Sonderdruck
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 345, S. 41—51, 1966

Der Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren, VII[1]

Untersuchungen über die Bildung der *cis*-olefinischen Bindungen in Polyenfettsäuren*

Von

Wilhelm Stoffel und **Hans-Gerd Schiefer**

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln

(Der Schriftleitung zugegangen am 11. Januar 1966)

Herrn Prof. Dr. C. Martius zum 60. Geburtstag gewidmet

In früheren Untersuchungen[2] über die Biosynthese der Polyenfettsäuren wurde gezeigt, daß diese in vitro in zwei Teilreaktionen studiert werden kann:

1. Verlängerung der Kohlenstoffkette der langkettigen Acyl-CoA-Ester durch Kondensation mit Malonyl-CoA und Reduktion mit NADPH an einem Multienzym des endoplasmatischen Reticulums; gesättigte, einfach und mehrfach ungesättigte Acyl-CoA-Ester werden zu den um zwei oder, je nach Malonyl-CoA-Konzentration, vier C-Atome höheren Homologen verlängert.

2. Stereo- und stellungsspezifische Einführung im Polyallylrhythmus angeordneter *all-cis*-olefinischer Bindungen in Richtung auf das Carboxylende des Fettsäuremoleküls. Studiert wurde die Umwandlung von 11.14-Eicosadienoyl- und 8.11.14-Eicosatrienoyl-CoA in 5.8.11.14-Eicosatetraenoyl-CoA (Arachidonsäure). Das Enzymsystem benötigt molekularen Sauerstoff und, je nach Mikrosomenpräparat, NADPH. Es ist ebenfalls an die endoplasmatische Membran gebunden und konnte bisher nicht in Lösung gebracht werden.

Der von uns beschriebene Mechanismus der Kettenverlängerung durch Malonyl-CoA und die Notwendigkeit von molekularem Sauerstoff für die Olefinierungsreaktion in der Biosynthese der Polyenfettsäuren wurde inzwischen von Nugteren[3] an analogen Beispielen untersucht und bestätigt.

---

* Verwendete Abkürzungen: CoA bzw. HS$\overline{\text{CoA}}$ = Coenzym A; NADP und NADPH = oxydiertes bzw. reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat; ATP = Adenosintriphosphat; Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; FAD = Flavin-adenin-dinucleotid.

[1] VI. Mitteil.: W. Stoffel u. H.-G. Schiefer, diese Z. **341**, 84 [1965].

[2] W. Stoffel, Biochem. biophysic. Res. Commun. **6**, 270 [1961]; diese Z. **333**, 71 [1963]; W. Stoffel u. K.-L. Ach, ebenda **337**, 123 [1964]; W. Stoffel, 16. Mosbacher Kolloquium 1965 der Gesellschaft f. Physiolog. Chemie über „Lipoide", Springer-Verlag, im Druck.

[3] D. H. Nugteren, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **60**, 656 [1962]; **106**, 280 [1965].

Bloomfield und Bloch[4] haben erstmals die Bedeutung des molekularen Sauerstoffs für die aerobe Bildung der Palmitolein- und Ölsäure aus der Palmitin- und Stearinsäure beschrieben. Die aus Hefe isolierte, an Partikeln gebundene „Desaturase" führt die *cis*-olefinische Bindung unabhängig von der Kettenlänge der gesättigten Fettsäure-CoA-Ester stellungsspezifisch stets zwischen C-9 und C-10, von der Thioestergruppe gerechnet, ein[5].

Bei der Olefinierung der Polyenfettsäuren bestimmen dagegen die schon im Molekül vorliegenden Doppelbindungen die Stellung der neu einzuführenden Doppelbindungen, die in der tierischen Zelle stets in das Carboxylende, durch eine Methylengruppe von der vorhandenen Doppelbindung isoliert, eingeführt werden. Die unterschiedliche Stellungsspezifität der „Desaturase" und unseres olefinierenden Enzyms spricht dafür, daß zwei verschiedene Enzymsysteme vorliegen, die die Reaktion möglicherweise nach dem gleichen oder einem ähnlichen enzymatischen Mechanismus katalysieren.

Drei Reaktionstypen können zur Bildung einer homo-allylständigen Doppelbindung führen:

1. eine Dehydrogenase-Reaktion
2. eine Hydroxylase-Reaktion
3. eine Oxydase-Reaktion

Die Einführung von olefinischen Bindungen durch eine Dehydrogenierungsreaktion wird durch Flavoproteide katalysiert, die zu Doppelbindungen in Konjugation zu funktionellen Gruppen mit negativem induzierendem Effekt ($>C{=}C<$; $>C{=}O$; $-CO \sim SCoA$) führen. Nach einem solchen Mechanismus verlaufen u. a. die Δ^1-Dehydrogenierungen von Steroiden in intakten Zellen und zellfreien Extrakten von *Bacillus sphaericus* (EC 1.3.99.4). Bei dieser Reaktion sollen Chinone (Vitamin K_3, Vitamin K_1, Ubichinone) als Cofaktoren und Elektronenakzeptoren beteiligt sein[6]. Bei den Polyenfettsäuren dagegen wird die neu einzuführende Doppelbindung homo-allylständig zur schon vorhandenen Doppelbindung eingeführt.

