

## 4. Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Messungen wurden an menschlichen Skelettmuskelhomogenaten durchgeführt. Man geht davon aus, dass sich im Gesamthomogenat die CPT I, CPT II, COT und weitere Acyltransferasen befinden. Nach Ultrazentrifugation erfolgte die Auftrennung der Transferasen in eine lösliche Fraktion, als Überstand bezeichnet und in eine nicht lösliche Fraktion, als Sediment bezeichnet. Es wird angenommen, dass sich die membrangebundenen Carnitin-Acyltransferasen (CPT I und CPT II) im Sediment befinden, während alle nicht membrangebundenen Transferasen (COT) im Überstand löslich sind.

### 4.1 Oktanyl-CoenzymA

Die spezifischen Aktivitäten ergaben Werte von  $0,3 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei  $5 \mu\text{M}$  Oktanyl bis hin zu  $60,78 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 2,5 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei einer Substratkonzentration von  $800 \mu\text{M}$ . Es ergaben sich unspezifische Aktivitäten von maximal  $5592,4 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm \text{SD}$  ( $\text{SD}=230,1$ ) bei Konzentrationen von  $1000 \mu\text{M}$  Oktanyl-CoA. Aus dem Verlauf konnte nicht auf eine Substratsättigung geschlossen werden. Der Proteinwert betrug  $92 \text{mg/ml}$ . (Abb.14)

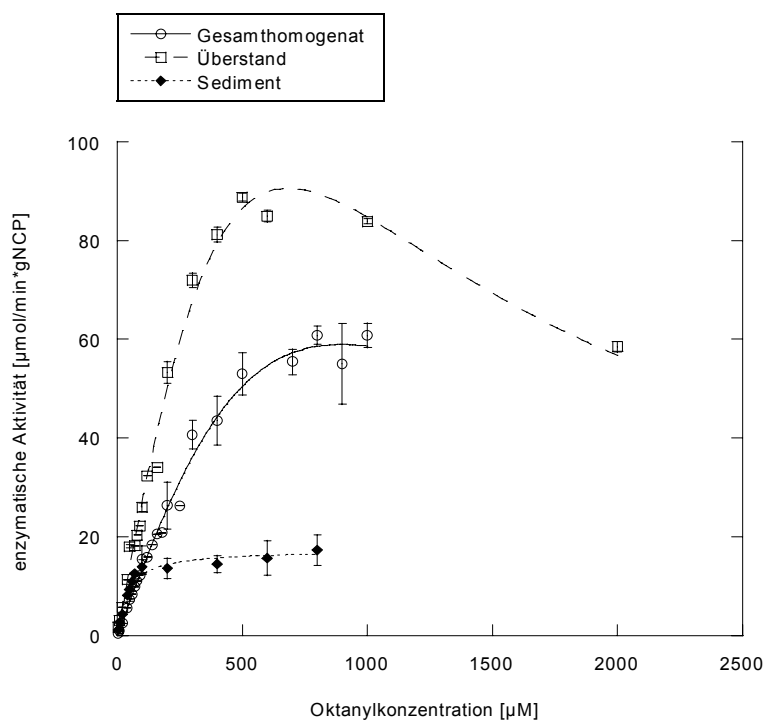


Abb.14: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Oktanyl-CoA (C8-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

Die maximale spezifische Aktivität im Sediment betrug für Oktanyl-CoA  $17,28\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 3\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei einer Konzentration von  $800\mu\text{M}$  und einem Proteinwert von  $58,35\text{mg}/\text{ml}$ . Die unspezifische Aktivität hatte ein Minimum von  $68,2\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  und ein Maximum von  $1008,7\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 175,5\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei  $800\mu\text{M}$ . Im Überstand lag die spezifische Aktivität bei maximal  $88,8\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,78\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei  $500\mu\text{M}$  und einem Proteinwert von  $43,7\text{mg}/\text{ml}$ .

Die unspezifische Aktivität betrug im Überstand maximal  $3880,7\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 34,1\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei  $500\mu\text{M}$ , danach kam es zum Abfall der Aktivität. In dieser Fraktion konnte eine Substratsättigung nicht beobachtet werden.

