

**DIE ONTWIKKELING VAN ELEKTROSPROEI
MASSASPEKTROMETRIE VIR DIE BEPALING VAN
KARNITIENPALMITOÏELTRANSFERASE I-
AKTIWITEIT IN FIBROBLASTE EN LEUKOSIETE**

**Luzaan Nolte
B.Sc. Hons.**

Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir
die graad Magister Scientiae in Biochemie in die Fakulteit
Natuurwetenskappe aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike
Hoër Onderwys.

Studieleiers: Mnr. F.H. van der Westhuizen
Prof. P.J. Pretorius

Potchefstroom
November 1997

SOLI DEO GLORIA!

Aan Pa, Ma, Kelvin en Wouter

INHOUDSOPGAWE

	Bladsy
ABSTRACT	1
OPSOMMING.....	3
 HOOFSTUK 1: INLEIDING.....	 5
 HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG.....	 7
2.1 Inleiding	7
2.2 Die metabolisme van langkettingvetsure in eukariote	7
2.2.1 Mitochondriale β -oksidasie en -defekte	7
2.2.2 Die rol van die karnitienpalmitoïeltransferases.....	10
2.3 Die karnitienpalmitoïeltransferases.....	12
2.3.1 CPT I- en CPT II-defekte	12
2.3.2 Die CPT I- en CPT II-proteïene en -isovorme	13
2.3.3 Die verspreiding van CPT I en CPT II.....	15
2.3.4 Molekulêre eienskappe van CPT I en CPT II.....	15
2.3.5 Die molekulêre basis van die CPT I-defek.....	17
2.3.6 Die molekulêre basis van die CPT II-defek	18
2.4 CPT-aktiwiteitsbepaling	19
2.5 Probleemstelling, doelstelling en benaderingswyse.....	21
 HOOFSTUK 3: CPT I-AKTIWITEITSBEPALING DEUR MIDDEL VAN N RADIO-ISOTOOPGEBASEERDE METODE	 23
3.1 Inleiding	23
3.2 Voorbereiding van materiaal.....	23
3.2.1 Kweking van fibroblaste	23
3.2.2 Bereiding van fibroblasthomogenate	24
3.2.3 Isolering van leukosiete.....	26
3.2.4 Bereiding van leukosiehomogenate	27

3.3	Die radio-isotoopgebaseerde metode vir CPT I-aktiwiteitsbepaling	27
3.3.1	Beginsel.....	27
3.3.2	Metode	28
3.3.3	CPT I-aktiwiteitsbepaling in fibroblast- en leukosiethomogenate	30
3.3.3.1	Proteïenafhanklike produkvorming deur CPT I.....	30
3.3.3.2	Tydafhanklike produkvorming deur CPT I.....	32
3.3.3.3	CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole homogenate	34
3.4	Samevatting.....	36

HOOFSTUK 4: CPT I-AKTIWITEITSBEPALING DEUR MIDDEL VAN ELEKTROSPROEI MASSASPEKTROMETRIE 37

4.1	Inleiding	37
4.2	Vorbereiding van materiaal.....	37
4.3	Die ontwikkeling van 'n ES-MS metode vir CPT I-aktiwiteitsbepaling	38
4.3.1	Elektrosproei tandem massaspektrometrie.....	38
4.3.2	Die beginsel van elektrosproei massaspektrometrie	39
4.3.3	Metode	42
4.3.4	Kondisies vir die ES-MS meting van gevormde asielkarnitiene	44
4.3.5	CPT I-aktiwiteitsbepaling in fibroblast- en leukosiethomogenate	45
4.3.5.1	Proteïenafhanklike produkvorming deur CPT I.....	45
4.3.5.2	Tydafhanklike produkvorming deur CPT I.....	48
4.3.5.3	CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole homogenate	48
4.4	Resultaatbespreking	50
4.5	Wysiging van die metode vir die bepaling van palmitoïelkarnitien deur middel van ES-MS.....	51
4.6	Die gebruik van 'n verbeterde ES-MS metode vir CPT I-aktiwiteitsbepaling	55
4.6.1	Metode	55
4.6.2	Kondisies vir die ES-MS meting van gevormde palmitoïelkarnitien	56
4.6.3	CPT I-aktiwiteitsbepaling in fibroblast- en leukosiethomogenate	56

4.6.3.1	Proteïenafhanklike produk vorming deur CPT I.....	56
4.6.3.2	Tydafhanklike produk vorming deur CPT I.....	58
4.6.3.3	CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole homogenate	58
4.7	Samevatting.....	61
HOOFSTUK 5: BESPREKING.....		63
5.1	Inleiding.....	63
5.2	Evaluering van die metodes wat in hierdie studie uitgevoer is.....	64
5.2.1	Inleiding	64
5.2.2	Evaluering van die radio-isotoopgebaseerde metode.....	64
5.2.3	Evaluering van die elektrospoei massaspektrometriese metode	67
5.3	Vergelyking van die radio-isotoopgebaseerde - en die ES-MS metode vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit	70
5.4	Samevatting	72
AFKORTINGSLYS.....		74
LITERATUURLYS		77

ABSTRACT

The development of electrospray mass spectrometry for the monitoring of carnitine palmitoyltransferase I activity in fibroblasts and leukocytes.

(Original title: Die ontwikkeling van elektrospoei massaspektrometrie vir die bepaling van karnitienpalmitoëltransferase I-aktiwiteit in fibroblaste en leukosiete).

Carnitine Palmitoyltransferase I (CPT I) is one of the important enzymes associated with normal mitochondrial membrane transport of certain metabolites. The importance of the enzyme in normal energy production is well illustrated during fasting conditions when a large flux of long chain fatty acids must be transported over the mitochondrial membrane to undergo β -oxidation. Up to now CPT I activity has been assayed in various tissues, including liver, leukocytes, platelets and fibroblasts by the use of an isotope exchange forward assay which measures the rate of palmitoyl-L-[methyl- ^3H]carnitine formation from palmitoyl-CoA and L-[methyl- ^3H]carnitine. We have developed an electrospray ionization mass spectrometric method for detecting palmitoylcarnitine formation from palmitoyl-CoA and carnitine, thus avoiding the use of radio labeled isotopes. In this assay, time dependent conversion of free carnitine by CPT I to palmitoylcarnitine is measured quantitatively, relative to isotopically labelled palmitoylcarnitine, by parent ion monitoring of fragment ion m/z 85. The combination of high sensitivity and selectivity of tandem mass spectrometry along with the environment friendly nature of the method makes it an ideal technique to measure CPT I activity.

Results of this study were presented at the following local and international congresses:

Nolte, L., Van der Westhuizen, F.H., Knoll, D.P., Mienie, L.J., Pretorius, P.J., & Erasmus, E. Carnitine palmitoyltransferase I activity monitoring in fibroblasts and leukocytes using electrospray mass spectrometry. South African Academy for Science and Arts Year, Potchefstroom, June 1997.

Nolte, L., Van der Westhuizen, F.H., Knoll, D.P., Mienie, L.J., Pretorius, P.J., & Erasmus, E. Carnitine palmitoyltransferase I activity monitoring in fibroblasts and leukocytes using electrospray mass spectrometry. First Symposium of the Biochemistry Society between the Biochemistry Departments of PU for CHE and UOVS, Bloemfontein, June 1997.

Nolte, L., Van der Westhuizen, F.H., Knoll, D.P., Mienie, L.J., Pretorius, P.J., & Erasmus, E. Carnitine palmitoyltransferase I activity monitoring in fibroblasts and leukocytes using electrospray mass spectrometry. 7th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Vienna, Austria, May 1997.

A publication originating from this work has been accepted:

Nolte, L., Van der Westhuizen, F.H., Pretorius, P.J., & Erasmus, E. Carnitine Palmitoyltransferase I Activity Monitoring In Fibroblasts And Leukocytes Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Biochemistry**. (Accepted and revised, 1997).

OPSOMMING

Karnitien Palmitoïeltransferase I (CPT I) is een van die belangrike ensieme wat geassosieer word met die normale mitochondriale transport van sekere metaboliete. Die belangrikheid van die ensiem in normale energie produksie word goed geïllustreer gedurende vastende toestand wanneer 'n groot vloed van langkettingvetsure oor die mitochondriale membraan getransporeer moet word om β -oksidasie te ondergaan. Tot op hede is CPT I-aktiwiteit in verskeie weefsels, insluitende lewer, leukosiete, bloedplaatjies en fibroblaste getoets deur middel van 'n radio-isotoopgebaseerde voorwaarde uitruilingstoets waarvolgens die tempo van palmitoïel-L-[metiel- ^3H]karnitien vorming vanaf palmitoïel-KoA en L-[metiel- ^3H]karnitien gemeet word. Ons het 'n elektrosprei massaspektrometriese metode ontwikkel wat die vorming van palmitoïelkarnitien vanaf palmitoïel-KoA en karnitien meet en so die gebruik van radioaktiewe isotope uitskakel. Met hierdie metode word die tydafhanklike omskakeling van vrye karnitien deur CPT I na palmitoïelkarnitien kwantitatief gemeet, relatief tot 'n stabiele isotoop van palmitoïelkarnitien, deur moederioonskandering vir fragment 85. Die kombinasie van die hoë sensitiwiteit en selektiwiteit van tandem massaspektrometrie tesame met die omgewingsvriendelikheid van die metode maak dit 'n ideale tegniek om CPT I-aktiwiteit te bepaal.

Die resultate van hierdie studie is by die volgende plaaslike en internasionale kongresse voorgedra:

Nolte, L., Van der Westhuizen, F.H., Knoll, D.P., Mienie, L.J., Pretorius, P.J., & Erasmus, E. Carnitine palmitoyltransferase I activity monitoring in fibroblasts and leukocytes using electrospray mass spectrometry. Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns Jaarkongres, Potchefstroom, Junie 1997.

Nolte, L., Van der Westhuizen, F.H., Knoll, D.P., Mienie, L.J., Pretorius, P.J., & Erasmus, E. Carnitine palmitoyltransferase I activity monitoring in fibroblasts and leukocytes using electrospray mass spectrometry. Eerste Simposium van die

Biochemiese Vereniging tussen Departement Biochemie (PU vir CHO) en Departement Biochemie (UOVS), Bloemfontein, Junie 1997.

Nolte, L., Van der Westhuizen, F.H., Knoll, D.P., Mienie, L.J., Pretorius, P.J., & Erasmus, E. Carnitine palmitoyltransferase I activity monitoring in fibroblasts and leukocytes using electrospray mass spectrometry. Sewende Internasionale Kongres van Aangebore Defekte van die Metabolisme, Wenen, Oostenryk, Mei 1997.

'n Publikasie wat uit hierdie studie voortgespruit het, is aanvaar:

Nolte, L., Van der Westhuizen, F.H., Pretorius, P.J., & Erasmus, E. Carnitine Palmitoyltransferase I Activity Monitoring In Fibroblasts And Leukocytes Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Biochemistry**. (Aanvaar en hersien, 1997).

HOOFSTUK 1

INLEIDING

In die mens maak langkettingvetsure 'n belangrike bron van energie uit, veral vir die hart, die lewer en die skeletspier. Karnitienpalmitoïeltransferase I (CPT I) is 'n ensiem wat betrokke by die transport van langkettingvetsure oor die mitochondriale membrane sodat dit die β -oksidasieweg kan betree (Finocchiaro *et al.* 1991). CPT I speel 'n belangrike rol in die vloeï van energie vanuit die mitochondriale β -oksidasieweg aangesien dit die tempobepalende stap in die β -oksidasieweg is (Bougnères *et al.* 1981). Defekte van CPT I word gekenmerk deur ensefalopatie, vastende hipoglisemie, hipoketonemie en verhoogde plasma karnitien in die afwesigheid van dikarboksielsuururie en/of enige waarneembare spier abnormaliteit (Bougnères *et al.* 1981; Tein *et al.* 1989; Roe & Coates, 1995). Met 'n toenemende voorkoms van hierdie defek is die vroeë herkenning daarvan belangrik, want deur vasting te verhoed, kan lewensgevaarlike hipoglisemie en die risiko van neurologiese nagevolge voorkom word. Die kliniese en biochemiese karaktereïenskappe is egter van so 'n aard dat dit selde 'n spesifieke diagnose, in die afwesigheid van 'n direkte ensiematiese analise toelaat. Tot op hede is CPT I-aktiwiteit gemeet deur van 'n radio-isotoopgebaseerde metode gebruik te maak en is dit die enigste manier om 'n CPT I-defek te identifiseer.

Die rol wat tandem massaspektrometrie in die biomediese veld speel, het die laaste dekade ongelooflik toegeneem (Dongré *et al.* 1997). 'n Revolusie het gevolg na die ontwikkeling van die nuwe vloeistof-fase atmosferiese druk ionisasie tegnieke soos elektrospoei en ioonsproei (Gelpí, 1995). Die doel van hierdie studie was om die potensiaal van elektrospoei massaspektrometrie as tegniek te gebruik om 'n metode te ontwikkel om CPT I-aktiwiteit in fibroblaste en leukosiete te bepaal ten einde 'n alternatiewe metode van CPT I-aktiwiteitsbepaling, wat moontlike voordele bo die huidige metode kan hê, daar te stel.

In Hoofstuk 2 word die literatuurgegewens rondom die karnitienpalmitoëltransferase sisteem saamgevat en word die doelwitte en benaderingswyse van die studie duidelik omskryf (Afdeling 2.5). In die daaropvolgende hoofstukke word die verskillende metodes van CPT I-aktiwiteitsbepaling en hul beginsels uiteengesit, die resultate bespreek en gevolgtrekkings daaruit gemaak. Laastens word die resultate van die verskillende metodes wat in hierdie studie ondersoek is, op 'n kritiese wyse in Hoofstuk 5 geëvalueer.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

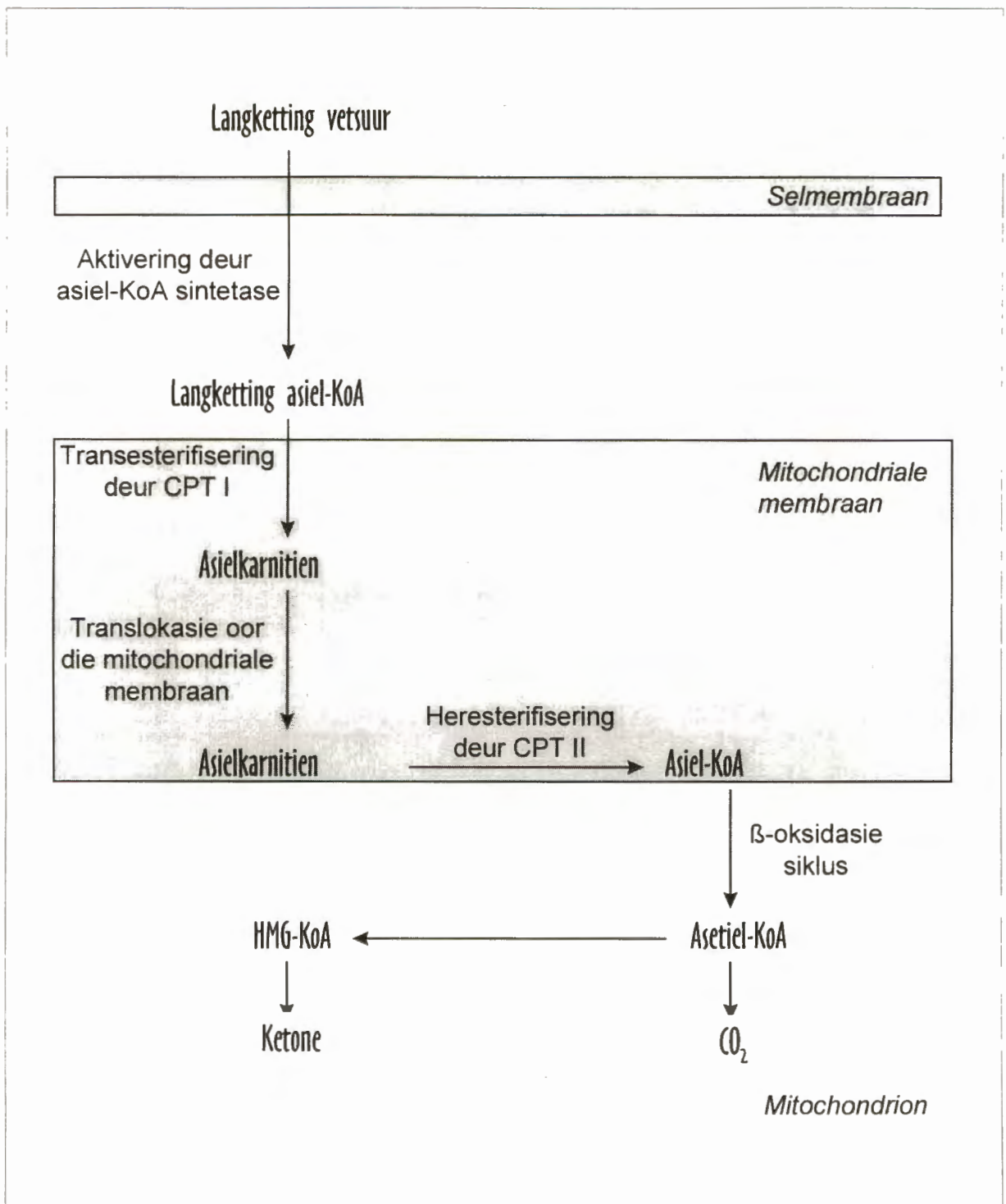
2.1 Inleiding

Die mitochondriale karnitienpalmitoëltransferase sisteem, betrokke by die oordrag van asielmolekules in die mitochondria is reeds sedert die 1960's bekend (Eaton *et al.* 1996). In hierdie hoofstuk word eerstens 'n kort beskrywing van die rol van die karnitienpalmitoëltransferases in die mitochondriale vetsuuroksidasieweg gegee waarna 'n gedetailleerde beskrywing van die karnitienpalmitoëltransferases en hul defekte gegee word. In laasgenoemde beskrywing word veral aandag gegee aan die twee kliniese vorme van hierdie defekte, die molekulêre aspekte van die ensieme en hul defekte, asook die metodes van aktiwiteitsbepaling van hierdie ensieme.

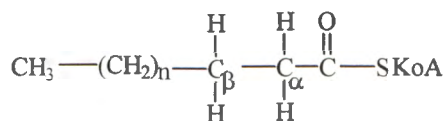
2.2 Die metabolisme van langkettingvetsure in eukariote

2.2.1 Mitochondriale β -oksidasie en -defekte

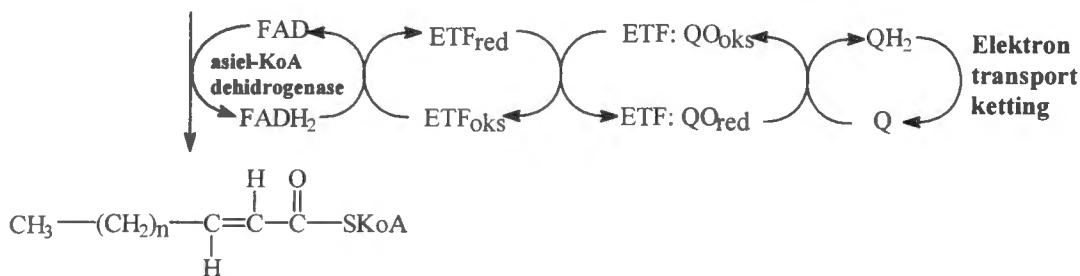
Gedurende oefening, stres of vasting word die triasielgliserolreserwes in die vetweefsel gemobiliseer en beweeg dit as vetsure na die verskillende weefsels waar dit as respiratoriese brandstof dien deur oksidasie te ondergaan. Aangesien vetsure hidrofobies is, word dit in die bloed, gebonde aan albumien, na die spier- en lewerweefsel getransporteer. Langkettingvetsure is 'n baie belangrike energiebron in die sel en hierdie energie word beskikbaar gestel deurdat dit mitochondriale β -oksidasie ondergaan (Villard *et al.* 1996). Die mitochondriale β -oksidasieweg is baie kompleks en sluit 20 individuele stappe in wat in die volgende onderskeie prosesse ingedeel kan word (Figuur 2.1): sellulêre opname van die vetsure; aktivering van die vetsure na asiel-KoA esters; transesterifisering na asielkarnitiene; translokasie oor die mitochondriale membraan; heresterifisering na asiel-KoA esters; en die



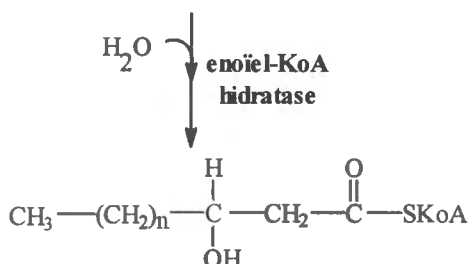
Figuur 2.1 'n Skematiese voorstelling van die mitochondriale β -oksidasie weg
 KoA = koënsiem-A; CPT = karnitienpalmitoïeltransferase; HMG-KoA = β -hidroksi- β -metielglutariel-koënsiem-A



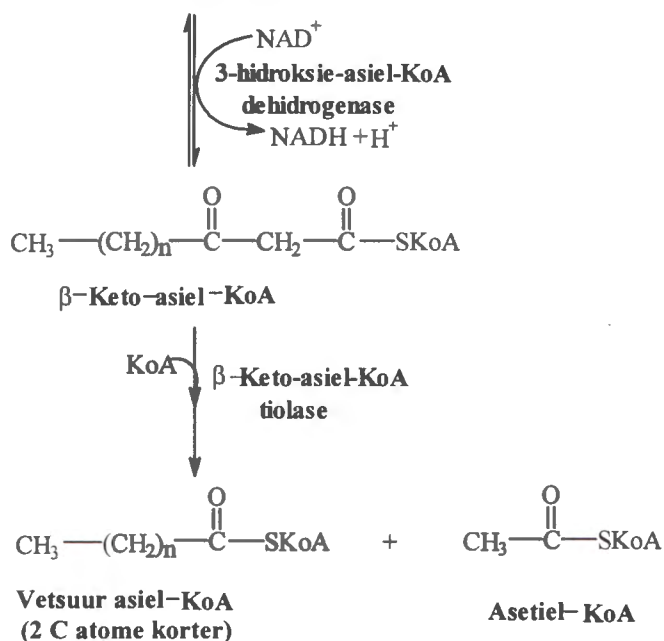
Vetsuur asiel-KoA



trans- Δ^2 -Enoïel-KoA



3-L-Hidroksie-asiel-KoA



Figuur 2.2 Die β -Oksidasie siklus van asiel-KoA

Die asiel-KoA word telkens afgebreek na asetiel-KoA en 'n asiel-KoA, twee koolstowwe korter, wat weer die weg betree (Voet & Voet, 1990).

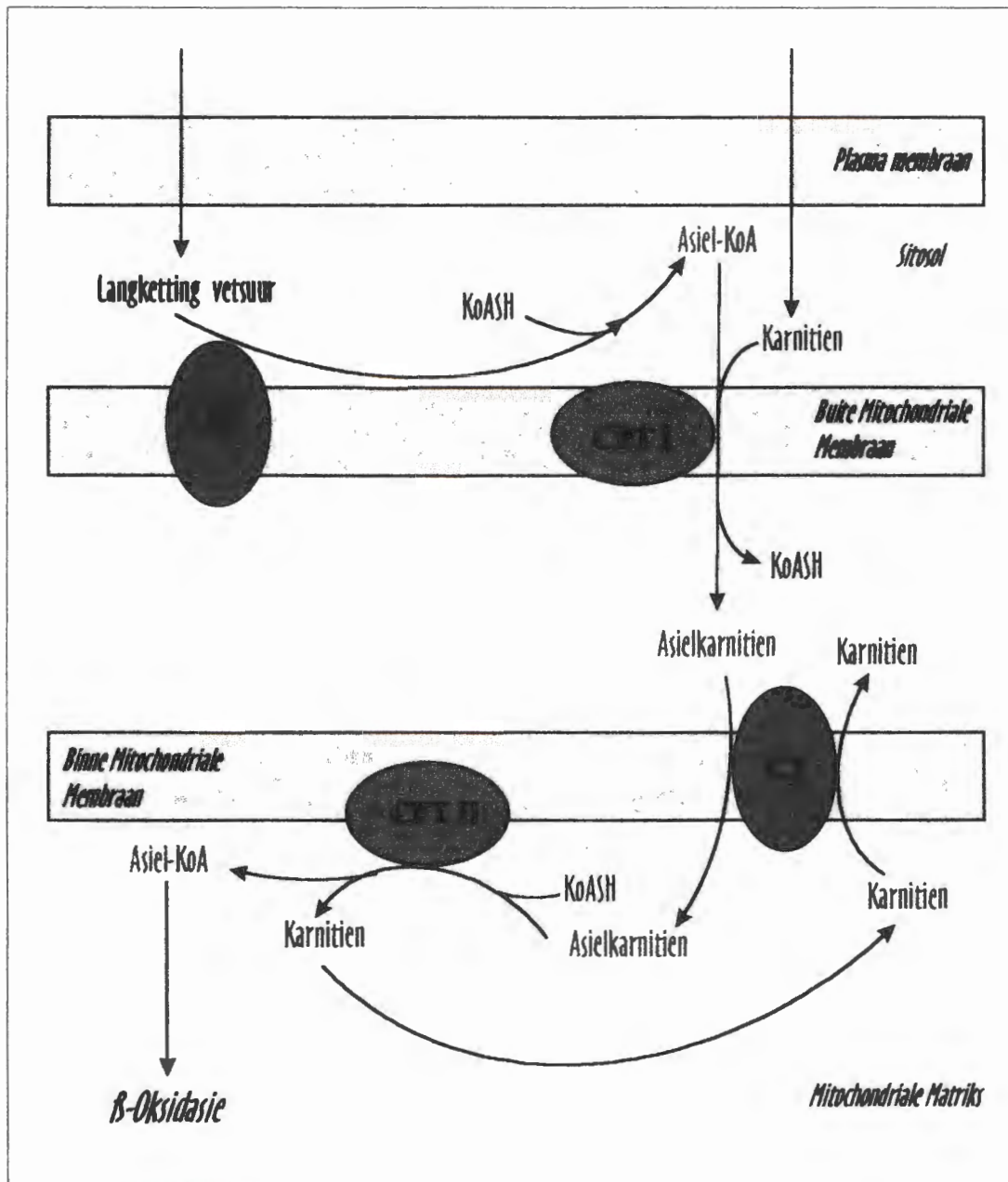
intramitochondriale β -oksidasiespiraal wat elektrone en asietiel-KoA genereer (Roe & Coates, 1995). β -oksidasie vind plaas deur opeenvolgende stappe van dehidrogenasie, hidrasie, dehidrogenasie en tiolitiese splyting (Figuur 2.2) wat lei tot die oordrag van elektrone na die elektron oordrag flavoproteïen (ETF), die vrystelling van asietiel-KoA wat omgesit word na ketoonliggaampies in die lewer en die vorming van 'n verkorte asiel-KoA wat weer die β -oksidasie siklus kan betree (Voet & Voet, 1990).

Twaalf defekte waarby mitochondriale vetsuuroksidasie en ketogenese betrokke is, is reeds geïdentifiseer (Roe & Coates, 1995). Mitochondriale vetsuuroksidasiedefekte word toenemend erken as 'n belangrike groep aangebore metaboliese defekte wat energie verlies en hoogs variërende simptome tydens stres, verlengde vasting of oefening kan veroorsaak (Bergman *et al.* 1994). Gesamentlik is β -oksidasiedefekte relatief algemene defekte wat gedurende die vroeë kinderjare te voorskyn kan kom as wiegiedood of 'n Reye-se-sindroom-tipe siekte. Die defekte is egter nie klinies sigbaar tot 'n relatief laat stadium van vasting nie en roetine laboratoriumtoetse gee nie 'n aanduiding van moontlike vetsuuroksidasiedefekte nie. Die kliniese en biochemiese karaktereienskappe is dus van so 'n aard dat dit selde 'n spesifieke diagnose, in die afwesigheid van 'n direkte ensiematiese analise toelaat.

2.2.2 Die rol van die karnitienpalmitoëltransferases

Voordat langkettingvetsure die mitochondriale membraan kan oorkruis, moet dit eers deur asiel-KoA sintetase geaktiveer word, waarna dit omkeerbaar met L-karnitien gekonjugeer word (Figuur 2.3). Die karnitienpalmitoëltransferase sisteem beheer die oordrag van endogene en eksogene langkettingvetsure oor die mitochondriale membraan (Tein *et al.* 1989). Eerstens aktiveer 'n tiokinase intrasellulêre langkettingvetsure na hul asiel-KoA esters waartydens ATP, gebonde aan die buite-mitochondriale membraan, gebruik word. Omdat die binne-mitochondriale membraan ondeurlaatbaar is vir langketting asiel-KoA, word die geaktiveerde vetsure gekonjugeer met karnitien deur CPT I. Die asiel-KoA beweeg oor die binne-mitochondriale membraan as 'n karnitien ester deur die proses van uitruilingsdiffusie gekataliseer deur karnitien-asielkarnitien translokase (Murthy & Pande, 1984; Tein *et al.* 1989; Bergman *et al.* 1994). Binne die mitochondria kataliseer CPT II die

vorming van asiel-KoA vanaf die karnitien ester en intramitochondriale KoA, waarna die asiel-KoA binne die mitochondriale matriks gebruik word vir β -oksidasie (Tein *et al.* 1989; Demaugre *et al.* 1988, 1990; Sadeh & Gutman, 1990).