Bei einer Hydroxylase-Reaktion wird der aktivierte Sauerstoff unter Mitbeteiligung von Elektronendonatoren, meist reduzierten Pyridinnucleotiden, in das Molekül in Form einer Hydroxylgruppe eingeführt[7]. In einer hypothetischen Folgereaktion könnte dann durch Dehydratisierung eine *cis*-olefinische Bindung gebildet werden. Für diese Gruppe von Enzymen, die gleichzeitig molekularen Sauerstoff und einen

---

[4] D. K. Bloomfield u. K. Bloch, J. biol. Chemistry **235**, 337 [1960].
[5] G. J. Schroepfer u. K. Bloch, J. biol. Chemistry **240**, 54 [1965].
[6] P. H. Gale, A. C. Page jr., T. H. Stoudt u. K. Folkers, Biochemistry **1**, 788 [1962]; V. Stefanovic, M. Hayano u. R. I. Dorfman, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **71**, 429 [1963].
[7] O. Hayaishi, Oxygenases, Academic Press, New York u. London 1962.

Elektronendonator benötigen, hat Mason[8] den Begriff „mixed function oxidases" geprägt. Dazu gehören verschiedene Steroidhydroxylasen, z. B. die durch CO hemmbare Steroid-21-Hydroxylase (EC 1.14.1.8) aus Nebennierenrindenmikrosomen[9–11], die von Kaufman[12] beschriebenen, Pteridin-abhängigen Hydroxylasen für aromatische Aminosäuren (EC 1.14.3.1) und Enzyme zur Hydroxylierung von aliphatischen Carbonsäuren[13, 14] und von Pharmaka[15].

Bei einer Oxydase-Reaktion dient der aktivierte Sauerstoff selbst als unmittelbarer Elektronenakzeptor. Der Wasserstoff wird stellungsspezifisch vom Molekül entfernt, ohne daß Intermediärprodukte faßbar sind[7].

Unsere Kenntnisse über den Elektronentransport in der Membran des endoplasmatischen Reticulums sind noch unvollständig. Die von Mason und Mitarbeitern[16] und von Omura et al.[11] schematisch skizzierten Elektronentransportketten erfassen nicht alle inzwischen aus der mikrosomalen Fraktion isolierten Redoxsysteme. So ist die von Sato et al.[17] beschriebene NADPH-Oxydase, die Naphthochinon benötigt, nicht eingeordnet worden; über die Bedeutung der in Mikrosomen vorkommenden Ubichinone[18] weiß man noch nichts. Auch unsere Kenntnisse über die funktionelle Bedeutung der mikrosomalen Cytochrome (Cytochrom b_5 und Cytochrom P-450 = Reticulochrom) und des mikrosomalen Nicht-Haem-gebundenen Eisens sind gering.

In dieser und der nachfolgenden Veröffentlichung[19] beschreiben wir Versuche, die unternommen wurden, um mit Hilfe von hemmenden Substanzen und Modellverbindungen einen Einblick in den Mechanis-

---

[8] H. S. Mason, Advances in Enzymol. **19**, 79 [1957].

[9] R. W. Estabrook, D. Y. Cooper u. O. Rosenthal, Biochem. Z. **338**, 741 [1963].

[10] D. Y. Cooper, S. Levin, S. Narasimhulu, O. Rosenthal u. R. W. Estabrook, Science [Washington] **147**, 400 [1965].

[11] T. Omura, R. Sato, D. Y. Cooper, O. Rosenthal u. R. W. Estabrook, Federat. Proc. **24**, Nr. 5, 1181 [1965].

[12] S. Kaufman, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **27**, 428 [1958]; J. biol. Chemistry **230**, 931 [1958]; **234**, 2677 [1959].

[13] K. Wakabayashi u. N. Shimazono, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **48**, 615 [1961].

[14] G. Lindstedt u. S. Lindstedt, Biochem. biophysic. Res. Commun. **7**, 394 [1962].

[15] C. Mitoma, H. S. Posner, H. C. Reitz u. S. Udenfriend, Arch. Biochem. Biophysics **61**, 431 [1956]; J. Cramer, J. A. Miller u. E. C. Miller, J. biol. Chemistry **235**, 885 [1960].

[16] H. S. Mason, J. C. North u. M. Vanneste, Federat. Proc. **24**, Nr. 5, 1172 [1965].

[17] R. Sato, H. Nishibayashi u. T. Omura, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **63**, 550 [1962]; H. Nishibayashi, T. Omura u. R. Sato, ebenda **67**, 520 [1963].

