

Über Biosynthese und biologischen Abbau hochungesättigter Fettsäuren

WILHELM STOFFEL*

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, Köln

Für die Membranen, welche die subzellulären Räume begrenzen, sind offenbar verschiedene Lipoidklassen von besonderer Bedeutung. Die Lipide bilden im Innern der Membranen bimolekulare Schichten, auf die außen Protein (Struktur- und/oder Enzymprotein) aufgelagert ist. Die entsprechende elektronenmikroskopische Struktureinheit nennt man unit-membrane [1—3]. Obwohl auch Membranen verschiedenster Herkunft, elektronenmikroskopisch betrachtet, morphologisch sehr ähnlich sind, muß man auf Grund der chemischen und biochemischen Befunde zwei Arten von Membranen unterscheiden:

1. die *stoffwechsel-aktiven Membranen*, die am Aufbau der subzellulären Partikeln beteiligt sind und als Bauelemente der Lipoid-Phase vorwiegend Phospholipide enthalten,

2. die *stoffwechsel-inaktiven Membranen*, deren Lipid-Schicht sich vorwiegend aus Sphingolipiden und Cholesterin aufbaut und deren Hauptvertreter das Myelin der Nervenfasern ist.

Die wichtigsten Phospholipide der stoffwechsel-aktiven Membranen zeigt Fig. 1.

Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Lipoid-Phase und Enzymproteinen, die auf Grund der gegenseitigen physikalischen Bindungen als „strukturgebunden“ angesprochen werden, machen die Kenntnis des Stoffwechsels der hochungesättigten Fettsäuren besonders wünschenswert.

Die Glycerophosphatide der Lipoid-Phase besitzen eine für sie typische *asymmetrische Verteilung* der Fettsäuren im Molekül. Die 1-Stellung des 1-3-Glycerophosphat-Skeletts ist durch eine vorwiegend gesättigte Fettsäure (Palmitin- oder Stearinsäure) verestert, während in der 2-Stellung hochungesättigte Fettsäuren mit 18 bis 22-C-Atomen und zwei bis sechs Doppelbindungen als Acylgruppen zu finden sind¹. Somit gibt es für jede Phospholipoidklasse eine Vielzahl von Fettsäurekombinationen, die zu bestimmten Spezies führen.

* Nach einem am 12. 11. 1965 anlässlich der Verleihung des Heinrich-Wieland-Preises 1965 in München gehaltenen Vortrag. — Sonderdrucke können über das Sekretariat des Kuratoriums für die Verleihung des Heinrich-Wieland-Preises (Priv.-Doz. Dr. FRICKER, 65 Mainz, Physiologisch-chemisches Institut der Universität) kostenlos bezogen werden.

¹ Verwendete Abkürzungen: CoA oder HSCoA = Coenzym A; NAD⁺ und NADH = oxydiertes bzw. reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; Acyl-CoA-Dehydrogenase (Acyl-CoA: (Akzeptor)-Oxydoreduktase, EC 1.3.99.3); Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase, bisher bekannt als Crotonase (1-3-Hydroxyacyl-CoA-Hydro-lyase, EC 4.2.1.17); Δ^1 ^{scis}— Δ^1 ^{trans}-Enoyl-CoA-Isomerase (EC 5.3.3.7, noch nicht registriert); 3-Hydroxy-acyl-CoA-3-Epimerase, wahrscheinlich identisch mit 3-Hydroxybutyryl-CoA-3-Epimerase, (EC 5.1.2.3), HOADH = 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase (1-3-Hydroxyacyl-CoA: NAD-Oxydoreduktase, EC 1.1.1.35), ER = endoplasmatisches Retikulum.

Hier soll über unsere in-vitro-Untersuchungen zur Biosynthese und zum biologischen Abbau der Polyenfettsäuren berichtet werden [4—11].

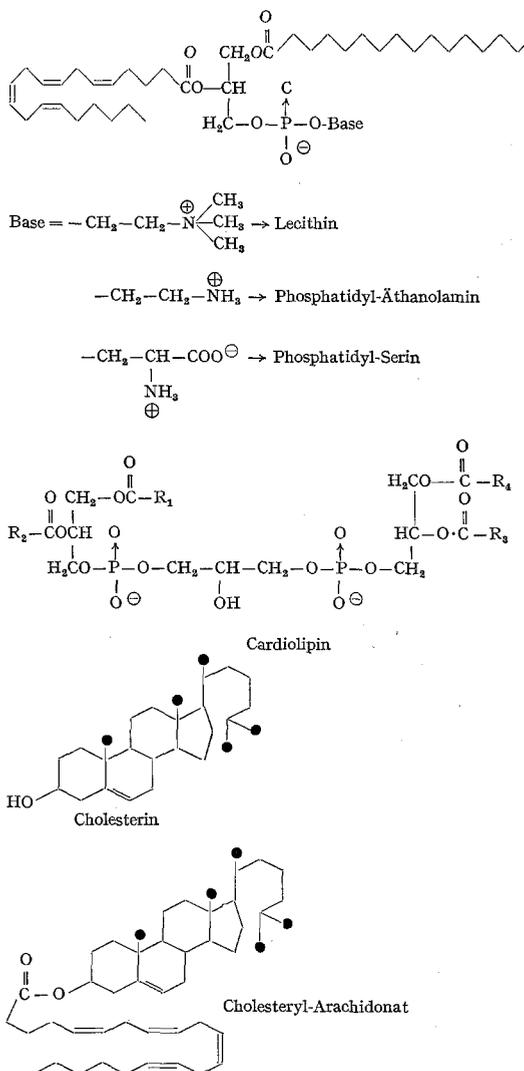


Fig. 1. Lipide in stoffwechselaktiven Membranen

I. Systematik der Polyenfettsäuren

Als Grundlage dient die Systematik der Polyenfettsäuren von KLENK und Mitarb. [12] (vgl. Fig. 2). Neben den Grundverbindungen sind einige Hauptvertreter dieser Fettsäure-Familien aufgeführt.

Nach KLENK lassen sich alle in den Lipiden vorkommenden ungesättigten Fettsäuren in solche vom *Palmitolein-, Öl-, Linol- und Linolensäure-Typus* einordnen. Die Struktur des Methyl-Endes bestimmt demnach die Zugehörigkeit zur einen oder anderen Familie.

Die olefinischen Bindungen sind, durch eine Methylene-Gruppe isoliert, im *Polyallyl-Rhythmus* angeordnet. Sie besitzen *all cis-Konfiguration*. Die Kohlenstoffketten der zu den beiden ersten Gruppen gehörenden Polyensäuren werden *de novo* aufgebaut, die C_{20} - und C_{22} -Polyenfettsäuren des Linol- und Linolensäure-Typs leiten sich jedoch von den für den tierischen Organismus essentiellen Fettsäuren Linol- und Linolensäure durch Kettenverlängerung und Einführung weiterer Doppelbindungen ab [12–17].

II. Biosynthese der Polyenfettsäuren

Zum Studium der Biosynthese der Polyenfettsäuren synthetisierten wir carboxyl-markierte und am Methyl-Ende mit Tritium markierte Polyenfettsäuren [18, 5].

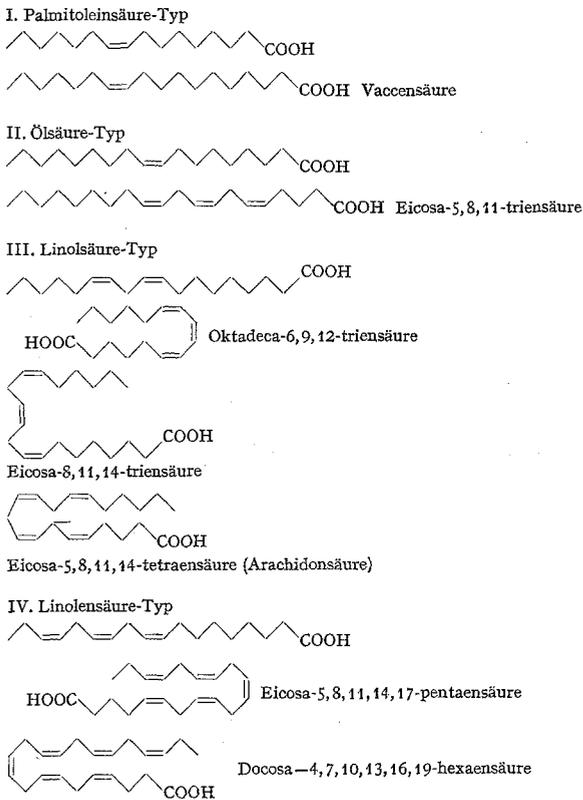


Fig. 2. Systematik der Polyensäuren nach KLENK [12]

Die Polyenfettsäuren wurden chemisch und radiochemisch rein erhalten nach Gegenstromverteilung (Heptan:Acetonitril:Methanol:Eisessig 3:1:1:1) [19], präparativer Gaschromatographie oder präparativer Dünnschichtchromatographie (20% $AgNO_3$ /Kieselgel H, Lösungsmittelsystem Heptan:Essigester 85:15). Durch IR-, NMR- und UV-Spektroskopie sowie oxydativen Ozonid-Abbau wurde ihre Struktur gesichert.

