Der Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren, VI[1]

Zur β-Oxydation der Mono- und Polyenfettsäuren Untersuchungen in vivo und in vitro mit [^{3}H, ^{14}C]-und [1-^{14}C]-markierten Mono- und Polyenfettsäuren*

Von

Wilhelm Stoffel und **Hans-Gerd Schiefer**

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln

(Der Schriftleitung zugegangen am 15. Februar 1965)

Bei unseren Untersuchungen[1–3] über die enzymatischen Reaktionen bei der β-Oxydation der ungesättigten Fettsäuren in Mitochondrien erhob sich die Frage, ob Mono- und Polyenfettsäuren mit der gleichen Geschwindigkeit wie gesättigte Fettsäuren abgebaut werden oder ob die Doppelbindungen dieser Verbindungen die Oxydation beeinflussen.

Versuche von Mead und Mitarbeitern[4] hatten ergeben, daß bei Fütterung von [1-^{14}C]-markierter Stearin-, Öl- und Linolsäure unterschiedliche Mengen $^{14}CO_2$ in der Exspirationsluft auftraten. Bernhard und Mitarbeiter[5] verglichen die Oxydationsgeschwindigkeiten von uniform markierter Öl-, Linol- und γ-Linolensäure nach Verfütterung an fettfrei ernährte Ratten und fanden, daß die Zahl der Doppelbindungen offenbar keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit des Abbaus der ungesättigten Fettsäuren ausübte. Fredrickson und Mitarbeiter[6] beobachteten vergleichbare Halbwertszeiten von [1-^{14}C]Palmitinsäure und [1-^{14}C]Linolsäure, die sie in Chylomikronen eingebaut oder als Fettsäure-Albumin-Komplex intravenös an Patienten verabreichten. Klenk[7] fand, daß auch am Methylende markierte Polyenfettsäuren zu einem großen Teil innerhalb von 12—24 Stdn. nach Verfütterung von der Ratte abgebaut werden.

Die vorliegende Arbeit soll die Frage klären, ob man aus der Messung des abgeatmeten $^{14}CO_2$ in vivo auf die Oxydation des ganzen Fettsäuremoleküls schließen kann. In Ergänzung zu früheren Untersuchungen sollen dann Versuche mit Rattenlebermitochondrien an einer größeren Anzahl von [1-^{14}C]-markierten Polyenfettsäuren das Ausmaß des Abbaus in vitro erfassen; die Schwierigkeiten bei der Auswertung von

---

* Verwendete Abkürzungen: CoA = Coenzym A; NAD$^{\oplus}$ = Nicotinamid-adenin-dinucleotid; AMP = Adenosinmonophosphat; ATP = Adenosintriphosphat.

[1] V. Mitteil.: W. Stoffel u. H. Caesar, diese Z. **341**, 76 [1965], vorstehend.

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

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

[4] J. F. Mead, W. H. Slaton u. A. B. Decker, J. biol. Chemistry **218**, 401 [1956].

[5] K. Bernhard, M. Rothlin, J.-P. Vuilleumier u. R. Wyss, Helv. chim. Acta **41**, 1017 [1958].

[6] D. S. Fredrickson u. R. S. Gordon, J. clin. Invest. **36**, 890 [1957].

[7] E. Klenk, 6. Internationaler Kongreß für Biochemie 1964, New York; E. Klenk, Advances in Lipid Res. **3**, im Druck.

Fütterungsversuchen (verschiedene Tierstämme; Unterschiede in Ernährungszustand und Resorptionsgeschwindigkeiten) lassen sich durch Versuche in vitro unter identischen Bedingungen vermeiden.

