Untersuchungen über die Biosynthese von Membranphospholipoiden

Acylierung des Lysolecithins und der Lysophosphatidsäure durch Polyenfettsäuren*

Von

Wilhelm Stoffel, Hans-Gerd Schiefer und Gerhard Dieter Wolf

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. Juli 1966)

Herrn Prof. Dr. Ernst Klenk in Dankbarkeit zum 70. Geburtstag gewidmet

Stoffwechselaktive Membranen wie die der Mitochondrien und des endoplasmatischen Reticulums enthalten als Hauptkomponenten der Lipoidphase Lecithin (Phosphatidylcholin) und Colaminkephalin (Phosphatidyläthanolamin). Typisch für diese Glycerophosphatide ist die asymmetrische Fettsäureverteilung mit vorwiegend gesättigten Fettsäuren in der 1-Stellung und vorwiegend ungesättigten Fettsäuren in der 2-Stellung des L-Glycerin-3-phosphats. Unsere früheren Untersuchungen[1-3] über die Biosynthese der hochungesättigten Fettsäuren hatten gezeigt, daß sowohl die Kettenverlängerung als auch die Olefinierungsreaktion durch Enzymsysteme katalysiert werden, die auf der Membran des endoplasmatischen Reticulums und somit räumlich in der Nachbarschaft zu den Enzymen, die an der Biosynthese von komplexen Lipoiden beteiligt sind, lokalisiert sind. Nach Wilgram und Kennedy[4] sind die Diglycerid-Acyltransferase, die Cholinphosphotransferase, die

* Verwendete Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat; CDP = Cytidindiphosphat; CoA bzw. $\overline{\text{CoA}}$SH = Coenzym A; DFP = Diisopropylfluorophosphat; Phosphatidsäure = 1,2-Diacyl-L-glycerin-3-phosphorsäure; Lysophosphatidsäure = 1-Acyl-L-glycerin-3-phosphorsäure; Lysolecithin = 1-Acyl-L-glycerin-3-phosphorylcholin.

Enzyme: Diglycerid-Acyltransferase = Acyl-CoA:1.2-Diglycerid-*O*-Acyltransferase (EC 2.3.1.20); Cholinphosphotransferase = CDP-Cholin:1.2-Diglycerid-Cholinphosphotransferase (EC 2.7.8.2); Cholinphosphat-Cytidyltransferase = CTP:Cholinphosphat-Cytidyltransferase (EC 2.7.7.15); Äthanolaminphosphotransferase = CDP-Äthanolamin:1.2-Diglycerid-Äthanolaminphosphotransferase (EC 2.7.8.1); Phospholipase A = Phosphatid-Acyl-Hydrolase (EC 3.1.1.4); Acyl-CoA: Lysolecithin-*O*-Acyltransferase (EC 2.3.1.?); Acyl-CoA:Lysophosphatidsäure-*O*-Acyltransferase (EC 2.3.1.?); Monoglyceridkinase = ATP:1-Monoglycerid-Phosphotransferase (EC 2.7.1.?); Acyl-CoA-Synthetase = Säure:CoA-Ligase (AMP) (EC 6.2.1.3).

[1] W. Stoffel, Biochem. biophysic. Res. Commun. **6**, 270 [1961].

[2] W. Stoffel, diese Z. **333**, 71 [1963].

[3] W. Stoffel u. H.-G. Schiefer, diese Z. **345**, 41 [1966].

[4] G. F. Wilgram u. E. P. Kennedy, J. biol. Chemistry **238**, 2615 [1963].

Cholinphosphat-Cytidyltransferase und die entsprechende Äthanolaminphosphotransferase vorwiegend in der mikrosomalen Fraktion vorhanden.

Der von Kornberg und Pricer[5] aufgezeigte und von Kennedy und Mitarbeitern[6] ausgearbeitete Syntheseweg für die Glycerinphosphatide und Triglyceride mit der Phosphatidsäure als gemeinsamem Zwischenprodukt führt zu einer Neusynthese dieser Verbindungsklasse. Dieser Weg erschwert jedoch die Interpretation der sehr deutlich sich unterscheidenden Fettsäurebesetzungen in den Triglyceriden und den Phosphatiden; letztere enthalten wesentlich größere Mengen Polyenfettsäuren. Auch Lecithin und Kephalin unterscheiden sich in der Fettsäurebesetzung wesentlich voneinander. Falls die Cholinphosphotransferase und die Äthanolaminphosphotransferase keine Spezifität für bestimmte Diglyceride aufweisen — Untersuchungen hierüber stehen noch aus —, müssen zusätzliche spezifische Synthesestufen oder Sekundärreaktionen gefolgert werden, um die asymmetrische Fettsäureverteilung zu deuten. So nimmt Lands[7] auf Grund der verschiedenen „turn-over" von 1- und 2-ständigen Fettsäuren an, daß eine Deacylierung des auf dem von Kennedy[6] aufgezeigten Weg synthetisierten Lecithins durch Phospholipase A stattfindet, die ausschließlich die 2-ständige Fettsäure des Lecithins und des Kephalins abspaltet[8, 9]; die entstandene Lysoverbindung soll dann durch spezifische, an das endoplasmatische Reticulum gebundene Acyl-CoA-Phosphatid-Acyltransferasen reacyliert werden. Aus der Beobachtung, daß die Phospholipase A in Pankreas, Leber, Niere und anderen Organen vorkommt[10], schloß Lands, daß dem Zusammenwirken der Phospholipase A und der Acyltransferase die Funktion des Umbaus der Phosphatide in solche mit spezifischer Fettsäureverteilung zukomme. Aus den unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Acylierungsreaktion mit Stearoyl-, Oleoyl- und Linoloyl-CoA schloß Lands auf verschiedene Acyltransferasen, die spezifisch für jede Fettsäure, jeden Akzeptor und jede Stellung des Akzeptors sein sollen.

Ein weiterer Weg, der zu einer spezifischen Fettsäureverteilung im Lecithin und Kephalin führen könnte, wäre durch eine Acylierung im Anschluß an die von Pieringer und Hokin[11] entdeckte Monoglycerid-

---

[5] A. Kornberg u. W. E. Pricer Jr, J. biol. Chemistry **204**, 345 [1953].

