fettsäureoxidation auch mitochondriale Reaktionsschritte beteiligt (Verhoeven *et al.*, 1998a; Verhoeven *et al.*, 1998b).

Von der α -Oxidation der Phytansäure ist bekannt, daß sie ausschließlich peroxisomal abläuft (Casteels *et al.*, 1997). In menschlichen Geweben findet die β -Oxidation von verzweigten Fettsäuren, wie Pristansäure, (Pedersen, 1987; Singh *et al.*, 1990) und Di- und Trihydroxycoprostansäure (Kase, 1989; Pedersen & Gustafsson, 1980) ebenfalls zum größten Teil in den Peroxisomen statt. 1998 konnte Verhoeven in kultivierten Fibroblasten zeigen, daß nur die ersten drei Zyklen der β -Oxidation von Pristansäure in den Peroxisomen ablaufen. Das entstandene 4,8-Dimethylnonanoyl-CoA wird vor dem weiteren Abbau als Carnitinester in die Mitochondrien transportiert, siehe Abb. 1-6 (Verhoeven *et al.*, 1998a). Aufgrund der Stereospezifität der beteiligten Enzyme, die nur (2S)-2-Methylacyl-CoAs erkennen können, ist in beiden Kompartimenten eine α -Methylacyl-CoA-Racemaseaktivität erforderlich.

Neben der natürlich vorkommenden (2*R*,6*R*,10*R*)-Pristansäure müssen auch die beim weiteren Abbau entstehenden (2*R*)-Enantiomere in die (2*S*)-Konfiguration überführt werden, bevor sie von den peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase und mitochondrialen Acyl-CoA-Dehydrogenasen umgesetzt werden können (Schmitz & Conzelmann, 1997).

Die duale Kompartimentierung der α -Methylacyl-CoA-Racemase wirft die Frage nach dem Mechanismus der subzellulären Lokalisation auf. Hierbei sind verschiedene Ursachen denkbar, die zur Zeit noch untersucht werden. Eine Erklärung für die bimodale Verteilung der Racemase könnte beispielsweise die Existenz unterschiedlicher Gene sein, aber auch verschiedene Transkripte oder Translationsprodukte sind vorstellbar.

Die häufigste Erklärung für gleiche Enzymaktivitäten in unterschiedlichen Kompartimenten ist das Auftreten von Isoenzymen durch zwar ähnliche aber unterschiedliche Gene. Es gibt jedoch keinen Hinweis für mehrere Racemasegene im Menschen. Bei Immunpräzipitationstests mit dem polyklonalen Antiserum gegen das Rattenenzym wurde die Enzymaktivität in humanen Gewebshomogenaten vollständig ausgefällt. Sollte es sich also um verschiedene mitochondriale und peroxisomale Enzyme handeln, müßten sie wenigstens sehr nah miteinander verwandt sein. Die aus unterschiedlichen humanen cDNA-Banken erhaltenen Sequenzen konnten jedoch nur einer einzigen cDNA-Sequenz zugeordnet werden. Vergleiche mit den zur Verfügung stehenden humanen EST-Banken führten ebenso zu keinem Anhaltspunkt für ein zweites Gen. Bei der genomischen Analyse verschiedener humaner PAC-Klone und genomischer Leukozyten-DNA wurde ebenfalls nur eine einzige DNA-Sequenz gefunden. Auch für die homologen Enzyme aus Ratte und Maus erbrachten entsprechende EST-Bank-Vergleiche keine Hinweise auf die Existenz weiterer Racemasegene (Schmitz *et al.*, 1997). Ferner ließen Southern Blots mit muriner genomischer DNA nur auf ein einziges Gen schließen (T.Kotti, persönl. Mitteilung).

