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

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 348, S. 882—890, Juli 1967

# Die enzymatische Acylierung von Lysophosphatidsäure, gesättigtem und ungesättigtem Lysolecithin

Von WILHELM STOFFEL, MARIA ELENA DE TOMÁS und HANS-GERD SCHIEFER

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

(Der Schriftleitung zugegangen am 2. Mai 1967)

**Zusammenfassung:** Die enzymatische Acylierung von Lysophosphatidsäure, gesättigtem und ungesättigtem Lysolecithin mit Paaren konkurrierender gesättigter, Monoen- und Polyen-Fettsäure-CoA-Ester als Substraten wurde untersucht.
Die molaren Verhältnisse der in die 2-Stellung der Lysophosphatidsäure inkorporierten Fettsäuren unterschieden sich nur wenig. Der Einbau der Fettsäuren war unabhängig von Struktur, Kettenlänge und Zahl der Doppelbindungen.
Gesättigtes Lysolecithin als Akzeptor zeigte eine deutliche Spezifität im Fettsäure-Einbau: Di-, Tri- und Tetraenfettsäuren wurden gegenüber den gesättigten und Monoen-Fettsäuren bevorzugt in die 2-Stellung des Lysolecithins eingebaut. Konkurrierende Fettsäuren mit je zwei und mehr Doppelbindungen wurden anderseits fast in äquimolarem Verhältnis eingebaut.
Die Kinetiken der Acylierungsreaktion mit ungesättigtem Lysolecithin als Akzeptor wiesen im Vergleich zum gesättigten Lysolecithin auf einen rascheren Fettsäure-Einbau hin, der Fettsäure-Gesamteinbau war höher, die Spezifität für ungesättigte Fettsäuren noch ausgeprägter.
Bei Acyl-CoA-Paaren, die als eine Komponente Palmitoyl-CoA enthielten, beobachtete man mit gesättigtem Lysolecithin als Akzeptor einen zwei- bis dreimal so hohen relativen und absoluten Einbau der gesättigten Fettsäure in die 2-Stellung wie mit ungesättigtem Lysolecithin, wo der Einbau der Palmitinsäure gegenüber den Polyenfettsäuren stark zurückgedrängt ist. Entsprechende Befunde wurden für Acyl-CoA-Paare, die als eine Komponente Linoloyl-CoA enthielten, mit ungesättigtem Lysolecithin als Akzeptor erhoben.

---

**Summary:** Experiments are described on the enzymatic acylation of lysophosphatidic acid, and saturated and unsaturated lysolecithin with pairs of competing saturated, monoenoic and polyenoic fatty acids.
The molar ratios of the different fatty acids which were incorporated in high yield into the 2-position of lysophosphatidic acid, were very similar. The incorporation of the fatty acids was independent of their structure, chain length and number of double bonds.
If saturated lysolecithin was the acceptor, a distinct specificity for polyenoic fatty acids was apparent: di-, tri- and tetraenoic fatty acids were preferred to

---

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

*Enzyme:* Phospholipase A = Phosphatid-Acyl-Hydrolase (EC 3.1.1.4); Phospholipase D = Phosphatidylcholin-Phosphatidohydrolase (EC 3.1.4.4); Acyl-CoA: Lysophosphatidsäure-*O*-Acyltransferase (EC 2.3.1.?); Acyl-CoA: Lysolecithin-*O*-Acyltransferase (EC 2.3.1.?); Acyl-CoA: 1.2-Diglycerid-*O*-Acyltransferase (EC 2.3.1.20); CDP-Cholin: 1.2-Diglycerid-Cholinphosphotransferase (EC 2.7.8.2); CDP-Äthanolamin: 1.2-Diglycerid-Äthanolaminphosphotransferase (EC 2.7.8.1).

*Abkürzungen:* DFP = Diisopropylfluorophosphat; Phosphatidsäure = 1.2-Diacyl-L-glycerin-3-phosphorsäure; Phosphatidsäure-dimethylester = 1.2-Diacyl-L-glycerin-3-phosphorsäure-dimethylester; Lysophosphatidsäure = 1-Acyl-L-glycerin-3-phosphorsäure; Lysolecithin = 1-Acyl-L-glycerin-3-phosphorylcholin; gesättigtes Lysolecithin = 1-Acyl-L-glycerin-3-phosphorylcholin mit 18% Palmitin- und 82% Stearinsäure; ungesättigtes Lysolecithin = 1-Acyl-L-glycerin-3-phosphorylcholin mit 18% Palmitin-, 80% Linol- und 2% Stearin- und Ölsäure; 1.2-Diglycerid = 1.2-Diacyl-L-glycerin.

the saturated and monoenoic fatty acids. On the other hand, competing fatty acids with two and more double bonds each were incorporated in almost equimolar ratios.
The kinetics of the acylation reaction with unsaturated lysolecithin as acceptor indicate a higher acylation rate. An even more pronounced specificity for unsaturated fatty acids was found.
Using pairs of acyl-coenzyme A-esters, one of which was $C_{16}$, the absolute and relative incorporation of this saturated fatty acid into the 2-position of saturated lysolecithin was twice to three times higher than into unsaturated lysolecithin. Using pairs of acyl-CoA-esters, one of which was $\Delta^{9,12}$-$C_{18}$, the latter was much better incorporated into unsaturated lysolecithin than into saturated lysolecithin.

