

Untersuchung eines Multienzymkomplexes: die Fettsäuresynthetase aus Schweineleber

Doctoral Thesis

Author(s):

Hotz, Peter Carl

Publication date:

1979

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000212408>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH 6181

**UNTERSUCHUNG EINES MULTIENZYMKOMPLEXES:
DIE FETTSÄURESYNTHETASE AUS SCHWEINELEBER**

**Abhandlung
zur Erlangung**

**des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH**

**vorgelegt von
PETER C. HOTZ
dipl. Chem. ETH
geboren am 27. Januar 1949
von Hombrechtikon (Kt. Zürich)**

**Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. Zuber, Referent
PD Dr. H. Dutler, Korreferent**

1979

3. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Isolierung und Reinigung des Multienzymkomplexes wurde wesentlich modifiziert. Insbesondere brachte die Einführung einer Affinitätschromatographie an Blue Dextran Sepharose eine starke Verkürzung der Aufarbeitungszeit und führte genügend schnell zur Abtrennung der Proteasen, sodass erstmals ein vollständig reines Produkt erhalten wurde.
2. Elektrophoretische Untersuchungen zeigten, dass der Enzymkomplex aus Untereinheiten vom halben Molekulargewicht des nativen Komplexes besteht. Eine Untereinheit besteht somit aus einer einzigen multifunktionellen Polypeptidkette mit mindestens sechs verschiedenen aktiven Stellen.
3. Der Enzymkomplex lässt sich in einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration in seine Untereinheiten dissoziieren. Dabei verschwindet die Aktivität des Kondensationsenzym.
4. Die Anzahl der 4'-Phosphopantetheinbindungsstellen wurde durch eine Taurinbestimmung mittels Aminosäure-Analyzer bestimmt. Es konnten 1.6 mol 4'-Phosphopantethein pro mol Enzym ermittelt werden, sodass jede Untereinheit mit grösser Wahrscheinlichkeit ihren eigenen 4'-Phosphopantetheinarm hat.
5. Bei der Fettsäuresynthetase aus Schweineleber handelt es sich daher um ein dimeres multifunktionelles Enzym und nicht, wie bisher angenommen, um einen Multienzymkomplex im ursprünglichen Sinne.
6. Die einzelnen Reaktionsschritte der Fettsäuresynthese wurden mit steady-state- und presteady-state-kinetischen Methoden

untersucht und ihre Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung bestimmt. Die Kondensationsreaktion konnte dabei als den geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt identifiziert werden.

7. Ebenfalls aus presteady-state-kinetischen Untersuchungen konnte die Evidenz einer negativen Kooperativität der Untereinheiten des multifunktionellen Enzyms abgeleitet werden. Die beiden funktionellen Einheiten arbeiten dabei abwechslungsweise wie ein Flip-Flop-Mechanismus.
8. Durch Inhibition mit Jodacetamid und Cerulenin konnte spezifisch die Kondensationsreaktion, durch Inhibition mit Phenylmethansulfonylfluorid spezifisch die Transferasen blockiert werden.
9. Mittels Affinitätsmarkierung mit p-Azidobenzoyl-¹⁴C-Coenzym A konnten zwei Bindungsstellen für Coenzym A identifiziert werden. Das Enzym besitzt somit zwei verschiedene Transferasen.
10. Ein neuartiges Modell über die Struktur und Funktionsweise des multifunktionellen Enzyms der Fettsäuresynthetase aus Schweineleber wird diskutiert. Die Kooperativität der Untereinheiten ist das Resultat einer Konformationsänderung des Enzyms. Es wird als plausibel erachtet, dass diese Konformationsänderung durch die Uebertragung des am 4'-Phosphopantetheinarm gebundenen Malonylrestes von der Malonyltransferase zum Kondensationsenzym hervorgerufen wird.

4. ABSTRACT

The isolation and purification of the multienzyme complex has been modified. An affinity chromatography on blue dextran sepharose resulted in a decrease of isolation time and made it possible to remove the proteases in an early state. Electrophoretic investigations showed that the multienzyme complex is built of only two identical multifunctional polypeptide chains. The separation of these two subunits effected a complete loss of activity of the condensing enzyme. Determination of the 4'-phosphopantethein content resulted in the fact, that there are 1.6 mole per mole of enzyme. Thus, the fatty acid synthetase is a dimer of a multifunctional enzyme rather than a multienzyme complex in the common sense. From affinity labeling with p-azido-benzoyl-¹⁴C-coenzyme A two binding sites for the coenzyme were derived, so that there are two different transferase activities in the enzyme. From presteady-state kinetic investigations, a negative cooperativity of the two subunits could be derived. The condensation reaction has been determined as the rate-limiting step in the overall fatty acid synthesis, and a new model of structure and mechanism of the multifunctional enzyme is discussed.