Sonderdruck aus
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin 30

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 348, S. 205–226, Februar 1967

Zur Polyenfettsäure- und Phospholipoidsynthese in der Gewebekultur von HeLa-Zellen*

Von WILHELM STOFFEL und ANDREAS SCHEID

*Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln***

(Der Schriftleitung zugegangen am 12. November 1966)

Zusammenfassung: Die Biosynthese von Polyenfettsäuren und deren Einbau in die Phospholipoide Lecithin und Colamin-kephalin von HeLa-Zellen wurden untersucht. Radioaktiv markierte Polyensäuren vom Öl-, Linol- und Linolensäuretyp wurden nach den aus früheren *In-vitro*-Untersuchungen abgeleiteten Prinzipien verlängert bzw. olefiniert und dann in die Lecithine und Colamin-kephaline eingebaut. Nach der Trennung dieser beiden Lipoidklassen wurde die Verteilung der markierten Säuren auf die 1- und 2-Stellung beider Phospholipoide bestimmt. Die asymmetrische Verteilung der Polyenfettsäuren auf die 1- und 2-Stellung des Glycerinphosphats wird um so deutlicher, je länger die Kohlenstoffkette und je größer die Anzahl der Doppelbindungen der Acylreste ist. Lecithine und Colamin-kephaline weisen eine sehr unterschiedliche Markierung durch die Polyensäuren auf.

Summary: The technique of tissue culture has been used in order to study the biosynthetic transformations (chain elongation and olefination) and the incorporation into phosphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine of the following polyenoic fatty acids:

$\Delta^{3,6}$-C_{12}; $\Delta^{5,8}$-C_{14}; $\Delta^{7,10}$-C_{16}; $\Delta^{4,7,10}$-C_{16}; $\Delta^{9,12}$-C_{18}; $\Delta^{9,12,15}$-C_{18}; $\Delta^{6,9,12}$-iso-C_{18}; $\Delta^{6,9}$-C_{18}; $\Delta^{5,8,11,14}$-C_{20}.

These polyenoic fatty acids were readily absorbed by HeLa cells and incorporated into phosphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine, unchanged or/and after chain elongation and olefination.
The quantitative analysis of aliquots of the total mixture was achieved by two-dimensional thin-layer-chromatography. The total lipid extract of the cells was separated by silicic acid chromatography into the different glycerophosphatides. The fatty acyl residues of the 2-positions of phosphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine were isolated after hydrolysis with phospholipase A. The fatty acids of the 1-position were obtained after trans-esterification of the pure lyso-compounds as methylesters. Quantitative determination of the distribution of the radioactivity in the lipid fractions and the quantitative radio-gaschromatographic analysis of the esters of the respective positions permit the following conclusions:
HeLa cells although they are dedifferentiated cells, carry out the chain elongation and olefination reactions. The reactions correspond to those of our previous in vitro experiments, which have been performed by rat liver microsomal enzyme systems. A distinct chain length optimum of 18 C-atoms for dienoic acids of the linoleic acid series is apparent. Whereas $\Delta^{3,6}$-C_{12} is neither elongated nor hardly incorporated into phospholipids, $\Delta^{5,8}$-C_{14} and $\Delta^{7,10}$-C_{16} are readily elongated to linoleic acid and partly into the C_{20}-series, as is linoleic acid itself yielding arachidonic acid. α-Linolenic and arachidonic acids are incorporated, as such, into phospholipids. $\Delta^{4,7,10}$-C_{16} and $\Delta^{6,9,12}$-iso-C_{18} are elongated and olefinated to trienoic and tetraenoic acids of the C_{20}- and C_{22}-

* Verwendete Abkürzungen: Phospholipase A = Phosphatid-Acyl-Hydrolase (EC 3.1.1.4); Acyl-CoA- = Acyl-Coenzym-A-Thioester; NADPH = reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat. Die Strukturen der Fettsäuren sind auf folgende Weise festgelegt: z. B. $\Delta^{9,12}$-C_{18} = 18 C-Atome, 2 cis-Doppelbindungen in Stellung 9 und 12.

** Postanschrift: Priv.-Doz. Dr. W. STOFFEL, 5 Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Straße 52.

series. $\Delta^{6,9}$-C_{18}, a member of the oleic acid family is transformed to $\Delta^{8,11}$-C_{20} and $\Delta^{5,8,11}$-C_{20} although the medium contained linoleic acid. These studies confirm our observations derived from in vitro studies that the chain elongation reaction requires a carboxylic end ($=CH[CH_2]_nCOOH$) favourably with not more than 5 CH_2-groups. As a consequence the substrates of the olefination reaction are mostly the acids of the C_{20}-series. The methyl end of the acids does not influence the elongation and olefination reaction.

The fatty acids under study were incorporated into phosphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine *asymmetrically* distributed into the 1- and 2-position of the glycerol moiety. The analyses indicate, that in general C_{16}-acids are preferably acyl groups of phosphatidyl choline; the unsaturated C_{18}-acids, eicosa-8,11- and -11,14-dienoic and eicosa-5,8,11- and -8,11,14-trienoic acids are present in approximately the same amount in both glycerophosphatides which represent the two main lipid classes of HeLa cells. Arachidonic acid and the polyenoic acids with 22 C-atoms were mainly incorporated into phosphatidyl ethanolamine.

All the polyenoic acids investigated here acylate predominantly the 2-position but also to a small extend the 1-position. Particularly the C_{14}- and C_{16}- polyenoic acids and the C_{20} acids with only two double bonds are incorporated with less discrimination into both positions. The 2-position of phosphatidyl ethanolamine is predominantly labelled with arachidonic acid and C_{22}- polyenoic acids. From their distribution pattern in phosphatidylcholine and phosphatidyl ethanolamine polyenoic acids may be ordered in a series, which reflects the increase in the ratio of the incorporation of each of the acids in the 2- and 1-position:

$$\Delta^{8,11 \text{ and } 11,14}\text{-}C_{20} < \Delta^{5,8,11 \text{ and } 8,11,14}\text{-}C_{20} < \Delta^{9,12}\text{-}C_{18} < \Delta^{5,8,11,14}\text{-}C_{20}.$$

Die Technik der Zellkultur wurde bisher für die biochemische Untersuchung des Lipoidstoffwechsels kaum angewendet. Lediglich in Untersuchungen über den Stoffwechsel der freien Fettsäuren Palmitinsäure[1] und Linolsäure[2] fand die Zellkultur Anwendung.

Die *Zellkultur* nimmt eine Mittelstellung zwischen dem Ganztier-Versuch und dem In-vitro-Versuch ein. Sie ermöglicht es, die biosynthetischen Leistungen einer einzelnen Zellart zu studieren. Über das chemisch definierte Nährmedium können isotopenmarkierte Intermediärprodukte eingeschleust werden. Ihr Weg im Stoffwechsel kann dann verfolgt werden. Es entfallen die Resorptions- und Transportphänomene und die Verteilung über den gesamten Organismus im Ganztier-Versuch. Das *In-vitro-Experiment* ermöglicht den Einblick in den Mechanismus von Einzelreaktionen und oft auch von Reaktionssequenzen, jedoch vermag es nicht die Frage zu beantworten, welche biologische Bedeutung der entsprechenden Reaktion zukommt.

In dieser Arbeit soll über Untersuchungen zur Biosynthese von Polyenfettsäuren und Glycerinphosphatiden in der Zellkultur von HeLa-Zellen berichtet werden. Die Ergebnisse sind vor allem im Hinblick auf die in früheren Untersuchungen *in vitro* gemachten Beobachtungen von Bedeutung. KLENK[3] und MEAD[4] haben wesentliche Grundzüge der Biogenese der C_{20}- und C_{22}-Polyenfettsäuren vom Öl-, Linol- und Linolensäuretyp in Versuchen *in vivo* klargelegt. Die Säuren vom Ölsäuretyp werden von der Zelle *de novo* synthetisiert, während solche vom Linol- und Linolensäuretyp von der tierischen Zelle nur unter Nutzung der essentiellen Linol- und Linolensäure aufgebaut werden. In Versuchen *in vitro* gelang es dann, die Biosynthese dieser Polyensäuren in zwei Teilreaktionen (Kettenverlängerung und Olefinierung) durchzuführen. Dabei zeigte sich, daß die Strukturen der einzelnen ungesättigten Fettsäuren (Kettenlänge, Zahl der Doppelbindungen und Länge des Carboxylendes) einen bestimmenden Einfluß auf die beiden Teilreaktionen haben[5].

Die Beziehung zwischen Struktur und Affinität der Polyenacyl-CoA-Ester in der Transacylase-Reaktion, die zur Acylierung der Stellung 2 im 1-Acyl-L-glycerin-3-phosphat und 1-Acyl-L-gly-

---

[1] A. A. SPECTOR, D. STEINBERG u. A. TANAKA, J. biol. Chemistry **240**, 1032 [1965].

[2] D. F. HAGGERTY, L. E. GERSCHENSON, I. HARARY u. J. F. MEAD, Biochem. biophysic. Res. Commun. **21**, 568 [1965].

[3] E. KLENK, in Advances in Lipid Research, Vol. 3, S. 1, Academic Press, New York 1965.

[4] J. F. MEAD, in Lipide Metabolism, John Wiley & Sons, New York, 1960.

[5] W. STOFFEL, 13. Mosbacher Colloquium, 1965, Springer-Verlag, Heidelberg.

cerin-3-phosphorylcholin führt, wurden gleichfalls untersucht[6,7]. Diese beiden Reaktionen sollen zu der für die Phospholipoide charakteristischen asymmetrischen Fettsäureverteilung führen[6].

In den hier beschriebenen Experimenten wurden den HeLa-Zellen in den einzelnen Versuchen radioaktiv markierte Polyenfettsäuren mit dem Medium angeboten. Die Säuren gehörten dem Linolsäuretyp, $\Delta^{3.6}$-C_{12}, $\Delta^{5.8}$-C_{14}, $\Delta^{7.10}$-C_{16}, $\Delta^{9.12}$-C_{18}, $\Delta^{4.7.10}$-C_{16}, $\Delta^{5.8,11.14}$-C_{20} und dem Ölsäuretyp, $\Delta^{6.9}$-C_{18} an. Ferner wurde die α-Linolensäure $\Delta^{9.12.15}$-C_{18} und eine am Methylende verzweigte isomere γ-Linolensäure, die 16-Methyl-6.9.12-heptadecatriensäure ($\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}) verwendet. Mit Hilfe dieser Substrate sollte über die folgenden Fragen Aufschluß erhalten werden: Werden in den HeLa-Zellen die Reaktionswege der Kettenverlängerung und der Olefinierung nach den aus In-vitro-Versuchen abgeleiteten Prinzipien begangen und wird auch in diesem System die Bedeutung der Fettsäurestruktur für diese Reaktionen deutlich? Durch Auftrennung der Phospholipoide in Phosphatidyl-cholin (Lecithin) und -äthanolamin (Colamin-kephalin) und die Analyse der 1- und 2-ständigen Fettsäuren in diesen beiden Lipoidklassen sollte die Antwort auf die Fragen gefunden werden, ob die markierten Fettsäuren unterschiedlich in Phosphatidyl-cholin und -äthanolamin eingebaut werden, wie es aus den Fettsäureanalysen dieser beiden Glycerinphosphatide zu erwarten ist, und ob die asymmetrische Fettsäurebesetzung der 1- und 2-Stellung, die für Glycerinphosphatide verschiedener Herkunft beschrieben wurde[8,9], unter diesen Versuchsbedingungen ebenfalls beobachtet wird.

