

1 Einleitung

Peroxisomen sind membrangebundene Organellen mit einem Durchmesser bis zu einem Mikrometer, die in fast allen eukaryotischen Zellen verbreitet sind. 1954 wurden von Rhodin elektronenmikroskopisch zytoplasmatische Einschlüsse in Nierentubuluszellen von Mäusen entdeckt (Rhodin, 1954). Diese waren nur morphologisch als Mikrokörperchen (*microbodies*) bekannt, bevor sie 1966 von C. de Duve biochemisch charakterisiert und als Organellen mit mindestens einer Wasserstoffperoxid-bildenden Oxidase und einer H₂O₂-abbauenden Katalase definiert wurden (De Duve & Baudhuin, 1966). Peroxisomen wurden lange Zeit für unbedeutende Überreste primitiver Oxidationssysteme gehalten, da in ihnen nur einige wenige Enzyme gefunden wurden, die man gemeinhin als unwichtig betrachtete. Mittlerweile ist die zentrale Bedeutung der Peroxisomen für den zellulären Stoffwechsel unumstritten, da ihnen eine Vielzahl wichtiger Stoffwechselreaktionen zugeordnet werden konnte.

Mit Ausnahme der Erythrozyten kommen Peroxisomen in allen menschlichen Zellen vor, wobei ihre Größe und Form, sowie ihre Häufigkeit gewebsabhängig ist (Roels *et al.*, 1991). Besonders konzentriert treten sie in Leber- und Nierengewebe auf, während sie in Fibroblasten und Amnionzyten in sehr viel geringerem Umfang zu finden sind. Abgesehen von den wurmförmigen Peroxisomen im Duodenalepithel (Roels *et al.*, 1991) handelt es sich um runde Organellen mit einem Durchmesser zwischen 0,1 - 1,0 µm. Die einfache Organellmembran ist aus peroxisomenspezifischen integralen Membranproteinen zusammengesetzt, in der Matrix befinden sich mehr als fünfzig Enzyme für anabole und katabole Stoffwechselwege.

Peroxisomen besitzen ein breit gefächertes Aufgabenspektrum, wozu nicht nur der oxidative Abbau exogener Substanzen zählt, wie D-Aminosäuren, und endogener Stoffwechselprodukte, wie Dicarbonsäuren (Kolvraa & Gregersen, 1986; Vamecq & Draye, 1987), L-Pipecolinsäure (Mihalik *et al.*, 1989), Polyaminen (Beard *et al.*, 1985; Holttä, 1977), α -Hydroxysäuren und Glyoxylsäure (Danpure & Jennings, 1986; Nakatani *et al.*, 1985) bis hin zur Oxidation überlangkettiger und verzweigter Fettsäuren, sondern auch einige Biosynthesen, z.B. von Plasmalogenen und Gallensäuren (Hajra *et al.*, 1979; Hajra *et al.*, 1982; zur Übersicht siehe van den Bosch *et al.*, 1992).

Die Peroxisomen verfügen über eine eigene β -Oxidation, die zwar analog zur mitochondrialen β -Oxidation verläuft, aber dennoch wesentliche Unterschiede aufweist. Im Gegensatz zu der β -Oxidation in den Mitochondrien dient sie weniger der Energiegewinnung, sondern dem oxidativen Abbau von Substraten, die im sonstigen zellulären Stoffwechsel nicht abgebaut werden können. Während die kurz- und langkettigen Fettsäuren in den Mitochondrien oxidiert werden, findet die β -Oxidation der überlangkettigen und methylverzweigten Fettsäuren in den Peroxisomen statt. Die Fettsäureoxidation unterliegt in beiden Organellen dem gleichen Reaktionsmechanismus. Nach der Aktivierung zum Acyl-CoA-Ester erfolgen Dehydrierung, Hydratation, erneute Dehydrierung und schließlich thiolytische Freisetzung. Dabei liegt der entscheidende Unterschied darin, daß bei der Dehydrierung der aktivierten Fettsäuren die entstehenden Reduktionsäquivalente auf molekularen Sauerstoff übertragen werden und nicht wie bei der mitochondrialen β -Oxidation in die Atmungskette eingeschleust werden. Das dabei gebildete H_2O_2 wird von Katalase in H_2O und O_2 disproportioniert.

Die Bedeutsamkeit der Peroxisomen wird durch die schweren Krankheitsbilder deutlich, die schon beim Fehlen eines einzelnen peroxisomalen Enzyms auftreten. Es sind bereits eine ganze Reihe angeborener Stoffwechselstörungen des Menschen bekannt, die vom Fehlen einzelner peroxisomaler Enzyme bis hin zur Störung der Peroxisomenbiogenese reichen. Ein völliges Fehlen der Peroxisomen bei Patienten mit Zellweger-Syndrom führt zu schwersten Mißbildungen, die wenige Monaten nach der Geburt zum Tode führen (Moser, 1988).

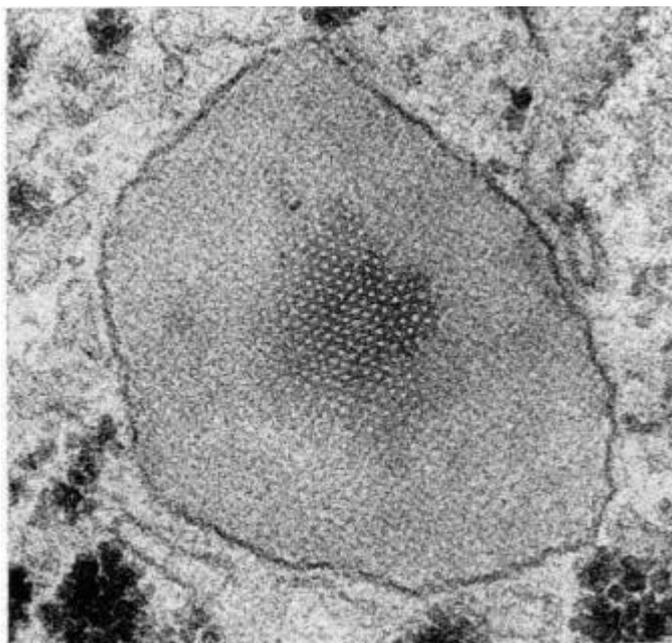


Abb. 1- 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Peroxisoms in der Rattenleber. In der Organelle, die von einer einzelnen Lipiddoppelschicht begrenzt ist, liegt ein Kristall aus Urat-Oxidase. Die dunklen Strukturen außerhalb des Peroxisoms sind Glykogenpartikel (entnommen aus: L. Stryer, 1998).

