

3. Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Es wurde Tris-HCL-Puffer (pH 7,6), Dithiotreitol, L-Carnitin sowie die Fettsäureester Oktanoyl Coenzym A Lithium Salz Monohydrat, Decanoyl Coenzym A Monohydrat, Lauroyl Coenzym A Lithium Salz, Myristoyl Coenzym A Lithium Salz, Palmitoyl Coenzym A Lithium Salz, Stearoyl Lithium Salz Coenzym A und Malonyl Coenzym A von der Firma SIGMA bestellt. Weiterhin von der Firma MERCK bovines Serumalbumin (Albuminfraktion 5), Isobutanol und Ammoniumsulfat. Für die Herstellung von Chappel-Perry Medium A wurden Kaliumchlorid von der Firma SIGMA und Magnesiumchlorid-Hexahydrat von der Firma MERCK sowie EDTA eingesetzt. L-[mehtyl-14C]-Carnitin wurde von der Firma NEN Life bezogen und Ready Safe von der Firma BECKMANN wurde als Szintillationslösung verwandt.

3.2 Geräte

Die Muskelbiopsien wurden auf einer Laborwaage von der Firma SARTORIUS abgewogen und in einem 7 ml Glas/Glas-Handhomogenisator (Typ Elvehjem) homogenisiert. Die Trennung in Sediment und Überstand erfolgte mittels einer Ultrazentrifuge (L7-Serie) von BECKMANN mit einem feststehenden Rotor. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler der Serie LS 6500, ebenfalls von der Firma BECKMANN. Von der Firma HETTICH wurde für die Aufbereitung der Proben eine Tischzentrifuge genutzt.

3.3 Muskelbiopsien

Alle Enzymmessungen erfolgten an Muskelhomogenaten aus menschlichen Muskelbiopsien, die zur Diagnostik eines CPT II-Mangels entnommen wurden, jedoch nach der Klinik, elektrophysiologischen und zytopathologischen Untersuchungen keinen Anhalt für eine Muskelerkrankung zeigten. In jedem Fall wurden offene Biopsien aus dem M. quadriceps femoris entnommen. Nach der Entnahme wurde der gewonnene Muskel mit isotoner Natriumchloridlösung gespült, von Fett- und Bindegewebe frei präpariert und bis zur weiteren Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff gefroren.

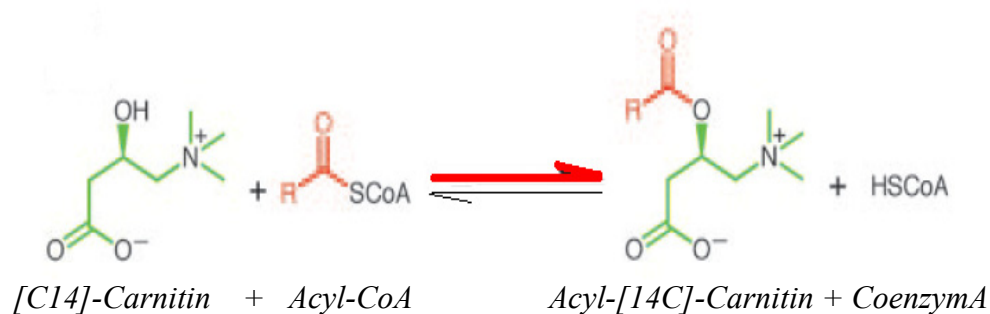
3.4 Aufarbeitung der Muskelbiopsien

Zur Herstellung des Homogenates wurde der Muskel tiefgefroren abgewogen und mit dem 29fachen Volumen CHAPPEL-PERRY Medium 8 Minuten im Homogenisator auf Eis zerrieben. Das CHAPPEL-PERRY Medium enthielt 100mM Kaliumchloridlösung, 5mM Magnesiumchloridlösung, 1mM EDTA-Lösung und 50mM Tris-HCL (pH 7,5). Das fertige Homogenat wurde in 1mL Portionen in flüssigem Stickstoff aliquotiert. Für die Messungen der Enzymaktivitäten im Sediment und Überstand wurde das Muskelhomogenat durch 30minütige Zentrifugation bei 183960g (entsprechen 50.000 Umdrehungen pro Minute) und 4°C in der Ultrazentrifuge aufgetrennt. Es wurde der Überstand abpipettiert und für die Messungen der COT-Aktivität aufgehoben. Das Sediment wurde mit CHAPPEL-PERRY Medium auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt, resuspendiert und erneut bei 183960g 30 Minuten zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde verworfen und das Sediment wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und zur Messung der CPT-Aktivität gesammelt.

