Sonderdruck
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 337, S. 123—132, 1964
Walter de Gruyter & Co., Berlin

Der Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren, II[1]

Eigenschaften des kettenverlängernden Enzyms Zur Frage der Biohydrogenierung der ungesättigten Fettsäuren *

Von

Wilhelm Stoffel und Karl-Ludwig Ach

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln

(Der Schriftleitung zugegangen am 30. November 1963)

Herrn Professor K. Bernhard zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Biosynthese der hochungesättigten Fettsäuren im tierischen Organismus besteht aus zwei ihrem chemischen Mechanismus nach unabhängigen Reaktionen: 1. der Verlängerung der Kohlenstoffkette der essentiellen Fettsäuren und 2. der Einführung im Polyallylrhythmus angeordneter *all-cis*-Doppelbindungen in Richtung auf das Carboxylende des Moleküls hin.

Verlängerung der Kohlenstoffkette langkettiger gesättigter, Monoen- und Polyenfettsäuren

In früheren Untersuchungen konnte indirekt gezeigt werden, daß die Linolsäure durch Malonyl-CoA in Gegenwart von NADPH zu 11.14-Eicosadiensäure verlängert wird und in einer sauerstoff- und NADPH-abhängigen Reaktion weitere Doppelbindungen stereospezifisch eingeführt werden[1]. Der von uns vorgeschlagene und nun auch experimentell direkt gesicherte Mechanismus steht im Gegensatz zu der Hypothese Wakils[2], wonach ein in den Mitochondrien lokalisiertes Enzymsystem die Kettenverlängerung mit durch Pyridoxaminphosphat aktiviertem Acetyl-CoA durchführen soll.

Die Beobachtungen, daß die Kettenverlängerung von Linolyl-CoA durch Acetyl-CoA in Abhängigkeit von der Hydrogencarbonat-, ATP- und NADPH-Konzentration verlief[1], führte zu dem Schluß, daß die C_2-Einheit über Malonyl-CoA inkorporiert wird und somit der Neusynthese von gesättigten Fettsäuren und der Kettenverlängerung ein einheitlicher chemischer Mechanismus zugrunde liegt. Es konnte nun

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

[1] I. Mitteil.: W. Stoffel, diese Z. **333**, 71 [1963]; Vortrag a. d. Gemeins. Tagung d. Dtsch. Ges. f. Physiol. Chem. u. d. Österr. Biochem. Ges., Wien, 26.—29. Sept. 1962; Biochem. biophysic. Res. Commun. **6**, 270 [1961].

[2] S. J. Wakil, J. Lipid Res. **2**, 1 [1961].

der direkte Beweis geführt werden, daß nicht nur die Linolsäure und γ-Linolensäure, sondern prinzipiell alle langkettigen Fettsäuren durch Malonyl-CoA verlängert werden.

Nach der von uns entwickelten Methode wurden die am häufigsten im tierischen Organismus vorkommenden Monoen- und Polyensäuren, ^{14}C-markiert in der Carboxylgruppe, durch Totalsynthese erhalten[3]. Dadurch wurden nun sehr übersichtliche Versuchsbedingungen geschaffen und eine sehr einfache Analytik ermöglicht. Während in den Ausgangsuntersuchungen[1] bei Verwendung von [1-^{14}C]Acetyl-CoA neben den verlängerten Polyenfettsäuren noch de novo synthetisierte gesättigte Fettsäuren auftraten, findet man nun allein das Reaktionsprodukt — die verlängerte Fettsäure — als markierte Verbindung neben der nicht umgesetzten Ausgangsverbindung vor.

Abb. 1 veranschaulicht das am Beispiel der γ-Linolensäure.