Figuur 2.3 Die mitochondriale karnitienpalmitoëltransferase sisteem

KoASH = koënsiem-A; AS = asiel-KoA sintetase; CPT = karnitienpalmitoëltransferase; CT = karnitien/asielkarnitien translokase

Die buitemembraangeassosieerde en detergens-labiele ensiem, CPT I, en die binnemembraangeassosieerde en detergens-stabiele ensiem, CPT II, saam met karnitien-asielkarnitien translokase, inisieer dus die mitochondriale oksidasie van langkettingvetsure deur hul opeenvolgende werking. Regulering van hierdie proses vind plaas by CPT I as gevolg van die unieke inhibering van die ensiem deur maloniel-KoA (McGarry, 1995).

2.3 Die karnitienpalmitoëltransferases

2.3.1 CPT I- en CPT II-defekte

In menslike patologie word CPT-defekte geassosieer met twee afsonderlike kliniese beelde: een met spier- en die ander met hepaties-geassosieerde simptome (Tein *et al.* 1989; Demaugre *et al.* 1990). Analises van CPT-aktiwiteit in fibroblaste van pasiënte met onderskeidelik die spier- en hepaties-geassosieerde vorme van die defek, toon dat die CPT I-defek voorkom in die hepaties-geassosieerde vorm en die CPT II-defek in die spier-geassosieerde vorm (Demaugre *et al.* 1988; 1990).

Die spier-geassosieerde vorm (CPT II) is beskryf in die geval van energieke manlike adolessente wat verlengde oefenprogramme volg of vastend is en word gekarakteriseer deur veelvuldige episodes van spier-nekrose, rabdomioliese en/of mioglobienurie wat soms kan lei tot akute of kroniese nierversaking (Tein *et al.* 1989). By jong kinders of pasgeborenes kan die CPT II-defek lei tot hipoketotiese hipoglisemie, kardiomiopatie, lewerversaking en wiegiedood (Handig *et al.* 1996). Die hepaties-geassosieerde vorm (CPT I) word gekenmerk deur ensefalopatie, vastende hipoglisemie, hipoketonemie, verhoogde plasma karnitien in die afwesigheid van dikarboksielsuururie en/of enige waarneembare spier abnormaliteit (Boigrières *et al.* 1981; Tein *et al.* 1989; Roe & Coates, 1995).

Die waarneming van die twee verskillende kliniese beelde van die CPT-defek het baie vrae laat ontstaan ten opsigte van die werking van die mitochondriale karnitienpalmitoëltransferase sisteem. Teen 1989 is daar tot 'n vergelyk gekom oor die volgende paar kenmerke van die mitochondriale transportsisteem: a) dat

transesterifisering van vetsure van koënsiem-A na karnitien beheer word deur CPT I, geleë op die buite mitochondriale membraan; b) dat die asielkarnitiene wat gevorm is, ingang tot die mitochondriale matriks verkry via karnitien-asielkarnitien translokase, geassosieer met die binne mitochondriale membraan (wat ook CPT II huisves vir die terugkakeling na asiel-KoA); en c) dat CPT I, maar nie CPT II, geïnhibeer word deur maloniel-KoA. Daar was egter nog nie konsensus ten opsigte van die volgende nie: a) Is CPT I en CPT II dieselfde of verskillende proteïene? b) Hoe vergelyk CPT I en CPT II tussen verskillende weefsels? c) Ondergaan maloniel-KoA en ander CPT I inhibeerders interaksie met die aktiewe setel van CPT I of met 'n alternatiewe regulerende setel wat daarmee geassosieer is (McGarry, 1995)? Vervolgens word hierdie aspekte verder bespreek.

2.3.2 Die CPT I- en CPT II-proteïene en -isovorme

Gedurende die afgelope aantal jare is probeer om antwoorde te kry op die vraag of CPT I en CPT II verskillende proteïene is of 'n enkele proteïen met verskillende eienskappe, afhangende van waar dit in die membraan voorkom. Bewyse vir die bestaan van twee aparte proteïene kom uit verskeie literatuurbronne wat verskille tussen CPT I en CPT II in terme van kinetiese en regulerende eienskappe, verskille in sensitiwiteit ten opsigte van inhibisie, molekulêre gewig en antigeniese eienskappe beskryf (Tein *et al.* 1989). 'n Samevatting van hierdie verskille uit Tein *et al.* (1989) word vervolgens gegee:

Verskeie waarnemings in dierweefsel suggereer dat CPT I en CPT II verskillende proteïene is. Declercq *et al.* (1987) toon verder dat CPT I, in rotspier en -lewer, deur verskillende inhibeerders geïnhibeer kan word, terwyl CPT II nie daardeur geïnhibeer word nie. Insgelyks word aangetoon dat, hoewel die bindingskapasiteit van CPT I vir die inhibeerders dieselfde in lewer en spier is, die CPT I-proteïen verskil ten opsigte van monomeriese groottes in lewer- en spierweefsel. CPT II het daarenteen 'n baie kleiner molekulêre gewig, wat dieselfde in beide lewer en spier is. Hieruit kan afgelei word dat CPT I en CPT II nie net verskillende proteïene is nie, maar dat daar ook weefsel-spesifieke verskille is in die CPT I-proteïen of die omgewingsinteraksies waarby dit betrokke is. Met gebruik van antiliggamete teen beeslewermitchondria is

aangetoon dat die twee CPT-reaksies nie deur identiese ensieme gekataliseer word nie (Brosnan *et al.* 1973). Verder is antigeniese ooreenstemming tussen die CPT II ensieme in rotlewer en spier en antigeniese verskille tussen die CPT I en CPT II ensieme waargeneem. Die bevindinge dat die hepaties- en spier-geassosieerde vorme van die CPT-defek die gevolg is van die CPT I- en CPT II-defek, onderskeidelik, versterk die hipotese dat CPT I en CPT II twee verskillende proteïene is.

Hierdie twee variante word onderskeidelik gekenmerk aan afsonderlike biochemiese abnormaliteite in fibroblaste en weefseluitdrukking van die defek verskil in beide kliniese vorme (Demaugre *et al.* 1991). In die hepaties-geassosieerde vorm (CPT I) is die defek teenwoordig in die lewer en fibroblaste, maar nie in die skeletspier nie (Tein *et al.* 1989) wat die afwesigheid van spier-geassosieerde simptome in pasiënte met die CPT I-defek verklaar. Die afwesigheid van spier-geassosieerde simptome in twee hepatiese pasiënte met die CPT I-defek, wel aangetoon in fibroblaste, het normale CPT I- en CPT II-aktiwiteite in spierweefsel (Tein *et al.* 1989). Hierdie is 'n sterk argument vir die bestaan van weefselspesifieke isovorme van CPT I tussen fibroblaste en spierweefsel. Dus kan CPT I dieselfde proteïen in die lewer en fibroblaste wees maar as 'n ander isovorm in die spier voorkom.

Hierdie resultate in mensweefsel vergelyk goed met vorige biochemiese bevindinge waar aangetoon is dat CPT I 'n proteïen van verskillende monomeriese groottes in rotlewer en -skeletspier is (Tein *et al.* 1989). Verdere data wat met muis- en rotweefsel verkry is, suggereer die teenwoordigheid van spesifieke CPT I-isovorme in die lewer, skeletspier en die hart (Tein *et al.* 1989). Dus sal die afwesigheid van kardiaal simptome in pasiënte met die CPT I-defek 'n resultaat wees van normale CPT I-aktiwiteit in dié weefsel. Daar is waargeneem dat die CPT II-defek nie beperk is tot spierweefsel nie, maar teenwoordig is in al die weefsels wat ondersoek is (Tein *et al.* 1989). Dit stem ooreen met die afwesigheid van weefselspesifieke isovorme van CPT II (Demaugre *et al.* 1990). Die hipotese dat geen weefselspesifieke isovorme vir CPT II bestaan nie ondersteun waarnemings dat CPT II van rotlewer en -spier dieselfde molekulêre massa en antigeniese eienskappe het (Tein *et al.* 1989). Onlangs is die cDNA's van CPT I en CPT II gekloneer en kon dit as finale bewys vir die verskille tussen hierdie twee proteïene dien.

2.3.3 Die verspreiding van CPT I en CPT II

In die verlede is aanvaar dat CPT-aktiwiteit versprei is op die buite (CPT I) en binne (CPT II) oppervlak van die binne-mitochondriale membraan (Demaugre *et al.* 1988). Onlangs is egter voorgestel en bewys dat CPT I voorkom op die buite-mitochondriale membraan en dat die aktiewe setel van die ensiem, sowel as die maloniel-KoA bindingsplek, wat betrokke is by die inhibisie van CPT I, voorkom op die buitenste (sitosoliese) deel van die buite-mitochondriale membraan (Tein *et al.* 1989; Demaugre *et al.* 1991; Fraser *et al.* 1997).

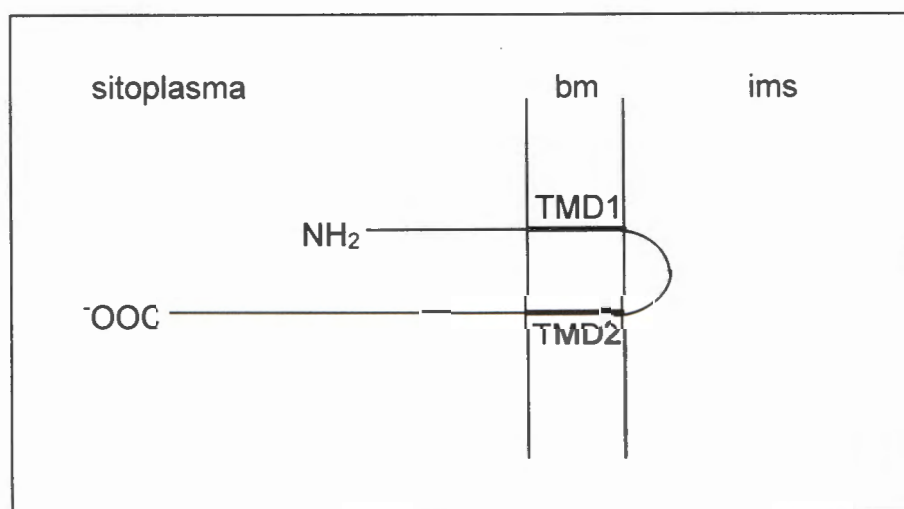
2.3.4 Molekulêre eienskappe van CPT I en CPT II

Uit 'n aantal ondersoeke na die molekulêre eienskappe van die CPT-ensieme van die mens en rot, is verskeie gevolgtrekkings gemaak (McGarry, 1995). Die cDNA wat vir menslewer CPT II kodeer, is gekloneer en die DNA-volgorde is deur Finocchiaro *et al.* (1991) bepaal. Dit bevat 'n oopreesraam van 1 974 bp wat kodeer vir 'n voorganger polipeptied van 658 aminosuur residue, insluitend 25 residue van 'n N-terminale leierpeptied. Die aktiewe, volwasse ensiem is 'n homotetrameer met 66kDa subeenhede wat uit 633 aminosure elk bestaan (Roe & Coates, 1995). Die geen vir CPT II is geleë op chromosoom 1p32 en die proteïen kom waarskynlik as dieselfde geenproduk deur die liggaam voor (Gellera *et al.* 1994).

Die cDNA van menslewer CPT I is ook geïsoleer (Britton *et al.* 1995) en 'n CPT I mRNA grootte van ongeveer 4.7 kb en 'n voorgestelde proteïen grootte van ongeveer 88 kDa, is verkry. Die menslewer CPT I-geen kom voor op chromosoom 11q (Britton *et al.* 1995). Soos genoem in Afdeling 2.3.2, word CPT I, anders as CPT II, uitgedruk in ten minste twee isovorme. Die skeletspier ensiem (CPT IB) verskil van sy lewer eweknie (CPT IA) daarin dat dit kleiner is (ongeveer 82 kDa), verskil ten opsigte van kinetiese eienskappe en 'n laer sensitiwiteit ten opsigte van maloniel-KoA het (McGarry, 1995). In die rothart (en heel waarskynlik ook die menshart) word beide die isovorme van CPT I in veranderende verhoudings uitgedruk, afhangende van die stadium van embrionale ontwikkeling (Brown *et al.* 1995). In die mens word die

lewer-isovorm van CPT I ook in fibroblaste uitgedruk en kan fibroblaste dus gebruik word vir die diagnose van oorerflike defekte van beide CPT II en lewer-geassosieerde CPT I (Britton *et al.* 1995). 'n Defek van die spier isovorm van CPT I is nog nie beskryf nie, hoewel die cDNA-volgorde van die mens CPT IB-geen reeds bepaal is (Van der Leij *et al.* 1997). Die twee isovorme word gekodeer deur verskillende lokusse op chromosoom 22q. Die feit dat uitdrukking van die rotlewer cDNA in gis, wat nie endogene CPT bevat nie, 'n toename in maloniel-KoA-sensitiewe CPT-aktiwiteit veroorsaak, dui daarop dat beide maloniel-KoA binding en die katalitiese funksie op 'n enkele polipeptied voorkom. Dit is waarskynlik dat die N-terminale gebied van CPT I, wat nie in CPT II voorkom nie, betrokke is by maloniel-KoA binding en die inhibisie van ensiem aktiwiteit (Brown *et al.* 1994).

Fraser *et al.* (1997) het die topologie van CPT I in lewermitochondria beskryf en stel voor: dat CPT I twee transmembraan domeine (TMD) het, dat die N- en C-terminale gebiede op dieselfde sitosoliese kant van die mitochondriale buite-membraan uitstaan, en dat die kort lussie (27 residue) wat die transmembraan domeine verbind, uitstaan na die mitochondriale intermembraanspasie kant. Die afgeleide topologie word diagrammatis aangetoon in Figuur 2.4. Op grond van hierdie model word voorgestel dat die aktiewe setel van CPT I voorkom in die groot C-terminale domein tot TMD2.



Figuur 2.4 'n Diagrammatiese voorstelling van die topologie van CPT I
bm = mitochondriale buitemembraan; ims = intermembraan spasie; TMD =
transmembraan domein (Fraser *et al.* 1997).

Maloniel-KoA is 'n spesifieke en omkeerbare inhibeerder van CPT I-aktiwiteit (McGarry *et al.* 1978) met geen effek op CPT II-aktiwiteit nie (Tein *et al.* 1989). Splyting van die N-terminale gebied van CPT I met proteïenase K lei tot die afname in aktiwiteit wat 'n aanduiding is van die vermoë van die N-terminus om CPT I-aktiwiteit merkbaar te beïnvloed as gevolg van sy interaksie met die C-terminale gebied, om sodoende die konformasie van laasgenoemde in 'n optimale toestand vir sy katalitiese aktiwiteit te hou (sien Figuur 2.4) (Fraser *et al.* 1997). Die verlies van maloniel-KoA sensitiwiteit met die splyting van slegs die ekstreme N-terminale gebied deur proteïenase K, dui daarop dat dié interaksie tussen die N- en C-terminale gebiede ook noodsaaklik is vir die behoud van die optimale tersiêre struktuur, wat nodig is vir die maloniel-KoA sensitiwiteit van CPT I. Verdere verlies van die N-terminale gebied lei tot versnelde verlies van sensitiwiteit wat suggereer dat ander interaksies, byvoorbeeld (i) tussen die ekstreme gedeelte van die N-terminus en die C-terminus, (ii) tussen TMD 1 en die membraan, en (iii) 'n intermembraan interaksie tussen TMD 1 en TMD 2, betrokke kan wees by die bepaling van die sensitiwiteit van CPT I vir maloniel-KoA (Fraser *et al.* 1997). As gevolg van CPT I se unieke inhibeerbaarheid deur maloniel-KoA (McGarry *et al.* 1995) is CPT I dus 'n setel vir die fisiologiese beheer van mitochondriale vetsuuroksidasie en ketogenese (Eaton *et al.* 1996). Volgens Tein *et al.* (1989) kan CPT I beskou word as die tempo-bepalende stap vir vetsuuroksidasie in lewer en fibroblaste wat lei tot hipoglisemiese ensefalopatie, terwyl CPT II die tempo-bepalende stap in die spier is, wat lei tot mioglobienurie. Die vroeë diagnose van dié defekte is noodsaaklik aangesien die voorkoming van vasting die lewensgevaarlike simptome en die gevaar van neurologiese skade kan verhoed.

2.3.5 Die molekulêre basis van die CPT I-defek

Hierdie defek is vir die eerste keer in 1981 deur Bougnères *et al.* (1981) beskryf en sedertdien is die defek in 10 pasiënte uit 8 nie-verwante families gediagnoseer (Roe & Coates, 1995). Die mutasies betrokke by die CPT I-defek is tot dusver nog nie beskryf nie. Die kliniese simptome van die defek presenter gewoonlyk tydens vasting as gevolg van virale infeksie of diaree en sluit koma, beroertes, hepatomegalie, hipoketotiese hipoglisemie en neurologiese afwykings in. Met die uitsondering van

een geval (pasgebore baba) is CPT I-pasiënte op die ouderdom van tussen 8 en 18 maande geïdentifiseer (Roe & Coates, 1995). Behandeling van die episodiese voorkoms van die kliniese simptome met glukose inspuiting, is gewoonlik suksesvol en verder moet vasting vermy word. Gereelde voedsel-inname en vervanging van die langketting vette in die dieet met mediumketting trigliseriede is standaard behandeling (Roe & Coates, 1995). Die definitiewe diagnose van 'n hepatiese CPT I-defek kan slegs gedoen word deur die ensiem aktiwiteit in fibroblaste, leukosiete of lewer te bepaal, aangesien dié isovorm van CPT I nie in spierweefsel uitgedruk word nie. Intermidiêre vlakke van CPT I-aktiwiteit, wat ooreenstem met heterosigositeit, is waargeneem in fibroblaste van die ouers van pasiënte (Roe & Coates, 1995). Dit bevestig dat oorerwing van die defek resessief van aard is.

2.3.6 Die molekulêre basis van die CPT II-defek

Die CPT II-defek is een van die mees algemene resessiewe, aangebore defekte van lipiedmetabolisme (Handig *et al.* 1996) en twee onderskeibare fenotipes is tot dusver beskryf. Bonnefont *et al.* (1996) verwys na die CPT II-defek by kinders en pasgeborenes as die hepatokardiomuskulêre vorm, en na dié by volwassenes as die spier vorm. In die hepatokardiomuskulêre vorm word die defek gekenmerk deur hipoketotiese hipoglisemie, lewerversaking, kardiomiopatie en skielike dood (Demaugre *et al.* 1991). Die CPT II-defek in volwassenes lei tot episodiese, vasting- of oefeninggeïnduseerde spierpyne, rabdomioliese en paroksismale mioglobienurie wat soms tot nierversaking kan lei. Alhoewel die ensiem defek in alle weefsels uitgedruk word, is die kliniese gevolge beperk tot die skeletspiere. Sedert die CPT II-defek in 1973 vir die eerste keer beskryf is (DiMauro & DiMauro, 1973), is meer as sestig soortgelyke gevalle beskryf (Bonnefont *et al.* 1996) en die CPT II-defek word beskou as die algemeenste oorsaak van oorerflike mioglobienurie (Schaefer *et al.* 1997). Die isolasie en molekulêre karakterisering van die CPT II-geen (Schaefer *et al.* 1997) het die identifisering van die siekteveroorsakende mutasies in die geen moontlik gemaak. Tot dusver is twaalf verskillende mutasies geïdentifiseer (Schaefer *et al.* 1997), maar die algemeenste mutasie is die S113L substitusie, 'n "missense" mutasie wat vir meer as 60% van alle CPT II-defektiewe allele in alle CPT II-pasiënte met dié defek, verantwoordelik is (Handig *et al.* 1996). 'n Y628S "missense" mutasie is

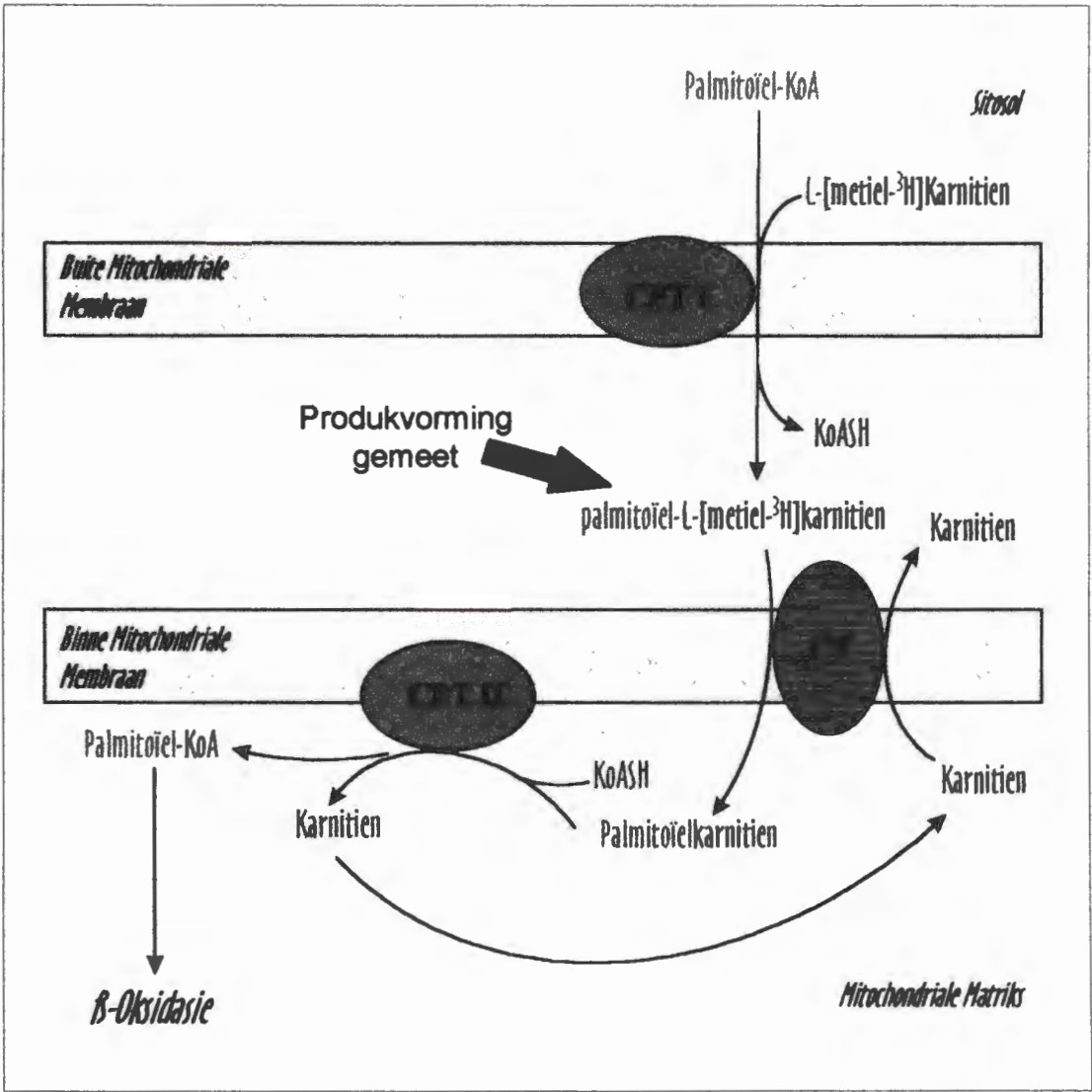
geïdentifiseer as die oorsaak vir die CPT II-defek by kinders (Bonfont *et al.* 1996) en het 'n 10 % CPT II residuele aktiwiteit en hewige verswakte oksidasie van langkettingvetsure tot gevolg. Daarenteen het die S113L substitusie 'n 20 % CPT II residuele aktiwiteit tot gevolg sonder om 'n invloed op langkettingvetsuuroksidasie te hê (Bonfont *et al.* 1996). Dus moet CPT II-aktiwiteit onder 'n sekere drempelwaarde wees om langkettingvetsuuroksidasie in fibroblaste te verswak. Hierdie drempelwaarde verskil tussen weefseltipes wat as verklaring mag dien vir die fenotipiese heterogeniteit van die CPT II-defek. Ander mutasies wat in die geval van die CPT II-defek by kinders beskryf is, is mutasies soos 'n R631C "missense" mutasie, 'n 11 bp duplikasie en 'n P227L "missense" mutasie (Handig *et al.* 1996).

Mediumketting trigliseriede word suksesvol gebruik vir die behandeling van mitochondriale langkettingvetsuuroksidasiedefekte insluitende CPT II (Schaefer *et al.* 1997). Schaefer *et al.* (1997) stel egter voor dat kleiner dosisse voorgeskryf moet word om nie die alternatiewe weë te oorlaai nie en dat hoë C₁₂-KoA (lauriel-KoA) konsentrasies uit die behandeling gesluit moet word, aangesien dit die optimum substraat vir CPT II is.

2.4 CPT-aktiwiteitsbepaling

Soos reeds genoem, kan 'n definitiewe diagnose van CPT I slegs gemaak word deur die ensiem aktiwiteit in fibroblaste, leukosiete of ander weefsels te bepaal. Tot op hede is CPT I-aktiwiteit gemeet deur 'n radio-isotoopgebaseerde voorwaartse uitruilingstoets waar van radioaktiefgemarkte substrate gebruik gemaak word en produkvorming bepaal kan word. So kan die aktiwiteit gemeet word as palmitoïel-L-[metiel-¹⁴C]karnitien vorming vanaf L-[metiel-¹⁴C]karnitien en palmitoïel-KoA (Sadeh en Gutman, 1990) of palmitoïel-L-[metiel-³H]karnitien vorming vanaf L-[metiel-³H]karnitien en palmitoïel-KoA (Demaugre *et al.* 1988) (Figuur 2.5). CPT II-aktiwiteit kan bepaal word deur die terugwaartse reaksie te meet waar die vorming van L-[metiel-³H]karnitien vanaf palmitoïel-L-[metiel-³H]karnitien en KoA bepaal, gemeet word (Bremer & Norum, 1967). Die derde toetsmetode wat gebruik word om CPT-aktiwiteit te bepaal, is ook 'n radio-isotoopgebaseerde uitruilingstoets wat die uitruiling van gemerkte karnitien met 'n poel palmitoïelkarnitien meet (Norum, 1964;

Engel, 1985). Daar word egter probleme ondervind met die interpretasie van die aktiwiteite wat deur verskillende outeurs waargeneem is, hoofsaaklik as gevolg van die verskille in die toetsmetodes en substraatkonsentrasies wat 'n vergelyking van resultate bemoeilik. Aangesien diagnose van die CPT-defekte net moontlik is met behulp van direkte ensiematiese analyses, word groot hoeveelhede mitochondria-verrykte fibroblaste benodig, wat die grootskaalse kweek van fibroblaste of die benutting van lewerbiopsies meebring (Demaugre *et al.* 1991; Schaefer *et al.* 1997).



Figuur 2.5 'n Skematiese voorstelling van die bepaling van CPT I-aktiwiteit deur middel van die radio-isotoopgebaseerde metode

2.5 Probleemstelling, doelstelling en benaderingswyse

Hoewel die mitochondriale karnitienpalmitoïeltransferase sisteem, wat betrokke is by die oordrag van asielmolekules in die mitochondria in, reeds sedert die 1960's bekend is, word daar steeds nie oor genoegsame kennis beskik om die werking van die sisteem volkome te verstaan nie. Soos reeds in Afdeling 2.3.5 en 2.3.6 genoem is, is CPT-defekte van die mees algemene defekte van die lipiedmetabolisme (Handig *et al.* 1996), maar is nog swak diagnoseerbaar en kom ook toenemend voorkom (Katzir *et al.* 1996). Onontbeerlik vir die definitiewe diagnose van hierdie defekte, is die akkurate bepaling van die aktiwiteit van die betrokke ensieme. Tot op hede is slegs van radioaktiewe isotope gebruik gemaak om die CPT-aktiwiteite te bepaal en aangesien die metodes wat in die literatuur beskryf is onderling soveel verskil ten opsigte van kondisies en konsentrasies van die komponente van die reaksie, is dit moeilik om vergelykende interpretasies te maak. Vir die radio-isotoopgebaseerde metode word suiwer mitochondriale fraksies of 'n groot hoeveelheid fibroblast- of leukosiethomogenaat benodig om meetbare aktiwiteite te verkry. Hierteenoor sal 'n metode wat 'n klein hoeveelheid selle benodig wat maklik bekombaar is, baie ideaal wees om vinnige en betroubare diagnoses te maak. 'n Vereiste van so 'n metode is dat dit steeds sensitief en akkuraat moet wees en verkieslik radioaktiewe uitsluit. Die vermyding van radioaktiewe materiaal beteken ook geen gesondheids- en omgewingsgevaar nie.