3.5 Messung der Enzymaktivität

Prinzip der Enzymmessung

Die CPT bewirkt in einer Säure-Basen-Katalyse die Koppelung eines Acyl-CoA-Esters an radioaktiv markiertes Carnitin, dabei wird Coenzym A frei und es entsteht Acylcarnitin. Ausgangsstoffe und Endprodukte befinden sich im biochemischen Gleichgewicht, weshalb man durch Überschuss eines Reaktionspartners die gewünschte Reaktionsrichtung erzwingen kann.



Die Reaktion entspricht der Isotopen-Vorwärtsreaktion, beschrieben von Zierz & Engel 1985. Durch die Zugabe von Muskelhomogenat wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurde durch die Zugabe von Isobutanol und Ammoniumsulfat die Enzymaktivität gestoppt. Durch einen Überschuss an [14C]-Carnitin lag das Gleichgewicht zu Gunsten der Hinreaktion, sodass die Rückreaktion vernachlässigt werden konnte. Das radioaktive Acyl-[14C]-Carnitin wurde in die fettige Phase extrahiert und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

3.6 Herstellung der Lösungen

Tab.2: Übersicht über die eingesetzten Chemikalien, deren Konzentration und die eingesetzten Volumina.

Lösungen	Menge der Substanzen	Volumen Aqua bidest	Molarität	pH	Bestellnummer
Carnitinlösung	98,8mg L-Carnitin + 300µl [C14]- Carnitinlösung	10 ml	50mM 49mM		Sigma:C-0283
Tris-HCL-Puffer	60,57 g Trizma Base	500 ml	1M	7,6	Sigma:T-6791
Rinderserum- Albumin	200 mg BSA Albumin Fraktion 5	20 ml	1%		Merck: 1.12018.0100
Dithiotreitollösung	30,8 mg DTT	5 ml	40 mM		Sigma:D-0632
Palmitoyl-CoA-Lösung	10,31 mg Palmitoyl- CoA Lithium Salz	10 ml	1 mM		Sigma:P-6716
Octanoyl-CoA-Lösung	9,18 mg Octanoyl-CoA Lithium Salz	10 ml / 5 ml	1 mM 2 mM		Sigma: O-6877
Decanoyl-CoA- Lösung	9,4 mg Decanoyl-CoA Monohydrat	10 ml / 5 ml	1mM 2mM		Sigma: D-5269
Lauroyl-CoA-Lösung	9,56 mg Lauroyl-CoA Lithiumsalz	10 ml / 5 ml	1mM 2mM		Sigma:L-2659
Myristol-CoA-Lösung	9,78 mg Myristol-CoA Lithiumsalz	10 ml / 5 ml	1 mM 2 mM		Sigma:M-4414
Stearoyl-CoA-Lösung	10,34 mg Stearoyl- CoA Lithiumsalz	10ml / 5 ml	1 mM 2 mM		Sigma:S-0802
Malonyl-CoA	17,1 mg Malonyl-CoA	2 ml	10 mM		Sigma:M-4263

3.7 Testansatz

Tab.3: Pipettierschema für einen Testansatz. Dabei wurden die Volumina der eingesetzten Acyl-CoA-Ester je nach gewünschter Endkonzentration variiert.

	Testkonzentration	Volumen
Tris-HCL-Puffer, pH 7,6	10mM	100µl
BSA	0,1%	100µl
Dithioeitol	1mM	25µl
Acyl-CoA	10/20µM	5-800µl
[14C]-Carnitin	5mM	100µl
Homogenat		100µl
Malonyl-CoA	10mM	20/40µl
Aqua bidest	ad	1000µl

3.8 Radioaktivität der Carnitinlösung

Aus 98,8 mg L-Carnitin und 10 ml Aquadest. wurde eine 50 mM L-Carnitin-Lösung hergestellt, zu der dann 300µl L-[methyl-14C]-Carnitin pipettiert wurden. Die so erstellte 49 µM [14C]-Carnitinlösung hatte eine spezifische Radioaktivität von 0,03 µCi/µmol.