An die Inkubation der HeLa-Zellen mit den genannten Fettsäuren über eine Zeitspanne von 20 Stdn. schloß sich in jedem Fall ein Analysengang an, der in Abb. 1 skizziert ist. Aus der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie der Gesamtlipoide und der nachfolgenden Analyse der Phospholipoidflecken auf Phosphor und Radioaktivität erhielten wir die Werte der Gesamtmenge und der spezifischen Aktivität (Zpm/μMol P) von Phosphatidyl-äthanolamin, Phosphatidyl-cholin, Phosphatidyl-serin, Phosphatidyl-inosit und Sphingomyelin. Die präparative Säulenchromatographie der Gesamtlipoide lieferte ein dünnschichtchromatographisch sauberes Phosphatidyl-äthanolamin und eine Phosphatidyl-cholin-Fraktion, die stets noch mit kleineren Mengen Phosphatidyl-serin (Serin-kephalin) und Phosphatidyl-inosit verunreinigt war. Nach Phospholipase-A-Spaltung dieser beiden Fraktionen und präparativer Trennung der Spaltprodukte auf Kieselsäure wurden die spezifischen Aktivitäten von Lyso-Phosphatidyl-äthanolamin und Lyso-Phosphatidyl-cholin durch Analysen von Dünnschichtplatten bestimmt. Die Methylester der 1- und 2-ständigen Fettsäuren von Phosphatidyl-äthanolamin und -cholin wurden der radio-gaschromatographischen Analyse unterzogen. Dabei wurden gleichzeitig mit den Massen der in ihrer Struktur bekannten Fettsäuren deren Radioaktivitäten registriert. Die einer bestimmten Fettsäure zuzuordnende Radioaktivität wurde umgerechnet auf ihren prozentualen Anteil an der Gesamtaktivität, die während der Chromatographie gemessen wurde. Die Abb. 2a—d zeigen die vier Chromatogramme eines Inkubationsversuches. Aus diesen Radioaktivitäts-Verteilungen auf die Fettsäuren einmal der 1- und zum anderen der 2-Position eines Phospholipoids und den spezifischen Aktivitäten der 1-Stellung (= spezif. Aktivität des Lyso-Phospholipoids) und der 2-Stellung (= spezif. Aktivität des Phospholipoids nach Abzug der spezif. Aktivität des Lyso-Phospholipoids) wurde die Radioaktivitätsverteilung auf die Fettsäuren jeder der beiden Phospholipoid-Klassen ermittelt. Aus diesen Ergebnissen und aus dem Mengenverhältnis von Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidyl-cholin haben wir noch die Aktivitätsverteilung auf die Fettsäuren des größeren Teils der Gesamtphospholipoide, den diese beiden Klassen darstellen, bestimmt.

Analyse der Phospholipoide aus HeLa-Zellen

Die qualitative Analyse der Gesamtlipoide von HeLa-Zellen zeigt Komponenten, die sich in ihrem Verhalten in der Dünnschichtchromatographie nicht von denen anderer tierischer Organe unterscheiden. Der Anteil der Phospholipoide am Zelltrockengewicht betrug durchschnittlich 11 μMol auf 100 mg getrocknete Zellen, das sind 8—9 Gewichts-%. Die Verteilung der Phospholipoide auf die einzelnen Klassen weist eine große Ähnlichkeit

[6] W. E. M. Lands u. P. Hart, J. biol. Chemistry **240**, 1905 [1965].
[7] W. Stoffel, H. G. Schiefer u. G. D. Wolf, diese Z. **347**, 102 [1966].
[8] D. J. Hanahan, J. biol. Chemistry **211**, 313 [1954].
[9] D. N. Rhodes, Biochem. J. **68**, 380 [1958].

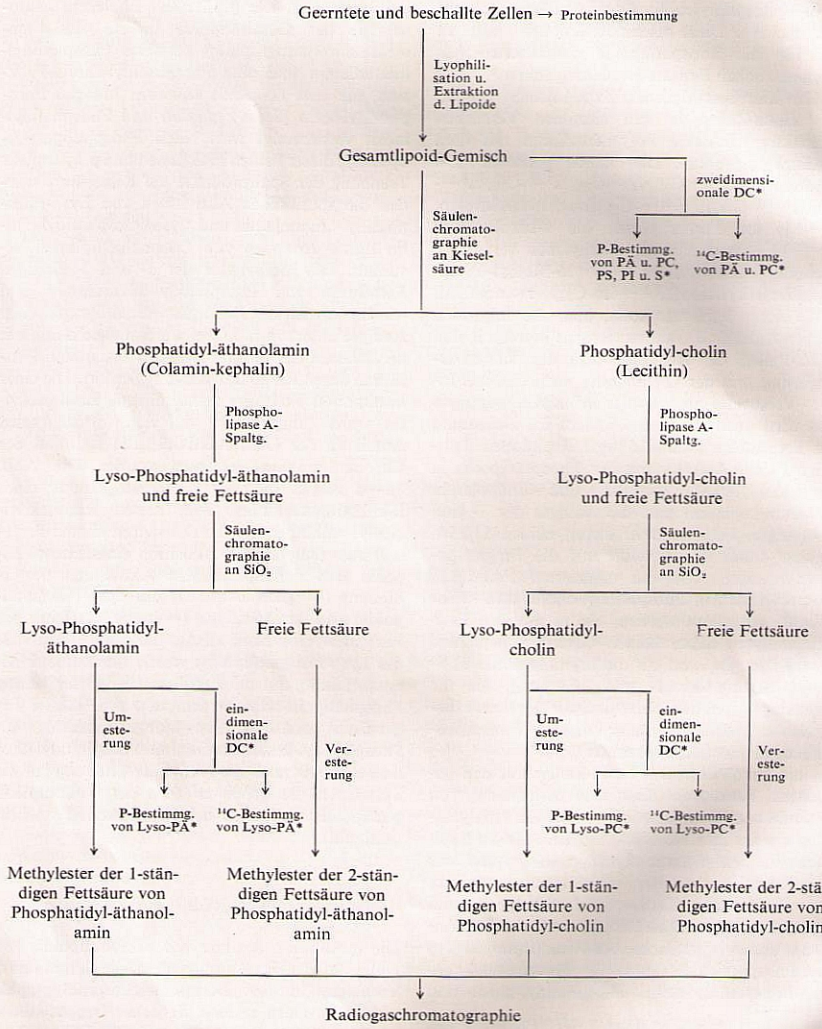

Abb. 1. Schematische Darstellung des Analysenganges.

* Abkürzungen: DC = Dünnschichtchromatographie; PÄ = Phosphatidyl-äthanolamin (Colamin-kephalin); PC = Phosphatidyl-cholin (Lecithin); PS = Phosphatidyl-serin (Serin-kephalin); PI = Phosphatidyl-inosit; S = Sphingomyelin.

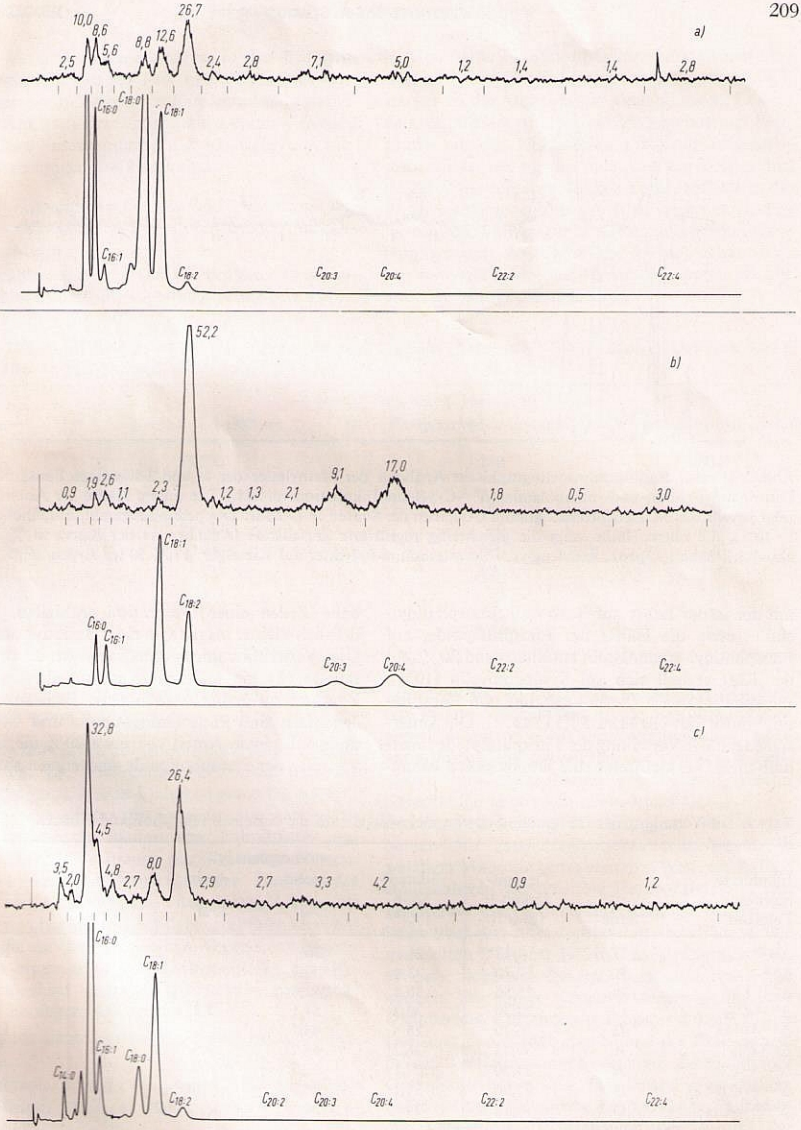

Abb. 2. a und b: Einbau in die 1-Stellung (a) bzw. 2-Stellung (b) des Phosphatidyl-äthanolamins
c und d: Einbau in die 1-Stellung (c) bzw. 2-Stellung (d) des Phosphatidyl-cholins. Abb. d) und Legende nächste Seite.

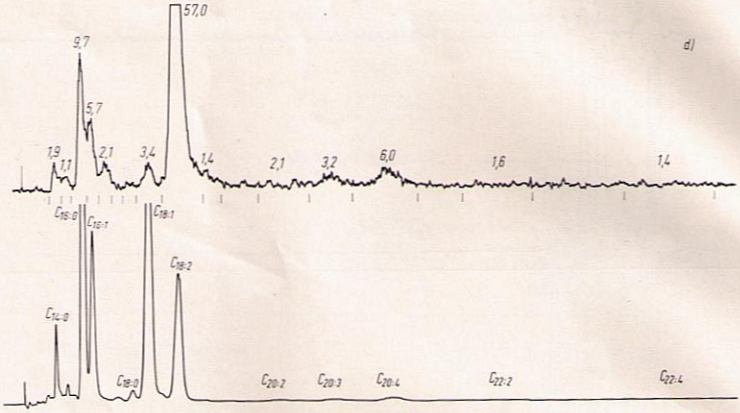

Abb. 2. (Forts.) Radiogaschromatographische Analysen der Methylester der 1- und 2-ständigen Fettsäuren von Phosphatidyl-cholin und -äthanolamin ($\Delta^{5.8}$-C_{14}-Säure-Inkubationsversuch). Die untere Hälfte der Abbildungen zeigt jeweils das Massenchromatogramm (Angaben der Säuren in C-Zahl: Doppelbindungszahl, Empfindlichkeit: $1 \cdot 10^{-7}$), die obere Hälfte zeigt die gleichzeitig registrierte Zerfallsrate (Angaben an der Kurve in % Radioaktivität). Säule: 15proz. Äthylenglykol-Bernsteinsäure-Polyester auf Kieselgur. 176°, 50 ml Argon/Min.

mit der in der Leber auf[10]. So stellt Phosphatidylcholin etwa die Hälfte der Phospholipoide, auf Phosphatidyl-äthanolamin entfallen rund 30% und der Rest verteilt sich auf Sphingomyelin (10%), Phosphatidyl-serin (Serin-kephalin) und Phosphatidyl-inosit (jeweils etwa 5%) (Tab. 1). Die Unterschiede in der Verteilung der Phospholipoide innerhalb einer Versuchsreihe, die jeweils gleich behandelte Zellen einer Generation enthielten, waren deutlich kleiner als die von einer Serie zur anderen. Die Verhältniszahlen unterliegen trotz der Bemühungen, die äußeren Wachstumsbedingungen konstant zu halten, erheblichen Schwankungen. Jedenfalls sind Phosphatidyl-cholin und -äthanolamin mit einem Anteil von etwa 80% die Hauptvertreter der Phospholipoide und eignen sich des-

Tab. 1. Die Verteilung der Phospholipoide von HeLa-Zellen auf die einzelnen Phospholipoid-Klassen.

Inkubierte markierte Fettsäure	Vers.-Serie	Gesamt-Lipoid-P [μMol]	Phosphatidyl-äthanolamin [%]*	Phosphatidyl-cholin [%]*	Phosphatidyl-serin [%]*	Phosphatidyl-inosit [%]*	Sphingomyelin [%]*
$\Delta^{3c.6c}$-C_{12}	D	4,42**	21	36	25		18
$\Delta^{5.8}$-C_{14}	B	17,30	33,4	48,1	5,6	5,0	8,0
$\Delta^{7.10}$-C_{16}	B	25,56	30,4	43,6	8,7	5,9	11,3
$\Delta^{9.12}$-C_{18}	C	22,30	30,2	54,1	3,2	3,9	8,5
$\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}	D	6,30	25	44,5	15		15
$\Delta^{6.9}$-C_{18}	A	30,73	26,2	47,2	8,6	8,6	9,3
$\Delta^{4.7.10}$-C_{16}	A	27,50	27,1	50,7	6,8	7,5	7,9
$\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}	B	25,90	31,1	45,2	7,0	6,0	10,7
$\Delta^{9.12.15}$-C_{18}	D	4,12	24	39	21		16

* % der gesamten Phospholipoide.
** In den Serien A—C wurden in jedem Versuch vier, in der Serie D wurde nur eine Kulturflasche verwendet.