Die subzelluläre Verteilung eines einzelnen Genprodukts basiert bei den meisten Proteinen auf verschiedenen Transportsignalen, die auf RNA-Ebene durch differentielle Transkription oder differentielles Spleißen und auf Proteinebene durch unterschiedliche Translationsstartpunkte entstehen können (zur Übersicht siehe Danpure, 1995). Bei der Suche nach Lokalisationssignalen konnten in allen drei homologen Racemase-cDNAs sogenannte PTS (*peroxisomal targeting signal*)-Motive identifiziert werden. Der C-Terminus der humanen Racemase endet mit der Sequenz –KASL, die nur geringfügig vom Sequenzmotiv –KANL der Maus- und Ratten-Racemase abweicht (Schmitz *et al.*, 1997).

Bei dem homologen hypothetischen Protein C24A3.3 des niederen Eukaryoten *Caenorhabditis elegans* liegt ebenfalls eine peroxisomale Zielsequenz vor. C24A3.3 endet mit dem klassischen peroxisomalen *targeting* Signal PTS1 (-SKL), vgl. Abb. 4- 2. Das peroxisomale PTS Typ I ist allerdings stark degeneriert. Von humanen sowie vielen anderen Säugetier-Katalasen ist die Sequenz -KANL bereits als funktionale peroxisomale Zielsequenz bekannt (Purdue & Lazarow, 1996). Bei der Untersuchung verschiedener Sequenzmotive mit dem *two-hybrid system* zeigte sogar die Sequenz -ANL zum humanen PTS I-Rezeptor PEX 5p ein deutliches Signal (Lametschwandtner *et al.*, 1998). Die Sequenz -KASL stellt deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit ein gültiges peroxisomales *targeting* Signal dar.

Bei der Suche nach mitochondrialen Signalsequenzen konnten keine klassischen Sequenzmotive identifiziert werden. Das Signal für den Import in Mitochondrien (MTS, *mitochondrial targeting signal*) ist gewöhnlich eine N-terminale Sequenz von 20-30 AS, die meist mehrere basische und hydrophobe Aminosäuren, aber üblicherweise keine sauren Reste enthält. Bei den Racemasen von Mensch, Ratte und Maus kommt jedoch an Position 10 in allen drei Homologen ein saurer Glutamatrest vor, vgl. Abb. 4- 2. Allerdings konnten auch in anderen funktionsfähigen MTS saure Reste identifiziert werden, bspw. enthält die β -Untereinheit der humanen Pyruvatdehydrogenase zwei Glutamatreste an den Positionen 10 und 14 (Koike *et al.*, 1988). Im Gegensatz zum menschlichen Enzym befinden sich an den Sequenzpositionen 4 und 7 der Maus- und Ratten-Racemase zwei basische Argininreste. Die N-Termini der Ratten- und Mausezyme fungieren somit wahrscheinlich als relativ passable mitochondriale Lokalisationssignale. Aufgrund von Punktmutationen könnte die N-terminale Sequenz der humanen Racemase im Laufe der Evolution ihren basischen Charakter verloren haben, so daß sich die Funktionalität der MTS verringert hat. Die unterschiedliche Stärke der mitochondrialen Transportsequenzen könnte damit eine Erklärung für die speziesabhängige Verteilung der Racemasen liefern.

Denkbar ist auch, daß die Effektivität des mitochondrialen Lokalisationssignals möglicherweise zusätzlich durch noch nicht näher untersuchte Struktureigenschaften der Racemasen unterstützt wird. Ein Modell dafür könnte die von Danpure und Mitarbeitern untersuchte Alanin/Glyoxylat-Aminotransferase I (AGT) darstellen. Ein Defekt dieses Enzyms, das beim Menschen ausschließlich peroxisomal lokalisiert ist, verursacht die primäre Hyperoxalurie Typ 1 (PH 1). Bei einigen Patienten mit PH 1 wurde gefunden, daß das Enzym an sich zwar intakt ist, aber nicht mehr in den Peroxisomen, sondern stattdessen in den Mitochondrien lokalisiert ist.