Peroxisomenbiogenese

Peroxisomen entstehen, wie bisher angenommen, nicht nur durch Teilung bereits existierender Organellen (Lazarow & Fujiki, 1985), sondern vermutlich auch unabhängig von bereits existierenden Peroxisomen (South & Gould, 1999). Peroxisomale Proteine werden im Cytoplasma an freien Polysomen zumeist zu ihrer endgültigen Größe synthetisiert und posttranslational in die Peroxisomen transportiert (Lazarow & Fujiki, 1985). Ausnahmen sind z.B. die Acyl-CoA-Oxidase und die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase, die als Vorstufen und nicht als reife Proteine in das Organell transportiert werden (Subramani, 1993). Da die peroxisomalen Proteine zum größten Teil komplett gebildet werden, muß das Signal für den weiteren Transport ins Peroxisom also schon in ihrer DNA-Sequenz enthalten sein (Osumi & Fujiki, 1990).

Peroxisomale Zielsequenzen (*peroxisomal targeting signals*, PTS) sind primär durch Komplementierungssysteme identifiziert worden, *in vitro* mit dem posttranslationalen Proteinimport in die Peroxisomen (Miyazawa *et al.*, 1989; Fujiki *et al.*, 1982) und *in vivo* mit kultivierten Zellen durch rekombinante DNA-Transfektion (Gould *et al.*, 1989; Swinkels *et al.*, 1992). Für den Transport ins Peroxisom sind bis jetzt zwei peroxisomale Sequenzmotive ermittelt worden, das carboxyterminale Signal PTS 1 (*peroxisomal targeting signal*), ein kurzes, nicht abgespaltenes Sequenzmotiv mit der Consensussequenz (S/A/C)(K/R/H)(L/M), und das aminoternale PTS 2 mit dem Sequenzmotiv (R/K)(L/V/I)X₅(Q/H)(L/A), welches im Vorläuferprotein im Abstand von 2-12 Aminosäuren zum N-Terminus lokalisiert ist und im reifen Protein herausgeschnitten ist.

Das Sequenzmotiv –SKL ist im Gegensatz zu Transportsequenzen anderer Organellen hoch konserviert (Miura *et al.*, 1992; Osumi & Fujiki, 1990). Daneben existieren aber auch eine Reihe abweichender Sequenzen, wie das Tetrapeptid -KANL der humanen Katalase (Purdue & Lazarow, 1996), die als PTS I agieren. 1993 wurden in der Katalase A von *S. cerevisiae* zwei unabhängige peroxisomale Transportsignale identifiziert, von denen das eine C-terminal, das andere Signalmotiv aber intern lokalisiert ist (Kragler *et al.*, 1993). In der Hefe *Candida tropicalis* wurden ebenfalls interne PTS entdeckt, die bislang aber noch unvollständig charakterisiert sind (Small *et al.*, 1988).

Peroxisomale Transportsignale vom Typ PTS I und II konnten nicht in allen der bisher sequenzierten peroxisomalen Matrixproteinen gefunden werden. Neben dem in wenigen Proteinen vorkommenden PTS 2, wie z.B. in der humanen 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (Bout *et al.*, 1988; Fujiki *et al.*, 1985; Miura *et al.*, 1984), sind PTS 1-Motive nur in 40 % der cytosolischen Proteine identifiziert worden (de Hoop & Ab, 1992; Fujiki, 1997; Osumi & Fujiki, 1990; Subramani, 1993). Dies legt die Vermutung nahe, daß neben den bereits beschriebenen PTS noch weitere peroxisomale Transportsignale existieren.

Zur Untersuchung der Peroxisomenbiogenese und des Proteinimportes sowie der möglicherweise daran beteiligten cytosolischen und membranständigen Komponenten wurden Komplementierungsstudien mit Hefemutanten, CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) und menschlichen Fibroblasten durchgeführt (zur Übersicht siehe Distel *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß an der Entstehung der menschlichen Peroxisomen mindestens dreizehn Gene (Lazarow *et al.*, 1995; Roscher *et al.*, 1989) beteiligt sind. Für die Biogenese in *S. cerevisiae* sind bis jetzt zwanzig Gene identifiziert worden (Kunau *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1998).

Genkomplementationsstudien wurden zuerst mit Hefemutanten von *Candida species*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* und *Yarrowia lipolytica* durchgeführt (Elgersma *et al.*, 1996; McNew & Goodman, 1996; Spong & Subramani, 1993; Subramani, 1993). Hefezellen können auch ohne funktionelle Peroxisomen auf Kompletmedium überleben, so daß Mutationen in der Peroxisomenbiogenese durch den Wachstumsstopp auf alternativen Kohlenstoffquellen, wie Ölsäure oder Methanol, identifiziert werden können. Solche peroxisomendefizienten (PEX) Mutanten (PEX-Gen-Nomenklatur, siehe Distel *et al.*, 1996) können als Vergleich zur zellulären Diagnostik von bestimmten peroxisomalen Erkrankungen des Menschen herangezogen werden. Zur genaueren Analyse der möglichen pathogenetischen Auswirkungen von Peroxisomenbiogenesedefekten wurden somatische Zellmutanten von CHO-Zellen entwickelt, die mit Humanzellen phäno- und genotypisch besser korrelieren (zur Übersicht siehe Elgersma & Tabak, 1996; McNew & Goodman, 1996; Subramani, 1993). Mit Hilfe von Komplementationsstudien konnten beispielsweise die genetischen Ursachen für das sogenannte Zellweger-Syndrom (ZS) untersucht werden. Bei Patienten mit ZS fehlen intakte Peroxisomen und es kommt zum Verlust aller peroxisomalen Funktionen aufgrund eines generalisierten peroxisomalen Biogenesedefekts.

