Sonderdruck
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 333, S. 71—88, 1963
Walter de Gruyter & Co., Berlin

Der Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren, I*

Zur Biosynthese hochungesättigter Fettsäuren

Von

Wilhelm Stoffel

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln

(Der Schriftleitung zugegangen am 11. September 1962)

Isotopenversuche von Klenk und Mitarbeitern[1] hatten zu dem Ergebnis geführt, daß in der Ratte die essentiellen Fettsäuren Linol- und Linolensäure durch Kettenverlängerung mit [1-^{14}C]Acetat und Einführung weiterer Doppelbindungen in Eicosa- und Docosapolyensäuren vom entsprechenden Linol- bzw. Linolensäuretypus übergeführt werden. Mead[2] postulierte für den speziellen Fall der Arachidonsäure auf Grund seiner Fütterungsversuche an Ratten mit [1-^{14}C]Linolsäure und [1-^{14}C]-γ-Linolensäure folgenden Weg für die Synthese der Arachidonsäure:

$$\text{Linolsäure} \xrightarrow{-2\,H} \gamma\text{-Linolensäure} \xrightarrow{+\,C_2} \text{Homo-}\gamma\text{-Linolensäure} \xrightarrow{-2\,H} \text{Arachidonsäure}$$

Diese Versuche in vivo erlaubten keinen Aufschluß über den Mechanismus der Biosynthese der Polyenfettsäuren. Die oben erwähnten Versuche hatten jedoch gezeigt, daß die Doppelbindungen der Polyensäuren nicht im Verlauf des Abbaus und einer dann anschließenden Kettenverlängerung der Linolsäure eingebaut werden. Vielmehr handelt es sich um zwei Reaktionen, nämlich die Kettenverlängerung und die Dehydrogenierungen.

In der vorliegenden Arbeit wird der erste Versuch unternommen, die Biosynthese der Polyensäuren in die Kettenverlängerung und die Dehydrogenierungen aufzuschlüsseln und deren Mechanismus zu ana-

* Verwendete Abkürzungen: CoA = Coenzym A; NADH und NADPH = reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat), bisher bekannt als DPNH und TPNH.

[1] E. Klenk, Naturwissenschaften **41**, 68 [1954]; diese Z. **302**, 268 [1955]; E. Klenk u. G. Kremer, diese Z. **320**, 111 [1960].

[2] J. F. Mead, G. Steinberg u. D. R. Howton, J. biol. Chemistry **205**, 683 [1953]; G. Steinberg, W. H. jr. Slaton, D. R. Howton u. J. F. Mead, ebenda **220**, 257 [1956]; ebenda **224**, 841 [1957]; J. F. Mead, ebenda **227**, 1025 [1957]; J. F. Mead u. D. R. Howton, ebenda **229**, 575 [1957].

lysieren. Die Arbeiten von Lynen[3], Brady[4] und Wakil[5] hatten eindeutig gezeigt, daß der Aufbau der gesättigten Fettsäuren von Acetyl-Coenzym A ausgehend durch Malonyl-CoA erfolgt, wobei im Verlauf der Acylierung des Malonyl-CoA Decarboxylierung eintritt. Diese durch das Synthetase-System katalysierte Reaktion verläuft im Falle der Hefe bis Stearinsäure[6]. Längerkettige Säuren wurden nicht beobachtet. Die Synthese verläuft im Überstand. In jüngster Zeit berichtete Wakil[7] über ein in den Mitochondrien lokalisiertes kettenverlängerndes Enzymsystem, das Acetyl-CoA nicht durch Carboxylierung sondern durch Pyridoxaminphosphat aktivieren soll. In seine Hypothese bezieht Wakil ebenso die Ölsäure und die essentiellen Fettsäuren ein, die in die entsprechenden C_{20}-Säuren verlängert werden sollen. Systematische Versuche zur Stützung dieser Hypothese stehen jedoch aus.

Synthesen von markierten und nicht markierten Ausgangsverbindungen

Für die im folgenden beschriebenen Versuche waren mehrere mit ^{14}C und Tritium markierte Polyensäuren und deren Coenzym-A-Ester erforderlich, die über die in Schema 1 und 2 wiedergegebenen Stufen synthetisiert wurden und deren Synthesen im experimentellen Teil beschrieben sind. Die Synthesen führten zu gaschromatographisch reiner [T]*all-cis*-Linolsäure ($\Delta^{9.12}$-Oktadecadiensäure, Verb. X), [T]γ-Linolensäure ($\Delta^{6.9.12}$-Oktadecatriensäure, XII), [T]- und [2-^{14}C]$\Delta^{11.14}$-Eicosadien- (XIV bzw. XXa) und -$\Delta^{8.11.14}$-Eicosatriensäure (XVI bzw. XXb).

Die Coenzym-A-Verbindungen wurden sowohl enzymatisch[8] als auch chemisch[9] dargestellt und charakterisiert.

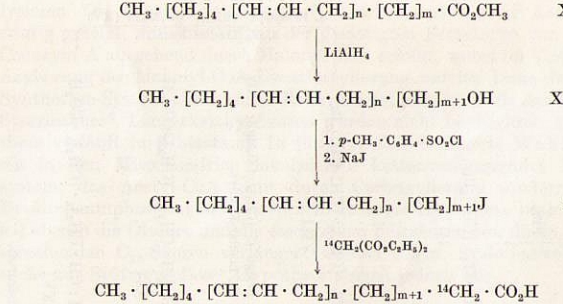
Kettenverlängerung der Linolsäure zu $\Delta^{11.14}$-Eicosadiensäure

Die einzelnen Zellfraktionen von Rattenleber (Hungertiere) wurden nach Standard-Methoden[10, 11] präpariert und mit Linolyl-CoA und [1-^{14}C]Acetyl-CoA sowie den unten angegebenen Cofaktoren inkubiert, die Fettsäuren isoliert, ihre Methylester gaschromatographisch getrennt und die Radioaktivität der einzelnen Komponenten gemessen. Tab. 1 gibt einen Überblick über die durch die einzelnen Fraktionen inkorporierten Acetatmengen.

---

[3] F. Lynen, J. cellular comparat. Physiol. Suppl. **54**, 1, 33 [1959].
[4] R. O. Brady, Proc. nat. Acad. Sci. USA **44**, 993 [1958].
[5] S. J. Wakil, J. Amer. chem. Soc. **80**, 6465 [1958].
[6] F. Lynen, Colloques int. Centre nat. Rech. sci. **99**, 71 [1961].
[7] S. J. Wakil, J. Lipid. Res. **2**, 1 [1961].
[8] A. Kornberg u. W. E. Pricer, J. biol. Chemistry **204**, 329 [1953].
[9] T. Wieland u. L. Rueff, Angew. Chem. **65**, 186 [1953].
[10] G. H. Hogeboom, W. C. Schneider u. G. E. Palade, J. biol. Chemistry **172**, 619 [1948].
[11] P. Siekevitz, J. biol. Chemistry **195**, 549 [1952].

Schema 1. Synthese tritiummarkierter C_{18}- und C_{20}-Polyenfettsäuren.



Schema 2. Synthese von [2-^{14}C]Eicosapolyensäuren.
a: n = 2, m = 6; b: n = m = 3

Tab. 1. Inkubationsversuche zur Kettenverlängerung von Linolyl-CoA.
Jeder Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml: 100 µMol Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, 25 µMol ATP, 150 µMol $KHCO_3$, 15 µMol Cystein, 15 µMol $MgCl_2$, 0,3 µMol Linolyl-CoA, 0,3 µMol [1-^{14}C]Acetyl-CoA ($1{,}3 \times 10^6$ ipm), 1 µMol NADPH, 1 µMol NADH; Inkub.: 2 Stdn. bei 37°.