Die Verwendung von inaktivem Malonyl-CoA war der des [2-^{14}C]-Malonyl-CoA vorzuziehen, da sonst noch endogenes Substrat mit verlängert wurde (Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure). Das Malonyl-CoA machte die Acetyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.2) der cytoplasmatischen Fraktion überflüssig. Während in den Ausgangsversuchen bei Verwendung von Acetyl-CoA, Hydrogencarbonat und ATP wegen der im Cytoplasma befindlichen Acetyl-CoA-Carboxylase beide Systeme erforderlich waren — die Überstandfraktion war noch durch Mikrosomenbruchstücke verunreinigt, wie sich nach längerem Zentrifugieren (2 Stdn. bei $110000 \times g$) zeigte — vermag das mikrosomale Protein allein mit Malonyl-CoA in Gegenwart von NADPH die langkettigen Fettsäuren zu verlängern. Acetyl-CoA an Stelle von Malonyl-CoA war völlig unwirksam.

Das kettenverlängernde Enzymsystem reagiert, rein mechanistisch betrachtet, wie das im Cytoplasma lokalisierte Fettsäure-Synthetase-System oder das der Hefe. Beide Enzymsysteme unterscheiden sich jedoch in folgenden Eigenschaften:

1. Während die Synthetase im Cytoplasma lokalisiert ist, ist das kettenverlängernde Enzym an das cytoplasmatische Reticulum gebunden.

2. Die Synthetase baut von einem Molekül Acetyl-CoA ausgehend mit Malonyl-CoA Palmitinsäure de novo auf; die Substrate des kettenverlängernden Enzyms hingegen sind allein die langkettigen Acylkomponenten und Malonyl-CoA.

3. Nach den Untersuchungen Lynens[4] enthält die Hefesynthetase keine Lipoide, das kettenverlängernde Enzym hingegen ist ein Lipoproteid[5]. In den hier beschriebenen Untersuchungen wurde die Ketten-

---

[3] W. Stoffel u. E. Bierwirth, Angew. Chem. **74**, 905 [1962]; W. Stoffel, Liebigs Ann. Chem. **673**, 26 [1964].

[4] F. Lynen, Vortrag a. d. Gemeins. Tagung d. Dtsch. Ges. f. Physiol. Chem. u. d. Österr. Biochem. Ges., Wien, 26.—29. Sept. 1962.

[5] W. Stoffel u. E. Bierwirth, in Vorbereitung.