Genotypisch basiert diese Stoffwechselstörung auf dem Ausfall unterschiedlicher Faktoren, die an der Peroxisomenbiogenese beteiligt sind. Bislang konnten für das ZS 12 Komplementationsgruppen (CG) ermittelt werden.

Zu den bisher identifizierten Peroxisomenbiogenesefaktoren, den sogenannten *Peroxinen*, gehören auch die peroxisomalen Membranproteine PEX 11p und PEX 16p (Erdmann & Blobel, 1995; Sakai *et al.*, 1995). PEX 11p (27-32 kDa) ist an der Peroxisomenproliferation beteiligt (Marshall *et al.*, 1996). Neben der PEX 11p-vermittelten Teilung bereits existierender Organellen, konnte mittlerweile auch eine unabhängige Neuf ormation von Peroxisomen gezeigt werden, in die das Peroxin P16p (45 kDa) involviert ist (South & Gould, 1999; Eitzen *et al.*, 1997).

Aus verschiedenen Hefen, namentlich *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *H. polymorpha* und *Y. lipolytica*, wurden Mutanten isoliert, die einen Defekt im SKL-Import besitzen. Der sogenannten PEX 5-Mutante, einem Mitglied der TPR-Proteinfamilie (*tetratricopeptide repeat*) fehlt der PTS I-Rezeptor (Goebel & Yanagida, 1991). Das humane PEX 5, von dem auch eine zweite Isoform mit einer Insertion von 37 Aminosäuren gefunden wurde, codiert ein 67 kDa Protein, für das *in vitro* eine Bindung an die PTS I-Sequenz belegt werden konnte (Fransen *et al.*, 1995). Eine Mutation des PEX 5-Gens könnte eine Ursache für die neonatale ALD und das Zellweger-Syndrom CG2 sein (Baes *et al.*, 1997; McCollum *et al.*, 1993).

Einen Defekt im PTS-2-Proteinimport konnten Marzioch und Lazarow bei der PEX 7-Mutante *S. cerevisiae pas7 (peb1)* zeigen. PEX 7 codiert den PTS 2-Rezeptor, ein 42 kDa-Protein (Marzioch *et al.*, 1994; Zhang & Lazarow, 1995). Hierfür konnte eine *in vivo*-Bindung an das PTS 2-Motiv nachgewiesen werden (Zhang & Lazarow, 1995). Ein Ausfall des humanen Homologs dieses Proteins ist vermutlich für eine Form der rhizomelischen Chondrodysplasia punctata (RCDP) verantwortlich (Braverman *et al.*, 1997; Fujiki, 1997). Die intrazelluläre Lokalisation der PTS-Rezeptoren wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert. Sowohl für die Lokalisation des PTS I-Rezeptors im Cytosol als auch für die Assoziation mit dem Peroxisom konnten Hinweise gefunden werden (Dodt *et al.*, 1995; Wiemer *et al.*, 1995; Dodt *et al.*, 1996). Marzioch zeigte für den PTS 2-Rezeptor, daß dieser cytosolisch und höchstens partiell peroxisomal assoziiert ist (Marzioch *et al.*, 1994). Die Arbeitsgruppe um Lazarow bestimmte im Gegensatz dazu den Standort dieses Rezeptors ausschließlich innerhalb des Peroxisoms (Zhang *et al.*, 1995).

Mit der Klonierung der PEX 13-Mutante von *S. cerevisiae* und *P. pastoris* wurde 1996 ein integrales peroxisomales Membranprotein (40 – 43 kDa) identifiziert, deren cytoplasmatisch orientierte SH3-Domäne an den PTS1-Rezeptor bindet und somit möglicherweise als *docking* Protein für den Proteinimport fungiert (Elgersma *et al.*, 1996; Erdmann & Blobel, 1996; Gould *et al.*, 1996). Am Proteinimport über den PTS 2-Rezeptor ist vermutlich das Genprodukt von PEX 17 beteiligt, ein relativ kleines Peroxin (23 kDa), das an der cytoplasmatischen Oberfläche der Peroxisomen liegt (Huhse *et al.*, 1998; Subramani, 1997). Eine gemeinsame Anlaufstelle für den PTS 1- und PTS 2-abhängigen Proteinimport könnte PEX 14p darstellen. Es handelt sich dabei um ein zum Cytosol gerichtetes, peripheres Membranprotein mit einer Molekulargröße von 38-39 kDa (Brocard *et al.*, 1997; Subramani, 1997). PEX 14p kann als Membranrezeptor sowohl den PTS 1- als auch den PTS 2-Rezeptor binden (Albertini *et al.*, 1997).

Weitere an Biogenese beteiligte Membrankomponenten sind durch PEX 2-Mutanten in CHO-Zellen ermittelt worden (Eitzen *et al.*, 1996; Waterham *et al.*, 1996). PEX 2 codiert ein integrales peroxisomales Membranprotein in der Größe von 35 kDa. Das Membranprotein PAF-1 (*peroxisome assembly factor-1*) besitzt zwei Transmembransegmente, wobei das N- und C-terminale Ende des Proteins ins Cytosol reicht. Dieses könnte damit den transmembranalen Proteinimport von neusynthetisierten Proteinen übernehmen. Eine Mutation von PEX 2 stellt vermutlich eine Ursache für das Zellweger Syndrom CG5 und CG10 dar (Shimozawa *et al.*, 1992; Tsukamoto *et al.*, 1994). Eine weitere an der Peroxisomenbiogenese beteiligte Proteinvariante konnte Tsukamoto mit der PEX 6-Mutante in CHO-Zellen identifizieren. Das Genprodukt von PEX 6 ist PAF-2 (*peroxisome assembly factor-2*). Das humane PAF-2-Protein hat eine Molekulargröße von 104 kDa und besitzt zwei mögliche ATP-Bindungsstellen. Es zählt zu den Mitgliedern der AAA-Familie (ATPase associated with diverse cellular activities) von ATPasen (Kunau *et al.*, 1993).

