

## 5 Zusammenfassung

Im Katabolismus methylverzweigter Fettsäuren spielt die  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase eine wichtige Rolle, indem sie die (*R*)- und (*S*)-Isomere von  $\alpha$ -methylverzweigten Fettsäuren als Coenzym A Thioester racemisiert. Methylverzweigte Fettsäuren entstehen beim Abbau von Isoprenoiden und werden darüber hinaus auch von vielen Organismen, wie z.B. Mycobakterien, synthetisiert. Die Hauptaufgabe der Racemase ist aber vermutlich in der Biosynthese von Gallensäuren zu sehen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase aus humanem Gewebe zu reinigen und zu charakterisieren sowie ihre physiologische Rolle im Katabolismus verzweigt-kettiger Fettsäuren und der Gallensäurebiosynthese zu untersuchen.

Die Aktivität der Racemase wurde anhand der [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O-Freisetzung aus [ $\alpha$ - $^3\text{H}$ ]- $\alpha$ -Methylacyl-CoAs bestimmt. Diese Methode erlaubt aufgrund ihrer hohen Spezifität und Empfindlichkeit auch eine verlässliche Aktivitätsbestimmung in Rohextrakten und fetalen Zellen.

Die  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase wurde aus humanem Gewebe isoliert und zur Homogenität gereinigt. Das Enzym wurde umfassend protein-chemisch und biochemisch charakterisiert und zur genauen molekularbiologischen Analyse in *E. coli* kloniert.

Die humane Racemase ist ein Monomer mit einer molekularen Masse von ca. 47 kDa. Der isoelektrische Punkt des Enzyms liegt bei pH 5.8, das pH-Optimum bei pH 8.0. Gegenüber Temperaturerhöhungen über die physiologischen 37°C ist die Racemase äußerst empfindlich, bei einer Temperatur von 50°C liegt die Halbwertszeit bei 15 min. Als Substrate akzeptiert das Enzym ein breites Spektrum von  $\alpha$ -Methylacyl-CoAs. Neben den Coenzym A-Thioestern  $\alpha$ -methylverzweigter Fettsäuren, wie Pristansäure, werden auch CoA-Ester von Steroidderivaten, z.B. des Gallensäureintermediats Trihydroxycoprostanol, und aromatischen Phenylpropionsäuren, wie dem Analgetikum Ibuprofen, umgesetzt. Freie Fettsäuren, geradkettige oder  $\beta$ -methylverzweigte Acyl-CoAs werden nicht racemisiert.

Die  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase ist in menschlichen Zellen zu mehr als 80 % in den Peroxisomen lokalisiert. Eine Restaktivität des Enzyms von weniger als 20 % ist in den Mitochondrien zu finden, da auch hier einige Reaktionsschritte des Abbaus methylverzweigter Fettsäuren stattfinden.

Da keine Hinweise auf Isoenzyme oder alternative Transkription vorliegen, handelt es sich bei der mitochondrialen und peroxisomalen Racemase aller Wahrscheinlichkeit nach um das gleiche Protein. Die Lokalisation der Racemase wird durch entsprechende peroxisomale (PTS 1) und mitochondriale (MTS) Transportsignale bestimmt. Bei der Faltung des Proteins könnte das mitochondriale Lokalisationssignal verdeckt werden, so daß der größte Teil der Moleküle in die Peroxisomen transportiert wird. Für dieses Modell spricht die Tatsache, daß bei Patienten mit einem generalisierten Defekt der peroxisomalen Biogenese (Zellweger-Syndrom) nur noch die mitochondriale Restaktivität der Racemase nachzuweisen ist. Alle Moleküle, die nicht vom mitochondrialen Translokationsapparat erkannt werden, verbleiben im Cytosol und werden degradiert. Ferner könnte ein alternativer Translationsstart in Verbindung mit einem cotranslationalem Proteintransport für die bimodale Verteilung der Racemase verantwortlich sein.

Die vollständige cDNA-Sequenz der humanen  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase hat eine Gesamtlänge von 2039 Basenpaaren mit einem offenen Leseraster von 89 - 1237 bp. Das ORF codiert ein Protein aus 382 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 42,4 kDa. Das Startcodon ATG ist in eine klassische Kozak-Sequenz zum Translationsstart eingebettet. Die Protein endet am C-Terminus mit dem Sequenzmotiv -KASL, das dem peroxisomalen Transportsignal (PTS I) einiger Säugetierkatalasen entspricht. Aufgrund alternativer Polyadenylierung sind in allen untersuchten menschlichen Geweben Transkripte von 1,6 kb bzw. 2,0 kb zu finden. Es liegt keine gewebesabhängige Polyadenylierung vor, die Racemase wird aber gewebsspezifisch exprimiert (besonders stark in Leber und Niere).