Zellfraktion	mg Protein	ipm	nMol [1-^{14}C]-Acetat inkorp.	% Acetat inkorp.	nMol Acetat pro mg Protein
Mitochondrien . . .	25	62650	14,2	4,75	0,36
Mikrosomen	13,5	6500	1,45	0,49	0,07
Überstand.	7,0	131900	30,6	10,2	2,8

Die Radioaktivitätsverteilungen in den Fettsäuremethylestern der Inkubationsansätze mit mitochondrialem und Überstand-Protein sind in Abb. 1a und 1b wiedergegeben.

Abb. 2 gibt die Abhängigkeit der Acetatinkorporation von der Proteinmenge von Mitochondrien und Überstand wieder.

Da bisher nur eine Synthese von gesättigten Fettsäuren durch die cytoplasmatische Fraktion sowohl von Lebergewebe[5] als auch von Hefe beobachtet wurde, erhob sich die Frage, ob der Kettenverlängerung der ungesättigten Fettsäuren der gleiche oder aber ein völlig anderer Mechanismus zugrunde liegt.

Aus der starken Abhängigkeit der Acetatinkorporation von der $HCO_3^{\ominus}$-Konzentration (Abb. 3) wurde der erste Hinweis für die von Lynen[12] zuerst postulierte CO_2-Fixierung durch die Biotin abhängige Acetyl-CoA-Carboxylase* zu Malonyl-CoA erhalten.

* EC 6.4.1.2.

[12] F. Lynen, Gordon Conference Lipid-Metabolism 1958.

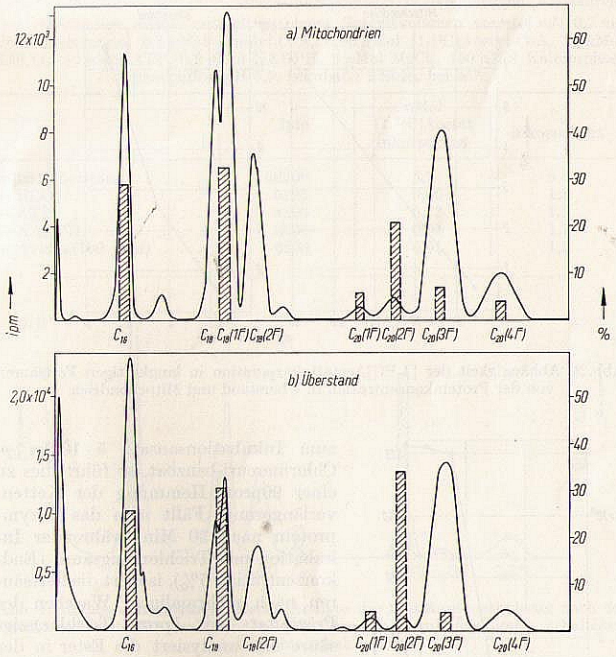


Abb. 1. Radiogaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester nach der Inkubation mit Mitochondrien (a) und dem Überstand (b).

Stationäre Phase: Äthylenglykol-polyadipinsäureester, 185°; 60 ml Durchfluß, Barber-Colman. Linke Ordinate und schraffierte Balken: Radioaktivität; rechte Ordinate und ausgezogene Kurven: % der eingesetzten Substanzmenge.

Diese Acetatinkorporation konnte durch Avidin, NADPH- und ATP-Entzug gehemmt werden (Tab. 2).

Die gesamte Enzymaktivität, nämlich die der Acetyl-CoA-Carboxylase und des Synthetase-Systems, ist in der zwischen 0 und 45% Ammoniumsulfatsättigung präzipitierenden Proteinfraktion des Überstandes enthalten (vgl. Abb. 4 und Tab. 3).

Es besteht ferner der Hinweis, daß nach der Carboxylierung des Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA dieses auf eine SH-Gruppe des Enzymproteins umacyliert wird, so wie es für das Hefe-Synthetase-System beschrieben wurde[6]. Dies geht aus folgenden Versuchen hervor: Fügt man

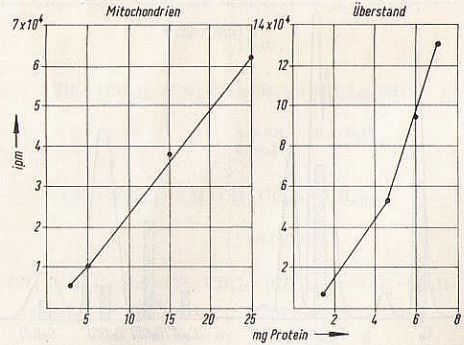


Abb. 2. Abhängigkeit der [1-^{14}C]Acetatinkorporation in langkettigen Fettsäuren von der Proteinkonzentration in Überstand und Mitochondrien.

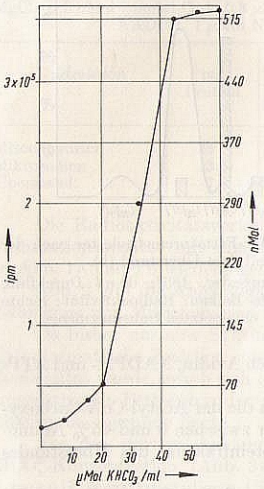


Abb. 3. Abhängigkeit der [1-^{14}C]-Acetatinkorporation in langkettigen Fettsäuren von der HCO_3^--Konzentration.

zum Inkubationsansatz $5 \cdot 10^{-3} m$ *p*-Chlormercuri-benzoat, so führt dies zu einer 90proz. Hemmung der Kettenverlängerung. Fällt man das Enzymprotein nach 30 Min. währender Inkubation mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 5%), isoliert die Fettsäuren nach mehrmaligem Waschen des Präzipitats mit 1proz. Trichloressigsäure und analysiert die Ester in der unten beschriebenen Weise (S. 87), so findet man mehr als ein Drittel der Radioaktivität an das Protein gebunden. Die Aktivität ist in denselben Komponenten vorhanden wie in den nicht proteingebundenen Säuren. Bei diesen sind mehr als 50% der Radioaktivität in der C_{20}-Diensäure vorhanden (Abb. 4). In Tab. 3 wird die Radioaktivitätsverteilung auf die einzelnen Ester zusammengefaßt.

Die Ester wurden einmal auf Grund ihrer spezifischen Retentionsvolumina identifiziert, ferner — und das vor allem im Falle der C_{20}-Diensäure — durch Cochromatographie

Tab. 2. Cofaktoren der [1-^{14}C]Acetatinkorporation in langkettigen Fettsäuren. Der vollständige Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml: 0,7 mg Überstandprotein, 0,1 μMol Linolyl-CoA, 0,06 μMol [1-^{14}C]Acetyl-CoA, 75 μMol $KHCO_3$, 10 μMol ATP, 0,2 μMol NADPH, 3 μMol $MgCl_2$, 150 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5. Inkubat.: 2 Stdn. bei 35°.

	ipm	nMol [1-^{14}C]Acetat inkorporiert	% inkorporiert
vollst. Überstand	38200	5,7	9,4
— HCO_3^-	5295	0,80	1,3
— ATP	4895	0,72	1,2
— NADPH	6800	0,94	1,7
+ Avidin (100 γ/ml) . . .	6200	0,91	1,5

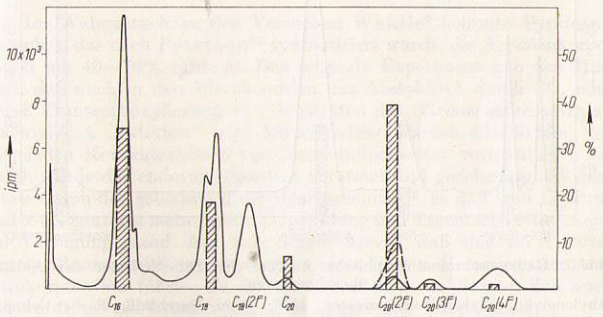


Abb. 4. Radiogaschromatographische Analyse der Fettsäure-methylester nach der Inkubation mit der zwischen 0—40% Ammoniumsulfatsättigung erhaltenen Überstandsfraktion.