ATP übernimmt bei der Biogenese der Peroxisomen verschiedene Aufgaben. Mehrere Arbeitsgruppen konnten eine ATP-Hydrolyse beim Import von peroxisomalen Matrixproteinen nachweisen (Horng *et al.*, 1995; Imanaka *et al.*, 1987; Wendland & Subramani, 1993). Einige Peroxine gehören zu der AAA-Familie der ATPasen (PEX1p, PEX6p) (Erdmann *et al.*, 1991; Nuttley *et al.*, 1994; Yahraus *et al.*, 1996), außerdem ist ATP z.B. für die Aktivität des peroxisomalen Membranprotein PMP 70 nötig, das zu der ABC (*ATP binding cassette*)-Familie gehört (Kamijo *et al.*, 1990).

Dessen Ausfall wird für einige Formen von ZS, nALD (Gärtner *et al.*, 1992) und ALD (Contreras *et al.*, 1996; Mosser *et al.*, 1993) verantwortlich gemacht. Für die Aktivität von cytoplasmatischen Chaperones, von denen vermutet wird, daß sie über eine Stabilisierung der Proteinkonformation am Import beteiligt sind, spielt die ATP-Hydrolyse ebenfalls eine Rolle (Crookes & Olsen, 1998; Walton *et al.*, 1994). Am Beispiel der Isocitratlyase, deren monomere Form effizienter als das oligomere Enzym importiert wird, wurde gezeigt, daß der Transport peroxisomaler Proteine durch die Struktur des zu importierenden Protein beeinflusst wird (Crookes & Olsen, 1998).

An der Peroxisomenbiogenese beteiligte Faktoren und zur Zeit diskutierte Modelle für den Proteinimport sind in Abb. 1- 2 dargestellt.

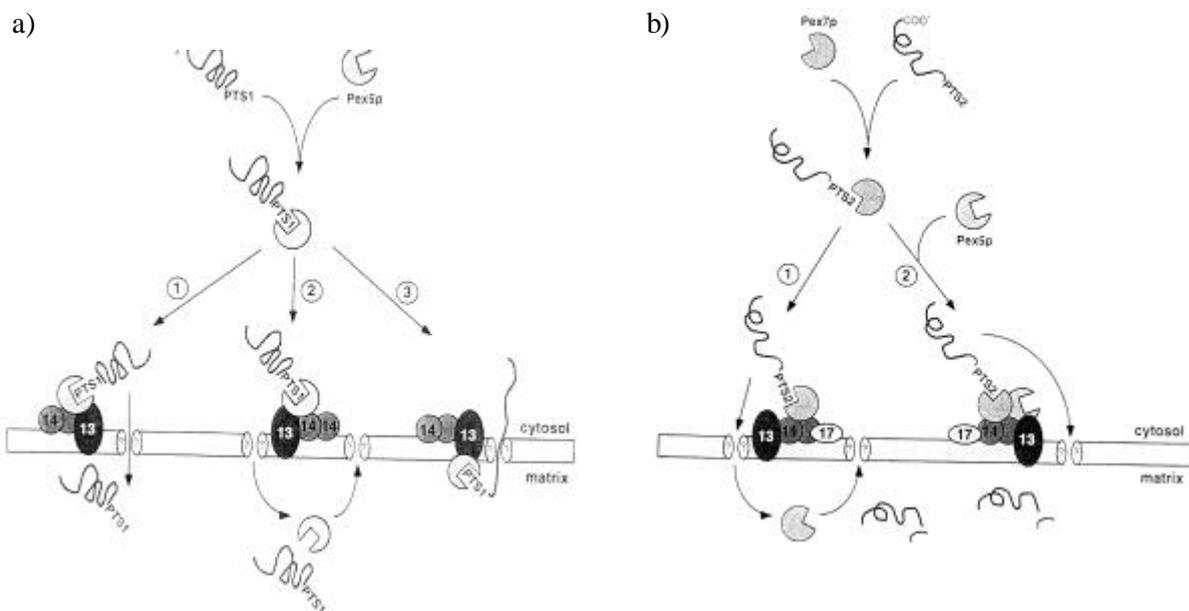


Abb. 1- 2: Peroxisomale Proteinimportmodelle und daran beteiligte Peroxine. (a) PTS1-Proteine interagieren mit dem löslichen PTS 1-Rezeptor (PEX 5p) und binden an die membrangebundenen Rezeptoren PEX 13p und PEX 14p. (1) Das Protein wird an der Oberfläche freigesetzt und importiert. (2) Das Protein wird rezeptorgebunden in die Matrix transportiert und erst dort freigesetzt. (3) PEX 5p ist intraperoxisomal lokalisiert, PTS1-Proteine gelangen über mögliche Translokationskanäle in die Matrix. (b) PTS 2-Proteine binden an den PTS 2-Rezeptor (PEX 7p). PEX 7p interagiert mit dem peripheren Membranrezeptor PEX 14p direkt (1) oder indirekt (2) über PEX 5p. Das Protein wird entweder schon vor dem Proteinimport freigesetzt oder erst gebunden an PEX 7p in die Matrix transportiert, bevor es proteolytisch abgespalten wird (Olsen, 1998).

Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen

Ein Defekt in der Peroxisomenbiogenese kann zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Obwohl die meisten dieser angeborenen Stoffwechselkrankheiten schon länger bekannt sind, ist es erst in neuerer Zeit gelungen, ihre genetischen Ursachen zu erforschen. Ein entscheidender Fortschritt gelang in diesem Zusammenhang mit der Isolierung Peroxisomen-defizienter Hefestämme (PEX-Mutanten), siehe Kapitel Peroxisomenbiogenese.

Man unterscheidet drei Typen peroxisomaler Stoffwechselstörungen:

Typ 1: Peroxisomen sind visuell nicht erkennbar und es liegt ein generalisierter Verlust aller peroxisomalen Funktionen vor [cerebrohepatorales Zellweger-Syndrom (ZS), neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD), infantiles Refsum-Syndrom (IRD)].

Typ 2: Peroxisomen sind vorhanden und haben eine normale Größe, mehrere peroxisomale Funktionen sind allerdings gestört [rhizomelische Chondrodysplasia punctata (RCDP), Hyperpipecolinazidämie].