Oor die afgelope dekade is 'n eksponensiële groei op die veld van biologiese toepassings van massaspektrometrie waargeneem. Aangesien gevormde produkte van ensiematiese reaksies direk, tot op subpikomolêre vlak, met behulp van massaspektrometrie bepaal behoort te kan word, hou hierdie tegniek die belofte in om CPT I-aktiwiteit akkuraat te bepaal deur van relatief min materiaal gebruik te maak. Elektrosproei massaspektrometrie is 'n baie gesogte meettegniek as gevolg van sy hoë mate van selektiwiteit en sensitiwiteit (Dongré *et al.* 1997).

Die volgende doelstelling is vir hierdie studie geformuleer: Die ontwikkeling van 'n elektrosproei massaspektrometriese metode om die aktiwiteit van CPT I in fibroblast- en leukosiethomogenate te bepaal. Om hierdie doelwit te bereik, is die volgende

benaderingswyse gevolg: die evaluering van die bestaande radio-isotoopgebaseerde metode vir CPT I-aktiwiteitsbepaling in fibroblast- en leukosiethomogeenat, die ontwikkeling en evaluering van ES-MS as deteksiemetode vir die aktiwiteitsbepaling van CPT I in fibroblast- en leukosiethomogeenat, en die vergelyking van die twee metodes ten opsigte van spesifisiteit, sensitiwiteit, herhaalbaarheid, koste en praktiese uitvoerbaarheid.

HOOFSTUK 3

CPT I-AKTIWITEITSBEPALING DEUR MIDDEL VAN 'N RADIO-ISOTOOPGEBASEERDE METODE

3.1 Inleiding

Om die ontwikkeling van die elektrospoei-massaspektrometriese (ES-MS) metode krities te kan vergelyk met die bestaande radio-isotoopgebaseerde metode, was dit nodig om laasgenoemde metode vir ons laboratorium te standaardiseer en CPT I-aktiwiteite in kontrole homogenate te bepaal. In hierdie hoofstuk word die bereiding van die fibroblast- en leukosiethomogenate en die standaardisering van die bestaande radio-isotoopgebaseerde metode (Demaugre *et al.* 1988) vir CPT I-aktiwiteitsbepaling beskryf.

3.2 Voorbereiding van materiaal

3.2.1 Kweking van fibroblaste

Fibroblastkulture is by 37°C en 5% CO₂ gekweek. Die voedingsmedium het bestaan uit Ham se F10 met 15 mM HEPES (Gibco), 10% fetale kalfserum (Sterilab), 1 x Anti-PPLO (Gibco) en 1 x Pen-Strep (Gibco) (Van der Westhuizen, 1993). Die selle is elke vierde dag gevoer en wanneer 'n volledige monolaag gevorm het, is die selle geoes.

Vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit, wat mitochondriale membraan assosiasie vereis vir katalitiese aktiwiteit, moes fibroblasthomogenate berei word sodanig dat die mitochondria intak bly. Fibroblaste in 75 cm² flesse (NUNC) is twee keer met 1 x PBS (10 x PBS bestaan uit 1.44 g/l KH₂PO₄ ; 90 g/l NaCl ; 7.95 g/l Na₂HPO₄·7H₂O) gewas, met 1.5 ml 0.05 mg/ml tripsien en 0.02 mg/ml EDTA (Gibco) behandel en vir 5 minute by 37°C geïnkubeer (Nolte *et al.* 1997). Die getripsineerde selle is in

polipropileenbuisse versamel en twee maal met 1 x PBS gewas waarna dit in 'n homogeniseringsbuffer [150 mM KCl; 50 mM Tris.HCl (pH 7.4)] gesuspendeer is. Die selle is op ys gelaat en op dieselfde dag vir die ensiem aktiwiteitsbepaling gebruik. Fibroblaste van normale persone is as kontroles in die eksperimente gebruik.

3.2.2 Bereiding van fibroblasthomogenate

Vir bereiding van die fibroblasthomogenate is sonisering gebruik om die selmembrane te breek. Vir die toets van CPT I-aktiwiteit is dit belangrik dat net die selmembraan en nie die mitochondriale membraan gebreek word nie en om hierdie rede is die soniseringsintensiteit waarby slegs die selmembraan en nie die mitochondriale membraan breek, vasgestel. Die relatiewe intaktheid van die mitochondriale membraan is vasgestel deur die aktiwiteit van die mitochondriale ensiem, sitraatsintase (EC 4.1.3.7.), te bepaal na sonisering van die homogenaat volgens die metode van Saggerson *et al.* (1982). Na die tripsinering- en wasstappe van die fibroblaste is die fibroblaste in 1.7 ml homogeniseringsbuffer [150 mM KCl; 50 mM Tris.HCl (pH 7.4)] gesuspendeer. Die selsuspensie is in verskillende polipropileenbuisse (1.5 ml) verdeel en by 'n intensiteit van onderskeidelik 10, 12, 14, 16, 20, 25 en 30 μm elk vir 3 sekondes, op ys, gesoniseer. Die gesoniseerde homogenaat is vir 15 minute teen 9 000 x g, 4°C, gesentrifugeer waarna die mitochondria-bevattende supernatant versamel en by 4°C bewaar is. Die reaksiemengsel vir die bepaling van sitraatsintase aktiwiteit is in 'n finale volume van 1 ml as volg saamgestel: 220 mM sukrose, 40 mM KCl, 10 mM Tris.HCl (pH7.4), 1 mM EGTA, 1.3 mg/ml vetsuurvrye beesserumalbumien, 50 μM asetiel-KoA, 0.1 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobensoësuur), 30 μl gesoniseerde mitochondria en 50 nmol oksaloasetaat, waarmee die reaksie geïnisieer is. Die sitraatsintase aktiwiteit is spektrofotometries bepaal by 25°C en 'n golflengte van 412 nm. Die resultate word in Tabel 3.1 en Figuur 3.1 gegee. Die sitraatsintase aktiwiteit is bereken volgens die formule:

$$SA = \frac{\Delta A}{\epsilon \times mg}$$

waar SA = nmol.min⁻¹.mg⁻¹

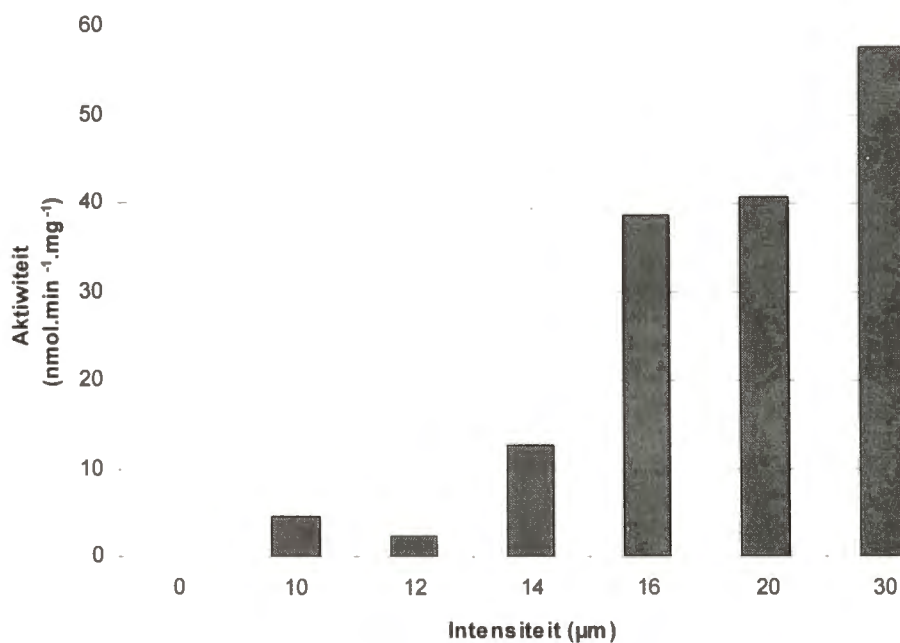
ΔA = verandering in absorbansie by 412nm / minuut

ε = ekstinksiekoëffisiënt

= 13.6/M/cm (Ellman *et al.* (1959))

Tabel 3.1: Sitraatsintase aktiwiteit in gesoniseerde fibroblasthomogenate.

Intensiteit van sonisering (μm)	Aktiwiteit (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	Aktiwiteit (%)
0	0	0
10	4.566	7.93
12	2.337	4.05
14	12.603	21.84
16	38.571	66.85
20	40.687	70.51
30	57.702	100.00



Figuur 3.1: Sitraatsintase aktiwiteit in gesoniseerde fibroblasthomogenate.

Fibroblasthomogenate is by verskillende intensiteite vir 3 sekondes gesoniseer waarna die sitraatsintase aktiwiteit bepaal is soos beskryf in Afdeling 3.2.2.

Volgens die resultate van Tabel 3.1 en Figuur 3.1 is dit duidelik dat die intensiteit van sonisering 'n definitiewe invloed het op die hoeveelheid sitraatsintase aktiwiteit wat in die homogenaat bepaal kan word. Relatiewe lae aktiwiteite is gemeet na toepassing van sonisering tot en met intensiteite van 14 μm waarna meer as 'n twee maal toename in aktiwiteit gemeet is. Volgens Saggerson *et al.* (1982) is 'n sitraatsintase aktiwiteit van laer as 20% van die aktiwiteit in selle wat by 'n intensiteit van 30 μm gesoniseer is, 'n aanduiding van mitochondriale intaktheid. Die afleiding kan dus gemaak word dat die mitochondria in die fibroblasthomogenaat wat by 'n intensiteit van 14 μm en hoër gesoniseer is, nie meer intak is nie. Uit Figuur 3.1 en Tabel 3.1 kan waargeneem word dat by sonisering vir 'n tydperk van 3 sekondes by 'n intensiteit van 10 μm die aktiwiteit van die sitraatsintase laer was as 20% van aktiwiteit in selle wat by 'n intensiteit van 30 μm gesoniseer is. Dit dui dus op die teenwoordigheid van intakte mitochondria na sonisering by 'n intensiteit van 10 μm .

Die volgende metode is deurgaans gevolg om die selmembrane te breek: Selhomogenaat is vir 3 sekondes by 'n intensiteit van 10 μm gesoniseer, dadelik weer op ys geplaas en vir 4 minute teen 150 x g (tensy anders vermeld) gesentrifugeer. Die supernatant is onttrek en in 'n volgende polipropileenbuis op ys bewaar. 'n Proteïenbepaling van elk van die kontroles is gedoen met die gebruik van die bicinchoniniensuur (BCA)-metode (Smith *et al.* 1985).

3.2.3 Isolering van leukosiete

Leukosiete van normale persone is deurgaans in al die eksperimente gebruik en is geïsoleer volgens 'n gewysigde metode van Steward & Male (1989). Bloed is 1:1 met 1 x PBS by 37°C verdun waarna 2.5 dele hiervan op 1 deel Percoll (1.086 g/ml; 37°C) in buise gelaai en gesentrifugeer is teen 800 x g vir 30 minute by kamertemperatuur. Die boonste fase is onttrek en daarna is die leukosiete ("buffy coat") oorgedra na 'n volgende buis en versigtig met 5 ml 1 x PBS gewas. Die leukosiete is gesedimenteer teen 800 x g vir 5 minute. Oorblywende eritrosiete is geliseer deur die byvoeging van 1 ml van 'n liseringsmengsel (NH_4Cl (8.29 g/l); NaHCO_3 (1 g/l) en EDTA (37.5 mg/l); pH7.4). Hierdie mengsel is vir 5 minute op ys gelaat, met 1 x PBS gewas en die leukosiete is gesentrifugeer soos reeds beskryf, waarna die supernatant

gedekanteer en die leukosiete in buffer [150 mM KCl; 50 mM Tris.HCl (pH 7.4)] gesuspendeer is.

3.2.4 Bereiding van leukosiethomogenate

Die leukosiethomogenate is op dieselfde wyse as die fibroblasthomogenate berei (sien Afdeling 3.2.2). Die geïsoleerde leukosiete is in buffer gesuspendeer en vir 3 sekondes by 'n intensiteit van 10 μ m gesoniseer. Aanvanklike CPT I-aktiwiteite wat verkry is, het getoon dat hierdie kondisies van sonisering vir leukosiethomogenaat, net soos in die geval van die sonisering van fibroblasthomogenaat, ideaal is vir die breking van die selmembrane sonder om die mitochondriale membrane te beskadig. Hierna is die homogenaat onmiddellik op ys geplaas en daarna vir 4 minute teen 150 x g gesentrifugeer. Die supernatant is onttrek en op ys bewaar tot verdere gebruik.

3.3 Die radio-isotoopgebaseerde metode vir CPT I-aktiwiteitsbepaling

3.3.1 Beginsel

Radioaktiefgemarkte substrate word lank reeds in ensiematiese analyses gebruik vir die bepaling van ensiem aktiwiteit (Wolf *et al.* 1983) en tot op hede was dit die enigste beskikbare metode van CPT I-aktiwiteitsbepaling (Demaugre *et al.* 1988; Sadeh en Gutman, 1990). CPT II-aktiwiteit kan bepaal word deur die terugwaartse reaksie te meet. Die bepaling van die spesifieke aktiwiteit van 'n ensiem behels die meting van die ensiem gekataliseerde transformasie van die substraat per tydeenheid per massa proteïene. As een van die betrokke substrate radioaktief gemerk is, lei die reaksie tot 'n radioaktiefgemarkte produk. Na 'n vasgestelde tyd moet die radioaktiewe produk van die onbenutte radioaktiewe substraat geskei word sodat die hoeveelheid produk wat gevorm is, bepaal kan word (Wolf *et al.* 1983).

Om hierdie metode sinvol te kan aanwend, moet aan 'n aantal vereistes voldoen word: Kwantitatiewe skeiding van die substraat van die produk kan geskied deur middel van oplosmiddelekstraksie van die produk uit die waterfase; om optimale kondisies vir aktiwiteitsbepalings te verkry, is dit nodig om 'n kort reaksieverloop te hê om in die

omgewing van die aanvangstempo te bly; die spesifieke radioaktiwiteit moet nie hoër wees as wat nodig is vir die radioaktiwiteitsbepalings nie (Wolf *et al.* 1983). Daar is twee belangrike redes waarom die spesifieke radioaktiwiteit van die substraat so laag moontlik gehou moet word, naamlik eerstens moet die substraatkonsentrasie optimaal wees (hoog, maar nie inhiberend). Aansienlike besparing in kostes vind plaas met die gebruik van substrate met lae spesifieke radioaktiwiteit. Tweedens kan die gebruik van gemerkte verbindinge met hoë aktiwiteit lei tot aansienlike komplikasies en 'n vermeerdering in foute (byvoorbeeld absorpsie as gevolg van radiolitiese afbraak, verhoogde gevaar van mikrobiese afbraak as gevolg van kleiner hoeveelhede van die verbinding wat gebruik word, ensovoorts) (Wolf *et al.* 1983). Na ekstraksie van die produk word die monster in 'n sintillasië-vloeistof geplaas en bepaling van die radioaktiwiteit geskied met 'n vloeistofsintillasië spektrometer. Blussing word in berekening gebring deur gebruik te maak van 'n geskikte blussingskromme waarna die aktiwiteit van die ensiem bereken kan word met die data.

3.3.2 Metode

'n Radio-isotoopgebaseerde voorwaartse uitruilingsreaksie (gewysigde metode van Demaugre *et al.* 1988) is gebruik om die tempo van palmitoëil-L-[metiel-³H]karnitienvorming vanaf L-[metiel-³H]karnitien en palmitoëil-KoA te meet. McGarry *et al.* (1983) het aangetoon dat die K_m -waarde van CPT I vir karnitien varieer afhangende van die tipe weefsel en die betrokke spesie. Volgens McGarry (1995) is die K_m -waarde vir karnitien 500 μM in die geval van die skeletspier isovorm van CPT I. Demaugre *et al.* (1988) het die K_m -waardes van CPT I vir karnitien en palmitoëil-KoA in twee verskillende kontrole fibroblasthomogenate bepaal. By 'n vaste konsentrasie van 500 μM L-karnitien is die K_m -waarde vir palmitoëil-KoA 28 en 23 μM in die verskillende homogenate terwyl die K_m -waarde vir karnitien 38 en 35 μM in die verskillende homogenate by 'n vaste palmitoëil-KoA konsentrasie van 100 μM is.

Die reaksiemengsel wat in hierdie studie gebruik is, is gebaseer op die werk van Demaugre *et al.* (1988) en is saamgestel in 550 μl en het bestaan uit 115 mM tris-HCl (pH7.4), 4.5 mM gereduseerde glutatioon, 70 mM KCl, 110 μM palmitoëil-KoA, selhomogenaat (0.05 - 0.3 mg totale proteïeninhoud) en 1% vetsuurvrye

beesserumalbumien (BSA) (m/v). Na 'n 5-min pre-inkubasieperiode by 30°C is die reaksie geïnisieer deur die byvoeging van 540 μM L-[metiel- ^3H]karnities (2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). In die proteïenafhanklikheidsreeks en die kontrole bepaling is 'n soortgelyke reaksiemengsel sonder selle as blanko gebruik en vir die tydafhanklikheidsreeks is dieselfde reaksiemengsel met 'n tydverloop van 0 minute as blanko gebruik (tensy anders vermeld). Die reaksie is by 30°C geïnkubeer en is daarna getermineer deur 1 ml koue 1.2 N HCl by die reaksiemengsel te voeg, soos beskryf deur McGarry *et al.* (1978).

Ekstrasie van die radioaktiewe palmitoïelkarnities is uitgevoer volgens die metode van Saggerson *et al.* (1982): 2 ml waterversadigde butanol is by die reaksiemengsel gevoeg en is vir 1 minuut deeglik gemeng (vortex). Die mengsel is teen 1000 x g vir 5 minute gesentrifugeer waarna die butanollaag afgetrek en gewas is met 5 ml butanolversadigde water deur dit goed te meng en dan te sentrifugeer. Die hoeveelheid palmitoïel-L-[metiel- ^3H]karnities wat gevorm is, is bepaal deur 1 ml van die butanollaag by 4 ml sintellasie-vloeistof te voeg en die hoeveelheid radioaktiwiteit is met behulp van vloeistofsintillasie-spektroskopie (Packard Tri-Carb vloeistofsintillasieteller) bepaal. Die omskakeling van tpm na dpm is uitgevoer deur gebruik te maak van 'n blussingskromme. Die CPT I-aktiwiteit is bereken volgens die formule:

$$\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} = \frac{\text{dpm}}{\text{SA}(\text{dpm} / \text{nmol})} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

SA = spesifieke aktiwiteit van die substraat (dpm/nmol)

dpm = disintegrasies per minuut

(Die spesifieke aktiwiteit van die substraat is telkens voor byvoeging daarvan in die reaksiemengsel bepaal.)

Dit is belangrik dat die reaksie so stadig geskied sodat net 'n klein hoeveelheid van die substraat tydens die reaksie tydperk na die produk omgeskakel het (Bergmeyer, 1983). Die rede hiervoor is om aktiwiteitsbepaling moontlik te maak en om in die liniêre gebied van die omskakelingskurwe te bly. Die voorgestelde toets vir CPT I-aktiwiteitsbepaling kan op twee maniere geëvalueer word (Bergmeyer, 1983):

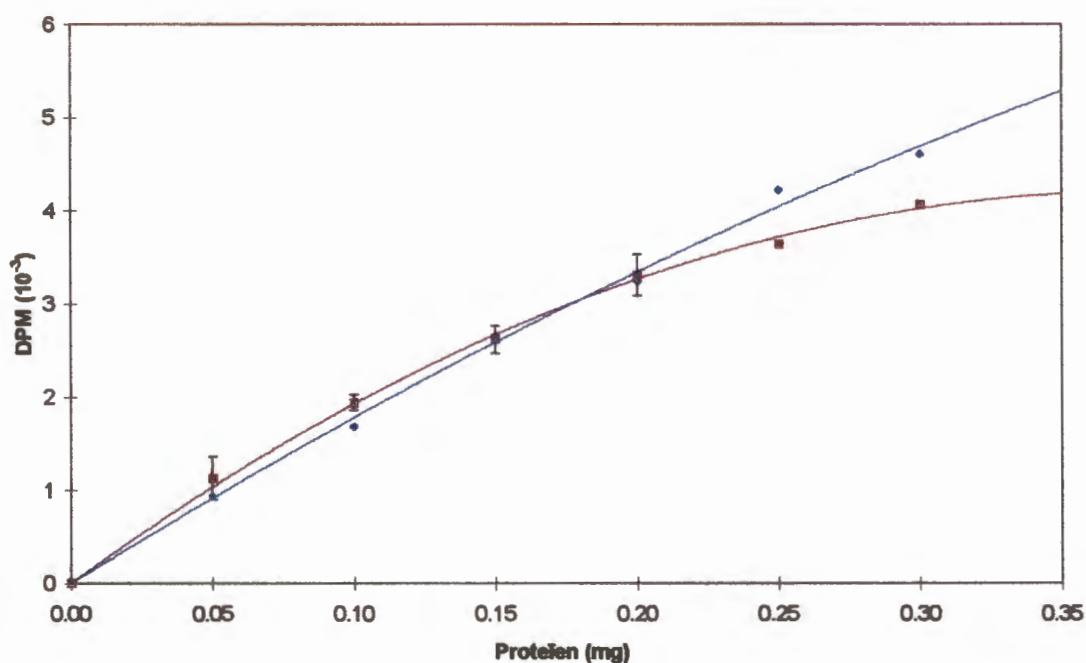
Eerstens moet die gebied van liniêre toename ten opsigte van toenemende **proteïeninhoud** vasgestel word en volgens hierdie kurwe kan dan bepaal word watter ensieminhoud in die reaksiemengsel ideaal is vir die aktiwiteitsbepaling van CPT I. 'n Verdere belangrike oorweging is die tydskaal van die toetsmetode - dit is essensieel dat daar geen noemenswaardige verandering in die aktiwiteit van die ensiem is oor die periode waartydens die reaksiesnelheid bereken word nie. Oor die algemeen word van 'n kort reaksieverloop by 'n spesifieke temperatuur gebruik gemaak. As, gerieflikheidshalwe, die aktiwiteit van die ensiem bepaal word deur 'n enkele lesing eerder as kontinue meting van aktiwiteit, is dit noodsaaklik om met 'n voorafgaande eksperiment te demonstreer dat die mate van produkvorming met verloop van tyd, liniêr verloop oor die totale inkubasie periode (Palmer, 1995). Tweedens moet die gebied van liniêre toename ten opsigte van **tyd** gevind word. Hierdie kurwe sal dus uitsluitel gee oor die ideale tydverloop vir die reaksie vir bepaling van CPT I-aktiwiteit. Ten einde 'n optimum proteïeninhoud en tydverloop vir die reaksie te bepaal is 'n proteïen- en tydafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate uitgevoer.

3.3.3 CPT I-aktiwiteitsbepaling in fibroblast- en leukosiethomogenate

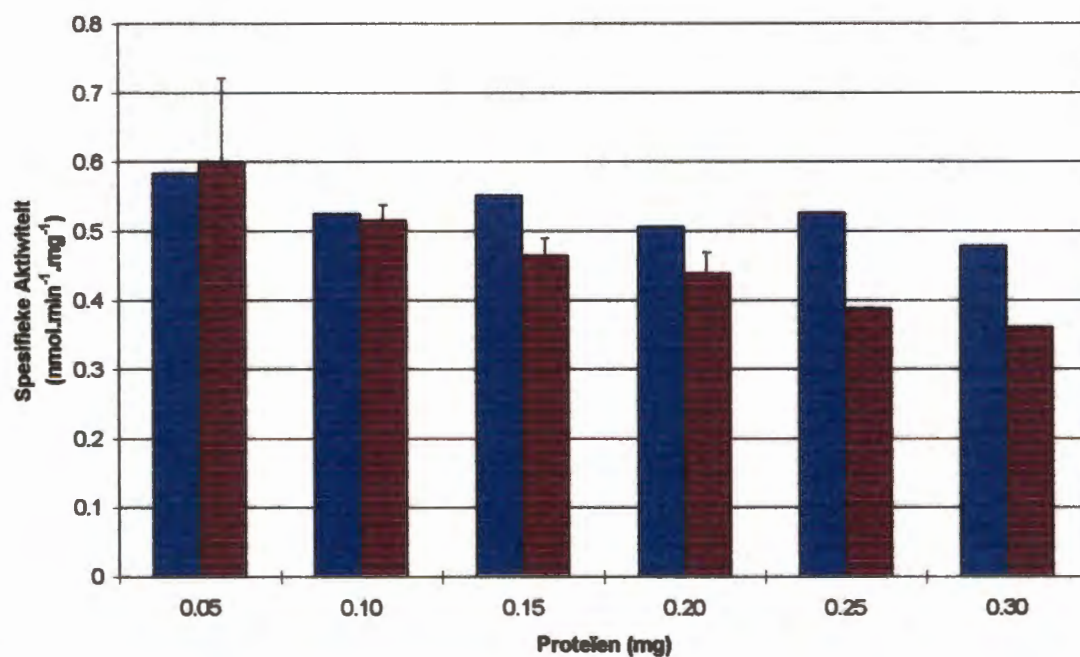
3.3.3.1 Proteïenafhanklike produkvorming deur CPT I

Vir die proteïenafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate is die reaksiemengsel saamgestel soos beskryf in Afdeling 3.3.2 en 'n reeks van 0 tot 0.3 mg proteïen is bygevoeg. Die reaksie is toegelaat om vir 'n tydperk van onderskeidelik 8 en 10 minute vir fibroblaste en leukosiete te verloop (McGarry *et al.* 1983) voordat dit getermineer is volgens die metode van McGarry *et al.* (1978). Die butanolekstraksie is gedoen volgens Saggerson *et al.* (1982) soos reeds in Afdeling 3.3.2 beskryf. Die resultate wat verkry is deur die bepaling van die mate van omsetting van L-[metiel-³H]karnitien na palmitoïel-[metiel-³H]karnitien, word in Figuur 3.2a en 3.2b gegee. Hierdie resultate toon 'n toename in produkvorming met toenemende hoeveelhede selhomogenaat wat bygevoeg is. Die toename in produkvorming is bykans liniêr in die fibroblast- en leukosiethomogenate (Figuur 3.2a) en ongeveer dieselfde hoeveelheid

(a)



(b)



Figuur 3.2: Proteïenafhanklikheid van CPT I-aktiwiteitsbepaling

Die onderskeie reaksiemengsels is saamgestel en uitgevoer soos in Afdeling 3.3.2 beskryf, met 'n inkubasieperiode van 8 minute en 10 minute in fibroblast- en leukosietomogenate, onderskeidelik. 'n Reaksiemengsel sonder selle is as blanko gebruik. Die verskillende monsterpunte in die geval van die leukosietomogenaat is telkens in duplikaat uitgevoer, en een keer in die fibroblastomogenaat. a: produkvorming teenoor proteïeninhoud. b: spesifieke aktiwiteit teenoor proteïeninhoud.

(♦ / ■ Fibroblaste; ■ / ■ Leukosiete)

produk, uitgedruk as disintegrasies per minuut (dpm), is gevorm na die betrokke inkubasieperiodes. Wanneer produkvorming uitgedruk word as spesifieke aktiwiteit, word 'n geringe afname in aktiwiteit waargeneem in beide fibroblast- ($0.57 - 0.49 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) en leukosiethomogenate ($0.57 - 0.35 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$), hoewel die afname in aktiwiteit effens groter is in die geval van leukosiete (Figuur 3.2b). Hoë agtergrondwaardes wat onderskeidelik 45% en 31% van die dpm by 0.1 mg proteïene uitgemaak het, is waargeneem in die fibroblast- en leukosiethomogenate. Om lig te werp op die hoë agtergrondwaardes wat tydens die gebruik van die radio-isotoopgebaseerde metode waargeneem is, word Tabel 3.2 ingesluit, waar die data van die proteïenafhanklikheidsreeks in fibroblaste weergegee word.