3.9 Durchführung

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Substanzen des Testansatzes zusammenpipettiert, dabei wurden verschiedene Mengen der Acylester verwendet und mit Aqua bidest auf 1000 µl aufpipettiert. Bei Acylesterkonzentrationen größer als 500µM mussten 2mM Acylesterlösungen verwendet werden, damit das Volumen des Testansatzes nicht größer als 1000 µl wurde. Für kleinere Konzentrationen wurden die 1mM Acylesterlösungen verwendet. Durch Zugabe des Muskelhomogenates wurde die Reaktion gestartet, der Testansatz wurde bei 30 °C für 10 Minuten im Wasserbad belassen. Mit 1 ml konzentriertem Isobutanol, 1 ml gesättigter Natriumsulfatlösung und etwa 0,5 g Natriumsulfat wurde die Reaktion gestoppt. Das Gemisch wurde etwa 10 Sekunden gemixt und für zehn Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Dabei erfolgte die Auftrennung in fettige obere und wässrige untere Phase. Es wurden 800µl der fettigen Phase, in der sich auch die Acylcarnitinerester gelöst befanden, abpipettiert und mit gleichem Volumen an mit Isobutanol gesättigtem Wasser vermischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 5000 rpm wurden 500µl

abgenommen und in Vials gefüllt. Zur Messung der Radioaktivität wurden 10 ml Szintillationslösung zugegeben und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Ansätze für die Bestimmungen der Leerwerte wurden ohne Muskelhomogenat pipettiert. Bei den Bestimmungen der Hemmung wurden je nach Ansatz 20 oder 40 µl Aquadest durch 10mM Malonyl-CoA ersetzt.

Sowohl für die Proteinkonzentration (*Abb.11*), als auch für die Zeit (*Abb.12*) und Temperatur (*Abb.13*) wurden Eichkurven erstellt um die Linearität der einzelnen Parameter im Messbereich nachzuweisen. Bei allen drei Parametern konnte innerhalb des Messbereiches eine lineare positive Korrelation mit der Aktivität (CPM) nachgewiesen werden. Im Falle der Temperatur-Eichkurve verhielt sich die Enzymaktivität oberhalb des Messbereiches (>37°C) nicht mehr linear, es kam zum Abfall der Aktivität.