Versuche in vivo mit doppelt [^{3}H, ^{14}C]-markierten Fettsäuren

Immer wieder wird im Zusammenhang mit der Biosynthese und der Oxydation der langkettigen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren die Möglichkeit eines partiellen Abbaus des Carboxylendes mit anschließender Kettenverlängerung diskutiert. Versuche mit allein am Carboxylende oder allein am Methylende markierten Fettsäuren können diese Frage nicht beantworten. So würden bei [1-^{14}C]-markierten Fettsäuren Umbauvorgänge am Carboxylende zur Bildung von $^{14}CO_2$ führen und eine vollständige Oxydation des Fettsäuremoleküls vortäuschen. Uniform oder allein am Methylende markierte Fettsäuren würden den möglichen partiellen Ab- und Wiederaufbau des Fettsäuremoleküls ebenfalls nicht erkennen lassen. Verfüttert man jedoch doppelt [^{3}H, ^{14}C]-markierte Fettsäuren, so sollte das Verhältnis ^{3}H/^{14}C der nach längerer Zeit aus den Leberlipoiden wieder isolierten verfütterten Fettsäure und der von ihr abgeleiteten Fettsäuren Aufschluß darüber geben können, ob die spezifische Aktivität der Carboxylgruppe durch partiellen Ab- und Wiederaufbau des Fettsäuremoleküls verdünnt wurde.

Die ungesättigten Fettsäuren mit den in den Strukturformeln angegebenen Markierungen (T = ^{3}H) wurden nach früher von uns ausgearbeiteten Methoden[8,9] für diese Untersuchungen synthetisiert. [^{3}H, ^{14}C]Stearinsäure wurde durch katalytische Hydrierung der Linolsäure dargestellt.

$HCT_2 \cdot CT_2 \cdot [CH_2]_2 \cdot [CH_2 \cdot CH{:}CH]_4 \cdot [CH_2]_3 \cdot {}^{14}CO_2H$
Arachidonsäure

$HCT_2 \cdot CT_2 \cdot [CH_2]_2 \cdot [CH_2 \cdot CH{:}CH]_2 \cdot (CH_2]_7 \cdot {}^{14}CO_2H$
Linolsäure

$HCT_2 \cdot CT_2 \cdot [CH_2]_{15} \cdot {}^{14}CO_2H$
Stearinsäure

Die Versuchstiere wurden 15 Stdn. nach der Verfütterung der markierten Fettsäure getötet. Die während dieser Zeit abgeatmeten Mengen an ^{14}C-Aktivität betrugen bei der Arachidonsäure 22%, bei Linolsäure 26% und bei Stearinsäure 20%. Die Aufarbeitung des Gesamtlipidextraktes der Leber ist im Versuchsteil beschrieben. Die Methylester der Fettsäuren nach Verfütterung von [^{3}H,^{14}C]Arachidon- und -Linolsäure wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Silbernitrat-Kieselgel-Schichten[10] getrennt und nach Goldrick und Hirsch[11] iso-

---

[8] I. Mitteil.: W. Stoffel diese Z. **333**, 71 [1963].
[9] W. Stoffel, Liebigs Ann. Chem. **673**, 26 [1964].
[10] C. B. Barrett, M. S. J. Dallas u. F. B. Padley, J. Amer. Oil Chem. Soc. **40**, 580 [1963].
[11] B. Goldrick u. J. Hirsch, J. Lipid Res. **4**, 482 [1963].

liert. Die Arachidonsäure war gaschromatographisch rein. Die Linolsäure, die noch Spuren von Eicosadien-(11.14)-säure enthielt, wurde durch präparative Gaschromatographie gereinigt. Nach Verfütterung von doppelt markierter Stearinsäure wurde das Gesamtestergemisch über die Quecksilberaddukte[12] in gesättigte, Monoen- und Polyen-Fettsäuren getrennt; durch präparative Gaschromatographie wurden aus der Fraktion der gesättigten Fettsäure-methylester reine Stearinsäure und aus der Monoensäurefraktion reine Ölsäure isoliert.