II₁. Kettenverlängerung der C_{16} -, C_{18} - und C_{20} -Säuren

Wir kennen zwei Enzymsysteme der tierischen Zelle für die Biosynthese der Kohlenstoffkette der Fettsäuren. Das eine Multienzym-System ist die sog. Fettsäuresynthetase, die von Acetyl- und Malonyl-CoA ausgehend die Synthese der gesättigten Fettsäuren, vorwiegend der Palmitinsäure, katalysiert. Die Teilreaktionen der Biosynthese klärten LYNEN und Mitarb. [20] an Hefe-Fettsäuresynthetase auf. Die *E. coli*-Fettsäuresynthetase haben VAGELOS und Mitarb. [21] studiert. Der Starter der Synthese ist in beiden Fällen Acetyl-Coenzym A.

Die Fettsäuresynthetase der tierischen Zelle, ein lösliches Enzym, das sich im Cytoplasma findet, konnten WAKIL und Mitarb. [22] isolieren.

Ein zweites Enzymsystem, das die langkettigen C_{16} -, C_{18} - und C_{20} -gesättigten und vor allem die einfach und mehrfach ungesättigten C_{20} - und C_{22} -Säuren aufbaut, wurde in unserem Arbeitskreis isoliert. (Die von WAKIL [22] mit einem Mitochondrien-Extrakt erzielte Kettenverlängerung langkettiger Acyl-Coenzym A-Ester durch Acetyl-Coenzym A dürfte durch eine Rückreaktion der β -Oxydationsreaktions-Sequenz erfolgen.)

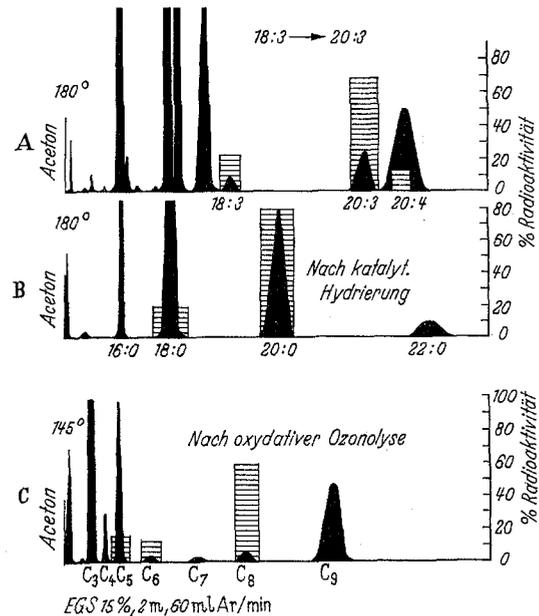


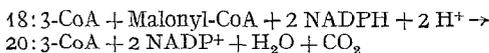
Fig. 3. Radiogaschromatographische Analyse, A der Fettsäuremethyl ester nach der Inkubation mit γ -Linolensäure, B der Fettsäuremethyl ester nach der katalytischen Hydrierung, C der Dicarbonsäure-dimethyl ester nach der oxydativen Ozonolyse der ungesättigten Fettsäuren

Unser Enzymsystem benutzt wie die Synthetase als Substrat für die Kettenverlängerung in der Kondensationsreaktion das Malonyl-CoA als aktivierte C_2 -Einheit. NADPH liefert in beiden Fällen die Reduktionsäquivalente für die Reduktionsschritte. Das kettenverlängernde Enzymsystem unterscheidet sich jedoch wesentlich von der Fettsäuresynthetase:

1. Es kommt zu *keiner de novo-Synthese* von Acetyl- und Malonyl-CoA ausgehend. Es werden nur langkettige Acyl-CoA-Thioester in Gegenwart von Malonyl-CoA verlängert.
2. Unser Enzym ist auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) strukturgebunden angeordnet. (Die Fettsäuresynthetase ist aus dem Cytoplasma als löslicher Enzymkomplex isolierbar.)
3. Die Fettsäuresynthetase der Hefe ist lipoid-frei [20]. Unser Enzym jedoch besitzt Lipoprotein-Struktur und ist als Einheit der ER-Membran aus etwa gleichen Teilen Lipid (Phosphatidyl-cholin 60%, Phosphatidyl-athanolamin 20%, Phosphatidyl-inosit 10%, Sphingomyelin 10%, Spur Cholesterin) und Protein aufgebaut.

Als Beispiel der Kettenverlängerungsreaktion soll die Umwandlung von Oktadeca-6,9,12-trienoyl-CoA in Eicosa-8,11,14-trienoyl-CoA betrachtet werden. Die

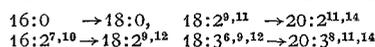
Stöchiometrie der Reaktion geht aus der folgenden Gleichung hervor:



Die Reaktion kann fluorimetrisch [23] am Verbrauch des reduzierten Triphosphopyridinnucleotids verfolgt werden. Die Ausbeute- und Strukturbestimmung des Reaktionsproduktes erfolgen durch Radiogaschromatographie und oxydativen Ozonid-Abbau (Fig. 3). Dieser Mechanismus der Kettenverlängerungsreaktion durch Malonyl-CoA wurde inzwischen von NUGTEREN bestätigt [24a, b].

Die Beobachtung NUGTERENS [24b], daß β , γ -ungesättigte Coenzym A-Ester durch die microsomale Fraktion reduziert werden, dürfte auf eine Verunreinigung mit der von uns [7] nur in Mitochondrien nachgewiesenen $\Delta^{\beta\text{cis}}-\Delta^{\beta\text{trans}}$ -Enoyl-CoA-Isomerase zurückzuführen sein. Erst nach der Isomerisierung dürfte es zur Hydrierung des α , β -trans-Produktes durch NADPH kommen.

An den Beispielen der Kettenverlängerung



orientiert, synthetisierten wir nach dem in Fig. 4 wiedergegebenen Syntheseweg die Coenzym A-Ester der entsprechenden α , β -trans-, D(-) und L(+) 3-Hydroxy- und 3-Ketopolyensäuren [25]. Eine chemische Racemat-Trennung der 3-Hydroxysäuren gelang nicht. D(-)-3-Hydroxypolyensäuren konnten jedoch auf dem vorgezeichneten Weg enzymatisch erhalten werden. In Gegenwart eines NADPH bildenden Systems werden die Coenzym A-Ester der α , β -transungesättigten Coenzym A-Ester sowie die 3-Ketoverbindungen bis zur Alkan-Stufe reduziert. Mit Hilfe der über Dichtegradientenzentrifugation mehrfach gereinigten ER-Fraktion konnte gezeigt werden, daß nur die D(-)-Form umgewandelt wird, d. h., daß diese das Produkt der Reduktion der β -Ketoverbindung und das Substrat der Dehydratisierungsreaktion am kettenverlängernden Enzym ist. Verunreinigung durch Mitochondrienbruchstücke führt zum Umsatz auch der L(+)-Form, da über die 3-Hydroxyacyl-CoA-Epimerase das D(-)-Enantiomere aus dem Gleichgewicht entfernt wird.

Das von SEUBERT und LYNEN [26] beschriebene reduzierende Enzym und die von POPJAK [27] sowie von MATTHES und CHAIKOFF [28] in der mikrosomalen Fraktion beschriebene Enoyl-CoA-Reduktase sind möglicherweise eine Teilenzymaktivität des kettenverlängernden Multienzyms. Somit werden bei der Kettenverlängerung langkettiger Acyl-CoA-Ester die gleichen Stufen wie in der de-novo-Synthese der gesättigten Fettsäuren durchlaufen.

Zur Spezifität der Kettenverlängerungsreaktion

Die Spezifität des kettenverlängernden Enzymsystems prüften wir in einer Reihe von Versuchen.

Folgende Eigenschaften des Multienzymkomplexes gehen aus Tabelle 1 hervor: Unter gleichen Versuchsbedin-

Tabelle 1. Kettenverlängerung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierten gesättigten, Mono- und Polyenylfettsäuren

Inkubierte $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierte Fettsäure	Reaktionsprodukte	Ausbeute
1. Myristinsäure	16:0	35%
2. Palmitinsäure	18:0	20%
3. Stearinsäure	20:0	10%
4. Ölsäure	20:1 [11]	10%
5. Eicosen-11-säure	22:1 [13]	5%
6. Hexadeca-4,7,10-triensäure	18:3 [6, 9, 12]	80%
	20:3 [8, 11, 14]	
7. Hexadeca-7,10-diensäure	18:2 [9, 12]	65%
	20:2 [11, 14]	
8. Oktadeca-6,9-diensäure	20:2 [8, 11]	70%
	20:3 [5, 8, 11]	
9. Oktadeca-6,9,12-triensäure	20:3 [8, 11, 14]	80%
10. Oktadeca-9,12,15-triensäure	20:3 [11, 14, 17]	10%
11. iso-Oktadeca-6,9,12-triensäure	iso-20:3 [8, 11, 14]	60%
12. Oktadeca-8,11,14-triensäure	20:3 [10, 13, 16]	5%
13. Oktadeca-9,12-diensäure	20:2 [11, 14]	25%
14. Eicosa-5,8,11-triensäure	22:3 [7, 10, 13]	15%
15. Eicosa-8,11,14-triensäure	22:3 [10, 13, 16]	15%
	22:4 [7, 10, 13, 16]	
16. Eicosa-5,8,11,14-tetraensäure	22:4 [7, 10, 13, 16]	42%
17. Oktadeca-6,9,12,15-tetraensäure	20:4 [8, 11, 14, 17]	65%
	20:5 [5, 8, 11, 14, 17]	

gungen werden gesättigte Fettsäuren mit 14, 16 und 18 C-Atomen verlängert, wobei die Ausbeute mit wachsender Kettenlänge abfällt ($14:0 > 16:0 > 18:0$). Das gleiche gilt für die Öl- und Eicosensäure ($18:1 > 20:1$). Bei identischem „Carboxyl-Ende“ [= CH(CH₂)_n-CO₂CoA] ist die Kettenverlängerung unabhängig von der Zahl der Doppelbindungen und der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Polyensäure-Typ, d. h. unabhängig von der Struktur des Methyl-Endes. $18:2$ [6, 9], $18:3$ [6, 9, 12], $18:4$ [6, 9, 12, 15] und iso $18:3$ [6, 9, 12] (terminale Isopropyl-Gruppe) werden in fast gleicher Ausbeute kettenverlängert. Das Opti-

