

Der Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren, V¹
 Zur β -Oxydation der Mono- und Polyenfettsäuren
 Der Mechanismus der enzymatischen Reaktionen an Δ^{2cis} -
 Enoyl-CoA-Verbindungen*

Von

Wilhelm Stoffel und Horst Caesar

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln

(Der Schriftleitung zugegangen am 15. Februar 1965)

Das Doppelbindungssystem der Polyenfettsäuren besitzt *all-cis*-Konfiguration und ist im Polyallylrhythmus angeordnet. Im Verlauf der β -Oxydation treten daher der Anzahl der Doppelbindungen entsprechend alternierend Δ^{3cis} - und Δ^{2cis} -ungesättigte Acyl-CoA-Ester auf. Die Schlüsselprobleme der β -Oxydation der einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren bestehen somit in der Aufklärung der enzymatischen Reaktionen an den Δ^{3cis} - und Δ^{2cis} -Enoyl-CoA-Verbindungen.

In der III. Mitteilung² wurden die enzymatischen Reaktionen an synthetisch dargestellten¹ Δ^{3cis} -Enoyl-CoA-Estern beschrieben. Das von der Ölsäure abgeleitete Dodecen-(3*c*)-oyl-CoA und das im Verlauf des Linolsäure-Abbaus auftretende Dodecadien-(3*c*,6*c*)-oyl-CoA werden durch eine aus Mitochondrien isolierte Δ^{3cis} - Δ^{2trans} -Enoyl-CoA-Isomerase zu Dodecen-(2*t*)-oyl-CoA und Dodecadien-(2*t*,6*c*)-oyl-CoA isomerisiert und dann durch die Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase zu L(+)-3-Hydroxy-lauroyl-CoA bzw. L(+)-3-Hydroxy-dodecen-(6*c*)-oyl-CoA hydratisiert.

In der vorliegenden Arbeit klären wir das zweite Problem, die an den längerkettigen Δ^{2cis} -Enoyl-CoA-Estern ablaufenden enzymatischen Reaktionen. Die gesättigten Acyl-CoA-Ester werden an der Acyl-CoA-Dehydrogenase in Δ^{2trans} -Enoyl-CoA-Derivate umgewandelt. Intermediärprodukte beim Abbau der ungesättigten Fettsäuren sind jedoch die *cis*-geometrischen Isomeren. Nach Wakil und Mahler³

* Verwendete Abkürzungen: CoA oder HSCoA = Coenzym A; NAD^o = oxydiertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid; EDTA = Äthylendiamin-tetraacetat; Tris = 2-Amino-2-hydroxymethyl-propandiol-(1.3).

Enzyme: Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase, bisher bekannt als Crotonase (L-3-Hydroxy-acyl-CoA-Hydro-Lyase, EC 4.2.1.17); Δ^{2cis} - Δ^{3trans} -Enoyl-CoA-Isomerase (EC 5.3.3.?, noch nicht registriert); 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase (L-3-Hydroxy-acyl-CoA:NAD-Oxydoreduktase, EC 1.1.1.35); 3-Hydroxy-acyl-CoA:3-Epimerase (eine eventuelle Identität mit 3-Hydroxy-butryl-CoA:3-Epimerase, EC 5.1.2.3, ist noch nicht auszuschließen).

¹ IV. Mitteil.: W. Stoffel, H. Caesar u. R. Ditzer, diese Z. **339**, 182 [1964].

² W. Stoffel, R. Ditzer u. H. Caesar, diese Z. **339**, 167 [1964].

³ S. J. Wakil u. H. R. Mahler, J. biol. Chemistry **207**, 125 [1954].

hydratisiert die Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase auch die *cis*-Verbindungen, wie dies am Isocrotonoyl-CoA gezeigt wurde. Isocrotonoyl-CoA wird nach Wakil⁴ zu D(-)-3-Hydroxy-butyryl-CoA hydratisiert, das dann an einer spezifischen, NAD⁺-abhängigen D(-)-3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase zur β -Ketoacyl-CoA-Verbindung dehydrogeniert werden soll.