Das Verhältnis $^{3}H/^{14}C$ der aus der Leber isolierten verfütterten Ausgangssäure und der aus dieser abgeleiteten Fettsäure (im Versuch mit Arachidonsäure: Arachidonsäure; mit Linolsäure: Linol- und Arachidonsäure; mit Stearinsäure: Stearin- und Ölsäure) wurde bei den Versuchen mit Linol- und Arachidonsäure auf dreifache Weise bestimmt: 1. durch Messung der Radioaktivitäten der reinen isolierten Fettsäure-methylester; 2. durch Dauben-Abbau[13] nach katalytischer Hydrierung der freien Säure und Messung der spezifischen Aktivitäten der dabei anfallenden [^{14}C]Benzoesäure und der [^{3}H]Nonadecan- bzw. -Heptadecansäure; 3. durch Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der ^{14}C-markierten Abbaudicarbonsäuren nach der oxydativen Ozonolyse und des 2.4-Dinitro-phenylhydrazons des nach der reduktiven Ozonolyse vom Methylende stammenden Aldehyds. Bei den Versuchen mit Stearinsäure wurde das $^{3}H/^{14}C$-Verhältnis nach den beiden ersten Methoden bestimmt.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist nach der Verfütterung der Arachidon- und Linolsäure das Verhältnis der beiden Isotope auch nach 15 Stdn., in denen die Tiere bereits 20—25% der ^{14}C-Aktivität als $^{14}CO_2$ abgeatmet haben, innerhalb der Meßgenauigkeit gleich der der Ausgangsverbindung. Daraus ziehen wir den Schluß, daß die langkettigen Fettsäuren keinen partiellen Ab- und Wiederaufbau erfahren, sondern völlig abgebaut werden, wenn sie einmal im Kontakt mit dem Multienzym der β-Oxydation im Mitochondrion stehen. Die Verschiebung des $^{3}H/^{14}C$-Verhältnisses im Versuch mit Stearinsäure führen wir auf eine teilweise Neusynthese aus ^{14}C-Acetat zurück, da sich nach dem Dauben-Abbau rund 5—7% der ^{14}C-Gesamtaktivität in der Heptadecansäure befinden.

Versuche in vitro mit Rattenlebermitochondrien

Auf Grund dieser Ergebnisse ist es möglich, durch Messung des freigesetzten $^{14}CO_2$ bei Versuchen mit Rattenlebermitochondrien die Oxydationsrate verschiedener Mono- und Polyenfettsäuren zu bestimmen.

Untersuchungen von Fritz[14] und Bremer[15] hatten gezeigt, daß DL-Carnitin die Oxydation von gesättigten Fettsäuren stimuliert. Fritz[14] nimmt an, daß die Acylgruppe des Coenzym-A-Esters durch

[12] E. Jantzen u. H. Andreas, Chem. Ber. **92**, 1427 [1959]; **94**, 628 [1961].
[13] W. G. Dauben, E. Hoerger u. J. W. Petersen, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2347 [1953].
[14] I. B. Fritz u. K. T. N. Yue, J. Lipid Res. **4**, 279 [1963].
[15] J. Bremer, J. biol. Chemistry **237**, 2228, 3628 [1962].

eine in der Mitochondrienmembran lokalisierte Carnitin-Transacylase auf Carnitin-umacyliert wird und so die für die Acyl-CoA-Verbindungen undurchlässige Membran als Acyl-Carnitin-Ester passieren kann; ein zweites, intramitochondriales Carnitin-Transacylase-System soll den Acylrest wieder auf das CoA übertragen, bevor die β-Oxydation eingeleitet wird.

In Tab. 2 sind die Ergebnisse unserer Versuche mit Rattenlebermitochondrien über die Oxydation verschiedener Mono- und Polyenfettsäuren ohne und mit Carnitinzusatz im Vergleich zur Palmitinsäure zusammengefaßt. Aus der Tabelle geht hervor, daß Mitochondrien gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren unter unseren Versuchsbedingungen mit vergleichbarer Geschwindigkeit oxydieren können. Carnitin steigert auch die Oxydation der ungesättigten Fettsäuren um das Zwei- bis Vierfache.

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

Tab. 1. Versuche in vivo mit doppelt [^{3}H, ^{14}C]-markierten Fettsäuren.

