

5. Diskussion

Die im menschlichen Skelettmuskel befindlichen Carnitin-Acyltransferasen tragen in ihrer Gesamtheit zur Aktivität des Fettstoffwechsels bei. Die gemessenen Ergebnisse sowie die berechneten Parameter (K_m , I_{50} , V_{max} und die katalytische Effizienz) sind dem zufolge nicht einer einzigen Carnitin-Acyltransferase zuzuordnen. Durch Trennung in lösliche und nicht lösliche Fraktionen wurde eine Unterscheidung von membrangebundenen und zytoplasmatischen Enzymen angestrebt, eine Auftrennung zwischen COT und CPT direkt war unter den gegebenen Versuchsbedingungen (in vitro) nicht möglich, sodass dies bei der Interpretation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden muss. Mögliche Erklärungen der gemessenen Ergebnisse sollen anhand der Enzymstruktur sowie dem Zusammenspiel verschiedener Transferaseaktivitäten im nativen Muskel aufgezeigt werden.

5.1 Michaelis-Menten-Konstanten

Betrachtet man das Gesamthomogenat so fällt auf, dass der K_m -Wert mit zunehmender Kettenlänge der Fettsäureester stetig abfällt und lediglich bei Stearyl-CoA wieder leicht ansteigt (Abb.21).

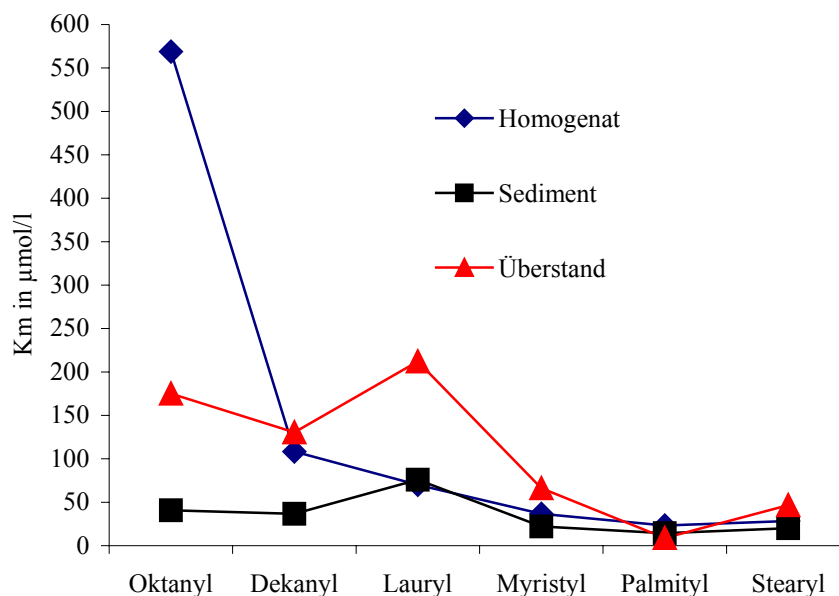


Abb.21: Dargestellt sind die Michaelis-Menten-Konstanten [μM] der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität im Gesamthomogenat und in den, durch Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen, Sediment und Überstand für die Fettsäure-CoA-Ester mit einer Kettenlänge von 8, 10, 12, 14, 16 und 18 Kohlenstoffatomen.

Der niedrigste K_m -Wert findet sich bei Palmityl-CoA, woraus man schließen könnte, dass das spezifischste Substrat für das Carnitin-Acyltransferasen-System des menschlichen Skelettmuskels Palmityl-CoA ist. Schon bei sehr niedrigen (also auch physiologischen) Konzentrationen wird dieses Substrat bevorzugt gebunden.

Am unspezifischsten wird im Gesamthomogenat das mittellangkettige Oktanyl-CoA gebunden, für eine effektive Bindung zwischen Substrat und Enzym sind hier unphysiologisch hohe Konzentrationen nötig. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte die Kettenlänge (8 C-Atome) dieses Substrates bieten. Da Oktanyl-CoA kleiner ist als die anderen untersuchten Fettsäureester, könnte es leichter Zugang zu den katalytischen Zentren der verschiedenen Acyltransferasen bekommen, wäre jedoch für eine spezifische Bindung zu klein. Da der Zugang zum katalytischen Zentrum nicht allein für die Veresterung wichtig ist, sondern auch die Konformation, würden so verhältnismäßig höhere Konzentrationen an Oktanyl-CoA benötigt um denselben Anteil an gebundenem Substrat zu erlangen.

Auch für die Carnitin-Acyltransferasen im Sediment und Überstand zeigte sich der niedrigste K_m -Wert bei Palmityl-CoA. Dies wurde insoweit nicht vermutet, da im Überstand hauptsächlich die COT angenommen wird und für diese nur eine geringe Spezifität für die Bindung von Palmityl-CoA erwartet wurde. Eine mögliche Erklärung könnte die Anwesenheit löslicher Acyltransferasen mit Aktivität für langkettige Acyl-CoA-Ester sein. So wird sowohl in den Peroxisomen als auch in den Mikrosomen eine Acyltransferase-Aktivität für langkettige Fettsäureester angenommen[74;75;91]. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die COT mit Palmityl-CoA eine spezifische Bindung eingeht, dabei würde durch eine Konformationsänderung die Struktur des katalytischen Zentrums so verändert, dass eine größere Bindungstasche entsteht. (siehe *Abb. 10 B*) Die Transferasen im Überstand zeigen im Vergleich zu den Transferasen des Sedimentes für fast alle Fettsäureester höhere K_m -Werte, binden somit insgesamt unspezifischer. Dies ist eventuell auch eine Folge der Fähigkeit zur Konformationsänderung, die eine vielseitige Bindung nur auf Kosten der Spezifität ermöglicht. Außer im Gesamthomogenat zeigten sich, sowohl bei den löslichen, als auch bei den nicht löslichen Transferasen, die geringsten Affinitäten für das Substrat Lauryl-CoA. Auch hier könnte man Ursachen in der Kettenlänge vermuten, wobei die COT in keiner Konformation einen Acylester mit 12 Kohlenstoffatomen spezifisch binden kann.