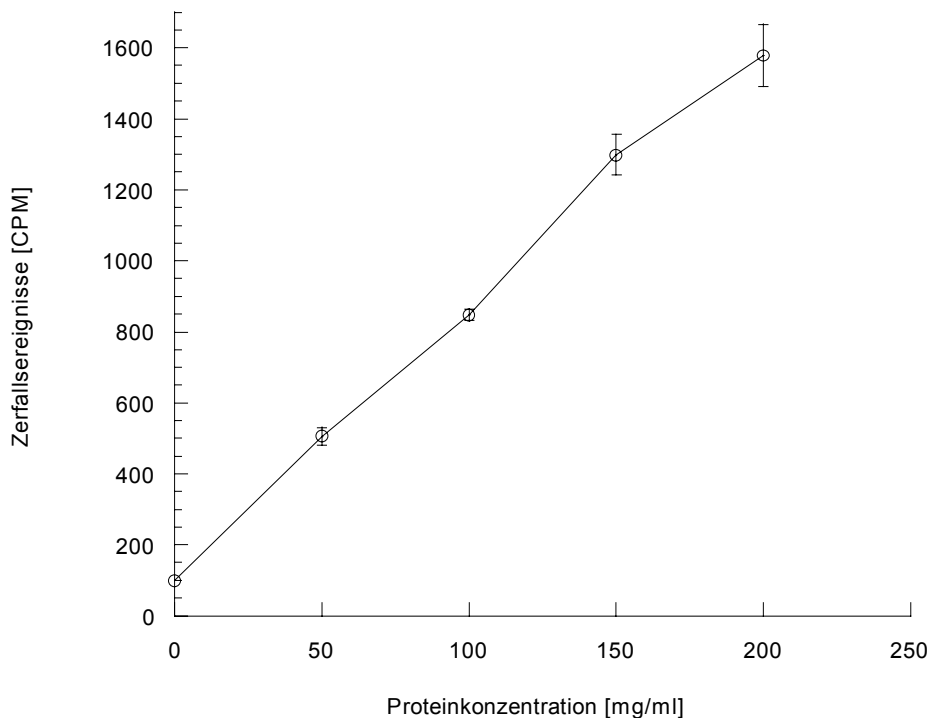


Abb.11: Dargestellt ist die Aktivität [CPM] in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge (Korrelationskoeffizient 0,99, n=3). Die Homogenatverdünnung betrug 1:30 (pro µl Homogenat ca. 0,033 mg Muskel).

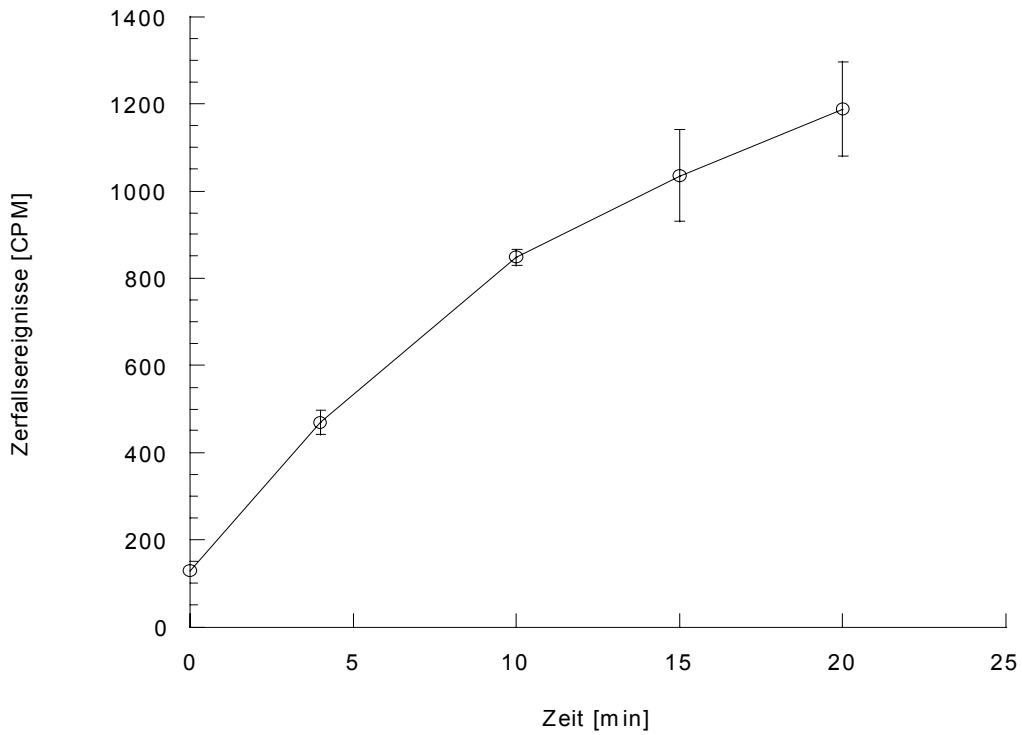


Abb.12: Dargestellt ist die Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit ($R=0,94$, $n=3$).