#### **4.2 Dekanyl-CoenzymA**

Für die spezifischen Aktivitäten ergaben sich im Gesamthomogenat bei einem Proteinwert von  $92\text{mg}/\text{ml}$  Werte von  $0,56\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bis  $30,7\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 2,7\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei einer Dekanyl-CoA-Konzentration von  $400\mu\text{M}$ .

Die unspezifischen Aktivitäten reichten von  $52,3\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei  $5\mu\text{M}$  bis maximal  $2833,2\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 248,3\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei  $400\mu\text{M}$  Dekanyl-CoA. Bei höheren Konzentrationen fiel die Aktivität stetig ab (*Abbildung 15*).

Die spezifischen Aktivitäten im Sediment ergaben Werte zwischen  $7,28\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  (bei  $50\mu\text{M}$ ) und  $11,41\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 1,65\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei einer Substratkonzentration von  $400\mu\text{M}$ . Die unspezifischen Aktivitäten von minimal  $422,5\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei  $50\mu\text{M}$  bis maximal  $661,9\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 96,1\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei  $300\mu\text{M}$ .

Die maximale spezifische Aktivität im Überstand lag bei  $63,81\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 2,34\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei  $400\mu\text{M}$ . Der Proteinwert lag im Sediment bei  $58\text{mg}/\text{ml}$  und im Überstand bei  $43\text{mg}/\text{ml}$ . Die unspezifische Aktivität zeigte ein Minimum von  $625,9\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei Substratkonzentrationen von  $50\mu\text{M}$  und ein Maximum von  $2743,9\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 102,6\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei  $400\mu\text{M}$ .

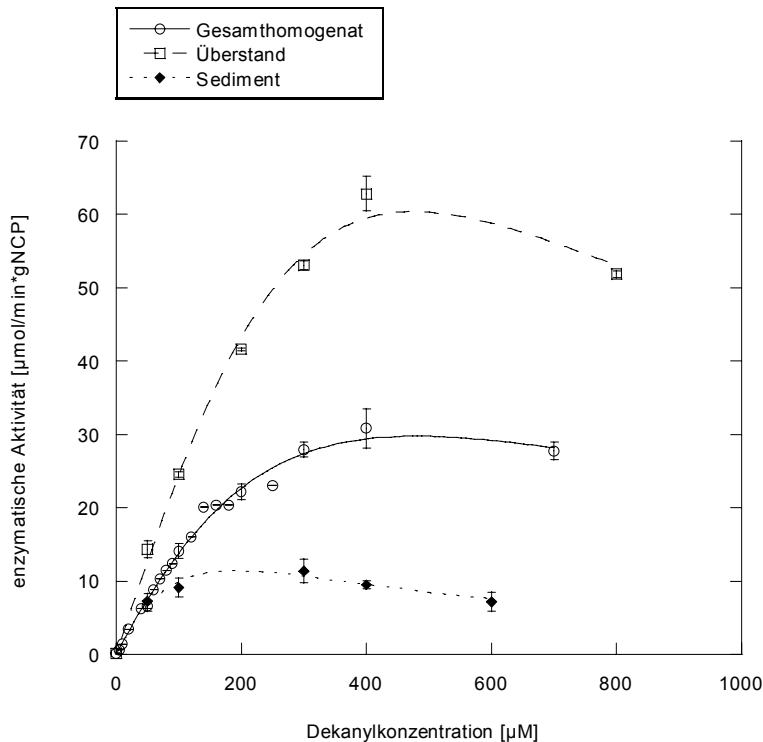


Abb.15: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Dekanyl-CoA (C10-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

### 4.3 Lauryl-CoenzymA

Die spezifische Aktivität ergab im Gesamthomogenat einen maximalen Wert von  $7,8 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,21 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei einem Proteinwert von  $92 \text{mg/ml}$  und einer Lauryl-CoA Konzentration von  $600 \mu\text{M}$ .

Die gemessenen unspezifischen Aktivitäten im Gesamthomogenat reichten von  $35,1 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei  $5 \mu\text{M}$  bis  $720,7 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 19,9 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei einer Konzentration von  $600 \mu\text{M}$ .

Im Sediment zeigten sich spezifische Aktivitäten von  $2,78 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei  $50 \mu\text{M}$  und maximal  $4 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,78 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei einer Substratkonzentration von  $300 \mu\text{M}$ . Dies entsprach unspezifischen Aktivitäten von minimal  $162,6 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei  $50 \mu\text{M}$  und maximal  $236,2 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 45,6 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei  $300 \mu\text{M}$  (Abb. 16).