[6] E. P. Kennedy, Federat. Proc. **16**, 847 [1957]; L. F. Borkenhagen u. E. P. Kennedy, J. biol. Chemistry **227**, 951 [1957]; S. B. Weiss, E. P. Kennedy u. J. Y. Kiyasu, ebenda **235**, 40 [1960].

[7] W. E. M. Lands, J. biol. Chemistry **235**, 2233 [1960]; W. E. M. Lands u. I. Merkl, ebenda **238**, 898 [1963]; W. E. M. Lands u. P. Hart, ebenda **240**, 1905 [1965].

[8] N. H. Tattrie, J. Lipid Res. **1**, 60 [1959].

[9] D. J. Hanahan, H. Brockerhoff u. E. J. Barron, J. biol. Chemistry **235**, 1917 [1960].

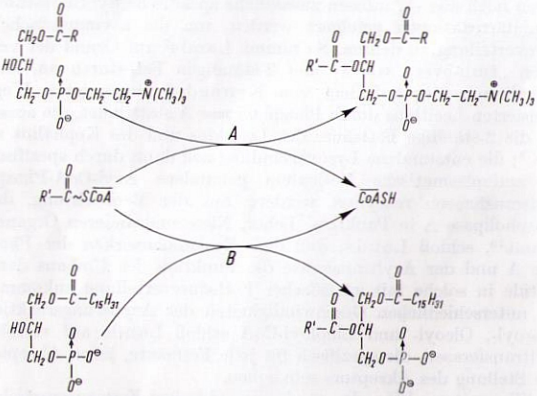
[10] H. van den Bosch u. L. L. M. van Deenen, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **106**, 326 [1965].

[11] R. A. Pieringer u. L. E. Hokin, J. biol. Chemistry **237**, 653, 659 [1962].

kinase-Reaktion denkbar, die zur Bildung der Lysophosphatidsäure und weiter zur Phosphatidsäure führen könnte. Dieser Weg entspricht dann der zweiten Acylierungsstufe des L-Glycerin-3-phosphats[5]. Die Acylierung des L-Glycerin-3-phosphats und der Lysophosphatidsäure führt zur Neusynthese, der von Lands angegebene Weg stellt nur eine Austauschreaktion dar.

Untersuchungen und Ergebnisse

Mit Hilfe von mehreren ^{14}C- oder ^{3}H-markierten gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren untersuchten wir die Acyltransferase-Reaktion mit Lysolecithin und Lysophosphatidsäure als Akzeptoren. Enzymatisch dargestelltes Lysolecithin (Reaktion A) und synthetisches 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat (Reaktion B) waren die Akzeptoren der beiden folgenden Acylierungsreaktionen:



Die Acyl-CoA: Lysolecithin-Acyltransferase- und die Acyl-CoA: Lysophosphatidsäure-Acyltransferase-Reaktion lassen sich mit Hilfe des Reagenzes nach Ellman[12] (Bis-[4-nitro-3-carboxy-phenyl]-disulfid) spektrophotometrisch verfolgen: das bei der Acylierungsreaktion freiwerdende Coenzym A reagiert unter Disulfid-Bildung und Freisetzung der Chinonform der 2-Nitro-5-mercapto-benzoesäure, die ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 412 mμ aufweist. Der optische Test ermöglicht die Messung der Kinetik der Acylierungsreaktionen, die Bestimmung der K_m-Werte und der Gleichgewichtskonstanten. Die radioaktiv markierten Substrate erlauben ferner nach Ablauf des optischen Tests eine Kontrolle der Reaktionen durch chromatographische Trennung und Isolierung der Reaktionsprodukte.

[12] G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophysics 82, 70 [1959].

In dieser Arbeit soll über folgende Untersuchungen berichtet werden: 1. die Acyl-CoA-Synthetase-Reaktion der langkettigen Polyenfettsäuren; 2. die Lokalisation der Acyltransferasen in der Zelle; 3. den Austausch von Acyl-CoA gegen [1-^{14}C] 8.11.14-Eicosatriensäure als β-ständiger Acylkomponente des Lecithins; 4. die Bruttoreaktion und die Kinetik der Acylierung des Lysolecithins mit radioaktiv markierten, gesättigten Mono- und Polyenfettsäuren; 5. die Kinetik der Acylierung der Lysophosphatidsäure.

1. Acyl-CoA-Synthetase-Reaktion mit langkettigen Polyenfettsäuren

Kornberg und Pricer[13] fanden, daß eine sehr aktive Acyl-CoA-Synthetase für langkettige Fettsäuren in den Mikrosomen der Meerschweinchenleber vorkommt. Dieses Enzym konnten wir in früheren Untersuchungen ebenfalls in den Mikrosomen der Rattenleber nachweisen. Kornberg und Pricer stellten enzymatisch die CoA-Ester der Fettsäuren bis zur Linolsäure dar; sie fanden, daß das Enzym ein Kettenlängenoptimum bei 12 Kohlenstoffatomen hat und daß Linol- und α-Linolensäure hemmend wirken. Aus Tab. 1 geht jedoch hervor, daß weder die Kettenlänge noch die Struktur des Doppelbindungssystems einen Einfluß auf die Ausbeute der Reaktion haben. Die enzymatisch synthetisierten CoA-Ester der Polyenfettsäuren sind enzymatisch voll wirksam, vorausgesetzt, daß bei der Isolierung und Reinigung dieser empfindlichen Verbindungen vorsichtig (N_2-Atmosphäre, niedrige Temperaturen) gearbeitet wird. Die CoA-Ester wurden papierchromatographisch auf ihre Reinheit geprüft.