Demgegenüber nehmen Stern und Mitarbeiter⁵ an, daß die Crotonase (Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase) nicht nur eine Hydratase sondern auch eine Stellungsisomerase und *cis* $\rightarrow$ *trans*-Isomerase ist und in größeren Mengen als Racemase fungiert⁶. Daneben haben Stern und Mitarbeiter⁷ in Rattenleber-Rohextrakten eine 3-Hydroxy-butyryl-CoA-Racemase nachgewiesen. Diese Aktivität wurde ebenfalls teilweise auf die Crotonase zurückgeführt.

1. Untersuchungen über die Hydratisierung der Δ^{2cis} -Enoyl-CoA-Ester

Die enzymatischen Untersuchungen wurden an der Dodecen-(2*c*)-oyl-CoA-Verbindung durchgeführt. Die chemische Synthese dieser Verbindung verlief mit geringer Ausbeute, weil neben der Acylierung der Thiolgruppe eine Addition der Thiolgruppe an die Doppelbindung stattfindet, eine Beobachtung, die schon früher bei der chemischen Synthese des Crotonoyl-CoA gemacht wurde⁸; gleichzeitig wird die *cis*-Verbindung teilweise zum *trans*-Isomeren umgelagert¹. Acyliert wurde mit dem gemischten Anhydrid von Säure und Kohlensäure-äthylester⁹. Wie schon früher¹ mitgeteilt, lassen sich die Stellungsisomeren und geometrischen Isomeren der C₁₂-Monoensäure-methylester gaschromatographisch einwandfrei trennen. Wir stellten fest, daß unabhängig von der Art der Spaltung des Coenzym-A-Esters (alkalische, saure oder Hg²⁺-Spaltung) zur Darstellung des Methylesters konstant etwa 30% des *trans*-isomeren Thioesters vorliegen.

Vergleicht man die Hydratisierung des Dodecen-(2*c*)-oyl-CoA mit der des Dodecen-(2*t*)-oyl-CoA durch die Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase — die Kinetik wurde durch Messung der Extinktionsabnahme bei 263 m μ ¹⁰ aufgenommen, — so sind sowohl die Extinktionsänderungen als auch die Reaktionsgeschwindigkeiten für beide gleich groß (Abb. 1).

Diese optischen Untersuchungen wurden durch die gaschromatographische Analyse bestätigt (Abb. 2).

⁴ S. J. Wakil, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 18, 314 [1955].

⁵ J. R. Stern u. A. Del Campillo, J. biol. Chemistry 218, 985 [1957].

⁷ J. R. Stern, A. Del Campillo u. A. L. Lehninger, J. Amer. chem. Soc. 77, 1073 [1955].

⁶ J. R. Stern, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 26, 641 [1957]. 77, 1073 [1955].

⁸ K. Decker, Dissert., Univ. München 1955.

⁹ Th. Wieland u. L. Rueff, Angew. Chem. 65, 186 [1953].

¹⁰ W. Seubert u. F. Lynen, J. Amer. chem. Soc. 75, 2787 [1955].

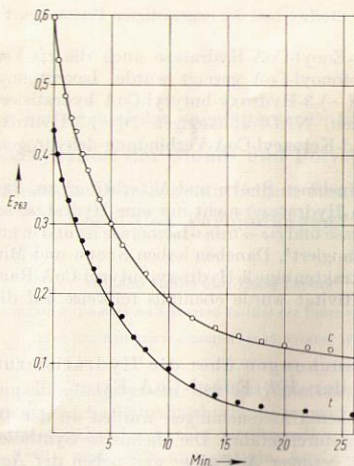


Abb. 1. Kinetik der Hydratisierung von Dodecen-(2c)-oyl-CoA und Dodecen-(2t)-oyl-CoA. Jeder Inkubationsansatz enthielt in einem Volumen von 1,8 ml: 0,1 μ Mol Substrat; 0,32 γ krist. Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase; 5 μ Mol EDTA; 100 μ Mol Phosphatpuffer, pH 7,4.