Der fehlerhafte Transport der Transferase wird durch eine Kombination von zwei Punktmutationen verursacht. Eine dieser Mutationen (Pro 11-->Leu) stellt einen relativ häufigen Polymorphismus dar, der zu einem funktionell schwachen mitochondrialen Transportsignal führt. Die seltenere Gly 170-->Arg Mutation verstärkt die Effizienz dieses Signals, indem die Proteinfaltung und –Dimerisierung verlangsamt wird und so daß das schwache MTS lange genug exponiert bleibt, um vom mitochondrialen Translokationsapparat erkannt und transportiert zu werden (Danpure, 1998). Analog dieses Modells könnte möglicherweise auch im Fall der α -Methylacyl-CoA-Racemase das schwache MTS auf ähnliche Weise aufgrund struktureller Charakteristika des Enzyms verstärkt werden.

Abgesehen von der N-terminalen Sequenz könnten eventuell andere, noch nicht identifizierte mitochondriale Sequenzmotive eine Rolle spielen. Bei der Adenylatkinase 2 sind neben der klassischen MTS noch intern lokalisierte Transportsignale für den Transport ins Mitochondrium verantwortlich (Bandlow *et al.*, 1998). Für zwei Isoformen von Cytochrom b5 und die Untereinheit 6 des Cytochrom bc1-Komplexes konnten C-terminale mitochondriale Translokationssignale identifiziert werden. Die N-Termini dieser Cytochrome setzen sich überwiegend aus sauren Resten zusammen und haben keinerlei Einfluß auf den Transport (DeLabre *et al.*, 1999; Kuroda *et al.*, 1998).

Fusionsexperimente mit der Adenylatkinase 2 zeigten, daß das Auftreten unterschiedlicher Transportsignale zu einer bimodalen Verteilung eines Proteins führen kann, indem diese je nach Stärke und Präsentation auf der Proteinoberfläche von dem entsprechenden Translokationsapparat erkannt werden (Bandlow *et al.*, 1998).

Die subzelluläre Verteilung der α -Methylacyl-CoA-Racemase beruht möglicherweise ebenfalls auf der Konkurrenz der verschiedenen Transportsignale. Das MTS könnte bei der Faltung des Proteins verdeckt werden, so daß nur noch die PTS 1-Sequenz präsentiert wird. Infolgedessen gelangt nur ein kleiner Teil der Moleküle ins Mitochondrium, der größte Teil wird dagegen in die Peroxisomen transportiert. Für diese Hypothese spricht, daß bei Patienten mit einem generalisierten Defekt der peroxisomalen Biogenese (Zellweger-Syndrom) die Racemaseaktivität auf die mitochondriale Restaktivität von 10-20 % reduziert ist, die auch nachweislich mitochondrial lokalisiert ist (siehe 3.3.8). Alle Proteine, die nicht früh genug vom mitochondrialen Importsystem erkannt werden, können später nicht mehr ins Mitochondrium transportiert werden, da nach der Proteinfaltung ihr MTS verdeckt ist, sondern werden im Cytosol abgebaut.

Eine weitere Erklärung für die subzelluläre Verteilung der Racemase könnte eine alternative Transkription bieten, wie z.B. von Elgersma und Mitarbeitern für die Carnitin-Acetyl-transferase (CAT) aus *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte. Die dual lokalisierte CAT wird ebenfalls nur von einem einzelnen Gen kodiert, auf dem mitochondriale (N-terminal) und peroxisomale (C-terminal und intern) Transportsignale identifiziert wurden. Der Transport der Transferase wird auf Transkriptionsebene reguliert, indem zwei verschiedene mRNAs mit bzw. ohne MTS transkribiert werden (Elgersma *et al.*, 1995). Auch die spezieabhängige Kompartimentierung der Alanin/Glyoxylat Aminotransferase I (AGT) ist auf unterschiedliche Transkripte eines Gens zurückzuführen. Die Enzymaktivität im Menschen, Altweltaffen, Kaninchen und Meerschweinchen ist peroxisomal lokalisiert (Danpure *et al.*, 1990; Noguchi & Takada, 1979; Takada & Noguchi, 1982; Yokota *et al.*, 1987). In Neuweltaffen (Krallenaffen) sowie anderen Nagetieren, wie Ratte, Maus und Hamster liegt die Enzymaktivität bimodal verteilt vor (Danpure *et al.*, 1990; Noguchi *et al.*, 1978). Fast vollständig mitochondrial, mit einer geringen peroxisomalen Restaktivität, wurde die Transferaseaktivität bei einigen Carnivoren, wie Katze und Hund nachgewiesen (Danpure *et al.*, 1990; Okuno *et al.*, 1979). Die duale Kompartimentierung der AGT konnte in Lebern von Ratten und Krallenaffen auf den Einsatz alternativer Transkriptionsstarts zurückgeführt werden (Oda *et al.*, 1990; Purdue *et al.*, 1992). Das längere Transkript besitzt am 5'-UTR eine 22 Aminosäure lange N-terminale *targeting* Sequenz, dem kürzeren fehlt dieses Signal. Durch eine Punktmutation des Startcodons von ATG zu ATA verlor der Mensch diese Sequenz während der Evolution (Takada *et al.*, 1990).