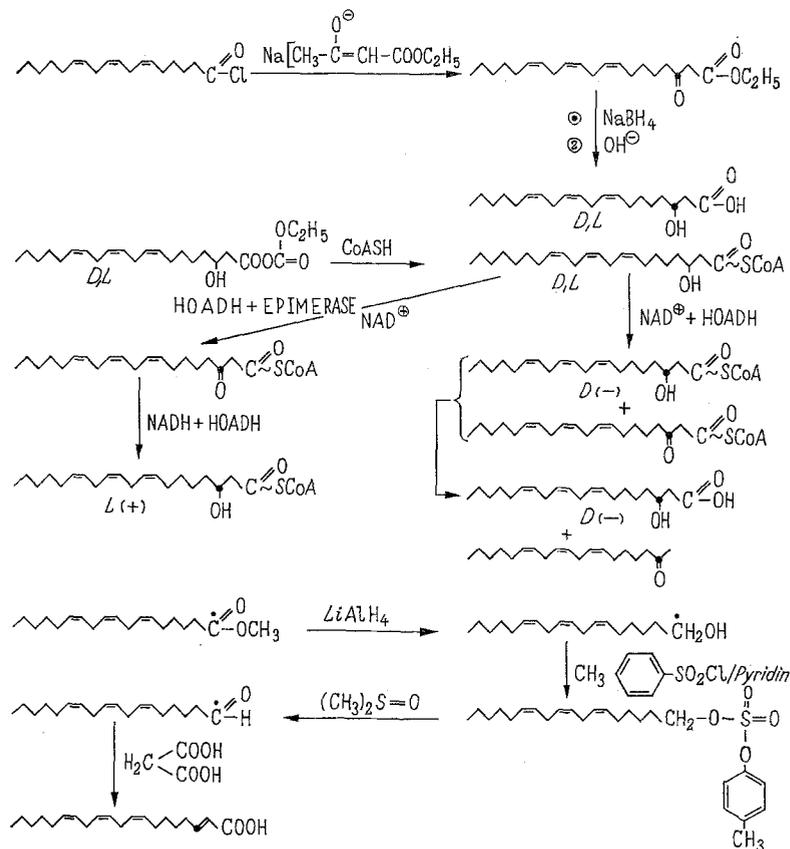


Fig. 4. Synthesen von Intermediärprodukten der Kettenverlängerungsreaktion [25]

mum der Länge des Carboxyl-Endes liegt bei $n = 4$ bis 5. Auch Modellsubstrate wie 16:2 [7, 10], 16:3 [4, 7, 10] werden in Gegenwart von einem oder zwei Molen Malonyl-CoA zu Linol- (18:2 [9, 12]) γ -Linolen- (18:3 [6, 9, 12]) bzw. Homo- γ -Linolensäure (20:3 [8, 11, 14]) in hoher Ausbeute verlängert (Fig. 5). Damit ist erwiesen, daß die tierische Zelle zwar die Kohlenstoffkette, nicht jedoch das Doppelbindungssystem der für sie essentiellen Fettsäuren aufbauen kann. Wie im nächsten Abschnitt

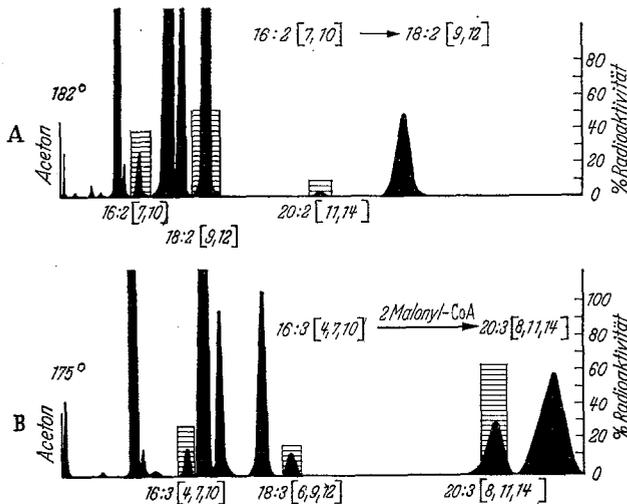


Fig. 5. Radiogaschromatographische Analyse des Fettsäuremethyl-ester-Gemisches nach Inkubation, A mit Hexadeca-7,10-diensäure, B mit Hexadeca-4,7,10-triensäure

gezeigt wird, besitzt die tierische Zelle keine Enzymaktivität für die Einführung einer olefinischen Bindung zwischen terminaler CH_3 -Gruppe und Kohlenstoffatom 9 (von der Carboxylgruppe aus gezählt). Das haben auch KLENK und IXFELD [29] aus in vivo-Versuchen abgeleitet.

II₂. Die Olefinierungsreaktion

Als zweite Teilreaktion untersuchten wir die stellungs- und stereospezifische Einführung cis-olefinischer Bindungen.

BLOOMFIELD und BLOCH [30] 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 stellungspezifisch stets zwischen C_9 — C_{10} , von der Thioester-Gruppe gerechnet, ein [31].

Bei der Olefinierung der Polyenfettsäuren [4] dagegen bestimmen die schon im Molekül vorliegenden Doppelbindungen die Stellung der neu einzuführenden Doppelbindungen. In der tierischen Zelle werden die neuen Doppelbindungen stets in das Carboxyl-Ende so eingeführt, daß sie durch eine Methylene-Gruppe von der vorhandenen Doppelbindung isoliert sind. Die unterschiedliche Stellungspezifität der „Desaturase“ und unseres olefinierenden Enzyms spricht für zwei verschiedene Enzymsysteme, welche die Reaktion möglicherweise nach einem gleichen oder doch ähnlichen Mechanismus katalysieren.

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

1. eine Dehydrogenase-Reaktion,
2. eine Oxygenase-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 (Carbonyl-, Thioestergruppen, Doppelbindungen) führen. Bei den Polyenfettsäuren dagegen wird die neu einzuführende Doppelbindung homo-allylständig zur schon vorhandenen Doppelbindung eingeführt.

Bei einer Oxygenase-Reaktion wird der aktivierte Sauerstoff unter Mitbeteiligung von Elektronendonatoren, meist reduzierten Pyridinnucleotiden, in das Molekül in Form einer Hydroxyl-Gruppe eingeführt [32]. 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 Elektronendonator benötigen, hat MASON [33] den Begriff „mixed function oxidases“ geprägt.

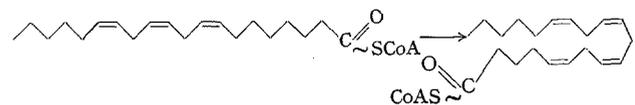
Bei einer Oxydase-Reaktion dient der aktivierte Sauerstoff selbst als unmittelbarer Elektronenakzeptor. Der Wasserstoff wird stellungspezifisch vom Molekül entfernt, ohne daß Intermediärprodukte faßbar sind [32].

Unsere Kenntnisse über den Elektronentransport in der Membran des endoplasmatischen Retikulums sind noch unvollständig. Die von MASON und Mitarb. [34] und von OMURA et al. [35] schematisch skizzierten Elektronentransportketten erfassen nicht alle inzwischen aus der mikrosomalen Fraktion isolierten Redoxsysteme. So ist die von SARO et al. [36, 37] beschriebene NADPH-Oxydase, die Naphthochinon benötigt, nicht eingeordnet worden; über die Bedeutung der in Mikrosomen vorkommenden Ubichinone [38] 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.

Wir haben versucht, mit Hilfe von *hemmenden Substanzen* und *Modellverbindungen* einen Einblick in den Mechanismus der Olefinierungsreaktionen bei der Biosynthese der Polyenfettsäuren zu gewinnen [10b, 11]. Die Polyenfettsäuren liegen als β -ständige Acylkomponenten in den Glycerophosphatiden der tierischen Zellmembranen vor [39]. Wir untersuchten daher weiter, ob die Olefinierungsreaktion an den freien wasserlöslichen Acyl-CoA-Estern stattfindet oder ob die Polyenfettsäure bei dieser Reaktion als β -Acylkomponente des Phospholipid-Moleküls strukturgebunden ist.