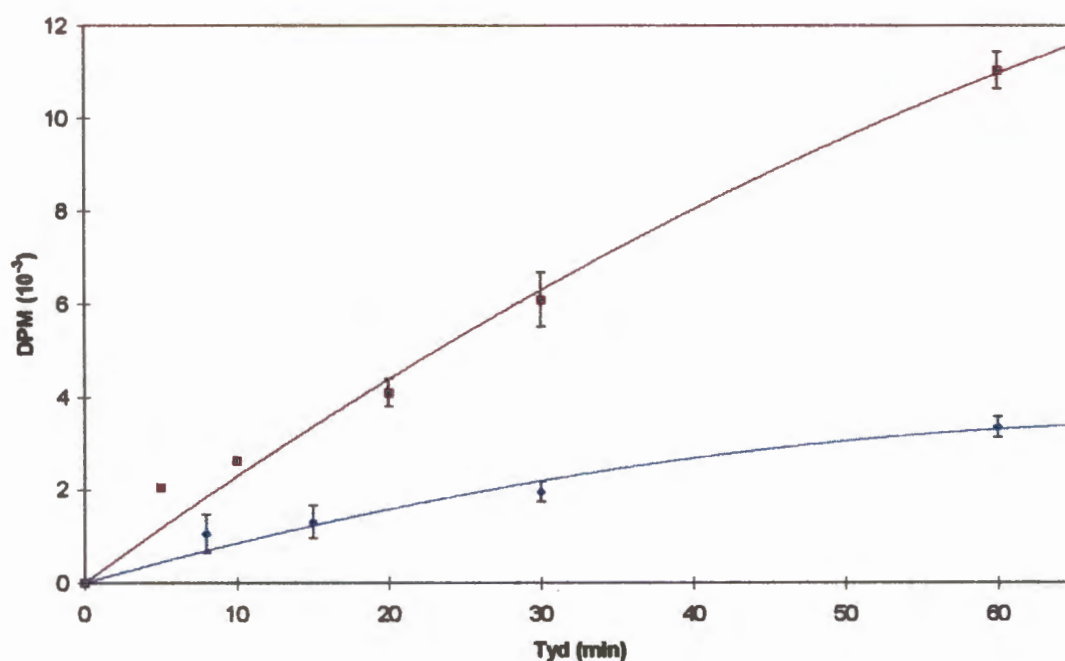
Tabel 3.2: Agtergrond in die proteïenafhanklikheidsreeks

Proteïeninhoud (μg)	dpm	Agtergrond as % van dpm
0.0 (Blanko)	703.27	
50	1170.13	60
100	1544.19	46
150	2030.89	35
200	2326.13	30
250	2812.70	25
300	3005.97	23

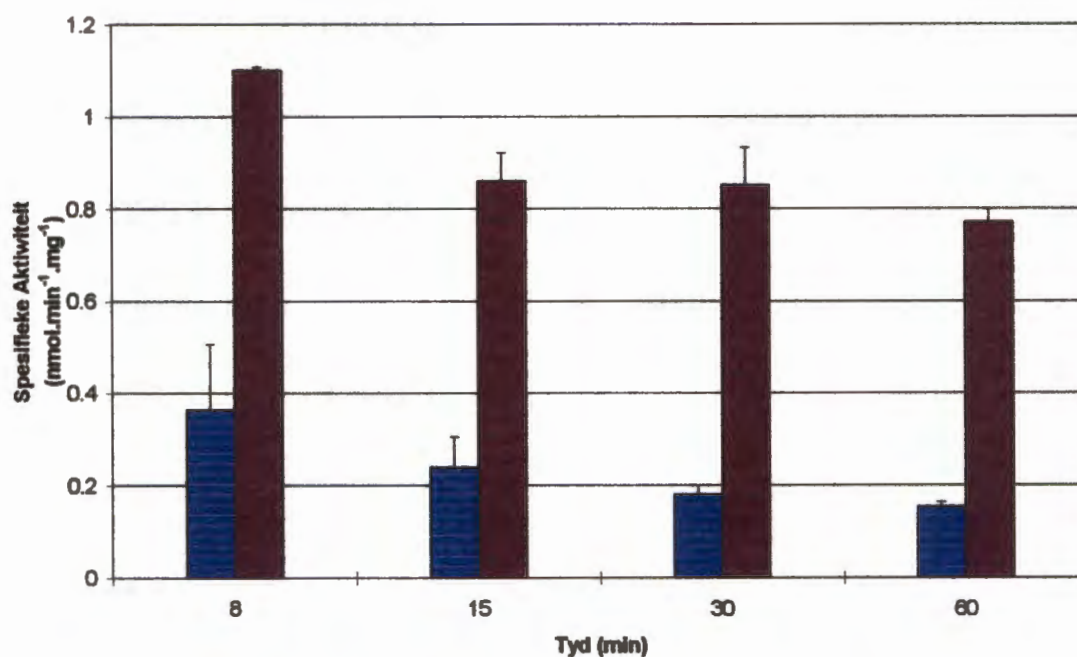
3.3.3.2 Tydafhanklike produkvorming deur CPT I

Vir die tydafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate is die reaksiemengsel saamgestel soos beskryf in Afdeling 3.3.2. 'n Proteïeninhoud van 0.1 mg is in elk van die reaksiemengsels gebruik, aangesien dit in die liniêre gebied val tydens die proteïenafhanklike produkvorming van CPT I-aktiwiteit en die tydafhanklikheidsreeks is saamgestel oor 'n totale inkubasieperiode van een uur met monstername na verskillende tydsintervalle. In die geval van die leukosiethomogenate is die reaksie op ys getermineer en $500 \mu\text{l}$ HCl bygevoeg nadat die totale inkubasieperiode verloop het. Die ekstraksies is gedoen volgens Saggerson *et al.* (1982) soos reeds beskryf in Afdeling 3.3.2. Die resultate wat verkry is deur die meting van omsetting vanaf L-[metiel- ^3H]karnitien na palmitoïel-[metiel- ^3H]karnitien,

(a)



(b)



Figuur 3.3: Tydafhanklikheid van CPT I-aktiwiteitsbepaling

Die onderskeie reaksiemengsels is saamgestel soos in Afdeling 3.3.2 beskryf, met 'n proteïeninhoud van 0.1 mg. In die geval van die leukosiethomogenate is 'n soortgelyke reaksiemengsel met 'n tydverloop van 0 minute as blanko gebruik en in die geval van die fibroblasthomogenaat is reaksiemengsel sonder selle met soortgelyke tydverloop as elk van die monsters, as blanko gebruik. Die verskillende monsterpunte is telkens in duplikaat gedoen. a: produk vorming teenoor tyd b: spesifieke aktiwiteit teenoor tyd.

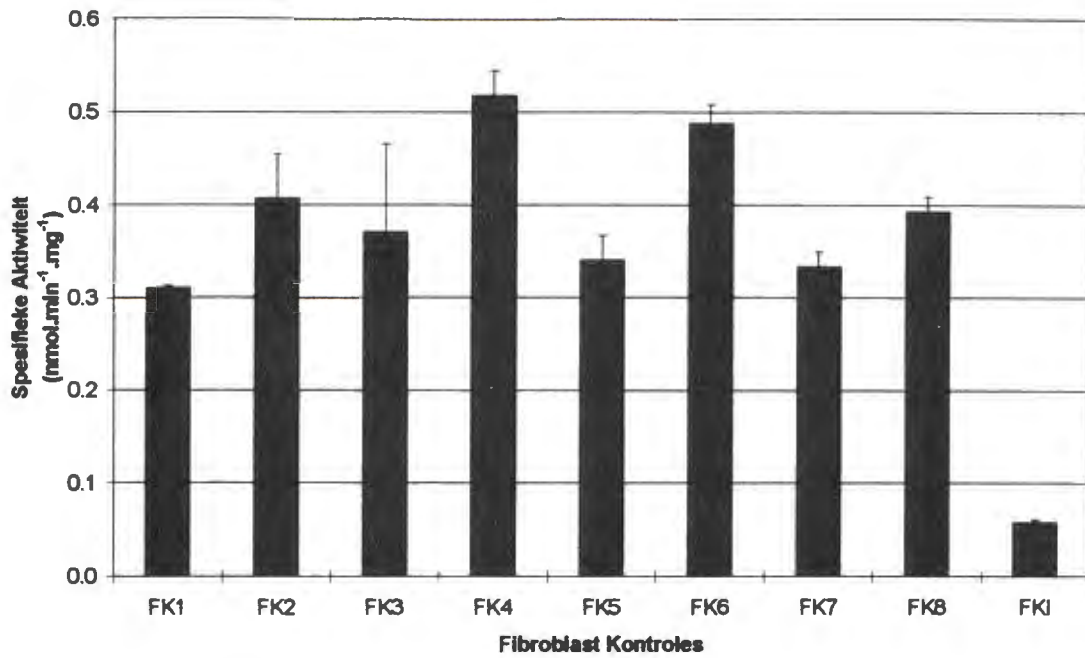
(♦ / ■ Fibroblaste; ■ / ■ Leukosiete)

word in Figuur 3.3a en 3.3b gegee. 'n Soortgelyke toename in produk vorming as waargeneem tydens die proteïenafhanklikheidsreeks, is na afloop van die totale inkubasieperiode waargeneem. In die geval van die fibroblasthomogenaat (Figuur 3.3a) is egter drie keer minder produk gevorm tydens 'n inkubasieperiode van een uur as in die geval van die leukosiethomogenaat (Figuur 3.3a). Uitgedruk as spesifieke aktiwiteit, is 'n soortgelyke afname in aktiwiteit in fibroblaste ($0.30 - 0.13 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) en leukosiete ($1.00 - 0.73 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) waargeneem, hoewel die spesifieke aktiwiteit in die geval van fibroblaste weer eens drie keer laer is as in die geval van leukosiete (Figuur 3.3b). Tydens die tydafhanklikheidsreeks in fibroblasthomogenaat is agtergrondwaardes vir elke monster bepaal deur 'n monster sonder homogenaat vir dieselfde tydperk as elke reaksie monster te laat verloop. Hoë agtergrondwaardes is weer eens waargeneem en het onderskeidelik 67%, 51%, 32% en 20% van die monsters met 'n 8, 15, 30 en 60 minute tydverloop, uitgemaak. In die geval van die leukosiethomogenaat waar die reaksie op 'n ander manier gestop is, het die agtergrondwaarde 24% van die aktiwiteit na 'n 20 minute tydverloop uitgemaak.

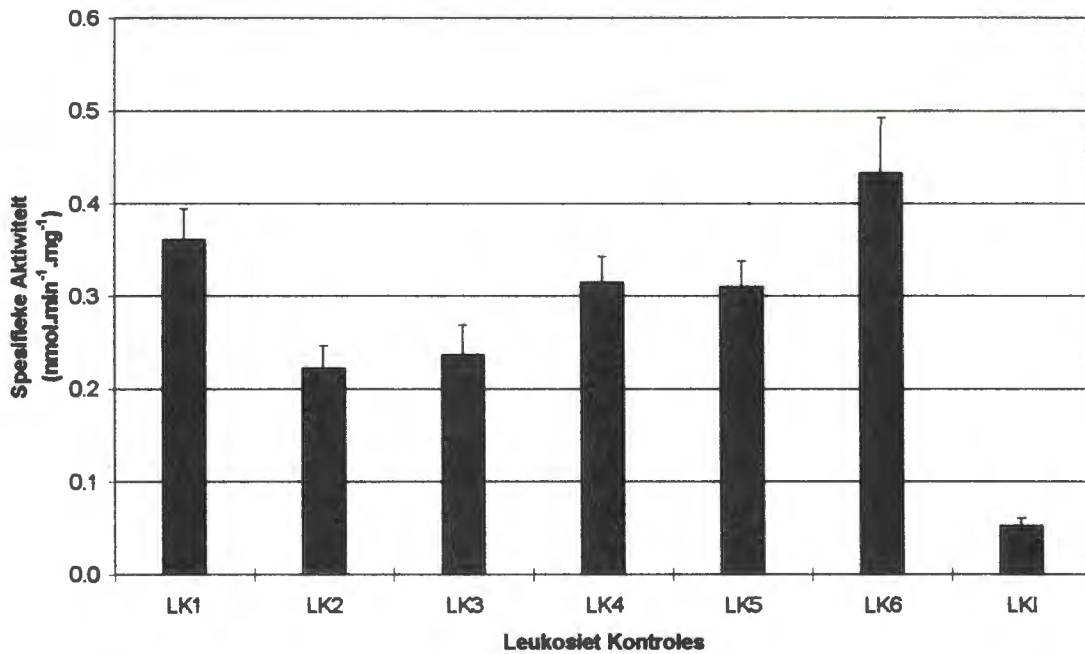
3.3.3.3 CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole selhomogenate

Tydens die aktiwiteitsbepaling in kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate is 'n proteïeninhoud van 0.1 mg per reaksiemengsel gebruik en 'n inkubasieperiode van 10 minute in die geval van fibroblasthomogenate en 20 minute in die geval van leukosiethomogenate. Hierdie betrokke proteïeninhoud en tydverloope is gebruik aangesien dit in die liniêre gebied van die reaksieverloop tydens die proteïen- en tydafhanklikheidsreeks, val. Die reaksiemengsel is saamgestel soos beskryf in Afdeling 3.3.2 en maloniel-KoA is bygevoeg as inhibeerder van CPT I. Die resultate van die CPT I-aktiwiteitsbepaling in fibroblast- en leukosiethomogenate word onderskeidelik in Figuur 3.4a en 3.4b, gegee. 'n Gemiddelde spesifieke aktiwiteit van $0.390 \pm 0.076 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ($n=8$) en $0.306 \pm 0.073 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ($n=6$) is onderskeidelik in die fibroblast- en leukosiethomogenate, waargeneem. Die waargenome CPT I-aktiwiteit in die geval van maloniel-KoA inhibisie was onderskeidelik $0.057 \pm 0.003 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ en $0.052 \pm 0.008 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ in fibroblast- en leukosiethomogenate, wat onderskeidelik 14.7% en 15.8% uitmaak van die gemiddelde CPT I-aktiwiteit waargeneem in hierdie homogenate.

(a)



(b)



Figuur 3.4 CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole homogenate

Die reaksiemengsel is saamgestel en uitgevoer soos in Afdeling 3.3.2 beskryf, met 'n proteïeninhoud van 0.1 mg en 'n 10 en 20 minute inkubasieperiode in fibroblast- (a) en leukosiet homogenate (b) onderskeidelik. 'n Reaksiemengsel sonder selle is as blanko gebruik. Die verskillende monsterpunte is telkens in triplikaat en die maloniel-KoA geïnhibeerde aktiwiteit in duplikaat bepaal. FK en LK is die fibroblast- en leukosiet kontroles met 'n totaal van 8 en 6 kontroles onderskeidelik. FK1 en LK1 is onderskeidelik fibroblast- en leukosiet kontroles met 50 μ M maloniel-KoA as inhibeerder bygevoeg.

Agtergrondwaardes wat onderskeidelik 51% en 58% van die gemiddelde meetbare radioaktiwiteit, wat in die reaksiemengsels vir fibroblast- en leukosiethomogenate gemeet is, uitgemaak het, is verkry.

3.4 Samevatting

In hierdie hoofstuk is die voorbereiding van die fibroblast- en leukosiethomogenate wat vir CPT I-aktiwiteitsbepalings gebruik is, beskryf. 'n Radio-isotoopgebaseerde metode is saamgestel vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit en die beginsel waarop hierdie metode berus, is ook beskryf. In hierdie eksperimente is waargeneem dat gemiddelde CPT I-aktiwiteit en maloniel-KoA geïnhibeerde CPT I-aktiwiteit meetbaar is met die radio-isotoopgebaseerde metode in fibroblast- en leukosiethomogenate. 'n Groot probleem wat ondervind is, is die hoë en variërende agtergrondwaardes wat deurgaans waargeneem is. Hoewel die radio-isotoopgebaseerde metode gebaseer is op die metode van Demaugre *et al.* (1988) is daar steeds verskille aangesien Demaugre *et al.* (1988) geen aanduiding gee van die hoeveelheid homogenaat gebruik en tydverloop van die reaksie nie en ook nie dat die tydverloop na die stop van die reaksie 'n effek het op die resultate nie. Tydens hierdie ondersoek is waargeneem dat die tydperk nadat die reaksie met soutsuur gestop is 'n invloed het op die hoë agtergrondwaardes en dit word bespreek in Afdeling 5.2.2. Dit maak dit dus moeilik om die resultate met dié van Demaugre *et al.* (1988) of enige ander in die literatuur te vergelyk. Die hoë agtergrondwaardes kan die betroubaarheid van die metode in die gedrang bring aangesien die dpm in normale selhomogenate slegs ongeveer 50% van die totale meetbare dpm uitmaak en daarom is die doelwit gestel om 'n metode te ontwikkel om die hoë agtergrondwaardes uit te skakel. Die ontwikkeling van 'n nuwe massaspektrometriegebaseerde metode van CPT I-aktiwiteitsbepaling word in die volgende hoofstuk beskryf.

HOOFSTUK 4

CPT I-AKTIWITEITSBEPALING DEUR MIDDEL VAN ELEKTROSPROEI MASSASPEKTROMETRIE

4.1 Inleiding

Die moontlikheid van 'n alternatiewe metode vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit is, sover vasgestel kon word, nog nie voorheen ondersoek nie. In hierdie hoofstuk word 'n oorsig van die werking van elektrosproei massaspektrometrie gegee (Afdeling 4.3.1 - 4.3.2) sodat die motivering vir die toepassing van hierdie tegniek vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit duidelik is. Daarna word die standaardisering van 'n nuwe metode, naamlik deur die gebruik van elektrosproei massaspektrometrie (ES-MS), vir die kwantifisering van palmitoïelkarnitiese as funksie van CPT I-aktiwiteit, beskryf (Afdeling 4.3.3 - 4.3.5).

4.2 Voorbereiding van materiaal

Die kweking van fibroblaste en die bereiding van fibroblasthomogenate asook die isolering van leukosiete en die bereiding van leukosiehomogenate is op presies dieselfde wyse gedoen as vir die radio-isotoopgebaseerde metode soos in Afdeling 3.2 beskryf is. Fibroblaste en leukosiete van normale persone is grootliks as kontroles in die eksperimente gebruik. In fibroblast sellyne waar die moontlikheid van bepaalde defekte bestaan, is die algemene β -oksidase aktiwiteit bepaal soos beskryf deur Olpin *et al.* (1992). Die resultate word in Tabel 4.1 getoon en bewys dat die betrokke sellyne normale β -oksidase aktiwiteite besit en dus is CPT I-aktiwiteit ook normaal.

Tabel 4.1: β -Oksidasie-aktiwiteit van kontrole fibroblaste

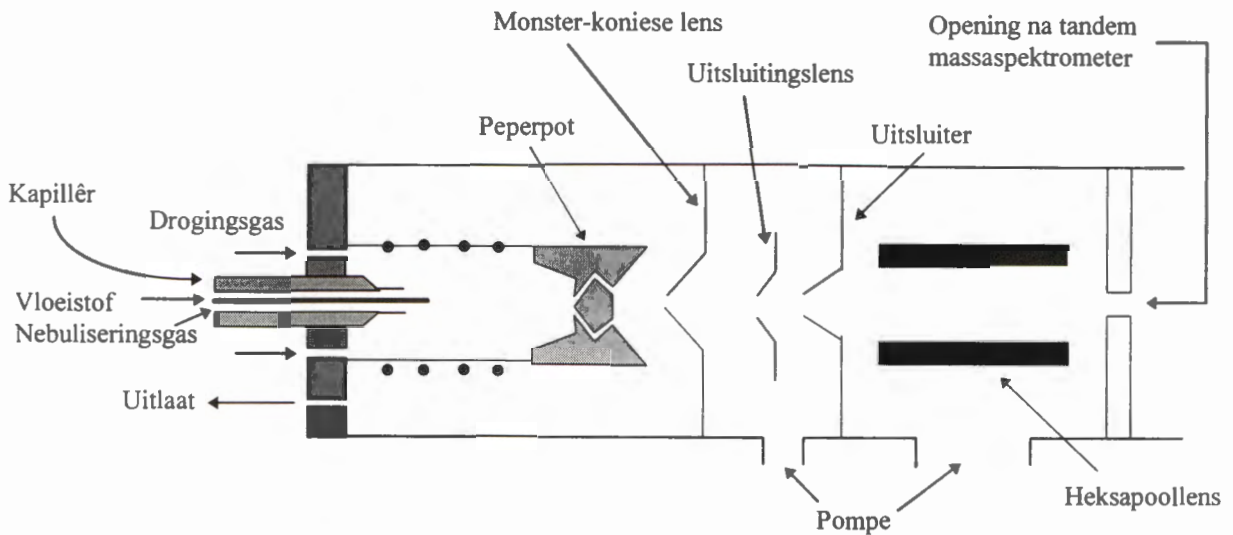
Sellyn	Miristiensuur (C ₁₄)	Palmitiensuur (C ₁₆)	C ₁₆ /C ₁₄
	Aktiwiteit (nmol.mg ⁻¹ .uur ⁻¹)		
FK19	2.76 ± 0.21	1.95 ± 0.44	0.71
FK20	3.62 ± 0.55	2.87 ± 0.23	0.79
FK21	4.84 ± 0.16	4.18 ± 0.36	0.86
Normaal (20) (Olpin <i>et al.</i> 1992)	4.1 ± 0.99 (2.25 - 6.55)	3.56 ± 0.78 (2.12 - 5.4)	0.87 (0.84 - 1.35)

4.3 Die ontwikkeling van 'n ES-MS-metode vir CPT I-aktiwiteitsbepaling

4.3.1 Elektrosproei tandem massaspektrometrie¹

Die funksie van 'n tandem massaspektrometer is om ione vanaf die gederivatiseerde verbindings in 'n monster te produseer. Daarna moet die voorgangerione volgens hul massas in die eerste analiseerder van die instrument uitgesoek en gefragmenteer word deur die ione te laat bots met argongas in die botsingsel om sodoende produksione te vorm. Die proses staan bekend as botsingsgeïnduseerde dissosiasie (CID) waarna die produksione volgens hul massas in die tweede analiseerder van die tandem instrument uitgesoek moet word. Die algehele proses staan bekend as MS-MS (massaspektrometrie-massaspektrometrie), wat 'n hoogs spesifieke manier van deteksie van spesifieke verbindings in 'n komplekse mengsel is. Een van die mees algemene analyses van gederivatiseerde monsters is die identifisering van al die molekulêre spesies wat afbreek om 'n gemeenskaplike fragmentioon te vorm en staan bekend as voorganger- of moederioonskandering. Tydens die analisering van byvoorbeeld die asielkarnitiene word die gemeenskaplike fragment met 'n massa van 85 Da, gebruik om inligting van al die gebuileerde asielkarnitiene wat in 'n mengsel teenwoordig is, te bekom.

¹ Alle inligting in verband met ES-MS is verkry uit die handleiding wat die apparaat vergesel.



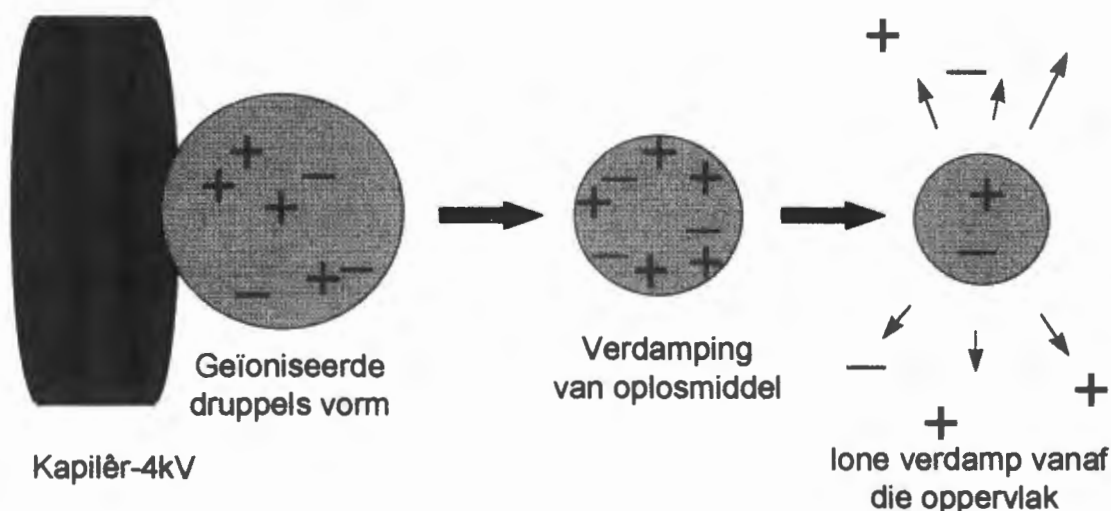
Figuur 4.1 'n Skematiese voorstelling van die elektrosproeibron (Handleiding van die apparaat)

4.3.2 Die beginsel van elektrosproeï massaspektrometrie

Elektrosproeï behels beide 'n vloeistof inlaatsisteem vir 'n massaspektrometer en terselfdertyd 'n ionisasiebron en uit die naam van hierdie tegniek kan afgelei word dat 'n elektriese veld gebruik word om 'n sproeï van baie fyn druppels te vorm. Soms is dit noodsaaklik om 'n massaspektrum van 'n verbinding wat in komplekse oplosmiddel is, te verkry. So 'n oplosmiddel kan nie direk deur die massaspektrometer beweeg nie, want in die hoë vakuum sal die vinnig verdampende oplosmiddel 'n groot druktoename meebring wat sal veroorsaak dat die instrument sy werking staak.

Die monsteroplossing beweeg deur 'n dun kapillêre buis met 'n hoë positiewe of negatiewe potensiaal oor die eindpunt van die kapillêr (in die omgewing van 3-5 kV) (Figuur 4.1). Rondom die kapillêr is 'n skede wat 'n vloei van stikstof nebuliseringsgas verby die vloeistofdruppel op die punt van die kapillêr rig. Dié hoë potensiaal veroorsaak 'n sterk elektriese veld wat saam met die nebuliseringsgas daartoe lei dat die vloeistof wat by die kapillêr se eindpunt verskyn, die kapillêr

druppels, wat 'n positiewe of negatiewe lading het, afhangende van die aangewende potensiaal, beweeg deur vier gaatjies in 'n vleklose staalblok, die peperpot, waarvan die wande effens verhit is om kondensasie te voorkom. Die druppels verdamp en word al kleiner as gevolg van die verdamping van die oplosmiddel. Om verdamping en die opbreek van ongewenste gegroepeerde ione aan te help, beweeg 'n drogingsgas (stikstof) deur die peperpot. Terselfdertyd, as gevolg van die oppervlakte van die druppels wat kleiner en kleiner word, verhoog die digtheid van die elektriese ladings op die oppervlak totdat 'n punt van onstabiliteit bereik word. Uiteindelik kom nie net neutrale oplosmiddel molekule nie, maar ook ione vry vanaf die oppervlak (Figuur 4.2).

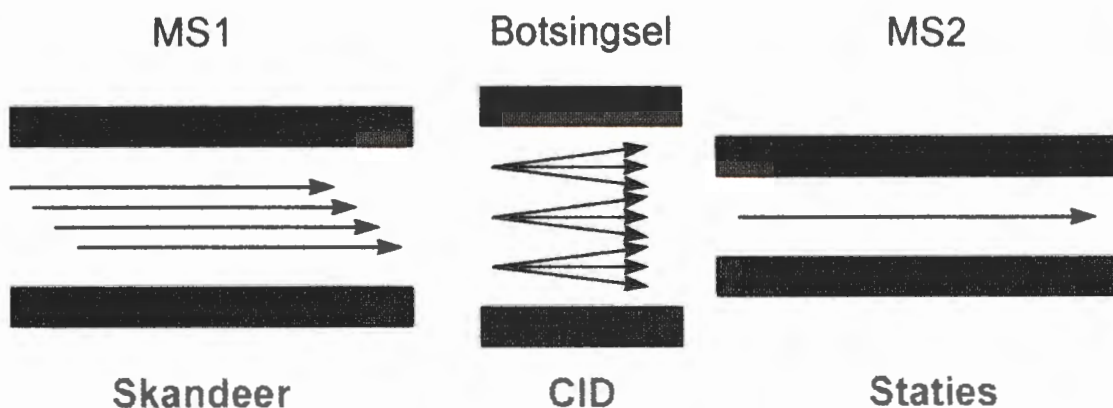


Figuur 4.2 Die proses van ionverdamping tydens elektrosprei ionisasie
'n Hoë potensiaal oor die kapillêr lei tot die vorming van geïoniseerde druppels. Verdamping van die oplosmiddel vind daarna plaas totdat ione vanaf die oppervlak verdamp.

Die ionisasie en verdamping van die oplosmiddel geskied by atmosferiese druk. Die gevormde ione beweeg deur 'n klein gaatjie na twee vakuum verdampingskamers via die monster-koniese lens en die uitsluitingslens, terwyl die oplosmiddelmolekules met die laer molekulêre massas afgepomp word. Die skeidingsproses tussen die monster- en oplosmiddelmolekules word hier verder verfyn en die ione word deur 'n

heksapool lens gefokusseer na die tandem massaspektrometer. 'n Voordeel van dié inlaat en ionbron is die groot hoeveelheid opbrengs vanaf die oorspronklike opgeloste monster en die produksie van gelaaië ione wat akkurate meting vergemaklik.