[10] D. J. HANAHAN, in Lipid Chemistry, John Wiley & Sons, New York 1960.

wegen für die genauere Analyse in den Isotopen-Experimenten. Aus der Tab. 1 geht ferner das Ausmaß hervor, in dem die radiogaschromatographischen Analysen der Phosphatidyl-cholin-Fraktion durch ihre Verunreinigung mit den Serin- und Inosit-Verbindungen verfälscht sind.

Die Markierung von Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidyl-cholin mit den eingesetzten markierten Fettsäuren

Die spezifischen Aktivitäten der isolierten Phosphatidyl-choline und -äthanolamine gehen aus Tab. 2 hervor. Beide Phospholipoidklassen sind markiert und zwar die Cholin-Verbindungen stets deutlich stärker als die Äthanolamin-Verbindungen. Es werden also die als Ammoniumsalz angebotenen Fettsäuren von den HeLa-Zellen nicht nur aufgenommen, sondern es werden auch die Säuren oder ihre im Zellstoffwechsel gebildeten Folgeprodukte in die Phospholipoide eingebaut. Alle verwendeten Polyensäuren wurden für die Phospholipoidsynthese herangezogen, doch kann die $\Delta^{3.6}$-C_{12}-Säure dazu nur sehr viel schlechter verwendet werden als alle anderen Säuren dieser Reihe.

Tab. 2. Die spezif. Aktivitäten von Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidyl-cholin. Zum Vergleich die spezif. Aktivitäten der mit den HeLa-Zellen inkubierten Fettsäuren.

Inkubierte Fettsäure	Spezif. Aktivität [Zpm/nMol]		
	Inkubierte Fettsäure	Phosphatidyl-äthanolamin	Phosphatidyl-cholin
$\Delta^{3.6}$-C_{12}	65 000	270	925
$\Delta^{5.8}$-C_{14}	370	76	124
$\Delta^{7.10}$-C_{16}	375	88	176
$\Delta^{9.12}$-C_{18}	287	46	139
$\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}	3900	390	1120
$\Delta^{6.9}$-C_{18}	472	100	168
$\Delta^{4.7.10}$-C_{16}	507	99	158
$\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}	186	61	76
$\Delta^{9.12.15}$-C_{18}	610	102	109

Zum Um- und Abbau der inkubierten Säuren im Zellstoffwechsel

Den von den Zellen aufgenommenen Säuren stehen drei Wege zur Verfügung: Sie können über die β-Oxydation zu Acetat-Einheiten gespalten werden, die ihrerseits wieder der Synthese von gesättigten und ungesättigten Säuren vom Palmitolein- und Ölsäuretyp zur Verfügung gestellt werden können. Ferner können die mikrosomalen Enzyme der Kettenverlängerung[11] und Olefinierung[12, 13] sie als Substrate übernehmen. Schließlich können sie ebenso wie die auf den ersten beiden Wegen entstandenen Säuren unverändert zur Acylierung des L-α-Glycerinphosphats oder der Lyso-Glycerinphosphatide[6, 7] herangezogen werden.

Um gerade diesen letzten Weg beurteilen zu können und nicht die an die Zellen adsorbierte Fettsäure des Inkubationsansatzes in die Bestimmung eingehen zu lassen, wurde die Verteilung der Radioaktivität auf die Fettsäuren der von freien Fettsäuren und Neutralfetten gereinigten Glycerinphosphatide untersucht (Tab. 3 und 4).

Aus der Radioaktivitätsverteilung auf die Komponenten des Fettsäuregemisches geht hervor, in welchem Maße die genannten drei Wege tatsächlich eingeschlagen werden. Die Radioaktivität in den gesättigten und einfach ungesättigten Säuren gelangt über den Acetat-„pool" in diese Säuren. Die markierten Polyenfettsäuren entsprechen, sofern es sich nicht um die inkubierten Säuren selber handelt, den durch Kettenverlängerung und/oder Olefinierung entstandenen Folgeprodukten.

Der über den Acetat-„pool" und die Neusynthese in das Fettsäuregemisch gelangte Anteil an der Gesamtaktivität ist aus Tab. 3 und 4 ersichtlich. Dabei ist der tatsächliche Einbau dieser Säuren in der Versuchszeit entsprechend der Anzahl der Acetateinheiten, die für ihren Aufbau herangezogen wurden, kleiner als ihr Anteil an der Radioaktivität.

[11] W. Stoffel u. K. L. Ach, diese Z. **337**, 123 [1964].

[12] W. Stoffel, Biochem. biophysic. Res. Commun. **6**, 270 [1961].

[13] W. Stoffel u. H. G. Schiefer, diese Z. **345**, 41 [1966].

Tab. 3. Die Verteilung der Radioaktivität auf die Fettsäuren der Glycerinphosphatide nach Inkubation mit markierten Fettsäuren vom Linolsäuretyp. Als „Rest" wird die Radioaktivität angegeben, die keiner der aufgeführten Komponenten zugeordnet werden kann. Angaben in % der eingesetzten Radioaktivität.

Aus Glycerinphosphatiden isolierte Fettsäuren	Inkubierte Säuren $\Delta^{3.6}$-C_{12}	$\Delta^{5.8}$-C_{14}	$\Delta^{7.10}$-C_{16}	$\Delta^{9.12}$-C_{18}	$\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}
$\Delta^{3.6}$-C_{12}	100				
gesätt. C_{14}		1,9	1,7	0,1	0,5
$\Delta^{5.8}$-C_{14}		1,5			
gesätt. C_{16}		11,0	9,5	0,8	0,1
Δ^{9}-C_{16}		4,7	4,6	0,2	
$\Delta^{7.10}$-C_{16}		2,3	7,0		
gesätt. C_{18}		1,3	1,0	0,4	0,5
Δ^{9}-C_{18}		4,2	1,6	1,2	0,2
$\Delta^{9.12}$-C_{18}		50,1	56,5	81,5	
$\Delta^{11.14}$-C_{20}		2,2	2,2	2,6	
$\Delta^{8.11.14}$-C_{20}		4,9	4,6	3,5	12,3
$\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}		8,5	4,2	5,1	83,2
$\Delta^{13.16}$-C_{22}		1,5	1,6	0,4	
$\Delta^{7.10.13.16}$-C_{22}		1,8	1,6	0,2	2,2
Rest		4,1	3,7	3,8	1,2

Tab. 4. Die Verteilung der Radioaktivität auf die Fettsäuren der Glycerinphosphatide nach der Inkubation von HeLa-Zellen mit verschiedenen [1-^{14}C]-markierten Fettsäuren. Als „Rest" wird die Radioaktivität angegeben, die keiner der aufgeführten Komponenten zugeordnet werden kann. Angaben in % der eingesetzten Radioaktivität.

Aus Glycerinphosphatiden isolierte Fettsäuren	Inkubierte Säuren $\Delta^{6.9}$-C_{18}	$\Delta^{4.7.10}$-C_{16}	$\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}	$\Delta^{9.12.15}$-C_{18}
gesätt. C_{14}	2,3	1,7	3,2	
gesätt. C_{16}	7,0	7,8	10,1	
Δ^{9}-C_{16}	1,1	3,1	1,6	
$\Delta^{7.10}$-C_{16}	1,2	4,0	0,9	
$\Delta^{4.7.10}$-C_{16}		21,3		
gesätt. C_{18}	1,2		5,1	
Δ^{9}-C_{18}	4,9	1,3	7,9	
$\Delta^{9.12}$-C_{18}		2,8		
$\Delta^{6.9}$-C_{18}	27,5			
$\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}			7,5	
$\Delta^{6.9.12}$-C_{18}		9,8		
$\Delta^{9.12.15}$-C_{18}				100
$\Delta^{8.11}$-C_{20}	11,4			
$\Delta^{8.11.14}$-iso-C_{20}			3,0	
$\Delta^{8.11.14}$-C_{20}		3,7		
$\Delta^{5.8.11}$-C_{20}	30,2			
$\Delta^{5.8.11.14}$-iso-C_{20}			31,6	
$\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}	2,6	35,5		
$\Delta^{10.13}$-C_{22}	2,7			
$\Delta^{10.13.16}$-iso-C_{22}			3,4	
$\Delta^{10.13.16}$-C_{22}		1,5		
$\Delta^{7.10.13}$-C_{22}	5,8			
$\Delta^{7.10.13.16}$-iso-C_{22}			14,2	
$\Delta^{7.10.13.16}$-C_{22}		4,2		
Rest	1,7	3,4	11,5	

Eine Ausnahme bildet die ^{3}H-markierte $\Delta^{3.6}$-C_{12}-Säure, deren Wasserstoffatome in mehreren Schritten des Abbaus und der Neusynthese Gelegenheit zum Austausch und damit zur Verdünnung hatten, so daß in den neu gebildeten Säuren nur eine nicht meßbar geringe Aktivität erwartet werden kann.

Der überwiegende Anteil der Radioaktivität in den Phospholipoiden wurde im Substrat selber und in den Kettenverlängerungs- und Olefinierungsprodukten gefunden. In Tab. 3 ist die Aktivitätsverteilung auf die Phospholipoid-Fettsäuren in den Versuchen mit den *Diensäuren vom Linolsäuretyp von 16 bis 18 C-Atomen und der Arachidonsäure* wiedergegeben. Die diesen Säuren gemeinsamen Strukturmerkmale sind die beiden durch eine Methylengruppe isolierten Doppelbindungen und die Länge des Methylendes von 5 C-Atomen. Die Unfähigkeit des tierischen Organismus, im terminalen Methylende weitere Doppelbindungen einzuführen[12], beschränkt die möglichen Veränderungen an diesen Säuren auf Verlängerungen des Carboxylendes um C_2-Einheiten und die Einführung weiterer Doppelbindungen in das Carboxylende. Es wurde früher gezeigt, daß die Kettenverlängerung der Polyensäuren durch ein mikrosomales Enzymsystem erfolgt, das NADPH und Malonyl-CoA als Cofaktoren benötigt. Das Enzym ist nicht streng substratspezifisch, doch werden Fettsäuren mit einer Länge von 16 und 18 C-Atomen und mit einem Abstand von 2 bis 5 Methylengruppen zwischen Carboxyl-C und erster Doppelbindung besonders gut umgesetzt. Eine größere Gesamtlänge des Moleküls sowie auch eine größere Länge des gesättigten Carboxylendes führen zu einem sehr kleinen Umsatz zu Verlängerungsprodukten[5]. Daß dieser Spezifitätsbereich des kettenverlängernden Enzyms in bezug auf die Längen von Gesamtkette und Carboxylende nicht nur diese obere Grenze hat, sondern auch nach unten beschränkt ist, geht aus dem $\Delta^{3.6}$-C_{12}-Säure-Inkubationsversuch hervor: Es wurden keine Verlängerungsprodukte dieser Säure gefunden. Hingegen geht die nur um 2 C-Atome längere $\Delta^{5.8}$-C_{14}-Säure zu 70% in längerkettige Folgeprodukte über. Die Radioaktivitätsverteilung auf die Fettsäuren in diesem Versuch gleicht der bei den Inkubationen mit anderen Bishomologen, der $\Delta^{7.10}$-C_{16}-Säure und der $\Delta^{9.12}$-C_{18}-Säure: In allen drei Versuchen ist die Aktivität in der Linolsäure am größten, ein kleiner Prozentsatz ist durch weitere Verlängerung in die Diensäuren der C_{20}- und C_{22}-Reihe gelangt. Hauptverlängerungsprodukt der $\Delta^{5.8}$-C_{14}-Säure sowie der $\Delta^{7.10}$-C_{16}-Säure ist die Linolsäure; es ist also gleichgültig, ob das Substrat eine einmalige oder zweimalige Verlängerung um eine C_2-Einheit erfordert. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von In-vitro-Inkubationen dieser Säuren mit Rattenleber-Mikrosomen und Malonyl-CoA[5]. Außer diesen durch Kettenverlängerung entstandenen Diensäuren treten auch Olefinierungsprodukte auf: etwa 4% der Radioaktivität wurde in $\Delta^{8.11.14}$-C_{20}-Säure gefunden, 4—8% in $\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}-Säure und ein kleinerer Teil in $\Delta^{7.10.13.16}$-C_{22}-Säure. Diese Überführung der Diensäuren in höher ungesättigte Polyensäuren hat uns überrascht, denn HAGGERTY et al.[2] berichteten jüngst, daß HeLa-Zellen nicht in der Lage seien, die Olefinierungs-Reaktion an Linolsäure durchzuführen. Sie interpretierten dieses Unvermögen als einen Verlust der olefinierenden Enzymaktivität im Verlauf der Entdifferenzierung. Der von uns verwendete HeLa-Stamm ist dagegen in der Lage, aus Linolsäure Arachidonsäure zu bilden (Abb. 3).