Insgesamt deuten die erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass sich die löslichen und nicht löslichen Carnitin-Acyltransferasen in ihrer Bindungsspezifität für verschieden langkettige Substrate überschneiden. Somit kann man keine klare Trennung zwischen den Carnitin-Acyltransferasen in Bezug auf ihre Substrate vornehmen. Die nicht löslichen Acyltransferasen

zeigen einen durchweg niedrigen K_m -Wert und somit die Fähigkeit verschiedene Fettsäureester spezifisch zu binden.

5.2 Hemmkonzentrationen (I_{50})

Bei der Mehrzahl der Fettsäure-CoA-Ester kam es bei steigenden Konzentrationen nicht nur zu einer Sättigung des Enzyms mit dem Substrat, sondern auch zu einer Hemmung und damit zum Abfall der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (*siehe Abb.22*). Um der Kinetik der Enzym-Substrat Reaktion gerecht zu werden, musste von einer Substrathemmung ausgegangen werden.

Dabei könnte der Acyl-CoA-Ester ein kompetitiver Inhibitor zu dem zweiten Substrat Carnitin sein und so nicht nur an der eigenen Bindungsstelle angreifen, sondern auch die des Carnitins blockieren [9].

Bei der verwandten Acetyltransferase kommt es durch Palmityl-CoA zur kompetitiven Hemmung der Reaktion. Allerdings agiert hierbei Palmityl-CoA als ein reiner Inhibitor und nicht als Substrat[16;17].

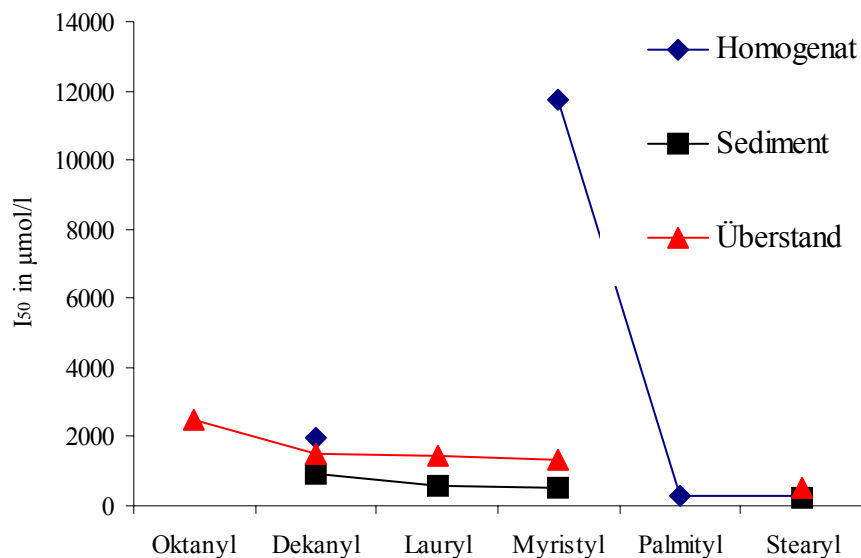


Abb.22: Dargestellt sind die Hemmkonzentrationen I_{50} [μM] der Carnitin-Acyltransferase-Aktivität im Gesamthomogenat und in den, durch Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen, Sediment und Überstand für die Fettsäure-CoA-Ester mit einer Kettenlänge von 8, 10, 12, 14, 16 und 18 Kohlenstoffatomen. Bei den fehlenden Säulen konnte keine Hemmkonzentration bestimmt werden, da es sich um eine reine Michaelis-Menten-Kinetik handelte und keine Substrathemmung vorlag.

Auch eine weitere Bindungsstelle des Acyl-CoA-Esters an der Carnitin-Palmityltransferase, welche durch die Bindung eines Acyl-CoA Moleküls die Konformation der Carnitin-Bindungsstelle verändert und so zu einer Aktivitätsminderung führt, wurde schon lange postuliert [9].

Bei der CPT I fand man heraus, dass die Malonyl-Bindungsstelle nahe des katalytischen Zentrums liegt und die Bindung des Malonyls zu einer kompetitiven Hemmung am katalytischen Zentrum führt, obwohl die Bindungsstelle eine andere ist (siehe *Abb.8*) [71]. Es wäre also auch denkbar, dass diese Bindungsstelle von einem anderen Acylrest besetzt würde und ähnlich dem Malonyl eine Konformationsänderung des katalytischen Zentrums bewirken könnte.

Im Gesamthomogenat ergab sich der niedrigste I_{50} -Wert für das Substrat Palmityl-CoA ($264\mu\text{M}$) gefolgt von Stearyl-CoA ($295\mu\text{M}$). Dies geht konform mit den beobachteten K_m -Werten, sodass Palmityl-CoA sowohl beim Substratumsatz, als auch bei der Substrathemmung der Carnitin-Acyltransferasen eine Sonderstellung einnimmt. Der niedrige I_{50} -Wert spricht dafür, dass die Substrathemmung an der gleichen Stelle, an der auch Malonyl-CoA binden kann, angreift.

Dabei könnte es sich um die Malonyl-CoA Bindungsstelle mit niedriger Affinität für Malonyl-CoA handeln, die in der Nähe des katalytischen Zentrums liegt. Hier käme es zur kompetitiven Inhibition, indem die Bindung des Palmityl-CoA in diesem Bereich die Konformation des katalytischen Zentrums verändert (siehe *Abbildung 8B*).