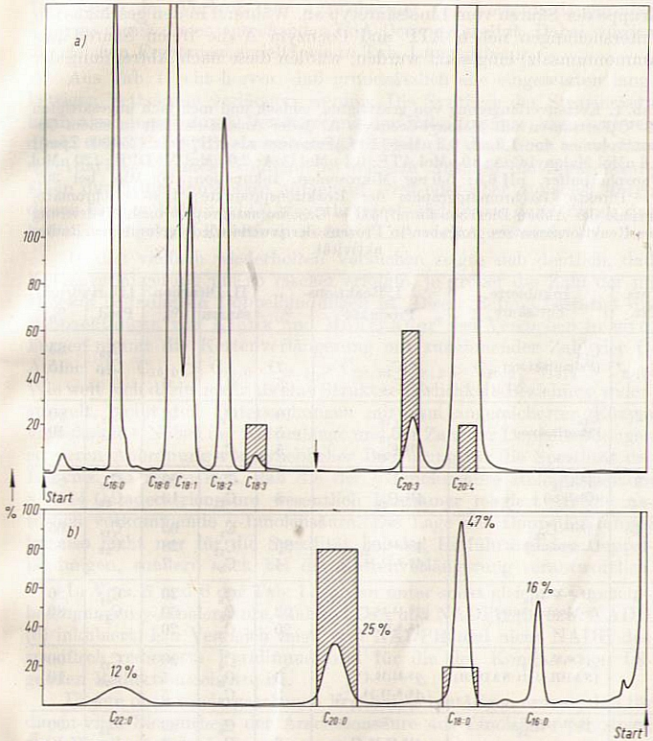


Abb. 1. Radiochromatographische Analyse des Fettsäuremethylester-Gemisches. a) nach der Inkubation von [1-^{14}C]γ-Linolensäure mit Malonyl-CoA und NADPH (Tab. 1, Vers. 5). Säulentemperatur 190°, 60 m*l* Argon/Min.: ↓ zeigt den Wechsel der Empfindlichkeitseinstellung von $3 \cdot 10^{-7}$ zu $1 \cdot 10^{-7}$ an. — b) Nach der Hydrierung. Säulentemperatur 200°, 60 m*l* Helium/Min., Flammenionisationsdetektor, Perkin-Elmer Modell F 6/4 HF. Ordinate und schraffierte Balken geben % der wiedergefundenen Radioaktivität an, die Zahlen an Kurve b die prozentualen Anteile des Gesamtfettsäure-methylester-Gemisches.

verlängerung der folgenden carboxyl-markierten Säuren studiert: Palmitin- und Stearinsäure, Öl- und 11-Eicosensäure, sowie Linol-, γ-Linolen-, 8.11.14-Eicosatriensäure (Homo-γ-linolensäure) und der Arachidonsäure (5.8.11.14-Eicosatetraensäure). Alle genannten Polyensäuren gehören der im tierischen Organismus überwiegend vorkommenden

Gruppe der Säuren vom Linolsäuretyp an. Während in den geschilderten Untersuchungen neben ATP und Coenzym A die freien Säuren (als Ammoniumsalz) eingesetzt wurden, wurden diese nach Abtrennung der

Tab. 1. Kettenverlängerung von gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten [1-^{14}C]Fettsäuren mit Malonyl-Coenzym A. Jeder Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml: 0,5 μMol [1-^{14}C]Fettsäure als $NH_4^{\oplus}$-Salz (250000 Zpm); 0,6 μMol Malonyl-CoA; 10 μMol ATP; 0,1 μMol CoA; 2,0 μMol NADPH; 120 μMol Phosphatpuffer, pH 6,5; 5,0 mg Mikrosomen. Inkubation: 90 Min. bei 30°. I = Direkte Gaschromatographie der Reaktionsprodukte; II = Gaschromatographie der Abbau-Dicarbonsäuren; III = Gaschromatographie nach Hydrierung des Reaktionsansatzes. Angaben in Prozent der jeweils wiedergefundenen Radioaktivität.

Vers. Nr.	Inkubierte Fettsäure	I. Reaktions-Produkte	%	II. Dicarbonsäuren	%	III. Hydrier.-Prod.	%
1	C_{16} (Palmitinsäure)					C_{16}	85
		C_{18}	7			C_{18}	15
		Δ^{9}-C_{18}	5	C_9	6		
2	C_{18} (Stearinsäure)	Δ^{9}-C_{18}	10	C_9	12	C_{18}	90
		C_{20}	5			C_{20}	10
		Δ^{11}-C_{20}	5	C_{11}	5		
3	Δ^{9}-C_{18} (Ölsäure)			C_9	90	C_{18}	88
		Δ^{11}-C_{20}	8	C_{11}	10	C_{20}	12
4	$\Delta^{9,12}$-C_{18} (Linolsäure)			C_9	65	C_{18}	65
		$\Delta^{11,14}$-C_{20}	30	C_{11}	28	C_{20}	35
		$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}	4	C_5	7		
5	$\Delta^{6,9,12}$-C_{18} (γ-Linolensäure)			C_6	20	C_{18}	20
		$\Delta^{8,11,14}$-C_{20}	62	C_8	60	C_{20}	80
		$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}	20	C_5	20		
6	$\Delta^{6,9,12}$-C_{18} (NADH statt NADPH)			C_6	90	C_{18}	90
		$\Delta^{8,11,14}$-C_{20}	5	C_8	5	C_{20}	10
		$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}	3	C_5	5		
7	$\Delta^{8,11,14}$-C_{18}			C_8	90	C_{18}	90
		$\Delta^{10,13,16}$-C_{20}	2	C_{10}	3	C_{20}	10
		$\Delta^{7,10,13,16}$-C_{20}	6	C_7	7		
8	Δ^{11}-C_{20}			C_{11}	95	C_{20}	92
		Δ^{13}-C_{22}	5	C_{13}	3	C_{22}	8
		$\Delta^{10,13}$-C_{22}	2	C_{10}	2		
9	$\Delta^{8,11,14}$-C_{20}			C_8	60	C_{20}	85
		$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}	18	C_5	25		
		$\Delta^{10,13,16}$-C_{22}	12	C_{10}	15	C_{22}	15
		$\Delta^{7,10,13,16}$-C_{22}	4	C_7	5		
10	$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20} (Arachidonsäure)			C_5	60	C_{20}	60
		$\Delta^{7,10,13,16}$-C_{22}	35	C_7	37		
		$\Delta^{4,7,10,13,16}$-C_{22}	5	C_4	3	C_{22}	40
11	Acetyl-CoA	—	—	—	—	—	—