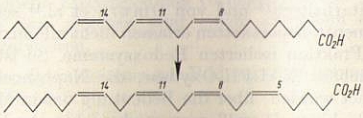
[18] S. Leonhäuser, K. Leybold, K. Krisch, Hj. Staudinger, P. H. Gale, A. C. Page jr u. K. Folkers, Arch. Biochem. Biophysics **96**, 580 [1962].

[19] W. Stoffel, H.-G. Schiefer u. R. Ditzer, diese Z. **344**, 52 [1966].

mus der Olefinierungsreaktion bei der Biosynthese der Polyenfettsäuren zu gewinnen. Die Polyenfettsäuren liegen als β-ständige Acylkomponenten in den Glycerophosphatiden der tierischen Zellmembranen vor[20]. Wir untersuchten daher, ob die Olefinierungsreaktion an den freien wasserlöslichen Acyl-CoA-Estern stattfindet oder ob die Polyenfettsäure bei dieser Reaktion als β-Acylkomponente des Phospholipoid-Moleküls strukturgebunden ist.

Enzymatische Untersuchungen mit 8.11.14-Eicosatriensäure

Die Olefinierungsreaktion studierten wir an dem letzten Schritt in der Biosynthese der Arachidonsäure[21], der Umwandlung der 8.11.14-Eicosatriensäure (Homo-γ-Linolensäure) in 5.8.11.14-Eicosatetraensäure (Arachidonsäure):



Dazu verwendeten wir [1-^{14}C]8.11.14-Eicosatriensäure[22].

Die einzelnen Zellfraktionen von Rattenleber wurden nach Siekevitz[23] isoliert und mit dem Ammoniumsalz der 8.11.14-Eicosatriensäure, ATP, CoA, $MgCl_2$, Cystein, NADPH inkubiert. Bei den Aktivierungs- und Hemmversuchen wurden die Mikrosomen mit den zu testenden Substanzen vorinkubiert, Katalase und Peroxydase wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn zu der Mikrosomensuspension pipettiert, bevor das Substrat und die verschiedenen Coenzyme dem Reaktionsansatz zugegeben wurden. Nach der Inkubation wurden die Fettsäuren isoliert. Die Umwandlung der eingesetzten 8.11.14-Eicosatriensäure in Arachidonsäure wurde radiogaschromatographisch entweder durch Analyse des Fettsäuremethylestergemisches oder der Dicarbonsäuredimethylester nach der oxydativen Ozonidspaltung der Fettsäuren bestimmt, wobei aus dem Verhältnis der Radioaktivitäten in der Kork- und Glutarsäure die Umwandlungsrate in Arachidonsäure berechnet wurde.

Das olefinierende Enzymsystem ist, wie bereits früher[2] beschrieben wurde, bei der üblichen Zellfraktionierung der Rattenleber in den Mikrosomen lokalisiert. Mitochondrien und 105000 $\times$ g-Überstand (vor und nach Hitzedenaturierung des Proteins) erhöhen die enzymatische Aktivität der Mikrosomen nicht.

Als kritisch erwies sich die Fettsäurekonzentration. Bei Konzentrationen größer als 10^{-4}M sank die Ausbeute der Reaktion (0,5 $\times$ 10^{-4}M 18%; 1 $\times$ 10^{-4}M 16%; 2,5 $\times$ 10^{-4}M 11%; 5 $\times$ 10^{-4}M 8%).

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

[21] J. F. Mead u. D. R. Howton, J. biol. Chemistry **229**, 575 [1957].

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

[23] P. Siekevitz, Methods in Enzymol. **5**, 61 [1962].

20—30% der eingesetzten 8.11.14-Eicosatriensäure wurden enzymatisch in Arachidonsäure umgewandelt. Da die Enzymaktivität der jeweils frisch präparierten Mikrosomen schwankte, analysierten wir bei allen Inkubationsversuchen mit aktivierenden oder hemmenden Substanzen gleichzeitig zwei Inkubationsansätze ohne Zugabe dieser Faktoren. Die Ausbeuten in Tab. 1 sind jeweils auf diese Standardinkubationen (= 100%) bezogen.

Die Notwendigkeit von NADPH für die Olefinierungsreaktion ist abhängig von der Mikrosomenpräparation; bei einigen Versuchsreihen stimulierte es die Reaktion deutlich, bei anderen blieb die Ausbeute der Reaktion mit und ohne NADPH gleich. Sauerstoff ist für die Reaktion unbedingt erforderlich; führt man die Olefinierungsreaktion unter anaeroben Bedingungen durch, sinkt der Umsatz auf 25% der Ausgangsaktivität ab. Künstliche Elektronenakzeptoren können den Sauerstoff nicht ersetzen.