Enzymatische Untersuchungen mit Eicosa-8,11,14-triensäure

Die Olefinierungsreaktion studierten wir an dem letzten Schritt in der Biosynthese der Arachidonsäure, der Umwandlung der Eicosa-8,11,14-triensäure (20:3 [8, 11, 14] Homo- γ -Linolensäure) in Eicosa-5,8,11,14-tetraensäure (20:4 [5, 8, 11, 14], Arachidonsäure)



Dazu verwendeten wir ($1\text{-}^{14}\text{C}$) Eicosa-8,11,14-triensäure [18]. Die einzelnen Zellfraktionen von Rattenleber wurden nach SIEKEVITZ [40] isoliert. 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 Homo- γ -Linolensäure und die verschiedenen Coenzyme dem Reaktionsansatz zugegeben wurden. Nach der Inkubation wurden die Fettsäuren isoliert. Die Umwandlung der eingesetzten Homo- γ -Linolensäure in Arachidonsäure wurde radiogaschromatographisch entweder durch Analyse des Fettsäuremethyl-ester-Gemisches oder der Dicarbonsäure-dimethylester 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 beschrieben wurde, bei der üblichen Zellfraktionierung der Rattenleber in den Mikrosomen lokalisiert. Mitochondrien und 105 000 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} molar sank die Ausbeute der Reaktion ($0,5 \cdot 10^{-4}$ M 18 %; $1 \cdot 10^{-4}$ M 16 %; $2,5 \cdot 10^{-4}$ M 11 %; $5 \cdot 10^{-4}$ M 8 %).

20 bis 30 % der Homo- γ -Linolensäure 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 der Tabelle 2 sind jeweils auf diese Standardinkubationen (= 100 %) bezogen.

Tabelle 2. Inkubationsversuche mit Cofaktoren und Hemmsubstanzen der Olefinierungsreaktion

Zusätze	Konz. (M/l)	rel. Ausbeute
FAD	10^{-5}	89 %
Atebrin	10^{-4}	44 %
Vitamin K ₃	10^{-4}	100 %
Ubichinon (0)	10^{-4}	100 %
Methylenblau	10^{-5}	44 %
Dichlorphenolindophenol	10^{-5}	73 %
Tetrahydrofolsäure	$5 \cdot 10^{-4}$	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-Chlormercuribenzoat	10^{-3}	14 %
Katalase	0,8 10^4 IA/Ansatz	66 %
Peroxydase	200 γ /Ansatz	25 %

Versuche in vitro mit Rattenlebermikrosomen zur Aktivierung und Hemmung der Olefinierungsreaktion (Umwandlung von Eicosa-8,11,14-triensäure in Eicosa-5,8,11,14-tetraensäure). Jeder Inkubationsansatz enthielt außer den angegebenen Zusätzen in einem Gesamtvolumen von 2 ml: 0,2 μ Mol Ammoniumsulfat der Eicosa-8,11,14-triensäure; 10 μ M ATP; 10 μ M MgCl₂; 0,2 μ M CoA; 10 μ M Cystein; 10 mg Mikrosomenprotein; 200 μ M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 2 μ M NADP; 20 μ M Glucose-6-phosphat; 3 IE Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Wie weit NADPH die Olefinierungsreaktion beeinflusst, hängt von der Mikrosomenpräparation ab; 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 Reaktion unter anaeroben Bedingungen durch, so sinkt der Umsatz auf 25 % der Ausgangsaktivität des Enzyms ab. Elektronenakzeptoren können den Sauerstoff nicht ersetzen.

Die Ergebnisse unserer Versuche zur Aktivierung und Hemmung der Olefinierungsreaktion zeigt Tabelle 2. Nach diesen Ergebnissen läßt sich eine Dehydrogenierungsreaktion ausschließen: FAD, Vitamin K₃, Ubichinon (0) und künstliche Elektronenakzeptoren 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 [41, 42], ist zu gering, als daß man daraus auf die Beteiligung eines Flavoproteids schließen könnte.

Wir prüften ferner, ob die neu einzuführende Doppelbindung nach dem Mechanismus einer Dehydrogenierungsreaktion in Konjugation zur schon bestehenden Doppelbindung eingeführt und anschließend evtl. zur Homo-Allylstellung isomerisiert wird. Wie am System Penta-1,3-dien \rightarrow Penta-1,4-dien gezeigt wurde [43], besitzen konjugierte Diene (1,3-Systeme) gegenüber den durch eine -CH₂-Gruppe isolierten Dien (1,4-Systeme) eine höhere Stabilisierungsenergie. Durch Totalsynthese stellten wir ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-Octadeca-7c,9c,12c-trien- und Octadeca-7t, 9c, 12c-triensäure dar [11]. Mit diesen Substraten konnte der experimentelle Beweis gegen einen solchen Mechanismus erbracht werden.

Unsere Befunde machen es unwahrscheinlich, daß bei der Olefinierungsreaktion durch eine Oxygenase 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 105 000 g-Überstand, noch Dihydrobiopterin, noch Tetrahydrofolsäure, die bei der Hydroxylierung von aromatischen Aminosäuren beteiligt sind [32], stimulieren die Reaktion. Ascorbinsäure [44–46], Eisensulfat [47] (Schwermetall-Effekt?) oder Eisensulfat und Ascorbinsäure hemmen die Olefinierungsreaktion.

In den letzten Jahren haben mehrere Forscher [35] zeigen können, daß das Cytochrom P-450 (= Reticulochrom) bei vielen „mixed function oxidase“-Reaktionen den molekularen Sauerstoff aktiviert. CO hemmt diese Reaktionen. Die CO-Hemmung ließ sich durch Licht aufheben. Das Maximum des photochemischen Wirkungsspektrums lag bei 450 m μ . Cytochrom P-450 konnten wir als Cofaktor ausschließen, da verschiedene CO/O₂-Gemische keinen Einfluß auf die Olefinierungsreaktion hatten. Über die Funktion von Cytochrom b₅ wissen wir nichts, da uns spezifische Inhibitoren fehlten.

Bemerkenswert ist die starke Hemmung der Olefinierungsreaktion durch o-Phenanthrolin, Äthylendiamintetraacetat und Cyanid, die Fe²⁺-Ionen komplexieren, und durch Peroxydase. Die starke Hemmung der Olefinierungsreaktion durch Chelat-Bildner mit Fe²⁺-Ionen weist auf eine mögliche Aktivierung des molekularen Sauerstoffs durch Fe²⁺-Ionen unter Bildung von Fe³⁺O₂⁻ (Perferryl-Ionen) hin [48], die die Elektronen des Substrats an der Enzymoberfläche direkt abstrahieren könnten. *Die Bildung eines ternären Komplexes Enzym-Fe³⁺O₂⁻-Polyenfettsäure-CoA-Ester könnte besonders durch die Metall- π -Komplex-Bindung des Fe³⁺ mit dem olefinischen System der Polyenfettsäure gefördert werden.*

Enzymatische Untersuchungen mit ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-Eicosa-8,11,14-triensäure als β -Acylkomponente des Lecithins

Lecithin mit (^3H) Palmitin- (30 %) und Stearinsäure (70 %) in α -Stellung und ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-Eicosa-8,11,14-triensäure in β -Stellung wurde synthetisch dargestellt: Sojalecithin wurde mit Lecithinase A hydrolysiert, das gereinigte Lysolecithin wurde in ^3H -Atmosphäre katalytisch hydriert. Der Cadmiumchlorid-Komplex des hydrierten Lysolecithins [49] wurde mit ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-Eicosa-8,11,14-trienoylchlorid in 30%iger Ausbeute acyliert [50]. Säulenchromatographie führte zu reinem

^3H — ^{14}C markiertem Lecithin mit einem $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -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 durchmischte. Parallele Ansätze enthielten markiertes Lecithin mit und ohne Zusatz eines NADPH-bildenden Systems. Nach der Inkubation wurde das extrahierte Lipoidgemisch an Kieselsäure getrennt [51]. Das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis im isolierten, dünnschichtchromatographisch reinen Lecithin betrug 9,3 und war praktisch identisch mit dem des inkubierten Lecithins. Spaltung des Lecithins mit Lecithinase A führte zur Freisetzung der β -ständigen Acylgruppe als freie Fettsäure, die durch Chromatographie an Kieselsäure vom Lysolecithin getrennt wurde. Radiogaschromatographie der Fettsäuremethylester und der Dicarbonsäure-dimethylester nach oxydativer Ozonolyse zeigte, daß eine Umwandlung der im Lecithin β -ständigen Eicosa-8,11,14-triensäure in Eicosa-5,8,11,14-tetraensäure nicht stattgefunden hatte. Bei einer Parallelinkubation mit dem Ammoniumsalz der 20:3 [8, 11, 14]-Säure als Substrat der Olefinierungsreaktion konnten wir mit der gleichen Mikrosomensuspension unter den oben beschriebenen Bedingungen eine Umwandlung von 14% in 20:4 [5, 8, 11, 14]-Säure ermitteln.

Die olefinischen Bindungen werden nur *homoallylständig* zu einer vorhandenen Doppelbindung in das Carboxyl-Ende des Polyensäuremoleküls eingeführt. Das Methyl-Ende und das Doppelbindungssystem bleiben völlig unangetastet. Die oft diskutierte *Biohydrogenierung* von cis-olefinischen Bindungen in der Alkankette entbehrt nach unseren Befunden jeglicher experimentellen Grundlage. Damit ist gleichzeitig auch der Übergang einer Fettsäure vom Öl-, Linol- oder Linolensäure-Typ in einen anderen Typ ausgeschlossen [4].