Äthylenglykol-polyadipinsäureester, 175°, 60 ml Durchfluß, Barber-Colman. Linke Ordinate und schraffierte Balken: Radioaktivität; rechte Ordinate und ausgezogene Kurve: % der eingesetzten Substanzmenge; gestrichelte Linie: Cochromatographierter synthet. $\Delta^{11,14}$-Eicosadiensäure-methylester.

Tab. 3. Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Fettsäure-methylestern nach Inkubation von Linolyl-CoA und [1-^{14}C]Acetyl-CoA mit dem Präzipitat bei 0- bis 45proz. Ammoniumsulfatsättigung.

Inkubation von	% Radioaktivität in					
	C_{16}	C_{18}	C_{20}	C_{20} (2/═)	C_{20} (3/═)	C_{20} (4/═)
Überstand + [1-^{14}C]Acetat + Linolsäure	43	43,5	4,5	10	—	—
Überstand + [1-^{14}C]Acetyl-CoA + Linolyl-CoA	28	22	5	40	5	—
0—40% Sättigung + [1-^{14}C]Acetyl-CoA + Linolyl-CoA	19	19	6	51	5	—

authentischen, durch Synthese erhaltenen $\Delta^{11.14}$-Eicosadiensäure-methylesters (XIV bzw. XXa). Ein schlüssiger Beweis dafür, daß die C_{20}-Diensäure durch Kettenverlängerung der Linolsäure entstanden ist, wurde durch den oxydativen Ozonidabbau[13] der über die Quecksilberaddukte[14] angereicherten Polyensäuren geliefert. Die hochradioaktive Nonandicarbonsäure (C_{11}) konnte nur von der $\Delta^{11.14}$-Eicosadiensäure herrühren (Abb. 5).

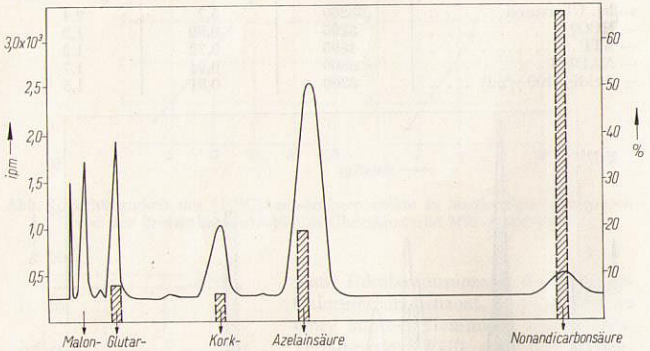


Abb. 5. Radiogaschromatographische Analyse der Dimethylester der Abbaudicarbonsäuren.

Äthylenglykol-polybernsteinsäureester, 135°, 60 ml Durchfluß, Barber-Colman. Linke Ordinate und schraffierte Balken: Radioaktivität; rechte Ordinate und ausgezogene Kurven: % der eingesetzten Substanzmenge.

Eine weitere Kontrolle wurde durch die radiogaschromatographische Analyse der hydrierten Probe und die sich daraus ergebende Bilanz der Radioaktivitätsverteilung auf die homologen Säuren erhalten.

Aus Tab. 1 (S. 74) geht hervor, daß auch in den Mitochondrien ein verhältnismäßig geringer Acetateinbau in langkettige Fettsäuren stattfindet. Tab. 4 zeigt zusammenfassend, daß als Cofaktoren ATP, NADPH und NADH mitwirken.

Aus Abb. 1a geht hervor, daß neben der C_{20}-Diensäure noch die C_{20}-Monoen-, C_{20}-Trien- und -Tetraensäuren markiert sind. Während die C_{20}-Monoensäure möglicherweise durch Kettenverlängerung der endogen vorliegenden Ölsäure entstanden ist, handelt es sich bei der C_{20}-Trien- und -Tetraensäure um Dehydrogenierungsprodukte der C_{20}-Diensäure. Bekanntlich gelingt es nicht, Mitochondrien frei von Mikrosomen zu präparieren.

[13] E. Klenk u. W. Bongard, diese Z. **290**, 181 [1952].
[14] E. Jantzen u. H. Andreas, Chem. Ber. **94**, 628 [1961].

Tab. 4. Inkubation von Mitochondrien mit Linolyl-CoA, [1-^{14}C]Acetyl-CoA und den angegebenen Cofaktoren.

Jeder Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 3,0 *ml*: 0,3 μMol [1-^{14}C]Acetyl-CoA ($2{,}9 \times 10^6$ ipm), 1 μMol NADPH, 1 μMol NADH, 25 μMol ATP, 0,5 μMol Linolyl-CoA, 15 μMol $MgCl_2$, 15 μMol Cystein, 150 μMol Phosphatpuffer, pH 6,5, 25 mg Protein. Inkubation: 2 Stdn. bei 30°.

Cofaktoren	ipm	nMol Acetat inkorporiert
vollst. System	13600	14
— ATP	970	1
— NADPH	6800	7,0
— NADH	9150	9,2

Im Widerspruch zu den Versuchen Wakils[7] hemmte Pyridoxalphosphat, das nach Peterson[15] synthetisiert wurde, die Acetatinkorporation um 40—70% (Tab. 5). Das folgende Experiment gab den Hinweis, daß auch in den Mitochondrien das Acetyl-CoA durch CO_2 oder durch Transcarboxylierung von Substraten des Citronensäurecyclus zu Malonyl-CoA „aktiviert" wird. Mitochondrien wurden 45—60 Min. mit steigenden Konzentrationen von Natriumfluoracetat vorinkubiert; dadurch wurde das endogene Substrat veratmet und gleichzeitig die Aconitase durch das gebildete Fluorcitrat gehemmt[16], so daß kein Isocitrat und α-Oxoglutarat mehr für die CO_2-Bildung und Transcarboxylierungen zur Verfügung stand. Aus Tab. 5 geht hervor, daß eine $4{,}5 \times 10^{-3}$*m* Natriumfluoracetat-Konzentration zu einer 70proz. Hemmung der Acetatinkorporation führte. Zu diesem Schluß kam in jüngster Zeit auch Hülsmann[17] auf Grund völlig anders angelegter Experimente.

Tab. 5. Einfluß des Natriumfluoracetats und Pyridoxalphosphats auf die Inkorporation von [1-^{14}C]Acetat durch Mitochondrien.

Zusatz [mMol/*l*]	nMol [1-^{14}C]Acetat inkorporiert	ipm
ohne	14,1	13800
Pyridoxalphosphat		
1	8	7750
5	8	7720
10	4,1	3985
FCH_2CO_2Na		
1,5	9,8	9400
3,0	5,2	5000
4,5	4,0	3850

[15] E. A. Peterson, H. A. Sober u. A. Meister, Biochem. Preparations **3**, 34 [1953].
[16] R. A. Peters, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B, **139**, 143 [1952].
[17] W. C. Hülsmann, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **58**, 417 [1962].