Für verschiedene Transkripte des α -Methylacyl-CoA-Racemase-Gens wurden keine Hinweise gefunden. Vergleiche der Racemase-cDNAs von Mensch, Maus und Ratte mit entsprechenden EST-Sequenzen ließen keine unterschiedlichen N-Termini oder zusätzliche Präsequenzen, die als MTS fungieren könnten, erkennen. Alternatives Spleißen konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da in Northern blots keine mRNAs des humanen, murinen oder Ratten-Enzyms mit verschiedenen langen 5'-Enden gefunden werden konnten, siehe 3.4.2 (Schmitz & Conzelmann, 1997; T.Kotti persönl. Mitteilung). Für die murine Racemase wurde kürzlich gezeigt, daß die mRNAs in Mitochondrium und Peroxisom die gleiche Größe haben und die Proteine identische N-Termini besitzen (D.Novikov, W.Schmitz, persönl. Mitteilung).

Eine duale Kompartimentierung von Proteinen kann auch auf einem alternativen Translationsstart basieren, wie im Fall der cytosolischen und mitochondrialen Fumarasen aus Rattenleber (Suzuki *et al.*, 1992). Knox zeigte am Modell von *S. cerevisiae*, daß der Verteilung der Fumarasen wahrscheinlich ein cotranslationaler Transport zugrunde liegt, der mit der Translation gekoppelt ist. Ein einziges Genprodukt von *FUM1* mit einer typischen N-terminalen MTS wird zuerst zum Mitochondrium transportiert. Es kommt zu einer Insertion des Proteins in die Mitochondrienmembran und proteolytischer Prozessierung, wobei der größte Teil der Moleküle (70 – 80 %) wahrscheinlich in einer Rückwärtsbewegung durch einen Translokationskanal wieder ins Cytosol gelangt (Knox *et al.*, 1998). Solche Rückwärtsbewegungen durch die mitochondriale Membran konnten *in vitro* mit DHFR-Fusionsexperimenten (Schneider *et al.*, 1994; Ungermann *et al.*, 1994) und *in vivo* beim Abbau von Proteinen im ER gezeigt werden (Garcia & Walter, 1988; Ooi & Weiss, 1992; Yang *et al.*, 1998). Viele mitochondriale Matrix-Proteine werden nach Import ins Mitochondrium anschließend zu anderen Kompartimenten re-exportiert. Vermutlich besitzen Mitochondrien aufgrund ihrer bakteriellen Herkunft spezifische Mechanismen für den Proteinexport (Soltys & Gupta, 1999).

Gegen einen alternativen Translationsstart der Racemase spricht die Beobachtung, daß die mitochondrialen und peroxisomalen murinen Racemasen identische N-Termini besitzen (D.Novikov, W.Schmitz, persönl. Mitteilung). Ferner gab es bei der Auftrennung von Gesamtzellextrakten keine Hinweise auf Proteine unterschiedlicher Größen (s.o.). Allerdings ist eine Kopplung von Translokation und Translation vorstellbar, die zu der unterschiedlichen Kompartimentierung der Racemase führen könnte. Ein ähnlicher Verteilungsmechanismus wird für die Adenylatkinase 2 (AK 2) diskutiert. AK 2 kommt sowohl in der mitochondrialen Membran (6-8 %) als auch im Cytoplasma (ca. 90 %) vor, es besitzt eine nicht abgespaltene MTS und noch zusätzliche interne mitochondriale Transportsignale (Bandlow *et al.*, 1998). Der Import von AK 2 verläuft wahrscheinlich cotranslational und trägt dabei möglicherweise zu der bimodalen Verteilung auf Cytosol und Mitochondrien bei (Nobumoto *et al.*, 1998).