Verfütterte Fettsäure			Isolierte Fettsäure-methylester			n. Dauben-Abbau	
	spezif. Aktiv. [Zpm/μMol]	^{3}H/^{14}C		spezif. Aktiv. [Zpm/μMol]	^{3}H/^{14}C	$\frac{[^3H]RCO_2H}{C_6H_5{}^{14}CO_2H}$	$\frac{[^3H]\text{Dinitrophenylhydrazon}}{[^{14}C]\text{Dicarbons.}}$
$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20} (Arachidonsäure)	^{3}H 3,20 × 10^6 ^{14}C 4,00 × 10^5	8,0	$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20} (Arachidonsäure)	^{3}H 2,45 × 10^5 ^{14}C 3,07 × 10^4	7,98	8,05	7,95
$\Delta^{9,12}$-C_{18} (Linolsäure)	^{3}H 2,10 × 10^6 ^{14}C 3,56 × 10^5	5,9	$\Delta^{9,12}$-C_{18} (Linolsäure) $\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20} (Arachidonsäure)	^{3}H 8,75 × 10^4 ^{14}C 1,47 × 10^4 ^{3}H 1,18 × 10^4 ^{14}C 2,00 × 10^3	5,91 5,92	5,88 —	5,94 5,96
C_{18} (Stearinsäure)	^{3}H 2,10 × 10^6 ^{14}C 3,56 × 10^5	5,9	C_{18} (Stearinsäure) Δ^9-C_{18} (Ölsäure)	^{3}H 2,52 × 10^5 ^{14}C 4,45 × 10^4 ^{3}H 3,98 × 10^4 ^{14}C 7,05 × 10^3	5,66 5,65	5,78 —	— —

Tab. 2. Versuche in vitro mit Rattenlebermitochondrien zur Messung der Oxydation verschiedener [1-^{14}C]-markierter Mono- und Polyenfettsäuren ohne und mit Carnitinzusatz im Vergleich zu Palmitinsäure. Jeder Inkubationsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 2,5 *ml*: 1 μMol Fettsäure als Ammoniumsalz; 200 μMol KCl; 12,5 μMol $MgCl_2$; 2,5 μMol ATP; 0,25 μMol AMP; 0,1 μMol CoA; 6,25 μMol $NAD^{\oplus}$; 2,5 μMol Natriumsuccinat; außerdem bei den entsprechenden Versuchen 2,5 μMol DL-Carnitin; 1 *ml* Mitochondriensuspension entsprechend 1 g Leberfeuchtgewicht. Inkubation 120 Min. bei 37° in Warburg-Trögen.

Säuretyp	Eingesetzte [1-^{14}C]Fettsäure	nMol Fettsäure oxydiert	
		ohne Carnitin	mit Carnitin
Gesättigt	C_{16} (Palmitinsäure)	29	47
Ölsäure-Typ	Δ^{9}-C_{18} (Ölsäure)	15,3	49
	$\Delta^{6,9}$-C_{18}	40	52,5
	Δ^{11}-C_{20}	12,7	34
Linolsäure-Typ	$\Delta^{9,12}$-C_{18} (Linolsäure)	37	57
	$\Delta^{4,7,10}$-C_{16}	24	36
	$\Delta^{6,9,12}$-C_{18} (γ-Linolensäure)	37	58
	$\Delta^{8,11,14}$-C_{20}	15	43
	$\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20} (Arachidonsäure)	29	43
Linolensäure-Typ	$\Delta^{9,12,15}$-C_{18} (Linolensäure)	59	95
Isomeres	$\Delta^{6,9,12}$-iso-C_{18}	31	80

Beschreibung der Versuche

1. Untersuchungen mit doppelt markierten, synthetischen Fettsäuren

Die [^{3}H,^{14}C]-markierten, ungesättigten Fettsäuren wurden nach früher von uns beschriebenen Methoden[8,9] synthetisiert; die [^{3}H,^{14}C]-markierte Stearinsäure wurde durch katalytische Hydrierung der Linolsäure dargestellt.