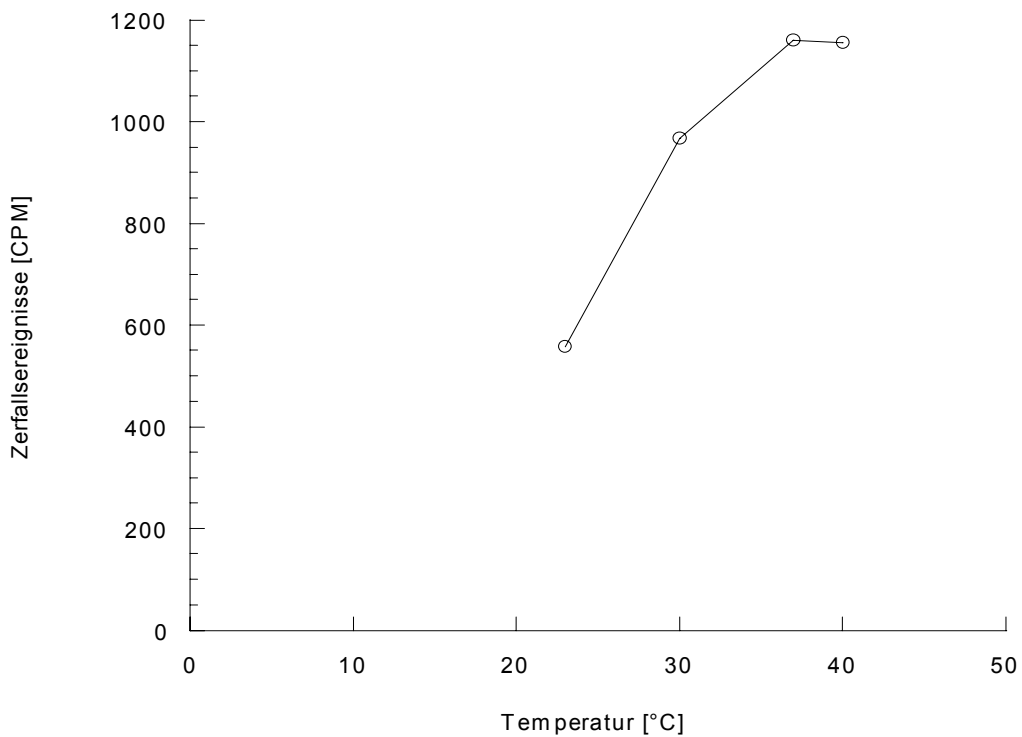


Abb.13: Dargestellt ist die Abhängigkeit der Temperatur von der gemessenen Aktivität zwischen 25°C und 37°C. Der Korrelationskoeffizient beträgt hierbei 0,95 ($n=3$).

Berechnung der Aktivität

a) Aktivität bezogen auf das Feuchtgewicht:

$$\frac{\{(CPM_{(Probe)} - CPM_{(Leerwert)}) * n_{(Carnitinlösung)} * V1\}}{(CPM_{(Standart)} * V2 * t * a)} = \frac{\text{nmol}}{(\text{min} * \text{gFG})}$$

b) Aktivität bezogen auf enthaltenes nicht kollagenes Protein:

$$\frac{\{(CPM_{(Probe)} - CPM_{(Leerwert)}) * n_{(Carnitinlösung)} * V1\}}{(CPM_{(Standart)} * V2 * t * p)} = \frac{\text{nmol}}{(\text{min} * \text{mgNCP})}$$

V1 Volumen des Testansatzes (1000 µl)

V2 Volumen des Ansatzes im Vial (500 µl)

t Inkubationszeit (10 min)

a eingesetzte Menge an Muskelgewebe (ca. 3,33 mg pro 100 µl Muskelhomogenat)

p eingesetzte Proteinmenge (mg NCP)

3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Vom Muskelhomogenat wurden 20µl abpipettiert und mit 180µl einer 50mM Natriumhydroxidlösung versetzt. Bei Raumtemperatur kommt es zur Hydrolyse des Nicht-Kollagen-Proteins. Zur Abtrennung des Kollagen-Proteins wurden die Proben fünf Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert. Zur Proteinbestimmung wurden 10µl des vorbereiteten Homogenates eingesetzt und mit 200µl BCA-Lösung C versetzt. Zur Eichung der Messung wurde für jede Bestimmung eine Eichkurve mit Hilfe einer BSA-Standardlösung erstellt. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Titerplattenreader bei einer Wellenlänge von 550nm, der Proteingehalt wurde aus der Eichgeraden abgelesen und auf die eingesetzte Menge an Muskelgewebe bezogen [mg NCP/ g Feuchtgewicht].