Tab. 1. Acyl-CoA-Synthetase-Reaktion mit langkettigen Polyenfettsäuren.

eingesetzte [1-^{14}C]-Polyenfettsäure	Ausbeute an CoA-Ester in %, bezogen auf eingesetztes CoA.
$\Delta^{4,7,10}$-C_{16}	75
Δ^{9}-C_{18}	82
$\Delta^{9,12}$-C_{18}	70
$\Delta^{6,9,12}$-C_{18}	60
$\Delta^{9,12,15}$-C_{18}	78
$\Delta^{7,9,12}$-C_{18}	79
$\Delta^{6,9,12}$-iso-C_{18}	87
$\Delta^{5,8,11}$-C_{20}	86
$\Delta^{8,11,14}$-C_{20}	78
$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}	81

2. Lokalisation der Acyl-CoA:Lysophosphatid-Acyltransferasen in der Zelle

Die Acyl-CoA:Lysolecithin-Acyltransferase-Aktivität der Rattenleber wurde von Lands[7] in der Mikrosomenfraktion gefunden. Bei

[13] A. Kornberg u. W. E. Pricer, Jr., J. biol. Chemistry **204**, 329 [1953].

unseren Untersuchungen wurde die Leber zunächst nach Siekevitz[14] in Mitochondrien-, Mikrosomen- und Überstandsfraktion getrennt und die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion durch Ultrazentrifugation in einem linearen Rohrzucker-Dichtegradienten (0,5—2,0M)[15] gereinigt. Die Ergebnisse unserer Studien zur Lokalisation der Acyltransferase sind in Tab. 2 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß die Acylierung durch eine an die Membran des endoplasmatischen Reticulums gebundene Acyltransferase erfolgt. Der geringfügige Einbau durch Mitochondrien ist möglicherweise noch auf eine Verunreinigung durch Spuren von Mikrosomen zurückzuführen.

Die gleiche Enzymverteilung ermittelten wir für die Acyl-CoA: Lysophosphatidsäure-Acyltransferase nach Zellfraktionierung und Reinigung der Zellfraktionen im linearen Rohrzucker-Dichtegradienten. In Abb. 1 ist die Kinetik der Acylierung von 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat mit $\Delta^{9,12,15}$-Octadecatrienoyl-CoA in Gegenwart der einzelnen Zellfraktionen wiedergegeben. Zur Hemmung der in Rattenleber sehr aktiven Acyl-CoA-Hydrolase war jede Fraktion während einer Stunde mit DFP vorinkubiert worden.

3. Untersuchung des möglichen Austauschs der in 2-Stellung des Lecithins eingebauten [1-^{14}C]8.11.14-Eicosatriensäure gegen [1-^{14}C]Linolsäure

Falls der von Lands postulierte Deacylierungs-Reacylierungsmechanismus die Grundlage für die asymmetrische Fettsäureverteilung in den Glycerinphosphatiden bildet, sollte man erwarten, daß Lecithin, das in 2-Stellung mit einer 1-^{14}C-markierten Fettsäure (8.11.14-Eicosatriensäure) acyliert ist, diese gegen eine andere, z. B. Linolsäure, teilweise austauschen kann. Dies erfordert, daß neben der Hauptaktivität der Acyltransferasen auch die Phospholipase A an die Membran des endoplasmatischen Reticulums gebunden ist, da der Transport der Lysoverbindung von einem Zellkompartement zu einem anderen unwahrscheinlich ist.

Den möglichen Austausch von 1-^{14}C-markierter Linolsäure gegen im Lecithinmolekül 2-ständige [1-^{14}C]8.11.14-Eicosatriensäure untersuchten wir in vitro mit Rattenlebermikrosomen. Durch Ultraschallbehandlung in der Kälte wurde das radioaktiv markierte Lecithin in Phosphatpuffer micellar gelöst und mit dann zugegebener Mikrosomensuspension, Linolsäure (als Ammoniumsalz), ATP und CoA erneut beschallt. Das micellar gelöste, radioaktiv markierte Lecithin kann in der Ultrazentrifuge bei $105000 \times g$ vollständig mit der Mikrosomenfraktion abzentrifugiert werden und ist somit entweder Bestandteil der Membranen oder an diese gebunden. Der Reaktionsansatz wurde während 2 Stdn. bei 37° inkubiert. Das Lecithin wurde säulenchromato-

---

[14] P. Siekevitz, Methods in Enzymol. **5**, 61 [1962].
[15] J. F. Thomson, Analytic. Chem. **31**, 836 [1959].

Tab. 2. Lokalisation der Acyl-CoA:Lysolecithin-Acyltransferase in der Zelle. Jeder Inkubationsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 ml 1 μMol [1-^{14}C]γ-Linolensäure als Ammoniumsalz, 10 μMol ATP, 0,5 μMol CoA, 10 μMol $MgCl_2$, 2 μMol Lysolecithin, 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 10 mg Protein jeder Zellfraktion. Inkubation 60 Min. bei 30°. Die freien Fettsäuren wurden nach der Inkubation säulenchromatographisch vom Lecithin getrennt, das chromatographisch reine Lecithin mit Phospholipase A gespalten und die abgespaltene 2-ständige Fettsäure säulenchromatographisch von der Lysoverbindung getrennt.

Zellfraktion	Radioaktivität der im Lecithin β-ständigen Fettsäure nach Spaltung des isolierten Lecithins mit Phospholipase A	
	Zpm	% der eingesetzten Radioaktivität
Mitochondrien	17000	8
Mikrosomen	172000	84
105000 × g-Überstand .	3000	1,5

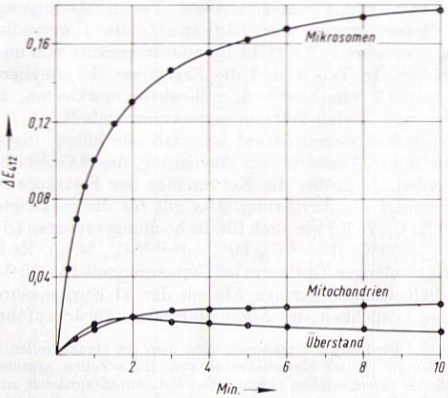


Abb. 1. Kinetik der Acylierung von 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat mit $\Delta^{9,12,15}$-C_{18}-CoA durch gereinigte Zellfraktionen (nach Ultrazentrifugation im kontinuierlichen Rohrzucker-Dichtegradienten). Jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 ml: 1 μMol Ellman-Reagenz; 0,05 μMol $\Delta^{9,12,15}$-C_{18}-CoA; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, und 2 mg Protein (Vorinkubation mit DFP). Die Leerküvette enthielt kein Acyl-CoA. Start der Reaktion zur Zeit 0 durch Zugabe von 0,25 μMol Lysophosphatidsäure.

graphisch[16] isoliert, die Fettsäure in 2-Stellung mit Phospholipase A abgespalten und die Fettsäuremethylester durch Radiogaschromatographie analysiert: [1-^{14}C]8.11.14-Eicosatriensäure wurde als einzige radioaktiv markierte Fettsäure identifiziert; ein Austausch gegen [1-^{14}C]Linolsäure hatte nicht stattgefunden.