Auch bei den löslichen und nicht löslichen Carnitin-Acyltransferasen zeigen sich die niedrigeren I_{50} -Werte für Substrate mit höherer Kettenlänge. So ist im Sediment und im Überstand der I_{50} -Wert für Stearyl-CoA am niedrigsten. Dies spricht dafür, dass auch bei der COT die Substrathemmung an einem korrespondierenden (äquivalent zur CPT I) Bereich stattfindet. So konnten Morillas et al. 2000 zeigen, dass auch die COT zwei Bindungsbereiche für Malonyl-CoA besitzt und der nahe dem katalytischen Zentrum liegende ebenfalls verschiedene Acyl-CoA-Ester binden kann [69].

Da also für alle Fraktionen der Carnitin-Acyltransferasen die niedrigsten I_{50} -Werte für Palmityl-CoA (bzw. Stearyl-CoA) gefunden wurden, könnte man davon ausgehen, dass die Substrathemmung immer an der gleichen Stelle der Enzyme abläuft und es sich bei dieser um die Malonyl-CoA-Bindungsstelle nahe des katalytischen Zentrums handelt.

5.3 Maximale Umsatzgeschwindigkeiten

In allen drei Fraktionen sinkt mit steigender Kettenlänge die maximale Umsatzgeschwindigkeit der Carnitin-Acyltransferasen. Dabei ist dieses Verhalten im Gesamthomogenat und im Überstand am stärksten ausgeprägt (Abb.23).

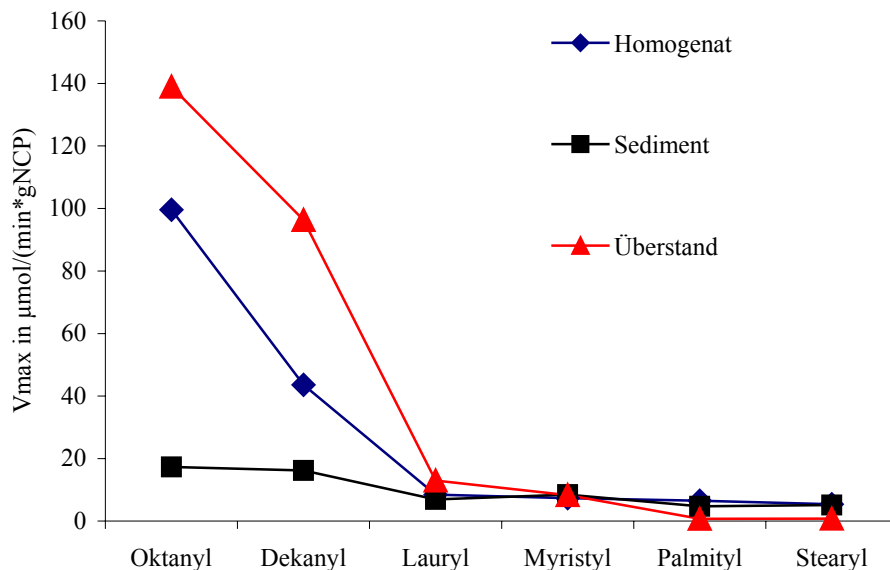


Abb.23: Dargestellt sind die maximalen spezifischen Umsatzgeschwindigkeiten in $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNCP})$ der Carnitin-Acyltransferasen im Gesamthomogenat, Sediment und Überstand für die Fettsäure-CoA-Ester (C8-CoA bis C18-CoA).

Man könnte daraus schließen, dass sich die Aktivitäten der löslichen und nicht löslichen Transferasen nicht gleichmäßig überlappen. So scheint die enorm hohe maximale Umsatzgeschwindigkeit der COT nur bei mittellangkettigen Estern erreicht zu werden, während die CPT im gesamten Bereich der getesteten Fettsäureester ähnlich hohe Umsatzgeschwindigkeiten erreicht. Im Überstand ist nach Dekanyl-CoA ein großer Abfall der Umsatzgeschwindigkeit zu erkennen, sodass die löslichen Transferasen kaum eine Aktivität für Palmityl-CoA und Stearyl-CoA zeigen. Die noch vorhandene Aktivität der Transferasen im Überstand für langkettige Fettsäureester kann einerseits durch mögliche Konformationsänderungen der COT und damit einhergehende Aktivitäten erklärt werden. Andererseits könnten für die gemessenen Aktivitäten lösliche Acyltransferasen der Mikrosomen oder Peroxisomen (siehe Tab.1) verantwortlich sein.

Im Sediment hingegen ist der Abfall der Umsatzgeschwindigkeiten dezenter ausgeprägt. Eindeutig erscheint, dass auch die nicht löslichen Transferasen eine Aktivität für mittellangkettige Substrate zeigen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass nicht die

maximalen Aktivitäten die Effizienz des Enzyms ausdrücken, sondern diese immer noch abhängig von dem K_m -Wert ist. So kann zwar die maximale Umsatzgeschwindigkeit höher sein, doch auch erst bei sehr viel höheren Substratkonzentrationen, während bei gleichen Bedingungen ein anderes Enzym schneller arbeitet (siehe Abschnitt 5.4).

Auch die Tatsache, dass im Überstand bis zum Substrat Lauryl-CoA durchweg höhere Umsatzgeschwindigkeiten erreicht werden als im Sediment, spricht nicht für geringere Effizienzen der Transferasen im Sediment. Dies zeigt lediglich, dass die löslichen Transferasen in ihrer Gesamtheit ihre maximalen Umsatzgeschwindigkeiten bei mittellangkettigen Fettsäureestern erreichen. Diese gemessenen Aktivitäten wurden jedoch erst bei sehr hohen Substratkonzentrationen erreicht und lassen keinesfalls Rückschlüsse auf die Situation im Skelettmuskel unter physiologischen Bedingungen zu. Es ist bisher noch nicht bekannt, wie viel Mol an Transferasen sich im Homogenat befinden und welcher Anteil davon löslich ist. So ist es durchaus möglich, dass das Verhältnis von COT zu CPT zu Gunsten der COT verschoben ist. Um darüber konkrete Aussagen zu machen, müssten Untersuchungen zum Transferasengehalt im Muskel durchgeführt werden. Dies könnte Inhalt weiterführender Studien sein, würde aber den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

5.4 Katalytische Effizienzen

Die katalytische Effizienz beschreibt die Fähigkeit eines Enzyms ein Substrat spezifisch umzusetzen. Die berechneten Ergebnisse stellen sowohl die Fähigkeit der Transferasen zur spezifischen Substratbindung, als auch zum Umsatz des Substrates dar.