Zusammensetzung der Lösungen

BCA-Lösung C: 50 Teile BCA-Lösung A + 1 Teil BCA-Lösung B

BSA-Standardlösung: 0,125; 0,25; 0,5 und 1,0 mg/ml

BCA-Lösung A: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA-Reagens und Natriumtartrat in 0,2 normaler Natriumhydroxidlösung

BCA-Lösung B: 4%ige Kupfersulfat-Lösung

3.11 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse

Die Bearbeitung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel und Microsoft Word. Zur Berechnung der K_m -Werte und der Maximalgeschwindigkeiten, sowie zur graphischen Darstellung der Michaelis-Menten-Enzym-Kinetik wurden die Programme SigmaPlot und KaleidaGraph, für die statistischen Berechnungen SPSS verwendet.

3.12 Kinetik der Carnitin-Acyltransferasen für die verschiedenen Acyl-CoA-Ester im Gesamthomogenat, Sediment und Überstand

Zur Beurteilung der Kinetik der Enzym-Substrat-Interaktion wurde für die jeweiligen Substrate die Abhängigkeit der Aktivität von der Konzentration bestimmt. Dafür wurden verschiedene Substratkonzentrationen bei konstanter Konzentration von Carnitin mit $5\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Die unspezifische Aktivität ergab sich aus dem Quotient der erhaltenen CPM-Werte und des eingesetzten Feuchtgewichtes.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde der Proteinwert des Muskelhomogenates gemessen und die CPM-Werte auf die jeweiligen Konzentrationen des Non Kollagen Protein der entsprechenden Fraktionen bezogen.

Im Muskelhomogenat befindet sich neben der mitochondrialen Carnitin-Acyltransferase-Aktivität, die als Carnitin-Palmityltransferase beschrieben wird und nicht löslich ist, noch eine weitere lösliche Transferaseaktivität, die als Carnitin-Oktanyltransferase bezeichnet wird. Diese ist sowohl im Zytoplasma, als auch in den Peroxisomen und Mikrosomen lokalisiert. Die Messung der Aktivität der Acyltransferasen im gesamten Homogenat beinhaltet immer beide Enzyme, die für die verschiedenen Substrate unterschiedliche Aktivitäten aufweisen. Jedoch kommt es immer auch zur Überlappung der Aktivitäten beider Enzyme und somit ist eine eindeutige Zuordnung der Spezifität für ein Substrat nicht möglich.

Durch Ultrazentrifugation wurde die nicht lösliche, an die Mitochondrienmembran gebundene, von der löslichen Fraktion getrennt und die vorhandenen Aktivitäten mittels Isotopen-Vorwärts-Reaktion untersucht. Für die erhaltenen K_m -Kurven wurde mit dem Programm Kaleidagraph eine Regression nach der Michaelis-Menten-Kinetik berechnet. Zeigte sich eine Substrathemmung wurde eine Regression nach einer Substrathemmungskinetik durch die Messpunkte gelegt.

3.12.1 Oktanyl-CoenzymA

Vom Substrat Oktanyl-CoenzymA wurden im Gesamthomogenat Konzentrationen von 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800,

900, 1000 μM bei einer konstanten Konzentration des C^{14} -Carnitins von 5 mM im Enzymtest mittels Isotopen-Vorwärtsreaktion gemessen. Für aussagekräftige Substratkonzentrationen, die für den Verlauf der Kurve wichtig sind, wurden die Messungen zwischen 4 und 7-mal wiederholt. In den beiden nach Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen wurden zur Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität Substratkonzentrationen von 5, 50, 100, 200-800 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Die Carnitin-Konzentration war konstant bei 5 μM . Die angegebenen Werte (*Abb.14*) sind Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten.

3.12.2 Dekanyl-CoenzymA

Zur Bestimmung der Carnitin-Transferaseaktivität des Gesamthomogenates für Dekanyl-CoenzymA wurden Substratkonzentrationen von 5, 10, 20, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 und 800 $\mu\text{mol/l}$ des Fettsäure-CoA-Esters eingesetzt (*Abb.15*) Die Konzentration von Carnitin war in allen Experimenten konstant bei 5 $\mu\text{mol/l}$. Die Messungen wurden entsprechend der Wertigkeit des Messpunktes zwischen 3- und 5-mal wiederholt. Orientierende Messpunkte wurden in die Berechnungen nicht mit einbezogen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Mittelwerte \pm der berechneten Standardabweichung (SD). Sowohl im Sediment, als auch im Überstand wurden die Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten bei Substratkonzentrationen von 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 600 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt. (*Abb.15*)