Die Ergebnisse unserer Versuche zur Aktivierung und Hemmung der Olefinierungsreaktion sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Nach diesen Ergebnissen läßt sich eine Dehydrogenierungsreaktion ausschließen: FAD, Menadion [Vitamin K_3], 2.3-Dimethoxy-5-methylbenzochinon-(1.4) [Ubichinon (0)] und künstliche Elektronenakzeptoren

Tab. 1. Versuche in vitro mit Rattenlebermikrosomen zur Aktivierung und Hemmung der Olefinierungsreaktion (Umwandlung von 8.11.14-Eicosatriensäure in 5.8.11.14-Eicosatetraensäure). Jeder Inkubationsansatz enthielt außer den angegebenen Zusätzen in einem Gesamtvolumen von 2 *ml*: 0,2 μMol Ammoniumsalz der 8.11.14-Eicosatriensäure; 10 μM ATP; 10 μM $MgCl_2$; 0,2 μM CoA; 10 μM Cystein; 10 mg Mikrosomenprotein; 200 μM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 2 μM NADP; 20 μM Glucose-6-phosphat; 3 U* Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Zusätze	[Mol/*l*]	rel. Ausbeute bez. auf Standardinkubation (= 100%)
FAD	10^{-5}	89%
Atebrin	10^{-4}	44%
Menadion	10^{-4}	100%
Ubichinon (O)	10^{-4}	100%
Methylenblau	10^{-5}	44%
Dichlorphenolindophenol	10^{-5}	73%
Tetrahydrofolsäure	5×10^{-4}	100%
Dihydrobiopterin	10^{-4}	100%
Ascorbinsäure	10^{-3}	32%
$FeSO_4$	10^{-3}	28%
Ascorbinsäure + $FeSO_4$	je 10^{-3}	43%
KCN	10^{-3}	25%
NaN_3	10^{-3}	28%
o-Phenanthrolin	10^{-2}	17%
Äthylendiamintetraacetat	10^{-3}	16%
p-Chlormercuri-benzoat	10^{-3}	14%
Katalase	$0{,}8 \times 10^4$ U/Ansatz	66%
Peroxydase	200 γ/Ansatz	25%

* U = internationale Einheit (μMol Substatumsatz/Min. unter Standardbedingunen.

wie Methylenblau und Dichlorphenolindophenol stimulieren die Olefinierungsreaktion nicht, sondern führen (z. B. Methylenblau) zu einer teilweisen Hemmung der Aktivität. Der Einfluß des Atebrins, das viele Flavoproteide kompetitiv hemmt[24], ist zu gering, als daß man daraus auf die Beteiligung eines Flavoproteids schließen könnte.

Wir prüften ferner die Möglichkeit, ob die neu einzuführende Doppelbindung nach dem Mechanismus einer Dehydrogenierungsreaktion in Konjugation zur schon bestehenden Doppelbindung eingeführt und anschließend zur Homo-Allylstellung isomerisiert wird. Wie am System 1.3-Pentadien — 1.4-Pentadien gezeigt wurde[25], besitzen konjugierte Diene (1.3-Systeme) gegenüber den durch eine —CH_2-Gruppe isolierten Dienen (1.4-Systeme) eine höhere Stabilisierungsenergie. Die in der nachfolgenden Veröffentlichung[19] ausführlich beschriebenen Versuche mit [1-^{14}C]7*c*.9*c*.12*c*-Octadecatrien- und 7*t*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure liefern den direkten experimentellen Beweis gegen einen solchen Mechanismus.

Unsere Befunde machen unwahrscheinlich, daß bei der Olefinierungsreaktion durch eine Hydroxylase hydroxylierte Intermediärprodukte gebildet werden, die durch Dehydratisierung zu einer *cis*-Doppelbindung führen. Ein Intermediärprodukt in Form einer Hydroxysäure oder einer polaren Verbindung wurde nicht gefunden. Weder 105000 × *g*-Überstand, noch Dihydrobiopterin, noch Tetrahydrofolsäure, die bei der Hydroxylierung von aromatischen Aminosäuren beteiligt sind[12], stimulieren die Reaktion. Ascorbinsäure[26,14], Eisensulfat[27] (Schwermetall-Effekt?) oder Eisensulfat + Ascorbinsäure[14] hemmen die Olefinierungsreaktion.

In den letzten Jahren haben verschiedene Autoren[9,11] wahrscheinlich machen können, daß das Cytochrom P-450 (= Reticulochrom) bei vielen „mixed function oxidase"-Reaktionen den molekularen Sauerstoff aktiviert. Verschiedene CO/O_2-Mischungsverhältnisse verminderten die Aktivität der Hydroxylierungsreaktionen. Die CO-Hemmung ließ sich durch Licht aufheben. Das Maximum des photochemischen Wirkungsspektrums lag bei 450 mμ.

Cytochrom P-450 konnten wir als Cofaktor ausschließen, da verschiedene CO/O_2-Gemische keinen Einfluß auf die Olefinierungsreaktion hatten. Über die Funktion von Cytochrom b_5 wissen wir nichts, da uns spezifische Inhibitoren fehlten.