Das kettenverlängernde Enzymsystem und das olefinierende Enzym sind auf der ER-Membran angeordnet. Ferner sind hier die Transacylasen, die die gesättigten und ungesättigten Acyl-Reste auf das L-3-Glycerophosphat oder Lysolecithin übertragen, zu finden. Alles deutet darauf hin, daß die ER-Membran die Produktionsstätte ihrer eigenen Lipoidphase und jener der gesamten Zelle ist.

Die Funktion der Lipide innerhalb der strukturgebundenen Enzyme von Lipoproteinstruktur ist ungeklärt.

III. Untersuchungen in vitro zur β -Oxydation der ungesättigten Fettsäuren

Die in vivo-Untersuchungen von MEAD [52], BERNHARD [53], FREDRICKSON [54] und KLENK [55] über den Abbau der ungesättigten Fettsäuren, die auf der Bestimmung der Abbaugeschwindigkeit einiger ^{14}C -markierter Fettsäuren im Tierversuch durch Messung des expirierten, radioaktiven CO_2 beruhen, haben ergeben, daß ungesättigte Fettsäuren offenbar so rasch wie gesättigte Fettsäuren verbrannt werden. Um die mit dem Tierversuch verbundenen Variablen zu eliminieren, bestimmten wir die Verbrennungsgeschwindigkeit einer größeren Anzahl ^{14}C -markierter gesättigter, einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren

mit isolierten Rattenlebermitochondrien. Tabelle 3 macht deutlich, daß unabhängig von der Struktur und dem essentiellen Charakter der Fettsäuren alle langkettigen Fettsäuren größenordnungsmäßig im gleichen Maße abgebaut werden, eine Beobachtung, die schon BERNHARD [53] durch Verfütterung von Öl-, Linol- und γ -Linolensäure an fettfrei ernährte Ratten machte. Der von FRITZ [55] und BREMER [56] beschriebene stimulierende Effekt des Carnitins auf die β -Oxydation von Palmitinsäure in Mitochondrien ist auch für diese Polyenfettsäuren sehr deutlich (Tabelle 3).

Tabelle 3. Oxydation ungesättigter Fettsäuren

Säuretyp	eingesetzte ^{14}C -markierte Fettsäure	μMol Fettsäure oxydiert ohne Carnitin	mit Carnitin
Gesättigte Fettsäure	C_{16} (Palmitinsäure)	29	47
Ölsäure-Typ	18:1 [9] (Ölsäure)	15,3	49
	18:2 [6, 9]	40	52,5
	20:1 [11]	12,7	34
Linolsäure-Typ	18:2 [9, 12] (Linolsäure)	37	57
	18:3 [4, 7, 10]	24	36
	18:3 [6, 9, 12] (γ -Linolensäure)	37	58
	20:3 [8, 11, 14]	15	43
	20:4 [5, 8, 11, 14] (Arachidonsäure)	29	43
Linolensäure-Typ	18:3 [9, 12, 15] (α -Linolensäure)	59	95
	iso-18:3 [6, 9, 12]	31	80

Alle diese Untersuchungen gehen aber von der bisher unbewiesenen Voraussetzung aus, daß das in Freiheit gesetzte $^{14}\text{CO}_2$ ein Indikator für die vollständige Verbrennung der langkettigen Fettsäuren sei. Um das zu prüfen, synthetisierten wir doppelt markierte Stearin-, Linol- und Arachidonsäure, ^3H im Methyl-Ende und ^{14}C in der Carboxyl-Gruppe, mit einem bestimmten Verhältnis der Isotopen im Molekül. Die Säuren wurden an Ratten verfüttert. Nach 4 bis 7 Std, in denen etwa 25—30% der verabreichten Radioaktivität als expiriertes CO_2 aufgefangen wurde, isolierten wir die Leberlipide und aus diesen die entspr. Fettsäuren (präparative Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie) und bestimmten erneut das Isotopen-Verhältnis $^3\text{H}/^{14}\text{C}$. Wie aus Fig. 6 hervorgeht, besaßen die isolierte Linol- und Arachidonsäure innerhalb der Fehlergrenze das gleiche Isotopen-Verhältnis wie die Ausgangssäuren. Die Abweichungen der Stearinsäure sind auf eine de-novo-Synthese aus dem Acetat-Pool zurückzuführen.

Aus diesen Versuchen folgern wir: ein partieller Abbau und Wiederaufbau der ungesättigten Fettsäuren findet nicht statt. Ist die Fettsäure einmal am Multienzym der β -Oxydation, so kommt es zum vollständigen Abbau des Moleküls.

Die enzymatischen Reaktionen der β -Oxydation der gesättigten Fettsäuren wurden durch die Arbeiten LYNENS und seiner Mitarbeiter sowie GREENS und seiner Mitarbeiter aufgeklärt. Sie werden heute im β -Oxydationszyklus zusammengefaßt.

Die im tierischen Organismus vorkommenden Gesamtfettsäuren enthalten gesättigte und ungesättigte Fettsäuren zu etwa gleichen Teilen. Das gesättigte Carboxyl- und nach dem Abbau des allcis-Doppelbindungssystems das Methyl-Ende der ungesättigten

Verfütterte Fettsäure	spez. Aktivität ZpM/ μ Mol	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	Isolierte Fettsäuremethylester	spez. Aktivität ZpM/ μ Mol	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	nach Dau- benabbau $^3\text{H}\text{-R}\text{COOH}$ $\text{C}_6\text{H}_5\text{-}^{14}\text{COOH}$	$^3\text{H}\text{-DNP}\text{-}$ Aldehyd $^{14}\text{C}\text{-Dicar-}$ bonsäure
20:4 [5, 8, 11, 14] (Arachidonsäure)	^3H $3,20 \cdot 10^6$ ^{14}C $4,00 \cdot 10^5$	8	20:4 [5, 8, 11, 14] (Arachidonsäure)	^3H $2,45 \cdot 10^5$ ^{14}C $3,07 \cdot 10^4$	7,98	8,05	7,95
18:2 [9, 12] (Linolsäure)	^3H $2,10 \cdot 10^6$ ^{14}C $3,56 \cdot 10^5$	5,9	18:2 [9, 12] (Linolsäure)	^3H $8,75 \cdot 10^4$ ^{14}C $1,47 \cdot 10^4$	5,91	5,88	5,94
			20:4 [5, 8, 11, 14] (Arachidonsäure)	^3H $1,18 \cdot 10^4$ ^{14}C $2,00 \cdot 10^3$	5,92	—	5,96
C_{18} (Stearinsäure)	^3H $2,10 \cdot 10^6$ ^{14}C $3,56 \cdot 10^5$	5,9	C_{18} (Stearinsäure)	^3H $2,52 \cdot 10^5$ ^{14}C $4,45 \cdot 10^4$	5,66	5,78	—
			18:1 [9] (Ölsäure)	^3H $3,98 \cdot 10^4$ ^{14}C $7,05 \cdot 10^3$	5,65	—	—

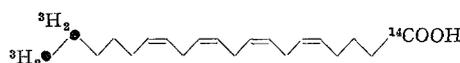


Fig. 6. Versuche in vivo mit doppelt (^3H , ^{14}C)-markierten Fettsäuren

Fettsäuren erfolgt zweifellos über den bekannten Zyklus. Welche Reaktionen laufen jedoch am Doppelbindungssystem dieser Verbindungen ab?

Nach dem Abbau des Carboxyl-Endes der Ölsäure tritt intermediär Dodecen-3 c-oyl-CoA, der Linolsäure das Dodeca-(3c, 6c)-dienoyl-CoA und weiter Octenoyl-2c-CoA auf (Fig. 7). Ganz allgemein betrachtet entstehen im Verlauf des Abbaus einer jeden Polyenfettsäure alternierend β , γ -cis und α , β -cis-Enoyl-CoA-Ester als Intermediärprodukte, gleichgültig ob 2, 3 oder bis zu 6 cisolefinische Doppelbindungen im Molekül vorhanden sind. Die Schlüsselprobleme der β -Oxydation der ungesättigten Fettsäuren münden somit in der Frage: Welche Reaktionen laufen an cis- β , γ - und cis- α , β -Enoyl-CoA-Estern ab?