3.12.3 Lauryl-CoenzymA

Die Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität des Gesamthomogenates für Lauryl-CoA erfolgte mit Konzentrationen von 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 180, 200, 300, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800 $\mu\text{mol/l}$ (*Abb.16*). Für den Verlauf der Kurve aussagekräftige Konzentrationen waren 5, 20, 50, 100-700 μM des Fettsäureesters, die in mindestens drei und maximal fünf Experimenten ermittelt wurden. Die Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität für das Substrat Lauryl-CoenzymA in der löslichen und nicht löslichen Fraktion erfolgte mittels Aktivitätsbestimmung bei Substratkonzentrationen von 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 600 μM im Sediment und Konzentrationen von 50, 100, 200- 600 und 800 μM im Überstand. Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurden die mittleren CPM-Werte auf die Konzentration an Non Kollagen Protein in der entsprechenden Fraktion bezogen.

3.12.4 Myristyl-CoenzymA

Die Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen im Homogenat wurde für Myristyl-CoenzymA - Konzentrationen von 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 140, 160, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 und 800 μ mol/l gemessen (*Abb.17*). Wobei die Messungen mit 50, 100, 200, 300-700 μ M insgesamt mindestens viermal durchgeführt wurden. Die Carnitin-Konzentration war bei allen Messungen konstant bei 5 μ M. Weiterhin wurden die Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten der löslichen, im Überstand enthaltenen und der nicht löslichen, an die Mitochondrienmembran gebundenen Fraktion für das Substrat Myristyl-CoenzymA bestimmt. Dazu wurden im Sediment Konzentrationen von 10, 20, 40, 50, 100, 200-700 μ mol/l Myristyl-CoA und im Überstand 50, 100, 200-800 μ M bei konstanter Carnitin-Konzentration (5 μ M) eingesetzt. Die Messungen wurden drei Mal durchgeführt.

3.12.5 Palmityl-CoenzymA

Für die Erstellung der Km-Kurve für das Substrat Palmityl-CoenzymA wurden Konzentrationen von 5, 10, 20, 40 -100, 120, 160 μ mol/l eingesetzt (*Abb.18*). Die einzelnen Messungen wurden 2-7-mal durchgeführt. Aus den ermittelten durchschnittlichen CPM-Werten wurden die spezifischen und unspezifischen Aktivitäten für die jeweiligen Konzentrationen bestimmt (s.o.). Die Konzentration an Carnitin lag konstant bei 5 μ M. Die Bestimmung der Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten im Sediment und Überstand für das Substrat Palmityl-CoenzymA erfolgte mit Substratkonzentrationen von 10, 20, 40, 60, 80, 100 und 120 μ M. Die Messungen wurden mindestens vier Mal durchgeführt und aus den Mittelwerten die spezifische und unspezifische Aktivität berechnet.

3.12.6 Stearyl-CoenzymA

Für die Bestimmung der Acyltransferase-Aktivität im Homogenat für das Substrat Stearyl-CoenzymA wurden Konzentrationen von 5, 10, 40, 50, 80, 100, 150, 200 und 250 μ mol/l gewählt (*Abb.19*). Die Messungen wurden ab einer Konzentration von 10 μ M bis 200 μ M vier Mal durchgeführt und jeweils der Mittelwert zur Berechnung der Aktivitäten herangezogen.

Die Acyltransferase-Aktivität wurde im Sediment mit Stearyl-CoA Konzentrationen von 10, 40, 50, 80, 100, 140 und 150 μ M und im Überstand mit zusätzlich 200 und 250 μ M gemessen. Die Experimente wurden insgesamt drei Mal durchgeführt.