4. Acylierung von Lysolecithin mit gesättigten, Monoen- und Polyenfettsäuren

Wir verwendeten als Enzymquelle die Mikrosomenfraktion aus Rattenleber. Da dieses System neben der Transacylase auch eine aktive Acyl-CoA-Synthetase enthält, setzten wir die freien Säuren als Ammoniumsalze, CoA, ATP und den Akzeptor Lysolecithin ein und isolierten nach gleichen Inkubationszeiten das durch Acylierung mit den verschiedenen 1-^{14}C-markierten Fettsäuren gebildete Lecithin. Die 2-ständige Fettsäure des durch Säulenchromatographie[16] gereinigten Lecithins wurde durch Phospholipase A abgespalten und die freie 1-^{14}C-markierte Fettsäure und das entstandene Lysolecithin durch erneute Säulenchromatographie getrennt. Die Fettsäuren wurden durch Radiogaschromatographie identifiziert. Die isolierten 2-ständigen Fettsäuren waren identisch mit den Ausgangssäuren, ausgenommen die Stearinsäure, die zu 35 % in Ölsäure, und die 8.11.14-Eicosatriensäure, die zu 15—20 % in 5.8.11.14-Eicosatetraensäure umgewandelt worden waren. Die rasche Umwandlung unter aeroben Versuchsbedingungen von Stearin- in Ölsäure wurde von Elovson[17], die Umwandlung von 8.11.14-Eicosatriensäure in 5.8.11.14-Eicosatetraensäure von uns[3] früher schon beschrieben. In Tab. 3 sind die Ergebnisse der Acylierung von Lysolecithin mit 15 verschiedenen, radioaktiv markierten, natürlich vorkommenden und Modell-Fettsäuren zusammengefaßt.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß alle höher ungesättigten Fettsäuren in hoher Ausbeute zur Acylierung des Lysolecithins herangezogen werden. Je größer die Kettenlänge der Fettsäure ist, umso vollständiger erfolgt die Acylierung. Das gilt für die gesättigten Fettsäuren (C_{16} 19%; C_{18} 75%) wie auch für die hochungesättigten ($\Delta^{4.7.10}$-C_{15} 35%; $\Delta^{4.7.10}$-C_{16} 53%; $\Delta^{6.9.12}$-C_{18} 80%; $\Delta^{8.11.14}$-C_{20} 86%). Es liegt also offenbar ein Kettenlängen-Optimum bei Fettsäuren mit 18—20 C-Atomen vor. Der verhältnismäßig geringe Einbau der 11-Eicosensäure dürfte auf die geringe Löslichkeit des Ammoniumsalzes zurückzuführen sein.

Dieser Befund wird durch Untersuchungen über die strukturellen Umwandlungen dieser Säuren in der Gewebekultur von HeLa-Zellen gestützt[18]; hier zeigte sich, daß die verschiedenen eingesetzten Fettsäuren zunächst zu den entsprechenden C_{18}-C_{20}-Fettsäuren verlängert wurden, bevor sie in die 2-Stellung des L-Glycerin-3-phosphats eingebaut wurden; die 1-Stellung dagegen wird auch durch C_{16}-Fettsäuren acyliert.

---

[16] D. J. Hanahan, J. C. Dittmer u. E. Warashina, J. biol. Chemistry **228**, 685 [1957].

[17] J. Elovson, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **106**, 291 [1965].

[18] W. Stoffel u. A. Scheid, Publikation in Vorbereitung.

Tab. 3. Acylierung von Lysolecithin mit verschiedenen, radioaktiv markierten, natürlich vorkommenden und Modell-Fettsäuren. Jeder Inkubationsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 ml: 1 μMol Fettsäure als Ammoniumsalz; 20 μMol ATP; 0,2 μMol CoA; 1 μMol Lysolecithin; 15 μMol Cystein; 10 μMol $MgCl_2$; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, und 10 mg Mikrosomenprotein. Inkubation 60 Min. bei 30°. Die freien Fettsäuren wurden nach der Inkubation säulenchromatographisch vom gebildeten Lecithin getrennt, das Lecithin mit Phospholipase A gespalten und die abgespaltene 2-ständige Fettsäure säulenchromatographisch von der Lysoverbindung getrennt. A = Radioaktivität.

Eingesetzte Fettsäure	freie Fettsäure 10^{-3} A[Zpm]	Radioaktivität d. in 2-Stellung des Lecithins eingebauten Fettsäure nach Spaltung mit Phospholipase A	
		10^{-3} A[Zpm]	% d. einges. Radioaktivität
$\Delta^{4,7,10}$-C_{15}	166 179	97 90	37 34
C_{16}	455 455	99 104	18 19
$\Delta^{7,10}$-C_{16}	267 276	79 76	23 22
$\Delta^{4,7,10}$-C_{16}	207 204	238 231	54 53
C_{18}	70 72	203 208	75 75
Δ^{9}-C_{18}	273 284	607 608	69 68
$\Delta^{6,9}$-C_{18}	102 108	294 280	74 72
$\Delta^{9,12}$-C_{18}	58 46	131 154	70 74
$\Delta^{9,12,15}$-C_{18}	28 31	357 357	93 93
$\Delta^{6,9,12}$-C_{18}	53 51	213 213	80 80
$\Delta^{6,9,12}$-iso-C_{18}	33 33	131 133	80 80
$\Delta^{8,11,14}$-C_{18}	77	217	74
Δ^{11}-C_{20}	248 303	222 270	47 47
$\Delta^{8,11,14}$-C_{20}	42 49	290 263	87 84
$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}	27 29	210 225	89 89

Wir untersuchten ferner die Kinetik der Acylierungsreaktion des Lysolecithins mit den Fettsäure-CoA-Estern im optischen Test, um einen weiteren Aufschluß über die Acylierungsreaktion des Lysoleci-

thins als möglicher Schlüsselreaktion für die spezifische Fettsäureverteilung zu erhalten.