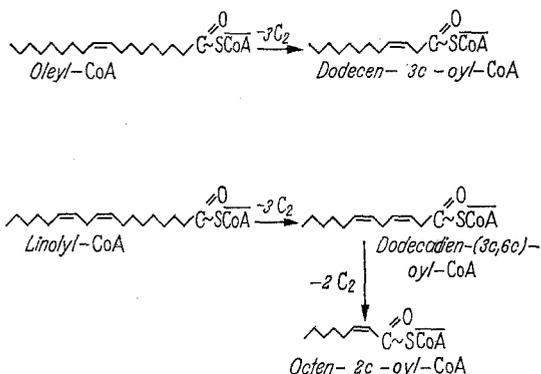


Fig. 7. cis- β , γ -(Δ^3) und cis- α , β -(Δ^2)-Enoyl-CoA-Intermediärprodukte im oxydativen Abbau der Öl- und Linolsäure

Enzymatische Reaktionen an β , γ -cis-Enoyl-Coenzym A-Estern

Nach STERN [57] und WAKIL [58] sollte die Crotonase, die jetzt als Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase bezeichnet wird, in der Lage sein, diese Zwischenprodukte in den bekannten Zyklus einmünden zu lassen. Die Crotonase sollte sowohl cis-trans- und Stellungsisomerisierungen und weiterhin Racemisierungen katalysieren. Die experimentellen Grundlagen für diese Aussagen waren sehr unzulänglich. Wir untersuchten zunächst die an cis- β , γ -ungesättigten CoA-Estern ablaufenden Reaktionen. Wir synthetisierten [8] die beiden genannten Intermediärprodukte sowie andere Modellverbindungen. Mit diesen cis- β , γ -ungesättigten Inter-

mediärprodukten des Öl- und Linolsäure-Abbaus prüften wir, ob die kristalline Crotonase diese Substrate zu hydratisieren vermag.

Aus Fig. 8 geht hervor, daß die beiden cis- β , γ -ungesättigten Substrate von der Crotonase nicht hydratisiert werden. Andererseits gelang die Hydratisierung mit Rattenleberhomogenat mit der gleichen Crotonase-Aktivität.

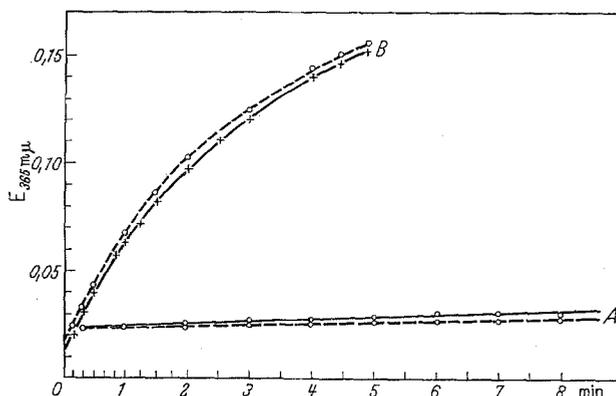


Fig. 8. Kinetik der Hydratisierung von Dodecen-3c-oyl-CoA (—) und Dodecadien-(3c, 6c)-oyl-CoA (---), A krist. Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonase), B Mitochondrienprotein [65–80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sätt.]

Diese Enzymfraktion ist allein in den Mitochondrien vorhanden. Wir nahmen zunächst eine spezifische Hydratase an. Es zeigte sich aber sehr bald im Verlauf der weiteren Enzymanreicherung und nach der vollständigen Entfernung der Crotonase-Aktivität, daß wir aus Rattenlebermitochondrien ein Enzym anreicherten, das eine *Stellungsisomerisierung* und gleichzeitig eine *geometrische Isomerisierung* katalysiert. In der Fig. 9 ist die Kinetik der Stellungsisomerisierung im optischen Test wiedergegeben.

Durch die in Konjugation zur Thioester-Gruppe auftretende Doppelbindung kommt es zur Ausbildung der spezifischen Absorption bei 263 $\mu\mu$ [59], die bei der anschließenden Hydratisierung durch Crotonase wieder verschwindet. Der spektroskopische Test erlaubt die Messung der Kinetik und erfährt die Stellungsisomerisierung, nicht jedoch die Form des geometrischen Isomeren. Diese sowie das Gleichgewicht der Reaktion

können sehr elegant auf den folgenden Wegen bestimmt werden: 1. cis-, trans- sowie die Stellungsisomeren eines Homologen lassen sich gaschromatographisch exakt trennen. Fig. 10 gibt die Trennung des Substrates und Produktes der Isomerisierungsreaktion nach der Veresterung wieder.

Δ^{3cis} -, Δ^{2cis} - und Δ^{2trans} -ungesättigte Methylester können an Kieselgel-Silbernitrat-Platten getrennt werden. So isolierten wir das Reaktionsprodukt einer enzymatischen Großinkubation und bestimmten die trans-Konfiguration der α , β -Dodecensäure durch IR-Spek-

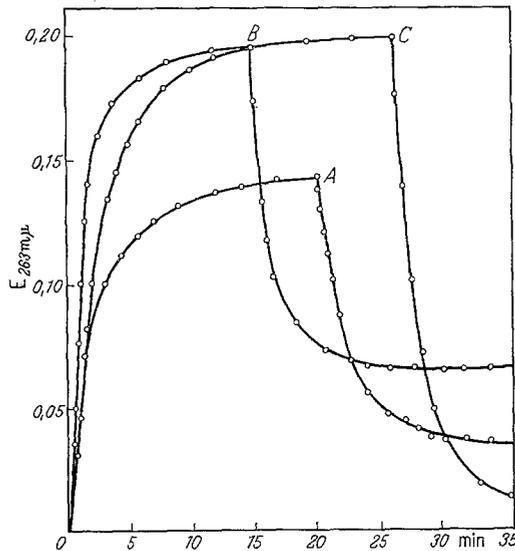


Fig. 9. Kinetik der Isomerisierung und der Hydratisierung von A Nonen-(3c)-oyl-CoA, B Dodecen-3c-oyl-CoA, C Dodecadien-(3c, 6c)-oyl-CoA. → Zugabe der Δ^3 -Enoyl-CoA-Hydratase

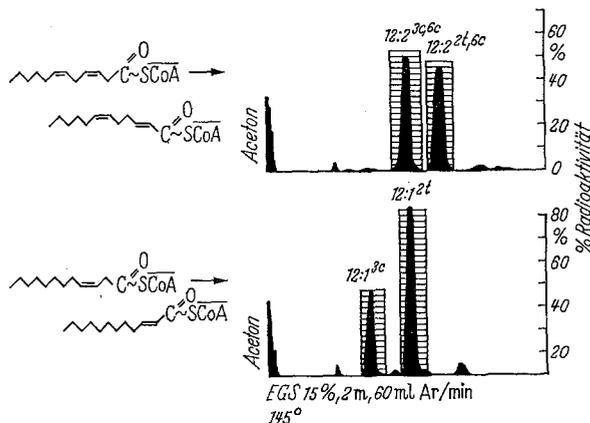


Fig. 10. Δ^{3cis} - Δ^{2trans} -Enoyl-CoA-Isomerase-Reaktion. Ordinate: Radioaktivität (%)

trospie. Wir bezeichneten die Isomerase wegen ihrer spezifischen Reaktion als Δ^{3cis} - Δ^{2trans} -Enoyl-CoA-Isomerase. Die Michaelis-Konstanten aller untersuchten Substrate wurde zu $5 \cdot 10^{-6} M$ bestimmt. Die Δ^{3trans} -Dodecenoyl-CoA-Verbindung besaß eine etwa 10mal größere Michaelis-Menten-Konstante. Die Isomerase weist keine Spezifität für die Kettenlänge, jedoch eine sehr ausgeprägte für die Δ^{3cis} -Konfiguration auf. Das pH-Optimum der Isomerase liegt bei pH 7-9. Das Enzym ist kein SH-Enzym. pCMB hemmt die Reaktion erst in $5 \cdot 10^{-4} M$ zu 20%, Jodacetamid in $10^{-3} M$ und N-Äthylmaleinimid in $10^{-3} M$ hingegen gar nicht. Von besonderem Reiz war der dieser Stellungs- und geometrischen Isomerisierung zugrunde liegende Me-

chanismus. Die von LYNEN [60] entdeckte Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase, die das Gleichgewicht zwischen Isopentenyl-Pyrophosphat und Dimethylallyl-Pyrophosphat einstellt, ist ein SH-Enzym. Nach LYNEN wäre eine Stellungsisomerisierung über die Addition einer Enzym-SH-Gruppe an die Doppelbindung unter Thioätherbindung zum Enzym und anschließender Eliminierung möglich. Da unser Enzym gegen SH-Reagenzien unempfindlich ist, schied ein solcher Mechanismus aus. Wir gingen zunächst der Frage nach, ob das an C_4 addierte Proton aus dem Wasser stammt oder ob eine direkte Wasserstoff-Übertragung von C_2 auf C_4 stattfindet. Wir ließen die Reaktion in T_2O ablaufen und bestimmten dann quantitativ die Aufnahme von Protonen ins Molekül. Die geringe in das Produkt inkorporierte Radioaktivität war identisch mit der im Blindversuch in nicht enzymatischer Reaktion eingebauten Radioaktivität und dürfte aus der Säure-Basenbehandlung bei der Aufarbeitung

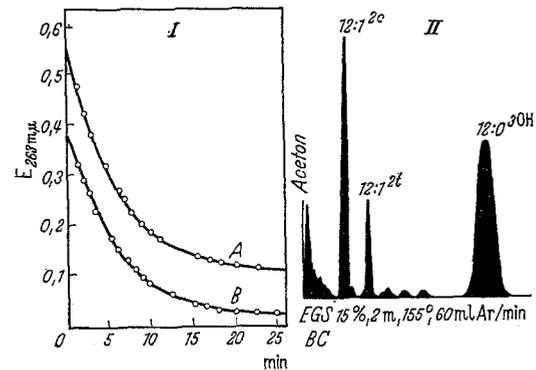
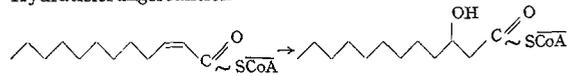


Fig. 11. Hydratisierung von α , β -Enoyl-CoA-Estern. I Kinetik der Hydratisierungsreaktion



A Dodecen-2c-oyl-CoA; B Dodecen-2t-oyl-CoA. — II Gaschromatographische Analyse des Inkubationsansatzes

der Inkubationsansätze zurückzuführen sein. Wir nehmen auf Grund dieser Versuche eine direkte Wasserstoff-Übertragung von C_2 auf C_4 an.