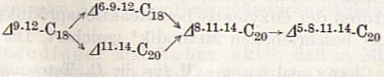
Deacylasen im Verlauf der Anreicherung des kettenverlängernden Enzyms durch die entsprechenden CoA-Derivate ersetzt. Dabei wurden die gleichen Ergebnisse erzielt[5] wie in Tab. 1 angegeben.

Aus Tab. 1 geht hervor, daß grundsätzlich alle eingesetzten langkettigen Fettsäuren verlängert werden. Die Synthese der Stearinsäure kann also einmal durch Verlängerung der Palmitinsäure, zum anderen direkt durch das Synthetase-System erfolgen. Es kann noch keine Aussage darüber gemacht werden, in welchem Ausmaß die Stearinsäure allein durch die Synthetase aufgebaut wird oder aber zunächst durch dieses Enzym Palmitoyl-CoA synthetisiert und dieses dann durch das kettenverlängernde Enzym zu Stearoyl-CoA verlängert wird.

In den vielfach wiederholten Versuchen zeigte sich deutlich, daß Kettenverlängerung um so rascher erfolgte, je größer die Zahl der im Molekül befindlichen Doppelbindungen ist. Dieser Befund bestätigt die Beobachtungen von Klenk und Mohrhauer[6] bei Versuchen in vivo. Ferner nimmt die Kettenverlängerung mit zunehmender Zahl der C-Atome ab: $C_{16:0} > C_{18:0}$; $C_{18:1} > C_{20:1}$; $C_{18:2} > C_{20:2}$; $C_{18:3} > C_{20:3}$. Wie weit sich darin mehr als eine Struktur-Löslichkeit-Beziehung widerspiegelt, bleibt den Untersuchungen mit dem angereicherten Enzym vorbehalten[5]. Neben der Kettenlänge und der Zahl der Doppelbindungen ist deren Anordnung von erheblicher Bedeutung für die Spezifität des Enzyms. So zeigte sich, daß die der γ-Linolensäure stellungsisomere 8.11.14-Octadecatriensäure wesentlich langsamer reagiert als die natürlich vorkommende γ-Linolensäure. Die Lage der Doppelbindungen ist also nicht nur für die Spezifität bei der Einführung der Doppelbindungen, sondern auch bei der Kettenverlängerung verantwortlich.

In Vers. 5 und 6 der Tab. 1 wurden unter sonst gleichen Versuchsbedingungen γ-Linolensäure, Malonyl-CoA und NADPH (5) bzw. NADH (6) inkubiert. Ein Vergleich zeigt, daß NADPH und nicht NADH das spezifisch reduzierte Pyridinnucleotid für die der Kondensation folgenden Reduktionsschritte ist.

Unsere oben wiedergegebenen Ergebnisse bestätigen erneut, daß für die in-vitro-Biosynthese der Arachidonsäure aus Linolsäure prinzipiell zwei Wege möglich sind:



Der obere Weg über die γ-Linolensäure ist offenbar der Hauptweg und bestätigt die in-vivo-Versuche von Mead[7]. Kettenverlängerung

---

[6] E. Klenk u. H. Mohrhauer, diese Z. **320**, 218 [1960].