Es ist denkbar, daß auf ähnliche Weise ein einziges Translationsprodukt der α -Methylacyl-CoA-Racemase zum Teil vollständig cotranslational ins Mitochondrium transportiert bzw. in einen Importinkompetenten Status gefaltet und in einer Rückwärtsbewegung durch eine Translokationspore ins Cytosol freigesetzt wird.

Während der Translokation würde das MTS eventuell durch die schnelle Faltung der Proteindomänen des translatierten Enzyms verdeckt, ihre Vorwärtsbewegung somit eingeschränkt und eine Rückwärtsbewegung ins Cytosol verursacht. Aufgrund struktureller Unterschiede und stärkerer mitochondrialer Lokalisationssignale verblieben die Enzyme von Ratte und Maus eher im Mitochondrium, während die humane Racemase zum größten Teil wieder re-exportiert und dann in die Peroxisomen transportiert würde. Auch die Interaktion von Ribosom und Translokationsapparat sowie molekulare Chaperones könnten zu diesem Rücktransport beitragen (Knox *et al.*, 1998).

Die Beteiligung von dem mitochondrialen Matrix *Heat-shock*-Protein mt-Hsp70 konnten Gaume und Mitarbeiter 1998 bei Faltung und Transport der mitochondrialen Dihydrofolatreduktase (DHFR) zeigen. Faltung und Translokation der DHFR konkurrieren dergestalt miteinander, daß das Protein vor dem endgültigen Import mehrere Zyklen von Faltung und Entfaltung durchlaufen muß (Gaume *et al.*, 1998).

Der Einfluß der verschiedenen Translokationssignale auf die subzelluläre Lokalisation der Racemase kann vermutlich genauer erst durch ein transgenes Mausmodell mit einer α -Methylacyl-CoA-Racemase-Defizienz nach Transfektion mit nativen und mutierten Racemase cDNAs geklärt werden.

Genomische Organisation der humanen α -Methylacyl-CoA-Racemase

Bei der Analyse der cDNA und der daraus resultierenden Aminosäuresequenz der α -Methylacyl-CoA-Racemase ist die große sequenzielle Übereinstimmung zwischen den untersuchten Spezies auffällig. Nicht nur auf Protein-, sondern auch auf RNA-Ebene ist die Racemase-Sequenz hoch konserviert. Ein Vergleich des genomischen Aufbaus der Racemase-Gene aus Mensch und Maus zeigt auch hier signifikante Übereinstimmungen (Abb. 4- 4). Die Exon- und Intronstrukturen des menschlichen Gens entsprechen der bekannten Struktur des murinen Racemase-Gens (T.Kotti, persönl. Mitteilung). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist die Anzahl der Exons bzw. Introns in beiden Spezies identisch, allerdings unterscheiden sich die Introns in ihrer Größe z.T. beträchtlich. Beim Menschen unterteilen vier Introns die fünf Exons an den Stellen 339/340 bp, 479/480 bp, 640/641 bp sowie 827/828 bp. Die Größen der Introns betragen 1,8 kb (Intron I), 1,3 kb (Intron II), 8,8 kb (Intron III) sowie 2,2 kb (Intron IV).

Die Intronpositionen der Maus sind gegenüber der humanen Sequenz zwischen Exon 1 und 2 sowie Exon 2 und 3 um eine Aminosäure versetzt. Ihre Größen weichen von den Introngrößen der humanen Sequenz ab und betragen 2,0 kb für Intron I, 1,5 kb für Intron II, 4,0 kb für Intron III und 5,0 kb für Intron IV (Abb. 4- 4). Eine detaillierte Darstellung der Exon-/Intronstruktur der humanen Racemase und ihrer DNA-Sequenz ist im Anhang abgebildet.