---

In den Glycerophosphatiden der tierischen Zelle sind die Fettsäuren asymmetrisch angeordnet: die 1-Stellung ist vorwiegend mit gesättigten, die 2-Stellung vorwiegend mit ungesättigten Fettsäuren besetzt[1]. Die für die asymmetrische Fettsäurenverteilung verantwortlichen Biosynthese-Reaktionen sind noch nicht gesichert. LANDS[2,3] nimmt an, daß das neusynthetisierte Lecithin[4] durch eine intrazelluläre Phospholipase A deacyliert und die entstandene Lysoverbindung durch fettsäure- und akzeptorspezifische Acyl-CoA:Lysophosphatid-Acyltransferasen, die an das endoplasmatische Reticulum gebunden sind, reacyliert wird.
In früheren Untersuchungen[5] über die Biosynthese von Membranphosphatiden berichteten wir über die enzymatische Acylierung des Lysolecithins und der Lysophosphatidsäure durch gesättigte, Monoen- und Polyen-Fettsäure-CoA-Ester. Die Geschwindigkeit der Acylierung der Lysophosphatidsäure war zwei- bis dreimal größer als die des Lysolecithins; die Kinetik der Acylierungsreaktion war für alle untersuchten Acyl-CoA-Ester fast gleich. Die Acylierung des Lysolecithins mit verschiedenen $C_{18}$- und $C_{20}$-Monoen- und Polyenfettsäure-CoA-Estern verlief wenig spezifisch; die träge Kinetik der Acylierung mit $C_{16}$-Fettsäure-CoA-Estern wies auf eine Kettenlängenspezifität hin. Auch die $\Delta^{6,9,12}$-Iso-$C_{18}$-Fettsäure, also eine Fettsäure mit „unnatürlicher Struktur" hinsichtlich des Methylendes, wurde mit hoher Ausbeute in die 2-Stellung des Lysolecithins eingebaut. Auf Grund der sehr ähnlichen Kinetiken der Acylierung des Lysolecithins mit verschiedenen Acyl-CoA-Estern schlossen wir auf eine einzige Acyl-CoA:Lysolecithin-Acyltransferase, die eine hohe Affinität für Polyenfettsäure-CoA-Ester mit 18 und 20 C-Atomen besitzt.
In der vorliegenden Arbeit soll über Untersuchungen zu folgenden Fragen berichtet werden:

1. welchen Einfluß hat die sterische Konfiguration des Lysolecithins auf die Acylierungsgeschwindigkeit, wenn die 1-Stellung des Akzeptormoleküls mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren besetzt ist? Welchen Einfluß hat die durch die Kettenlänge und die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül bedingte sterische Form der Kohlenstoffkette der Acyl-CoA-Ester bei der Acylierung dieser Akzeptoren?

2. wie ist die Fettsäureverteilung, wenn gleichzeitig zwei verschiedene Acyl-CoA-Ester in gleicher Konzentration bei der Acylierungsreaktion mit Lysophosphatidsäure und Lysolecithin als Akzeptoren eingesetzt werden? Werden die Fettsäuren unabhängig von ihrer Struktur im molaren Verhältnis 1:1 eingebaut oder ergeben sich Hinweise für eine Konkurrenzreaktion, etwa in dem Sinne, daß stärker ungesättigte oder längerkettige Fettsäure-CoA-Ester bevorzugt eingebaut werden?

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen als Enzymquelle die Mikrosomenfraktion aus Rattenleber. Die Acyl-CoA:Lysolecithin-*O*-Acyltransferase- und die Acyl-CoA:Lysophosphatidsäure-*O*-Acyltransferase-Reaktion wurden mit Hilfe des Reagenzes nach ELLMAN[6] spektrophotometrisch verfolgt[3,5]. In einer früheren Untersuchung[5] mit Lysolecithin als Akzeptor fanden wir eine befriedigende Übereinstimmung zwischen der nach dem optischen Test berechneten Menge an freigesetztem CoA und der in 2-Stellung des Lecithins inkorporierten Menge radioaktiv markierter Fettsäuren.