Einführung der Doppelbindungen

Zum Studium des Mechanismus der Einführung der Doppelbindungen von *all-cis*-Konfiguration im Divinylmethanrhythmus wurden die Coenzym-A-Derivate von [2-^{14}C]$\Delta^{11.14}$-Eicosadiensäure und [2-^{14}C]-$\Delta^{8.11.14}$-Eicosatriensäure dargestellt (s. S. 86) und zusammen mit verschiedenen Cofaktoren und Zellfraktionen inkubiert, die ungesättigten Fettsäuren nach der Inkubation isoliert und nach der oxydativen Ozonidspaltung die Dicarbonsäuren säulenchromatographisch getrennt und deren Radioaktivität bestimmt. Findet eine Einführung von Doppelbindungen unter Umwandlung zu Arachidonsäure statt, so gibt die in der Glutarsäure befindliche Radioaktivität die Ausbeute an, mit der die Dehydrogenierung verlaufen ist.

$$CH_3 \cdot [CH_2]_4 \cdot [CH:CH \cdot CH_2]_3 \cdot CH:CH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot \overset{*}{C}H_2 \cdot CO_2H$$

$$\downarrow O_2/H_2O_2$$

$$CH_3 \cdot [CH_2]_4 \cdot CO_2H + 3\,HO_2C \cdot CH_2 \cdot CO_2H + HO_2C \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot \overset{*}{C}H_2 \cdot CO_2H$$

In Tab. 6 sind die Ergebnisse von Inkubationen der verschiedenen Zellfraktionen unter aeroben und anaeroben Bedingungen zusammengestellt.

Da die säulenchromatographische Trennung der höheren Dicarbonsäuren (C_8—C_{11}) nicht zufriedenstellend ist, wurde diese Fraktion papierchromatographisch (System: Chloroform, Papier Schleicher & Schüll 2043b, absteigend) analysiert. Es stellte sich dabei heraus, daß rund 5% der eingesetzten Aktivität in der Korksäure vorhanden waren.

Tab. 6. Inkubationsversuche zur Bestimmung der Zellfraktionen und der Bedingungen für die Dehydrogenierungen von $\Delta^{11.14}$-Eicosadienoyl-CoA.

Jeder Inkubationsansatz enthielt im Gesamtvolumen von 1,5 ml: [2-^{14}C]$\Delta^{11.14}$-Eicosadienoyl-CoA in der angegebenen Menge (0,1 μMol = 33000 ipm), 15 mg Protein, 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 10 μMol Kaliumthioglykolat; Inkubation: 60 Min. bei 30°.

Zellfraktion	eingesetzte Aktivität [ipm]	Aktivität in Dicarbonsäuren [ipm]		dehydrogeniert [%]
		C_{11}—C_8	C_5	
Mitochondrien				
anaerob . . .	33000	26800	395	1,2
aerob	33000	25100	180	0,5
Mikrosomen				
anaerob . . .	33000	28300	750	2,2
aerob	33000	27400	3620	11,0
aerob	47000	33600	8020	17,0
aerob	200000	144300	34500	17,2
Überstand				
aerob	33000	28400	650	2,0

Wurde statt der Diensäure [2-^{14}C]$\Delta^{8.11.14}$-Eicosatrienoyl-CoA mit Mikrosomen inkubiert, so ergab sich eine Umwandlung in Arachidonsäure von 22%. Abb. 6 veranschaulicht eine säulenchromatographische Trennung der Dicarbonsäuren nach Inkubation von Mikrosomen mit [2-^{14}C]-$\Delta^{11.14}$-Eicosadienoyl-CoA unter aeroben Bedingungen. Die Malonsäure erwies sich in allen Fällen als inaktiv.

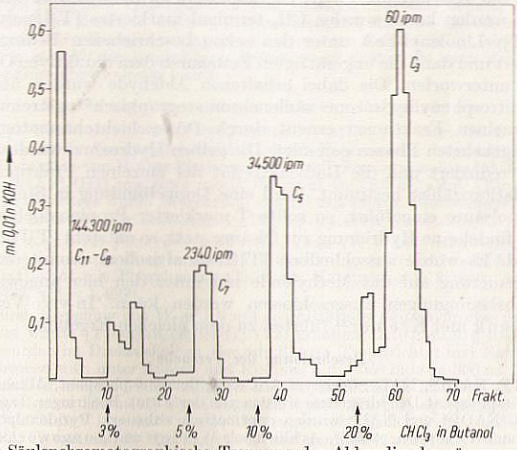


Abb. 6. Säulenchromatographische Trennung der Abbaudicarbonsäuren nach der aeroben Inkubation von [2-^{14}C]$\Delta^{11.14}$-Eicosadienoyl-CoA mit Mikrosomen.
Abszisse: Fraktionen à 2 ml. Die Radioaktivitäten sind über den einzelnen Komponenten angegeben.

Außer Sauerstoff erwies sich NADPH als wesentlicher Cofaktor. Die Dehydrogenierung verläuft ferner nur am Coenzym-A-Derivat der Säure (Tab. 7).

Tab. 7. Cofaktoren der Dehydrogenasereaktion.
Der vollständige Ansatz enthielt in 1,5 ml: 0,1 µMol [2-^{14}C]$\Delta^{11.14}$-Eicosadienoyl-CoA (33000 ipm), 15 mg Protein, 100 µMol Kaliumphosphatpuffer, 1 µMol NADPH, 10 µMol Kaliumthioglykolat; Inkubation: 60 Min. bei 30°.

	ipm in Glutarsäure	% dehydrogeniert
Vollst. System	4650	14
— Acyl-CoA + NH_4-Salz der $\Delta^{11.14}$-Eicosadiensäure	1445	4,5
— NADPH	1620	5,0
— NADPH + NADH	2200	6,5

Die genannten Cofaktoren O_2, NADPH und Coenzym-A-Derivat sind identisch mit den von Bloch[18, 19] für die Dehydrogenierung von Stearin- zu Ölsäure und Öl- zu Linolsäure ermittelten Faktoren, eine Reaktion, die an Hefe studiert wurde.

Die Umwandlung von Ölsäure in Linolsäure in der Hefe geht mit der Einführung einer Doppelbindung in Richtung auf das Methylende einher. Zur Klärung der Frage, ob Linolsäure zu Linolensäure dehydrogeniert werden kann, wurden CH_3-terminal markiertes [T]Linolyl-CoA und [T]γ-Linolenyl-CoA unter den schon beschriebenen Bedingungen inkubiert und dann die ungesättigten Fettsäuren dem reduktiven Ozonidabbau unterworfen. Die dabei erhaltenen Aldehyde wurden über die 2.4-Dinitro-phenylhydrazone säulenchromatographisch[20] getrennt und die einzelnen Fraktionen erneut durch Dünnschichtchromatographie mit umgekehrten Phasen gereinigt. Die gelben Hydrazone wurden katalytisch reduziert und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen im Scintillationszähler bestimmt. Wird eine Doppelbindung in Stellung 15 der Linolsäure eingeführt, so sollte T-markierter Propionaldehyd auftreten, findet eine Hydrierung zur Ölsäure statt, so entsteht [T]Pelargonaldehyd. Es wurde ausschließlich [T]Hexanal isoliert, womit eine Dehydrogenierung auf das Methylende hin unter den hier angewandten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden kann. In-vivo-Versuche von Klenk und Kremer[21] führten zu dem gleichen Ergebnis.