---

[24] E. Haas, J. biol. Chemistry **155**, 321 [1944]; L. Hellerman, A. Lindsay u. M. R. Bovarnick, ebenda **163**, 553 [1946].

[25] J. Hine, Physical Organic Chemistry, S. 23, McGraw Hill Book Company Inc., New York 1956.

[26] B. S. Gould u. J. F. Woessner, J. biol. Chemistry **226**, 289 [1957]; K. Krisch u. Hj. Staudinger, Biochem. Z. **334**, 312 [1961]; H. Kersten, W. Kersten u. Hj. Staudinger, ebenda **327**, 284 [1955].

[27] A. J. Fulco u. K. Bloch, J. biol. Chemistry **239**, 993 [1964].

Bemerkenswert ist die starke Hemmung der Olefinierungsreaktion durch *o*-Phenanthrolin, Äthylendiamintetraacetat und Cyanid, die $Fe^{2\oplus}$-Ionen komplexieren, und durch Peroxydase. Die starke Hemmung der Olefinierungsreaktion durch Chelat-Bildner mit $Fe^{2\oplus}$-Ionen weist auf eine mögliche Aktivierung des molekularen Sauerstoffs durch $Fe^{2\oplus}$-Ionen unter Bildung von $Fe^{III}O_2^{\ominus}$ (Perferrylionen) hin[28], die die Elektronen des Substrates an der Enzymoberfläche direkt abstrahieren könnten. Die Bildung eines ternären Komplexes Enzym-$Fe^{III}O_2^{\ominus}$-Polyenfettsäure-CoA-Ester könnte besonders durch die Metall-π-Komplex-Bindung des $Fe^{3\oplus}$ mit dem olefinischen System der Polyenfettsäure gefördert werden. Diese Vorstellungen über Metall-olefinische Bindungen wurden von Dewar[29] entwickelt.

Enzymatische Untersuchungen mit 8.11.14-Eicosatriensäure als β-Acylkomponente des Lecithins

Das eingesetzte Lecithin mit [^{3}H]Palmitin-(30%) und Stearinsäure (70%) in α'-Stellung und [1-^{14}C]8.11.14-Eicosatriensäure in β-Stellung wurde synthetisch dargestellt:

Sojalecithin wurde mit Phospholipase A (= Lecithinase A) hydrolysiert[20], das gereinigte Lysolecithin wurde in ^{3}H-Atmosphäre katalytisch hydriert. Der Cadmiumchlorid-Komplex des hydrierten Lysolecithins[30] wurde mit [1-^{14}C]8.11.14-Eicosatrienoylchlorid in 30proz. Ausbeute acyliert[31]. Säulenchromatographie führte zu reinem doppelt markiertem Lecithin mit einem ^{3}H/^{14}C-Verhältnis von 9,35.

Durch Ultraschallbehandlung in der Kälte wurde das Lecithin in Phosphatpuffer micellar gelöst und mit der dann zugegebenen Mikrosomensuspension durch erneutes Beschallen durchmischt. Parallele Ansätze enthielten markiertes Lecithin mit und ohne Zusatz eines NADPH-bildenden Systems. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsansätze mit Chloroform/Methanol extrahiert und das Lipoidgemisch an einer Kieselsäure-Säule getrennt[32]. Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch identifiziert.

Das ^{3}H/^{14}C-Verhältnis im isolierten Lecithin betrug 9,3 und war praktisch identisch mit dem des inkubierten Lecithins. Spaltung des Lecithins mit Phospholipase A[20] führte zur Freisetzung der β-ständigen Acylgruppe als freie Fettsäure, die durch Chromatographie an einer Kieselsäure-Säule[32] vom Lysolecithin getrennt wurde. Radiogaschromatographie der Fettsäuremethylester und der Dicarbonsäure-dimethylester nach oxydativer Ozonolyse zeigte, daß eine Umwandlung der im Lecithin β-ständigen 8.11.14-Eicosatriensäure in 5.8.11.14-Eicosatetraensäure nicht stattgefunden hatte. Bei einer Parallelinkubation mit dem

---

[28] L. L. Ingraham, Biochemical Mechanisms, John Wiley and Sons, New York 1961.

[29] M. J. S. Dewar, Bull. Soc. chim. France **18**, C 79 [1951].

[30] E. Baer u. M. Kates, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1394 [1948].

[31] E. Baer u. D. Buchnea, Canad. J. Biochem. Physiol. **37**, 953 [1959].

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

Ammoniumsalz der Triensäure als Substrat der Olefinierungsreaktion konnten wir mit der gleichen Mikrosomensuspension unter den oben beschriebenen Bedingungen eine Umwandlung von 14% in Arachidonsäure ermitteln.

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

Beschreibung der Versuche

ATP, Coenzym A, NADP, FAD, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) aus Hefe (140 U/mg), Katalase aus Rinderleber ($3{,}9 \times 10^4$ U/mg), Peroxydase aus Meerrettich (Reinheitszahl 3,0) und Tris wurden von der Fa. C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim, *Crotalus-adamanteus*-Toxin (Phospholipase A, EC 3.1.1.4) wurde von der Fa. F. G. Celo, Zweibrücken, bezogen.