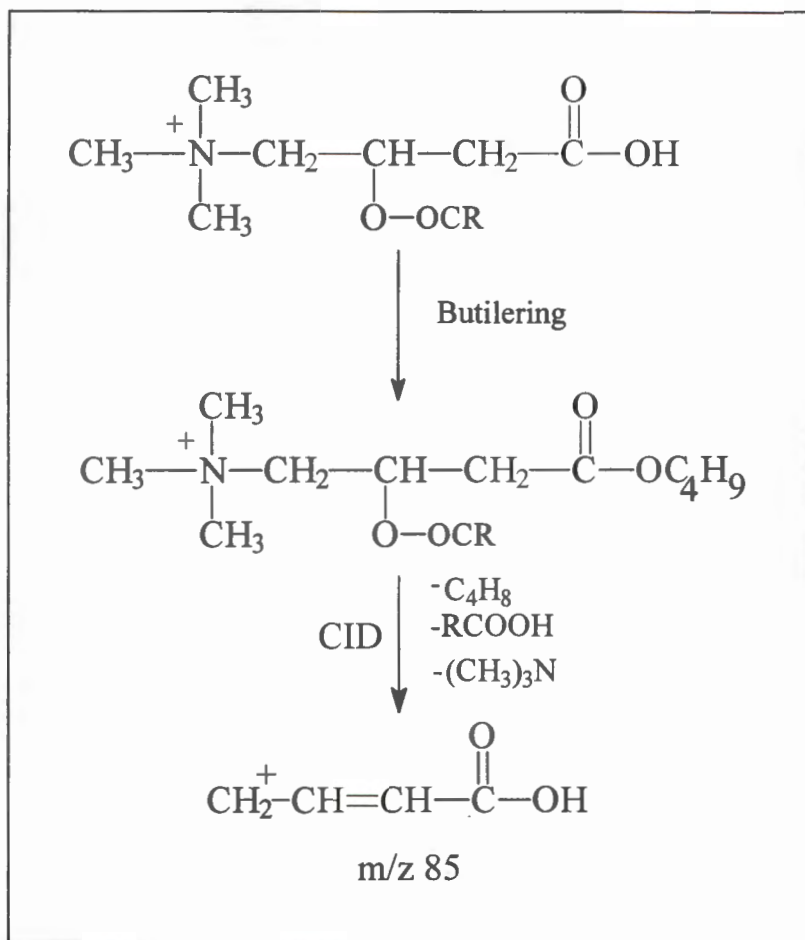
Die ione word geanaliseer op die beginsel van moederioonskandering (Figuur 4.3). Moederioonskandering is 'n manier van tandem massaspektrometrie (MS-MS) dataversameling wat gebruik word vir die identifisering en bevestiging van 'n bekende groep verbindings wat 'n gemeenskaplike dogterioon produseer wanneer fragmentasie plaasvind, hoewel die moederione verskillende massas kan hê. Die eerste massaspektrometer skandeer oor 'n massagebied wat die massas van al die moederione insluit. Elke keer as 'n ion deurbeweeg wat in die botsingsel fragmenteer om die karakteristieke dogterioon te vorm, sal dit in die tweede MS waargeneem word. Die massaspektrum wat so ontstaan is dié van die moederione. Die botsingsel is gevul met argon gas met 'n bepaalde druk en botsingsenergie wat die fragmentasie van die moederione tot gevolg het, 'n proses wat bekend staan as botsingsgeïnduseerde dissosiasie (CID). Die tweede massaspektrometer is staties sodat net die karakteristieke dogterione waargeneem word.



Figuur 4.3 Moederioonskandering deur middel van tandem massaspektrometrie (MS-MS)

MS1 skandeer oor 'n sekere massagebied, fragmentasie vind in die botsingsel plaas en MS2 is staties.

Tydens positiewe ion elektrospreei-ionisasie lei CID van die n-butielesters van asielkarnitiene tot die karakteristieke fragmentioon met 'n 85 massa-tot-lading verhouding (Figuur 4.4). Dit is in ooreenstemming met die massa van $^+\text{CH}_2\text{-CH=CH-COOH}$ as gevolg van die $(\text{CH}_3)_3\text{N}$, C_4H_8 en die asielgroep wat afgesplyt word. Moederioonskandering vir die 85 (m/z) fragment verskaf dus die asielkarnitiënprofile.



Figuur 4.4 Butilering en botsingsgeïnduseerde dissosiasie (CID) van die n-butielesters van asielkarnitiene
'n Karakteristieke 85 (m/z) fragment vorm. (R = asielgroep)

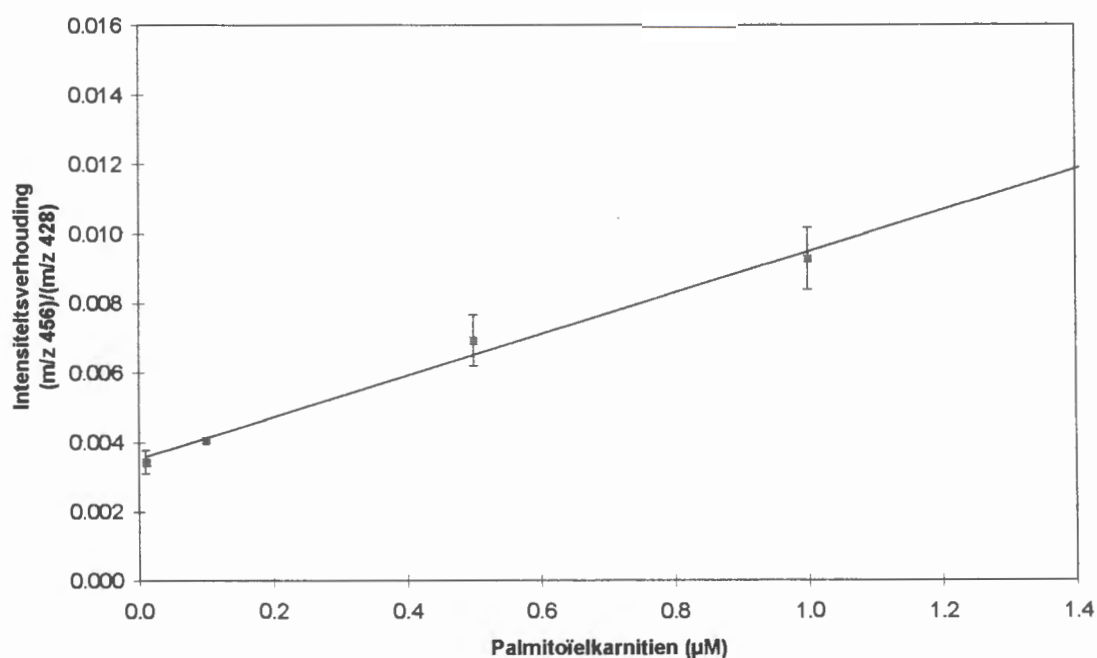
4.3.3 Metode

Dieselfde beginsel en reaksiekondisies vir 'n voorwaartse uitruilingsreaksie vir CPT I-aktiwiteitsbepaling, soos gebruik in die radio-isotoopgebaseerde metode (Demaugre *et*

al. 1988), is in hierdie geval gebruik, maar die tempo van palmitoïelkarnitienvorming vanaf L-karnitien en palmitoïel-KoA is gemeet deur van 'n ES-MS gebruik te maak. Die reaksiemengsel wat in hierdie studie gebruik is, is ook gebaseer op die werk van Demaugre *et al.* (1988) en is saamgestel in 550 µl wat bestaan het uit 115 mM tris (pH 7.4), 4.5 mM gereduseerde glutatioon, 70 mM KCl, 110 µM palmitoïel-koA, selhomogenaat (0.05 - 0.3 mg proteïen) en 1% vetsuurvrye beesserumalbumien (BSA) (m/v). Na 'n 5 min pre-inkubasieperiode by 30°C is die reaksie geïnisieer deur die byvoeging van 540 µM L-karnitien. In die proteïenafhanklikheidsreeks en die kontrole homogenate is 'n soortgelyke reaksiemengsel sonder selle as blanko gebruik en vir die tydafhanklikheidsreeks is dieselfde reaksiemengsel met 'n tydverloop van 0 minute as blanko gebruik. Die reaksie is by 30°C geïnkubeer en is daarna getermineer deur 1 ml koue 1.2 N HCl by die reaksiemengsel te voeg, soos beskryf deur McGarry *et al.* (1978). Tensy anders vermeld, is 10 µM miristoïelkarnitien by elke reaksiemengsel gevoeg vir kwantifiseringsdoeleindes. Hierdie konsentrasie is aanvanklik gekies aangesien dit goeie respons gelever het tydens die aanvanklike kondisies. 'n Butanolekstraksie van die gevormde palmitoïel-L-karnitien is uitgevoer volgens 'n aangepaste metode van Saggerson *et al.* (1982): 600 µl waterversadigde butanol is by 200 µl van die reaksiemengsel gevoeg en is vir 1 minuut deeglik gemeng (vortex). Die mengsel is hierna teen 1 000 x g vir 5 minute gesentrifugeer waarna die butanollaag afgetrek en 1 ml butanolversadigde water bygevoeg is. Hierna is die fases gemeng, gesentrifugeer en 400 µl van die butanollaag is onder stikstof gedroog. Tensy anders vermeld, is butilering van die monster uitgevoer deur 'n 20 minute inkubasie in 100 µl butanol/HCl (3:1) by 60°C. Na die butileringstap is dit weer eens gedroog en in 100 µl asetonitriël/water (1:1) (met 1% mieresuur) opgelos. 'n Volume van 15 µl is telkens in die elektrospoei-inlaat ingespuut en die teenwoordigheid van palmitoïel-L-karnitien en miristoïelkarnitien is bepaal met behulp van elektrospoei positiewe massaspektrometrie. Die kondisies word in Afdeling 4.3.4 uiteengesit. Die voorgestelde toets is net soos in die geval van die radio-isotoopgebaseerde metode geëvalueer ten opsigte van die proteïen- en tydafhanklike produk vorming deur CPT I (kyk Afdeling 3.3.2).

4.3.4 Kondisies vir die ES-MS meting van gevormde asielkarnitiene

Elektrosproei massaspektrometrie is uitgevoer met 'n VG Quattro II driedelige kwadrupool instrument (Micromass, U.K.). Die spanning oor die elektrosproei kapillêr was 3.2 kV, die keëlspanning was 28 V en die temperatuur van die bron was 70°C. Stikstof is gebruik as drogings- en nebuliseringsgas en die vloeitempo's van die drogings- en nebuliseringsgas was 350 L/h en 20 L/h onderskeidelik. Data is versamel deur middel van moederioonskandering. Botsingsgeïnduseerde dissosiasie (CID) met argongas in die botsingsel by 'n druk van 1.3×10^{-3} mbar en 'n botsingsenergie van 25 eV produseer karakteristieke en intense dogterione by m/z 85. 'n Standaardkurwe is verkry vir die kwantifisering van palmitoïelkarnitien deur van 'n vaste konsentrasie van 10 μM miristoïelkarnitien en verskeie konsentrasies van die natuurlike verbinding gebruik te maak (Figuur 4.5). Aangesien miristoïelkarnitien slegs twee koolstoflengtes korter as palmitoïelkarnitien is, stem sy chemiese en fisiese eienskappe baie ooreen met dié van die produk en sal ionisasie daarvan soortgelyk aan dié van die produk (palmitoïelkarnitien) wees. Hierdie eienskappe van miristoïelkarnitien maak die verbinding ideaal vir die gebruik as analoog om palmitoïelkarnitien te kan kwantifiseer.



Figuur 4.5 Die standaardkurwe van palmitoïelkarnitien met miristoïelkarnitien as analoog. 'n Vaste konsentrasie van 10 μM miristoïelkarnitien is gebruik en butilering is gedoen soos beskryf in Afdeling 4.3.3.

4.3.5 CPT I-aktiwiteitsbepaling in fibroblast- en leukosiethomogenate

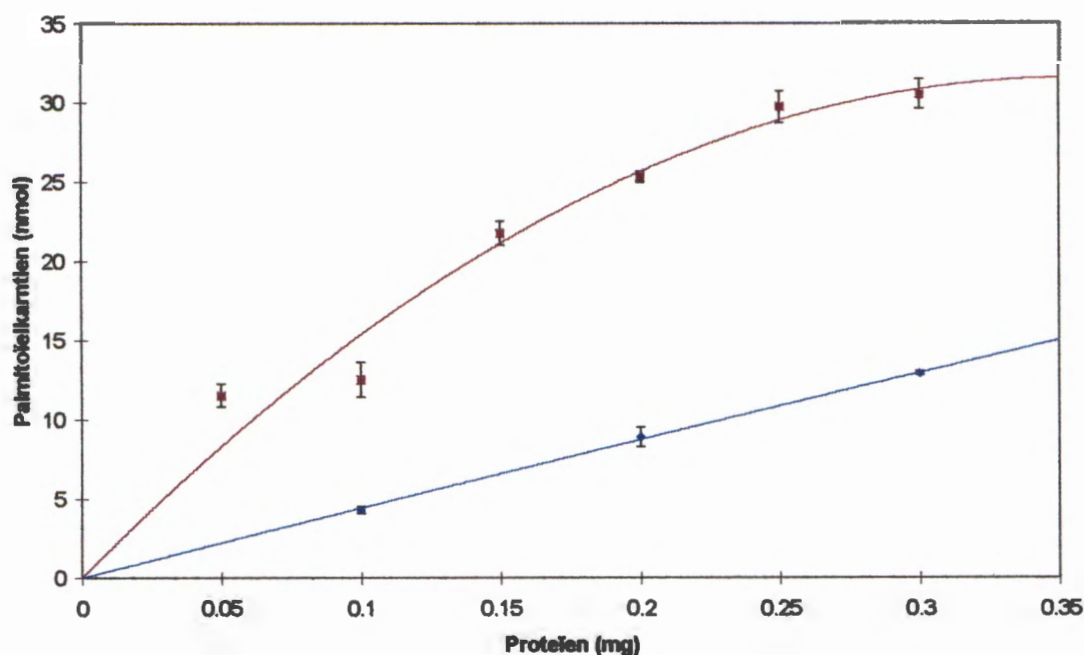
4.3.5.1 Proteïenafhanklike produkvorming deur CPT I

Vir die proteïenafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate is die reaksiemengsel saamgestel soos beskryf in Afdeling 4.3.3 en 'n reeks van 0 tot 0.3 mg proteïen is voorberei. Voordat die proteïenbepaling van die supernatant gedoen is, is die homogenate teen 1 000 x g gesentrifugeer om sodoende die definitiewe sedimentasie van die selmembrane te verseker. Mitochondria sedimenteer nie onder hierdie kondisies nie (Palmer, 1995). Die reaksie is toegelaat om vir 'n tydperk van 10 minute te verloop (McGarry *et al.* 1983) voordat dit getermineer is volgens McGarry *et al.* (1978). Die butanolekstraksie is gedoen soos beskryf in Afdeling 4.3.3. Die resultate wat verkry is deur die meting van die mate van omsetting van L-karnitien na palmitoïelkarnitien, word in Figuur 4.6 gegee.

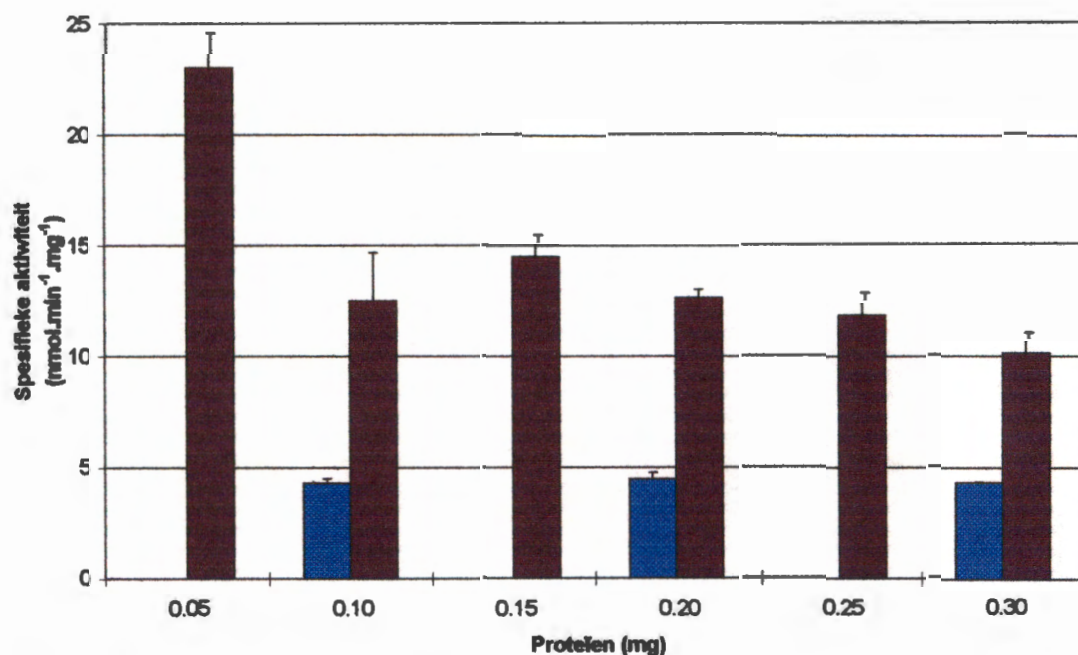
Die hoeveelheid gevormde palmitoïelkarnitien (nmol) is bereken uit die verhouding van die intensiteite van die gevormde palmitoïelkarnitien tot die analoog (miristoïelkarnitien), met behulp van 'n standaardkurwe (Figuur 4.5). Daarna is die spesifieke aktiwiteit van CPT I bereken deur die hoeveelheid gevormde palmitoïelkarnitien (nmol) deur die tydverloop (minute) en die hoeveelheid homogenaat (mg) te deel.

Hierdie resultate toon 'n toename in produkvorming met toenemende hoeveelhede selhomogenaat wat bygevoeg is. Die toename in produkvorming is nagenoeg liniêr in die teenwoordigheid van tot 0.15 en 0.2 mg proteïen, onderskeidelik, vir leukosiet- en fibroblasthomogenate (Figuur 4.6a). Produk vorming neem geleidelik toe in beide homogenate, maar neem stadiger toe by hoër proteïeninhoude en die hoeveelheid palmitoïelkarnitien wat na die betrokke inkubasieperiodes gevorm is, verskil in die omgewing van 17 nmol. Wanneer die produk vorming uitgedruk word as spesifieke aktiwiteit, is nagenoeg konstante aktiwiteite van $4.35 \pm 0.09 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ en $12.35 \pm 1.56 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ waargeneem in fibroblast- en leukosiethomogenate onderskeidelik, terwyl by 'n 0.05 mg proteïeninhoud verrassend hoë aktiwiteit in leukosiete waargeneem is (Figuur 4.6b).

(a)



(b)

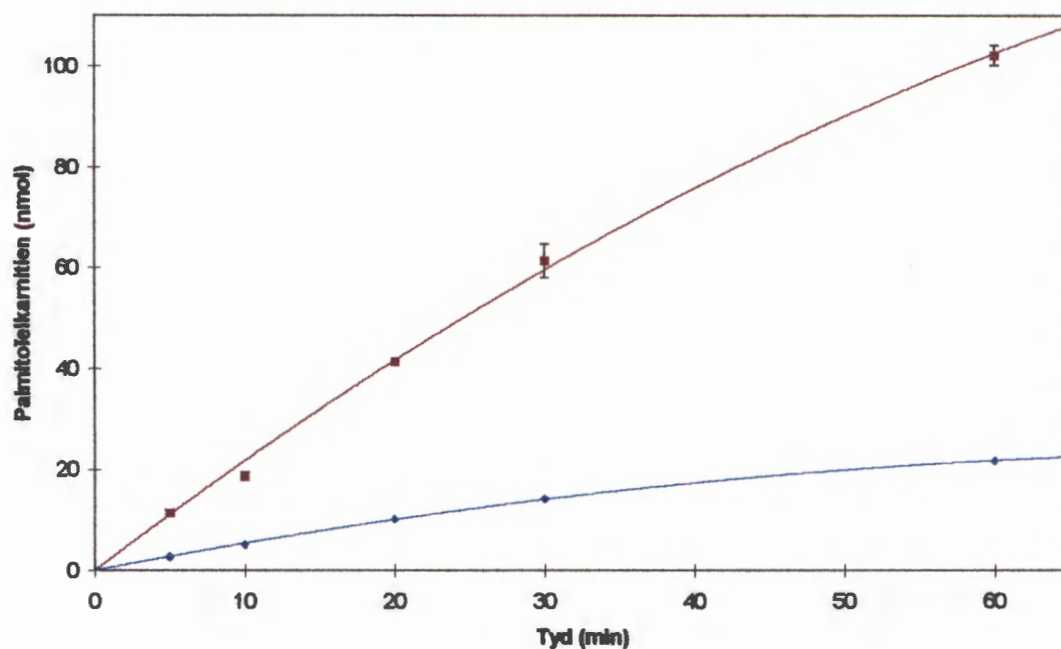


Figuur 4.6 Proteïenafhanklikheid van CPT I-aktiwiteitsbepaling

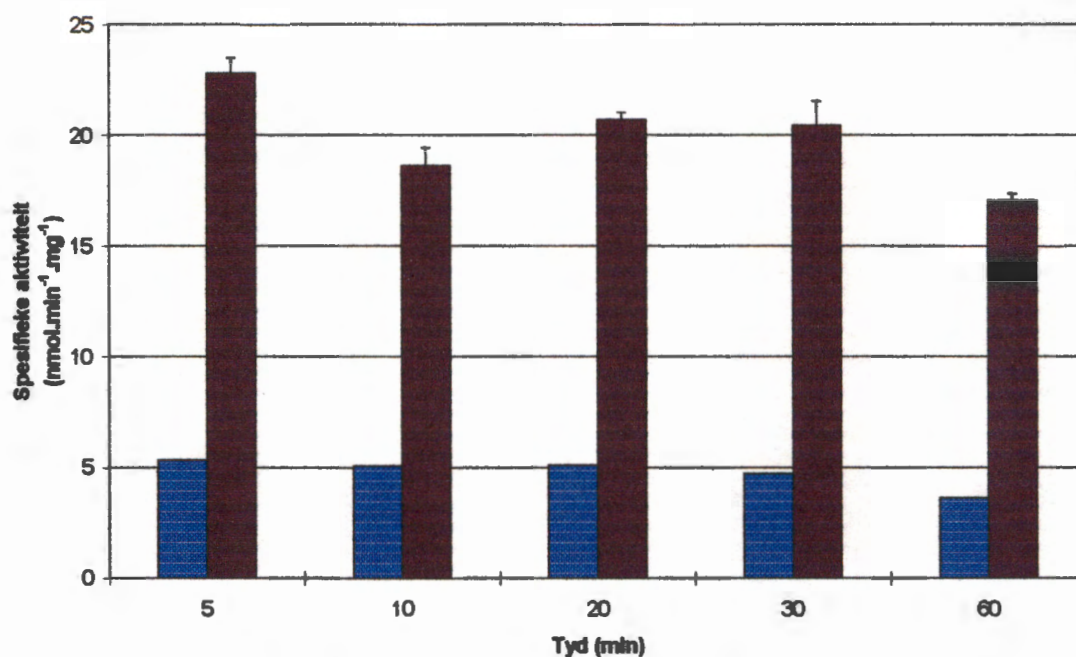
Die reaksiesmengsel is saamgestel en uitgevoer soos in Afdeling 4.3.3 beskryf, met 'n inkubasieperiode van 10 minute. 'n Reaksiesmengsel sonder selle is as blanko gebruik. Die verskillende monsterpunte is telkens in duplikaat gedoen. a: produk vorming teenoor proteïeninhoud. b: spesifieke aktiwiteit teenoor proteïeninhoud.

(♦ / ■ Fibroblaste; ■ / ■ Leukosiete)

(a)



(b)



Figuur 4.7 Tydafhanklikheid van CPT I-aktiwiteitsbepaling

Die reaksiemengsel is saamgestel en uitgevoer soos in Afdeling 4.3.3 beskryf, met 'n proteïeninhoud van 0.1 mg. 'n Reaksiemengsel met 'n tydverloop van 0 minute is as blanko gebruik. Die verskillende monsterpunte in die geval van die leukosietomogenaat is telkens in duplikaat uitgevoer, en een keer in die fibroblastomogenaat. a: produkvorming teenoor tyd b: spesifieke aktiwiteit teenoor tyd.

(♦ / ■ Fibroblaste; ■ / ■ Leukosiete)

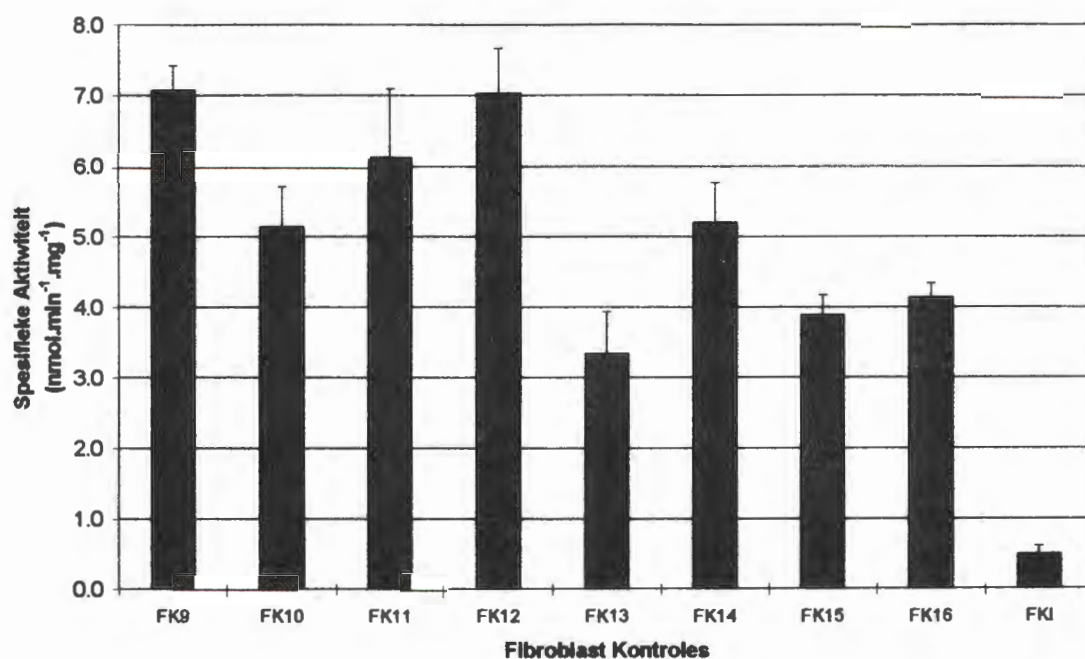
4.3.5.2 Tydafhanklike produk vorming deur CPT I

Vir die tydafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate is die reaksiemengsel saamgestel soos beskryf in Afdeling 4.3.3. 'n Proteïeninhoud van 0.1 mg is in elk van die reaksiemengsels gebruik, aangesien dit in die liniêre gebied van die reaksieverloop val en die tydafhanklikheidsreeks is saamgestel oor 'n totale inkubasieperiode van een uur met monsternamings na verskillende tydsintervalle. Die reaksie is getermineer en die butanolekstraksie gedoen soos beskryf in Afdeling 4.3.3. Die resultate wat verkry is deur die bepaling van die mate van omsetting van L-karnities na palmitoïelkarnities, word in Figuur 4.7 gegee. 'n Bykans liniêre toename in produk vorming oor die totale inkubasieperiode is waargeneem in fibroblast- en leukosiethomogenate. In die geval van die fibroblaste is egter vyf keer minder produk gevorm tydens 'n inkubasieperiode van een uur as in die geval van leukosiete (Figuur 4.7a). Uitgedruk as spesifieke aktiwiteit, word 'n afname in aktiwiteit in fibroblaste ($5.33 - 3.61 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) en leukosiete ($22.82 - 17.03 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) waargeneem (Figuur 4.7b), hoewel die spesifieke aktiwiteit in die geval van die fibroblasthomogenate vyf keer laer is as in die geval van die leukosiethomogenate.