Die Proteinsequenz der  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase ist hoch konserviert. Ihre Sequenzen in Mensch, Maus und Ratte besitzen eine Identität von ca. 80 %. Zu dem niederen Eukaryoten *C. elegans* ist noch eine 40 %ige Übereinstimmung der Sequenz zu verzeichnen. Es finden sich ferner sequenzielle Ähnlichkeiten der Racemase zu einigen Proteinen humanpathogener Bakterien.

Das Gen der humanen  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase wird von vier Introns an den Stellen 335/336 Nt, 479/480 Nt, 640/641 Nt und 827/828 Nt unterbrochen. Die Größen der Introns betragen 1,8 kb (Intron I), 1,3 kb (Intron II), 8,8 kb (Intron III) und 2,2 kb (Intron IV).

Das humane Racemasegen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5 nahe am Centromer (5p1.3), im Intervall von D5S651 (46,6 cM) und D5S634 (59,9 cM).

## Summary

Racemization is an essential step for bile acid synthesis and it is important for degradation of  $\alpha$ -methyl branched-chain fatty acids. The (*R*)- and (*S*)-isomers of  $\alpha$ -methyl-branched chain fatty acids were shown to be interconverted as coenzyme A thioesters by an  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase. Various branched-chain fatty acids arise in the catabolism of isoprenoids and are also synthesized by a variety of organisms, particularly mycobacteria. The aim of this work was to purify and to characterize the racemase from human tissue and to analyse the physiologic role in the degradation of branched-chain fatty acids and the bile acid synthesis.

A radiometric assay with 2-methyl[2- $^3\text{H}$ ]acyl-CoAs as substrates was used routinely for monitoring purification procedure. The sensitivity of this assay allows measurements in homogenates or crude extracts, released amounts of [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O are not influenced by further metabolism.

The  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase was purified from human liver to apparent homogeneity. The enzyme was exhaustively characterized by methods of biochemistry and protein chemistry. The cDNA coding for human racemase was cloned in *E. coli* and sequenced.

The enzyme is a monomer of 47 kDa with an isoelectric point of pH 5.8 and is optimally active at between pH 8.0. Heat treatment at temperatures over 37°C results in denaturing of the enzyme, which has a half-life of about 15 min at 50°C.

The enzyme accepts a wide range of  $\alpha$ -methylacyl-CoAs, including pristanoyl-CoA, trihydroxycoprostanoyl-CoA (an intermediate in bile acid synthesis) as substrates. Also arylpropionyl-CoAs such as the anti-inflammatory drug ibuprofen are accepted, but neither free fatty acids,  $\beta$ -methyl-branched nor linear-chain acyl-CoAs.

In human tissues 80 - 90 % of the racemase activity is found in peroxisomes and 10 - 20 % in mitochondria. Degradation of branched chain fatty acids is located in both compartments, so the enzyme has to be distributed between peroxisomes and mitochondria. No evidence was found for the existence of isoenzymes or different transcription products. It appears that only one mRNA is transcribed from one gene and that also only one protein is synthesized.

The different recognition of peroxisomal (PTS 1) and mitochondrial targeting signals (MTS) may determine the subcellular distribution.

The protein may fold in such a way that the only poor recognized MTS is no longer accessible and only the PTS is sequestered by the peroxisomal import system. This model would explain that patients with Zellweger Syndrome have reduced racemase activity of 10-20 % of the normal level, this corresponds to the activity normally found in mitochondria. Any racemase protein not recognized by the mitochondrial transport system remains in the cytosol where it is degraded. Additionally, different translation start points together with co-translational transport may cause the subcellular distribution of the human  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase.

The complete cDNA sequence has an overall length of 2039 base pairs, with a open reading frame between 89 - 1237 bp. The ORF codes for a protein of calculated molecular mass of 42,4 kDa. The ATG start codon is embedded in a classical Kozak sequence for translation start. The C-Terminus of the protein is -KASL, which is very similar to the peroxisomal targeting signals (PTS 1) of many mammalian catalases. In all human tissues analysed in this work two different transcripts of racemase with sizes of 1,6 kb and 2,0 kb have been found and show alternate polyadenylation. Polyadenylation of racemase is not tissue-dependent but its expression is tissue-specific (strong activity is found in liver and kidney).

The protein sequence of  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase is highly conserved. The racemase sequences of mouse and rat both share about 80 % amino acid identity with the human sequence. Eucaryotic *C. elegans* genes share 40 % identical amino acids with the human racemase, some sequence identity was also found to proteins of human pathogenic bacteria.

The human  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase gene comprises five exons and four introns, precise positions of the introns are between 335/336 bp, 479/480 bp, 640/641 bp and 827/828 bp. The intron sizes are 1,8 kb (intron I), 1,3 kb (intron II), 8,8 kb (intron III) and 2,2 kb (intron IV).

The human racemase gene is localized on the short arm of chromosome 5, near the centromer (region 5p1.3) and between the markers D5S651 (46,6 cM) and D5S634 (59.9 cM).