Im Gesamthomogenat zeigt sich für die katalytischen Effizienzen ein zweigipfliger Verlauf mit dem ersten Maximum für Dekanyl-CoA und einem zweiten Maximum für Palmityl-CoA. Dies zeigt das Nebeneinander von Carnitin-Acyltransferase-Aktivitäten für mittellangkettige und für langkettige Fettsäureester. Dabei kommt es zur Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten der CPT und der COT, sowie weiterer im Skelettmuskel vorhandener Acyltransferase-Aktivitäten. Dekanyl-CoA ist das spezifische Substrat für die COT und Palmityl-CoA für die CPT (*Abb. 25*). Diese gemessenen Maxima setzen sich wahrscheinlich aus den Aktivitäten mehrerer Acyltransferasen zusammen, sodass abweichende Maxima nach Auftrennung in lösliche und nicht lösliche Fraktionen durchaus erklärbar sind (Vgl. *Abb. 25 und 26*). So wurde bei den löslichen Transferasen zwar ebenfalls ein Maximum für langkettige Fettsäureester gefunden, dieses lag allerdings bei Myristyl-CoA. Geht man davon aus, dass lösliche Acyltransferasen mit einer Aktivität für langkettige Fettsäuren existieren [74;75;91], so läge deren Maximum bei einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen.

Nach Auftrennung zeigen sich Oktanyl-CoA und Dekanyl-CoA als die spezifischen Substrate

für die löslichen Transferasen (*Abb.27*). In der Arbeit von Miyazawa et al. (1983) wurde für das Substrat Dekanyl-CoA eine 7fach höhere Aktivität der COT im Vergleich mit dem Substrat Palmityl-CoA gefunden [68]. Dies unterstützt das hier beobachtete Verhältnis der katalytischen Effizienzen der COT für Dekanyl-CoA: Palmityl-CoA von 9:1. Für das Substrat Lauryl-CoA wurde von Miyazawa et al. (1983) eine 4fach höhere Aktivität der COT im Vergleich zu Palmityl-CoA beschrieben, dies differiert mit dem hier berechneten Verhältnis von 3:4. Allerdings wurden die genannten Ergebnisse an isolierten Hepatozyten gefunden [68]. Im Sediment zeigt sich ebenfalls ein zweigipfliger Verlauf an mit Maxima bei Dekanyl-CoA und Myristyl-CoA/Palmityl-CoA (*Abb.26*). Eine Vermutung für das erste Maximum ist die Anwesenheit von membrangebundenen Acyltransferasen mit einer Aktivität für mittellangkettige Fettsäuren, dies ist jedoch rein spekulativ. Eventuell sind auch bei der CPT Konformationsänderungen möglich die dieses Enzym zum spezifischen Umsatz von mittellangkettigen Fettsäureestern befähigen. Eindeutig scheint der schlechte Umsatz des Substrates Lauryl-CoA zu sein. Im Vergleich der katalytischen Effizienzen zeigte sich im Gesamthomogenat und im Sediment die geringste katalytische Effizienz für das Substrat Lauryl-CoA, lediglich im Überstand war sie für Stearyl-CoA noch niedriger (*Abb. 25, 26,27*). Im Vergleich der getrennten Fraktionen wird deutlich, dass nur für die Substrate Oktanyl-CoA und Dekanyl-CoA die Transferasen des Überstandes eine höhere katalytische Effizienz haben und ab dem Substrat Lauryl-CoA sich dieses Verhältnis umdreht. Das Verhältnis der katalytischen Effizienzen von membrangebundenen zu löslichen Transferasen verschiebt sich mit zunehmender Kettenlänge des Acyl-CoA-Esters immer mehr in Richtung der membrangebundenen Transferasen (*Abb. 24*).

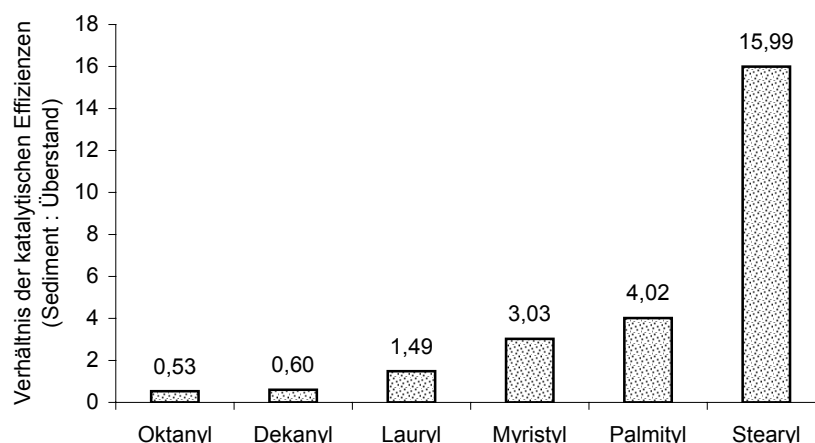


Abb.24: Dargestellt sind die Verhältnisse der katalytischen Effizienzen der löslichen zu den nicht löslichen Carnitin-Acyltransferasen.