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

in vitro von γ-Linolensäure zu 8.11.14-Eicosatriensäure erzielte jüngst auch Nugteren[8] durch Malonyl-CoA und bestätigte damit für diesen speziellen Fall unseren früher angegebenen Mechanismus[1].

Von besonderem Interesse war für uns die Beobachtung, daß Arachidonsäure sehr rasch zu 7.10.13.16-Docosatetraensäure verlängert wird und damit zu den Polyensäuren des Linolsäuretyps mit 22 C-Atomen führt. Die Untersuchungen über die Polyensäuren der Nebennierenphosphatide[9, 10] hatten auf das besonders reiche Vorkommen von Arachidonsäure und 7.10.13.16-Docosatetraensäure hingewiesen*.

Da bisher die Polyensäure-Biosynthese ausschließlich in vitro mit Enzympräparationen der Leber durchgeführt wurde, bot sich die Nebenniere als geeignetes Organ für die Klärung der Frage nach der Biosynthese der C_{20}- und C_{22}-Polyensäuren außerhalb der Leber an.

In Tab. 2 sind die ersten Ergebnisse der Inkubationen von [1-^{14}C]-Linol-, γ-Linolen-, 8.11.14-Eicosatrien- und Arachidonsäure mit Rindernebennieren-Mikrosomen, Malonyl-CoA und NADPH zusammengefaßt. Die Versuche zeigen, daß auch hier die Arachidonsäure und die 7.10.13.16-Docosatetraensäure sehr rasch synthetisiert werden.

Tab. 2. Kettenverlängerung von Polyensäuren in Nebennierenrinden-Mikrosomen. Jeder Ansatz enthielt: 0,5 μMol des Ammoniumsalzes der entsprechenden Säure, 10 μMol ATP, 0,1 μMol CoA, 2 μMol NADPH, 0,5 μMol inaktives Malonyl-CoA, 150 μMol Phosphatpuffer, pH 6,5; 5 mg mikrosomales Protein. Gesamtvolumen 1,5 m*l*. Inkubationsdauer: 90 Min. bei 30°.

Inkubierte [1-^{14}C]Säure	Aktivitäten in % der Gesamtaktivität in								% Verlängerung
	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$	$C_{20:2}$	$C_{20:3}$	$C_{20:4}$	$C_{22:3}$	$C_{22:4}$	$C_{22:5}$	
$\Delta^{9.12}$-C_{18}	80	5	5	—	10	—	—	—	15
$\Delta^{6.9.12}$-C_{18}	—	48	—	32	20	—	—	—	50
$\Delta^{8.11.14}$-C_{20}	—	—	—	71	12	11	6	—	17
$\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}	—	—	—	—	62	—	32	6	38

Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß die Nebennierenrinde in der Lage ist, die für ihre Phosphatide charakteristischen hochungesättigten Acylkomponenten zu synthetisieren.

Die Strukturen der enzymatischen Reaktionsprodukte wurden mit der schon früher beschriebenen Methodik[1] gesichert. Die Ausbeute der

* Der von Chang und Sweeley[10] für die C_{22}-Tetraensäure eingeführte Trivialname „adrenic acid" trägt nicht zur Vereinfachung der Nomenklatur bei, zumal diese Säure schon früher auch in anderen Organen, wie Gehirnphosphatiden und Leberphosphatiden von Klenk und Mitarbeitern[11] beschrieben wurde.

[8] D. H. Nugteren, Proc. Biochem. Soc. 430th Meeting, Juli 1963.

[9] E. Klenk u. D. Eberhagen, diese Z. **322**, 258 [1960].

[10] T. L. Chang u. C. C. Sweeley, J. Lipid Res. **3**, 170 [1962]; Biochemistry **2**, 592 [1963].