Exon1human	89					90	100
Exon1 Maus						AT GGCAC TGCAG	
						AT G* TG****GT	
Exon1human		110	120	130	140	150	
Exon1human	101	GGCATCTCGG	TCATGGAGCT	GTCCGGCCTG	GCCCCGGGCC	CGTTCTGTGC	
Exon1 Maus		***G**AG**	*TG*****	*G*A*****	*****G*	*****C*G	
Exon1human		160	170	180	190	200	
Exon1human	151	TATGGTCCTG	GCTGACTTCG	GGGCGCGTGT	GGTACGCGTG	GACCGGCCCG	
Exon1 Maus		A*****	**G*****	*C**CGAG**	***G*****	A*****TG*	
Exon1human		210	220	230	240	250	
Exon1human	201	GCTCCCGCTA	CGACGTGAGC	CGCTTGGGCC	GGGGCAAGCG	CTCGCTAGTG	
Exon1 Maus		*****--AC	G*G**A**AT	TTTC***C**	*A*****	*****C*	
Exon1human		260	270	280	290	300	
Exon1human	251	CTGGACCTGA	AGCAGCCGCG	GGGAGCCGCC	GTGCTGCGGC	GTCTGTGCAA	
Exon1 Maus		*****	***GCT*T*A	*****T*A*G	***T*****	*CA*****GC	
Exon1human		310	320	330			
Exon1human	301	GCGGTCGGAT	GTGCTGCTGG	AGCCCTTCCG	CCGCG →		
Exon1 Maus		A**CG****C	***T*****	*****	*T →		
Exon2human					340	350	
Exon2human	336	Intron I human (1,8 kb)			← GTGTC	ATGGAGAAAC	
Exon2 Maus		Intron I Maus (2 kb)			← GCG*****	*****	
Exon2human		360	370	380	390	400	
Exon2human	351	TCCAGCTGGG	CCCAGAGATT	CTGCAGCGGG	AAAATCCAAG	GCTTATTTAT	
Exon2 Maus		*****T**	G*****C*	**A*T**A**	*C*****A	***C**C**	
Exon2human		410	420	430	440	450	
Exon2human	401	GCCAGGCTGA	GTGGATTTGG	CCAGTCAGGA	AGCTTCTGCC	GGTTAGCTGG	
Exon2 Maus		*****	*C*****	***A**G**	*TT***C*A	AAG*****	
Exon2human		460	470	480	490	500	
Exon2human	451	CCACGATATC	AACTATTTGG	CTTTGTCAG →			
Exon2 Maus		***T**C**	*****	***AT →			
Exon3human							
Exon3human	480	Intron II human (1,3 kb)			← G	TGTTCTCTCA	AAAATTGGCA
Exon3 Maus		Intron II Maus (1,5 kb)			← CAGG	C*****G**	**G*****
Exon3human		510	520	530	540	550	
Exon3human	501	GAAGTGGTGA	GAATCCGTAT	GCCCCGCTGA	ATCTCCTGGC	TGACTTTGCT	
Exon3 Maus		***C*****	***C**C**C	C*A*****	*****	*****GC	
Exon3human		560	570	580	590	600	
Exon3human	551	GGTGGTGGCC	TTATGTGTGC	ACTGGGCATT	ATAATGGCTC	TTTTTGACCG	
Exon3 Maus		*****A****	*C*****CA*	*****	G*GC*****	*C*****A**	
Exon3human		610	620	630	640		
Exon3human	601	CACACGCACT	GACAAGGGTC	AGGTCATTGA	TGCAAATATG →		
Exon3 Maus		*****T**	*G*CGA**G*	**A*****C**	*T***GC*** →		
Exon4human						650	
Exon4human	641	Intron III human (8,8 kb)			←	GTGGAAGGAA	
Exon4 Maus		Intron III Maus (4 kb)			←	*****G*	