Beschreibung der Versuche

ATP, $NADP^{\oplus}$, $NAD^{\oplus}$, Coenzym A (CoA), Glucose-6-phosphat, Alkohol- und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurden von der Firma Boehringer, Ingelheim, bezogen. $NADP^{\oplus}$ und $NAD^{\oplus}$ wurden enzymatisch reduziert. Pyridoxalphosphat wurde nach Peterson et al.[15], Avidin nach Wooley und Longsworth[22] dargestellt.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe der quantitativen Biuret-Reaktion nach Beisenherz et al.[23]. Die Zellfraktionierung wurde nach Hogeboom, Schneider und Palade[10], die Präparation von Mikrosomen nach Siekevitz[11] ausgeführt.

Die aeroben Inkubationen erfolgten in Schliffzentrifugengläsern, anaerobe Inkubationen in Thunberg-Rohren im Thermostaten.

Die Radioaktivitätsmessungen sowohl der wasserlöslichen Coenzym-A-Derivate und Dicarbonsäuren als auch der toluollöslichen Fettsäuren und deren Ester wurden mit dem Flüssigkeitsscintillationszähler (Tricarb Model 314, Packard) durchgeführt. Als Phosphore dienten 2.5-Diphenyl-oxazol (POP) (4 g/l) und 1.4-Bis-[5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol (POPOP) (0,1 g/l) in Toluol oder Dioxan. Wasserunlösliche Verbindungen wurden mit einem kleinen Volumen Dioxan in Lösung gebracht und 5 bzw. 10 ml Toluollösung zugefügt. Die Zählausbeute (mit [^{14}C]-Benzoesäure bestimmt) betrug bei der Fensterbreite 10—60 V bei Tap 4 konstant 52%, für Tritium bei 10—60 V und Tap 7 10%.

[18] D. K. Bloomfield u. K. Bloch, J. biol. Chemistry **235**, 337 [1960].
[19] Ch. Yuan u. K. Bloch, J. biol. Chemistry **236**, 1277 [1961].
[20] E. Klenk u. H. Brockerhoff, diese Z. **310**, 153 [1955].
[21] E. Klenk u. G. Kremer, noch unveröffentlicht.
[22] D. W. Wooley u. L. G. Longsworth, J. biol. Chemistry **142**, 285 [1958].
[23] G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfleiderer, Z. Naturforsch. **8b**, 555 [1953].

Die Radiopapierchromatogramme wurden teils mit dem Radiopapierchromatographen FH 452 (Frieseke & Hoepfner) in Verbindung mit dem Methandurchflußzähler FH 407, dem Strahlungsmeßgerät FH 49 und einem Metrawatt-Schreiber ausgewertet. Chromatogramme tritiummarkierter Verbindungen wurden in 1 cm breite Streifen zerschnitten und in der Scintillatorlösung mit dem Tricarb-Gerät ausgewertet.

Die radiogaschromatographischen Analysen wurden auf dem Barber-Colman Gerät Model 10 so ausgeführt, daß der zu den einzelnen Komponenten des Gemisches gehörende Trägergasstrom vom Detektor über eine beliebig heizbare kurze Kapillare direkt in die Scintillationsflüssigkeit strömte. Es wurde so eine fast quantitative Rückgewinnung der aufgetragenen Radioaktivität, eine saubere Trennung sowohl der langkettigen Fettsäuremethylester als auch der Abbaudicarbonsäure-dimethylester erzielt.

Synthesen der tritiummarkierten Polyensäuren

[T]1-Brom-octin-(2) (VII): Pentin-(1)-ol-(5) (II) wurde nach Vogel[24] über Tetrahydrofurfurylchlorid (I) durch Natriumamid dargestellt. Katalytische Reduktion von II über Platinoxyd in einer Tritiumatmosphäre führte zu [T]-Amylalkohol (III) mit einer spezif. Aktivität von 2,3 μC/μMol. [T]n-Amylbromid (IV) wurde durch Bromierung von III mit 48proz. Bromwasserstoffsäure in 90proz. Ausbeute gewonnen, Sdp.$_{760}$ 78°, $n_D^{20} = 1{,}4440$, spezif. Akt. 2,3 μC/μMol.

2-[Propin-(2)-yloxy]-tetrahydropyran (V) erhielt man durch Reaktion von äquimolaren Mengen von 2.3-Dihydro-pyran und frisch dest. Propargylalkohol mit Phosphoroxychlorid als Katalysator in 85proz. Ausbeute. Sdp.$_{25}$ 78°, $n_D^{20} = 1{,}4560$.

Durch Kupplung von IV und V mit anschließender Säurehydrolyse des Pyranyläthers wurde [T]Oktin-(2)-ol-(1) (VI) erhalten: 2,10 g (0,30 g-Atome) Lithium wurden im Dreihalskolben, der mit Rührer, Tropftrichter und Natronkalkrohr versehen war, unter Rühren und Kühlung auf —35° in etwa 300 m*l* flüssigen Ammoniak in kleinen Teilen während 15 Min. eingetragen, nachdem zu Beginn eine Spatelspitze Eisen(III)-nitrat zugesetzt wurde. Nach 1stdg. Rühren wurden 35,0 g (0,25 Mol) V innerhalb von 30 Min. zugetropft. Nach 4 Stdn. wurden 19,5 g (0,12 Mol) IV während 20 Min. eingetropft und dann nach weiteren 5 Stdn. Rühren das Ammoniak unter Zutritt von Luftfeuchtigkeit über Nacht abdampfen gelassen. Das Reaktionsprodukt wurde in Äther aufgenommen, vom Lösungsmittel wieder befreit, mit 25 m*l* 25proz. H_2SO_4 und soviel Methanol versetzt, daß ein einphasiges System entstand. Diese Lösung wurde 30 Min. bei Zimmertemperatur gerührt und eine weitere $^1/_2$ Stde. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Sättigen der wäßr. Phase mit Kochsalz wurde VI in Äther aufgenommen, bis zur Neutralität gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel abgedampft und durch fraktionierte Destillation als farblose Flüssigkeit vom Sdp.$_{10}$ 91—94°, $n_D^{20} = 1{,}4561$ erhalten. Ausb.: 11,8 g (94 mMol) oder 78% d. Th.

11,2 g (89 mMol) [T]-Oktinol (VI) wurden in 20 m*l* trockenem Äther und 1,75 m*l* trockenem Pyridin gelöst und 9,8 g (36 mMol) Phosphortribromid innerhalb von 30 Min. unter Rühren bei —20° zugetropft, das Reaktionsgemisch anschließend noch 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht und dann auf Eis gegossen. Das Produkt wurde in Äther aufgenommen, die Lösung mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, die Lösung eingeengt und der Rückstand fraktioniert destilliert. Ausb.: 11,9 g (63 mMol) [T]Oktinbromid (VII), Sdp.$_{12}$ 90—91°, $n_D^{20} = 1{,}4862$; spezif. Akt. 2,3 μC/μMol. Die Verbindung ist gaschromatographisch rein.

[T]1-Brom-undecadiin-(2.5) (VIII): In einem 250-m*l*-Dreihalskolben, der mit Rührer, Kühler und Tropftrichter ausgerüstet war, wurden 4,8 g (0,2 g-

[24] A. I. Vogel, Practical Organic Chemistry S. 901, Longmans, Green & Co., New York 1956.