Die [1-^{14}C]8.11.14-Eicosatriensäure wurde durch Totalsynthese[25] erhalten, spezif. Aktivität 350000 Zpm/μMol; sie war chemisch und radiochemisch rein und bildete nach Neutralisation mit 2N NH_4OH eine klare wäßr. Lösung. Die Radioaktivitäten der Verbindungen wurden mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer der Fa. Packard, Modell 3214, gemessen. Als Phosphore dienten 2.5-Diphenyl-oxazol (PPO, 5 g/l) und 1.4-Bis-[4-methyl-5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP, 0,3 g/l) in Toluol.

Die Zellfraktionierung erfolgte nach Siekevitz[23], die Eiweißbestimmung nach der Biuretmethode.

1. Inkubationsversuche mit 8.11.14-Eicosatriensäure

Jeder Inkubationsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 ml: 200μM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 0,2 μM Ammoniumsalz der 8.11.14-Eicosatriensäure (70000 Zpm); 10 μM ATP; 10 μM $MgCl_2$; 10 μM Cystein; 0,2 μM CoA und 10 mg Protein; bei den entsprechenden Versuchen außerdem 2 μM NADP; 20 μM Glucose-6-phosphat und 3 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Die in Tab. 1 angegebenen, aktivierenden oder hemmenden Substanzen wurden, in Wasser oder Methylglykol (Menadion, Ubichinon) gelöst, in den bezeichneten Endkonzentrationen 30 Min. bei 30° im Thermostaten mit den Mikrosomen vorinkubiert; danach wurden die radioaktiv markierte Fettsäure und die Cofaktorenlösung zupipettiert. Katalase und Peroxydase wurden unmittelbar vor Zugabe der Fettsäure und der Cofaktoren zu der Mikrosomensuspension gegeben. Bei Versuchen unter anaeroben Bedingungen enthielt der Hauptraum der Thunberg-Röhrchen Mikrosomensuspension und Cofaktorenlösung, der Seitenarm die Fettsäurelösung in Puffer. Die Röhrchen wurden mehrfach an der Wasserstrahlpumpe unter Schütteln evakuiert und jeweils mit Methan oder reinstem Helium belüftet. Bei Versuchen mit Kohlenmonoxyd enthielt der Hauptraum normaler Warburg-Tröge die Mikrosomensuspension, NADP, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; der Seitenarm Fettsäure und Cofaktorenlösung. Die Gefäße wurden mehrfach an der Wasserstrahlpumpe unter Schütteln evakuiert und jeweils mit den verschiedenen CO/O_2-Gemischen (1/1; 19/1 [v/v]), die wir in einer Standflasche durch Verdrängen bestimmter Wasservolumina durch die Gase hergestellt hatten, belüftet. Die Inkubationen erfolgten im Dunkeln.

Die Gefäße wurden 60 Min. bei 30° im Thermostaten bei häufigem Umschütteln inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden mit 5proz. methanol. KOH 2 Stdn. unter Stickstoff verseift. Unverseifbares wurde mit Petroläther extrahiert, die alkoholische Lösung mit 2N HCl angesäuert und 5mal mit Petroläther ausgeschüt-

telt. Die freien Fettsäuren wurden entweder mit BF_3-Methanol verestert und als Fettsäuremethylester durch Radiogaschromatographie analysiert oder durch oxydative Ozonolyse[33] abgebaut und als Abbaudicarbonsäuredimethylester[22] radiogaschromatographisch untersucht. Die radiogaschromatographischen Analysen wurden wie beschrieben[2] ausgeführt.

2. Inkubationsversuche mit 8.11.14-Eicosatriensäure als β-ständige Acylkomponente des Lecithins

Lysolecithin wurde durch enzymatische Hydrolyse von Sojalecithin mit Phospholipase A[20] (*Crotalus-adamanteus*-Toxin) erhalten, aus Chloroform mit Äther zweimal ausgefällt und an Kieselsäure[32] gereinigt. 1,1 g Lecithin ergaben 685 mg dünnschichtchromatographisch reines Lysolecithin. Durch katalytische Hydrierung (PtO_2 in Essigester) in ^{3}H-Atmosphäre wurden 685 mg α-[^{3}H]Stearoyl(Palmitoyl)-L-α-glycerophosphorylcholin erhalten, spez. Aktivität 3,5 $\times$ 10^6 Zpm/μMol (Mol.-Gew. mit 538 angenommen). Die α'-Stellung war mit 30% [^{3}H]Palmitin- und 70% [^{3}H]Stearinsäure acyliert (P = 5,80%; ber. 5,78%).