---

[1] D. J. HANAHAN, H. BROCKERHOFF u. E. J. BARRON, J. biol. Chemistry **235**, 1917 [1960].
[2] W. E. M. LANDS, J. biol. Chemistry **235**, 2233 [1960]; W. E. M. LANDS u. I. MERKL, ebenda **238**, 898 [1963].
[3] W. E. M. LANDS u. P. HART, J. biol. Chemistry **240**, 1905 [1965].
[4] E. P. KENNEDY, Federat. Proc. **16**, 847 [1957]; L. F. BORKENHAGEN u. E. P. KENNEDY, J. biol. Chemistry **227**, 951 [1957]; S. B. WEISS, E. P. KENNEDY u. J. Y. KIYASU, ebenda **235**, 40 [1960].
[5] W. STOFFEL, H.-G. SCHIEFER u. G. D. WOLF, diese Z. **347**, 102 [1966].
[6] G. L. ELLMAN, Arch. Biochem. Biophysics **82**, 70 [1959].

*1. Acylierung von gesättigtem und ungesättigtem Lysolecithin mit gesättigten, Monoen- und Polyenfettsäuren*

Abb. 1 gibt die im optischen Test gemessenen Kinetiken der Acylierung des gesättigten und ungesättigten Lysolecithins mit den angegebenen Fettsäure-CoA-Estern wieder. Mit ungesättigtem Lysolecithin als Akzeptor ist die Anfangsgeschwindigkeit der Acyltransferase-Reaktion etwa zwei- bis viermal so groß wie mit gesättigtem Lysolecithin. Mit ungesättigtem Lysolecithin als Akzeptor und den CoA-Estern der Fettsäuren $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$, $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ und $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ läuft die Reaktion innerhalb weniger Minuten bis zum Gleichgewicht, während die Reaktion mit gesättigtem Lysolecithin als Akzeptor langsamer abläuft, aber — sofern man die Reaktion lange genug verfolgt — den gleichen Endwert erreicht wie die Reaktion mit ungesättigtem Lysolecithin.

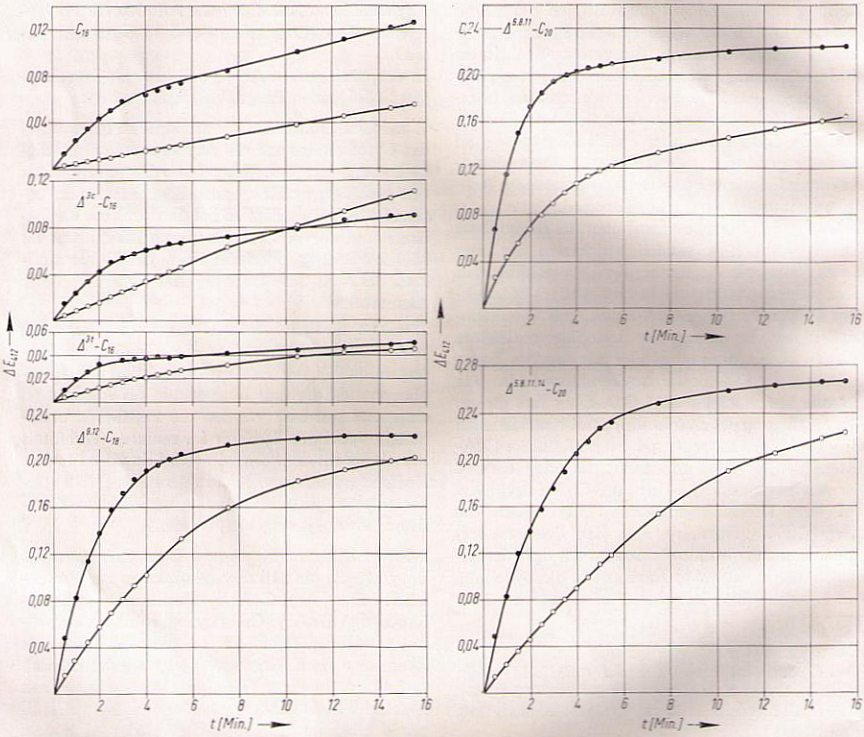


Abb. 1. Kinetik der Acylierung von gesättigtem (o——o) und ungesättigtem (•——•) Lysolecithin mit radioaktiv markierten CoA-Estern der jeweils angegebenen Fettsäuren. Jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 ml: 1 μMol ELLMAN-Reagenz; 0,1 μMol Acyl-CoA; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 2 mg Mikrosomenprotein (Vorinkubation mit DFP). Die Leerküvette enthielt kein Acyl-CoA. Start der Reaktion zur Zeit 0 durch Zugabe von 0,1 μMol gesättigtem oder ungesättigtem Lysolecithin. Messung der Extinktionszunahme bei 412 mμ.