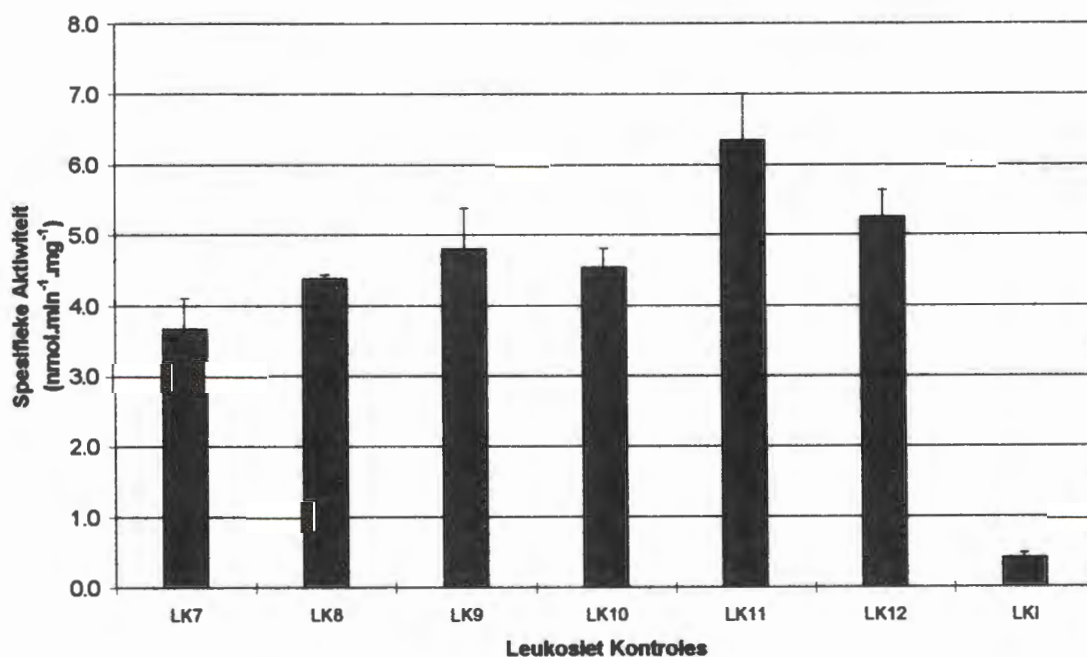
4.3.5.3 CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole homogenate

Tydens die CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate is 'n proteïeninhoud van 0.1 mg gebruik met 'n inkubasieperiode van 10 minute in die geval van fibroblasthomogenate en 20 minute in die geval van leukosiethomogenate. Hierdie betrokke proteïeninhoud en tydverloope is gebruik aangesien dit in die liniêre gebied van die reaksieverloop tydens die proteïen- en tydafhanklikheidsreeks, val. Die reaksiemengsel is saamgestel soos beskryf in Afdeling 4.3.3 en maloniel-KoA is bygevoeg as inhibeerder van CPT I. Die resultate van die spesifieke aktiwiteitsbepaling in fibroblast- en leukosiethomogenate word in Figuur 4.8a en Figuur 4.8b, onderskeidelik, gegee. 'n Gemiddelde spesifieke aktiwiteit van $5.243 \pm 1.414 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($n=8$) en $4.831 \pm 0.907 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($n=6$) is, onderskeidelik in die fibroblast- en leukosiethomogenate, waargeneem. Die waargenome CPT I-aktiwiteit in die geval van maloniel-KoA inhibisie was onderskeidelik $0.49 \pm 0.119 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($n=2$) en $0.41 \pm 0.078 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

(a)



(b)



Figuur 4.8 CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole homogenate

Die reaksiemengsel is saamgestel en uitgevoer soos in Afdeling 4.3.3 beskryf, met 'n proteïeninhoud van 0.1 mg en 'n 10 en 20 minute inkubasieperiode in fibroblast- (a) en leukosiet homogenate (b) onderskeidelik. 'n Reaksiemengsel sonder selle is as blanko gebruik. Die verskillende monsterpunte is telkens in duplikaat gedoen. FK en LK is die fibroblast- en leukosiet kontroles met 'n totaal van 8 en 6 kontroles onderskeidelik. FK1 en LK1 is onderskeidelik fibroblast- en leukosiet kontroles met 50 μ M maloniel-KoA as inhibeerder bygevoeg.

(n=2) in fibroblast- en leukosiethomogenate, wat 9.4% en 8.4% uitmaak van die gemiddelde CPT I-aktiwiteit waargeneem in dié homogenate. Agtergrondwaardes wat onderskeidelik 18.2% en 12.7% van die gemiddelde produkvorming in onderskeidelik kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate uitmaak, is waargeneem.

4.4 Resultaatbespreking

Die resultate wat verkry is met die gebruik van miristoïelkarnitiese as analoog, is in sekere opsigte moeilik interpreteerbaar. Die rede hiervoor is dat in beide die proteïen- en tydafhanklikheidsreeks 'n tendens van toenemende produkvorming met 'n toename in proteïeninhoud en tydverloop waargeneem is, maar, hoewel hierdie tendens waargeneem is en produkvorming meetbaar was, is groot verskille waargeneem in die hoeveelheid produk wat in beide homogenate van beide reekse gevorm is (Figuur 4.6a en 4.7a). Die spesifieke aktiwiteite in die fibroblasthomogenate was redelik konstant (Figuur 4.6b en 4.7b), maar steeds hoër as die aktiwiteite in die literatuur beskryf (Demaugre *et al.* 1988, 1991; Sadeh & Gutman, 1990; Haworth *et al.* 1992; Bergman *et al.* 1994; Schaefer *et al.* 1997). In leukosiete is ook redelik konstante spesifieke aktiwiteite waargeneem, maar hoër aktiwiteite as dié in fibroblasthomogenate is waargeneem. Hierdie relatief hoë spesifieke aktiwiteite in die leukosiethomogenate (Figuur 4.6b en 4.7b) en 'n relatief hoë aktiwiteit by 0.05 mg proteïen in die leukosiethomogenaat (Figuur 4.6b) is moeilik om te verklaar. 'n Bepaling van die CPT I-aktiwiteit in kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate het variasies in veral die fibroblasthomogenate opgelewer (Figuur 4.8a). Tog is waargeneem dat die gemiddelde spesifieke aktiwiteite in fibroblast- en leukosiethomogenate, hoewel hoog in vergelyking met CPT I-aktiwiteite wat in die literatuur weergegee is, in dieselfde orde grootte is.

Die feit dat 'n tendens waarneembaar is tydens proteïen- en tydafhanklike produkvorming deur CPT I en verder dat kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate redelik konstante spesifieke aktiwiteite toon, dui daarop dat dit moontlik is om ES-MS te gebruik vir CPT I-aktiwiteitsbepaling. Die waargenome variasies en uitermatig hoë aktiwiteite in leukosiethomogenate dwing ons egter om die metingsproses te evalueer en kwantifisering te verbeter om sodoende aktiwiteitsbepalings se akkuraatheid te

verseker. Tydens die evaluering van die intensiteite van die onderskeie pieke wat verkry is, is vanuit die massaspektra van die miristoïelkarnitien en die palmitoïelkarnitien waargeneem dat die analoog as gevolg van die konsentrasie (10 μ M), die gevormde produk oorskadu. Dit het tot gevolg gehad dat 'n enorme deel van die ionisasie van die molekules aan die analoog (miristoïelkarnitien) toegedeel word en die mate van ionisasie tussen die analoog en palmitoïelkarnitien gevolglik nie vergelykbaar is nie. Derhalwe is die apparaat se sensitiwiteit nie optimaal vir die kwantifisering van palmitoïelkarnitien nie en verder is daar geringe verskille in die struktuur van miristoïelkarnitien en palmitoïelkarnitien wat variasies in ionisasie kan meebring. Sekere veranderinge in die eksperimentele opstelling is oorweeg wat vervolgens beskryf word.

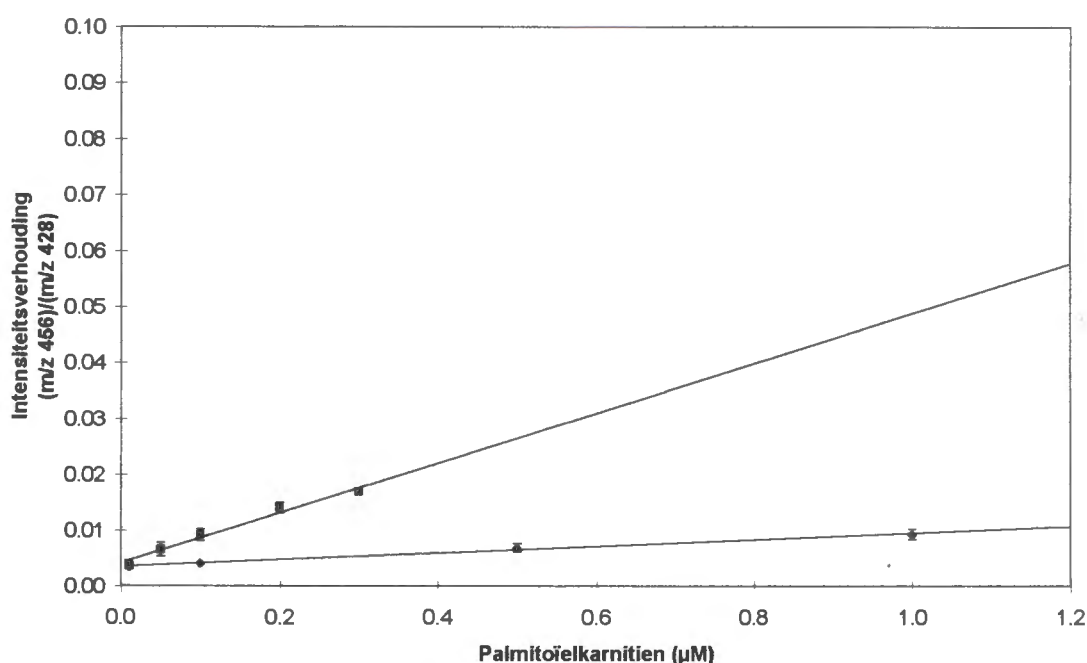
4.5 Wysiging van die metode vir die bepaling van palmitoïelkarnitien deur middel van ES-MS

Na persoonlike mededeling deur Dr. Michael Morris² is 'n nuwe butileringsmetode, waar van gedroogde n-butanol (oor 'n 0.3 nm molekulêre sif gedehidreerd gehou) en asetielchloried gebruik gemaak word, ondersoek. Verder is [16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitien deur die loop van die eksperimente tot ons beskikking gestel om as stabiele isotoop te gebruik, aangesien hierdie verbinding se chemiese en fisiese eienskappe baie meer as miristoïelkarnitien ooreenstem met dié van palmitoïelkarnitien. In die ontwerp van 'n sensitiewer metingsproses is die gebruik van hierdie alternatiewe, swaargemerkte analoog teen 'n laer konsentrasie en ook die gewysigde butileringsmetode ondersoek.

Om die effektiwiteit van die nuwe butileringsmetode te ondersoek is 'n standaardkurwe, waar van 'n vaste konsentrasie van 10 μ M miristoïelkarnitien en variërende konsentrasies palmitoïelkarnitien gebruik is, saamgestel. Die gedroogde monsters is vir 15 minute by 70°C gebutileer met 100 μ l gedroogde n-butanol en 10 μ l asetielchloried en die resultate is vergelyk met dié van die butileringsmetode beskryf in Afdeling 4.3.3 (Figuur 4.9). Die oorspronklike butileringsmetode (beskryf in Afdeling

² Micromass, Tudorstraat, Altrincham, Cheshire WA 14 5RZ, Engeland.

4.3.3) het gedeeltelike hidrolise van die asielkarnitiene tot gevolg en die gebruik van gedroogde n-butanol en asetielchloried is baie meer effektief aangesien die butileringsreagens gedehidreerd gehou word deur die 0.3 nm molekulêre sif. Uit Figuur 4.9 is dit duidelik waarneembaar dat minder palmitoïelkarnitien hidroliseer met die gebruik van die gewysigde butileringsmetode aangesien die verhouding van palmitoïelkarnitien tot die analoog baie groter is vir elke vasgestelde palmitoïelkarnitien konsentrasie. Dit het dus tot gevolg dat akkurater kwantifisering moontlik is met die gewysigde butileringsmetode.

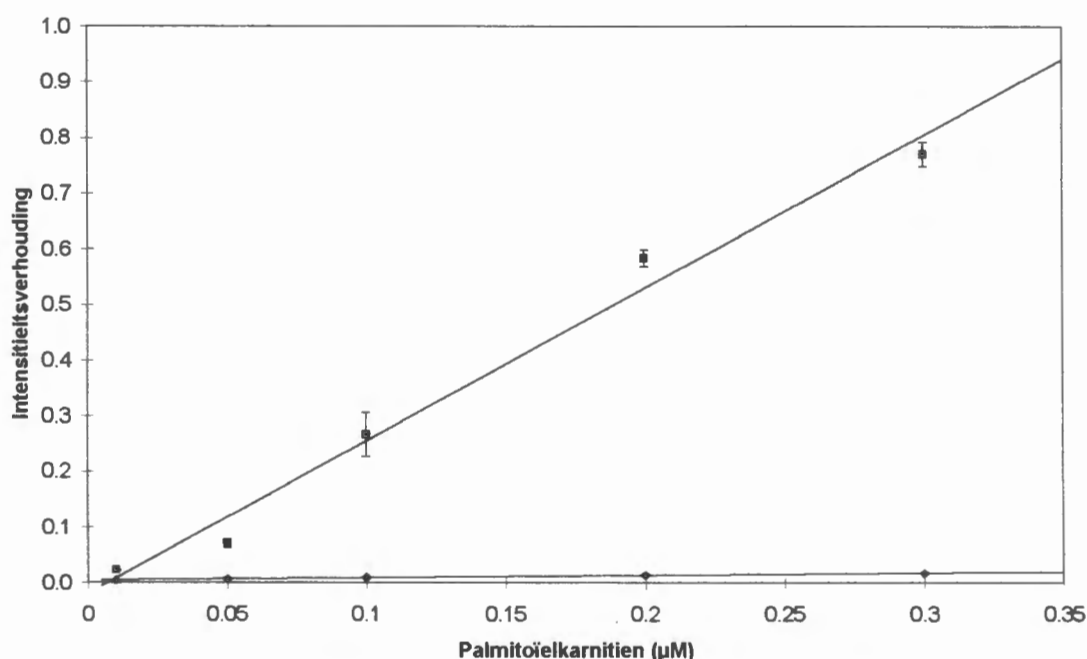


Figuur 4.9 Die standaardkurwe van palmitoïelkarnitien en miristoïelkarnitien, as analoog.

'n Vaste konsentrasie van 10 μM miristoïelkarnitien is gebruik en butilering is gedoen met 100 μl butanol-HCl (♦) en 100 μl gedroogde n-butanol en 10 μl asetielchloried (■)

Vervolgens is 'n standaardkurwe opgestel met 'n vaste konsentrasie van 0.2 μM [16, 16, 16-d₃]palmitoïelkarnitien en variërende konsentrasies palmitoïelkarnitien wat volgens die nuwe metode gebutileer is (Figuur 4.10). Hierdie standaardkurwe toon 'n liniêre lyn van 'n konsentrasie van 0.01 μM tot 0.30 μM palmitoïelkarnitien relatief tot 'n vaste [16, 16, 16-d₃]palmitoïelkarnitienkonsentrasie van 0.2 μM. Wanneer dié standaardkurwe vergelyk word met dié waar 'n konsentrasie van 10 μM miristoïelkarnitien as analoog by elke monster gevoeg is, is dit duidelik dat die

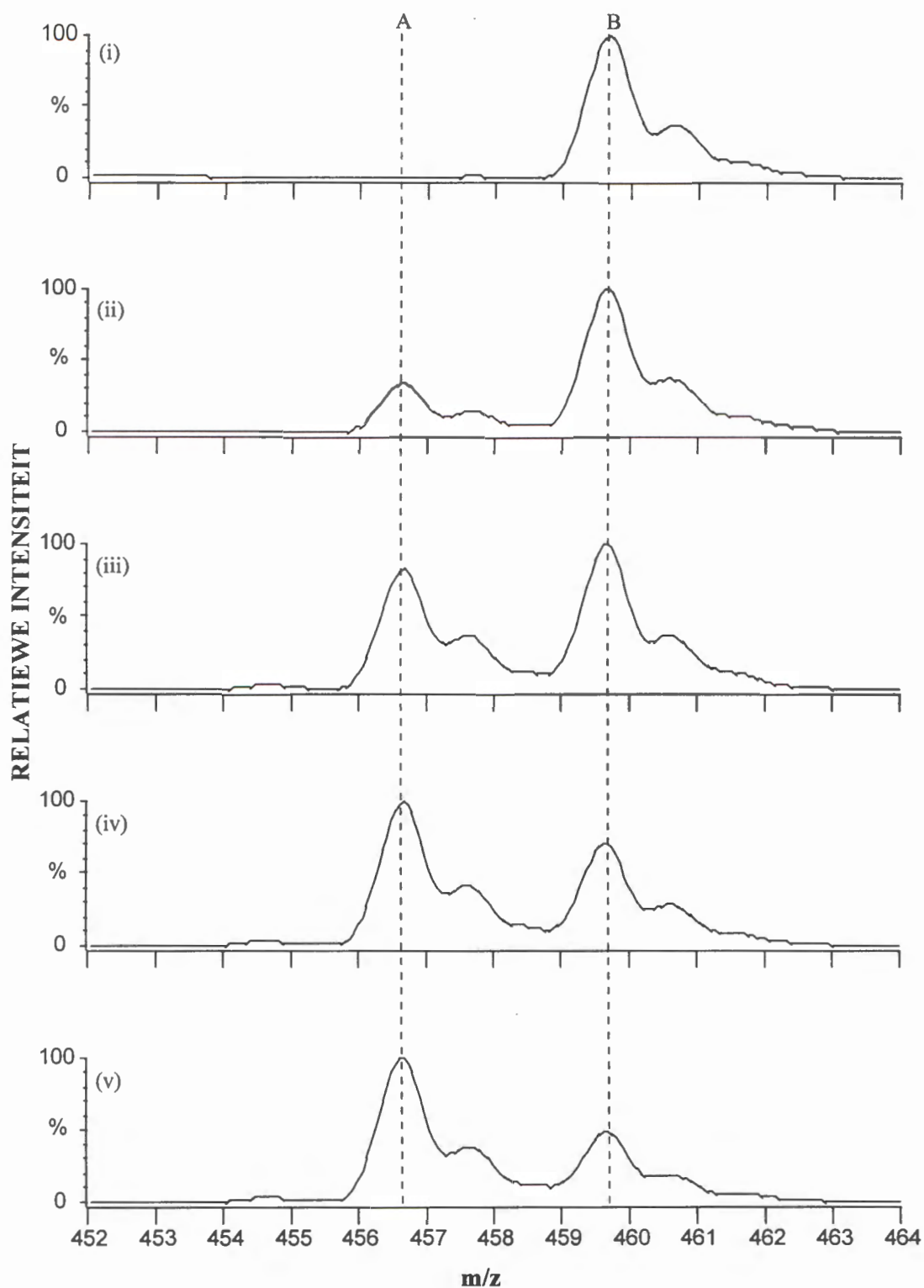
analoog nie meer die palmitoïelkarnitien piek, oorskadu nie (Figuur 4.10). Die konsentrasies van die verbindings is nou in dieselfde orde grootte, wat kwantifisering baie akkurater maak. 'n Verdere voordeel van die gebruik van [16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitien as swaargemerkte analoog, is dat sy fisiese en chemiese eienskappe presies ooreenstem met dié van die produk, waar miristoïelkarnitien twee koolstofkettings korter is. Dus sal die ionisasie van [16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitien en palmitoïelkarnitien ooreenstem en die deteksielimiet van die apparaat sal deur die stabiele isotoop versadig word. Dit lei tot hoër sensitiwiteit vir die waarneming van die produk en dus sal laer konsentrasies van die produk meetbaar wees.



Figuur 4.10 Die standaardkurwe van palmitoïelkarnitien met [16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitien en miristoïelkarnitien, onderskeidelik as analoë.

'n Vaste konsentrasie van 10 μ M miristoïelkarnitien ($\blacklozenge$) en 0.2 μ M [16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitien ($\blacksquare$) is onderskeidelik gebruik. Butilering is gedoen met 100 μ l gedroogde n-butanol en 10 μ l asetiëchloried.

Die gebutileerde derivate van palmitoïelkarnitien en [16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitien is onderskeidelik by m/z 456.73 en m/z 459.73 deur middel van die massaspektrometer gemonitor. Spektre van die ES-MS analise van die gebutileerde derivate van palmitoïelkarnitien en [16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitien by verskillende tydsintervalle word in Figuur 4.11 gegee. Die progressiewe toename in die omskakeling van



Figuur 4.11 ES-MS analise van palmitoïelkarnitienvorming

Produkvorming is gemeet deur moederioonskandering vir fragment 85 van die gebutileerde derivate van (A) palmitoïelkarnitien (m/z 456.73) en (B) [16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitien (m/z 459.73) by tydsintervalle van (i) 0; (ii) 5; (iii) 10; (iv) 20 en (v) 30 minute.

Palmitoïel-KoA na palmitoïelkarnitien is duidelik waarneembaar met die meting van die produk en die stabiele isotoop van palmitoïelkarnitien. Uit hierdie resultate kan die afwesigheid van palmitoïelkarnitien by 'n tydverloop van 0 minute (Figuur 4.11 (i)) en die progressiewe toename in produkvorming na tydsintervalle van onderskeidelik 5, 10, 20 en 30 minute (Figuur 4.11 (ii) tot (v)), duidelik waargeneem word. Hierdie gewysigde metingsmetode is dus meer geskik as die oorspronklike metode wat beskryf is vir die meting van CPT I-aktiwiteit. Gevolglik is die CPT I-aktiwiteit in die res van die eksperimente volgens hierdie metode uitgevoer.

4.6 Die gebruik van 'n verbeterde ES-MS metode vir CPT I-aktiwiteitsbepaling.

4.6.1 Metode

'n Soortgelyke reaksiemengselsamestelling as dié beskryf in Afdeling 4.3.3 is gebruik vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit deur gebruik te maak van die verbeterde ES-MS metode. Alle homogenate is na sonisering teen 1 000 x g gesentrifugeer en CPT I-aktiwiteit weer eens geëvalueer ten opsigte van die proteïen- en tydafhanklike produkvorming. Die reaksiemengsel is saamgestel in 'n 400 µl reaksievolume en al die reaksies is vir 20 minute by 30°C geïnkubeer, tensy anders vermeld. In die proteïenafhanklikheidsreeks en kontrole CPT I-aktiwiteitsbepalings is 'n soortgelyke reaksiemengsel sonder palmitoïel-KoA as blanko gebruik en in die tydafhanklikheidsreeks is dieselfde reaksiemengsel met 'n tydverloop van 0 minute as blanko gebruik. [16, 16, 16-d₃]palmitoïelkarnitien (0.2 µM) is as stabiele isotoop by elke reaksiemengsel gevoeg na verloop van die reaksie, waarna die butanolekstraksie gedoen is soos in Afdeling 4.3.3 beskryf. Butilering van die gedroogde monsters is uitgevoer deur 100 µl gedroogde n-butanol en 10 µl asetielchloried by te voeg en vir 15 minute by 60°C te inkubeer. 'n Soortgelyke standaardkurwe soos dié van Figuur 4.10 is gebruik om die gevormde palmitoïelkarnitien te kwantifiseer.

4.6.2 Kondisies vir die ES-MS meting van gevormde palmitoïelkarnitien

Die kondisies vir die ES-MS meting van gevormde palmitoïelkarnitien met die VG Quattro II drieledige kwadрупool-instrument was dieselfde as dié beskryf in Afdeling 4.3.4. Slegs die manier van dataversameling is aangepas om meer kontinue meting van elke verbinding te verseker. Waar die instrument in die vorige metode wisselend geskandeer het deur verskillende skandeerfunksies in verskillende massa-tot-lading gebiede toe te pas, het hierdie metode die voordeel dat kontinuu oor 'n baie klein massagebied geskandeer word (m/z 450 - 465).

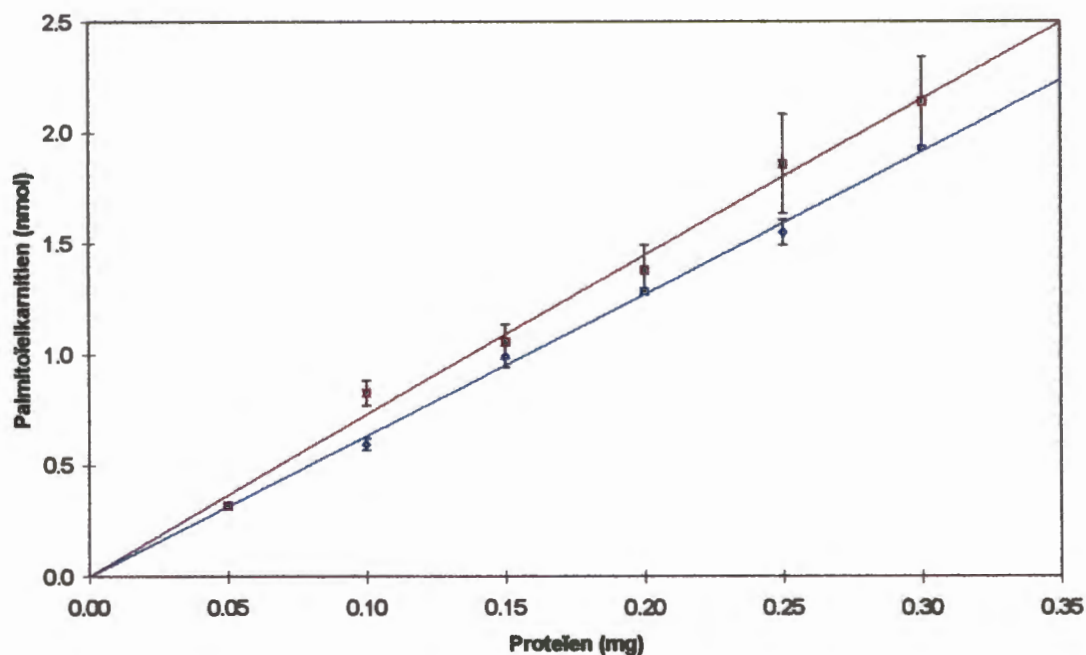
4.6.3 CPT I-aktiwiteitsbepaling in fibroblast- en leukosiethomogenate

4.6.3.1 Proteïenafhanklike produkvorming deur CPT I

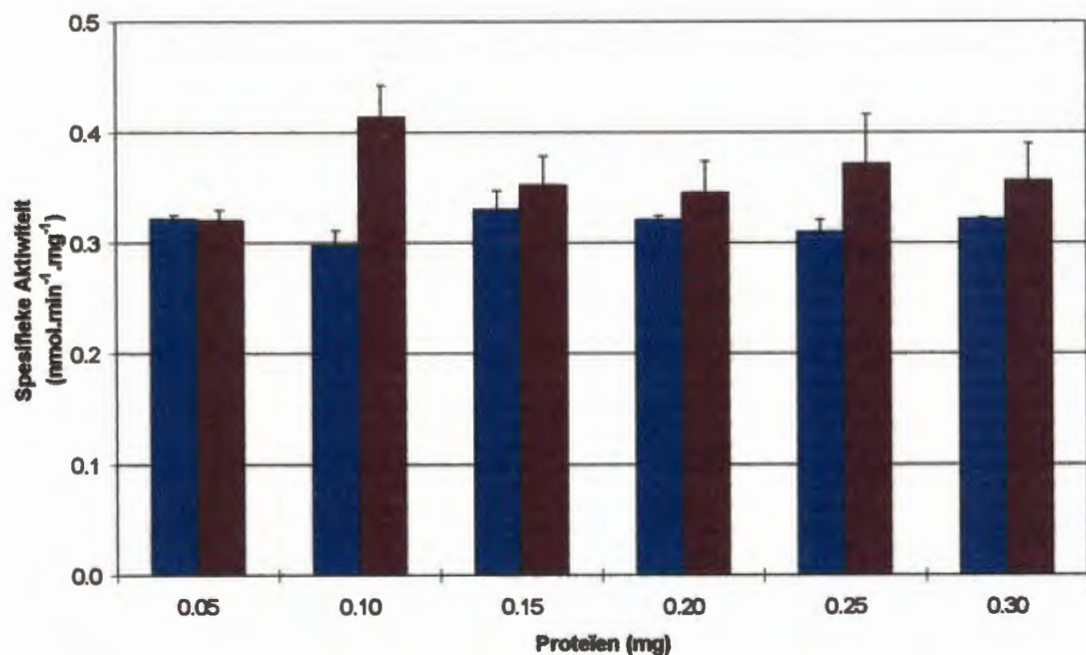
Vir die proteïenafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate is die reaksiemengsel saamgestel soos beskryf in Afdeling 4.5.1 en 'n reeks van 0 tot 0.3 mg proteïen is saamgestel en die reaksie is toegelaat om vir 'n tydperk van 20 minute te verloop. Die resultate wat verkry is met die gebruik van hierdie gewysigde metode word in Figuur 4.12a en 4.12b gegee. Hierdie resultate toon 'n bykans liniêre toename in produkvorming in fibroblaste en leukosiete met toenemende hoeveelhede selhomogenaat wat bygevoeg is (Figuur 4.12a). Die hoeveelheid produk gevorm met die leukosiethomogenaat is effens meer as die hoeveelheid in die geval van fibroblasthomogenaat.

Die hoeveelheid gevormde palmitoïelkarnitien (nmol) is bereken uit die verhouding van die intensiteite van die gevormde palmitoïelkarnitien tot die sy swaargemerkte analoog ([16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitien), met behulp van 'n standaardkurwe (Figuur 4.10). Daarna is die spesifieke aktiwiteit van CPT I bereken deur die hoeveelheid gevormde palmitoïelkarnitien (nmol) deur die tydverloop (minute) en die hoeveelheid homogenaat (mg) te deel.

(a)



(b)



Figuur 4.12 Proteïenafhanklikheid van CPT I-aktiwiteitsbepaling

Die reaksiemengsel is saamgestel soos in Afdeling 4.5.1 met 'n inkubasieperiode van 20 minute. 'n Reaksiemengsel sonder palmitoïel-KoA is as blanko gebruik. Die verskillende monsterpunte is telkens in duplikaat gedoen. a: produkvorming teenoor proteïeninhoud. b: spesifieke aktiwiteit teenoor proteïeninhoud.