Exon4human	651	660	670	680	690	700
Exon4 Maus		CAGCATATTT	AAGTTCTTTT	CTGTGGAAAA	CTCAGAAATC	GAGTCTGTGG
		*T*****C**	*****A**	*****C	*C***CCCAT	*G*****
Exon4human	701	710	720	730	740	750
Exon4 Maus		GAAGCACCTC	GAGGACAGAA	CATGTTGGAT	GGTGGAGCAC	CTTTCTATAC
		A**CAG****	*****A**	***C**A***	**C**T****	*****C**
Exon4human	751	760	770	780	790	800
Exon4 Maus		GACTTACAGG	ACAGCAGATG	GGGAATTCAT	GGCTGTTGGA	GCAATAGAAC
		A**C****A*	**G*****C*	***G*****	*****A**T	**C*****
Exon4human	801	810	820			
Exon4 Maus		CCCAGTTCTA	CGAGCTGCTG	ATCAAAG →		
		*****T	T*CA*****	C*T**** →		
Exon5human	827			830	840	850
Exon5 Maus		Intron IV human (2,2 kb)		← GAC	TTGGACTAAA	GTCTGATGAA
		Intron IV Maus (5 kb)		← ***	*****CG*	*****G***
Exon5human	851	860	870	880	890	900
Exon5 Maus		CTTCCCTCTC	AGATGAGCAC	GGATGATTGG	CCAGAAATGA	AGAAGAAGTT
		C***C*	*****T	A*CA*****	*****G****	*****A**
Exon5human	901	910	920	930	940	950
Exon5 Maus		TGCAGATGTA	TTTGCAAAGA	AGACGAAGGC	AGAGTGGTGT	CAAATCTTTG
		*****G	*****	***T*****	**A*****C	**G*****
Exon5human	951	960	970	980	990	1000
Exon5 Maus		ACGGCACAGA	TGCCTGTGTG	ACTCCGGTTC	TGACTTTTGA	GGAGGTTGTT
		*****G****	**G*****	**C**A**G*	*****G****	*****CCC*C
Exon5human	1001	1010	1020	1030	1040	1050
Exon5 Maus		CATCATGATC	ACAACAAGGA	ACGGGGCTCG	TTTATCACCA	GTGAGGAGCA
		CCC*G*	*****GA**	*****C***C	**C*****TG	A**G*****
Exon5human	1051	1060	1070	1080	1090	1100
Exon5 Maus		GGACGTGAGC	CCCCGCCCTG	CACCTCTGCT	GTTAAACACC	CCAGCCATCC
		*CT*CC****	*****	*****	T*CC*GA**T	**T**G***
Exon5human	1101	1110	1120	1130	1140	1150
Exon5 Maus		CTTCTTTCAA	AAGGGATCCT	TTCATAGGAG	AACACACTGA	GGAGATACTT
		*A***GC***	*****C***	*CTG*****G*	*G*****C*T	A**AG*G***
Exon5human	1151	1160	1170	1180	1190	1200
Exon5 Maus		GAAGAATTTG	GATTCAGCCG	CGAAGAGATT	TATCAGCTTA	ACTCAGATAA
		AG***G*A**	*****T*A	G*****C	CT*****GC	*****G
Exon5human	1201	1210	1220	1230	1240	
Exon5 Maus		AATCATTGAA	AGTAATAAGG	TAAAAGCTAG	TCTCTAA	
		*****G****	**G*****C	*****C*A	***TGA	

Abb. 4- 4: Exon-/Intronstruktur des ORF der α -Methylacyl-CoA-Racemasen von Mensch und Maus (die angegebenen Sequenzpositionen sind auf die Gesamtsequenz der humanen Racemase bezogen).

Im Gegensatz zu dem fast identischen Aufbau der Mensch- und Mausgene ist bei den *Caenorhabditis elegans*-Genen der Proteine ZK892.4 und C24A3 eine völlig andere genomische Organisation erkennen, vgl. Tab. 4- 1. Zum einen sind die *C.elegans*-Gene in sieben statt in fünf Exons unterteilt, zum anderen unterscheidet sich ihre Aufteilung vollständig von den beiden Säuger-Genen (Abb. 4- 5).