Die spezifische Aktivität erreichte im Überstand ein Maximum von  $9,6 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,33 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ . Im Überstand lag das Minimum der unspezifischen Aktivität bei  $102,1 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei  $50 \mu\text{M}$  und das Maximum bei  $422,8 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 14,5 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei  $600 \mu\text{M}$ . In beiden Fraktionen zeigte sich eine Substratsättigung. Die

Proteinkonzentration lag im Sediment bei durchschnittlich 58,35mg/ml und im Überstand bei durchschnittlich 43,7mg/ml.

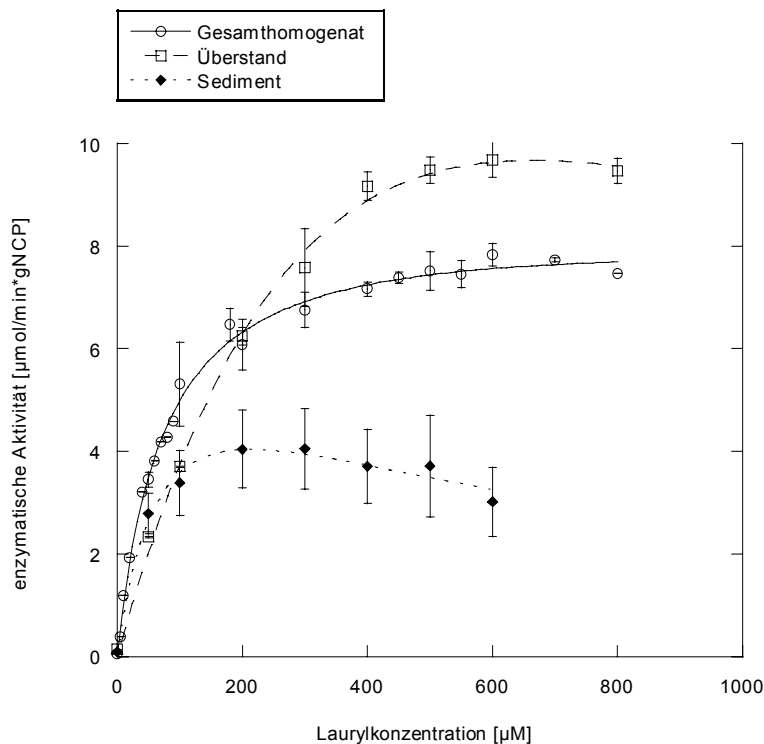


Abb.16: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Lauryl-CoA (C12-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

#### 4.4 Myristyl-CoenzymA

Die maximale spezifische Aktivität im Gesamthomogenat lag bei  $6,71 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,22 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ . Die maximale unspezifische Aktivität erreichte  $617,3 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 20,6 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei einer Konzentration von  $500 \mu\text{M}$  Myristyl-CoA. Bei weiterer Steigerung der Konzentration fiel die Aktivität wieder ab (Abb.17).

Die spezifische Aktivität betrug im Sediment minimal  $1,83 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei  $10 \mu\text{M}$  Myristyl-CoA und maximal  $5,8 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,12 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei  $400 \mu\text{M}$  (Proteinwert: 58,35mg/ml). Die unspezifische Aktivität im Sediment reichte von  $107,2 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei  $10 \mu\text{M}$  bis maximal  $342,3 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 7,3 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei einer Substratkonzentration von  $100 \mu\text{M}$ .