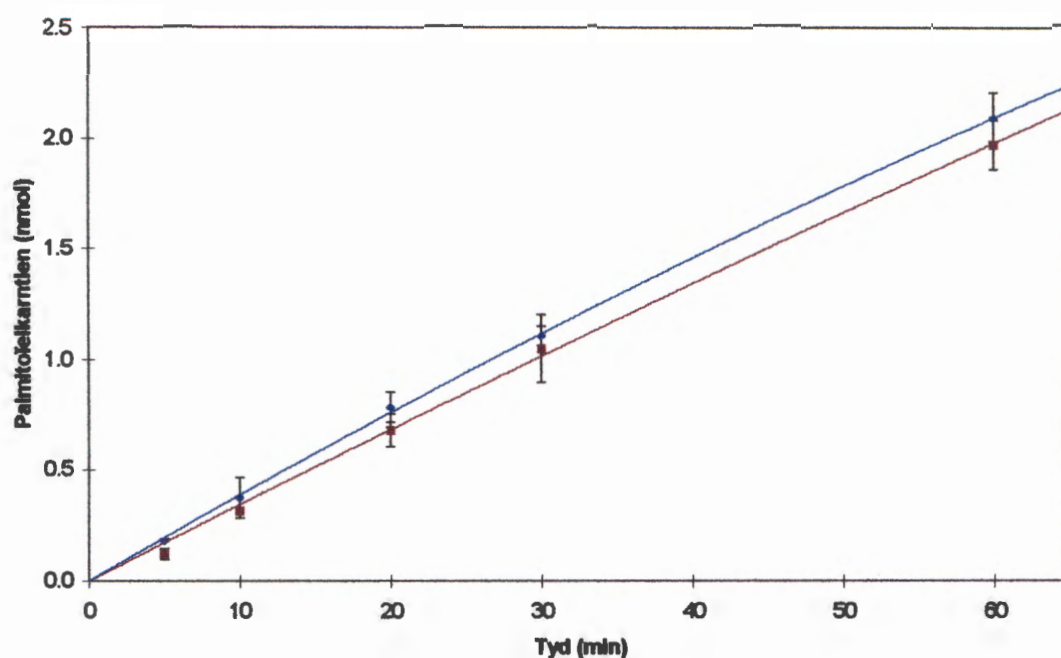
(♦ / ■ Fibroblaste; ■ / ■ Leukosiete)

Wanneer die produk vorming uitgedruk word as spesifieke aktiwiteit, is redelik konstante aktiwiteite van $0.317 \pm 0.006 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ en $0.360 \pm 0.012 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ waargeneem in onderskeidelik fibroblast- en leukosiethomogenate, hoewel effens hoër aktiwiteit met leukosiethomogenate waargeneem is (Figuur 4.12b). Baie lae agtergrondwaardes, wat 2.4% en 1.6% van die hoeveelheid produk vorming (nmol) by 0.1 mg proteïene uitgemaak het, is onderskeidelik in die fibroblast- en leukosiethomogenate waargeneem.

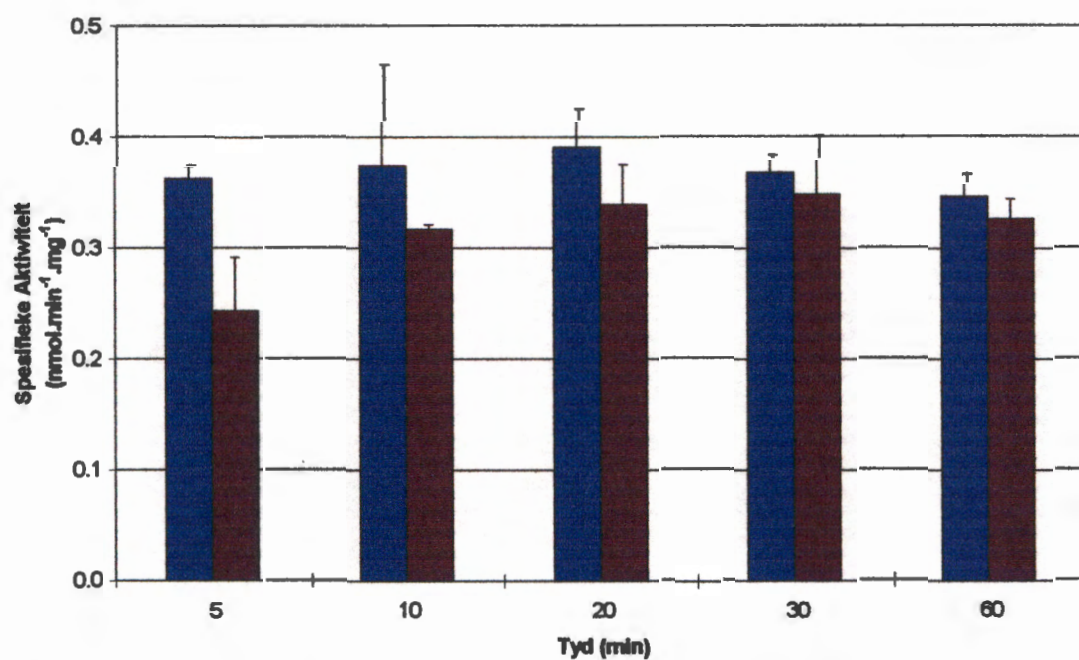
4.6.3.2 Tydafhanklike produk vorming deur CPT I

Vir die tydafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate is die reaksiemengsel saamgestel soos in Afdeling 4.5.1 beskryf. 'n Proteïeninhoud van 0.1 mg is in elk van die reaksiemengsels gebruik, aangesien dit in die liniêre gebied van die reaksieverloop val en die tydafhanklikheidsreeks is uitgevoer oor 'n totale inkubasieperiode van een uur met monstername na verskillende tydsintervalle. Die resultate wat verkry is deur die meting van die mate van omsetting van L-karnities na palmitoïelkarnities met behulp van hierdie gewysigde metode word in Figuur 4.13a en 4.13b gegee. 'n Soortgelyke tendens van 'n bykans liniêre toename in produk vorming is waargeneem met beide die fibroblast- en leukosiethomogenate (Figuur 4.13a), met 'n effens hoër produk vorming met fibroblasthomogenate. Uit die tydafhanklikheidsreeks, uitgedruk as spesifieke aktiwiteit (Figuur 4.13b), is redelik konstante aktiwiteite waargeneem in die fibroblasthomogenate ($0.369 \pm 0.016 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) en 'n effense toename in aktiwiteit tot en met 30 minute, met 'n gemiddeld van $0.315 \pm 0.020 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ in die leukosiethomogenate. Weer eens is baie lae agtergrondwaardes wat onderskeidelik 1.4% en 4.3% van die hoeveelheid produk vorming (nmol) na 'n tydverloop van 20 minute in fibroblast- en leukosiethomogenate uitmaak, waargeneem. Uit Figuur 4.11 blyk dit duidelik dat die hoeveelheid palmitoïelkarnities weglaatbaar is in die blanko en dat die agtergrondwaarde dus 'n baie geringe persentasie van die gevormde palmitoïelkarnities uitmaak.

(a)



(b)

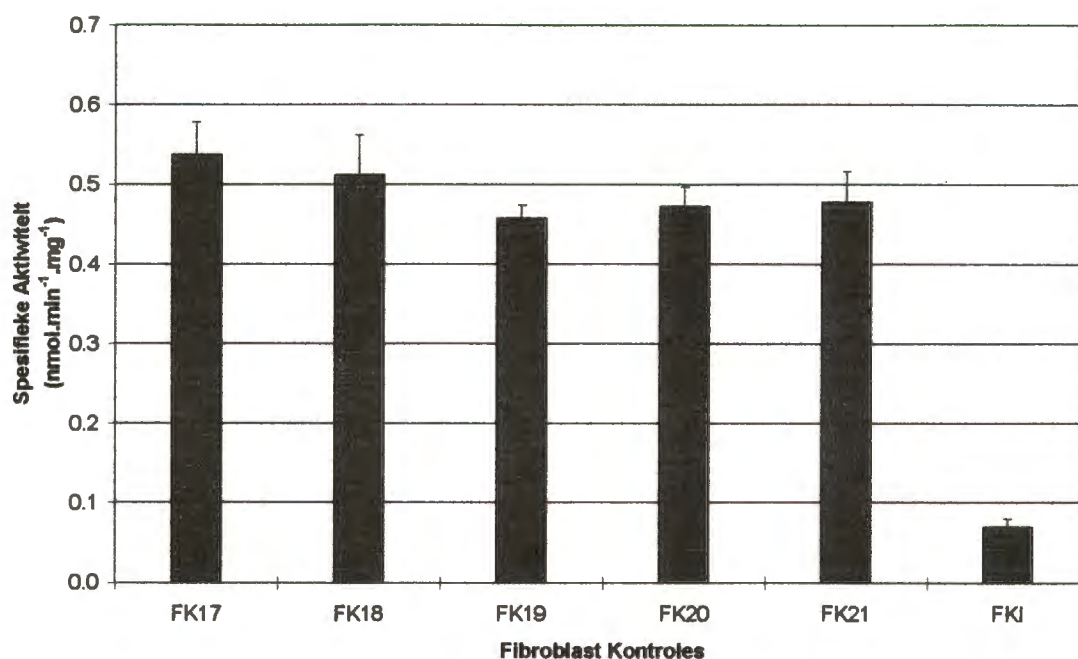


Figuur 4.13 Tydafhanklikheid van CPT I-aktiwiteitsbepaling

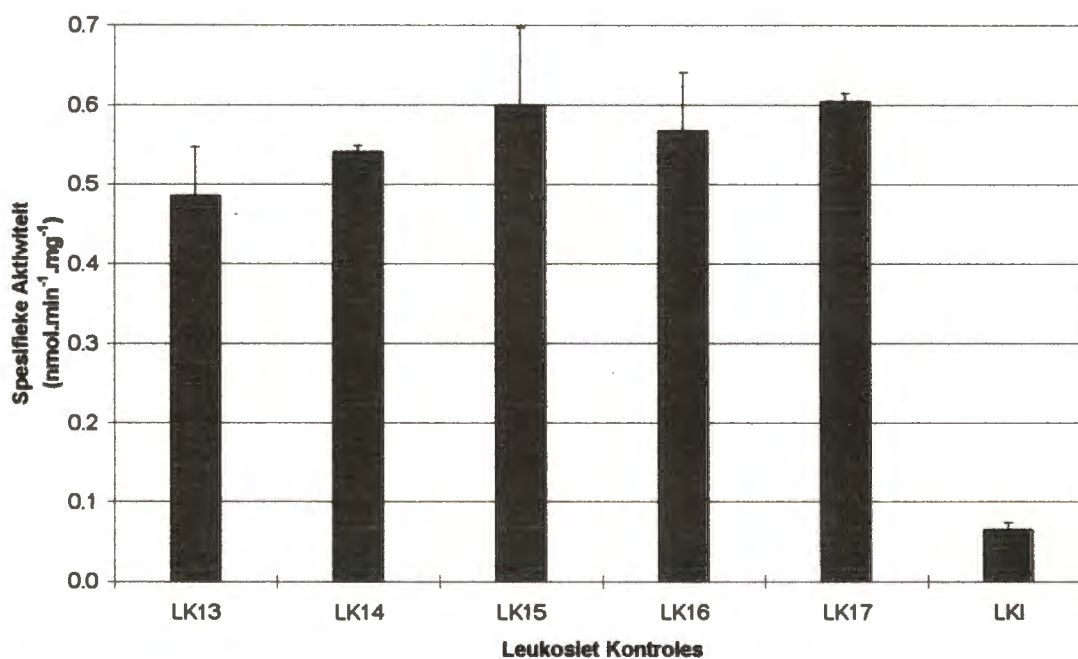
Die reaksiemengsel is saamgestel soos in Afdeling 4.5.1 met 'n proteïeninhoud van 0.1 mg. 'n Reaksiemengsel met 'n tydverloop van 0 minute is as blanko gebruik. Die verskillende monsterpunte is telkens in duplikaat gedoen. a: produkvorming teenoor tyd b: spesifieke aktiwiteit teenoor tyd.

(♦ / ■ Fibroblaste; ■ / ■ Leukosiete)

(a)



(b)



Figuur 4.14 CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole homogenate

Die reaksiemengsel is saamgestel soos in Afdeling 4.5.1 met 'n proteïeninhoud van 0.1 mg en 'n 20 minute inkubasieperiode in fibroblast- (a) en leukosiet homogenate (b). 'n Reaksiemengsel sonder palmitoïel-KoA is as blanko gebruik. Die verskillende monsterpunte is telkens in duplikaat gedoen. FK en LK is die fibroblast- en leukosiet kontroles onderskeidelik, met 'n totaal van 5 kontroles in beide homogenate. FKI en LKI is onderskeidelik fibroblast- en leukosiet kontroles met 50 μ M maloniel-KoA as inhibeerder bygevoeg.

4.6.3.3 CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole homogenate

Tydens CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate is 'n proteïeninhoud van 0.1 mg gebruik, met 'n inkubasieperiode van 20 minute wat beide in die liniêre gebied van die reaksieverloop val. Die reaksiemengsel is saamgestel soos beskryf in Afdeling 4.5.1 en maloniel-KoA is bygevoeg as inhibeerder van CPT I. Die resultate van die spesifieke aktiwiteitsbepaling in onderskeidelik kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate word in Figuur 4.14a en Figuur 4.14b, gegee. 'n Gemiddelde spesifieke aktiwiteit van $0.492 \pm 0.041 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (n=5) en $0.560 \pm 0.065 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (n=5) is onderskeidelik, in die fibroblast- en leukosiethomogenate waargeneem. Die waargenome CPT I-aktiwiteit in die geval van maloniel-KoA inhibisie is onderskeidelik $0.070 \pm 0.010 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (n=2) en $0.065 \pm 0.009 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (n=2) in fibroblast- en leukosiethomogenate, onderskeidelik, wat 14.2% en 11.6% uitmaak van die gemiddelde CPT I-aktiwiteit waargeneem in hierdie homogenate. Baie lae agtergrondwaardes wat 1.7% en 1.3% van die gemiddelde produk vorming in onderskeidelik kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate uitmaak, is waargeneem.

4.7 Samevatting

In hierdie hoofstuk is die beginsel waarop ES-MS berus, beskryf asook die gebruik van hierdie tegniek om 'n alternatiewe metode te ontwikkel vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit. Daar is waargeneem dat die gemiddelde CPT I-aktiwiteit en maloniel-KoA geïnhibeerde CPT I-aktiwiteit in fibroblast- en leukosiethomogenate meetbaar is met behulp van ES-MS en dat die tegniek in die toekoms gebruik kan word om diagnoses van die CPT I-defek te maak. Op die oog af lyk die resultate wat verkry is uit die aangepaste ES-MS metode baie meer konstant en interpreteerbaar as dié gedoen volgens die aanvanklike ES-MS metode wat beskryf is. Agtergrondwaardes met gebruik van $0.2 \mu\text{M}$ [16, 16, 16- d_3]palmitoïelkarnitiese as swaargemerkte analoog, tesame met die gewysigde butileringsmetode, maak 'n baie kleiner persentasie van die gemiddelde gevormde produk uit as in die geval van die aanvanklike ES-MS metode en die radio-isotoopgebaseerde metode. Dit strek tot groot voordeel van die

alternatiewe ES-MS metode aangesien dit die sensitiwiteit en betroubaarheid van die apparaat, asook die herhaalbaarheid van die resultate, verhoog.

HOOFSTUK 5

BESPREKING

5.1 Inleiding

CPT I speel 'n baie belangrike rol in vetsuuroksidasie, want dit is die eerste ensiem betrokke by die β -oksidasie van vetsure en volgens Fraser *et al.* (1997) ook die tempo-bepalende stap vir vetsuuroksidasie in mitochondria. Dus vervul CPT I 'n baie belangrike rol in die handhawing van selfunksie in eukariote. Karnitienpalmitoïeltransferase defekte is van die mees algemene defekte van die lipiedmetabolisme (Handig *et al.* 1996). Die vroeë diagnose van die CPT I-defek is van kardinale belang om lewensgevaarlike simptome en die gevaar van neurologiese skade te verhoed. Tot op hede is slegs van radio-isotoopgebaseerde metodes gebruik gemaak om CPT I-aktiwiteit te bepaal. Aangesien die gepubliseerde metodes van meting onderling soveel verskil ten opsigte van substraat- en ander konsentrasies, is dit moeilik om vergelykende interpretasies te maak (Demaugre *et al.* 1988, 1991; Sadeh & Gutman, 1990; Haworth *et al.* 1992; Bergman *et al.* 1994; Schaefer *et al.* 1997). Vir hierdie radio-isotoopgebaseerde metode is hoofsaaklik van suiwer mitochondriale preperate of van 'n groot hoeveelheid fibroblast- of leukosiethomogenate gebruik gemaak om genoegsame meetbare aktiwiteite te verkry (Demaugre *et al.* 1988; Tein *et al.* 1989; Schaefer *et al.* 1997). Die ontwikkeling van 'n nuwe meetmetode wat kleiner hoeveelhede selle benodig en nie van radioaktiewe isotope gebruik maak nie, sal meer ideaal wees om diagnoses vinnig te maak en 'n metode wat produkvorming direk kan meet, sal die bepaling van CPT I-aktiwiteit soveel selektiewer en sensitiewer maak.

5.2 Evaluering van die metodes wat in hierdie studie uitgevoer is

5.2.1 Inleiding

Die radio-isotoopgebaseerde metode is uitgevoer om die herhaalbaarheid van die metode te ondersoek en te kyk na die meetbaarheid van lae CPT I-aktiwiteite om sodoende betroubare diagnosis te kan maak. Die ontwikkelde ES-MS metode word geëvalueer op grond van faktore soos spesifisiteit, sensitiwiteit, herhaalbaarheid en praktiese uitvoerbaarheid.

5.2.2 Evaluering van die radio-isotoopgebaseerde metode

Daar is besluit om 'n proteïen- en tydafhanklikheidsreeks in beide homogenate te doen om sodoende die metode te optimaliseer vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit in die kontrole homogenate. Tydens die proteïenafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate is 'n bykans liniêre toename in produk vorming waargeneem met 'n toename in proteïeninhoud, terwyl 'n stadiger toename in produk vorming plaasgevind het by hoër proteïeninhoude (Figuur 3.2a). Hoewel daar 'n verskil van 2 minute tydverloop tussen die reaksies in die fibroblast- en leukosiethomogenate is, verskil die totale produk vorming net in 'n geringe mate. Aangesien die toename in produk vorming afplat, sal daar dus 'n effense afname in spesifieke aktiwiteit voorkom, soos ook waargeneem in Figuur 3.2b. Die tydafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate toon 'n soortgelyke tendens as in die geval van die proteïenafhanklikheidsreeks, naamlik 'n aanvanklike liniêre toename in produk vorming (Figuur 3.3a) asook 'n geringe afname in spesifieke aktiwiteit (Figuur 3.3b) hoewel produk vorming baie hoër is in leukosiethomogenate. Hierdie afname in aktiwiteit tydens toenemende proteïeninhoud en tyd is baie gering en kan moontlik toegeskryf word aan die wisselvalligheid van die agtergrondwaardes. In die geval van die tydafhanklikheidsreeks kan die afname in spesifieke aktiwiteit ook wees weens die aktiwiteit van die ensiem wat afneem by lang inkubasies. Met die gebruik van hierdie metode is hoë vlakke radioaktiwiteit in blanko-monsters waargeneem. Agtergrondwaardes is in die geval van die tydafhanklikheidsreeks in fibroblaste saam met elke monsterpunt bepaal. Wanneer die hoeveelheid radioaktiwiteit (dpm) in die

blanko-monsters as persentasie van die radioaktiwiteit van die betrokke monster uitgedruk word, is 'n afname vanaf 67% na 'n tydverloop van 8 minute tot 20% na 60 minute waargeneem (data nie aangetoon nie). Hierdie tendens kan moontlik verklaar word aan die hand van die effek van soutsuur waarmee die reaksie gestop word, op die effektiewe ekstraksie van die radioaktiewe produk alleen. Protonering van die radioaktiewe substraat geskied in die teenwoordigheid van soutsuur wat tot gevolg het dat die substraat tydens ekstraksie makliker in die butanolfase oplos. In reaksies wat eerste gestop is, geskied protonering dus oor 'n langer tydperk en die hoër radioaktiwiteit van die blanko-monsters kan dus aan hierdie verskynsel toegeskryf word. Herhaling van die tydafhanklikheidsreeks in leukosiete het telkens hoër agtergrondwaardes as in die reaksie-monsters opgelewer. Gevolglik is 'n alternatiewe termineringsmetode vir die reaksie gebruik, naamlik deur dit op ys te plaas (sien Afdeling 3.3.3.2). Na die totale tydverloop is 'n kleiner volume soutsuur (500 μ l) gelyktydig by elk van die monsters gevoeg en die butanolekstraksies is dan uitgevoer. Die resultate het baie laer agtergrondwaardes opgelewer en 'n tendens van toenemende produkvorming met 'n toename in tyd, is waargeneem. Produk vorming en die spesifieke aktiwiteit was in hierdie geval baie hoër as in die fibroblasthomogenaat, wat waarskynlik toegeskryf kan word aan die laer agtergrondwaardes (Figuur 3.3a).

Hoewel dieselfde tendens waargeneem is in beide die proteïen- en tydafhanklikheidsreekse, is dit moeilik om die variasies in produk vorming en spesifieke aktiwiteite te verklaar, aangesien die metodes op daardie tydstip nog nie gestandaardiseer was nie, vanweë die probleme wat ondervind is met die hoë agtergrondwaardes. Wat wel uit hierdie reekse waarneembaar is, is die invloed van soutsuur en die tydperk wat die monsters daaraan blootgestel word, sowel as die effek van 'n aangepaste stopmetode (sien Afdeling 3.3.3.2). Uit die proteïenafhanklikheidsreekse met beide homogenate is dit duidelik dat, by gebruik van 0.1 mg proteïen, genoegsame meetbare ensiem aktiwiteit teenwoordig is. Uit die tydafhanklikheidsreekse is besluit om 'n 10 minute en 20 minute inkubasieperiode in onderskeidelik fibroblast- en leukosiethomogenaat toe te laat, en ook na aanleiding van die literatuur waar van 8 minute (McGarry *et al.* 1983) en 20 minute (Sadeh & Gutman 1990) inkubasieperiodes in onderskeidelik fibroblast- en leukosiethomogenaat gebruik gemaak is.

Met die bepaling van CPT I-aktiwiteit in kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate is die reaksie ook met soutsuur getermineer maar die tydperk voordat die butanolekstraksie gedoen is, was dieselfde vir al die monsters. Daar is gevolglik 'n gemiddelde waarde vir CPT I-aktiwiteite in fibroblast- en leukosiethomogenate bepaal en baie klein standaardafwykings is waargeneem, naamlik $0.39 \pm 0.076 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (n=8) en $0.31 \pm 0.073 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (n=6) onderskeidelik. 'n Opmerklike verskynsel is die hoë agtergrondwaardes wat verkry is. Agtergrondwaardes wat onderskeidelik 51% en 58% van die gemiddelde meetbare radioaktiwiteit, wat in die reaksiemengsels vir fibroblast- en leukosiethomogenate gemeet is, uitgemaak het, is verkry. Die CPT I-aktiwiteit wat oorgebly het na inhibering met maloniel-KoA was onderskeidelik 14.7% en 15.8% van die gemiddelde spesifieke aktiwiteit in fibroblast- en leukosiethomogenate. Dus maak die onderskeie agtergrondwaardes 63% en 79% van die totale hoeveelheid radioaktiwiteit in fibroblast- en leukosiethomogenate in die geval van die maloniel-KoA geïnduseerde "defek" uit

Hierdie hoë agtergrondwaardes kan aanleiding gee tot 'n groter kans op foute en die betroubaarheid van hierdie metode kan bevraagteken word. Uit hierdie studie blyk dit duidelik dat soutsuur 'n effek het op die oplosbaarheid van die radioaktiewe substraat in die butanolfase. Dit kan dus die rede wees vir die hoë agtergrondwaardes wat in die kontrole homogenate waargeneem is. Aangesien 'n klein hoeveelheid proteïene in die reaksiemengsels gebruik is, word slegs 'n klein hoeveelheid produk gevorm gedurende 'n tydverloop van 10 tot 20 minute. Die hoeveelheid radioaktiewe substraat in die reaksiemengsels, nadat die reaksie getermineer is, is dus nog in oormaat en in verhouding tot die hoeveelheid produk gevorm, baie meer. Dit is dus moontlik dat die radioaktiewe substraat verantwoordelik is vir kontaminasie van die butanolfase. 'n Moontlike oplossing vir hierdie hoë agtergrondwaardes kan wees om uit die liniêre gebied van die reaksie te beweeg en 'n reaksieverloop van byvoorbeeld 60 minute toe te laat om sodoende meer produkvorming toe te laat (Niezen-Koning *et al.* 1992). Agtergrondwaardes behoort dan 'n relatief kleiner persentasie van die gemete radioaktiwiteit uit te maak en diagnoses sal met 'n groter mate van betroubaarheid gedoen kan word. 'n Ander oplossing sou die ondersoek na 'n beter ekstraksiemetode wees, maar daar is geen aanduiding uit die literatuur dat 'n beter ekstraksiemiddel

bestaan nie. Butanol word algemeen gebruik vir die ekstraksie van palmitoïelkarnitien uit reaksiemengsels met karnitien daarin teenwoordig.

Omdat die reagentiese en reaksiekondisies wat in hierdie studie gebruik is, verskil van dié in die literatuur, is dit moeilik om hierdie resultate met dié in die literatuur te vergelyk. Die radio-isotoopgebaseerde metode in hierdie studie gebruik is gebaseer op die metode gebruik deur Demaugre *et al.* (1988) en relatief laer spesifieke aktiwiteit ($0.390 \pm 0.076 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) is in fibroblaste waargeneem as die $2.45 \pm 0.65 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ deur Demaugre *et al.* (1998). Hierdie verskil in spesifieke aktiwiteit kan moontlik toegeskryf word aan die hoë agtergrondwaardes as gevolg van die effek van soutsuur op die radioaktiewe substraat. Ten spyte van die hoë agtergrondwaardes, was dit tog moontlik om met hierdie metode die gemiddelde CPT I-aktiwiteit in fibroblast- en leukosiethomogenate te bepaal en 'n geïnduseerde CPT I-defek te diagnoseer. Dit kan moontlik wees dat die agtergrondwaardes 'n laer persentasie van die gemiddelde hoeveelheid radioaktiwiteit sal uitmaak indien 'n hoër proteïeninhoud in die reaksiemengsel gebruik sou word. Dan is daar egter die nadeel van groter hoeveelhede selle wat benodig word vir diagnoses. Verder is dit noodsaaklik om die butanolekstraksie dadelik nadat die reaksie met soutsuur getermineer is, uit te voer om sodoende 'n gelyke periode waartydens die verskillende reaksiemengsels in die soutsuur is, te verseker. Die skeiding van die radioaktiewe produk van die radioaktiewe substraat speel dus 'n kritiese rol in die gehalte van die resultate. Die radio-isotoopgebaseerde metode vereis ook dat spesifieke voorsorgmaatreëls getref moet word vir die hantering van radioaktiewe materiaal en daar is ook 'n groot hoeveelheid radioaktiewe afval betrokke, wat tesame met die aankoop van die radioaktiewe substraat 'n groot uitgawe is.

5.2.3 Evaluering van die elektrospoei massaspektrometriese metode

ES-MS is as alternatiewe meetmetode ondersoek. Nadat die moontlikheid om die hoeveelheid produk wat ensiematies gevorm is direk met behulp van ES-MS te bepaal, ondersoek is, is waargeneem dat die soutsuur, soute en proteïene wat teenwoordig is, inmeng met die ionisasie van die gevormde palmitoïelkarnitien. Dit noodsaak die butanolekstraksie waarna palmitoïelkarnitien kwantitatief bepaal kon word met behulp

van die ES-MS metode. Net soos in die geval van die radio-isotoopgebaseerde metode, is 'n proteïen- en tydafhanklikheidsreeks in fibroblast- en leukosiethomogenate ter optimalisering van die metode vir CPT I-aktiwiteitsbepaling in kontrole homogenate gedoen.

Soos reeds in Afdeling 4.6 genoem, is die resultate wat met behulp van die ES-MS metode verkry is baie betroubaar. Die tendense wat in beide homogenate waargeneem is, dui op 'n amper liniêre toename in produkvorming in die proteïen- en tydafhanklikheidsreekse (Figuur 4.11a en 4.12a). Deurgaans is ook redelik konstante spesifieke aktiwiteite in die homogenate waargeneem tydens die proteïen- en tydafhanklikheidsreekse (Figuur 4.11b en 4.12b). Die gemiddelde spesifieke aktiwiteite van $0.492 \pm 0.041 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ($n=5$) en $0.560 \pm 0.065 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ($n=5$) gemeet in die kontrole fibroblast- en leukosiethomogenate is heelwat laer as die spesifieke aktiwiteite verkry uit die literatuur, soos bepaal met radio-isotoopgebaseerde metodes (kyk Tabel 5.1). Dit blyk dat elke laboratorium sy eie metode van CPT I-aktiwiteitsbepaling gebruik en dat geen waardes onderling vergelykbaar is nie.