Typ 3: Defekt eines einzelnen peroxisomalen Enzyms [Refsum-Syndrom, Adreno-leukodystrophie (X-ALD), Acyl-CoA-Oxidase-Mangel, peroxisomaler Thiolase-Mangel, trifunktionaler Enzymdefekt, primäre Hyperoxalurie Typ I (PH 1), Alkyl-DHAP-Synthetase-Mangel, Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase (DHAP-Atase)-Mangel, Akatalasämie].

Die folgende Tabelle (Tab. 1- 1) zeigt einen Überblick über häufigere peroxisomale Erkrankungen (vergleiche auch Moser, 1989; Wanders *et al.*, 1990). Das hier nicht näher erläuterte Refsum-Syndrom wird im folgenden Kapitel behandelt.

Peroxisomale Erkrankung	Pathogenese	Morphologie und Klinische Manifestierung	Biochemische Analyse
Cerebro-hepatorenales Zellweger-Syndrom (ZS)	autosomal rezessiv vererbte Krankheit; Fehlen funktioneller Peroxisomen, Verlust aller peroxisomalen Enzymaktivitäten	kraniofaziale Abnormitäten, Hepatomegalie mit Ikterus und Leberzirrhose, glomeruläre Mikrozysten der Nieren; psychomotorische Retardierung, schwere Hypotonie der Skelett-muskulatur, schwere Leberfunktionsstörung, Tod im Säuglingsalter.	Erhöhung von VLCFA, Phytansäure, Pipecolinsäure und Gallensäureintermediaten, Abnahme der Plasmalogen-Synthese
neonatale Adrenoleukodystrophie (nALD)	autosomal rezessiv vererbte Krankheit; verringerte Anzahl und Größenverlust der Peroxisomen, Verlust aller peroxisomalen Enzymaktivitäten	extensive Demyelinisierung im ZNS, Leberzirrhose; Zellweger-ähnliche Symptomatik, Erkrankung nach dem ersten Lebensjahr.	siehe ZS
infantiles Refsum-Syndrom (IRD)	autosomal rezessiv vererbte Krankheit;	abgeschwächte Zellweger-Variante; faziale Dymorphie, Chorioretinopathie, Hepatomegalie; Krankheitsverlauf beginnt im ersten Lebensjahr	siehe ZS
Adrenoleukodystrophie (X-ALD)	x-chromosomal vererbte Krankheit; normale Peroxisomen, Defekt in Transport oder Aktivierung der VLCFA-CoA-Synthetase durch Defekt des ALD-Proteins [ABC-(ATP-Bindungskassette) Membrantransporter-superfamilie]	Cerebrale Demyelinisierung, neurologische Symptome: Gehör- und Visusverlust, Demenz, Bewegungsstörungen; Nebennierenrindeninsuffizienz spätinfantile Erkrankung; Tod meist im ersten Lebensjahrzehnt	Akkumulation von VLCFA
Adrenomyeloneuropathie (AMN)	siehe ALD	Abgeschwächte klinische Variante von ALD, tritt erst im dritten Lebensjahrzehnt auf und betrifft hpts. das periphere NS und Rückenmark, z.T. Nebennierenrindeninsuffizienz	siehe ALD

Tab. 1- 1: Einige häufiger auftretende peroxisomale Erkrankungen.

Katabolismus verzweigtkettiger Fettsäuren

Neben den linearen aliphatischen Carbonsäuren, die im Stoffwechsel als Hauptbestandteil von Triglyceriden und Membranlipiden eine zentrale Rolle spielen, werden auch komplexere Carbonsäuren metabolisiert, denen beispielsweise als Hormone, wie Prostaglandine und Retinsäure, oder Membranbestandteile, wie α -Hydroxysäuren, eine wichtige Bedeutung zukommt. Daneben gehört zu diesen Carbonsäuren auch eine Vielzahl von katabolen Zwischenprodukten. Zu diesen Intermediaten zählen einige methylverzweigte Fettsäuren, die beim Abbau von Isoprenoiden entstehen, als quantitativ bedeutenster Vertreter ist in diesem Zusammenhang die Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) zu nennen. Phytansäure kann von Säugetieren nicht *de novo* synthetisiert werden, sondern wird hauptsächlich mit der Nahrung aufgenommen und auch zu einem geringen Teil durch Umsetzung aus freiem Phytol gewonnen (Steinberg *et al.*, 1967). Phytol (3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-en-1-ol), eine Seitenkette des Chlorophylls, wird von verschiedenen Bakterien im Pansen von Wiederkäuern abgespalten und weiter zu Phytansäure umgesetzt (Patton & Benson, 1966). Mit der Nahrung, und zwar vor allem aus Rindfleisch und Milchprodukten, gelangt die Phytansäure in den menschlichen Stoffwechsel und wird dort zu Pristansäure (2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure) abgebaut (Mize *et al.*, 1966; Steinberg, 1989). Neben der vom Phytol abstammenden Pristansäure werden auch geringe Mengen dieser Säure direkt aus der Nahrung aufgenommen (Avigan *et al.*, 1966).

Der Katabolismus verzweigtkettiger Fettsäuren gelangte zu allgemeinem Interesse durch die Beobachtung, daß sowohl Phytansäure (Poulos *et al.*, 1984) als auch Pristansäure (Poulos *et al.*, 1988) in den Seren von Patienten akkumulierten, die einen Defekt in der Peroxisomenbiogenese aufwiesen, und somit feststand, daß wenigstens einige Schritte ihres Abbaus in den Peroxisomen stattfinden müssen. Normalerweise liegt Phytansäure nur zu ca. 0,1 % im menschlichen Serum vor. Beim sogenannten Refsum-Syndrom hingegen steigt der Anteil der Phytansäure in Serum und Leber bis auf 30 % der gesamten Fettsäuren, meist in Form von Triglyceriden (Klenk, 1963).

Das Refsum-Syndrom (Morbus Refsum) wurde 1946 von S. Refsum erstmals als *Herodopathia atactica polyneuritiformis* beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine autosomal rezessiv vererbte peroxisomale Erkrankung, die sich in erster Linie durch eine atypische Retinitis pigmentosa, cerebelläre Ataxie und chronische Polyneuropathie äußert.

Die Ursache dieser Stoffwechselerkrankung beruht auf einem Defekt im Phytansäurekatabolismus.