*2. Acylierung der Lysophosphatidsäure 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat und des gesättigten und ungesättigten Lysolecithins mit Kombinationen von zwei verschiedenen gesättigten, Monoen- und Polyenfettsäure-CoA-Estern*

Wir untersuchten als Substrate der Acylierungsreaktion folgende Kombinationen von Acyl-CoA-Estern:

$C_{16}$ und $\Delta^{9}$-$C_{18}$; $C_{16}$ und $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$; $C_{16}$ und $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$; $C_{16}$ und $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$; $\Delta^{9}$-$C_{18}$ und $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$; $\Delta^{9}$-$C_{18}$ und $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$; $\Delta^{9}$-$C_{18}$ und $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$; $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ und $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$; $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ und $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$; $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ und $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$.

Wir bestimmten für jede Fettsäurekombination aus der im optischen Test mit Hilfe des Reagenzes nach ELLMAN[6] gemessenen Extinktionsdifferenz (Tab., Spalte 1) die Gesamtmenge an freigesetztem CoA (Spalte 2), die dem Gesamteinbau in das Phosphatid entspricht. Um die Reaktionsprodukte isolieren und analysieren zu können, wurden die Ansätze verfünffacht: der aus dem optischen Test bestimmte Fettsäureeinbau (Spalte 2) wurde entsprechend umgerechnet (Spalte 3). Die Aufarbeitung der Inkubationsansätze ist im experimentellen Teil ausführlich beschrieben. Die Phosphatidsäure isolierten wir, indem wir das extrahierte Lipoidgemisch mit Diazomethan umsetzten[7]; die Phosphatidsäuredimethylester wurden dünnschichtchromatographisch (System: Chloroform) von den übrigen Lipoiden abgetrennt (Abb. 2).

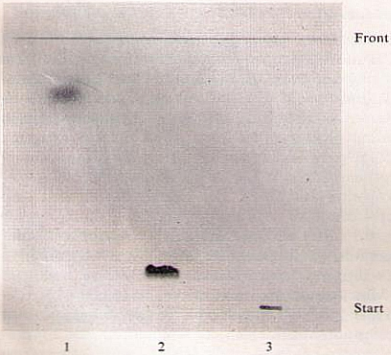


Abb. 2. Dünnschichtchromatogramm von Fettsäuremethylester (1), Phosphatidsäure-dimethylester (2) und Lecithin (3). Nicht-aktivierte Kieselgel-H-Schicht. Laufmittel: Chloroform. Anfärbung durch Besprühen mit $K_2Cr_2O_7$-gesätt. 70proz. Schwefelsäure und anschließendes Veraschen bei 180°C während 30 Min.

Die Methylester der in die 2-Stellung des Phosphatids eingebauten radioaktiven Fettsäuren wurden gaschromatographisch[8] analysiert. Aus der gemessenen Radioaktivität und der bekannten spezifischen Aktivität wurde der Einbau der einzelnen Fettsäuren in das Phosphatidmolekül bestimmt und auf den nach dem optischen Test berechneten Gesamteinbau (Spalte 3) bezogen (Spalte 4). Die molaren Verhältnisse der eingebauten Fettsäuren sind in Spalte 5 wiedergegeben.

Mit *Lysophosphatidsäure* als Akzeptor findet man für alle untersuchten Fettsäurekombinationen gegenüber Lysolecithin eine höhere Gesamteinbaurate. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da wir bei früheren Untersuchungen[5] mit Arachidonoyl-CoA als Substrat für 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat als Akzeptor $K_m = 0{,}8 \cdot 10^{-6}$ bestimmt hatten gegenüber $K_m = 5{,}0 \cdot 10^{-5}$ für Lysolecithin als Akzeptor. Der Gesamteinbau weist für die verschiedenen Fettsäurekombinationen nur geringe Unterschiede auf. Die Ölsäure wird gegenüber Palmitinsäure und allen Polyenfettsäuren, die Linolsäure gegenüber der Tri- und Tetraenfettsäure bevorzugt eingebaut. Die Unterschiede in den molaren Verhältnissen der in die 2-Stellung inkorporierten Fettsäuren sind gering.

Der Gesamteinbau der Fettsäuren in das *Lysolecithin* ist dann hoch, wenn in der Fettsäurekombination zwei oder mehr Doppelbindungen vorhanden sind. Di-, Tri- und Tetraenfettsäuren werden im Vergleich zu den gesättigten und Monoenfettsäuren bevorzugt in die 2-Stellung des Lysolecithins eingebaut. Mit ungesättigtem Lysolecithin als Akzeptor betragen die molaren Verhältnisse der eingebauten Fettsäuren z. B. für die Kombination $C_{16}$ und $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ 1:28, für die Kombination $C_{16}$ und $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ 1:15. Wenn bei der Acylierung der 2-Stellung des Lysolecithins Fettsäuren mit je zwei und mehr Doppelbindungen konkurrieren, werden die Fettsäuren nahezu in äquimolarem Verhältnis eingebaut: Kombination $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ und $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ 1:0,5; Kombination $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ und $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ 1:2.