Belangrik in die identifisering van aangebore metaboliese defekte is die akkurate meting van abnormale metaboliete en ensiem aktiwiteite. Volgens ons kennis is ES-MS nog nie tevore gebruik vir die aktiwiteitsbepaling van CPT I nie. In Afdeling 4.5 is aangetoon dat hierdie tegniek wel gebruik kan word vir die roetine analyses van CPT I-aktiwiteit. Aangesien hierdie metode primêr ontwikkel is om pasiënte met die CPT I-defek akkuraat te diagnoseer, was dit nodig om vas te stel of lae vlakke van CPT I-aktiwiteit meetbaar is met hierdie metode. Om dit te ondersoek is die CPT I-aktiwiteit in die afwesigheid en teenwoordigheid van $50 \mu\text{M}$ maloniel-KoA bepaal. In die teenwoordigheid van maloniel-KoA is aktiwiteite van $0.070 \pm 0.010 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ($n=2$) en $0.065 \pm 0.009 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ($n=2$) in fibroblast- en leukosiethomogenate onderskeidelik gemeet (Figuur 4.14), wat 14.2% en 11.6% van die gemiddelde aktiwiteit in hierdie homogenate uitmaak. Dit is vergelykbaar met die 5% tot 26% aktiwiteit verkry in fibroblaste in die geval van defektiewe CPT I-ensieme (Roe & Coates, 1995).

Tabel 5.1: Spesifieke aktiwiteit van CPT I verkry uit verskeie literatuurbronne.

Verwysing	CPT I-Aktiwiteit (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)		
	Weefseltipe		
	Fibroblaste	Leukosiete	Spier
Radio-isotoopgebaseerde metode			
Bertorini <i>et al.</i> (1980)	1.40 ± 0.51		0.062 ± 0.016
Zierz & Engel (1985)			0.916 ± 0.281
Demaugre <i>et al.</i> (1988)	2.45 ± 0.65		
Tein <i>et al.</i> (1989)	17.8 ± 4.4		
Sadeh & Gutman (1990)	1.29 ± 0.22	0.82 ± 0.23	
Demaugre <i>et al.</i> (1990)	2.42 ± 0.70		
Demaugre <i>et al.</i> (1991)	1.00 ± 0.30		
Haworth <i>et al.</i> (1992)	0.92 ± 0.18		2.45 ± 0.8
Bergman <i>et al.</i> (1994)	1.04 ± 0.20		
Katzir <i>et al.</i> (1996)		1.28 ± 0.09	
Schaefer <i>et al.</i> (1997)	0.21		
Elektrosproei massaspektrometriese metode			
Nolte <i>et al.</i> (1997)	0.49 ± 0.041	0.56 ± 0.065	

Die resultate van hierdie studie toon dat die ES-MS metode se sensitiwiteit baie hoog is, selfs by baie lae vlakke van ensiem aktiwiteit. Konsentrasies laer as 0.01 µM palmitoëelkarntien kan gekwantifiseer word met behulp van ES-MS (Figuur 4.10). Agtergrondwaardes van laer as 2% van die gemiddelde ensiematiese produk vorming is verkry en dit verseker 'n hoë sein tot agtergrondverhouding in die massaspektrum en maak dit moontlik om lae aktiwiteite met groter akkuraatheid te bepaal.

5.3 Vergelyking van die radio-isotoopgebaseerde - en die ES-MS metode vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit

Die vergelyking van die radio-isotoopgebaseerde metode en die ES-MS metode is belangrik om sodoende die voor- en nadele van beide metodes uit te wys en die plek en moontlikhede van die ES-MS metode in die toekoms te ondersoek.

Soos reeds in Afdeling 5.2.2 genoem, is voortdurend baie hoë agtergrondwaardes waargeneem met gebruik van die radio-isotoopgebaseerde metode. Waar die agtergrondwaardes in die geval van die radio-isotoopgebaseerde metode meer as 50% van die totale aktiwiteit uitmaak het, was dit minder as 2% van die totale spesifieke aktiwiteit in die geval van die ES-MS metode. Hierdie dramatiese verskil in die waargenome agtergrondwaardes tussen die radio-isotoopgebaseerde metode en die ES-MS metode, is hoofsaaklik as gevolg daarvan dat in die eersgenoemde metode nie voldoende onderskei kan word tussen die radioaktiefgemerkte substraat en gevormde produk nie. In die geval van die radio-isotoopgebaseerde metode word die butanolekstraksies uitgevoer om die radioaktiewe substraat en produk te skei om sodoende die hoeveelheid radioaktiwiteit ingebou in die substraat te meet. In Afdeling 5.2.2 is die invloed van die gebruik van soutsuur as termineringsreagens op die butanolekstraksie beskryf. Van die substraatmolekules ekstraheer saam met die produk en omdat die metode nie tussen die twee kan onderskei nie lei dit tot hoë agtergrondwaardes. Die hoë agtergrondwaardes bring die betroubaarheid van die aktiwiteitsbepalings met behulp van die radio-isotoopgebaseerde metode in gedrang, veral waar lae aktiwiteite bepaal moet word. Omdat die ES-MS metode hoogs selektief ingestel kan word vir die gevormde produk, het die substraat geen invloed op die gemete piek in die massaspektrum nie. Butanolekstraksies word in hierdie geval net gedoen om enige soute en proteïene in die monster, wat 'n invloed op die ionisasie van die produk in die bron van die apparaat het, te elimineer. As gevolg van die lae agtergrondwaardes in die geval van die ES-MS metode, word 'n hoë sein tot agtergrondverhouding gemeet, ongeveer 50:1 teenoor 'n verhouding van 2:1 met die radio-isotoopgebaseerde metode, en dus is die sein baie sterker en die sensitiwiteit van die metode baie hoër in vergelyking met die radio-isotoopgebaseerde metode. Met

gebruik van die ES-MS metode sal dit dus moontlik wees om laer aktiwiteite met groter akkuraatheid en betroubaarheid te kan bepaal.

'n Groot voordeel in die geval van ES-MS is dat [16, 16, 16-d₃]palmitoïelkarnities as stabiele isotoop gebruik word vir kwantifisering van palmitoïelkarnities. Behalwe vir die kwantifisering van produkvorming kompenseer dit ook vir enige verlies van palmitoïelkarnities tydens die ekstraksies, 'n korreksie faktor wat nie in die radio-isotoopgebaseerde metode teenwoordig is nie. Die verlies van gevormde produk gedurende die ekstraksie proses is waarskynlik verantwoordelik vir die laer spesifieke aktiwiteite verkry in kontrole homogenate met die radio-isotoopgebaseerde metode in vergelyking met die ES-MS metode. Soos reeds in Afdeling 4.4 genoem, stem die fisiese en chemiese eienskappe van [16, 16, 16-d₃]palmitoïelkarnities en palmitoïelkarnities ooreen, dus sal hulle soortgelyk ekstraheer en ioniseer en die deteksielimiet van die apparaat sal deur die stabiele isotoop versadig word, wat kwantifisering baie akkuraat maak en die sensitiwiteit van die apparaat verhoog.

ES-MS sny die gebruik van radio-gemerkte chemikalië, wat gesondheids- en omgewingsgevaar inhou, uit. Koste kan dus besnoei word op die substraat, groot hoeveelhede buise wat benodig word vir die ekstraksies en 'n klomp radioaktiewe afval. Hoewel daar van 'n baie duur en gespesialiseerde apparaat met die ES-MS metode gebruik gemaak word, is die kostes verbonde aan die ensiemreaksie aansienlik laer as met die radio-isotoopgebaseerde metode.

In die literatuur is hoofsaaklik van baie suiwer mitochondriale ekstrakte uit lewer en spier (McGarry *et al.* 1983; Zierz & Engel 1985; Tein *et al.* 1989; Haworth *et al.* 1992) of van groot hoeveelhede fibroblast- of leukosiethomogenaat (Sadeh & Gutman 1990; Demaugre *et al.* 1991; Katzir *et al.* 1996) gebruik gemaak. 'n Voordeel van die ES-MS metode is dat baie klein hoeveelhede selhomogenaat benodig word om die aktiwiteitsbepaling te doen. Minder as 0.1 mg proteïene is genoeg materiaal vir die diagnose van die CPT I-defek. Dit beteken beduidende besparings in terme van tyd en chemikalië aangesien fibroblaste vir 'n kort tyd opgekweek hoef te word en minder as 5 ml bloed benodig word vir die isolering van leukosiete. Die gebruik van leukosiete in kombinasie met die ES-MS metode van CPT I-aktiwiteitsbepaling beteken dat

resultate in 'n baie korter tyd beskikbaar kan wees as met die gebruik van fibroblaste. Tyd speel 'n belangrike rol in die diagnoses van metaboliese defekte, aangesien die korrekte behandeling lewensgevaarlike simptome en permanente skade kan voorkom. Verdere voordele van die ES-MS metode is dat slegs 200 µl van die reaksiemengsel gebruik word vir die bepaling van die hoeveelheid palmitoïelkarnitien daarin. Dit is dus moontlik om dieselfde monster se palmitoïelkarnitien herhaaldelik te bepaal.

Die rol wat tandem massaspektrometrie in die biomediese veld speel, het die laaste dekade ongelooflik toegeneem (Dongré *et al.* 1997). 'n Revolusie het gevolg na die ontwikkeling van die nuwe vloeistof-fase atmosferiese druk ionisasie tegnieke soos elektrospoei en ioonsproei (Gelpí, 1995). Hierdie tegnieke is veral gebruik vir: die kwalitatiewe en kwantitatiewe analise van baie polêre molekule in studies op metabolisme en die biochemiese verskynsels van endogene verbindings; strukturele biopolimere soos peptiede, proteïene, glikoproteïene en glikolipiede; en laer molekulêre massa verbindings soos vetsure, vitamïene, steroïede en nukleïensure. So ver ons kennis strek is hierdie tegniek nog nie voorheen gebruik om enige ensiem aktiwiteit in vitro te bepaal nie en die bekendstelling daarvan mag geleenthede bied vir 'n heel nuwe toepassingsveld wat tot akkurate ensiem aktiwiteitsbepalings en vinniger diagnoses sal lei. 'n Kombinasie van dié metode se selektiwiteit en sensitiwiteit maak dit 'n baie betroubare en akkurate metode om diagnoses van die CPT I-defek mee te maak.

5.4 Samevatting

Soos reeds genoem kataliseer CPT I die tempo-bepalende stap van vetsuuroksidasie in mitochondria en vervul dus 'n baie belangrike rol in die handhawing van selffunksie in eukariote. Die interaksie van maloniel-KoA is nie net betrokke by die direkte beheer van die tempo van vetsuuroksidasie nie, maar verskaf ook 'n indikasie van die relatiewe beskikbaarheid van vetsure en glukose. Dit speel 'n belangrike rol in die beheer van insulien sekresie deur die β -selle van die pankreas en in reaksie op iskemie in die hartspier (Fraser *et al.* 1997). Uit die belangrike rol wat CPT I in vetsuuroksidasie speel en die toenemende voorkoms van defekte van hierdie ensiem is die noodsaaklikheid van die vinnige diagnose van die ensiem defek en die akkurate

bepaling van CPT I-aktiwiteit duidelik. Daar is reeds probeer om die nadeel van groot hoeveelhede selhomogenaat wat benodig word vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit met die bestaande metodes te oorbrug (Schaefer *et al.* 1997) en dit spreek van die behoefte vir 'n metode wat min materiaal benodig.

Volgens ons kennis is slegs die radio-isotoopgebaseerde metode tot dusver gebruik vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit. In hierdie projek is die doelstelling soos beskryf in Afdeling 2.5, naamlik die ontwikkeling van 'n ES-MS tegniek om die aktiwiteit van CPT I in fibroblast- en leukosiethomogenate te bepaal, verwesenlik.

Die doelwitte wat gestel is, is bereik deur uit beskikbare metodes 'n radio-isotoopgebaseerde metode saam te stel om CPT I-aktiwiteite in kontrole homogenate te bepaal. Met die evaluering van hierdie metode is egter gevind dat dit nie altyd so sensitief is nie en dat faktore soos hoë agtergrondwaardes die betroubaarheid van die metode in gedrang bring. Daarom is die doelwit gestel om 'n alternatiewe metode te ontwikkel en met gebruik van 'n elektrospoei massaspektrometrie-gebaseerde tegniek is geslaag daarin om 'n metode te ontwikkel vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit sonder die gebruik van radio-isotope, deur van klein hoeveelhede homogenaat gebruik te maak. Hierdie metode het 'n baie hoë selektiwiteit en sensitiwiteit, en baie lae agtergrondwaardes is waargeneem, in teenstelling met die radio-isotoopgebaseerde metode. Hierdie eienskappe verseker dat die nuwe metode in die toekoms betroubaar gebruik kan word vir die bepaling van CPT I-aktiwiteit en die diagnose van defekte van hierdie ensiem.

Verdere ontwikkeling word gedoen op die gebruik van elektrospoei massaspektrometrie vir die bepaling van CPT II-aktiwiteit. Ons glo dat die diversiteit van die tegniek in die toekoms toegepas kan word op 'n groot verskeidenheid ensiematiese analyses en dat ES-MS gereedelik gebruik sal word vir die bestudering van ensiem defekte van aangebore metaboliese siektetoestande.

AFKORTINGSLYS

A	absorbansie
AS	asiel-KoA sintetase
ATP	adenosientrifosfaat
BCA	bicinchoniniensuur
bm	mitochondriale buitemembraan
BSA	beesserumalbumien
°C	grade Celsius
¹⁴ C	koolstof met relatiewe atoommassa van 14
C ₁₂	koolstofketting wat 12 koolstowwe bevat
C-terminale	karboksiterminale
cDNA	polideoksiribonukleotied gesintetiseer onder leiding van RNA-afhanklike DNA-polimerase
CID	botsingsgeïnduseerde dissosiasie
CO ₂	koolstofdioksied
CPT	karnitien palmitoyltransferase
CT	karnitien/asielkarnitien translokase
DNA	deoksiribonukleïensuur
dpm	disintegrasies per minuut
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
EGTA	etileenglikol-bis(β-aminoetiel-eter)tetra-asynsuur
ES-MS	elektrosproei massaspektrometrie
ETF	elektron oordrag flavoproteïen
ETF:QO	elektron oordrag flavoproteïen:Ubiquinoon oksidoreduktase
eV	elektronvolt
FAD	flavien adenien dinukleotied (geoksideerde vorm)
FADH	flavien adenien dinukleotied (gereduseerde vorm)
FK	fibroblast kontrole
x g	gravitasie eenhede ontwikkel tydens sentrifugering
³ H	waterstof met relatiewe atoommassa van 3
HCl	waterstofchloried (soutsuur)
HEPES	4-(2-hidroksiëtiel)-1-peperasien-etaansulfoonsuur
H ₂ O	waterstofoksied (water)
HMG-KoA	β-hidroksi-β-metielglutariel-koënsiem-A
ims	intermembraan spasie

KCl	kaliumchloried
KH ₂ PO ₄	kaliumdiwaterstoffosfaat
KoA	koënsiem A
KoASH	koënsiem A
kV	kilovolt
K _m	Michaelis konstante
L/h	liter per uur
LK	leukosiet kontrole
mbar	millibar
mg ⁻¹	per milligram
min ⁻¹	per minuut
mM	millimolêr
mRNA	boodskapper ribonukleïensuur
MS	massaspektrometer
MS-MS	tandem massaspektrometrie
m/v	massa per volume
m/z	massa-tot-lading verhouding
N-terminale	aminoterninale
NaCl	natriumchloried
NAD vorm)	nikotienamied adenien dinukleotied (geoksideerde
NADH	nikotienamied adenien dinukleotied (geredusideerde vorm)
NaHCO ₃	ammoniumwaterstofkarbonaat
Na ₂ HPO ₄	dinatriumwaterstoffosfaat
NH ₄ Cl	ammoniumchloried
nm	nanometer
nmol	nanomol
nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹	nanomol per minuut per milligram
PBS	fosfaat-gebufferde fisiologiese soutoplossing
Pen-Strep	penisillien-streptomisien
PPLO	Eng: pleuropneumonia-like organisms
Q	koënsiem Q
SA	spesifieke aktiwiteit
TMD	transmembraan domein
tpm	tellings per minuut
Tris	tris-(hidroksimetiel)-aminometaan
µg	mikrogram
µl	mikroliter
µm	mikrometer

V

volt

LITERATUURLYS

BERGMAN, A.J.I.W., DONCKERWOLCKE, R.A.M.G., DURAN, M., SMEITINK, J.A.M., MOUSSON, B., VIANEY-SABAN, C. & POLL-THE, B.T. 1994. Rate-dependent distal renal tubular acidosis and carnitine palmitoyltransferase I deficiency. **Pediatric Research**, **36**, 582-588.

BERGMEYER, H.U. 1983. Determination of the catalytic activity of enzymes. (*In* Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. & Graßl, M. eds. **Methods of enzymatic analysis**. Volume I. Derde uitgawe Weinheim : Verlag Chemie p. 104-142).

BERTORINI, T., YEH, Y-Y., TREVISAN, C., STADLAN, E., SABESIN, S., & DIMAURO, S. 1980. Carnitine palmityl transferase deficiency: Myoglobinuria and respiratory failure. **Neurology**, **30**, 263-271.

BONNEFONT, J.-P., TARONI, F., CAVADINI, P., CEPANEC, C., BRIVET, M., SAUDUBRAY, J.-M., LEROUX, J.-P. & DEMAUGRE, F. 1996. Molecular analysis of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatocardiomuscular expression. **American Journal of Human Genetics**, **58**, 971-978.

BOUGNÈRES, P. F., SAUDUBRAY, J.-M., MARSAC, C., BERNARD, O., ODIEVRE, M., & GIRARD, J. 1981. Fasting hypoglycemia resulting from hepatic carnitine palmitoyltransferase deficiency. **Journal of Pediatrics**, **98**, 742-746.

BREMER, J., & NORUM, K.R. 1967. The mechanism of substrate inhibition of palmityl coenzyme A: carnitine palmityltransferase by palmityl coenzyme A. **The Journal of Biological Chemistry**, **242**, 1744-1748.

BRITTON, C.H., SCHULTZ, R.A., ZHANG, B., ESSER, V., FOSTER, D.W., & MCGARRY, J.D. 1995. Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: Characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **92**, 1984-1988.

BROSNAN, J.T., KOPEC, B., & FRITZ, I.B. 1973. The localization of carnitine palmitoyltransferase on the inner membrane of bovine liver mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, **248**, 4075-4082.

BROWN, N.F., ESSER, V., FOSTER, D.W., & MCGARRY, J.D. 1994. Expression of a cDNA for rat liver carnitine palmitoyltransferase I in yeast establishes that catalytic activity and malonyl-CoA sensitivity reside in a single polypeptide. **The Journal of Biological Chemistry**, **269**, 26438-26442.

BROWN, N.F., WEIS, W.C., HUSTI, J.E., FOSTER, D.W., & MCGARRY, J.D. 1995. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. **The Journal of Biological Chemistry**, **270**, 8952-8957.

DECLERCQ, P.E, FALCK, J.R., KUWAJIMA, M., TYMINSKI, H., FOSTER, D.W., & MCGARRY, J.D. 1987. Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. **Journal of Biological Chemistry**, **262**, 9812-9821.

DEMAUGRE, F., BONNEFONT, J-P., MITCHELL, G., NGUYEN-HOANG, N., PELET, A., RIMOLDI, M., DI DONATO, S., & SAUDUBRAY, J.-M. 1988. Hepatic and muscular presentations of carnitine palmitoyl transferase deficiency: Two distinct entities. **Pediatric Research**, **24**, 308-311.

DEMAUGRE, F., BONNEFONT, J-P., CEPANEC, C., SCHOLTE, J., SAUDUBRAY, J-M. & LEROUX, J-P. 1990. Immunoquantitative analysis of human carnitine palmitoyltransferase I and II defects. **Pediatric Research**, **27**, 497-500.

DEMAUGRE, F., BONNEFONT, J-P., COLONNA, M., CEPANEC, C., LEROUX, J-P. & SAUDUBRAY, J-M. 1991. Infantile form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with

hepatomuscular symptoms and sudden death. **Journal of Clinical Investigation**, **87**, 859-864.

DIMAURO, S.M., & DIMAURO, P.M. 1973. Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria. **Science**, **182**, 929-931.

DONGRÉ, A.R., ENG, J.K., & YATES, J.R. 1997. Emerging tandem-massspectrometry techniques for the rapid identification of proteins. **TIBTECH**, **15**, 418-425.

EATON, S., BARTLETT, K. & POURFARZAM, M. 1996. Mammalian mitochondrial β -oxidation. **Biochemical Journal**, **320**, 345-357.

ELLMAN, G.L. 1959. Tissue Sulphydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **82**, 70-77.

FINOCCHIARO, G., TARONI, F., ROCCHI, M., MARTIN, A.L., COLOMBO, I., TARELLI, G.T., & DIDONATO, S. 1991. cDNA cloning, sequence analysis and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **88**, 661-665.

FRASER, F., CORSTORPHINE, C.G. & ZAMMIT, V.A. 1997. Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. **Biochemical Journal**, **323**, 711-718.

GELLERA, C., VERDERIO, E., FLORIDIA, G., FINOCCHIARO, G., MONTERMINI, L., CAVADINI, P., ZUFFARDI, O., & TARONI, F. 1994. Assignment of the human carnitine palmitoyltransferase II gene (CPT1) to chromosome 1p32. **Genomics**, **24**, 195-197.

GELPÍ, E. 1995. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, **703**, 59-80.

HANDIG, I., DAMS, E., TARONI, F., VAN LAERE, S., DE BARSY, T., & WILLEMS, P.J. 1996. Inheritance of the S113L mutation within an inbred family with carnitine palmitoyltransferase enzyme deficiency. **Human Genetics**, **97**, 291-293.

HAWORTH, J.C., DEMAUGRE, F., BOOTH, F.A., DILLING, L.A., MOROZ, S.P., SESHIA, S.S., SEARGEANT, L.E. & COATES, P.M. 1992. Atypical features of the hepatic form of carnitine palmitoyltransferase deficiency in a Hutterite family. **Journal of Pediatrics**, **121**, 553-557.

KATZIR, Z., HOCHMAN, B., BIRO, A., RUBINGER, D.I., FEIGEL, D., SILVER, J., FRIEDLAENDER, M.M., POPOVTZER, M.M., & SMETANA, S. 1996. Carnitine palmitoyltransferase deficiency: An underdiagnosed condition? **American Journal of Nephrology**, **16**, 162-166.

MCGARRY, J.D., LEATHERMAN, G.F., & FOSTER, D.W. 1978. Carnitine Palmitoyltransferase I: The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. **Journal of Biological Chemistry**, **253**, 4128-4136.

MCGARRY, J.D., MILLS, S.E., LONG, C.S., & FOSTER, D.W. 1983. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. **Biochemical Journal**, **214**, 21-28.

MCGARRY, J.D. 1995. Ketogenesis and lipogenesis: Metabolic integration in health and disease. **Biochemical Society Transactions**, **23**, 481-485.

MCGARRY, J.D. 1995. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system: its broadening role in fuel homeostasis and new insights into its molecular features. **Biochemical Society Transactions**, **23**, 321-324.

MURTHY, M.S.R. & PANDE, S.V. 1984. Mechanism of carnitine acylcarnitine translocase-catalyzed import of acylcarnitines into mitochondria.

NIEZEN-KONING, K.E., WANDERS, R.J.A., NAGEL, G.T., IJLST, L., & HEYMANS, H.S.A. 1992. A new, simple assay for long-chain acyl-CoA dehydrogenase in cultured skin fibroblasts using stable isotopes and GC-MS. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1180**, 28-32.

NOLTE, L., VAN DER WESTHUIZEN, F.H., PRETORIUS, P.J., & ERASMUS, E. 1997. Carnitine palmitoyltransferase I activity monitoring in fibroblasts and leukocytes using electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**. (Aanvaar vir publikasie).

NORUM, K.R. 1964. Palmityl-CoA: carnitine palmityltransferase. Purification from calf-liver mitochondria and some properties of the enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, **89**, 95-108.

OLPIN, S.E., MANNING, N.J., CARPENTER, K., MIDDLETON, B., & POLLITT, R.J. 1992. Differential diagnosis of hydroxydicarboxylic aciduria based on release of $^3\text{H}_2\text{O}$ from [9,10- ^3H]myristic and [9,10- ^3H]palmitic acids by intact cultured fibroblasts. **Journal of inherited Metabolic Disease**, **15**, 883-890.

PALMER, T. 1995. An introduction to bioenergetics, catalysis and kinetics. (In Palmer, T. ed. **Understanding enzymes**. Vierde uitgawe. Great Britian : Prentice Hall/Ellis Horwood p. 87-106)

ROE, C.R., & COATES, P.M. 1995. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. (In Scriver, C.R., Sly, W.S., Valle, D. eds. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. Sewende uitgawe. New York : McGraw-Hill p. 1501-1533).

SADEH M., & GUTMAN, A. 1990. Carnitine palmitoyltransferase deficiency: A common cause of recurrent myoglobinuria. **Israel Journal of Medical Science**, **26**, 510-515.

SAGGERSON, E.D., CARPENTER, C.A., & TSELENTIS, B.S. 1982 Effects of thyroidectomy and starvation on the activity and properties of hepatic carnitine palmitoyltransferase. **Biochemical Journal**, **208**, 667-672.

SCHAEFER, J., JACKSON, S., TARONI, F., SWIFT, P. & TURNBULL, D.M. 1997. Characterisation of carnitine palmitoyltransferase in patients with a carnitine palmitoyltransferase deficiency: implications for diagnosis and therapy. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, **62**, 169-176.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., & KLENK, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, **150**, 76-85.

STEWART, M., & MALE, D. 1989. Immunological techniques. (*In* Riott, I., Brostoff, J., & Male, D., eds. **Immunology**. Gower Medical Publishing p. 25.13).

TEIN, I., DEMAUGRE, F., BONNEFONT, J.-P., & SAUDUBRAY, J.-M. 1989. Normal muscle CPT₁ and CPT₂ activities in hepatic presentaion patients with CPT₁ deficiency in fibroblasts. **Journal of Neurological Sciences**, **92**, 229-245.

VAN DER LEIJ, F.R., TAKENS, J., VAN DER VEEN, A.Y., TERPSTRA, P., & KUIPERS, J.R.G. 1997. Localization and intron usage analysis of the human CPT1B gene for muscle type carnitine palmitoyltransferase I. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1352**, 123-128.

VAN DER WESTHUIZEN, F.H. 1993. **Klonering en uitdrukking van die mensgeen vir interleukin-5 (IL-5)**. Verhandeling vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.

VILLARD, J., FISCHER, A., MANDON, G., COLLOMBET, J.M., TARONI, F., & MOUSSON, B. 1996. Recurrent myoglobinuria due to carnitine palmitoyltransferase II deficiency: Expression of the molecular phenotype in cultured muscle cells. **Journal of the Neurological Sciences**, **136**, 178-181.

VOET, D. & VOET, J.G. 1990. Lipid metabolism. **Biochemistry**. p. 618-677.

WOLF, W., HAGEN, A. & NEWSHOLME, E.A. 1983. Enzymatic analysis with radiobiochemicals. (*In* Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. & Graßl, M. eds. **Methods of enzymatic analysis**. Volume II. Dritte uitgawe Weinheim : Verlag Chemie p. 527-549).

ZIERZ, S., & ENGEL, A.G. 1985. Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle. **European Journal of Biochemistry**, **149**, 207-214.

BEDANKINGS

By voltooiing van hierdie verhandeling wil ek graag my opregte dank en waardering uitspreek teenoor:

- My studieleier, Francois van der Westhuizen , vir jou uitstekende leiding, jou positiewiteit en vriendelikheid regdeur alles. Ek kon met vrymoedigheid van jou hulp gebruik maak.
- Mnr. Erasmus, vir al die vriendelike hulp en aanmoediging en die ure voor die MS. Dit is 'n vreugde om saam met u te werk.
- Prof. Piet Pretorius, vir die finansiële en morele ondersteuning, die belangstelling en onderskraging tydens die hele projek.
- My ouers en Kelvin, vir julle opoffering en geduld tydens my studies. Sonder julle sou dit nie vir my moontlik wees om hierdie droom te verwesenlik nie - baie dankie!
- Almal by Biochemie en Mikrobiologie, julle belangstelling, motivering en vriendskap het die M.Sc. die moeite werd gemaak.
- Wouter, jou liefde en geloof in my was my motivering gedurende hierdie studie en vir die lewe.
- My God, vir die geleentheid en krag. Alles kom van U af en op die ou einde gaan alles tog weer terug na U.