Phytansäure kann aufgrund der β -ständigen Methylverzweigung nicht über die β -Oxidation der linearen Fettsäuren abgebaut werden. Statt dessen wird in den Peroxisomen durch die sogenannte α -Oxidation die Carboxylgruppe oxidativ abgespalten. Nach Aktivierung der Phytansäure zum CoA-Ester erfolgt eine Hydroxylierung zu 2-Hydroxyphytanoyl-CoA. Bei der anschließenden Decarboxylierung entsteht Pristanal, welches dann zu Pristansäure weiter oxidiert wird, siehe Abb. 1- 4 (Verhoeven *et al.*, 1997a,b). Die betreffende Methylgruppe der Pristansäure befindet sich jetzt in α -Stellung, so daß der weitere Abbau über die β -Oxidation erfolgen kann, siehe Abb. 1- 5. Nach der Dehydrierung der aktivierten Fettsäure, Hydratation und erneuter Dehydrierung werden abwechselnd Propionyl-CoA und Acetyl-CoA thioltyisch freigesetzt (zur Übersicht siehe Verhoeven *et al.*, 1998 b). Der vollständige Phytansäureabbau ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 1- 3).

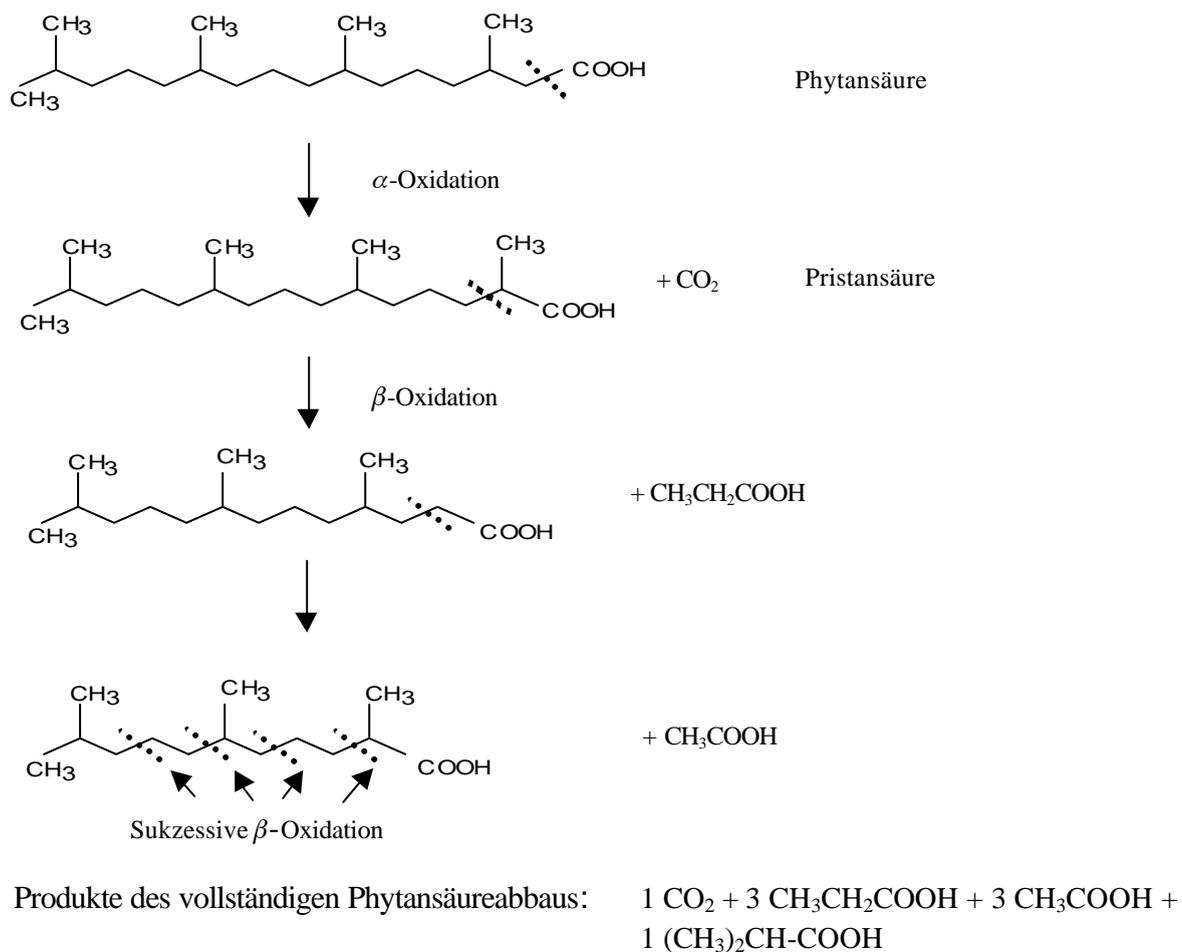


Abb. 1- 3: Phytansäureabbau.

Die Akkumulation von Phytansäure in Gewebe und Serum von Patienten mit Morbus Refsum konnte inzwischen auf einen Defekt der Phytanoyl-CoA-Hydroxylase zurückgeführt werden. Die Hydroxylase katalysiert den ersten Reaktionsschritt der α -Oxidation von Phytansäure (Abb. 1- 4). Bei einem Ausfall des Enzyms wird die Hydroxylierung von Phytanoyl-CoA zu 2-Hydroxyphytanoyl-CoA unterbunden und der Abbau von Phytansäure blockiert (Casteels *et al.*, 1997).

Da es sich bei Phytansäure um eine exogene Substanz handelt, können bei Patienten mit Refsum-Syndrom durch eine Phytansäure-arme Diät (< 10 mg/d) jedoch gute Behandlungserfolge erzielt werden (Steinberg *et al.*, 1967).