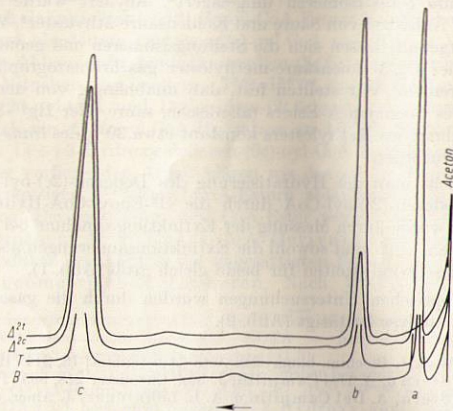


Abb. 2. Gaschromatographische Analyse der Fettsäure-methylester nach der Inkubation von Dodecen-(2t)-oyl-CoA bzw. Dodecen-(2c)-oyl-CoA mit Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase. T = Testgemisch: a) Dodecen-(2c)-säure-, b) Dodecen-(2t)-säure-, c) 3-Hydroxy-laurinsäure-methylester. B = Blindversuch mit Dodecen-(2c)-oyl-CoA ohne Enzym. Die Inkubationen wurden mit dem Fünffachen der unter Abb. 1. beschriebenen Ansätze unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Säulentemp. 125°, 70 ml Argondurchfluß/Min., Pye.

Die gaschromatographische Analyse zeigt, daß im Gleichgewicht bei pH 7,4 das Verhältnis jedes der beiden isomeren Substrate zu den entsprechenden 3-Hydroxy-lauroyl-CoA-Estern etwa 30:70 beträgt. Aus diesen Versuchen folgt, daß die Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase sowohl das *cis*- als auch das *trans*-Isomere der α,β -ungesättigten Acyl-CoA-Ester mit vergleichbarer Geschwindigkeit hydratisiert.

Kombiniert man den Hydratase- und 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase-Schritt im optischen Test mit Dodecen-(2*c*)-oyl-CoA, so läuft die Gesamtreaktion nur zu etwa 30% ab, also gerade um den Anteil, den wir als *trans*-Isomeres, und damit „Verunreinigung“, in unserem Substrat gaschromatographisch erfaßt hatten¹. Das Hauptprodukt der Hydratisierung, das D(–)-3-Hydroxy-lauroyl-CoA, wurde hingegen nicht durch die spezifisch auf das L-(+)-enantiomere Derivat eingestellte 3-Hydroxy-acyl-Dehydrogenase dehydrogeniert (Abb. 3).

2. Untersuchungen über die Dehydrogenierung des Hydratisierungsproduktes der Δ^2 *cis*-Enoyl-CoA-Ester

Zu Beginn unserer Untersuchungen konnten wir aus Rattenleber-Mitochondrien eine Enzym-Fraktion isolieren, die das D(–)-3-Hydroxy-lauroyl-CoA epimerisiert². Obwohl diese Präparation Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase enthielt, beruhte die Epimerisierung nicht auf diesem Enzym. Eine der in der Enzym-Fraktion vorhandenen Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase-Aktivität äquivalente Menge kristalliner Hydratase führte nur zu einem unbedeutenden Umsatz, den wir einer Verunreinigung durch die 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase zuschreiben. Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase und 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase unterscheiden sich wesentlich in Hitze- und Säurestabilität. Die Epimerase wird durch Erwärmen (10 Min. auf 60° oder 10 Min. auf 40° bei pH 4,0) vollständig inaktiviert, Bedingungen, unter denen die Hydratase stabil ist. Auch $10^{-3}M$ *p*-Chlormercuri-benzoat führte zur völligen Hemmung der Epimerase.