---

[7] E. BAER u. J. MAURUKAS, J. biol. Chemistry **212**, 39 [1955].

[8] W. STOFFEL, diese Z. **333**, 71 [1963].

*I. Lysophosphatidsäure*

| Fettsäure-kombination | Optischer Test (1facher Ansatz) $\Delta E_{412}$ 1 | nMol freiges. Coenzym A 2 | Inkubationsansatz (5facher Ansatz) Gesamteinbau [nMol Fettsäure] 3 | Einbau der Komponenten [nMol Fettsäure] 4 | Molares Verhältnis der eingebauten Fettsäuren 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| $C_{16}$ $\Delta^{9}$-$C_{18}$ | 0,321 | 47,2 | 236 | 58,6 177,4 | 1/3,0 |
| $C_{16}$ $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ | 0,335 | 49,3 | 246 | 90 156 | 1/1,7 |
| $C_{16}$ $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ | 0,339 | 49,8 | 249 | 138 111 | 1/0,8 |
| $C_{16}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,335 | 49,3 | 246 | 115 131 | 1/1,1 |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$ $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ | 0,336 | 49,5 | 247 | 150 97,5 | 1/0,7 |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ | 0,285 | 41,9 | 208 | 160 48 | 1/0,3 |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,309 | 45,5 | 228 | 154 74 | 1/0,5 |
| $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ | 0,356 | 52,5 | 262 | 183 79 | 1/0,4 |
| $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,346 | 51,0 | 255 | 149 106 | 1/0,7 |
| $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,312 | 46,0 | 230 | 110 120 | 1/1,1 |

*II. Gesättigtes Lysolecithin**

| Fettsäure-kombination | Optischer Test (1facher Ansatz) $\Delta E_{412}$ 1 | nMol freiges. Coenzym A 2 | Inkubationsansatz (5facher Ansatz) Gesamteinbau [nMol Fettsäure] 3 | Einbau der Komponenten [nMol Fettsäure] 4 | Molares Verhältnis der eingebauten Fettsäuren 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| $C_{16}$ $\Delta^{9}$-$C_{18}$ | 0,107 | 15,7 | 78,5 | 14,8 63,7 | 1/4,3 |
| $C_{16}$ $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ | 0,219 | 32,2 | 161 | 24,5 136,5 | 1/5,6 |
| $C_{16}$ $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ | 0,234 | 34,4 | 172 | 12,5 159 | 1/12,7 |
| $C_{16}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,194 | 28,6 | 143 | 27,4 116 | 1/4,3 |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$ $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ | 0,195 | 28,7 | 144 | 20,6 123 | 1/6 |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ | 0,210 | 30,9 | 154 | 44,4 110 | 1/2,5 |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,214 | 31,5 | 158 | 15 143 | 1/9,5 |
| $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ | 0,322 | 47,5 | 238 | 165 73 | 1/0,4 |
| $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,190 | 28 | 140 | 60 80 | 1/1,3 |
| $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,229 | 33,7 | 169 | 65 104 | 1/1,6 |

*III. Ungesättigtes Lysolecithin**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $C_{16}$ $\Delta^{9}$-$C_{18}$ | 0,105 | 15,5 | 77,5 | 8,8 68,7 | 1/7,8 |
| $C_{16}$ $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ | 0,290 | 42,5 | 212 | 7,6 204 | 1/27,5 |
| $C_{16}$ $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ | 0,287 | 42,2 | 211 | 10 201 | 1/20,5 |
| $C_{16}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,212 | 31,2 | 156 | 10 146 | 1/14,9 |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$ $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ | 0,272 | 40,0 | 200 | 25,8 174 | 1/6,8 |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ | 0,251 | 37,0 | 185 | 52 133 | 1/2,6 |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,230 | 33,8 | 169 | 45 124 | 1/2,8 |
| $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ | 0,324 | 47,5 | 238 | 155 83 | 1/0,5 |
| $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,264 | 38,8 | 194 | 94 100 | 1/1,1 |
| $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$ $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$ | 0,284 | 41,7 | 209 | 76 133 | 1/1,8 |

* s. Fußnote zu Beginn der Arbeit.