In einer vergleichenden Versuchsreihe setzten wir für den optischen Test als Akzeptor katalytisch hydriertes Lysolecithin (in 1-Stellung C_{16} 30%; C_{18} 70%) ein und verfolgten die Geschwindigkeit der Acylierung durch die verschiedenen Fettsäure-CoA-Ester. Anschließend wurde das in 2-Stellung mit einer radioaktiven Fettsäure acylierte Lecithin aus den Inkubationsansätzen isoliert. In Tab. 4 sind die Ausbeute des bei der Acylierung des Lysolecithins mit Acyl-CoA freigesetzten CoA (berechnet aus der Extinktionsdifferenz nach einer Eichkurve) und die Ausbeute an säulenchromatographisch isoliertem Lecithin gegenübergestellt.

Tab. 4. Enzymatische Acylierung von Lysolecithin mit verschiedenen radioaktiv markierten Acyl-CoA-Estern. Vergleich der aus dem optischen Test berechneten Menge an freigesetztem CoA mit der in 2-Stellung des Lecithins inkorporierten Menge radioaktiv markierter Fettsäuren. Jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 ml: 1 μMol Ellman-Reagenz; 0,2 μMol Acyl-CoA; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, und 2 mg Mikrosomenprotein (Vorinkubation mit DFP). Die Leerküvette enthielt kein Acyl-CoA. Start der Reaktion zur Zeit 0 durch Zugabe von 0,5 μMol Lysolecithin. Messung der Extinktionszunahme bei 412 mμ. Nach Extraktion mit Chloroform/Methanol, säulenchromatographischer Reinigung des Gesamtlipoidextraktes und Spaltung des Lecithins mit Phospholipase A wurde die Radioaktivität der abgespaltenen 2-ständigen Fettsäure gemessen.

eingesetztes Acyl-CoA	nMol freiges. Coenzym A	nMol Fettsäuren in 2-Stellung des Lecithins
C_{16}	35	50
$\Delta^{4,7,10}$-C_{16}	15 15	17 15
Δ^{9}-C_{18}	46 47	50 44
$\Delta^{9,12}$-C_{18}	44 43	64 63
$\Delta^{6,9,12}$-C_{18}	82 81	78 85
$\Delta^{7,9,12}$-C_{18}	23	24
$\Delta^{6,9,12}$-iso-C_{18}	51 50	65 67
$\Delta^{8,11,14}$-C_{20}	50 55	69 63
$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}	52 50	60 58

Abb. 2 gibt die im optischen Test gemessenen Kinetiken der Acylierung des Lysolecithins mit den angegebenen Fettsäure-CoA-Estern wieder. Abb. 3 zeigt die Abhängigkeit der Acylierungsreaktion von der Enzymkonzentration.

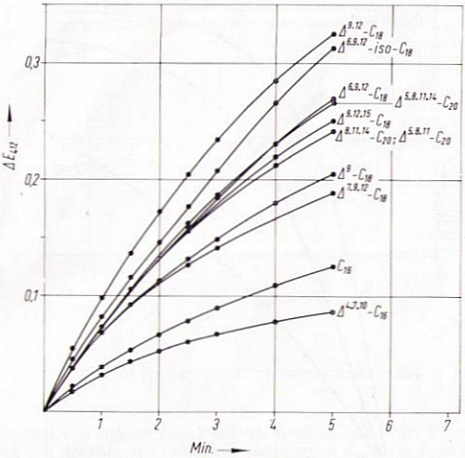


Abb. 2. Kinetik der Acylierung von Lysolecithin mit radioaktiv markierten Fettsäure-CoA-Estern. Jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 ml: 1 μMol Ellman-Reagenz; 0,1 μMol Acyl-CoA; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, und 2 mg Mikrosomenprotein (Vorinkubation mit DFP). Die Leerküvette enthielt kein Acyl-CoA. Start der Reaktion zur Zeit 0 durch Zugabe von 0,25 μMol Lysolecithin.

Wir bestimmten die Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) nach Lineweaver-Burk. Mit Arachidonoyl-CoA als Substrat wurde für Lysolecithin $K_m = 5 \times 10^{-5}$M gemessen. Mit Lysolecithin als Akzeptor ergaben sich für die verschiedenen Fettsäure-CoA-Ester folgende K_m-Werte:

C_{16}: $8 \cdot 10^{-6}$M $\Delta^{9,12,15}$-C_{18}: $4{,}5 \cdot 10^{-6}$M
$\Delta^{6,9,12}$-C_{18}: $5 \cdot 10^{-6}$M $\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}: $3 \cdot 10^{-6}$M

Tzur und Shapiro[19] beobachteten eine Steigerung der Veresterung des Glycerinphosphats, wenn Fremdprotein zugefügt wurde; sie deuteten den Effekt des Proteins als Akzeptorfunktion für das neusynthetisierte Lipoid. Lands und Hart[7] nehmen an, daß das Protein eine hemmende Wirkung der Acyl-CoA-Ester auf die Transacylasen aufhebt, und sehen eine Analogie zu den Befunden von Bortz und Lynen[20], die eine Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase durch langkettige Fettsäure-CoA-Ester beobachteten. In unseren Untersuchungen konnte die Geschwindigkeit der Acylierung von Lysolecithin

[19] R. Tzur u. B. Shapiro, J. Lipid Res. **5**, 542 [1964].
[20] W. M. Bortz u. F. Lynen, Biochem. Z. **339**, 77 [1963].