Zwei Wege sind für die Synthese der Arachidonsäure aus der Linolsäure möglich. Der erste Schritt kann entweder eine Kettenverlängerung zu $\Delta^{11.14}$-C_{20}-Säure[12] sein oder aber die Einführung einer Doppelbindung unter Bildung der γ-Linolensäure[5,14]. Sowohl die $\Delta^{11.14}$-C_{20}-Säure als auch die γ-Linolensäure kann in vitro in die Arachidonsäure überführt werden[11,12]. Da wir in allen diesen Diensäure-Inkubations-Versuchen bei der radiogaschromatographischen Analyse eine deutlich meßbare Aktivität in einer Säure mit dem Retentionsvolumen der $\Delta^{11.14}$-C_{20}-Säure, nie jedoch in der $\Delta^{6.9.12}$-C_{18}-Säure fanden, sprechen diese Befunde dafür, daß der tatsächlich beschrittene Weg auf dem von STOFFEL[12] postulierten über die $\Delta^{11.14}$-C_{20}-Säure als Intermediärprodukt führt. In Tab. 3 sind ferner die Radioaktivitätsverteilungen nach Verwendung der *Arachidonsäure* als Substrat mitgeteilt. Diese Säure wird, abgesehen von einem kleinen Teil, der der β-Oxydation anheimfällt, ohne weitere Verlängerung und Dehydrogenierung in die Phospholipoide eingebaut. Das spricht dafür, daß die Arachidonsäure eine für die Phospholipoid-Synthese optimale Struktur besitzt.

In Tab. 4 sind die Radioaktivitätsverteilungen auf die Fettsäuren der Phospholipoide von HeLa-Zellen wiedergegeben, die mit gewöhnlich nicht oder nur in kleinsten Konzentrationen in der HeLa-Zelle vorkommenden Säuren inkubiert waren.

[14] J. F. MEAD u. D. R. HOWTON, J. biol. Chemistry **229**, 575 [1957].

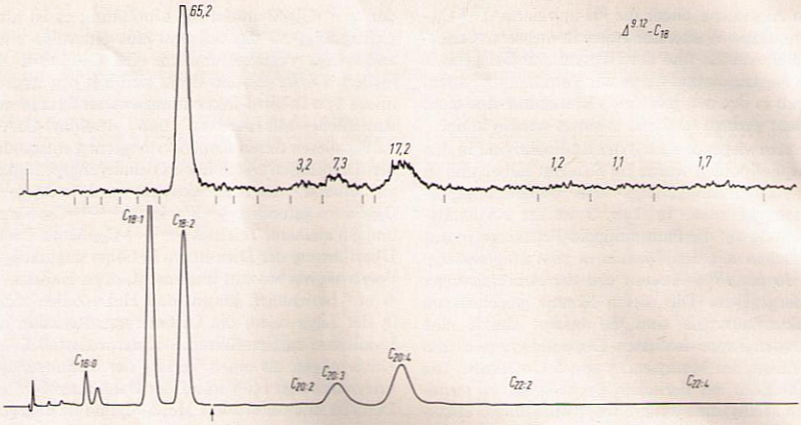

Abb. 3. Radiogaschromatogramm des Methylester-Gemisches der 2-ständigen Fettsäuren des Phosphatidyläthanolamins nach Inkubation mit $\Delta^{9.12}$-C_{18}-Säure (Linolsäure). An der im Massenchromatogramm (untere Kurve) markierten Stelle (↑) wurde die Empfindlichkeit verdreifacht (von $3 \cdot 10^{-7}$ auf $1 \cdot 10^{-7}$). Obere Kurve: gleichzeitig registrierte Radioaktivität. Sonst wie Legende zu Abb. 2.

Die $\Delta^{6.9}$-C_{18}-Säure gehört auf Grund ihres Methylendes von 9 C-Atomen zur Ölsäurefamilie. Die Ölsäure unterscheidet sich von der Linolsäure einmal dadurch, daß sie vom Organismus ganz synthetisiert werden kann[15], und zum anderen dadurch, daß sie vom hinreichend mit Linolsäure ernährten Organismus nicht als Substrat der Kettenverlängerung und Olefinierung benutzt wird. Es sind in den Organphosphatiden fettfrei ernährter Ratten jedoch Polyensäuren vom Ölsäuretyp nachgewiesen worden[16], und zwar hauptsächlich die $\Delta^{5.8.11}$-C_{20}-Säure, die ganz aus Acetat aufgebaut wird, und für deren Synthese die Ölsäure ein Zwischenprodukt darstellt[17]. Als ersten Schritt in der Synthese dieser Polyensäuren aus der Ölsäure kann man die Olefinierung zur $\Delta^{6.9}$-C_{18}-Säure annehmen. Dieses mögliche Zwischenprodukt haben wir HeLa-Zellen angeboten. Wie die Linolsäure so wird auch die $\Delta^{6.9}$-C_{18}-Säure aufgenommen und in die Phospholipoide eingebaut. Es entstehen jedoch, anders als in den Versuchen mit der Linolsäure und ihren kürzerkettigen Homologen, sehr viel mehr Verlängerungsprodukte: In der C_{20}-Reihe wurden 44% und in der C_{22}-Reihe 8% der Aktivität nachgewiesen. Die $\Delta^{6.9}$-C_{18}-Säure stellt auf Grund ihres um 3 C-Atome kürzeren Carboxylendes ein Substrat dar, das dem kettenverlängernden Enzym offenbar leichter zugänglich ist als die Linolsäure. Es gilt also auch für die lebende Zelle die nach Experimenten mit isolierten Rattenleber-Mikrosomen von uns aufgestellte Regel[5], die für optimale Umsätze am kettenverlängernden Enzym eine Länge des Carboxylendes von nicht mehr als fünf Methylenbrücken fordert. Den größten Anteil an den Verlängerungs- und Dehydrogenierungsprodukten der $\Delta^{6.9}$-C_{18}-Säure stellt die $\Delta^{5.8.11}$-C_{20}-Säure. Der gesamte Weg von der Ölsäure zur $\Delta^{5.8.11}$-C_{20}-Säure wird nur dann beschritten, wenn, wie in fettfrei ernährten Ratten, die Linolsäure als ideales Substrat für die Bildung von höher ungesättigten Polyensäuren fehlt. Hingegen ist die Reaktionsfolge von der $\Delta^{6.9}$-C_{18}-Säure zur $\Delta^{5.8.11}$-C_{20}-Säure auch dann leicht gangbar, wenn die Zellen eine hinreichende Menge Linolsäure angeboten bekommen*.

[15] A. J. FULCO u. J. F. MEAD, J. biol. Chemistry **234**, 1411 [1959].

[16] E. KLENK u. K. OETTE, diese Z. **318**, 86 [1960].

[17] E. KLENK u. H. PFLÜGER, diese Z. **335**, 53 [1963].

* Gaschromatographische Analysen des verwendeten Kälberserums ergaben einen Linolsäuregehalt von 10 mg in 100 m*l* des fertigen Nährmediums.

Wir schließen daraus, daß die erste Reaktion, die Olefinierung der Ölsäure zur 6.9-Oktadecadiensäure, der Schritt sein muß, dessen schwierige Durchführung das Auftreten der $\Delta^{5.8.11}$-C_{20}-Säure im normal ernährten Organismus verhindert.

Die $\Delta^{4.7.10}$-C_{16}-Säure ist eine Modellverbindung, deren einmalige Verlängerung die γ-Linolensäure liefern sollte. Versuche von MEAD[14] zeigten, daß die an Ratten verfütterte [1-^{14}C]γ-Linolensäure fast vollständig in die Arachidonsäure umgewandelt wurde. Andererseits führten unsere früheren In-vitro-Experimente zwar zu einer zweimaligen Verlängerung der $\Delta^{4.7.10}$-C_{16}-Säure, es wurde jedoch nur ein kleiner Teil der $\Delta^{8.11.14}$-C_{20}-Säure zur Arachidonsäure dehydrogeniert. In HeLa-Zellen wird die $\Delta^{4.7.10}$-C_{16}-Säure zu 20% unverändert in die Phospholipoide eingebaut. 20% der Radioaktivität wurden in der γ-Linolensäure und ca. 40% in der C_{20}-Reihe gefunden. Diese Verlängerung des größeren Teils über die γ-Linolensäure hinaus zu C_{20}-Säuren entspricht den Befunden in den genannten In-vivo- und In-vitro-Experimenten. Das Überwiegen der C_{20}-Säuren über das einfache Verlängerungsprodukt, die γ-Linolensäure, bestätigt, daß die Länge des Carboxylendes entscheidend ist für die weitere Verlängerung der C_{18}-Säuren. Es ergibt sich nämlich hier eine sehr ähnliche Verteilung der Radioaktivität auf die C_{18}- und die C_{20}-Säuren wie in dem Experiment mit der $\Delta^{6.9}$-C_{18}-Säure, die mit der γ-Linolensäure ($\Delta^{6.9.12}$-C_{18}) die Länge des Carboxylendes gemeinsam hat. Ganz anders ist jedoch die Verteilung in dem Versuch mit der Linolsäure, die dieselbe Länge des Methylendes wie die γ-Linolensäure, jedoch ein um drei C-Atome längeres Carboxylende besitzt. Wie in den Experimenten von MEAD[14] wird auch hier die intermediär entstehende $\Delta^{8.11.14}$-C_{20}-Säure fast vollständig (zu 90%) zur Arachidonsäure dehydrogeniert. Für die Frage der Arachidonsäuresynthese aus Linolsäure erscheint es beachtenswert, daß die γ-Linolensäure, die in diesem Versuch als Intermediärprodukt auftritt und nach dem von MEAD postulierten Weg bei der Arachidonsäuresynthese als Zwischenprodukt auftreten sollte, hier zwar in die Phospholipoide eingebaut wird, in den Experimenten mit der Linolsäure jedoch nicht nachgewiesen werden kann. Auch dieser Befund stützt den von uns beschriebenen Weg der Arachidonsäuresynthese.

Da die γ-Linolensäure als Zwischenprodukt im Aufbau der Arachidonsäure aus der $\Delta^{4.7.10}$-C_{16}-Säure auftrat, sollte ihr Verfüttern an HeLa-Zellen zu einer etwa gleich starken Bildung von C_{20}-Säuren führen. Statt der γ-Linolensäure selber haben wir die $\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}-Säure (Abb. 4) eingesetzt. Diese Säure besitzt das gleiche Doppelbindungssystem und Carboxylende wie die γ-Linolensäure, jedoch ein verzweigtes Methylende in Gestalt einer Isopropylgruppe. In-vitro-Versuche hatten gezeigt, daß diese Säure wie die $\Delta^{4.7.10}$-C_{16}-Säure hauptsächlich in die Eicosatriensäure überführt wurde, daß also die Verzweigung des Methylendes die Kettenverlängerung nicht beeinflußt. Die Verfütterung der $\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}-Säure an HeLa-Zellen führt zu dem

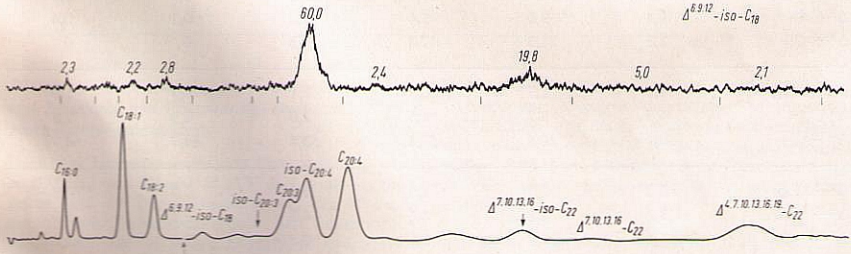

Abb. 4. Radiogaschromatogramm des Methylestergemisches der 2-ständigen Fettsäuren des Phosphatidyläthanolamins nach Inkubation mit $\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18} (16-Methyl-6.9.12-heptadecatriensäure). An der im Massenchromatogramm (untere Kurve) markierten Stelle (↑) wurde die Empfindlichkeit verzehnfacht (von $3 \cdot 10^{-7}$ auf $3 \cdot 10^{-8}$). Obere Kurve: gleichzeitig registrierte Radioaktivität. Temperatur der Säule: 180°. Sonst wie Legende zu Abb. 2.

gleichen Ergebnis (Tab. 4): Die Radioaktivitätsverteilung auf die längerkettigen Folgeprodukte weist eine starke Ähnlichkeit mit der in dem $\Delta^{4.7.10}$-C_{16}-Säure-Experiment auf, nur sind die C_{22}-Säuren deutlich stärker vertreten. Es wird hier derselbe Unterschied zum In-vitro-Versuch beobachtet wie bei der $\Delta^{4.7.10}$-C_{16}-Säure-Inkubation: die entstehende $\Delta^{8.11.14}$-iso-C_{20}-Säure wurde zu 90% zur $\Delta^{5.8.11.14}$-iso-C_{20}-Säure dehydrogeniert. Auch dieser Versuch macht die vorhin erwähnte Hypothese HAGGERTYS unwahrscheinlich.