Legende zu den Tabellen I—III

Enzymatische Acylierung der Lysophosphatidsäure 1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphat und von gesättigtem und ungesättigtem Lysolecithin mit verschiedenen Kombinationen von zwei radioaktiv markierten Acyl-CoA-Estern. Optischer Test: jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 m*l*: 1 μMol ELLMAN-Reagenz; je 0,1 μMol beider Acyl-CoA-Ester; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 2 mg Mikrosomenprotein (Vorinkubation mit DFP). Die Leerküvette enthielt kein Acyl-CoA. Start der Reaktion zur Zeit 0 durch Zugabe von 0,1 μMol Mononatriumsalz der Lysophosphatidsäure oder gesättigtem oder ungesättigtem Lysolecithin in wäßriger Lösung. Messung von $\Delta E_{412}$ innerhalb 15 Min. Aus der Extinktionsdifferenz (Spalte 1) errechnet man mit Hilfe einer Eichkurve oder des spezifischen Absorptionskoeffizienten der Chinonform der 2-Nitro-5-mercapto-benzoesäure die Gesamtmenge freigesetzten CoA's (Spalte 2), die dem Gesamteinbau in das Phosphatid entspricht. Zur Isolierung und Analyse der Reaktionsprodukte wurden die Inkubationsansätze gegenüber dem optischen Test verfünffacht, der Gesamtfettsäureeinbau (Spalte 2) wurde entsprechend umgerechnet

* s. Fußnote zu Beginn der Arbeit.

Fortsetzung der Legende zu den Tabellen

(Spalte 3). Extraktion und Reinigung der Reaktionsprodukte s. exper. Teil. Die Methylester der 2-ständigen radioaktiven Fettsäuren wurden gaschromatographisch analysiert. Aus der gemessenen Radioaktivität und der bekannten spezifischen Aktivität wurde der Einbau der einzelnen Fettsäuren in das Phosphatid bestimmt und auf den Gesamtfettsäureeinbau (Spalte 3) bezogen (Spalte 4). Die molaren Verhältnisse der eingebauten Fettsäuren sind in Spalte 5 angegeben.

Spezifische Aktivität der Fettsäure-CoA-Ester:

| | |
|---|---|
| $C_{16}$: | 370 000 Zpm/μMol |
| $\Delta^{9}$-$C_{18}$: | 340 000 Zpm/μMol |
| $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$: | 330 000 Zpm/μMol |
| $\Delta^{5.8.11}$-$C_{20}$: | 800 000 Zpm/μMol |
| $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$: | 3 340 000 Zpm/μMol |

Vergleicht man die Acylierungsreaktion mit gesättigtem und ungesättigtem Lysolecithin als Akzeptoren, so zeigt sich im allgemeinen eine trägere Kinetik für gesättigtes Lysolecithin. Die molaren Verhältnisse der in die 2-Stellung eingebauten Fettsäuren unterscheiden sich für gesättigtes und ungesättigtes Lysolecithin bei einigen Fettsäurekombinationen deutlich voneinander: z. B. $C_{16}$ und $\Delta^{9.12}$-$C_{18}$; $C_{16}$ und $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$; $\Delta^{9}$-$C_{18}$ und $\Delta^{5.8.11.14}$-$C_{20}$.

## Diskussion

Die Biosynthese der Phosphatidsäure wurde von KORNBERG und PRICER[9] aufgeklärt. Die Umwandlung der Phosphatidsäure in die Esterlipoide der Zelle verläuft nach den bisher vorliegenden Ergebnissen auf dem von KENNEDY[4] beschriebenen Weg. Um die unterschiedliche Fettsäurenverteilung in den Lipoiden zu erklären, müssen regulatorische Mechanismen angenommen werden, die zwischen der Phosphatidsäure als gemeinsamem Intermediärprodukt und Lecithin, Kephalin und Triglycerid als Endprodukten eingreifen müßten, oder aber man müßte annehmen, daß die Endprodukte in einer zusätzlichen Reaktion umgebaut werden.

Aus dem Vorkommen der Phospholipase A in tierischen Organen[10] und der Beobachtung, daß die Lysoverbindungen durch Acyl-CoA:Lysophosphatid-Acyltransferasen acyliert werden können, schloß LANDS[2,3] auf einen unterschiedlichen „turn-over" der 1- und 2-ständigen Fettsäuren. Hierzu liegen keine schlüssigen Experimente vor. Die Acyltransferasen sind an die Membranen des endoplasmatischen Reticulums gebunden, kommen in der Mitochondrienfraktion nur in geringer Aktivität vor[5] und fehlen auf der Lysosomenmembran vollständig[11]. Die Umacylierung erfordert ein Molekül ATP. Energetisch rationeller wäre es, wenn die Acyl-CoA:1.2-Diglycerid-*O*-Acyltransferase oder die CDP-Cholin:1.2-Diglycerid-Cholinphosphotransferase bzw. die CDP-Äthanolamin:1.2-Diglycerid-Äthanolaminphosphotransferase eine Spezifität für 1.2-Diglyceride mit bestimmter Fettsäurebesetzung aufweisen würden. Diglyceride mit definierter Fettsäurebesetzung waren bisher nicht zugänglich; zur Klärung dieser Frage haben wir nach der chemischen Synthese der erforderlichen radioaktiv markierten Substrate inzwischen Experimente unternommen, über die bald berichtet werden soll.