Atome) Magnesium mit 50 ml trockenem Tetrahydrofuran überschichtet, auf —5° gekühlt und unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 21 g (0,2 Mol) Äthylbromid in 20 ml Tetrahydrofuran während 45 Min. zugetropft und noch 3 weitere Stdn. bei Zimmertemperatur gerührt. Eine Lösung von 6,1 g (0,1 Mol) Propargylalkohol in 50 ml Tetrahydrofuran wurde innerhalb von 30 Min. bei 0° zugefügt, 3 Stdn. unter Stickstoff bei Zimmertemperatur gerührt und dann zum Grignard-Komplex 500 mg Kupfer(I)-cyanid gegeben. Nach 10 Min. wurden 9,3 g (0,05 Mol) [T]Oktinbromid (VII) in 30 ml Tetrahydrofuran bei Zimmertemperatur innerhalb von 15 Min. zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stdn. in N_2-Atmosphäre unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Der Grignard-Komplex wurde dann mit eiskalter 2*n* H_2SO_4 zerlegt, das Reaktionsprodukt mit Äther extrahiert, die Lösung 3mal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, eingeengt und destilliert. Ausb.: 6,5 g (47 mMol) [T]Undecadiin-(2.5)-ol-(1), Sdp.$_{0,1}$ 92°, n_D^{24} = 1,4810. Der Alkohol wurde wegen seiner großen Sauerstoffempfindlichkeit sofort bromiert: Zu 6,5 g (45 mMol) [T]Undecadiinol in 20 ml trockenem Äther und 1,0 ml Pyridin wurden bei —20° unter Rühren 5,6 g (25 mMol) Phosphortribromid innerhalb von 30 Min. zugetropft, 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht und dann auf Eis gegossen. Das Bromid (VIII) wurde in Äther aufgenommen, mit 5proz. $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen, über $CaCl_2$ getrocknet, eingeengt und der Rückstand fraktioniert destilliert. Sdp.$_{0,6}$ 86°, n_D^{20} = 1,5155. Ausb.: 4,6 g (21,5 mMol) = 81% d. Th., spezif. Akt. 2,3 μC/μMol. Das Bromid ist gaschromatographisch rein.

9-Decinsäure (IX): Aus 75 g (0,40 Mol) Undecylensäure wurden durch Bromierung, Enthalogenierung mit Natriumamid in flüssigem Ammoniak [aus 41 g (1,7 Mol) Natrium in 1,5 *l* NH_3] und Aufarbeitung in der üblichen Weise 60,0 g (0,37 Mol) 10-Undecinsäure vom Sdp.$_{0,1}$ 139° gewonnen. Veresterung mit 5proz. methanol. Salzsäure ergab 63,0 g (0,32 Mol) 10-Undecinsäuremethylester vom Sdp.$_{0,1}$ 97°.

11.11-Diphenyl-undecen-(10)-in-(1) wurde nach Khan[25] durch Grignard-Reaktion mit Phenylmagnesiumbromid dargestellt und dann mit Chromtrioxyd zu 9-Decinsäure (IX) oxydiert. Ausb.: 48% d. Th.; Sdp.$_{0,1}$ 88°; n_D^{20} = 1,4569.

6-Heptinsäure (XI): 1-Chlor-4-brom-butan wurde aus Tetrahydrofuran[26] synthetisiert, das 6-Chlor-hexin-(1) durch Reaktion des Chlorbrombutans mit Natriumacetylid; Sdp.$_{760}$ 144°, n_D^{20} = 1,4480. Das Chlorhexin wurde unter Rühren so zu Natriumcyanid in Dimethylsulfoxyd[27] getropft, daß die Temperatur 140° nicht überstieg. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stdn. bei 120° erhitzt und das Produkt auf Eis gegossen, mit Äther extrahiert, die vereinigten Auszüge wurden mit gesätt. Kochsalzlösung 2mal gewaschen und über $CaCl_2$ getrocknet. Das 6-Heptinsäure-nitril-(1) wurde sofort mit 15proz. methanol.-wäßr. KOH-Lösung durch 24stdg. Kochen unter Rückfluß verseift. Nach Abtrennen des Unverseifbaren wurden durch Destillation 10,5 g (84 mMol) 6-Heptinsäure (XI) erhalten. n_D^{20} = 1,4510. Der Methylester von XI (n_D^{20} = 1,4385) war gaschromatographisch rein.

[T]9.12-Octadecadiinsäure-methylester: Die Kupplung wurde in Anlehnung an die Methode von Osbond[28] durchgeführt. 2,45 g (0,1 g-Atom) Magnesiumspäne wurden in einem mit Rückflußkühler, Rührer und Tropftrichter versehenen 250-ml-Dreihalskolben mit 30 ml trockenem Tetrahydrofuran überschichtet und unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 12 g (0,11 Mol) Äthylbromid in 10 ml Tetrahydrofuran während 1 Stde. unter Rühren zugetropft. Nach dem

[25] N. Khan, Org. Syntheses **32**, 104 [1952].
[26] M. S. Newman u. J. H. Wotiz, J. Amer. chem. Soc. **71**, 1292 [1949].
[27] R. A. Smiley u. Ch. Arnord, J. org. Chemistry **25**, 257 [1960].
[28] I. M. Osbond, P. G. Philpott u. I. C. Wickens, J. chem. Soc. [London] **1961**, 2797.

Anspringen der Reaktion wurde auf —5° gekühlt. Nach Zugabe des Äthylbromids wurde noch weitere 3 Stdn. gerührt, dann eine Lösung von 8,4 g (50 mMol) 9-Decinsäure (IX) in 25 ml Tetrahydrofuran während 30 Min. bei 0° eingetropft und weitere 3 Stdn. gerührt. Nach Zugabe von 1,0 g Kupfer(I)-cyanid wurde eine Lösung von 4,75 g (25 mMol) [T]Octinbromid (VII) in 15 ml Tetrahydrofuran zugetropft und das Reaktionsgemisch 24 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Das Tetrahydrofuran wurde weitgehend im Vak. abdestilliert und der Grignard-Komplex bei 0° mit 2*n* H_2SO_4 zerlegt. Das Reaktionsprodukt wurde in Äther aufgenommen, die Säuren mit 2*n* NH_4OH aus dem Äther extrahiert und unter Kühlung mit 2*n* H_2SO_4 in Freiheit gesetzt. Sie wurden in Äther aufgenommen, über Na_2SO_4 getrocknet und nach dem Abdampfen des Lösungsmittels mit 5proz. methanol. Salzsäure in der üblichen Weise in die Methylester übergeführt. Der 9-Decinsäure-methylester wurde in einer für kleine Mengen eigens konstruierten Apparatur[29] durch Molekulardestillation bei 60°/0,03 Torr gereinigt und der Octadecadiinsäure-methylester bei 90—110°/10^{-4} Torr destilliert. Er war gaschromatographisch rein. Ausb.: 4,52 g (15,5 mMol) [T]9.12-Octadecadiinsäure-methylester, 62% d. Th.; $n_D^{20} = 1{,}4681$. Spezif. Akt. 2,3 μC/μMol.

[T]*all-cis*-$\Delta^{9.12}$-Octadecadiensäure-methylester: 4,52 g (15 mMol) des Diinsäuremethylesters wurden in 50 ml Methanol gelöst und über 2 g Lindlar-Katalysator[30], der mit 50 mg Chinolin vergiftet war, halbhydriert. Die theoretische Wasserstoffmenge (695 ml H_2) wurde innerhalb von 25 Min. aufgenommen. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Methanol im Vak. abgedampft, der Rückstand in Petroläther aufgenommen, die petrolätherische Lösung mit 2*n* HCl vom Chinolin befreit, mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und dann eingeengt. Der Rückstand wurde der Molekulardestillation[29] unterzogen, Badtemperatur 100 bis 115°/10^{-4} Torr. Das Destillat bestand aus dem gaschromatographisch reinen, farblosen [T]Linolsäure-methylester. Das IR-Spektrum wies keine trans-Bande bei 965 cm^{-1} auf. Ausb.: 4,25 g (14 mMol) oder 93% d. Th.; $n_D^{20} = 1{,}4606$, spezif. Akt. 2,3 μC/μMol.