Aus dem geringen Umsatz in der Dehydrierungs-Reaktion nach Hydratisierung von Dodecen-(2*c*)-oyl-CoA schlossen wir, daß D(–)-3-Hydroxy-lauroyl-CoA das eigentliche Hydratisierungsprodukt darstellt. Die Zugabe von 3-Hydroxy-acyl-CoA-Epimerase-Fraktion (spezif. Aktivität 0,24 μ Mol/mg je Min.) führte dann auch zum vollständigen Umsatz des eingesetzten Substrates (Abb. 3).

Als weiteres Substrat setzten wir DL-3-Hydroxy-caprinoyl-CoA in den optischen Test ein. 50% des Substrats, nämlich der L-(+)-Anteil, wurde sofort und allein in Gegenwart der 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase und NAD⁺ dehydrogeniert. Nach Zugabe der Epimerase wurde das restliche D(–)-Substrat umgesetzt.

Die erwählte Racemisierung mit Hilfe einer spezifischen D(–)-3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase und NAD⁺ als Cofaktor⁴ konnten wir nicht beobachten. Unsere dialysierte Epimerase-Fraktion erfährt bei

Zugabe von $\text{NAD}^{\oplus}$ keine Aktivitätssteigerung, wie das aus Abb. 4 hervorgeht.

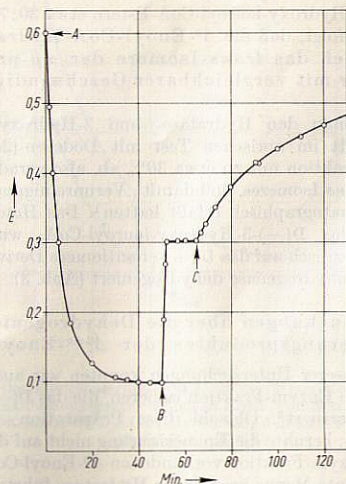


Abb. 3. Kinetik der Hydratisierung und der Epimerisierung von Dodecen-(2c)-oyl-CoA.

In einem Gesamtvolumen von 1,8 ml (A), 1,9 ml (B) bzw. 2,0 ml (C): 0,2 μMol Dodecen-(2c)-oyl-CoA; 5 μMol EDTA; 150 μMol Tris-Puffer, pH 7,4, für die Hydratisierungsreaktion A—B und pH 9,0 für die Dehydrogenierung und Epimerisierung. In A Zugabe von 0,32 γ Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase; in B Zugabe von 40 γ 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase und 0,6 μMol $\text{NAD}^{\oplus}$; in C Zugabe von 45 γ 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase. Ordinate: E_{263} bzw. ab 50 Min. E_{340} .

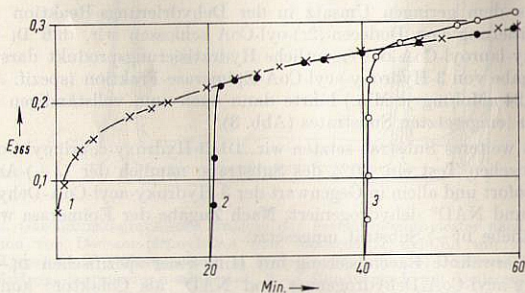
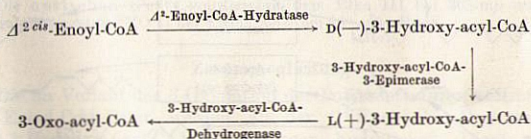


Abb. 4. Kinetik der Epimerisierung. Erläuterungen siehe Text.

Drei Ansätze wurden im Zeitpunkt 0 mit je 50 γ 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase inkubiert. Ferner enthielt jeder Ansatz 0,1 μ Mol D(-)-3-Hydroxy-lauroyl-CoA; 5 μ Mol EDTA; 150 μ Mol Tris-Puffer, pH 9,2. Die Zugabe von 0,6 μ Mol NAD⁺ und 40 γ 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase erfolgte zur Probe 1 im Zeitpunkt 0, zur Probe 2 nach 20 Min. und zur Probe 3 nach 40 Min. Im Zeitpunkt 20 und 40 Min. setzte sofort die Dehydrogenierung des in diesem Zeitintervall jeweils epimerisierten L(+)-3-Hydroxy-lauroyl-CoA ein und erreichte den gleichen Umsatz, der in Probe 1 in dieser Zeit erzielt war. Die Epimerisierung verläuft also unabhängig von NAD⁺.