Der Inkubationsversuch mit der $\Delta^{9.12.15}$-C_{18}-Säure, der α-Linolensäure, bestätigte die Rückschlüsse auf die Bedeutung der Länge des Carboxylendes für die Kettenverlängerung: Es treten keine Verlängerungsprodukte auf, da das Carboxylende länger ist als in den beiden zuletzt genannten Versuchen. Es bleibt jedoch ungeklärt, warum die Linolsäure als einzige von den Säuren mit 7 Methylenbrücken im Carboxylende zu über 10% verlängert wird, während die α-Linolensäure überhaupt keine Umsätze zeigt.

Die Verteilung der Fettsäuren auf Phosphatidylcholin und Phosphatidyl-äthanolamin

In Tab. 5 und 6 sind die Verteilungen der Radioaktivitäten auf die Fettsäuren der Phosphatidylcholin- und Phosphatidyl-äthanolamin-Fraktionen zusammengestellt. Vergleicht man innerhalb eines Versuches die Radioaktivitätsprozentsätze einzelner Säuren im Phosphatidyl-cholin mit denen gleicher Säuren im Phosphatidyl-äthanolamin, so gelangt man zu folgender, für alle Versuche gültigen Feststellung: in der Cholin-Verbindung ist der Anteil der C_{16}-Säuren sehr viel größer als in der Äthanolamin-Verbindung, die Säuren der C_{18}-Reihe, die Eicosadien- und Eicosatriensäure sind in beiden Phospholipoidklassen etwa gleich stark vertreten, während die höher ungesättigten Säuren, insbesondere die Arachidonsäure, im Phosphatidyl-äthanolamin einen deutlich stärkeren Anteil ausmachten. Hier überwiegen also, anders als im Phosphatidyl-cholin, die langkettigen und hochungesättigten Säuren.

Tab. 5. Die Verteilung der radioaktiven Fettsäuren auf Phosphatidyl-cholin (PC) und Phosphatidyl-äthanolamin (PÄ) (Inkubation mit Diensäuren vom Linolsäuretyp).

Aus PC bzw. PÄ isolierte Säure	Inkubierte Säure $\Delta^{5.8}$-C_{14}		$\Delta^{7.10}$-C_{16}		$\Delta^{9.12}$-C_{18}	
	PC	PÄ	PC	PÄ	PC	PÄ
C_{14}	2,2	1,0	1,8	1,4	0	0
$\Delta^{5.8}$-C_{14}	1,3	1,9				
gesätt. C_{16}	14,4	2,8	11,7	3,2	0,9	0,6
Δ^{9}-C_{16}	5,4	3,0	5,4	2,9	0,1	0,4
$\Delta^{7.10}$-C_{16}	2,7	1,3	7,8	4,5	0	0
gesätt. C_{18}	1,1	1,7	0,9	1,1	0,3	1,0
Δ^{9}-C_{18}	4,3	3,8	1,5	2,0	0,9	2,8
$\Delta^{9.12}$-C_{18}	50,7	48,6	57,8	52,8	84,7	64,7
$\Delta^{11.14}$-C_{20}	2,2	2,2	1,9	3,2	2,3	4,5
$\Delta^{8.11.14}$-C_{20}	3,2	8,8	4,6	4,8	3,1	5,9
$\Delta^{5.8.11}$-C_{20}	5,6	15,3	3,1	7,3	3,6	13,0
$\Delta^{13.16}$-C_{22}	1,4	1,7	—	6,2	0,2	1,7
$\Delta^{7.10.13.16}$-C_{22}	1,3	2,0	—	6,4	0	1,2
Rest	4,0	4,6	3,5	4,0	3,8	4,0

Tab. 6. Verteilung der radioaktiven Fettsäuren auf Phosphatidyl-cholin (PC) und Phosphatidyl-äthanolamin (PÄ).

Aus PC bzw. PÄ isolierte Säure	Inkubierte Säure $\Delta^{6.9}$-C_{18}		$\Delta^{4.7.10}$-C_{16}		$\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}	
	PC	PÄ	PC	PÄ	PC	PÄ
gesätt. C_{14}	2,7	1,2	1,6	2,1	4,8	0,4
gesätt. C_{16}	8,4	2,6	9,6	2,6	14,0	3,1
Δ^{9}-C_{16}	1,2	0,8	3,6	1,5	2,3	0,2
$\Delta^{7.10}$-C_{16}	1,4	0,5	5,1	0,6	1,2	0,4
$\Delta^{4.7.10}$-C_{16}			25,5	8,5		
gesätt. C_{18}	0,5	3,7			6,3	3,0
Δ^{9}-C_{18}	5,3	3,6	1,4	1,0	10,0	4,2
$\Delta^{9.12}$-C_{18}			3,3	1,8		
$\Delta^{6.9}$-C_{18}	28,7	23,6				
$\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}					9,7	3,6
$\Delta^{6.9.12}$-C_{18}			10,5	6,3		
$\Delta^{8.11}$-C_{20}	10,2	15,5				
$\Delta^{8.11.14}$-iso-C_{20}					4,0	1,1
$\Delta^{8.11.14}$-C_{20}			3,9	3,2		
$\Delta^{5.8.11}$-C_{20}	29,8	32,0				
$\Delta^{5.8.11.14}$-iso-C_{20}					20,2	52,2
$\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}	2,5	2,8	28,4	56,1		
$\Delta^{10.13}$-C_{22}	2,7	2,8				
$\Delta^{10.13.16}$-iso-C_{22}					4,7	1,0
$\Delta^{10.13.16}$-C_{22}			1,9	0,4		
$\Delta^{7.10.13}$-C_{22}	5,4	7,4				
$\Delta^{7.10.13.16}$-iso-C_{22}					12,1	17,9
$\Delta^{7.10.13.16}$-C_{22}			2,5	9,5		
Rest	1,3	3,3	2,4	6,5	10,8	12,8

Die spezifische Verteilung der Fettsäuren auf die 1- und 2-Stellung von Phosphatidyl-cholin und Phosphatidyl-äthanolamin

Nach den Untersuchungen von TATTRIE[18], HANAHAN et al.[19] und VAN DEENEN et al.[20] darf es als gesichert gelten, daß die Phospholipase A aus den Glycerinphosphatiden Phosphatidyl-cholin und Phosphatidyl-äthanolamin die 2-ständige Estergruppe hydrolysiert. Die Analyse der Spaltprodukte führte zu folgendem Bild von der Fettsäurebesetzung der beiden Hydroxyl-Gruppen des L-Glycerin-3-phosphats: Die ungesättigten Fettsäuren, wie die Linolsäure und die Arachidonsäure, besetzen vorwiegend die β-Stellung, während gesättigte Fettsäuren, insbesondere die Stearinsäure und die Palmitinsäure, fast ausschließlich in der α-Stellung gefunden werden[10].

Um einen Aufschluß über den Einbaumodus der in unseren Inkubationsversuchen entstandenen Fettsäuren zu erhalten, haben wir Phosphatidyl-cholin und -äthanolamin mit Phospholipase A gespalten; die Analyse der abgespaltenen Fettsäuren sowie der Lysoverbindungen auf ^{14}C und Phosphor lieferten die Aktivität des Gesamtphospholipoids und der

[18] N. H. TATTRIE, J. Lipid Res. **1**, 60 [1959].
[19] D. J. HANAHAN, H. BROCKERHOFF u. E. J. BARRON, J. biol. Chemistry **235**, 1917 [1960].
[20] L. L. M. VAN DEENEN u. G. H. DE HAAS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **70**, 538 [1963].

Tab. 7. Die Verteilung der Radioaktivität auf die 1- und 2-Stellung von Phosphatidyl-cholin (PC) und Phosphatidyl-äthanolamin (PÄ).

analysiertes Material		Inkubierte Säuren											
		$\Delta^{5.8}$-C_{14}		$\Delta^{7.10}$-C_{16}		$\Delta^{9.12}$-C_{18}		$\Delta^{6.9}$-C_{18}		$\Delta^{4.7.10}$-C_{16}		$\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}	
		[Zpm/ µMol]	[%]	[Zpm/ µMol]	[%]	[Zpm/ µMol]	[%]	[Zpm/ µMol]	[%]	[Zpm/ µMol]	[%]	[Zpm/ µMol]	[%]
PC	1- + 2-St.	124 000	100	176 000	100	138 600	100	168 000	100	157 800	100	75 500	100
	1-Stellung	25 200	20	39 300	24	27 000	20	57 000	34	44 000	28	17 300	23
	2-Stellung	98 800	80	136 700	76	111 600	80	111 000	66	113 800	72	58 200	77
PÄ	1- + 2-St.	75 700	100	88 000	100	45 500	100	100 000	100	99 000	100	61 000	100
	1-Stellung	10 700	14	20 000	23	12 600	28	47 000	47	10 100	10	9 050	15
	2-Stellung	65 000	86	68 000	77	32 900	72	53 000	53	88 900	90	51 950	85

1-ständigen Fettsäure (als spezifische Aktivität = Zpm/µMol P angegeben). Die Aktivität in der 2-Stellung wurde aus der Differenz dieser beiden Werte errechnet. In Tab. 7 sind diese Befunde zusammengestellt. In jedem Versuch sind sowohl die Cholin- wie die Äthanolamin-Verbindungen in der 2-Stellung stärker markiert als in der 1-Stellung.

Die weitergehende Analyse der spezifischen Verteilung wird allerdings erst durch die Untersuchung der Verteilung jedes einzelnen Umwandlungsproduktes jeder inkubierten Säure (Tab. 7) auf die 1- und 2-Stellungen der beiden Lipoidklassen möglich. Dafür wird die Aktivität (Zpm) jeder Fettsäure in der 1- und 2-Position eines µMols Phosphatidylcholin bzw. -äthanolamin angegeben. Diese Werte erhielten wir, indem wir die in Tab. 7 aufgeführten spezifischen Aktivitäten der 1- und 2-Stellungen entsprechend den durch die Radiogaschromatographie gewonnenen Prozentsätzen auf die einzelnen Fettsäuren verteilten. In den Diagrammen Abb. 5—8 sind jeder der auf der Abszisse bezeichneten Säuren vier Säulen zugeordnet, deren Höhen die Aktivitäten in der 1- und 2-Stellung eines µMols

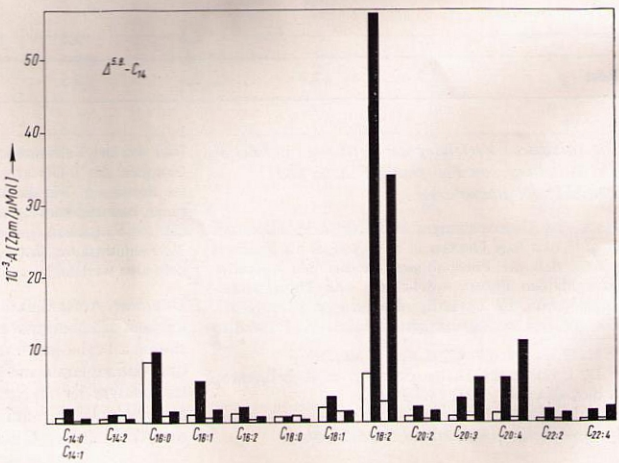

Abb. 5. Inkubationsversuch mit $\Delta^{5.8}$-C_{14}-Säure. Verteilung der radioaktiven Fettsäuren auf die 1- und 2-Stellung von Phosphatidyl-cholin und Phosphatidyl-äthanolamin nach Inkubation mit der angegebenen Fettsäure. Jeder der auf der Abszisse bezeichneten Säuren ist eine Gruppe von vier Säulen zugeordnet. Die Säulen einer Gruppe entsprechen von links nach rechts der 1- und 2-Stellung von Phosphatidylcholin und der 1- und 2-Stellung von Phosphatidyläthanolamin. Ordinate: spezif. Aktivität (*A*) in Zpm/µMol.