Zusammenfassend: cis- β , γ -Enoyl-CoA-Ester, die als Intermediärprodukte im oxydativen Abbau der ungesättigten Fettsäuren entstehen, werden durch gleichzeitige Stellungs- und geometrische Isomerisierung durch die Δ^{3cis} - Δ^{2trans} -Enoyl-CoA-Isomerase in den trans- α , β -Enoyl-CoA-Ester umgelagert.

Enzymatische Reaktionen an langkettigen α , β -cis-Enoyl-Coenzym A-Estern

Die zweite Frage ist die nach den an den cis- α , β -Enoyl-CoA-Estern ablaufenden Reaktionen. Nach unseren Untersuchungen hydratisiert die Crotonase langkettige cis- α , β -ungesättigte CoA-Ester, wie dies aus der Fig. 11 hervorgeht. Cis- α , β -Dodecenoyl-CoA ist das Substrat der hier wiedergegebenen Hydratisierungs-Reaktion.

Im oberen Abschnitt ist die Kinetik der Hydratisierung, im unteren die gaschromatographische Analyse nach Einstellung des Gleichgewichtes angegeben. Es stellte sich die Frage, welche optische Konfiguration das entstandene β -Hydroxy-lauroyl-CoA besitzt. Nachdem die chemische Trennung der racemischen 3-Hydroxylaurinsäure in die optischen Antipoden über

die diastereomeren α -Phenyläthylammonium-Salze gelang, konnten wir zeigen, daß die 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase keine Kettenlängen-Spezifität, wohl aber eine absolute Spezifität für den L(+)-Antipoden der Coenzym A-Ester auch der langkettigen 3-Hydroxysäuren aufweist. Mit Hilfe des D(-) 3-Hydroxy-lauroyl-CoA-Esters konnten wir in Rattenleber-Mitochondrien eine Epimerase nachweisen und dann etwa 50fach anreichern. Die Kinetik der Epimerase-Reaktion kann im optischen Test leicht verfolgt werden (Fig. 12).

In Gegenwart von NAD⁺ dehydrogeniert die HOADH das 3-Hydroxy-lauroyl-CoA nicht. Erst nach Zugabe der Epimerase läuft die Dehydrogenierung quantitativ ab, da die Epimerase laufend den L(+)-Antipoden für die Dehydrogenierungsreaktion liefert, der unter den Bedingungen des optischen Tests quantitativ aus dem Gleichgewicht entfernt wird.

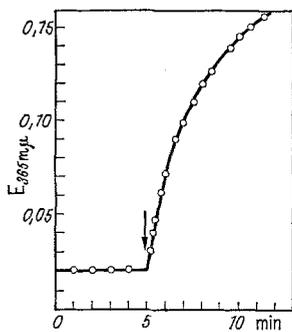


Fig. 12. Epimerisierung und Dehydrogenierung des D(-)-3-Hydroxy-lauroyl-CoA. [D(-)- β -Hydroxy-lauroyl-CoA + NAD⁺ + β -Hydroxyacyl-Dehydrogenase.] \downarrow D(-)- β -Hydroxyacyl-CoA-Epimerase

Produktisolierung nach einer präparativen Inkubation und die Bestimmung der optischen Drehung ergab, daß die Epimerase die D(-)-Form vollständig racemisiert. Diese Epimeraseaktivität ist nicht der Crotonase zuzuschreiben.

Die chemische Synthese der cis- α,β -Enoyl-CoA-Thioester über die gemischten Anhydride führt stets zur teilweisen cis-trans-Isomerisierung, deren Ausmaß nach der Hydrolyse des CoA-Esters durch quantitative Gaschromatographie ermittelt werden kann. Hydratisiert man, wie in Fig. 13 gezeigt ist, Dodecen-2c-oyl-CoA, das 30% trans-Isomeres enthält, mit der Crotonase, so werden beide, das trans- und das cis-Isomere, zur β -Hydroxy-lauroyl-CoA hydratisiert. Schließt man an die Hydratisierung die Dehydrogenierung mit HOADH und NAD⁺ an, so beobachtet man nur eine Bildung von NADH, die quantitativ dem trans-Anteil im Substrat entspricht. Erst die Zugabe der Epimerase führt zur vollständigen Dehydrogenierung des Substrates. Diese Reaktion wurde mit Substraten verschiedener Kettenlänge ausgeführt. Die Epimerase weist keine Kettenlängenspezifität auf. So wie die $\Delta^{cis}\text{-}\Delta^{trans}\text{-Enoyl-CoA-Isomerase}$ ist auch die D(-) β -Hydroxyacyl-CoA-Epimerase in den Mitochondrien lokalisiert.

Somit ergibt sich: cis- α,β -Enoyl-CoA-Verbindungen, die zweite Gruppe von Intermediärprodukten im biologischen Abbau hochungesättigter Fettsäuren, werden an der Crotonase zum D(-)-Antipoden der 3-Hydroxyacyl-CoA-Verbindung hydratisiert und anschließend zum L(+)-Antipoden an der D(-)-3-Hydroxyacyl-CoA-Epimerase epimerisiert. Der L(+)-Antipode ist

wieder ein Produkt, über das der Anschluß an das Enzymsystem des schon bekannten β -Oxydationszyklus gewonnen wird.

Beide Enzyme sind in den Mitochondrien der Leber sowie in den Mitochondrien der in Tabelle 4 aufgeführten Organe nachgewiesen worden. Das Vorkommen der beiden Enzyme ist nicht nur auf die tierische Zelle beschränkt, sondern konnte auch in niedrigeren

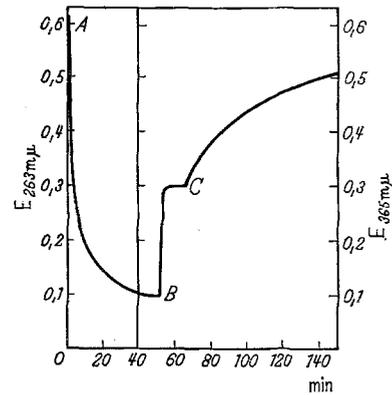


Fig. 13. Hydratisierung und Epimerisierung von Dodecen-2c-oyl-CoA. A \rightarrow Zugabe von Δ^2 -Enoyl-CoA-Hydratase, B \rightarrow Zugabe von 3-Hydroxy-acyl-CoA-Dehydrogenase, C \rightarrow Zugabe von 3-Hydroxyacyl-CoA-3-Epimerase

Organismen wie *Phycomyces Blakesleeanus* und *Neurospora crassa* nachgewiesen werden. Dies weist auf die Allgemeingültigkeit der oben beschriebenen Mechanismen beim Abbau des Doppelbindungssystems der ungesättigten Fettsäuren hin.

Tabelle 4. Verteilung der $\Delta^{cis}\text{-}\Delta^{trans}\text{-Enoyl-CoA-Isomerase}$ und der 3-Hydroxy-acyl-CoA-Epimerase in den Organen der Ratte. Spez. Aktivität in nMol. min⁻¹. mg⁻¹

Organ	Leber	Niere	Herzmuskel	Gehirn
spez. { Isomerase	260	64	52	4
Akt. { Epimerase	146	23	64	2

Die hier geschilderten Reaktionen und Enzyme, die im Verlauf der β -Oxydation der großen Gruppe der ungesättigten Fettsäuren für den Abbau der Doppelbindungssysteme eingeschaltet sind, machen eine

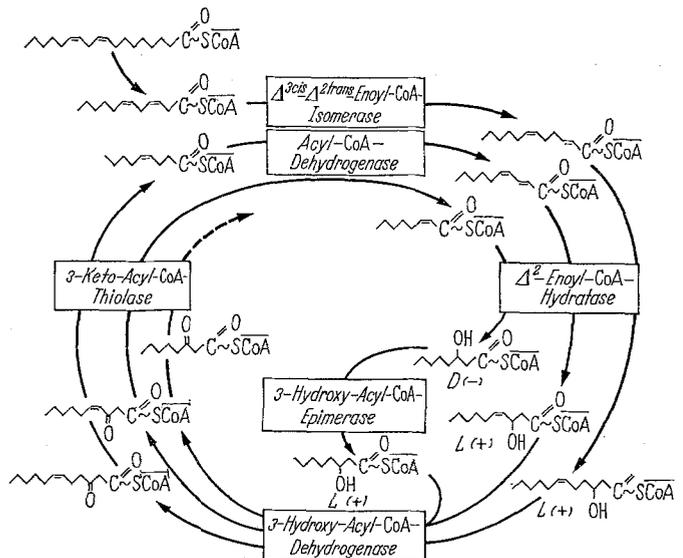


Fig. 14. β -Oxydation von allcis-Doppelbindungssystemen in ungesättigten Fettsäuren

Erweiterung des bisher bekannten und auf die gesättigten Fettsäuren beschränkten β -Oxydationszyklus erforderlich. Fig. 14 faßt die Reaktion eines solchen erweiterten Reaktionszyklus am Beispiel des Abbaus der Linolsäure zusammen.