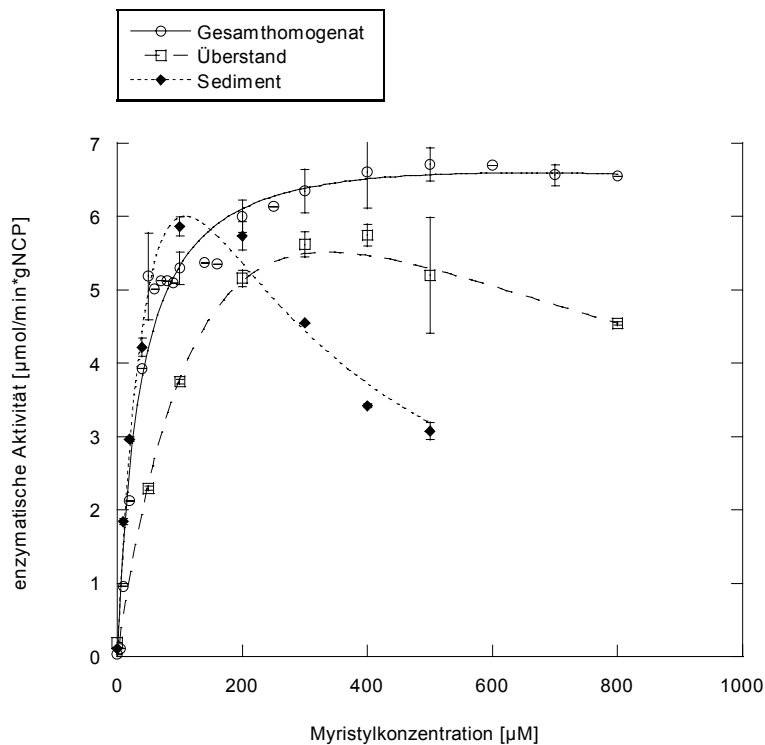


Abb.17: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Myristyl-CoA (C14-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

Die spezifische Aktivität erreichte im Überstand Werte von  $2,29 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei  $50 \mu\text{M}$  bis maximal  $5,74 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,15 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei einer Myristyl-CoA Konzentration von  $400 \mu\text{M}$  und einem Proteinwert von  $43,7 \text{mg/ml}$ .

Die maximale unspezifische Aktivität lag bei einer Substratkonzentration von  $400 \mu\text{M}$  mit  $251,0 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 6,6 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ .

#### 4.5 Palmityl-CoenzymA

Die spezifische Aktivität im Gesamthomogenat ergab einen maximalen mittleren Wert von  $4,11 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm 0,31 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$  bei  $80 \mu\text{M}$  bei einem Proteinwert von  $92 \text{mg/ml}$ . Die mittleren unspezifischen Aktivitäten im Homogenat reichten bis maximal  $378,4 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG}) \pm 29,1 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$  bei  $80 \mu\text{M}$ . Bei Konzentrationen über  $80 \mu\text{M}$  fiel die Aktivität stark ab (bei  $120 \mu\text{M}$ :  $334,7 \text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{gFG})$ ), sodass von einer Substrathemmung ausgegangen werden konnte (Abb.18).

Die maximale spezifische Aktivität erreichte im Sediment  $4,32 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP}) \pm$

0,8 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei 100 $\mu\text{M}$ . Die unspezifische Aktivität betrug im Sediment maximal 252,5 $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 46,2 \text{ nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei 100 $\mu\text{M}$ .

Die maximale spezifische Aktivität erreichte im Überstand Werte von 0,6 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,03\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei einer Substratkonzentration von 80 $\mu\text{M}$ . Es wurden maximale unspezifischen Aktivitäten bei einer Konzentration von 80 $\mu\text{M}$  mit 28,9 $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 1,6\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  gemessen. Die Proteinwerte betragen 58,35 $\text{mg}/\text{ml}$  im Sediment und 43,7 $\text{mg}/\text{ml}$  im Überstand.