Im folgenden Reaktionsschema sind die an den Δ^{2cis} -Enoyl-CoA-Estern ablaufenden Reaktionen nochmals zusammenfassend dargestellt:



Die Δ^{3cis} - Δ^{2trans} -Enoyl-CoA-Isomerase und die 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase sind wie alle schon bekannten Enzyme der β -Oxydation in den Mitochondrien lokalisiert. Beide Enzyme sind in den meisten Geweben vorhanden, wenn auch in unterschiedlicher Konzentration. Gehirn-Mitochondrien weisen nur eine sehr niedrige Aktivität auf. Mit Hilfe des Dodecen-(3c)-oyl-CoA und des D(-)-3-Hydroxy-lauroyl-CoA wurden die spezif. Aktivitäten an Isomerase und Epimerase der in der Tabelle aufgeführten Organe bestimmt.

Verteilung der Δ^{3cis} - Δ^{2trans} -Enoyl-CoA-Isomerase und der 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase in den Organen der Ratte.

Organ	spezif. Aktivität [nMol $\cdot$ Min. ⁻¹ $\cdot$ mg ⁻¹]	
	Isomerase	Epimerase
Leber	260	146
Niere	64	23
Herzmuskel	52	64
Gehirn.	4	2

Auf Grund dieser und der in der III. Mitteilung¹¹ beschriebenen Ergebnisse müssen die Δ^{3cis} - Δ^{2trans} -Enoyl-CoA-Isomerase und die 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase in den Multienzymkomplex der β -Oxydation einbezogen werden. Die einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden mit einer den gesättigten Fettsäuren vergleichbaren Geschwindigkeit vollständig in den Mitochondrien oxydiert¹¹. Der Abbau des *all-cis*-Doppelbindungssystems dieser Fettsäuren erfordert je-

¹¹ VI. Mittell.: W. Stoffel u. H. G. Schiefer, diese Z. **341**, 84 [1965], nachstehend.

doch die koordinierte Wirkung der beiden genannten Enzyme und der im Abbau der gesättigten Fettsäuren beteiligten Enzyme. Somit muß der β -Oxydationscyclus bestehend aus dem Komplex: Acyl-CoA-Dehydrogenase — Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase — 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase — 3-Keto-acyl-CoA-Thiolase um die $\Delta^{3\text{cis}}\Delta^{2\text{trans}}$ -Enoyl-CoA-Isomerase und die 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase erweitert werden.

Am Beispiel der β -Oxydation der Linolsäure sollen die einzelnen enzymatischen Schritte nochmals zusammenfassend dargestellt werden (Abb. 5).

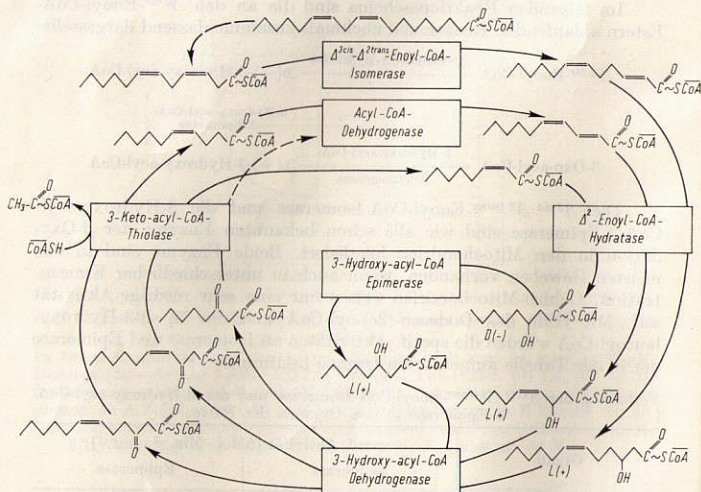


Abb. 5. Schema der β -Oxydation der Linolsäure.