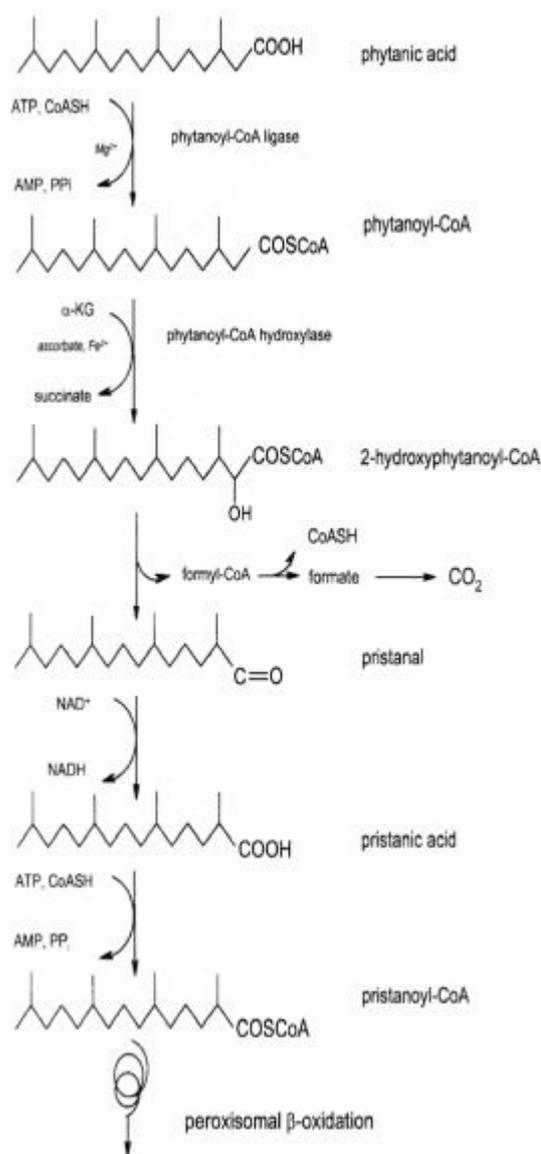


Abb. 1- 4: α -Oxidation von Phytansäure (entnommen aus Verhoeven *et al.*, 1998b)

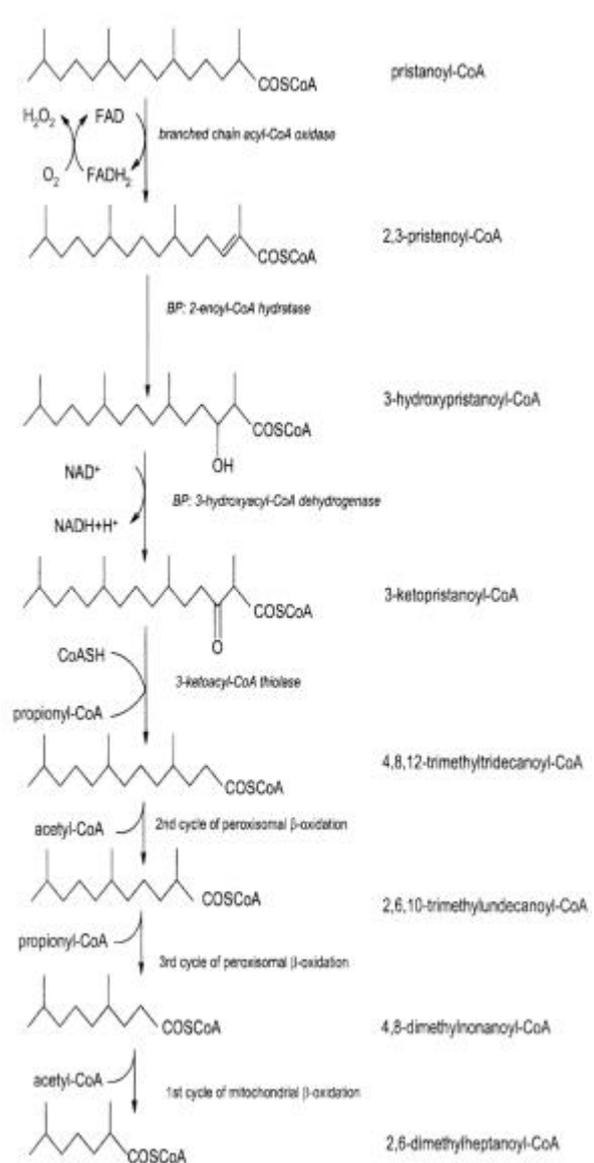


Abb. 1- 5: β -Oxidation von Pristansäure (entnommen aus Verhoeven *et al.*, 1998b)

Stereochemie der β -Oxidation der α -Methylacyl-CoAs

Pristansäure (2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure) fällt nach der α -Oxidation von Phytansäure als Gemisch von zwei verschiedenen Stereoisomeren an, da Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) natürlicherweise als Mischung eines (3*R*,7*R*,11*R*)- und eines (3*S*,7*R*,11*R*)-Diastereomeren vorliegt (Ackman, 1967).

Die α -Oxidation verändert die Stellung des Wasserstoffatoms in β -Position nicht (Avigan *et al.*, 1966; Fingerhut *et al.*, 1993) und führt somit zu einem Diastereomergemisch aus (2*R*,6*R*,10*R*)- und (2*S*,6*R*,10*R*)-Pristansäure. Die beteiligten mitochondrialen Acyl-CoA-Dehydrogenasen und peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidasen können stereospezifisch jedoch nur das (2*S*)-2-Methylacyl-CoA erkennen und umsetzen (Schmitz & Conzelmann, 1997). Für den weiteren Abbau methylverzweigter Fettsäuren müssen also Enzyme vorkommen, die in der Lage sind, die Stereoisomere von der (*R*)- in die (*S*)-Konfiguration zu überführen.

Die ersten drei Zyklen der β -Oxidation von Pristansäure zu 4,8-Dimethylnonanoyl-CoA finden in den Peroxisomen statt, anschließend wird das verkürzte Acyl-CoA als Carnitinester in die Mitochondrien transportiert, wo es zu CO₂ und H₂O abgebaut wird (Verhoeven *et al.*, 1998a). Da sowohl Mitochondrien als auch Peroxisomen am oxidativen Abbau von Phytansäure bzw. Pristansäure beteiligt sind, müssen zur vollständigen β -Oxidation der Pristansäure zu CO₂ und H₂O in beiden Organellen Racemasen vorkommen. In den Peroxisomen wird die Racemase-Aktivität zum Pristansäureabbau zweimal benötigt, in den Mitochondrien nur für die Racemisierung von (2,6*R*)-Dimethylheptanoyl-CoA zu (2,6*S*)-Dimethylheptanoyl-CoA (Abb. 1- 6).