3.13 Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA

Nach der Trennung des Muskelhomogenates in ein lösliches Sediment und einen nicht löslichen Überstand wurde die Hemmbarkeit der erhaltenen Acyltransferase-Fraktionen durch Malonyl-CoA getestet. Zum Vergleich wurden Gesamthomogenat, Sediment und Überstand mit je 20 μ M und 40 μ M Malonyl-CoA versetzt (Abb.20). Es wurden die Substrate Lauryl-CoA und Palmityl-CoA den Acyltransferasen der verschiedenen Fraktionen im suboptimalen Bereich angeboten. Damit sollte eine zusätzliche Substrathemmung durch die Acyl-CoA-Ester selbst umgangen werden. Die Carnitin-Konzentration lag konstant bei 5 μ M, der Proteinwert im Gesamthomogenat lag bei 93,7mg/ml, im Sediment bei 58,9mg/ml und im Überstand bei 44,2mg/ml. Die Messungen wurden für jedes Substrat, jede Fraktion und jede Inhibitor-Konzentration jeweils vier Mal durchgeführt und aus den Mittelwerten die unspezifischen und spezifischen Aktivitäten berechnet.

Die Hemmbarkeit wurde für Lauryl-CoA im Gesamthomogenat mit einer Substratkonzentration von 600 μ M, im Sediment von 200 μ M und im Überstand von 400 μ M gemessen.

Für das Substrat Palmityl-CoA wurde die Hemmbarkeit der Acyltransferase-Aktivität im Gesamthomogenat mit einer Substratkonzentration von 60 μ M, im Sediment mit 40 μ M und Überstand mit 120 μ M gemessen.

3.14 Berechnung der Michaelis-Menten-Konstanten

Mit dem Programm KaleidaGraph wurde aus den erstellten Umsatz-Konzentrations-Kurven die Konzentration des jeweiligen Substrates bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit bestimmt (Michaelis-Menten-Konstante). Dieses erfolgte für das Gesamthomogenat und für die, durch Ultrazentrifugation erhaltenen, Fraktionen Sediment und Überstand. Dabei wurden die Kurvenverläufe, die eine Substratsättigung zeigten, zur Berechnung der einzelnen Parameter nach der Substrathemmungs-Kinetik (entsprechend dem mathematischen Zusammenhang aus Abschnitt 3.15) ausgewertet. Zeigte sich keine Substrathemmung, so erfolgte die Regression nach der Michaelis-Menten-Kinetik.

3.15 Berechnung der Hemmkonzentration I_{50}

Für die Fettsäureester, bei denen die Acyltransferasen der verschiedenen Fraktionen eine Substrathemmung zeigten, wurde die Hemmkonzentration I_{50} berechnet. Dies erfolgte aus den Substrat-Umsatz-Kurven mit Hilfe des Programms KaleidaGraph.

Dabei wurde eine Regression nach folgendem mathematischen Zusammenhang durchgeführt:

$$V = \frac{V_{max}}{(1 + K_m/[S] + [S]/I_{50})}$$

V	Umsatzgeschwindigkeit	[nmol/(min*gFG)]
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit	[nmol/(min*gNCP)]
K _m	Michaelis-Menten-Konstante	[μmol/l]
[S]	Acyl-CoA Konzentration	[μmol/l]
I ₅₀	Hemmkonzentration	[μmol/l]

3.16 Berechnung der katalytischen Effizienz des Substratumsatzes

Aus dem Verhältnis der Maximalgeschwindigkeit und der Michaelis-Menten-Konstante [K_m] wurde die katalytische Effizienz der Carnitin-Acyltransferasen des Muskelhomogenates berechnet. So ist nicht nur eine Aussage über die Bindungsfähigkeit des Enzyms für ein Substrat und die Geschwindigkeit der ablaufenden Reaktion zu treffen, sondern auch die Effektivität des Umsatzes kann bestimmt werden.

$$K_{katalytische\ Effizienz} = \frac{K_{kat}}{K_m} \quad K_{kat} = \frac{V_{max}}{n}$$

Da die Konzentration des Enzyms im Muskelhomogenat unbekannt ist, wurde die katalytische Effizienz vereinfachend angenommen als Verhältnis der Maximalgeschwindigkeit zur Michaelis-Menten-Konstante.

$$K_{katalytische\ Effizienz} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

K _{kat}	katalytische Konstante	[nmol/(min*mol)]
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit	[nmol/(min*gFG)]
K _m	Michaelis-Menten-Konstante	[μmol/l]
n	Stoffmenge der Transferase	[mol]