Arachidonsäure:	spezif. Akt. ^{3}H	$3{,}20 \times 10^6$ Zpm/μMol
	spezif. Akt. ^{14}C	$4{,}00 \times 10^5$ Zpm/μMol
	^{3}H/^{14}C	8,0
Linolsäure:	spezif. Akt. ^{3}H	$2{,}10 \times 10^6$ Zpm/μMol
	spezif. Akt. ^{14}C	$3{,}56 \times 10^5$ Zpm/μMol
	^{3}H/^{14}C	5,9
Stearinsäure:	spezif. Akt. ^{3}H	$2{,}10 \times 10^6$ Zpm/μMol
	spezif. Akt. ^{14}C	$3{,}56 \times 10^5$ Zpm/μMol
	^{3}H/^{14}C	5,9

Die Radioaktivitäten der Verbindungen wurden mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer der Fa. Packard, Modell 3214, bei folgenden Einstellungen der Zählkanäle gemessen:

^{3}H: Fenstereinstellung 50—250, Verstärkung (gain) 10%, Zählausbeute 32%,
^{14}C: Fenstereinstellung 10—1000, Verstärkung (gain) 7%, Zählausbeute 53%.

Die Hochspannung war jeweils auf Tap 5 gestellt.

Als Phosphore dienten 2.5-Diphenyl-oxazol (PPO 0,5 g/*l*) und 1.4-Bis-[4-methyl-5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP, 0,3 g/*l*) in Toluol.

Die radioaktiv markierten Fettsäuren wurden den Versuchstieren (Ratten eigener Inzucht) mit der Schlundsonde appliziert. Der Verlauf der Resorption und des Abbaus der verfütterten Fettsäure wurde durch Radioaktivitätsmessung des abgeatmeten $^{14}CO_2$ nach Fredrickson und Ono[16] gemessen. Die Versuchstiere

[16] D. S. Fredrickson u. K. Ono, J. Lab. clin. Med. **51**, 147 [1958].

wurden 15 Stdn. nach der Verfütterung getötet, die Leber wurde homogenisiert und mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) 4mal extrahiert. Nach der Umesterung des Gesamtlipoidextraktes wurden die Methylester verseift, Unverseifbares abgetrennt und die freien Fettsäuren erneut verestert. Die Methylester wurden auf 500 μ dicken Silbernitrat-Kieselgel H (2:8, g/g)-Schichten[10] im System Heptan-Essigester 7:3 (v/v) dünnschichtchromatographisch getrennt; auf einer Platte konnten bis zu 500 mg Methylester präparativ getrennt werden. Die Banden wurden mit 2.7-Dichlor-fluoreszeinlösung (30 mg in 100 *ml* Äthanol) sichtbar gemacht und nach Goldrick und Hirsch[11] isoliert.

Analytische Gaschromatogramme wurden auf dem Barber Colman Modell 10 aufgenommen; die präparative Trennung der Fettsäure-methylester erfolgte auf dem Perkin Elmer F 6, der zum Auffangen der Fraktionen modifiziert wurde. Die stationäre Phase war 15% Äthylenglykol-Bernsteinsäure-Polyester.

Die Bestimmung der Radioaktivität der Carboxylgruppe erfolgte nach Dauben[13], der oxydative und reduktive Ozonidabbau nach Klenk und Mitarbeitern[17]. Die Radioaktivitätsbestimmung der stark selbstlöschenden 2.4-Dinitro-phenylhydrazone wurde früher beschrieben[8].

2. Untersuchungen mit Rattenlebermitochondrien

Die verwendeten Coenzyme wurden von der Fa. C. F. Boehringer, Mannheim, DL-Carnitin von der Fa. Calbiochem, Los Angeles, bezogen. Die [1-^{14}C]-markierten Fettsäuren wurden durch Totalsynthese erhalten[8, 9]; sie waren chemisch und radiochemisch rein und bildeten nach Neutralisation mit 2*n* NH_4OH klare wäßr. Lösungen.