685 mg (1,25 mMol) Lysolecithin wurden in 30 *ml* auf 40° erwärmten Äthanols gelöst und 2,5 g Cadmiumchlorid ($CdCl_2 \cdot 2{,}5\ H_2O$), in 2 *ml* Wasser gelöst, zugetropft[30]. Nach 2stdg. Stehenlassen bei 0° wurde der Cadmiumchlorid-Komplex scharf abgesaugt, mit Äthanol und trockenem Äther gewaschen und über P_2O_5 im Hochvakuum getrocknet. Ausb. 970 mg (100% d. Th.).

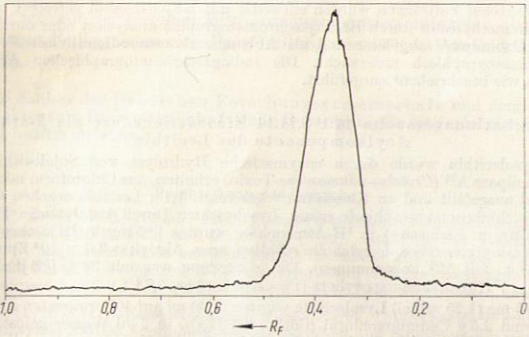
1,1 g (3,6 mMol) [1-^{14}C]8.11.14-Eicosatriensäure in 3 *ml* trockenem Benzol wurden mit 3 *ml* Oxalylchlorid versetzt, 6 Stdn. bei 40° und 12 Stdn. bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluß aufbewahrt. Überschüssiges Oxalylchlorid wurde mit trockenem Benzol vollständig durch mehrmaliges Abdampfen entfernt, das Säurechlorid in Hexan gelöst und schnell mit eiskaltem Wasser zweimal gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurden 1,1 g Säurechlorid als gelbliches Öl erhalten.

Die Acylierung erfolgte nach Baer und Buchnea[31]. In einem 100-*ml*-Dreihalskolben, der mit Rührer, $CaCl_2$-Rohr versehen und mit feinen Glasperlen (30 *ml*, 0,5 mm Durchmesser, Fa. Bühler) beschickt war, ließ man zu einer Lösung von 1,1 g (3,5 mMol) [1-^{14}C]8.11.14-Eicosatrienoylchlorid in 10 *ml* trockenem Äther 970 mg (1,25 mMol) Lysolecithin-$CdCl_2$-Komplex in 20 *ml* äthanolfreiem Chloroform und dann bei 0° unter kräftigem Rühren 3,0 *ml* Pyridin in 30 *ml* Chloroform zutropfen. Nach 2 Stdn. Rühren bei Zimmertemperatur wurde von den Glasperlen abgesaugt, diese gut mit Chloroform gewaschen und das Filtrat bei 25° im Vak. eingeengt, der Rückstand in Chloroform/Methanol/Wasser 5:4:1 warm (40°) gelöst und über eine Mischbett-Ionenaustauscher-Säule Amberlite IR 45—IRC 50 (30 $\times$ 2,0 cm) mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch gegeben, eingeengt und der Rückstand über eine Kieselsäure-Säule (70 g, Kieselsäure-Hyflo Super Cel 2:1) gereinigt. Das Chloroform/Methanol-Gemisch 1:1 (v/v) eluierte dünnschichtchromatographisch und radiodünnschichtchromatographisch reines α'-[^{3}H]Stearoyl (Palmitoyl)-β-[^{14}C] 8.11.14-Eicosatrienoyl-L-α-glycerophosphorylcholin. Ausb. 350 mg (0,42 mMol) oder 30% d. Th. Spezif. Aktivität: ^{3}H = 3,5 $\times$ 10^6 Zpm/μMol; ^{14}C = 0,375 $\times$ 10^6 Zpm/μMol. ^{3}H/^{14}C = 9,35.

Das Radiodünnschichtchromatogramm ist in der Abbildung wiedergegeben.

1 μMol in Chloroform gelöstes Lecithin wurde in ein Kölbchen gegeben und das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen. Das Lecithin wurde in 1 *ml* 0,1M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, durch Beschallen (Ultraschallgerät Type USIG 750 der Fa. Schoeller, Frankfurt) micellar gelöst. Nach Zugabe der Mikrosomensuspension wurde durch erneutes kurzes Beschallen eine klare Lösung erhalten, die dann entweder ohne weitere Zusätze oder nach Zugabe von NADP, Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase 60 Min. bei 30° inkubiert wurde. Das Reaktionsgemisch wurde mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) 5mal extra-

[33] E. Klenk u. W. Bongard, diese Z. **290**, 181 [1952].