Die Proteine ZK892.4 und C24A3.3, verbindet untereinander nur eine 75 %ige Sequenzidentität, interessanterweise stimmt die Organisation der beiden *C.elegans*-Gene jedoch völlig überein. Im offenen Leseraster enthalten sie sechs Introns an exakt den gleichen Positionen, siehe Tab. 4- 1.

	Exon 1 (Intron- position I)	Exon 2 (Intron- position II)	Exon 3 (Intron- position III)	Exon 4 (Intron- position IV)	Exon 5 (Intron- position V)	Exon 6 (Intron- position VI)	Exon 7
Mensch	247 bp (247/248 bp)	144 bp (391/392 bp)	161 bp (552/553 bp)	187 bp (739/740 bp)	410 bp (-)	-	-
Maus	244 bp (244/245 bp)	144 bp (388/389 bp)	161 bp (552/553 bp)	187 bp (739/740 bp)	410 bp (-)	-	-
C1(C24A3)	114 bp (203/204 bp)	84 bp (287/288 bp)	196 bp (483/484 bp)	135 bp (618/619 bp)	139 bp (757/758 bp)	188 bp (945/946 bp)	167 bp
C2(ZK892)	114 bp (114/115 bp)	84 bp (198/199 bp)	196 bp (394/395 bp)	135 bp (529/530 bp)	139 bp (668/669 bp)	188 bp (856/857 bp)	167 bp

Tab. 4- 1: Genomischer Aufbau des ORF der α -Methylacyl-CoA-Racemasen aus Mensch, Maus und der zwei hypothetischen Proteinen C1 und C2 aus *C.elegans*.

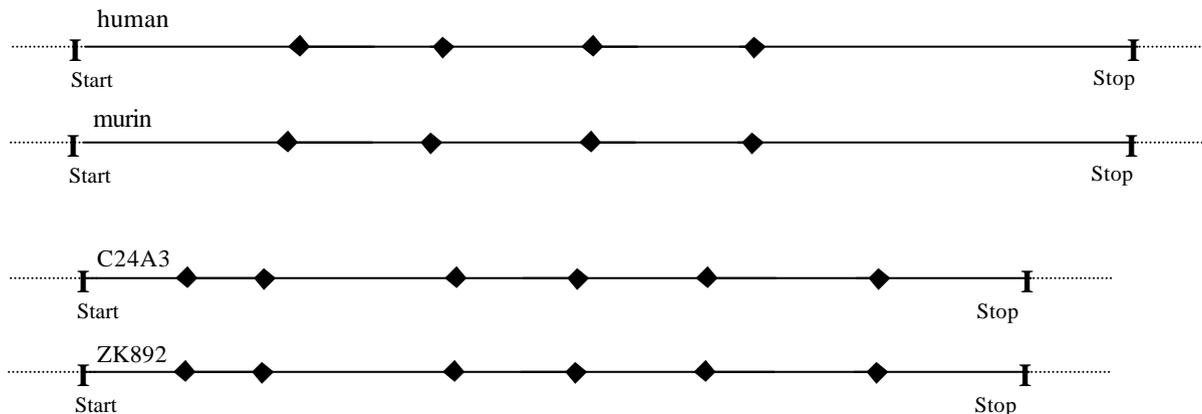


Abb. 4- 5: Exonstruktur der α -Methylacyl-CoA-Racemasen aus Mensch, Maus und der zwei hypothetischen Proteinen C1 (ZK892) und C2 (C24A3) aus *C.elegans* (die jeweiligen Intronpositionen sind mit E markiert).

Im Laufe der Evolution hat sich die genomische Struktur der Racemasen stark verändert. Bei Mensch und Maus als Vertreter der Säugetiere läßt sich eine hoch konservierte genomische Organisation feststellen (vgl. Tab. 4- 1 und Abb. 4- 5). Um eine genauere Aussage über den phylogenetischen Ursprung der Racemase zu treffen, fehlen jedoch noch weitere Daten einer größeren Zahl verschiedener Spezies.