Die Rattenlebermitochondrien wurden bei 0—2° präpariert. Die Leber wurde in 9 Vol. 0,2*m* Saccharose—0,001*m* Versen—0,2*m* Phosphatpuffer, pH 7,0, homogenisiert. Nach Abschleudern des Zelldetritus wurden die Mitochondrien durch 15 Min. Zentrifugieren bei 10000 $\times$ *g* gewonnen, einmal mit Phosphatpuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zentrifugat pro 1 g Leberfeuchtgewicht wurde in 1 *ml* Saccharose-Versen-Phosphatpuffer homogenisiert. Die Eiweißbestimmung erfolgte nach der Biuretmethode.

Die Oxydationsrate der [1-^{14}C]Fettsäuren wurde in Anlehnung an Snyder und Godfrey[18] bestimmt. Dabei enthielt der Hauptraum normaler Warburggefäße die Mitochondriensuspension, Fettsäure- und Cofaktorenlösung; der Seitenarm enthielt 0,3 *ml* 6*n* H_2SO_4; zur Absorption des freigesetzten CO_2 und zur späteren Messung der Radioaktivität dienten 0,5 *ml* Hyamin-X-10-Lösung* in einer kleinen Ampulle auf dem Zentralgefäß. Die Gefäße wurden verschlossen und 2 Stdn. bei 37° im Thermostaten geschüttelt. Die dann in den Hauptraum eingekippte Schwefelsäure stoppte die Reaktion und setzte gelöstes CO_2 in Freiheit. Zur vollständigen Absorption des CO_2 als Hyamincarbonat wurden die Gefäße weitere 3 Stdn. geschüttelt. Die Radioaktivität der Hyamincarbonatlösung wurde mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer der Fa. Packard, Modell 3214, bei folgenden Einstellungen der Zählkanäle gemessen:

Fenstereinstellung 50—1000, Verstärkung (gain) 7%, Hochspannung Tap 5.

Als Phosphore dienten, wie oben beschrieben, PPO und Dimethyl-POPOP in Toluol. Die Zählausbeute wurde durch Zugabe eines „inneren Standards" bestimmt; sie lag bei 70—75% und wurde auf 100% korrigiert. Wie wiederholte Versuche mit $Ba^{14}CO_3$ zeigten, konnten wir mit dieser Methode 83% des insgesamt freigesetzten $^{14}CO_2$ erfassen; die gefundenen Werte wurden entsprechend auf 100% korrigiert. Die Menge der in 2 Stdn. oxydierten Fettsäuren wurde in nMol angegeben und bezogen auf die Menge Mitochondrien pro 1 g Leberfrischgewicht.

---

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

[17] E. Klenk u. W. Bongard, diese Z. **290**, 181 [1952]; E. Klenk u. G. Kremer, ebenda **320**, 111 [1960].

[18] F. Snyder u. P. Godfrey, J. Lipid. Res. **2**, 195 [1961].

Zusammenfassung

Mit Hilfe doppelt [^{3}H,^{14}C]-markierter Stearin-, Linol- und Arachidonsäure wurde gezeigt, daß langkettige Fettsäuren keinen partiellen Abbau und Wiederaufbau erfahren, sondern vollständig abgebaut werden. Gesättigte, Monoen- und Polyen-Fettsäuren werden durch Rattenlebermitochondrien mit vergleichbaren Geschwindigkeiten oxydiert. Carnitin steigert auch die Oxydationsrate der ungesättigten Fettsäuren.

Summary

In vivo experiments with (^{3}H,^{14}C)-doubly labeled stearic, linoleic and arachidonic acids showed that long chain fatty acids do not undergo partial degradation and resynthesis, but are completely oxidized. Saturated, monoenoic, and polyenoic fatty acids are degraded by rat liver mitochondria at comparable rates. Carnitine stimulates the rate of oxidation of unsaturated fatty acids.

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