Phosphatidyl-cholin bzw. eines μMols Phosphatidyl-äthanolamin anzeigen.

Wie oben festgestellt wurde, stellt bei den Inkubationen mit den C_{14}- und C_{16}-Diensäuren vom Linolsäuretyp die Linolsäure das Hauptverlängerungsprodukt dar, die den Zellen angebotene Linolsäure selbst wird zum größten Teil unverändert in die Glycerinphosphatide eingebaut. Anhand der Abb. 5, die die Fettsäureverteilungen nach der Inkubation mit der $\Delta^{5.8}$-C_{14}-Säure wiedergibt, stellen wir fest, daß die Linolsäure bei beiden Phosphatidgruppen zum weitaus überwiegenden Teil die 2-Stellungen besetzt. Verfolgt man weiter die Verteilung in den längerkettigen und stärker ungesättigten Säuren, so findet man, daß das Gefälle von der 2-Stellung zur 1-Stellung beider Phospholipoide zunimmt, bis es bei der Arachidonsäure ein Maximum erreicht mit einem Wert von 20:1 im Phosphatidyl-äthanolamin. Ferner ist in dieser Reihe der Gradient von der 2-Stellung des Phosphatidyl-äthanolamins zu der des -cholins um so stärker, je weiter man von der Linolsäure zur Arachidonsäure gelangt. Dieselben Verhältnisse haben wir auch in der Verteilung der Folgeprodukte im $\Delta^{7.10}$-C_{16}-Säure- und im $\Delta^{9.12}$-C_{18}-Säure-Versuch gefunden.

Der Einbau der $\Delta^{6.9}$-C_{18}-Säure (Abb. 6) in die vier Glycerinphosphatidpositionen unterscheidet sich von dem der Linolsäure insofern, als er in die 1-Stellungen relativ stärker und in die 2-Stellungen, insbesondere die des Phosphatidyl-äthanolamins, in relativ geringerem Maße erfolgte. Die Verteilung der $\Delta^{8.11}$-C_{20}-Säure auf die beiden Stellungen des Phosphatidyl-äthanolamins gleicht der Verteilung im Phosphatidyl-cholin. Die Verlängerung um die C_2-Einheit (C_{16} zu C_{18}) hatte bewirkt, daß das Produkt bevorzugt in die 1-Stellungen eintritt, die Einführung einer Doppelbindung führt nun dazu, daß die $\Delta^{5.8.11}$-C_{20}-Säure wieder bevorzugt zur Acylierung der 2-Stellung herangezogen wird. Doch ist noch nicht der scharfe Gradient der Arachidonsäureinkorporation in den vorigen Versuchen erreicht, auch überwiegt die Aktivität der $\Delta^{5.8.11}$-C_{20}-Säure im Phosphatidyl-cholin noch über die im -äthanolamin.

In dem $\Delta^{4.7.10}$-C_{16}-Säure-Versuch (Abb. 7) begegnen wir demselben Muster der Arachidonsäureverteilung wie in den Experimenten mit den Diensäuren vom Linolsäuretyp: hier ist die 2-Stellung des Phosphatidyl-äthanolamins mit 20:4 und 22:4 stärker besetzt als die 2-Stellung des -cholins; auch hier ist in der Äthanolamin-Verbindung mit einem Verhältniswert von 46:1 ein maximales Gefälle zwischen 2- und 1-ständiger Arachidonsäure erreicht. Anders als die Tetraensäuren haben alle stärker gesättigten Säuren bevorzugt die Cholin-Verbindung acyliert.

Die Verteilung der $\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}-Säure und ihrer Folgeprodukte (Abb. 8) gleicht der im vorange-

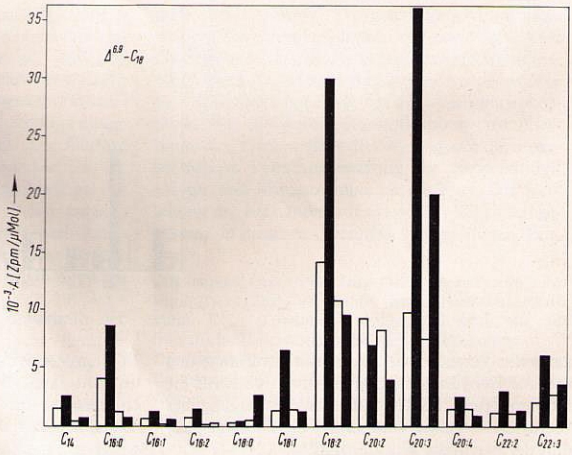

Abb. 6. Inkubationsversuch mit $\Delta^{6.9}$-C_{18}. Alle übrigen Angaben s. Legende zu Abb. 5.

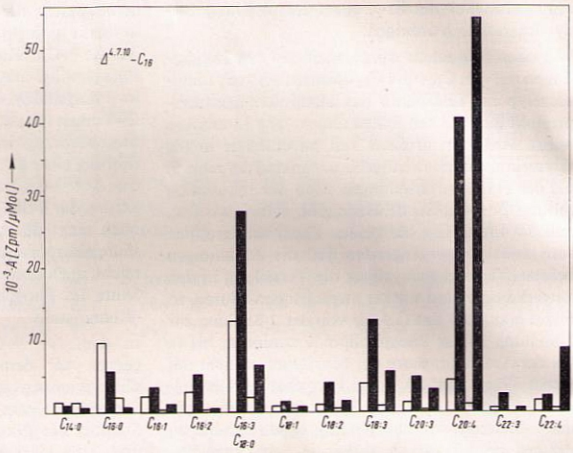

Abb. 7. Inkubationsversuch mit $\Delta^{4,7,10}$-C_{16}-Säure. Alle übrigen Angaben s. Legende zu Abb. 5.

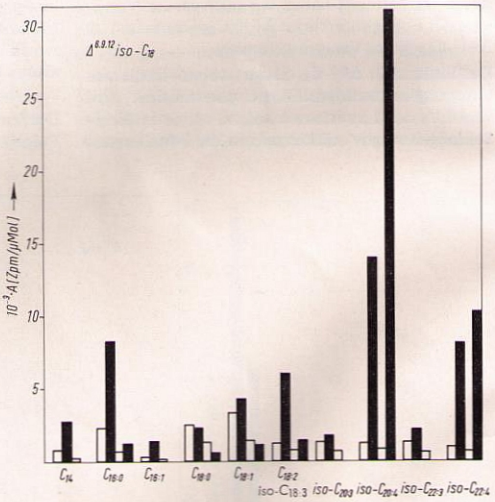

Abb. 8. Inkubationsversuch mit $\Delta^{6,9,12}$-iso-C_{18}-Säure. Alle übrigen Angaben s. Legende zu Abb. 5.

gangenen Versuch: wie für die Kettenverlängerung und die Dehydrogenierung gilt somit auch für die Acylierungsreaktionen, daß die Verzweigung des Methylendes keinen Einfluß auf die Substratspezifität der beteiligten Enzyme ausübt.

In allen Versuchen zeichnet sich folgende Tendenz ab: Die langkettigen Polyensäuren mit der Arachidonsäure als Hauptvertreter werden fast ausschließlich zur Acylierung der 2-Stellung herangezogen, im Phosphatidyl-äthanolamin noch stär-

ker als im Phosphatidyl-cholin. Die Spezifität für die 2-Stellung gilt auch noch für die Linolsäure. Sie verliert sich jedoch bei gleicher Kettenlänge der Acylgruppe mit der Abnahme der Anzahl der Doppelbindungen oder bei gleicher Anzahl der Doppelbindungen mit der Abnahme der Länge der Kohlenstoffkette und führt zu einem beträchtlichen Einbau solcher Acylreste in die 1-Stellung.

Dieser Vergleich bestätigt die bekannte Tatsache der unsymmetrischen Fettsäureverteilung, jedoch trifft für unser System die Formulierung von HANAHAN[10] nicht zu, daß die gesättigten Fettsäuren nur in der 1- und die ungesättigten nur in der 2-Position zu finden sind. Es läßt sich aus unseren Befunden eher eine Reihe ableiten, in der die Polyensäuren geordnet sind nach der Steilheit des Gefälles zwischen der Einbaurate in die 2- und die 1-Stellung. Die Tab. 8 gibt diese Verhältniszahlen des spezifischen Einbaus einiger intermediär entstandener Polyensäuren wieder. Sieht man von 2 Werten, die in der Tabelle eingeklammert sind, ab, so läßt sich folgende Anordnung erkennen:

20:2 < 20:3 < 18:2 < 20:4

(C-Zahl: Doppelbindungs-Zahl)

Tab. 8. Das Verhältnis von Radioaktivität in der 2-Stellung zu der in der 1-Stellung von Lecithin und Colaminkephalin.

Inkubierte Säure C-Zahl: Doppelbindungszahl / Isolierte Säure	Spezif. Aktivität der 2-ständigen Fettsäure / spezif. Aktivität der 1-ständigen Fettsäure					
	Phosphatidyl-cholin			Phosphatidyl-äthanolamin		
	14:2	16:2	18:2	14:2	16:2	18:2
$18:2^{9,12}$	4,7	6,4	8,5	2,7	4,6	11,9
$20:2^{11,14}$	0,7	1,2	3,0	0,9	1,6	4,6
$20:3^{8,11,14}$	3,3	3,8	3,8	1,3	(9,9)*	7,8
$20:4^{5,8,11,14}$	8,2	15,0	(5,6)*	21,4	15,1	20,2

* Eingeklammerte Werte sind Ausnahmen von der im Text erwähnten Regel.

Der Spezifität des Einbaus, die in dieser Reihe zum Ausdruck kommt, liegen die Substratspezifitäten zweier Reaktionen zugrunde: der Acylierung der 1-Stellung sowie der 2-Stellung. Durch In-vitro-Inkubationen von CoA-Estern gesättigter Fettsäuren mit mikrosomalem Acyl-CoA: Lysolecithin-Acyltransferase hat LANDS[6] gezeigt, daß die Acylierung der 1-Stellung um so schneller abläuft, je größer die Kettenlänge ist, und umgekehrt kürzerkettige Fettsäuren schneller in die 2-Stellung eingeführt werden als die längerkettigen. Die Ölsäure übertraf in ihrer Einbaugeschwindigkeit in die 2-Stellung alle gesättigten Säuren und blieb bei der Acylierung der 1-Stellung hinter ihnen zurück. Durch unsere In-vivo-Versuche läßt sich diese Reihe für die Polyensäuren fortsetzen: Das Gefälle zwischen der Besetzung der 2- und 1-Stellung ist bei der $\Delta^{9.12}$-C_{18}-Säure größer als bei der um 2 C-Atome längeren $\Delta^{11.14}$-C_{20}-Säure; innerhalb der C_{20}-Reihe führt die Einführung von Doppelbindungen zu einer zunehmenden Bevorzugung der 2-Position vor der 1-Position.

Es bleibt hiernach jedoch offen, ob die spezifische Verteilung der Polyensäuren auf die 1- und 2-Stellungen in unseren Versuchen auf die Substratspezifität der von LANDS[6] untersuchten Acyl-CoA: Lysolecithin-Acyltransferase zurückzuführen ist oder auf die Spezifität der Acyl-CoA: L-Glycerin-3-phosphat-*O*-Acyltransferase (EC 2.3.1.15), die in dem von KENNEDY[21] vorgeschlagenen Syntheseweg der Glycerinphosphatide und der Triglyceride die Fettsäuren in das Glycerinphosphat-Gerüst einführt. Wird der letztere Weg beschritten, so müßte eine zusätzliche Spezifität der die Cholinphosphorsäure und die Äthanolaminphosphorsäure übertragenden Enzyme gefordert werden, um die unterschiedliche Fettsäurebesetzung des Phosphatidylcholins und -äthanolamins zu erklären. Die Verteilung der Fettsäuren auf die beiden Verbindungsklassen in unseren Versuchen stützt diesen Einwand.

Wir danken Herrn Priv. Doz. Dr. R. ACKERMANN und Frau J. COLLARD, Viruslabor der Universitätsnervenklinik Köln (Direktor Prof. Dr. W. SCHEID), für die freundliche Unterstützung bei der Gewebekultur.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und dem BUNDESMINISTERIUM FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG danken wir für die großzügige Unterstützung unserer Arbeit.

[21] E. P. KENNEDY, Federat. Proc. **16**, 847 [1957].