[T]$\Delta^{6.9.12}$-Octadecatriensäure-methylester: Wie für [T]$\Delta^{9.12}$-Octadecadiinsäure-methylester beschrieben, wurden 8,8 g (70 mMol) 6-Heptinsäure (XI) und 10,3 g (44 mMol) [T]1-Brom-undecadiin-(2.5) (VIII) kondensiert. Jedoch wurde die Dauer der Kondensationsreaktion auf 8 Stdn. beschränkt. Ausb.: 9,1 g (33 mMol) oder 75% d. Th. Die gegen Luftsauerstoff sehr empfindliche Säure wurde sofort in einer Stickstoffatmosphäre mit HCl-Methanol verestert und destilliert. Der Ester wurde sogleich unter den beschriebenen Bedingungen halbhydriert. Da Oxydationsprodukte sehr leicht zur Vergiftung des Lindlar-Katalysators führen, wurde die methanol. Lösung des Triinsäureesters vor Beginn der Hydrierung mit 1 g Katalysator oder Tierkohle geschüttelt, unter Stickstoff schnell abfiltriert und dann hydriert. Nach Abtrennen des Chinolins wurde der γ-Linolensäure-methylester destilliert (Badtemperatur 110—120°/10^{-4} Torr), $n_D^{20} = 1{,}4682$. Der Ester war gaschromatographisch rein.

Die freien Säuren X und XII wurden durch Verseifung des [T]Linolsäure- und [T]γ-Linolensäure-methylesters in der üblichen Weise dargestellt.

[T]$\Delta^{11.14}$-Eicosadiensäure (XIV) und [T]$\Delta^{8.11.14}$-Eicosatriensäure (XVI) wurden nach der gleichen Methode aus VII und XIII bzw. VIII und XV in 50- bzw. 65proz. Ausbeute synthetisiert. Die Methylester waren gaschromatographisch rein.

Synthesen der [2-^{14}C]Eicosapolyensäuren[31]

Octadecadien-(9.12)-ol-(1) (XVIIIa): Durch $LiAlH_4$-Reduktion von 4,80 g (16 mMol) Linolsäure-methylester (XVIIa; Hoffmann-LaRoche) wurden

[29] H. Mohrhauer, Dissertat., Univ. Köln 1960.
[30] H. Lindlar, Helv. chim. Acta **35**, 446 [1952].
[31] E. Klenk u. H. Mohrhauer, diese Z. **320**, 218 [1960].

3,70 g (14 mMol) XVIIIa erhalten. Das IR-Spektrum wies keine Carbonylbande bei 1680 cm^{-1} auf. Der Tosylester wurde in Pyridin dargestellt und sofort in das 1-Jod-octadien-(9.12) (XIXa) übergeführt.

[2-^{14}C]$\Delta^{11.14}$-Eicosadiensäure (XXa): 1,13 g (3 mMol) XIXa und 320 mg (2 mMol) [2-^{14}C]Malonsäure-diäthylester wurden in die Malonestersynthese eingesetzt. Nach der Veresterung mit 5proz. methanol. Salzsäure wurde der Ester durch Molekulardestillation gereinigt. Ausb.: 395 mg (1,28 mMol [2-^{14}C]$\Delta^{11.14}$-Eicosadiensäure-methylester oder 64% d. Th. Spezif. Akt. 1,6 $\times$ 10^6 ipm/mg oder 0,48 μC/μMol. Der Ester war gaschromatographisch rein.

[2-^{14}C]$\Delta^{8.11.14}$-Eicosatriensäure-methylester: Octadecatrien-(6.9.12)-ol-(1) (XVIIIb) wurde durch $LiAlH_4$-Reduktion des durch Synthese erhaltenen inaktiven γ-Linolensäure-methylesters (XVIIb) dargestellt.

Tosylester und Jodid (XIXb) wurden wie beschrieben dargestellt. Aus 500 mg (1,5 mMol) [2-^{14}C]Malonsäure-diäthylester wurden 230 mg (0,77mMol) durch Destillation gereinigter [2-^{14}C]$\Delta^{8.11.14}$-Eicosatriensäure-methylester mit einer spezif. Aktivität von 0,65 μC/μMol erhalten.

[1-^{14}C]Acetyl-Coenzym A[32]: 10 mg (13 μMol) Coenzym A wurden in 2 *ml* 0,1*m* $KHCO_3$-Lösung mit 2 mg $NaBH_4$ bei 0° reduziert und zur gekühlten Lösung 1,5 mg (15 μMol) [1-^{14}C]Essigsäure-anhydrid gerührt, die Lösung auf pH 2 eingestellt, das Dioxan im Vak. abgedampft und die wäßrige Lösung lyophilisiert. Das [1-^{14}C]Acetyl-CoA wurde papierchromatographisch (System 0,1*m* Acetatpuffer, pH 4,5/96proz. Äthanol 1:1 bei 0—2° absteigend, Schleicher & Schüll 2043b) gereinigt. Die Zone mit dem R_F-Wert von 0,54 wurde nach dem Trocknen im Kühlraum eluiert und lyophilisiert. Auf Grund der Radioaktivitätsmessung betrug die Ausbeute 8,5 μMol [1-^{14}C]Acetyl-CoA oder 65% d. Th. Spezif. Akt. 10 μC/μMol.

Die Coenzym-A-Thioester der [T]Linol-, [T]γ-Linolen-, [2-^{14}C]$\Delta^{11.14}$-Eicosadien- und [2-^{14}C]$\Delta^{8.11.14}$-Eicosatriensäure sowie der inaktiven Linolsäure wurden sowohl enzymatisch[33, 18] als auch chemisch[34] mit folgenden Ausbeuten synthetisiert:

	Ausbeute [%]		spezif. Akt.
	enzymat.	chemisch	[ipm/μMol]
[T]Linolyl-CoA	60	54	4,2 $\times$ 10^6
[T]γ-Linolenyl-CoA	55	58	1,12 $\times$ 10^6
[2-^{14}C]$\Delta^{11.14}$-Eicosadienoyl-CoA .	55	—	0,24 $\times$ 10^6
[2-^{14}C]$\Delta^{8.11.14}$-Eicosatrienoyl-CoA	60	—	0,25 $\times$ 10^6

Durch Papierchromatographie ließen sich die vier CoA-Derivate in den Systemen Isopropylalkohol/Pyridin/Wasser 1:1:2 (R_F = 0,68—0,70) und Äthanol/0,1*m* Acetatpuffer, pH 4,5, 1:1 (R_F = 0,50) nicht voneinander trennen. Die Verbindungen sind leicht wasserlöslich und bei pH 7,0, —20° und unter Stickstoff monatelang haltbar. Die Ausbeute an inaktivem Linolyl-CoA wurde mit der verzögerten Nitroprussid-Reaktion[33] oder besser dem für langkettige Fettsäureester abgeänderten Hydroxamattest[34] bestimmt, die Ausbeute an chemisch synthetisiertem Linolyl-CoA spektrophotometrisch[35], wobei die molaren Extinktionen für Palmitoyl-CoA bei 260 mμ (E = 16,4 $\times$ 10^6 cm^2/Mol) und 230 mμ (E = 0,4 $\times$ 10^6 cm^2/Mol) der Berechnung zugrunde gelegt wurden.