Abb.25:

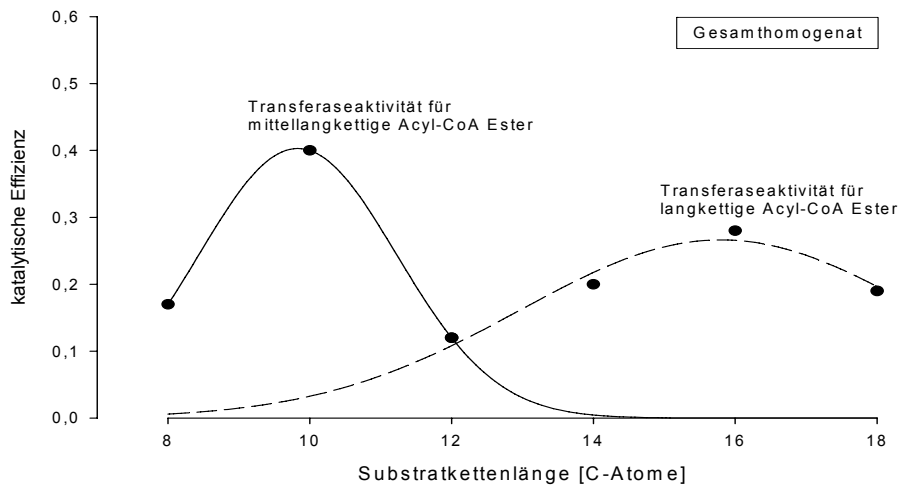


Abb.26:

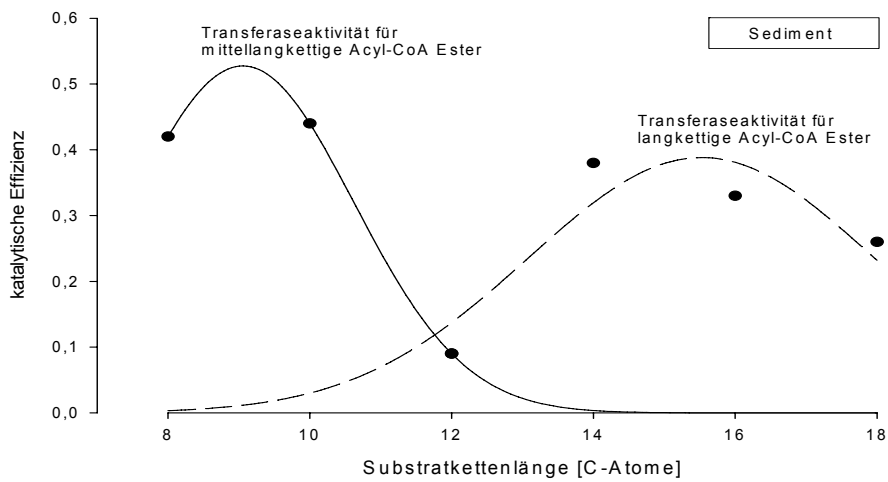


Abb.27:

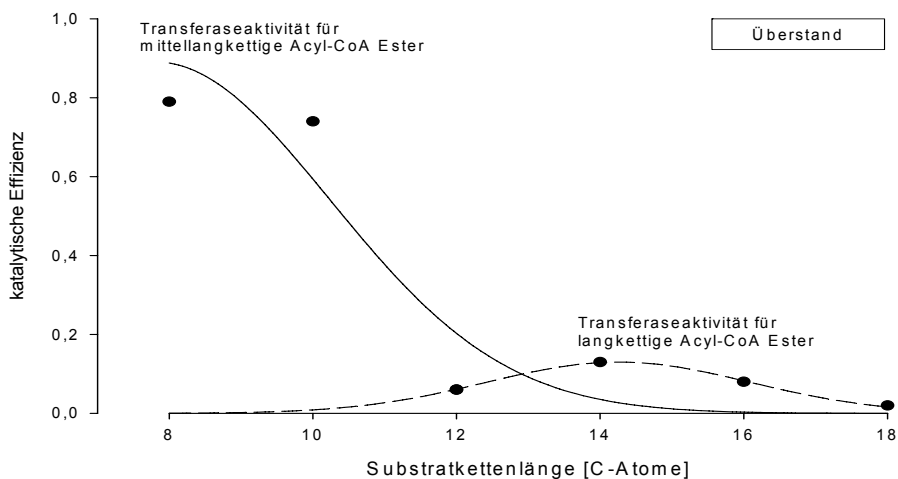


Abb.25,26,27: Katalytische Effizienzen der Gesamtheit (Abb.25) sowie der membrangebundenen (Abb.26) und löslichen (Abb.27) Transferasen des menschlichen Skelettmuskels. Hypothetische Darstellung zweier sich überlappender Acyltransferase-Aktivitäten.

5.5 Hemmung der Carnitin-Acyltransferasen durch Malonyl-CoA

Ein wichtiger Regulator im Fettstoffwechsel ist das Malonyl-CoA, welches als Ausgangspunkt der Fettsäuresynthese die entgegen gerichtete β -Oxidation unterdrückt. So gilt es als wichtiger Inhibitor der Carnitin-Palmityltransferase. Außerdem ist die Aktivität der Carnitin-Oktanyltransferase durch Malonyl-CoA hemmbar [8]. Bei Zugabe von Malonyl-CoA zum gesamten Muskelhomogenat kommt es nicht nur zur Aktivitätsminderung der CPT, sondern auch der COT und eventuell noch weiterer Malonyl-CoA sensitiver Carnitin-Acyltransferasen. In bisherigen Studien zur Hemmbarkeit der CPT wurde die COT nicht mit berücksichtigt [42]. Ein Ziel der Arbeit war es, herauszufinden in wieweit sich die Hemmbarkeit der Acyltransferase-Aktivitäten in den, durch Ultrazentrifugation getrennten, Fraktionen unterscheidet.

Geht man davon aus, dass sich im Sediment, die an die Mitochondrienmembran gebundene CPT I und CPT II befindet, so würde die Aktivität nach bisherigen Erkenntnissen um circa zwei Drittel gehemmt werden [42]. Wenn die COT auch Malonyl-CoA sensitiv ist, dann würde man bei Abtrennung dieser ein anderes Verhältnis von Malonyl-CoA sensitiver zu nicht sensitiver CPT erwarten.