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

Beschreibung der Versuche

Coenzym A, NAD^+ und 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase waren Präparate der Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim.

Die Protein-Bestimmung erfolgte mit Hilfe der quantitativen Biuret-Reaktion¹² sowie nach Warburg und Christian¹³.

¹² G. Beisenberg, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfeleiderer, Z. Naturforsch. **8b**, 555 [1953].

¹³ O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. **310**, 384 [1942].

Die Zellfraktionierung wurde nach Hogeboom und Mitarbeitern¹⁴ ausgeführt. Der Aufschluß der Mitochondrien wurde durch Ultraschall-Behandlung einer Suspension von 15 mg/ml in 0,05*m* Phosphatpuffer, pH 7,4 (0,003*m* in EDTA) mit dem Gerät UD Usig 750 LF der Fa. Schoeller, Frankfurt, durchgeführt. Dauer der Beschallung 2 Min., 20000 Hz, Kühlung bei -5° .

Der Coenzym-A-Ester der Dodecen-(2*c*)-säure wurde nach einer l. c.¹ beschrieben, modifizierten Methode dargestellt. Die wäßrige Coenzym-A-Lösung wurde in kleinen Anteilen zu dem 30- bis 40fachen Überschuß an gemischtem Anhydrid gegeben.

Die Synthesen der Substrate und die Anreicherung der Enzyme sind in den vorangehenden Mitteilungen^{1, 2} beschrieben.

Die gaschromatographischen Analysen wurden auf dem Gerät der Firma Pye, England, unter den im Text angeführten Bedingungen durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Inkubationsansätze für die gaschromatographische Analyse wurde schon beschrieben².

Die optischen Tests wurden mit dem Elko III bei 365 m μ und dem Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss bei 20° ausgeführt.

Zusammenfassung

Die im Verlauf der β -Oxydation der Polyenfettsäuren auftretenden Δ^{2cis} -Enoyl-CoA-Ester werden an der Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase zu D(-)-3-Hydroxy-acyl-CoA-Verbindungen hydratisiert. Diese werden durch die 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase zum L(+)-Antipoden epimerisiert. Die beiden Reaktionen wurden an Dodecen-(2*c*)-oyl-CoA und D(-)-3-Hydroxy-lauroyl-CoA untersucht.

Die Beteiligung der Δ^{3cis} - Δ^{2trans} -Enoyl-CoA-Isomerase und der 3-Hydroxy-acyl-CoA-Epimerase an der β -Oxydation der einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren machen die Einbeziehung dieser Enzyme in den β -Oxydationscyclus erforderlich. Eine Zusammenfassung der am Doppelbindungssystem der Linolsäure ablaufenden enzymatischen Reaktionen bei der β -Oxydation dieser Säure wird gegeben.

Summary

Δ^{2cis} -Enoyl-CoA-esters, intermediates of polyunsaturated fatty acid β -oxidation, are hydrated by Δ^2 -enoyl-CoA hydratase to the D(-)-3-hydroxyacyl-CoA derivatives. Subsequently these are epimerized by a 3-hydroxyacyl-CoA 3-epimerase to the L(+) antipode. These reactions have been studied with dodecen-(2*c*)-oyl-CoA and D(-)-3-hydroxy-lauroyl-CoA.

The enzymatic reactions carried out by the Δ^{3cis} - Δ^{2trans} -enoyl-CoA isomerase and the 3-hydroxyacyl-CoA epimerase in the β -oxidation of mono- and polyunsaturated fatty acids requires that these two enzymes be included in the β -oxidation cycle. A summary of the enzymatic reactions in the oxidation of linoleic acid is given.

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

¹⁴ G. H. Hogeboom, W. C. Schneider u. G. E. Palade, J. biol. Chemistry 172, 619 [1948].