Dünnschichtchromatogramm des α′-[^{3}H]Stearoyl(Palmitoyl)-β-[^{14}C]8.11.14-Eicosatrienoyl-L-α-glycerophosphorylcholins.
Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4.
Radioaktivitätsanalyse: Dünnschicht-Scanner der Fa. Prof. Dr. Berthold, Wildbad.

hiert und der Gesamtlipoidextrakt auf eine Kieselsäure-Säule (4 g Kieselsäure, 12 Stdn. bei 110° aktiviert) gegeben und mit Chloroform/Methanol-Gemischen (a. 9:1 80 m*l*; b. 3:2 150 m*l*; c. 1:4 100 m*l*) eluiert[32]. Die Lipoidfraktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-G-Schichten identifiziert; Entwicklung im Lösungsmittelsystem I (Petroläther[60—90°]/Äther/Eisessig 70:30:2), anschließend in gleicher Laufrichtung im Lösungsmittelsystem II (Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4).

Frakt. a enthielt freie Fettsäuren und (Spuren) Kephalin, Frakt. b Kephalin und Lecithin, Fraktion c (Spuren) Lecithin.

Das aus dem Gesamtlipoidextrakt isolierte Lecithin wurde mit 2 mg Sojalecithin verdünnt, in 5 m*l* Äther gelöst und mit 1 mg *Crotalus-adamanteus*-Toxin (gelöst in 0,1 m*l* 0,1M Tris-Puffer, pH 7,4, mit 0,01M $CaCl_2$) während 12 Stdn. bei Raumtemperatur unter Rühren gespalten. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in der oben beschriebenen Weise[32] erneut an einer Kieselsäure-Säule chromatographiert; die 9:1-Fraktion enthielt die β-ständige Acylkomponente des Lecithins, die 1:4-Fraktion das Lysolecithin.

Die freien Fettsäuren wurden durch oxydative Ozonolyse[33] abgebaut, die Abbaudicarbonsäure-dimethylester durch Radiogaschromatographie analysiert.

Tab. 2. Analyse der Inkubationsansätze mit α′-[^{3}H]Stearoyl(Palmitoyl)-β-[^{14}C]-8.11.14-Eicosatrienoyl-L-α-glycerophosphorylcholin.

Inkubationsansatz	Gesamtlipoidextrakt		Lecithinfraktion		β-ständige Fettsäure nach Spaltg. mit Phospholipase A	
	^{3}H [Zpm]	^{14}C [Zpm]	^{3}H [Zpm]	^{14}C [Zpm]	^{3}H [Zpm]	^{14}C [Zpm]
ohne NADPH	$3{,}12 \times 10^6$	317000	$2{,}45 \times 10^6$	263000	521000	190000
mit NADPH	$3{,}00 \times 10^6$	308000	$2{,}08 \times 10^6$	223000	475000	210000

Zusammenfassung

Weitere Untersuchungen in vitro über die Biosynthese von Polyenfettsäuren werden beschrieben. Dabei wird der Einfluß von Substanzen, die potentiell den Elektronentransport in der Redoxkette des endoplasmatischen Reticulums hemmen oder aktivieren, auf die Einführung der *cis*-olefinischen Bindung in Homoallylstellung am Beispiel der Umwandlung von 8.11.14-Eicosatriensäure in 5.8.11.14-Eicosatetraensäure (Arachidonsäure) untersucht. Der Mechanismus einer Dehydrogenase-Reaktion konnte ausgeschlossen werden. Flavoproteide, Chinone, Biopterin und Cytochrom P-450 sind nach unseren Versuchen nicht in die Reaktion einbezogen. Die starke Hemmung durch Agentien, die Eisen-Ionen komplexieren (*o*-Phenanthrolin, Äthylendiamintetraacetat, Cyanid), und durch Peroxydase weist auf die Beteiligung eines Eisen-Sauerstoff-Komplexes hin.

Mit Hilfe von synthetischem α'-[^{3}H]Stearoyl(Palmitoyl)-β-[1-^{14}C]-8.11.14-Eicosatrienoyl-L-α-glycerophosphorylcholin konnte gezeigt werden, daß die Olefinierung am Coenzym-A-Derivat und nicht an der Polyenfettsäure im Molekülverband des Lecithins erfolgt.

Summary

Further experiments in vitro on the biosynthesis of polyenoic fatty acids are described. The influence of substances that are potential inhibitors or activators of the electron transport of the redox chain in the endoplasmic reticulum was investigated in relation to the introduction of *cis*-olefinic bonds in homo-allylic position. The transformation of eicosa-8,11,14-trienoic acid into eicosa-5,8,11,14-tetraenoic acid (arachidonic acid) was studied as an example. The mechanism of a dehydrogenase reaction can be excluded. Flavoproteins, quinones, folic acid derivatives and cytochrome P_{450} are not involved in this reaction according to the experiments described.

The potent inhibition by iron-complexing agents (*o*-phenanthrolin, EDTA, $CN^{\ominus}$) and by peroxidase points to the participation of an iron-oxygen-complex.

Using synthetic α'-[^{3}H]stearoyl (palmitoyl)-β-[1-^{14}C] eicosa-8,11,14-trienoyl-L-α-glycerophosphorylcholine, it was demonstrated that the coenzyme A ester and not the polyenoic acyl-residue of the lecithin molecule is the substrate of the olefination reaction.

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