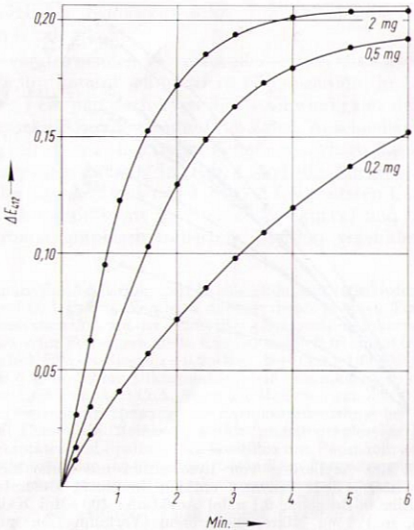


Abb. 3. Einfluß der Enzymkonzentration auf die Kinetik der Acylierung von Lysolecithin mit radioaktiv markiertem $\Delta^{9.12}$-C_{18}-CoA. Jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 m*l*: 1 μMol Ellman-Reagenz; 0,05 μMol $\Delta^{9.12}$-C_{18}-CoA; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, und Mikrosomenprotein in den angegebenen Konzentrationen (Vorinkubation mit DFP). Die Leerküvette enthielt kein Acyl-CoA. Start der Reaktion zur Zeit 0 durch Zugabe von 0,50 μMol Lysolecithin.

und Lysophosphatidsäure durch steigende Konzentrationen von Serumalbumin nicht gesteigert werden. Im Gegenteil führten höhere Proteinmengen, wie Abb. 4 zeigt, zur Hemmung der Reaktion, da die Substrate offenbar an das enzymatisch inaktive Protein gebunden werden und somit die aktuelle Substratkonzentration herabgesetzt wird.

Lands[7] schloß aus seinen Acylierungsversuchen mit wenigen Substraten, daß für jede Fettsäure eine spezifische Acyltransferase vorliege. Unser Befund, daß die $\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}-Säure und die $\Delta^{8.11.14}$-C_{18}-Säure, also Verbindungen mit „unnatürlicher Struktur" hinsichtlich des Methyl- oder des Carboxylendes, mit hoher Ausbeute (s. Tab. 3) in die 2-Stellung des Lysolecithins eingebaut werden, läßt diese Hypothese fragwürdig erscheinen. Die Geschwindigkeiten der Acylierung des Lysolecithins

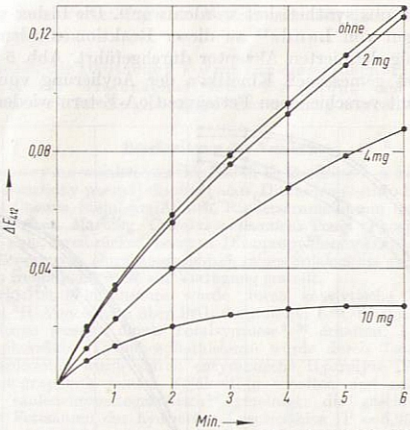


Abb. 4. Einfluß von zugesetztem Rinderserumalbumin auf die Kinetik der Acylierung von Lysolecithin mit radioaktiv markiertem C_{16}-CoA. Jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 m*l*: 1 μMol Ellman-Reagenz; 0,2 μMol C_{16}-CoA; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 2 mg Mikrosomenprotein (Vorinkubation mit DFP) und Rinderserumalbumin in wäßriger Lösung in den angegebenen Mengen. Die Leerküvette enthielt kein Acyl-CoA. Start der Reaktion zur Zeit 0 durch Zugabe von 0,50 μMol Lysolecithin.

durch die einzelnen Fettsäure-CoA-Ester sind in der C_{18}- und C_{20}-Reihe nicht wesentlich unterschieden. Besitzt das Molekül eine starre Konfiguration, wie z. B. C_{16} oder $\Delta^{7l/7c.9.12}$-C_{18}*, so ist die Affinität zum Enzym vermindert. Auf Grund der sehr ähnlichen Kinetiken der Acylierung des Lysolecithins mit verschiedenen Acyl-CoA-Estern nehmen wir an, daß es sich um eine einzige Acyl-CoA:Lysolecithin-Acyltransferase handelt, die eine hohe Affinität für Polyenfettsäure-CoA-Ester mit dem für sie charakteristischen olefinischen System bzw. für die dadurch bedingte cyclische Molekülkonfiguration besitzt. In den kinetischen Untersuchungen zeichnen sich keine Spezifitäten für bestimmte Fettsäuren ab.

5. Acylierung der Lysophosphatidsäure 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat mit gesättigten, Monoen- und Polyenfettsäuren

Auf der weiteren Suche nach einem Syntheseschritt, der zur spezifischen Fettsäureanordnung im Phospholipoidmolekül führen könnte, untersuchten wir die Acylierung des 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phos-

* $\Delta^{7l/7c.\,9c.\,12c}$-$C_{18}$ stellt ein 1:1-Gemisch der *cis*- und *trans*-Isomeren dar.

phats, das von uns synthetisiert worden war[21]. Die bisher vorliegenden Untersuchungen von Lands[22] zu dieser Reaktion wurden mit einem chemisch wenig definierten Akzeptor durchgeführt. Abb. 5 gibt die im optischen Test gemessenen Kinetiken der Acylierung von Lysophosphatidsäure mit verschiedenen Fettsäure-CoA-Estern wieder.