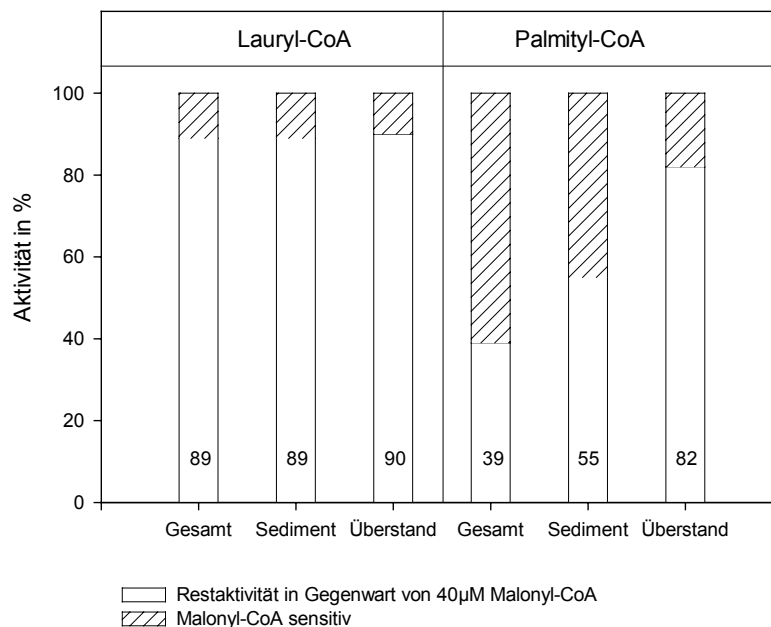


Abb.28: Restaktivität der Carnitin-Acyltransferasen für die Substrate Lauryl-CoA und Palmityl-CoA bei Hemmung mit 40 μ M Malonyl-CoA (angegeben in Prozent in den Säulen). Verglichen wurden die Transferaseaktivitäten des Gesamthomogenats mit der löslichen und unlöslichen Fraktion.

Wie in *Abbildung 28* dargestellt, kam es im gesamten Muskelhomogenat zu einem stärkeren Abfall der Carnitin-Transferaseaktivität für Palmityl-CoA, als dies im Sediment der Fall war. Daraus könnte man schlussfolgern, dass die, im Gesamthomogenat befindliche, Malonyl-CoA sensitive Transferaseaktivität sich aus der CPT (I) und der COT zusammensetzt. Allerdings bestünde auch die Möglichkeit einer weiteren Malonyl-CoA sensitiven Transferaseaktivität, die sich nach Zentrifugation ebenfalls im Überstand befindet. So wurde zum Beispiel eine an die Mikrosomenmembran gebundene Malonyl-CoA sensitive Transferaseaktivität postuliert [89]. Aber auch am rauen und glatten endoplasmatischen Retikulum wird eine Malonyl-CoA sensitive Carnitin-Acyltransferase vermutet [57]. Diese ist weder mit der CPT noch mit der COT identisch und stellt so eine weitere Acyltransferase-Aktivität für mittel bis langkettige Fettsäureester dar. Lilly et al. konnten zeigen, dass diese mikrosomale Transferase stark hemmbar durch Malonyl-CoA ist. So wurde die Aktivität mit dem Substrat Dekanyl-CoA bei einer Konzentration von $17\mu\text{M}$ Malonyl-CoA vollständig gehemmt [57].

Somit ist der hemmbare Anteil der CPT nicht wie bisher vermutet zwei Drittel, sondern nur circa 45 Prozent. Geht man also davon aus, dass im Sediment nur die CPT I Malonyl-CoA sensitiv ist, könnte man vermuten, dass sich die gesamte CPT-Aktivität etwa 1:1 aus CPT I und CPT II zusammensetzt.

Auch die Rolle der Acyl-CoA-Synthetase, der eine Transferaseaktivität zugeschrieben wird, könnte auf die gegebene Konstellation einen Einfluss haben [73]. Die Hemmbarkeit der Transferaseaktivität durch Malonyl-CoA ist im Gesamthomogenat und auch im Sediment für das Substrat Palmityl-CoA am stärksten ausgeprägt, sodass man daraus schließen könnte, dass es sich bei dieser um die CPT handelt.

Zur genaueren Untersuchung der Malonyl-CoA Sensitivität der Acyltransferasen wurde das Substrat Lauryl-CoA dem Enzym angeboten. Für dieses Substrat ist die Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) im Gesamthomogenat etwas höher als für Palmityl, allerdings ist die katalytische Effizienz wesentlich geringer.

Der inhibitorische Effekt des Malonyl-CoA fiel für das Substrat Lauryl-CoA sowohl im Gesamthomogenat, als auch im Überstand und Sediment wesentlich geringer aus. Außerdem könnte man erwarten, dass sich im Sediment für Lauryl ein ähnliches Verhältnis von sensitiver zu nicht sensitiver Transferaseaktivität zeigt. In der Fraktion der löslichen Transferasen ist die Aktivitätsminderung mit $40\mu\text{M}$ Malonyl-CoA für Lauryl-CoA fast genau so stark ausgeprägt wie bei dem Substrat Palmityl-CoA. Dieser vergleichbar hohe Aktivitätsverlust des Überstandes bei Lauryl und Palmityl lässt sich durch eine ähnliche katalytische Effizienz der löslichen Acyltransferase für diese Substrate erklären. Hingegen ist

die katalytische Effizienz der nicht löslichen CPT für Palmityl-CoA wesentlich höher als für Lauryl-CoA. Damit konform geht die Beobachtung, dass sich die im Sediment befindliche CPT bei der Umsetzung des Substrates Lauryl-CoA nur zu 11% durch Malonyl-CoA hemmen lässt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich im Sediment außer der CPT noch weitere Acyltransferasen befinden, die Lauryl verestern und wenig Malonyl-CoA sensitiv sind. Dennoch deuten die Ergebnisse eher darauf hin, dass Lauryl-CoA hauptsächlich von der löslichen Acyltransferase-Aktivität umgesetzt wird und diese nur zu circa 10 % Malonyl-CoA sensitiv ist.