In einer früheren Veröffentlichung[5] berichteten wir über die enzymatische Acylierung von Lysophosphatidsäure und Lysolecithin mit einer Vielzahl von gesättigten, Monoen- und Polyenfettsäuren, die *einzeln* als Substrate zur Acylierung eingesetzt wurden. Die Kinetik der Acylierung der Lysophosphatidsäure ließ keine Spezifität für bestimmte Acyl-CoA-Ester erkennen. Mit gesättigtem Lysolecithin als Akzeptor fanden wir eine träge Kinetik für $C_{16}$-Fettsäure-CoA-Ester; diese Kettenlängenspezifität wird durch die jetzigen Untersuchungen mit weiteren $C_{16}$-Monoenfettsäuren (Abb. 1: $\Delta^{3c}$-$C_{16}$ und $\Delta^{3t}$-$C_{16}$) bestätigt. Die Mono-, Di-, Tri- und Tetraen-Fettsäuren mit 18 und 20 C-Atomen wurden mit fast gleicher Geschwindigkeit in die 2-Stellung des Lysolecithins eingebaut. Eine Spezifität für bestimmte Polyenfettsäuren war nicht nachweisbar, die $K_m$-Werte waren fast identisch.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir in vitro die Acylierung von drei Akzeptoren (Lysophosphatidsäure, gesättigtes und ungesättigtes Lysolecithin) mit *Paaren konkurrierender Fettsäure-CoA-Ester* (s. S. 886) als Substraten. Ähnliche Verhältnisse findet man in vivo, da dem tierischen Organismus mit den Nährstoffen gleichzeitig gesättigte, Monoen- und Polyen-Fettsäuren angeboten werden.

Mit *Lysophosphatidsäure* als Akzeptor fanden wir einen hohen Fettsäure-Gesamteinbau, der für die verschiedenen Fettsäurekombinationen nur geringe Unterschiede aufwies. Auch die molaren Ver-

[9] A. KORNBERG u. W. E. PRICER jr., J. biol. Chemistry **204**, 345 [1953].

[10] H. VAN DEN BOSCH u. L. L. M. VAN DEENEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **106**, 326 [1965].

[11] W. STOFFEL u. H. GRETEN, Publikation in Vorbereitung.

hältnisse der in die 2-Stellung inkorporierten Fettsäuren unterschieden sich nur wenig. Der Einbau der Fettsäuren war unabhängig von Struktur, Kettenlänge und Zahl der Doppelbindungen.

*Gesättigtes Lysolecithin* als Akzeptor, das sich von der Lysophosphatidsäure nur durch die zusätzliche Cholin-Gruppe am Phosphatrest unterscheidet, zeigte dagegen eine deutliche Spezifität: Di-, Tri- und Tetraen-Fettsäuren wurden gegenüber den gesättigten und Monoen-Fettsäuren bevorzugt in die 2-Stellung des Lysolecithins eingebaut. Konkurrierende Fettsäuren mit je zwei und mehr Doppelbindungen wurden andererseits fast im äquimolaren Verhältnis eingebaut.

Mit *ungesättigtem Lysolecithin* als Akzeptor, das in der 1-Stellung 80% Linolsäure enthält, wiesen die Kinetiken der Acylierungsreaktion im Vergleich zum gesättigten Lysolecithin auf einen rascheren Einbau hin, der Gesamteinbau war höher und die Spezifität für ungesättigte Fettsäuren ausgeprägter. Gesättigtes Lysolecithin bildet gegenüber ungesättigtem Lysolecithin Lösungen stärker micellaren Charakters. Möglicherweise ergeben sich daraus Unterschiede in der Diffusionsgeschwindigkeit zur Wirkgruppe der Enzyme.

Bei Acyl-CoA-Paaren, deren eine Komponente Palmitoyl-CoA war, beobachtete man mit gesättigtem Lysolecithin als Akzeptor einen zwei- bis dreimal so hohen relativen und absoluten Einbau der gesättigten Fettsäure in die 2-Stellung wie mit ungesättigtem Lysolecithin, wo der Einbau der Palmitinsäure gegenüber den Polyenfettsäuren ganz zurückgedrängt war. Entsprechende Befunde wurden für Acyl-CoA-Paare, deren eine Komponente Linoloyl-CoA war, mit ungesättigtem Lysolecithin als Akzeptor erhalten. Möglicherweise können diese Ergebnisse durch VAN DER WAALSsche Kräfte erklärt werden, durch die die Kohlenwasserstoffkette der Fettsäure in 1-Stellung des Lysolecithins die Orientierung der in die 2-Stellung einzuführenden Fettsäure bestimmt, d. h. für die Acylierungsreaktion wäre neben der Spezifität des Enzyms für ungesättigte Fettsäuren als Substrate auch die Struktur des Akzeptors von Bedeutung. Die röntgenkristallographische Analyse der molekularen Anordnung der Ölsäure[12] und der Stearinsäure[13] legt solche Überlegungen nahe.