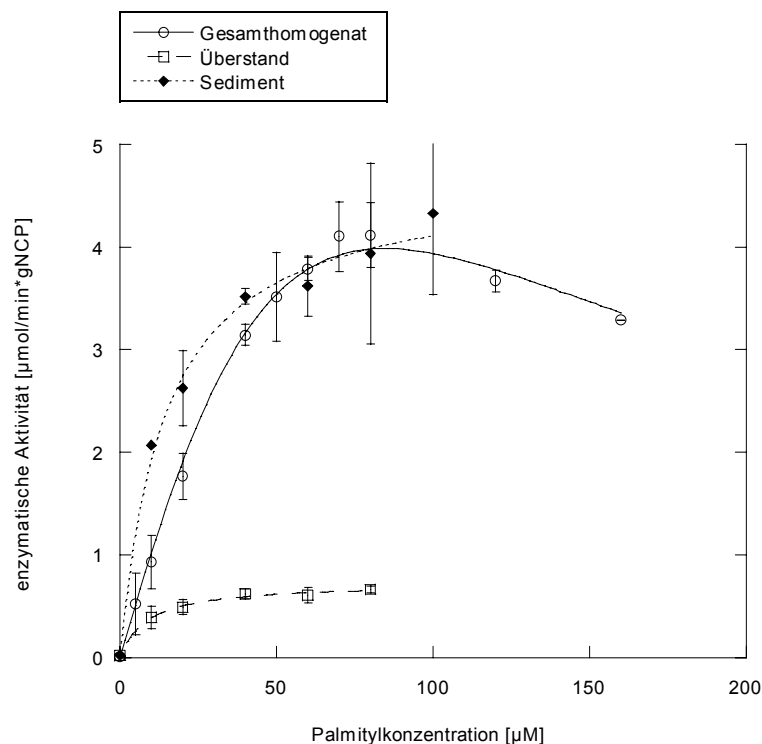


Abb.18: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Palmitoyl-CoA (C16-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

#### 4.6 Stearyl-CoenzymA

Die spezifische Aktivität betrug im Gesamthomogenat maximal 3,3 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,76\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei einer Substratkonzentration von 80  $\mu\text{M}$ . (Proteinwert: 92 $\text{mg}/\text{ml}$ ).

Die maximale unspezifische Aktivität fand sich bei einer Konzentration von 80 $\mu\text{M}$  mit 302,4 $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 70,0\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  und fiel bei höheren Konzentrationen wieder ab, sodass von einer Substratsättigung ausgegangen werden konnte (Abb.19).

Im Sediment war spezifische Aktivität bei 3,4 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,3\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei

einer Substratkonzentration von 80  $\mu\text{M}$  am größten (Proteinwert: 58,35mg/ml).

Es ergab sich eine mittlere maximale unspezifische Aktivität von  $198,8\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 20,9\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$  bei einer Konzentration von  $80\mu\text{M}$ .

Im Überstand war die spezifische Aktivität maximal  $3,2\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP}) \pm 0,1\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei  $140\mu\text{M}$  (Proteinwert: 43,7mg/ml). Die maximale unspezifische Aktivität lag bei  $140\mu\text{M}$  mit  $21,2\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG}) \pm 4,4\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{gFG})$ .

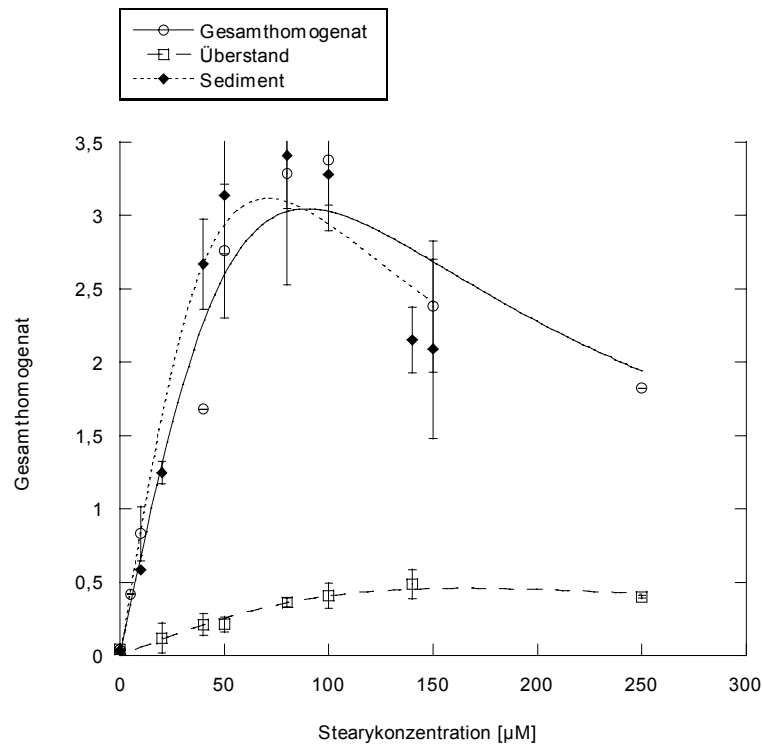


Abb.19: Enzymatische Aktivität der Carnitin-Acyltransferasen für das Substrat Stearyl-CoA (C18-CoA). Die Messungen erfolgten im menschlichen Skelettmuskelhomogenat sowie in der, nach Auftrennung durch Ultrazentrifugation erhaltenen, löslichen und nicht löslichen Fraktion.