Insgesamt lassen sich folgende Schlüsse in Bezug auf die Malonyl-CoA-Sensitivität zusammenfassen:

1. Sowohl die nicht lösliche, als auch die lösliche Transferaseaktivität besitzen einen Malonyl-CoA sensitiven und einen nicht sensitiven Anteil.
2. Die Malonyl-CoA Sensitivität ist bei der nicht löslichen Transferase stärker ausgeprägt.
3. Die Hemmbarkeit der Transferasen ist im gesamten Homogenat und im Sediment am stärksten für das Substrat Palmityl-CoA.
4. Im Überstand sind die hemmbaren Anteile bei beiden Substrate vergleichbar.
5. Die Malonyl-CoA sensitive Transferase wird hauptsächlich durch die CPT repräsentiert.
6. Auch die COT ist Malonyl-CoA sensitiv, allerdings in geringerem Maße als die CPT.

5.6 Zusammenfassende Gegenüberstellung von Gesamthomogenat, Sediment und Überstand

Im zusammenfassenden Vergleich der Substrate zeigen sich eine stetig abnehmende maximale Aktivität und ein abnehmender Km-Wert bei zunehmender Kettenlänge (*Abb. 29*). Am wahrscheinlichsten tragen zu den beobachteten Aktivitäten die CPT I und II der Mitochondrien, die COT der Peroxisomen und eine Carnitin-Acyltransferase der Mikrosomen und des endoplasmatischen Retikulums (die weder mit der COT noch mit der mitochondrialen CPT identisch ist) bei [57]. Nach einer Studie von Guzman und Geelen (1992) soll sich die Gesamtaktivität zu 75 Prozent aus mitochondrialer CPT-Aktivität und zu 25 Prozent aus peroxisomaler Transferaseaktivität zusammensetzen [38]. Allerdings wurden in genannter Arbeit die beiden Aktivitäten nach Hemmbarkeit durch Malonyl-CoA und TDGA getrennt

(als CPT I wurde eine Malonyl-CoA und TDGA sensitive Transferaseaktivität und als COT eine Malonyl-CoA sensitive und TDGA insensitive Aktivität angenommen). Die Rolle der Acyltransferasen der Mikrosomen wurde nicht berücksichtigt. Des Weiteren fanden Abo-Hashema et al. (1999) heraus, dass die mikrosomale Acyltransferase schon bei physiologischen Malonyl-CoA-Konzentrationen gehemmt wird und so die Acylester bevorzugt durch die mitochondriale CPT verstoffwechselt werden [2]. Wird diese jedoch spezifisch gehemmt oder ist mit Substraten überladen, wird die peroxisomale β -Oxidation induziert [49]. So arbeiten die verschiedenen Carnitin-Acyltransferasen Hand in Hand und ihre Regulation erscheint als ein komplexer Zusammenhang aus Induktion und Hemmung durch die verschiedenen Substrate.

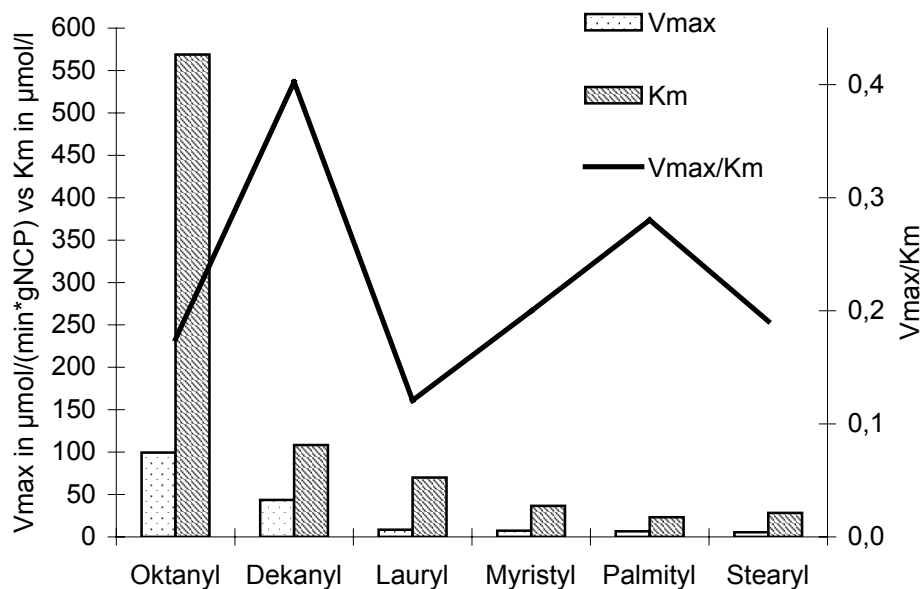


Abb.29: Michaelis-Menten-Konstante, Maximalgeschwindigkeiten und katalytische Effizienzen als Quotient aus beiden (V_{max}/K_m) für die verschiedenen Substrate der Carnitin-Acyltransferasen im Gesamthomogenat.

Der Anteil der Transferaseaktivität der Peroxisomen ist höchst wahrscheinlich nicht statisch, sondern sehr variabel und abhängig von den verschiedenen Versuchsbedingungen.

In den *Abbildungen 30 und 31* sind die Enzymkinetikparameter nach Auftrennung in lösliche und nicht lösliche Fraktion dargestellt. Es ist nicht zu beweisen, ob sich durch diese Auftrennung die Aktivität in den Peroxisomen oder Mitochondrien ändert, da die gegenseitigen Einflüsse der Carnitin-Acyltransferasen dadurch wegfallen.