[11] E. Klenk u. F. Lindlar, diese Z. **229**, 268 [1955]; E. Klenk u. W. Montag, J. Neurochemistry **2**, 233 [1958].

Reaktion wurde bestimmt: 1. durch die gaschromatographische Analyse, 2. durch den chemischen Abbau: oxydative Ozonolyse mit anschließender Charakterisierung und Radioaktivitätsbestimmung der als Spaltprodukte isolierten Abbaudicarbonsäuren und 3. durch Hydrierung des Fettsäuremethylester-Gemisches und anschließende Radiogaschromatographie. Die Leistungsfähigkeit der Kombination dieser drei Methoden geht aus Tab. 1 hervor. Die Analytik wurde durch die Anwendung der in der Carboxyl-Gruppe markierten Polyenfettsäuren wesentlich vereinfacht. Die radiochromatographische Analyse wurde in jedem Versuch durch die chemischen Methoden ergänzt.

Zur Frage der Biohydrogenierung

Eine noch immer umstrittene Frage ist, ob der tierische Organismus ungesättigte Fettsäuren hydrieren kann[12], obwohl Bernhard[13] in Versuchen in vivo eindeutig gezeigt hat, daß uniform markierte Öl-, Linol- und γ-Linolensäure nicht hydriert werden, und auch Stein[14] keine Hydrierung von Linolsäure durch Fettgewebe feststellen konnte. Vor kurzem

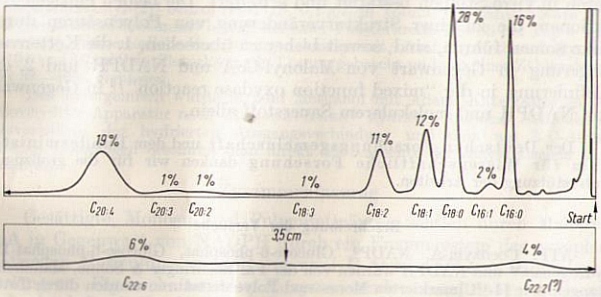


Abb. 2. Gaschromatographische Analyse des Fettsäuremethylester-Gemisches aus Mikrosomenlipoiden. Säulentemperatur: 190°, 60 m*l* Helium/Min. Flammenionisationsdetektor, Perkin-Elmer Modell F 6/4 HF. Die Zahlen an der Kurve geben die prozentualen Anteile des Gesamtfettsäure-methylester-Gemisches an.

berichteten Staudinger und Zubrzycki[15], daß in Mikrosomen eine Hydrierung ungesättigter Fettsäuren stattfindet: Die Autoren führen den NADPH-Umsatz der „NADPH-Oxydase" in nativen Mikrosomen, der die für die O_2-Aufnahme berechnete stöchiometrische Menge über-

[12] J. F. Mead, Annu. Rev. Biochem. **32**, 263 [1963].
[13] K. Bernhard, M. Rothlin u. H. Wagner, Helv. chim. Acta **41**, 1155 [1958].
[14] Y. Stein u. O. Stein, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **58**, 417 [1962].
[15] H. J. Staudinger u. Z. Zubrzycki, diese Z. **332**, 109 [1963].

schreitet, auf eine Hydrierung von ungesättigten Fettsäuren zurück. Diese Aussage beruht auf einer vergleichenden gaschromatographischen Analyse vor und nach der Inkubation mit NADPH als Beweismittel. Das Bemerkenswerte dieser Analysen ist, daß sämtliche C_{20}-(Arachidonsäure 25%) und C_{22}-Polyensäuren (10%) fehlen. Möglicherweise haben diese gegen Luftsauerstoff, Licht und erhöhte Temperaturen äußerst empfindlichen Verbindungen nicht den Weg bis zur Analyse gefunden. Abb. 2 gibt ein Gaschromatogramm des Fettsäure-methylester-Gemisches, das aus Mikrosomen-Lipoiden isoliert wurde, wieder. Nach Hydrierung lieferte dieses Gemisch ein Gaschromatogramm, das mit Abb. 1b praktisch identisch war.