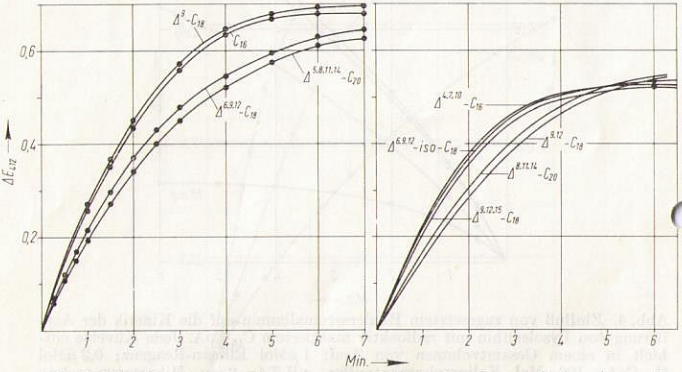


Abb. 5. Kinetik der Acylierung von 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat mit radioaktiv markierten Fettsäure-CoA-Estern. Jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 m*l*: 1 μMol Ellman-Reagenz; 0,1 μMol Acyl-CoA; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, und 2 mg Mikrosomenprotein (Vorinkubation mit DFP). Die Leerküvette enthielt kein Acyl-CoA. Start der Reaktion zur Zeit 0 durch Zugabe von 0,25 μMol Lysophosphatidsäure.

Daraus ergibt sich, daß 1. die Acylierungsgeschwindigkeit des 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphats mindestens doppelt so groß wie die des Lysolecithins ist, 2. alle Säuren mit fast gleicher Geschwindigkeit in die Lysophosphatidsäure unter Bildung der entsprechenden Phosphatidsäure eingebaut werden. Wir bestimmten die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) nach Lineweaver-Burk. Mit Arachidonoyl-CoA als Substrat wurde für 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat $K_m = 0{,}8 \times 10^{-6}$M gemessen. Mit 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat als Akzeptor ergaben sich für die verschiedenen Fettsäure-CoA-Ester folgende K_m-Werte:

C_{16}: $2{,}5 \cdot 10^{-6}$M $\quad$ $\Delta^{9,12,15}$-C_{18}: $2{,}5 \cdot 10^{-6}$M
$\Delta^{6,9,12}$-C_{18}: $1{,}0 \cdot 10^{-6}$M $\quad$ $\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}: $2{,}5 \cdot 10^{-6}$M

Die Vermutung von Kennedy[23], daß auf dieser Stufe der Synthese von Phospholipoiden eine spezifische Einführung von Fettsäuren zur

[21] W. Stoffel u. G. D. Wolf, diese Z. **346**, 94 [1966].
[22] W. E. M. Lands u. P. Hart, J. Lipid Res. 5, 81 [1964].
[23] E. P. Kennedy, 5. Internat. Kongreß für Biochemie, Moskau 1961, Symposium Nr. VII, S. 1.

asymmetrischen Verteilung der Fettsäuren führen könnte, muß ausgeschlossen werden.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für wissenschaftliche Forschung und der Stiftung Volkswagenwerk für die großzügige Unterstützung unserer Arbeiten.

Beschreibung der Versuche

Alle Coenzyme wurden von der Fa. C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim, Bis-[4-nitro-3-carboxy-phenyl]-disulfid [=5,5′-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)] von der Fa. EGA-Chemie, Steinheim/Albuch, Rinderserumalbumin trocken reinst von den Behringwerken, Marburg, *Crotalus-adamanteus*-Toxin (Phospholipase A) von der Fa. F. G. Celo, Zweibrücken, bezogen. Diisopropylfluorophosphat wurde von der Fa. Bayer, Leverkusen, chromatographisch reines Sojalecithin von der Fa. Nattermann, Köln, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

^{3}H-markierte Palmitinsäure wurde durch katalytische Hydrierung von $\Delta^{4.7.10}$-C_{16} in ^{3}H-Atmosphäre über PtO_2 dargestellt; 1-^{14}C-markierte Monoen- und Polyenfettsäuren wurden durch Totalsynthese[2, 24] erhalten. 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphorsäure (Lysophosphatidsäure) wurde durch Totalsynthese[21] dargestellt. Lysolecithin wurde durch enzymatische Hydrolyse (Phospholipase A) von chromatographisch reinem Sojalecithin erhalten und nach katalytischer Hydrierung säulenchromatographisch[16] gereinigt; die gaschromatographische Analyse der Fettsäuren des hydrierten Lysolecithins [P = 5,95%, ber. 5,98%; $[\alpha]_{24}$:2,4° (10% in Chloroform)] ergab einen Gehalt von 30% C_{16} und 70% C_{18} in der 1-Stellung.

Der CoA-Ester der [^{3}H]Palmitinsäure wurde nach Seubert synthetisiert[25]. Die CoA-Ester der Monoen- und Polyenfettsäuren wurden nach Kornberg und Pricer[13] enzymatisch präpariert; die überschüssige 1-^{14}C-markierte Fettsäure wurde durch mehrmaliges Auswaschen mit 80proz. Äthanol und Äther/Äthanol 1:1 quantitativ entfernt. Die Thioester wurden papierchromatographisch (Papier Schleicher & Schüll 2043b; aufsteigend; System Propanol-(2)/Pyridin/Wasser 1:1:1) analysiert und die Radioaktivitätsverteilung, wie früher[2] beschrieben, gemessen; die Thioester waren einheitlich (R_F 0,36—0,40), freie Fettsäuren waren nicht nachweisbar.

Die Radioaktivitäten wurden mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer der Fa. Packard, Modell 3214, gemessen. Als Phosphore dienten 2.5-Diphenyloxazol (PPO, 5 g/*l*) und 1.4-Bis-[4-methyl-5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP, 0,3 g/*l*) in Toluol.

Die Zellfraktionierung erfolgte nach Siekevitz[14]; die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion wurden durch Ultrazentrifugation in einem kontinuierlichen Rohrzucker-Dichtegradienten (0,5M—2,0M Rohrzucker in Wasser) gereinigt[26]: 0,5 m*l* jeder Fraktion wurden in der Kälte vorsichtig auf einen kontinuierlichen Rohrzuckergradienten geschichtet. Die Röhrchen wurden während 210 Min. bei 105000×*g* und einer Rotortemperatur von +1° in einem SW-50-Rotor in einer Beckman Ultrazentrifuge L-2 zentrifugiert. Die deutlich sichtbaren Banden der Mitochondrien und Mikrosomen wurden abgehebert.

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach der Biuretmethode oder nach Warburg und Christian[27].