Experimenteller Teil

Die Testsubstanzen für Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidyl-cholin wurden nach HANAHAN[22] aus Gehirnlipoiden und Sojalecithin gereinigt. Reines Sphingomyelin erhielten wir aus Gehirnlipoiden nach der von SWEELEY[23] angegebenen Methode. Phospholipase A von *Crotalus adamanteus* wurde von Celo, Zweibrücken, bezogen. Wir verwendeten für die Dünnschichtchromatographie „Kieselgel H für DC" der Firma Merck, Darmstadt, und Magnesiumtrisilikat Woelm. Die Säulenchromatographie wurde auf Kieselsäure Mallinckrodt 80—100 mesh und Hyflo-Supercel durchgeführt.

^{14}C-markierte Polyensäuren waren in der Carboxylgruppe markiert, die $\Delta^{3c.6c}$-C_{12}-Säure war an den Kohlenstoffatomen C_3, C_4, C_6 und C_7 mit Tritium besetzt.

Als Nährlösung für die HeLa-Zellkulturen verwendeten wir LYG-Medium[24], (Hanks-Salzlösung mit folgenden Zusätzen je Liter: 5 g Lactalbuminhydrolysat, 1 g Hefeextrakt [Difco], 3,5 g Glucose, 100 mg L-Glutamin und 10 g Valin). Unmittelbar vor Gebrauch wurden je Liter 10 mMol $NaHCO_3$, 100000 E Penicillin und 100 mg Streptomycin hinzugefügt. Zu 900 m*l* des fertigen Mediums wurden 100 m*l* Kälberserum gegeben.

Zum Umsiedeln der Zellen in neue Flaschen wurden die Kulturen mit einer Versene-Lösung (2 g Titriplex 3, Merck, je Liter phosphatgepufferte Kochsalzlösung) 20 Min. bei 37°C inkubiert. Die damit vom Glas gelösten Zellen wurden abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Mit dieser Suspension wurden die neuen Flaschen beschickt.

Die Inkubationsversuche wurden in 250-m*l*-Flaschen in Rollerkulturen durchgeführt (Mediummenge 50 m*l*, Rotationsgeschwindigkeit 2—3 U./Min.). Die Kulturen erhielten am 8. Tag ihres Wachstums, bis zu dem die Zellen einen dichten Rasen gebildet hatten, 48 m*l* neues Medium. 12 Stdn. später wurde das Ammoniumsalz der markierten Fettsäure, das durch Zufügen von etwas mehr als einer äquimolaren Menge NH_3 und durch Schütteln unter gelindem Erwärmen dargestellt worden war, in 2,0 m*l* Lösung je Kulturflasche zugegeben.

Dieses Verfahren scheint keinen toxischen Effekt auf die HeLa-Zellen zu bewirken, jedenfalls bleibt das mikroskopische Bild unverändert und auch die aus den Ergebnissen dieser Experimente ersichtliche biologische Aktivität spricht gegen eine gröbere Schädigung der Zellen.

Nach einer 20stdg. Inkubationsdauer wurden die Zellen mit einer Silikonlasche von der Glaswand abgelöst und aus dem Medium 10 Min. bei 2000 × *g* abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 30 m*l* Wasser suspendiert und beschallt. Ein aliquoter Teil wurde der Proteinbestimmung mit dem FOLIN-Phenol-Reagens nach LOWRY[25] zugeführt. Der Rest der beschallten Suspension wurde lyophilisiert und gewogen. Die Tab. 9 gibt diese Werte sowie die Daten der inkubierten Fettsäuren wieder.

Aus den getrockneten Zellen wurden die Gesamtlipoide durch dreimalige heiße Extraktion mit je 25 m*l* Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:5, jeweils 20 Min. lang

[22] D. J. HANAHAN, J. C. DITTMER u. E. WARASHINA, J. biol. Chemistry **228**, 685 [1957].

[23] C. C. SWEELEY, J. Lipid Res. **4**, 402 [1963].

[24] D. J. MERCHANT, R. H. KAHN u. W. H. MURPHY, Handbook of Cell and Organ Culture S. 235, Burgess Publ. Company, 1964.

[25] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].

Tab. 9. Daten der inkubierten radioaktiv markierten Fettsäuren und Zellausbeuten der Inkubationen.

Inkubierte Fettsäure*	Vers.-Serie**	Spezif. Aktivität der Säure · 10^{-5} [Zpm/μMol]	Inkubierte Aktivität · 10^{-6} [Zpm]	Inkubierte Menge [μMol]	Protein [mg]	Zelltrockengewicht [mg]
$\Delta^{3c.6c}$-C_{12}	D	650,00	975,0	15,0	19	—
$\Delta^{5.8}$-C_{14}	B	3,70	14,7	39,8	142	223
$\Delta^{7.10}$-C_{16}	B	3,75	15,8	41,8	134	218
$\Delta^{9.12}$-C_{18}	C	2,87	12,2	42,7	153	228
$\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}	D	39,00	1755,0	45,0	30	—
$\Delta^{6.9}$-C_{18}	A	4,72	25,4	53,7	138	212
$\Delta^{4.7.10}$-C_{16}	A	5,07	23,2	45,7	143	220
$\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}	B	1,86	7,4	40,0	147	228
$\Delta^{9.12.15}$-C_{18}	D	6,10	18,3	30,0	30	—

* In der $\Delta^{3c.6c}$-C_{12}-Säure sind die C-Atome C_3, C_4, C_6 und C_7 mit ^3H, in allen anderen Säuren die Carboxylgruppe mit ^{14}C markiert.

** In den Versuchsserien A—C wurden in jedem Versuch 4 Rollerflaschen verwendet, die inkubierte Säure wurde gleichmäßig auf die Flaschen verteilt. In der Versuchsserie D genügte wegen der höheren spezif. Aktivität der Säuren eine Flasche.

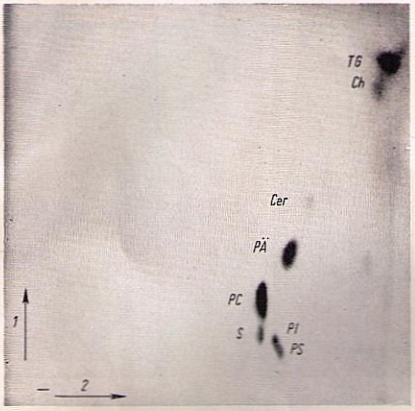

Abb. 9. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm des Gesamtlipoidextraktes aus HeLa-Zellen.

Start: Links unten an der durch einen Strich bezeichneten Stelle. Die Pfeile geben die Laufrichtung an.

1. Laufrichtung: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4

2. Laufrichtung: n-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1

Abkürzungen: TG = Triglycerid; Ch = Cholesterin; Cer = Cerebrosid; PÄ = Phosphatidyl-äthanolamin; PC = Phosphatidyl-cholin; PI = Phosphatidyl-inosit; PS = Phosphatidyl-serin; S = Sphingomyelin.

in Stickstoff-Atmosphäre, gewonnen. Die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, filtriert und unter Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 8,0 m*l* Chloroform/Methanol 3:2 gelöst, davon wurden 50-μl-Proben für die quantitative analytische Dünnschichtchromatographie verwendet. Diese Trennung erfolgte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel H mit 10% Magnesiumsilikat[26]. Nach dem Entwickeln in der ersten Dimension in Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 wurde die Platte 10 Min. im Stickstoff-Strom getrocknet. Laufmittel in der zweiten Richtung war n-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1. Auf der getrockneten Platte wurden die Lipoidflecken in einer mit Jod gesättigten Kammer sichtbar gemacht (Abb. 9). Wie die Abb. 9 zeigt, gelingt so eine einwandfreie Trennung der Phospholipoide Phosphatidyl-cholin, Phosphatidyl-äthanolamin und Sphingomyelin, während die Trennung von Phosphatidyl-serin und -inosit nicht gleichmäßig gut war. Die Identität der Flecken der 3 erstgenannten Verbindungen ergab sich aus eindimensionalen Vergleichschromatogrammen von Gesamtlipoid und bekannten Testsubstanzen in beiden Fließmitteln. Nach Besprühen mit ZINZADZE-Reagens[27] zeigten alle 5 Verbindungen eine Blaufärbung, Phosphatidyl-äthanolamin und -serin erwiesen sich als Ninhydrin-positiv.

Die phospholipoidhaltigen Flecken von 3 Platten wurden in Zentrifugengläser überführt und nach FISKE-SUBBAROW in der Modifikation von BARTLETT[28] auf Phosphor untersucht. Die Extinktion wurde jedoch bei 660 mμ gemessen, weil bei dieser Wellenlänge der durch das Kieselgel verursachte relative Fehler der Extinktion gleich Null ist. Dabei ist die Extinktion für 0,1 μMol P = 0,192. Als Testsubstanz diente Diphenylphosphat. Die phospholipoidhaltigen Flecken zweier weiterer Platten wurden zur Radioaktivitätsbestimmung in Zählgläschen mit 10 m*l* Szintillatorlösung* und 1 m*l* Hyamin-Base** gebracht. Durch die Hydrolyse mit Hyamin-Base wird ein Haften der Phosphatide an der Gläschenwand verhindert und eine konstante Zählausbeute erzielt. Wegen des unübersichtlichen Effektes des Kieselgels auf die Zählausbeute wurde für jede Probe die Zählausbeute durch Zugabe eines inneren Standards gesondert bestimmt. Die Messungen erfolgten im Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb Model 3214, Packard, La Grange (USA). Die spezif. Aktivitäten sind in Zpm/μMol Phosphat (Phospholipoid) angegeben.

Zur Präparation einer Phosphatidyl-äthanolamin- und einer Phosphatidyl-cholin-Fraktion aus dem Gesamtlipoidextrakt eines jeden Versuches führten wir unter standardisierten Bedingungen säulenchromatographische Trennungen nach HANAHAN[22] durch. Dreiviertel der Gesamtlipoide mit bis zu 0,7 mg Lipoid-Phosphor wurden in Säulen von 1 cm Durchmesser an 2 g Kieselsäure, die vorher 12 Stdn. bei 110°C aktiviert worden war, und 1 g Hyflo-Supercel chromatographiert. Die Probe wurde in wenig Chloroform gelöst aufgetragen.

Folgendes Elutionsschema wurde exakt eingehalten:

I. Chloroform	35 m*l*	Neutralfette,
II. Chloroform/Methanol 9:1	14 m*l*	freie Fettsäuren
III. Chloroform/Methanol 4:1	25 m*l*	Phosphatidyl-äthanolamin
IV. Chloroform/Methanol 3:2a (a: 1. Fraktion)	40 m*l*	Phosphatidyl-cholin, Phosphatidyl-serin, Phosphatidyl-inosit

[26] G. ROUSER, G. KRITCHEVSKY, C. GALLI u. D. HELLER, J. Amer. Oil Chemists Soc. **42**, 215 [1965].

[27] J. C. DITTMER u. R. L. LESTER, J. Lipid Res. **5**, 126 [1964].

[28] G. R. BARTLETT, J. biol. Chemistry **234**, 466 [1959].

* 5 g 2.5-Diphenyl-oxazol (PPO) und 0,3 g 1.4-Bis-[4-methyl-5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP) in 1 *l* Toluol.

** 1% Dimethyl-[2-[2-(*p*-diisobutyl-methyl-phenoxy)-äthoxy]-äthyl]benzyl-ammoniumhydroxyd.

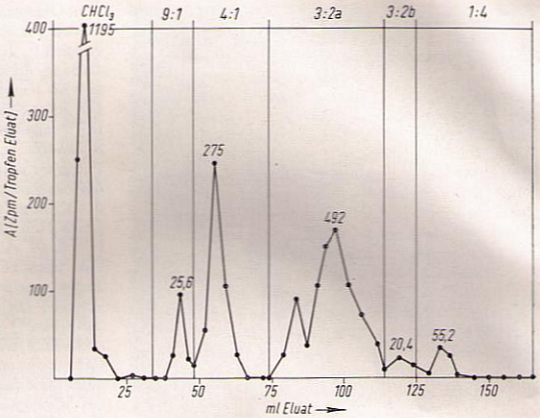

Abb. 10. Säulenchromatographische Auftrennung des Lipoid-Gesamtextraktes der mit $\Delta^{6.9.12}$-iso-C_{18}-Säure inkubierten Zellen. Die senkrechten Linien bezeichnen die Fraktionswechsel, dazwischen ist das Chloroform - Methanol - Mischungsverhältnis angegeben (vgl. S. 223). Die Zahlen über den Gipfeln geben nach Multiplikation mit 10^3 die Radioaktivität der Fraktionen in Zpm. an.