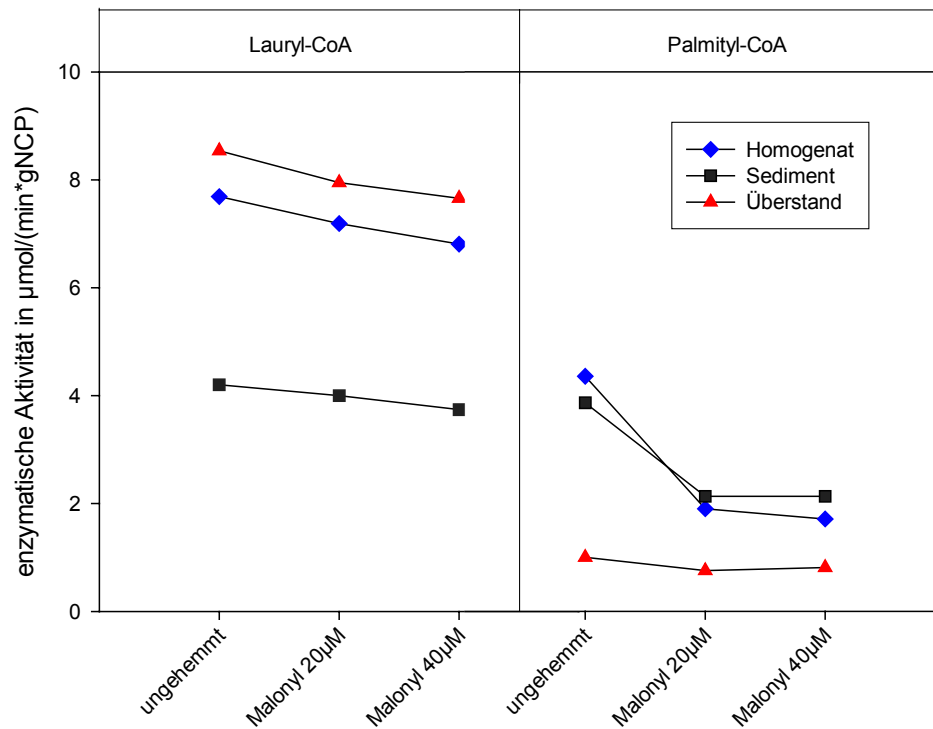
## 4.7 Hemmbarkeit durch Malonyl-CoenzymA

### 4.7.1 Lauryl-CoA

Im Gesamthomogenat wurde bei einer Substratkonzentration von  $600\mu\text{M}$  eine enzymatische Aktivität von  $7,2 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$  bei einer Malonyl-CoA Konzentration von  $20\mu\text{M}$  gemessen. Diese Aktivität fiel bei einer Inhibitor-Konzentration von  $40\mu\text{M}$  auf  $6,81\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{gNCP})$ .

Im Sediment lag die enzymatische Aktivität bei einer Substratkonzentration von  $200\mu\text{M}$  und

einer Inhibitor-Konzentration von 20 $\mu$ M bei 4,0  $\mu$ mol/(min\*gNCP) und bei 40 $\mu$ M bei 3,73  $\mu$ mol/(min\*gNCP). Im Überstand wurde bei einer Substratkonzentration von 400 $\mu$ M Lauryl-CoA gemessen. Dabei zeigte sich bei einer Malonyl-CoA Konzentration von 20 $\mu$ M eine enzymatische Aktivität von 7,95  $\mu$ mol/(min\*gNCP) und bei 40 $\mu$ M Malonyl-CoA fiel die Aktivität auf 7,66  $\mu$ mol/(min\*gNCP)( siehe *Abb.20*).



*Abb.20: Dargestellt ist die Hemmung der unspezifischen Aktivitäten der Carnitin-Acyltransferasen mit 20  $\mu$ M und 40  $\mu$ M Malonyl-CoA für die Substrate Lauryl-CoA und Palmityl-CoA. Die Hemmung wurde im Muskelhomogenat, sowie in den durch Ultrazentrifugation getrennten Fraktionen Sediment und Überstand durchgeführt. Es sind die Mittelwerte aus vier Messungen abgebildet.*

#### 4.7.2 Palmityl-CoA

Im gesamten Homogenat zeigten die mit 20 $\mu$ M Malonyl-CoA gehemmten Acyltransferasen eine enzymatische Aktivität von 1,71 $\mu$ mol/(min\*gNCP). Bei Steigerung der Inhibitor-Konzentration auf 40 $\mu$ M fiel die enzymatische Aktivität auf 1,54 $\mu$ mol/(min\*gNCP).