Unsere Versuche mit den chemisch sowie radiochemisch reinen Mono- und Polyensäuren des Öl- und Linolsäuretyps — dem letzteren gehören fast alle ungesättigten Fettsäuren der Rattenleber an — zeigten eindeutig, daß mit Hilfe unserer hochempfindlichen Tracermethode — auch unter den l. c.[15] genannten Bedingungen — keine Hydrierung von ungesättigten Fettsäuren stattfindet.

Dadurch werden die früheren Versuche in vivo von Bernhard[13] durch in-vitro-Studien bestätigt und erweitert. Die beiden einzigen Reaktionen, die zu einer Strukturveränderung von Polyensäuren durch Mikrosomen führen, sind, soweit bisher zu übersehen, 1. die Kettenverlängerung in Gegenwart von Malonyl-CoA und NADPH und 2. die Olefinierung in der "mixed function oxydase reaction"[16] in Gegenwart von NADPH und molekularem Sauerstoff allein.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung danken wir für die großzügige Unterstützung der Arbeiten.

Beschreibung der Versuche

ATP, Coenzym-A, NADP⊖, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase* und NADPH wurden von der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim, bezogen. Die [1-^{14}C]markierten Mono- und Polyenfettsäuren wurden durch Totalsynthese erhalten[3]. Die Verbindungen sind chemisch und radiochemisch rein. Jede der Säuren besitzt eine spezif. Aktivität von $5{,}0 \times 10^5$ Zpm/μMol. Sie bilden nach Neutralisation mit $2n$ NH_4OH klare Lösungen. Die Coenzym-A-Derivate der Säuren wurden enzymatisch[1] oder chemisch dargestellt[5]. [1-^{14}C]Acetyl-CoA wurde nach Simon[17] dargestellt, inaktives und [2-^{14}C]Malonyl-CoA nach Eggerer[18].

Alle Inkubationen wurden in Warburg-Gefäßen aerob durchgeführt. Die Ansätze wurden dann mit 10% methanol. KOH auf etwa $0{,}5n$ eingestellt und 30 Min. unter Stickstoff zum Sieden erhitzt, Unverseifbares abgetrennt und nach Ansäuern mit $2n$ HCl die freien Fettsäuren extrahiert. Vor der Verseifung wurde jeder Ansatz mit 4 mg Mikrosomen-Lipoid verdünnt.

Die radiogaschromatographische Analyse der langkettigen Fettsäuremethylester wurde auf dem Barber Colman Modell 10 mit diskontinuierlicher Akti-

---

* EC 1.1.1.49.

[16] H. S. Mason, Science [Washington] **125**, 1185 [1957].

[17] E. J. Simon u. D. Shemin, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2520 [1953].

[18] H. Eggerer u. F. Lynen, Biochem. Z. **335**, 540 [1962].

vitätsmessung bei einer Säulentemperatur von 185°, die der Dicarbonsäure-methylester bei 145° bzw. 180° für langkettige Dicarbonsäuren durchgeführt[1]. Säule: 200 × 0,45 cm, stationäre Phase: 10% Äthylenglykol-Bernsteinsäure-Polyester, Trägergas: Argon, 60 ml/Min. Durchfluß. Radium-Ionisationsdetektor, 1250 oder 950 V Spannung.

Die Trennung der gesättigten Monoen- und Polyenfettsäureester über die Quecksilber-Addukte sowie der oxydative Abbau, die Trennung und Identifizierung der Dicarbonsäuren wurden schon beschrieben[1]. Die Trennung von gesättigten und ungesättigten Säuren über die Hg-Addukte der Ester zur nachfolgenden Charakterisierung der Säuren über die Abbaudicarbonsäuren ließ sich durch die oxydative Ozonidspaltung des Gesamtfettsäuregemisches umgehen. Nach Zersetzung überschüssigen H_2O_2 durch Spuren Pd/$BaSO_4$ und Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Dicarbonsäuren in Methanol/Wasser 1:2 gelöst, die Monocarbonsäuren durch 3malige Extraktion mit Petroläther entfernt und nach Abdampfen des Lösungsmittels die Dicarbonsäuren mit Diazomethan in Äther verestert.