Ich möchte meinen besonderen Dank meinen Mitarbeitern Dr. DITZER, Dr. CAESAR und Dr. SCHIEFER für ihre begeisterte Mitarbeit bei der Bearbeitung der geschilderten Problemkreise aussprechen. — Die Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und das Bundesministerium für wissenschaftliche Forschung großzügig unterstützt.

[1] ROBERTSON, J. D.: Progr. Biophys. and Biophys. Chem. 10, 343 (1960). — [2] DANIELLI, J. F., in: Surface Phenomena in Chemistry and Biology, S. 246. London: Pergamon Press 1958. — [3] SALEM, L.: Can. J. Biochem. and Physiol. 40, 1237 (1962). — [4] STOFFEL, W.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 6, 270 (1961). — [5] STOFFEL, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 333, 71 (1963). — [6] STOFFEL, W., u. K. L. ACH: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 337, 123 (1964). — [7] STOFFEL, W., R. DITZER u. H. CAESAR: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 339, 167 (1964). — [8] STOFFEL, W., H. CAESAR u. R. DITZER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 339, 182 (1964). — [9] STOFFEL, W., u. H. CAESAR: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 341, 76 (1965). — [10] STOFFEL, W., u. H. G. SCHIEFER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. (a) 341, 84 (1965); (b) 345, 41 (1966). — [11] STOFFEL, W., H. G. SCHIEFER u. R. DITZER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 52 (1966). — [12] KLENK, E.: Experimentia 17, 199 (1961). — [13] KLENK, E.: (a) Naturwissenschaften 41, 68 (1954); — (b) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 302, 268 (1955). — [14] MEAD, J. F., G. STEINBERG u. D. R. HOWTON: J. Biol. Chem. 205, 683 (1953). — [15] STEINBERG, G., W. H. SLATON jr., D. R. HOWTON u. J. F. MEAD: J. Biol. Chem. (a) 220, 257 (1956); (b) 224, 841 (1957). — [16] MEAD, J. F.: J. Biol. Chem. 227, 1025 (1957). — [17] MEAD, J. F., u. D. R. HOWTON: J. Biol. Chem. 229, 575 (1957). — [18] STOFFEL, W.: Liebigs Ann. Chem. 673, 26 (1964). — [19] CRAIG, L. C., u. E. H. AHRENS, jr.: J. Biol. Chem. 195, 299 (1952). — [20] LYNEN, F.: Vortrag a. d. Gemeins. Tagg d. Dtsch. Ges. f. Physiol. Chem. u. d. Österr. Biochem. Ges., Wien 1962. — [21] ALBERTS, A. W., P. W. MAJERUS, B. TALAMO u. P. R. VAGELOS: Biochemistry 3, 1563 (1964). — [22] WAKIL, S. J.: J. Lipid Res. 2, 1 (1961). — [23] BERGMAYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 551. Weinheim (Bergstr.): Verlag Chemie 1962. — [24] NUGTEREN, D. H.: (a) Biochem. J. 89, 23 P (1963); — (b) Biochim. et Biophys. Acta 106, 280 (1965). — [25] STOFFEL, W., u.

H. D. PRUSS: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. (im Druck). — [26] SEUBERT, W., G. GREULL u. F. LYNEN: Angew. Chem. 69, 359 (1957). — [27] LACHANCE, J. P., G. POPJÁK u. A. DE WAARD: Biochem. J. 68, 7 P (1958). — [28] MATTHES, K. J., S. ABRAHAM u. I. L. CHAIKOFF: Biochim. et Biophys. Acta 37, 180 (1960). — [29] IXFELD, H.: Diss. Köln 1963. — [30] BLOOMFIELD, D. K., u. K. BLOCH: J. Biol. Chem. 235, 337 (1960). — [31] SCHROEFFER, G. J., u. K. BLOCH: J. Biol. Chem. 240, 54 (1965). — [32] HAYAISHI, O.: Oxygenases. New York u. London: Academic Press 1962. — [33] MASON, H. S.: Advances in Enzymol. 19, 79 (1957). — [34] MASON, H. S., J. C. NORTH u. M. VANNESTE: Federation Proc. 24, No. 5, 1172 (1965). — [35] OMURA, T., R. SATO, D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL u. R. H. ESTABROOK: Federation Proc. 24, No. 5, 1181 (1965). — [36] SATO, R., H. NISHIBAYASHI u. T. OMURA: Biochim. et Biophys. Acta 63, 550 (1962). — [37] NISHIBAYASHI, H., T. OMURA u. R. SATO: Biochim. et Biophys. Acta 67, 520 (1963). — [38] LEONHÄUSER, S., K. LEYBOLD, K. KRISCH, H. J. STAUDINGER, P. H. GALE, A. C. PAGE, jr. u. K. FOLKERS: Arch. Biochem. Biophys. 96, 580 (1962). — [39] HANAHAN, D. J., H. BROCKERHOFF u. E. J. BARRON: J. Biol. Chem. 235, 1917 (1960). — [40] SIEKEVITZ, P.: Methods in Enzymol. 5, 61. — [41] HAAS, E.: J. Biol. Chem. 155, 321 (1944). — [42] HELLERMANN, L., A. LINDSAY u. M. R. BOVARNICK: J. Biol. Chem. 163, 553 (1946). — [43] HINE, J.: Physical Organic Chemistry, S. 23. New York: McGraw Hill Book Co. 1956. — [44] GOULD, B. S., u. J. F. WOESSNER: J. Biol. Chem. 226, 289 (1957). — [45] KRISCH, K., u. H. J. STAUDINGER: Biochem. Z. 334, 312 (1961). — [46] KERSTEN, H., W. KERSTEN u. H. J. STAUDINGER: Biochem. Z. 327, 284 (1955). — [47] FULCO, A. J., u. K. BLOCH: J. Biol. Chem. 239, 993 (1964). — [48] INGRAHAM, L. L.: Biochemical Mechanismus. New York: John Wiley & Sons 1961. — [49] BAER, E., u. M. KATES: J. Am. Chem. Soc. 70, 1394 (1948). — [50] BAER, E., u. D. BUCHNEA: Can. J. Biochem. and Physiol. 37, 953 (1959). — [51] HANAHAN, D. J., J. C. DITTMER u. E. WARASHINA: J. Biol. Chem. 228, 685 (1957). — [52] MEAD, J. F., W. H. SLATON u. A. B. DECKER: J. Biol. Chem. 218, 401 (1956). — [53] BERNHARD, K., M. ROTHLIN, J. P. VUILLEUMIER u. R. WYSS: Helv. Chim. Acta 41, 1017 (1958). — [54] KLENK, E.: 6. Internat. Kongr. für Biochemie 1964, New York. — [55] FRITZ, I. B.: J. Lipid Res. 4, 279 (1963). — [56] BREMER, J.: J. Biol. Chem. 237, 2228, 3628 (1962). — [57] STERN, J. R., u. A. DEL CAMPILLO: J. Biol. Chem. 218, 985 (1956). — [58] WAKIL, S. J., u. H. R. MAHLER: J. Biol. Chem. 207, 125 (1954). — [59] SEUBERT, W., u. F. LYNEN: J. Am. Chem. Soc. 75, 2787 (1955). — [60] LYNEN, F., B. W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNING u. E. M. MÖSLEIN: Angew. Chem. 71, 657 (1959).

Eingegangen am 18. April 1966

Tätigkeitsbericht der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V.

für die Zeit vom 1. 1. 1964 bis 31. 12. 1965

Anläßlich der Festversammlung der Max-Planck-Gesellschaft in Frankfurt/Main gab der Präsident, Professor Dr. ADOLF BUTENANDT, München, am 23. Juni 1966 unter anderem eine Übersicht über die Bemühungen zur Neugründung und Weiterführung der Institute der Gesellschaft. Er führte aus:

„Im Berichtsjahr (1965) ist es uns endlich gelungen, den seit vielen Jahren verfolgten Plan zu realisieren, zwei neue geisteswissenschaftliche Institute in unsere Gesellschaft aufzunehmen: In Freiburg/Br. gründeten wir das Max-Planck-Institut für ausländisches und internationales Strafrecht unter der Leitung von Professor Dr. HANS-HEINRICH JESCHECK und in München das Max-Planck-Institut für ausländisches und

internationales Patent-, Urheber- und Wettbewerbsrecht unter der Leitung von Professor Dr. EUGEN ULMER.

Schon in den Vorjahren, auf den Jahresversammlungen in Hamburg 1964 und in Mannheim 1965, habe ich die Schwierigkeiten angedeutet, die bei der Gründung dieser Institute auftraten. Zu unserer großen Überraschung wurde bei der Verhandlung über die Finanzierung der Institute von den Vertretern der Länder die Frage aufgeworfen, ob die Max-Planck-Gesellschaft überhaupt Träger neuer geisteswissenschaftlicher Institute sein solle. Nachdem im Berichtsjahr der Wissenschaftsrat in seinen Empfehlungen festgestellt hat, daß es gerade der Zwecksetzung