ETH zürich

ETH Library

Die e-Oxydoreduktase aus Schweineleber und deren Identifikation als Bestandteil einer Fettsäuresynthetase

Doctoral Thesis

Author(s):
Kull, Arthur

Publication date:
1970

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000194554

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. Nr. 4447

DIE e-OXYDOREDUKTASE AUS SCHWEINELEBER UND DEREN IDENTIFIKATION ALS BESTANDTEIL EINER FETTSÄURESYNTHETASE

ABHANDLUNG

zur Erlangung
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

ARTHUR KULL

dipl. Ing.-Chem. ETH
geboren am 11. Oktober 1940
von Niederlenz (Kt. Aargau)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. V. Prelog, Referent
P.-D. Dr. H. Dutler, Korreferent

Juris-Druck + Verlag Zürich
1970

3. ZUSAMMENFASSUNG

3.1. Die von WALDVOGEL [3] ausgearbeitete Vorschrift zur Isolierung der e-Oxydoreduktase aus Schweineleber wurde überprüft und für die Gewinnung des Enzyms in präparativem Masstab wesentlich abgeändert. Aus einem Ansatz gelang es, innerhalb von 8 - 10 Tagen, je nach Enzymgehalt der Leber, zwischen 50 und 200 mg des reinen Enzyms zu erhalten.

3.2. Das gereinigte Enzympräparat verhielt sich bei der Analyse mit der Disk-Elektrophorese und der Ultrazentrifuge als einheitliches Protein, welches mindestens 95 % rein war.

3.3. Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass neben dem pH (WALDVOGEL[3]) vor allem die Proteinkonzentration, die Pufferkonzentration und das Vorhandensein von Dithiothreitol für die Erhaltung der Aktivität sehr wichtig sind. Es wurde eine Methode entwickelt, welche eine zweimonatige Aufbewahrung des Enzyms ohne Aktivitätsverlust erlaubt.

3.4. Die Charakterisierung des Enzyms als Fettsäuresynthetase der Schweineleber gelang durch den Nachweis, dass 1. NADPH durch das Modellsubstrat S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin einerseits und die natürlichen Substrate Acetyl-CoA und Malonyl-CoA anderseits mit den für Fettsäuresynthetasen typischen Reaktionsgeschwindigkeiten oxydiert wird und 2. die synthetisierten Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure ^{14}C enthalten, wenn 1-^{14}C-Acetyl-CoA und nicht markiertes Malonyl-CoA als Substrate verwendet werden.

3.5. Die e-Oxydoreduktase-Aktivität konnte, wie ursprünglich angenommen, der β-Ketoacylenzym-Reduktase innerhalb des Fettsäuresynthetase-Komplexes zugeschrieben werden, da 1. die e-Oxydoreduktase- und die Fettsäuresynthetase-Aktivität durch keine der verwendeten chromatographischen Methoden aufgetrennt wurden und 2. das Modellsubstrat S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin mit einer Reaktionsgeschwindigkeit reduziert wird, welche mit der bei der Fettsäuresynthetase aus Hefe[17] beobachteten vergleichbar ist.

3.6. Die maximalen Geschwindigkeiten und die Michaelis-Konstanten von verschiedenen aliphatischen und alicyclischen Carbonylverbindungen wurden bestimmt. Aus einer vergleichenden Betrachtung dieser Konstanten gelang es, eine Aussage über die Topographie der aktiven Stelle zu machen.

3.7. Die kinetische Analyse der Fettsäuresynthese ergab, dass hohe Acetyl-CoA-Konzentrationen eine Substratinhibition verursachen, welche mit Malonyl-CoA nicht beobachtet wird.

3.8. Bei der Untersuchung des Einflusses der Palmityl-CoA-Konzentration auf die Geschwindigkeit sowohl der e-Oxydoreduktase- als auch der Fettsäuresynthetase-Reaktion gelang es, für die Enzym- und die Palmityl-CoA-Konzentration Grenzen festzulegen, innerhalb welcher eine Inhibition von einheitlichem Typus stattfindet. Ausserhalb dieser Grenzen kommt zusätzlich eine nicht definierbare Inhibition zustande.

3.9. Versuche mit (9R)-trans-Dekalindion-(1,4) als Substrat und Palmityl-CoA als Inhibitor zeigten, dass die Inhibition in bezug auf die e-Oxydoreduktase-Aktivität gemischt kompetitiv-nicht kompetitiv ist. Daraus liess sich für Palmityl-CoA eine Inhibitionskonstante ermitteln.