Die Präparation der Lebermikrosomen erfolgte nach Siekewitz[19], die der Nebennierenrinde nach Cooper und Rosenthal[20]. Unser Enzymsystem ist frei von fettsäureoxydierenden Eigenschaften. Dies konnte leicht durch die Absorption von radioaktivem CO_2 sowie durch das Fehlen von markierten niedrigmolekularen Abbauprodukten gezeigt werden[21].

Die Radioaktivitätsmessungen der toluollöslichen Fettsäuren und deren Ester wurden mit dem Flüssigkeitsscintillationszähler (Tricarb Modell 314 Packard) durchgeführt. Als Phosphore dienten 2.5-Diphenyl-oxazol (PPO, 4 g/*l*) und 1.4-Bis-[5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol (POPOP, 0,1 g/*l*) in Toluol. Die Zählausbeute (mit [^{14}C]Benzoesäure bestimmt) betrug bei einer Fensterbreite 10—60 bei Tap 4 konstant 52%. Wasserlösliche Verbindungen wurden mit 0,5 ml 1% methanol. Hyamin X-10* und 10 ml Scintillatorlösung in Lösung gebracht und mit einer Zählausbeute von 38—40% gemessen.

Das Estergemisch wurde in 2 ml Methanol mit Adams-Katalysator in der Mikrohydrier-Apparatur nach Clauson-Kaas[22] hydriert. Aus dem Radioaktivitätsverhältnis der hydrierten Ausgangsverbindung und dem um 2 C-Atome höheren Homologen bestimmt man direkt die Ausbeute der enzymatischen Umwandlung.

Zusammenfassung

Gesättigte, Monoen- und Polyenfettsäuren werden durch Malonyl-CoA in Gegenwart von NADPH durch ein Enzymsystem des cytoplasmatischen Reticulums zu den um zwei C-Atome höheren Homologen verlängert. Eigenschaften des Enzyms werden beschrieben und mit denen des Fettsäuresynthetase-Systems verglichen. Die Synthese der Polyensäuren ist nicht an die Leber gebunden. Es wird die in-vitro-Synthese der Arachidonsäure und der 7.10.13.16-Docosatetraensäure durch Mikrosomen aus Nebennieren-Rinde beschrieben.

Eine „Biohydrogenierung" der ungesättigten Fettsäuren durch das mikrosomale Enzym konnte durch Isotopenstudien ausgeschlossen werden.

---

* Dimethyl- {2-[2-(*p*-diisobutyl-methyl-phenoxy)-äthoxy]-äthyl}-benzyl-ammoniumhydroxyd.

[19] P. Siekewitz, J. biol. Chemistry **195**, 549 [1952].

[20] D. Y. Cooper u. O. Rosenthal, Arch. Biochem. Biophysics **96**, 331 [1962].

[21] F. Snyder u. P. Goldfrey, J. Lipid Res. **2**, 195 [1961].

[22] N. Clauson-Kaas u. F. Limborg, Acta chem. scand. **1**, 884 [1947].

Summary

Saturated, monoenoic and polyenoic fatty acids are converted to homologues with two more carbon atoms by malonyl-CoA in the presence of NADPH and a microsomal enzyme system. Properties of the enzyme are given and compared with those of fatty acid synthetase. The synthesis of polyenoic acids is not confined to the liver. The synthesis of arachidonic- and docosa-7,10,13,16-tetraenoic acid by the adrenal microsomal enzyme has been studied. A biohydrogenation of the most common unsaturated fatty acids present in mammalian phosphatides by microsomes could be excluded by isotope studies reported here.

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