V. Chloroform/Methanol 3:2b (b: 2. Fraktion)	15 ml	Spuren von Phosphatidylcholin und Sphingomyelin
VI. Chloroform/Methanol 1:4	40 ml	Sphingomyelin

Dabei wurde die Elution durch Auffangen von einzelnen Tropfen in Zählgläschen und Messung ihrer Radioaktivität laufend kontrolliert. In Abb. 10 ist eines der auf diese Weise gewonnenen Elutionsmuster wiedergegeben.

Die Reinheit der Fraktionen wurde dünnschichtchromatographisch geprüft (Abb. 11). Danach wurde mit der 4:1-Fraktion (III) regelmäßig sauberes Phosphatidyl-äthanolamin gewonnen, die 3:2a-Fraktion (IV) enthielt neben dem Phosphatidyl-cholin noch das Phosphatidyl-serin und Phosphatidyl-inosit.

Die Phospholipoide der Fraktionen III und IV wurden mit Phospholipase A gespalten. Dazu wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff abgeblasen und der Rückstand in 5 ml Äther gelöst. Nach Zugabe von 1 mg Phospholipase A von *Crotalus adamanteus* in 0,1 ml 0,1M Trispuffer, pH 7,4, der 0,01M an Ca Cl war, wurde 6 Stdn. bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurde der Äther im Stickstoffstrom abgedampft und das Wasser durch wiederholte Zugabe von etwas Methanol und erneutes Einengen im Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Chloroform/Methanol aufgenommen und in der für die Auftrennung des Gesamtextraktes beschriebenen Weise an Kieselsäure chromatographiert. Die Hydrolyseprodukte von Fraktion III (Phosphatidyl-äthanolamin) wurden nach folgendem Elutionsschema getrennt:

Chloroform/Methanol 9:1	14 ml	Freie Fettsäuren
Chloroform/Methanol 4:1	25 ml	Evtl. vorhandenes ungespaltenes Phosphatidyl-äthanolamin
Methanol	100 ml	Lyso-Phosphatidyl-äthanolamin

Die Spaltprodukte der Fraktion IV wurden in folgenden Fraktionen isoliert:

Chloroform/Methanol 9:1	14 ml	Freie Fettsäuren
Chloroform/Methanol 3:2	35 ml	Evtl. vorhandenes ungespaltenes Phosphatidyl-cholin
Methanol	100 ml	Lyso-Phosphatidyl-cholin

Abb. 12 gibt die Radioaktivitätsverteilungen in den Eluaten dieser Säulentrennungen wieder.

Die einzelnen Fraktionen wurden im Vak. eingeengt, die Rückstände mit gleichen Volumina Lösungsmittel versetzt und dünnschichtchromatographisch untersucht (Abb. 13 und 14).

Zur Ermittlung der spezif. Aktivitäten von Lyso-Phosphatidyl-cholin und Lyso-Phosphatidyl-äthanolamin wurden für jede Bestimmung fünf gleiche Teile der entsprechenden Fraktion auf Phosphor-freien Platten mit Kieselgel H und 10% Magnesiumsilikat und mit Chloroform/Methanol/Wasser als Laufmittel chromatographiert. In der oben für die Analyse der Phospholipoide beschriebenen Weise wurden drei dieser Flecken auf ihren P-Gehalt und 2 auf ihre Radioaktivität untersucht.

Die Reste der Lyso-Phospholipoid-Fraktionen wurden mit 5proz. HCl in Methanol umgeestert. Die aus den

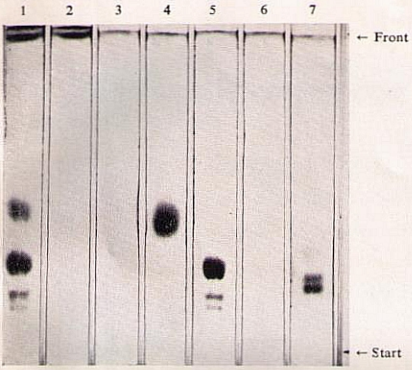

Abb. 11. Dünnschichtchromatogramm der auf Kieselsäure getrennten Fraktionen des Gesamtlipoidextraktes ($\Delta^{6.9}$-C_{18}-Säure-Versuch). Kieselgel H + 10% Mg-Silikat, 30 Min. bei 110°C aktiviert, Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4. Anfärben des Chromatogramms durch Besprühen mit $K_2Cr_2O_7$-gesätt. 70proz. H_2SO_4 und anschließendes Veraschen für 30 Min. bei 180°C. Vor dem Auftragen der Proben wurde der Kieselgel-Belag in Bahnen unterteilt, die ein Abweichen der wandernden Flecken von der vertikalen Laufrichtung verhinderten. Es wurden gleiche aliquote Teile aufgetragen vom Gesamtlipoidextrakt vor der Trennung (1) und den Chloroform/Methanolfraktionen 1:0 (2), 9:1 (3), 4:1 (4), 3:2a* (5), 3:2b* (6) und 1:4 (7). Die 4:1-Fraktion enthält reines Phosphatidyl-äthanolamin, in der 3:2a* Fraktion sind unter dem starken Flecken, dem Phosphatidyl-cholin, noch zwei schwächere Komponenten zu sehen. Sie wurden durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie als Phosphatidyl-inosit im oberen und Phosphatidyl-serin im unteren Flecken identifiziert. Nach den Angaben von HANAHAN[22] ist das Auftreten dieser beiden Komponenten im Beginn der 3:2-Fraktion zu erwarten. Ihnen dürfte der kleinere Radioaktivitätsgipfel im Aktivitätsdiagramm Abb. 10, der regelmäßig beobachtet wurde, entsprechen.

* a und b: s. Method. Teil S. 223-224.

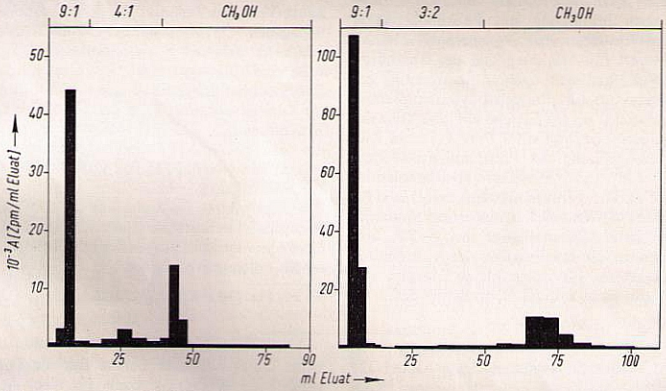

Abb. 12. Säulenchromatographische Auftrennung der Spaltprodukte von Phosphatidyl-äthanolamin und -cholin nach Inkubation mit Phospholipase A. Es wurden Fraktionen von 2,0, 3,0 und 5,0 m*l* aufgefangen und aliquote Teile zur Aktivitätsbestimmung entnommen. An der oberen Abszisse sind die Mischungsverhältnisse von Chloroform und Methanol angegeben (vgl. S. 224). Die mit demselben Elutionsmittel erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt. Ordinate: Aktivität (*A*) in Zpm/m*l* Eluat.

Phospholipase-A-Spaltungsansätzen isolierten Fettsäuren wurden mit BF_3-Methanol verestert. Die so erhaltenen Fettsäure-methylester wurden radiogaschromatographisch untersucht.

Die Radiogaschromatographie führten wir mit dem Gaschromatographen der Firma Packard durch. Als stationäre Phase diente 15proz. Äthylenglykol-Bernsteinsäure-Polyester auf Kieselgur in Säulen von 180 cm Länge, als Trägergas Argon. Säulentemperatur und Durchflußgeschwindigkeit sind unter den Abbildungen wiedergegeben. Das den Argon-Ionisationsdetektor verlassende Trägergas mit den Fettsäurekomponenten

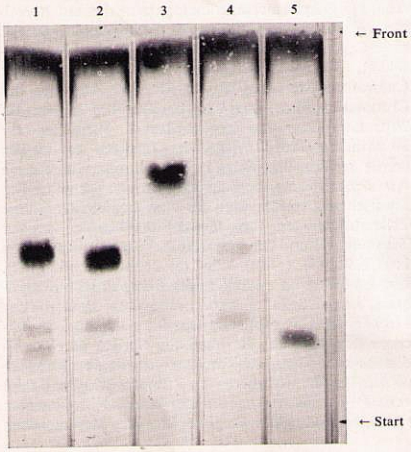

Abb. 13. Dünnschichtchromatogramm der auf Kieselsäure getrennten Spaltungsprodukte von *Phosphatidyläthanolamin* nach Inkubation mit Phospholipase A ($\Delta^{5.8}$-C_{14}-Säure-Versuch). (1) Phosphatidyl-äthanolamin-Testsubstanz, (2) Aliquoter Teil des Spaltungssubstrates, der 4:1-Fraktion nach Säulentrennung des Gesamtlipoidextraktes (im Phosphatidyl-äthanolamin-Fleck 29 nMol P). (3) bis (5) Gleiche aliquote Teile der Fraktionen Chloroform/Methanol 9:1, 4:1 und Methanol nach Auftrennung des Phospholipase-A-Spaltungsansatzes (im Lyso-Phosphatidyl-äthanolamin-Fleck 32 nMol P). Die Verunreinigungen in (1) und (2) treten auch dann auf, wenn die in Chloroform/Methanol gelösten Phosphatidyl-äthanolamine bei -20^0 aufbewahrt werden. In der 4:1-Fraktion der Auftrennung des Spaltungsansatzes (4) treten kleine Mengen von nicht gespaltenem Phosphatidyl-äthanolamin auf.

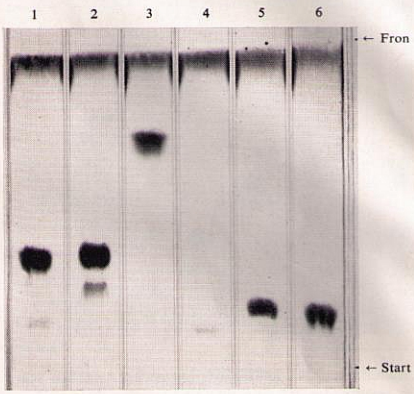

Abb. 14. Dünnschichtchromatogramm der auf Kieselsäure getrennten Spaltungsprodukte von *Phosphatidylcholin* nach Inkubation mit Phospholipase A ($\Delta^{5.8}$-C_{14}-Säure-Versuch). Technik: Wie in der Legende zu Abb. 11 angegeben. (1) Phosphatidyl-Cholin-Testsubstanz. (2) Aliquoter Teil des Spaltungssubstrates, der Fraktion 3:2a* nach Säulentrennung des Gesamtlipoidextraktes (im Phosphatidyl-cholin-Flecken 43,8 nMol P). (3) bis (5) Gleiche aliquote Teile der Chloroform/Methanol-Fraktionen 9:1, 3:2 und Methanol nach Auftrennung des Phospholipase A-Spaltungsansatzes (im Lyso-Phosphatidyl-cholin-Flecken 42,5 nMol P). (6) 55 nMol Lyso-Phosphatidyl-cholin-Testsubstanz. In der 3:2-Zwischenfraktion (4) findet sich ein deutlich von Lyso-Phosphatidyl-cholin verschiedener Fleck, dessen R_F dem eines Lyso-Phosphatidyl-serins oder Lyso-Phosphatidyl-inosits entsprechen könnte.

* a und b: s. Method. Teil S. 223-224.

wurde in den Verbrennungsofen Packard Model 325 geleitet und strömte von da mit dem entstandenen $^{14}CO_2$ weiter durch die Durchflußzelle, die in der Zählkammer des Scintillationszählers stand. Die Registrierung der Zerfallsrate erfolgte auf einem zweiten Schreiber. Die quantitative Auswertung der einem „peak" zuzuordnenden Zerfälle wurde so durchgeführt, daß nach dem Auftreten eines Aktivitäts-„peaks" auf dem zweiten Schreiber der Zählvorgang von Hand beendet wurde. Von den bis zu diesem Zeitpunkt gezählten Zerfällen wurde ein Nullwert von 30 Zpm abgezogen. Zur Kontrolle dieser Methode konnte das die Durchflußzelle verlassende Trägergas auch in eine Äthanolamin-Szintillatorlösung** geleitet werden, in der das $^{14}CO_2$ absorbiert wurde. Die so gewonnenen Meßwerte deckten sich mit denen, die die oben beschriebene Methode lieferte.

** 500 m*l* Toluol, 400 m*l* Dimethylglykol, 50 m*l* frisch destilliertes Äthanolamin, 6 g PPO und 0,3 g Dimethyl-POPOP.