[32] E. J. Simon u. D. Shemin, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2520 [1953].
[33] F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. **574**, 33 [1951].
[34] M. M. Rapport u. N. Alonzo, J. biol. Chemistry **217**, 193 [1955].
[35] W. Seubert, Biochem. Preparations **7**, 80 [1960].

Isolierung der Fettsäuren: Die Inkubationsansätze wurden mit 1—2 ml 10proz. methanol. KOH 2 Stdn. in N_2-Atmosphäre unter Rückfluß gekocht, Unverseifbares mit Petroläther ausgeschüttelt, die alkoholische Lösung mit 2*n* HCl angesäuert und 3mal mit Petroläther ausgeschüttelt, die vereinigten Petrolätherextrakte über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde sofort mit BF_3-Methanol verestert und die Ester in der üblichen Weise isoliert. Wenn erforderlich, wurde auf dieser Stufe mit Fettsäuremethylestern, die aus der gleichen für die Inkubation verwendeten Zellfraktion gewonnen waren, verdünnt.

Trennung der gesättigten Monoen- und Polyenfettsäuren über die Quecksilber-Addukte[14]: Die Methylester wurden mit 2 ml einer 2proz. methanol. Quecksilber(II)-acetat-Lösung 4 Stdn. bei 50° im Brutschrank und 36 Stdn. bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Lösungsmittel wurde vollständig im Vak. bei 25—30° abgedampft, der Rückstand 3mal mit je 2 ml Benzol extrahiert und die vereinigten Extrakte auf eine Kieselsäure-Säule (2 g) aufgetragen. Die gesätt. Ester wurden frontal mit Benzol (30 ml Benzol) und die Monoene mit Äther eluiert. Die Elution der Monoene erwies sich dann als vollständig (gaschromatographische Analyse), wenn der Tüpfeltest des Eluates mit einer 2proz. Diphenylcarbazonlösung (aus 100 mg Diphenylcarbazid in 5 ml 10proz. methanol. KOH kurz aufgekocht) negativ war. Die Polyenfettsäure-methylester-Addukte wurden mit 20 ml 5proz. Eisessig in Äthanol frontal eluiert.

Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels der einzelnen Fraktionen wurden die Addukte mit 2 ml konz. Salzsäure, 2 ml Wasser und 4 ml Methanol sowie 5 ml Petroläther (30—60°) 60 Min. geschüttelt und die regenerierten Fettsäureester nach Abdampfen des Petroläthers erhalten.

Die Radioaktivitätsverteilung auf die einzelnen Komponenten wurde, wie beschrieben, gaschromatographisch bestimmt. Ein aliquoter Teil wurde in einer Mikrohydrierapparatur vollständig hydriert und ebenfalls zur Kontrolle radiogaschromatographisch analysiert.

Oxydativer Abbau der Polyenfettsäuren: Die Methylester der Polyensäuren wurden mit 0,5*n* methanol. KOH in der üblichen Weise verseift und anschließend dem oxydativen Ozonidabbau unterworfen[13]. Die Monocarbonsäuren wurden mit Petroläther von dem dabei anfallenden, in Methanol-Wasser 1:1 gelösten, Dicarbonsäuregemisch abgetrennt. Die Dicarbonsäurelösung wurde bis zur Trockne eingedampft (Temp. $< 40°$), mit Diazomethan verestert und dann gaschromatographisch in Verbindung mit der Radioaktivitätsmessung analysiert.

Reduktiver Ozonidabbau: Ein aliquoter Teil der in Methylenchlorid bei —20° ozonisierten Polyensäuren wurde abpipettiert und zur Ozonidlösung 20 bis 30 mg Triphenylphosphin in 2 ml Methylenchlorid gegeben. Nach 4stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde zur Lösung 1 ml alkohol. 3.4-Dinitro-phenylhydrazin-Lösung gefügt, kräftig durchgeschüttelt, kurze Zeit auf 60° erhitzt und nach 2 Stdn. mit 5 ml 2*n* H_2SO_4 verdünnt. Die Dinitrophenyl-hydrazone wurden mit nitromethangesätt. Petroläther (60—80°) extrahiert, Aldehydsäuren mit 5proz. $NaHCO_3$ ausgeschüttelt, die Lösung über Na_2SO_4 getrocknet, eingeengt, auf 10 ml aufgefüllt und ein aliquoter Teil des Hydrazongemisches nach Kepner[36] durch Verteilungschromatographie getrennt. Die einzelnen Fraktionen erwiesen sich im Dünnschichtchromatogramm stets mit Hydrazonen anderer Kettenlänge verunreinigt. Aliquote Teile jeder Fraktion wurden daher durch Dünnschichtchromatographie mit umgekehrten Phasen gereinigt: Die Dinitrophenylhydrazone (bis zu 500 γ) wurden als Fleck oder aber strichförmig auf der Startlinie einer mit einer 5proz. petrolätherl. Vaselinlösung imprägnierten Kieselgel-Schicht aufgetragen und in Methanol/Wasser 9:1 oder 7:1 entwickelt. Die gelben Flecken oder Banden wurden von der Glasplatte quantitativ in ein Reagenzglas übergeführt, mit Benzol eluiert, die Konzentration kolorimetrisch bestimmt[20] oder aber die Lösung im Vak.

[36] N. G. Hawkins, A. Dinsmoor-Webb u. R. Kepner, Analytic. Chem. 28, 1975 [1956].

eingeengt, in Äthanol gelöst und über PtO_2 katalytisch in der Mikrohydrierapparatur hydriert. Die farblose Lösung wurde mit methanol. Salzsäure angesäuert und zur Trockne eingeengt. Der farblose Rückstand wurde quantitativ mit einer Dioxan-Toluol-Scintillatorlösung in ein Zählgläschen gebracht und die Radioaktivität gemessen. Auf diese Weise war eine einwandfreie Messung der Aktivität der Dinitrophenylhydrazone von tritiummarkierten Abbaualdehyden ohne jeden Quencheffekt möglich.

Zusammenfassung

In Versuchen in vitro konnte gezeigt werden, daß Linolyl-Coenzym A zu $\Delta^{11,14}$-Eicosadiensäure durch ein im Überstand von Rattenleber befindliches Enzymsystem nach dem für die Synthese gesättigter Fettsäuren gültigen Mechanismus durch Malonyl-CoA verlängert wird. Die Dehydrogenierung von $\Delta^{11,14}$-Eicosadienoyl- und $\Delta^{8,11,14}$-Eicosatrienoyl-Coenzym A verläuft in einer sauerstoff- und NADPH-abhängigen Reaktion in den Mikrosomen. Linolsäure wird nicht zu Linolensäure dehydrogeniert, wodurch ein Übergang von Polyensäure des Linolsäuretypus in solche des Linolensäuretypus ausgeschlossen wird.

Summary

In vitro studies showed that in the conversion of linolyl-coenzyme A to $\Delta^{11,14}$-eicosadienoic acid by an enzyme system in the soluble fraction of rat liver, the chain is extended by malonyl-CoA, analogous to the synthesis of saturated fatty acids. The dehydrogenation of $\Delta^{11,14}$-eicosadienoyl- and $\Delta^{8,11,14}$-eicosatrienoyl-coenzyme A occurs in the microsomes and is oxygen and NADPH-dependent. Linoleic acid is not dehydrogenated to linolenic acid; the conversion of polyunsaturated acids of the linoleic type to those of the linolenic type is thus excluded.

Priv.-Doz. Dr. Dr. W. Stoffel, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Köln, 5 Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Straße 52.