Neben den methylverzweigten Fettsäuren konnte gezeigt werden, daß auch andere α -Methylcarbonsäuren, wie die Gallensäure-Intermediate THCA (3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -cholestan-26-säure) und DHCA (3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholestan-26-säure), stereospezifisch in der (*S*)-Konfiguration oxidiert werden (Pedersen *et al.*, 1996; Van Veldhoven *et al.*, 1996). Da bei der mitochondrialen Hydroxylierung der Cholesterin-Seitenkette selektiv das (25*R*)-Diastereomer gebildet wird (Shefer *et al.*, 1978), muß die Racemisierung auch in der Gallensäurebiosynthese einen wichtigen Schritt darstellen. In Rattenleber wurde 1994 die Existenz einer spezifischen α -Methylacyl-CoA-Racemase nachgewiesen, die die α -methylverzweigten Fettsäuren als Coenzym A-Thioester isomerisiert (Schmitz *et al.*, 1994) und auch in der Lage ist, (25*R*)-THCA und (25*R*)-DHCA zu (25*S*)-THCA und (25*S*)-DHCA zu racemisieren (Schmitz & Conzelmann, 1997).

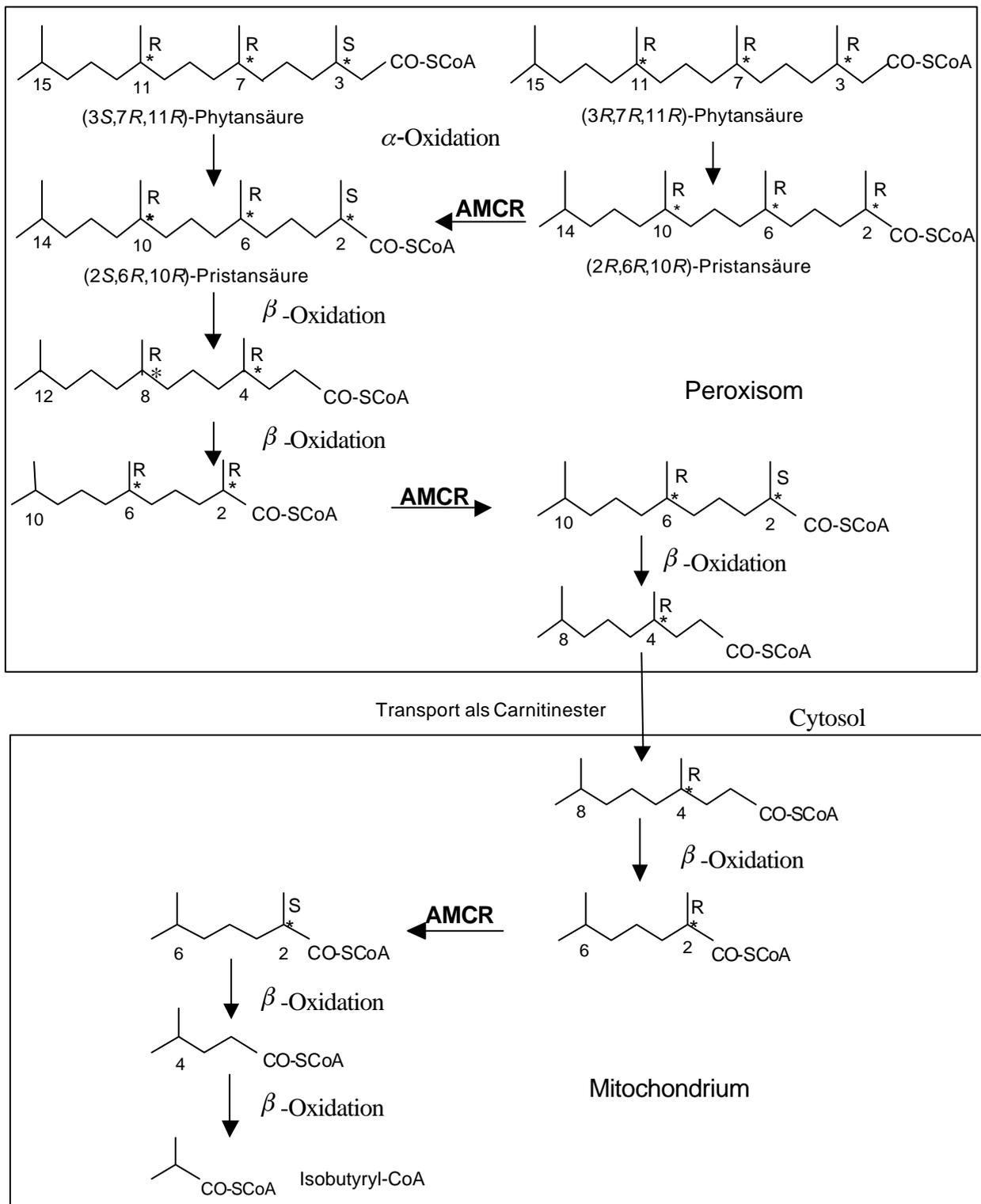


Abb. 1- 6: Schematische Darstellung des Phytansäureabbaus hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der Racemaseaktivität (AMCR: α -Methylacyl-CoA-Racemase) (Verhoeven et al., 1998a).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die α -Methylacyl-CoA-Racemase aus humanem Gewebe zu isolieren und protein-chemisch und biochemisch zu charakterisieren.

Daran anschließend sollte die Racemase parallel zu den Enzymhomologen von Ratte und Maus molekularbiologisch analysiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen dazu beitragen, die Aufgabe der α -Methylacyl-CoA-Racemase im menschlichen Stoffwechsel weiter aufzuklären.

In diesem Zusammenhang sollte die Beteiligung der Racemase an katabolen und anabolen Vorgängen, wie dem Katabolismus verzweigtkettiger Fettsäuren und der Biosynthese von Gallensäuren untersucht werden. Von besonderem Interesse waren dabei mögliche Auswirkungen eines Enzymdefekts und die Frage, inwieweit die Racemase an der Entstehung angeborener peroxisomaler Stoffwechselstörungen beteiligt ist.