Im Sediment ergab die Hemmung mit 20 $\mu$ M Malonyl-CoA eine Aktivität von 1,92 $\mu$ mol/(min\*gNCP). Die Steigerung auf 40 $\mu$ M Malonyl-CoA zeigte keine weitere Abnahme der Transferaseaktivitäten. Im Überstand lagen die enzymatischen Aktivitäten nach Zugabe von 20  $\mu$ M Malonyl-CoA bei 0,68  $\mu$ mol/(min\*gNCP) und nach Zugabe von 40  $\mu$ M Malonyl-CoA bei 0,73  $\mu$ mol/(min\*gNCP) (*Abb.20*).



#### 4.8 Michaelis-Menten-Konstanten

Tab.4: Km-Werte [ $\mu\text{M}$ ] der Carnitin-Acyltransferasen in den verschiedenen Fraktionen.

	Michaelis-Menten-Konstanten in $\mu\text{mol/l}$		
	<u>Gesamthomogenat</u>	<u>Sediment</u>	<u>Überstand</u>
Oktanyl-CoA	569	41	175
Dekanyl-CoA	108	37	131
Lauryl-CoA	70	76	212
Myristyl-CoA	37	22	66
Palmityl-CoA	23	14	9
Stearyl-CoA	28	20	47

#### 4.9 Hemmkonzentration $I_{50}$

Tab.5: Hemmkonzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] in den verschiedenen Fraktionen.

	Hemmkonzentration $I_{50}$ in $\mu\text{mol/l}$		
	<u>Gesamthomogenat</u>	<u>Sediment</u>	<u>Überstand</u>
Oktanyl-CoA			2459
Dekanyl-CoA	1950	927	1512
Lauryl-CoA		607	1420
Myristyl-CoA	11747	533	1338
Palmityl-CoA	264		
Stearyl-CoA	295	230	531

#### 4.10 Maximale Umsatzgeschwindigkeiten

Entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik steigt die Umsatzgeschwindigkeit bei steigender Substratkonzentration an. Im Verlauf der Kurve erfolgen dann eine Enzymsättigung und eine asymptotische Näherung des Umsatzes an eine Maximalgeschwindigkeit. Im Falle der Carnitin-Acyltransferasen im Muskelhomogenat kam es bei den Substraten Dekanyl-CoA, Myristyl-CoA, Palmityl-CoA und Stearyl-CoA nach dem Erreichen einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit zu einer Substratsättigung und danach zur Substrathemmung, sodass in diesen Fällen von einer Substrathemmungs-Kinetik ausgegangen werden kann. Im Falle der Substrate Oktanyl-CoA und Lauryl-CoA fand sich im Gesamthomogenat keine Substrathemmung. Die Maximalgeschwindigkeiten wurden aus den spezifischen Aktivitäten errechnet.

Tab.6: Maximale Umsatzgeschwindigkeiten [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ ].

	Maximale Umsatzgeschwindigkeit in $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$		
	<u>Gesamthomogenat</u>	<u>Sediment</u>	<u>Überstand</u>
Oktanyl-CoA	99,5	17,3	138,9
Dekanyl-CoA	43,6	16,2	96,3
Lauryl-CoA	8,5	6,9	12,9
Myristyl-CoA	7,3	8,4	8,3
Palmityl-CoA	6,5	4,7	0,73
Stearyl-CoA	5,4	5,1	0,75

#### 4.11 Katalytische Effizienzen des Substratumsatzes

Tab.7: Katalytische Effizienzen der Acyltransferasen der einzelnen Fraktionen.

	Effizienz des Enzym-Substrat-Umsatzes $V_{\text{max}}/K_m$		
	<u>Gesamthomogenat</u>	<u>Sediment</u>	<u>Überstand</u>
Oktanyl-CoA	0,17	0,42	0,79
Dekanyl-CoA	0,4	0,44	0,74
Lauryl-CoA	0,12	0,09	0,06
Myristyl-CoA	0,2	0,38	0,13
Palmityl-CoA	0,28	0,33	0,08
Stearyl-CoA	0,19	0,26	0,02