Abb.: 30

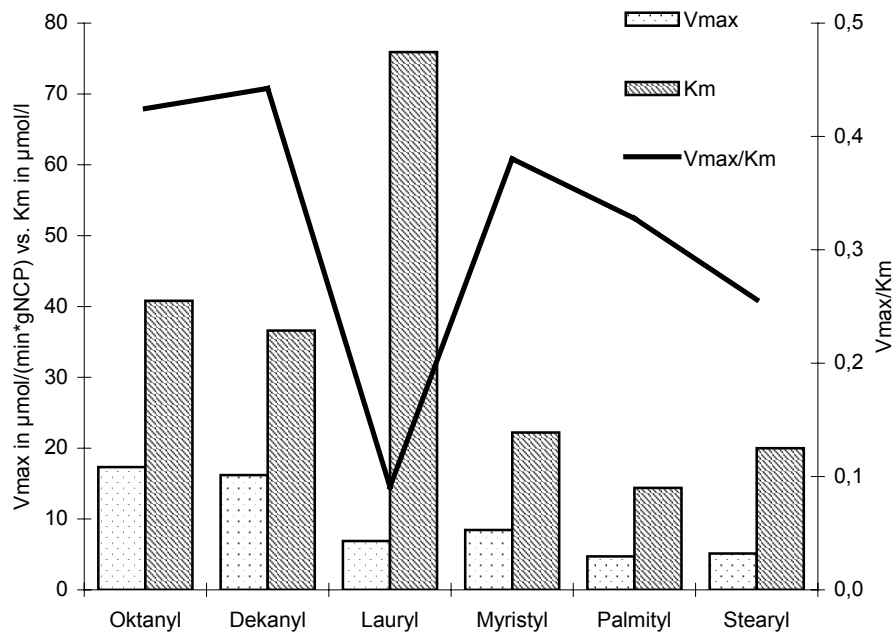


Abb.31:

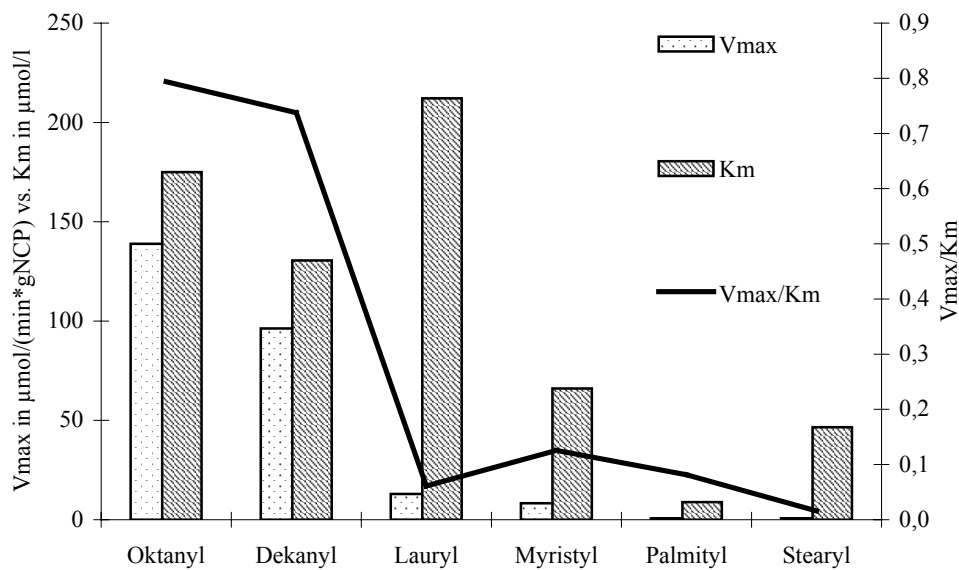


Abb.30 und 31: Dargestellt sind die Michaelis-Menten-Konstante, die Maximalgeschwindigkeit und die katalytischen Effizienz als Quotient aus beiden (V_{max}/K_m) für die verschiedenen Substrate der nicht löslichen Carnitin-Acyltransferase im Sediment (Abb. 30) und der löslichen Carnitin-Acyltransferase im Überstand (Abb. 31).

Durchgängig nachzuweisen war die schlechte katalytische Effizienz für das Substrat Lauryl-CoA. Auch die Affinität der Carnitin-Acyltransferasen aller Fraktionen war für dieses Substrat am geringsten (siehe die hohen K_m -Werte). Eventuell trägt die Kettenlänge von 12

Kohlenstoffatomen, die weder Palmitoyl-CoA (16 C-Atome) noch Oktanoyl-CoA (8 C-Atome) nahe kommt zu dieser schlechten Affinität bei. Diese Ergebnisse widersprechen deutlich den Beobachtungen von Schäfer et al. (1997), die mit peripheren Blutzellen und Fibroblasten gemacht wurden [85]. In allen untersuchten Fraktionen ist die Aktivität und die katalytische Effizienz der Transferasen für Oktanoyl-CoA und Dekanoyl-CoA am höchsten.

Dies könnte bei der COT durch die Größe der Tasche, in der das Substrat gebunden wird, erklärt werden, denn bei Substraten die längerkettig sind fällt die maximale Umsatzgeschwindigkeit ab. Wahrscheinlich muss das Enzym erst seine Konformation ändern, damit auch langkettige Fettsäuren gebunden werden können (siehe Abschnitt 1.5.3).

Im Falle der membrangebundenen Transferasen wird die schlechte Spezifität der Enzyme für die mittellangkettigen Fettsäureester durch eine höhere maximale Umsatzgeschwindigkeit ausgeglichen. Eine mögliche Erklärung für die hohen beobachteten Umsatzgeschwindigkeiten bei der CPT wäre der leichtere Zugang des relativ kleinen Substrates Oktanoyl-CoA zum katalytischen Zentrum.