Inkubationsansätze für den optischen Test[7]: Zur Hemmung der in Rattenleber sehr aktiven Acyl-CoA-Hydrolase[7] wurden die Zellfraktionen (20 mg Protein/m*l*) vor dem Versuch mit Diisopropylfluorophosphat (c = 5 mM) während

[24] W. Stoffel, Liebigs Ann. Chem. **673**, 26 [1964]; J. Amer. Oil Chemists' Soc. **42**, 583 [1965].

[25] W. Seubert, Biochem. Preparations **7**, 80 [1960].

[26] R. G. Martin u. B. N. Ames, J. biol. Chemistry **236**, 1372 [1961].

[27] E. Layne, Methods in Enzymol. **3**, 451 [1957].

60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 *ml*: 1 μMol Ellman-Reagenz[12] in neutraler wäßr. Lösung; Acyl-CoA (Konzentrationen s. Abbildungs-Legenden); 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, und 2 mg Enzymprotein. Der Leerwert enthielt kein Acyl-CoA. Die Reaktion wurde zur Zeit 0 gestartet durch Zugabe von Lysolecithin bzw. Mononatriumsalz der Lysophosphatidsäure in wäßr. Lösung (Konzentrationen s. Abbildungs-Legenden). Die Zunahme der Extinktion bei 412 mμ wurde im Spektralphotometer Zeiss PMQ II verfolgt.

Aus der gemessenen Extinktionsdifferenz ließ sich mit Hilfe einer Eichkurve mit authent. CoA die Menge an freigesetztem CoA berechnen.

Die K_m-Werte wurden nach Lineweaver und Burk bestimmt.

Zur Untersuchung einer möglichen Austauschreaktion der 2-ständigen $\Delta^{8.11.14}$-C_{20} von synthet. 1-Stearoyl-(bzw. 1-Palmitoyl)-2-[1-^{14}C]-Eicosa-8.11.14-trienoyl-L-glycerin-3-phosphorylcholin[3] mit $\Delta^{9.12}$-C_{18} wurden 2 μMol des markierten Lecithins in 1 *ml* 0,1M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, durch Ultraschallbehandlung micellar gelöst, dann 10 μMol ATP, 10 μMol $MgCl_2$, 0,5 μMol CoA, 1 μMol [1-^{14}C]Linolsäure als Ammoniumsalz und 25 mg Mikrosomenprotein zugefügt. Durch erneutes kurzes Beschallen in der Kälte wurde eine klare Lösung erhalten, die während 2 Stdn. bei 37° unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert wurde.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Chloroform/Methanol 2:1 gestoppt und mehrmals mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch extrahiert; die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, unter Stickstoff zur Trockne eingeengt und sofort in Chloroform gelöst. Die chromatographische Trennung des Gesamtlipoidextraktes erfolgte nach Hanahan[16]; die Lipoidfraktionen wurden dünnschichtchromatographisch identifiziert[3]. Die 2-ständigen Fettsäuren des Lecithins wurden mit Phospholipase A abgespalten[28] und der Rückstand nach Entfernen des Lösungsmittels an einer Kieselsäure-Säule[16] in freie Fettsäure und Lysolecithin getrennt.

Die freien Fettsäuren wurden mit BF_3-Methanol verestert, die Fettsäuren des Lysolecithins mit 5proz. methanol. Salzsäure umgeestert. Die Fettsäuremethylester wurden durch Radiogaschromatographie analysiert (Gaschromatograph der Fa. Packard, Series 7500, mit Verbrennungsofen, Durchflußzelle und Ratemeter).

Zusammenfassung

Die enzymatische Acylierung von Lysolecithin und Lysophosphatidsäure wurde mit einer Vielzahl von gesättigten, Monoen- und Polyenfettsäuren untersucht. Die Acyltransferasen sind an die Membranen des endoplasmatischen Reticulums gebunden. Die Geschwindigkeit der Acylierung der Lysophosphatidsäure ist unter den gewählten Versuchsbedingungen zwei- bis dreimal größer als die des Lysolecithins. Die Acylierung der Lysophosphatidsäure durch die Acyl-CoA-Ester weist keine Spezifität für bestimmte Fettsäurestrukturen auf; die Kinetik der Acylierungsreaktion ist für alle untersuchten Acyl-CoA-Ester fast gleich. Auch die Acylierung des Lysolecithins mit verschiedenen C_{18}- und C_{20}-Monoen- und Polyenfettsäure-CoA-Estern verläuft sehr unspezifisch; allein Palmitoyl- und 4.7.10-Hexadecatrienoyl-CoA weisen eine träge Kinetik auf.

---

[28] F. Haverkate u. L. L. M. van Deenen, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **106**, 78 [1965].

Ein Austausch von 2-ständiger 8.11.14-Eicosatriensäure im Lecithin gegen Linolsäure durch Rattenlebermikrosomen konnte nicht beobachtet werden.

Summary

The enzymatic acylation of lysolecithin and lysophosphatidic acid (1-palmitoyl-L-glycerol-3-phosphate) with several saturated, monoenoic and polyenoic fatty acids has been studied. The acyltransferases are bound to the membranes of the endoplasmic reticulum (microsomal fraction). The rate of the acylation of lysophosphatidic acid exceeds that of lysolecithin twice to three times, under the chosen experimental conditions. The acylation of lysophosphatidic acid by the different acyl-CoA-esters exhibits no specificity for particular fatty acid structures; the kinetics of the acylation reaction are almost identical for all acyl-CoA-esters investigated so far. The acylation of lysolecithin with different C_{18}- und C_{20}-monoenoic and polyenoic fatty acid coenzyme A esters also proceeds rather unspecifically, except palmitoyl-CoA and 4,7,10-hexadecatrienoyl-CoA which yield a rather sluggish reaction.

The possible exchange of the [1-^{14}C]8,11,14-eicosatrienoyl-residue in the 2-position of lecithin against [1-^{14}C]linoleic acid has been studied with a microsomal preparation. No exchange of the two acyl residues could be observed.

Dozent Dr. Dr. Wilhelm Stoffel, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 5 Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Str. 52.