[12] S. ABRAHAMSSON u. I. RYDERSTEDT-NAHRINGBAUER, Acta crystallogr. [Copenhagen] **15**, 1261 [1962].

[13] S. ALEBY u. E. v. SYDOW, Acta crystallogr. [Copenhagen] **13**, 487 [1960].

Die Frage, ob die Acyl-CoA : Lysophosphatidsäure-*O*-Acyltransferase und Acyl-CoA : Lysolecithin-*O*-Acyltransferase identische Enzyme sind, muß noch offen bleiben. Welche Bedeutung der elektrischen Ladung der beiden Akzeptoren zukommt — Lysophosphatidsäure trägt eine negative Ladung, während Lysolecithin ein Dipol zwischen Phosphatgruppe und Cholinrest darstellt —, ist noch unbekannt.

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, dem BUNDESMINISTERIUM FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG und der STIFTUNG VOLKSWAGENWERK für die großzügige Unterstützung unserer Arbeiten. M. E. de T. dankt dem CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TÉCNICAS, Argentinien, für ein Stipendium.

## Beschreibung der Versuche

Alle Coenzyme wurden von der Fa. C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim, ELLMAN-Reagenz = Bis-[4-nitro-3-carboxy-phenyl]-disulfid von der Fa. EGA-Chemie, Steinheim/Albuch, *Crotalus-adamanteus*-Toxin (= Phospholipase A) von der Fa. F. G. Celo, Zweibrücken, bezogen. Diisopropylfluorophosphat wurde von der Fa. Bayer, Leverkusen, chromatographisch reines Sojalecithin von der Fa. Nattermann, Köln, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die 1-$^{14}$C-markierten Monoen- und Polyenfettsäuren wurden durch Totalsynthese[8,14], 1-$^{14}$C-markierte Palmitinsäure aus [1-$^{14}$C]$\Delta^{7,10}$-$C_{16}$ durch katalytische Hydrierung über $PtO_2$ erhalten. Die CoA-Ester wurden entweder nach KORNBERG und PRICER[15] oder nach GOLDMAN und VAGELOS[16] präpariert.

Die Radioaktivitäten wurden mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer Modell 3214 der Fa. Packard gemessen. Als Phosphore verwandten wir 2.5-Diphenyloxazol (PPO, 5 g/*l*) und 1.4-Bis-[4-methyl-5-phenyloxazolyl-(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP, 0,3 g/*l*) in Toluol.

*Lysolecithin* wurde durch enzymatische Hydrolyse (Phospholipase A) von chromatographisch reinem Sojalecithin erhalten, aus Chloroform mit Äther zweimal ausgefällt und an Kieselsäure[17] gereinigt. Die 1-Stellung des Lysolecithins war zu 18% mit Palmitin-, zu 80% mit Linol- und zu 2% mit Stearin- und Ölsäure acyliert.

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

[15] A. KORNBERG u. W. E. PRICER jr., J. biol. Chemistry **204**, 329 [1953].

[16] P. GOLDMAN u. P. R. VAGELOS, J. biol. Chemistry **236**, 2620 [1961].

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

Gesättigtes Lysolecithin wurde aus Lysolecithin durch katalytische Hydrierung ($PtO_2$ in Essigester) dargestellt. Die 1-Stellung war zu 18% mit Palmitin- und zu 82% mit Stearinsäure acyliert.

1-Palmitoyl-L-glycerin-3-phosphorsäure *(Lysophosphatidsäure)* wurde durch Totalsynthese[18] erhalten.

1.2-Diacyl-L-glycerin-3-phosphorsäure *(Phosphatidsäure)* wurde aus chromatographisch reinem Sojalecithin durch Hydrolyse mit Phospholipase D aus Weißkohl[19] dargestellt und mit Diazomethan[7] in den Dimethylester übergeführt. Der Phosphatidsäure-dimethylester wurde durch Chromatographie an Kieselsäure (Kieselsäure Mallinckrodt, 100 mesh, 12 Std. bei 110°C aktiviert) mit Äther/Petroläther-Gemischen steigender Äther-konzentration gereinigt: der Phosphatidsäure-dimethylester wurde mit 80% Äther in Petroläther (v/v) eluiert. Die Substanz war dünnschichtchromatographisch (nicht-aktivierte Kieselgel-H-Schichten; System: Chloroform) einheitlich: $R_F$-Wert 0,25—0,30. Lecithin bleibt im gleichen Laufmittel am Start liegen. Der Phosphatidsäure-dimethylester zeigte auf der Dünnschichtplatte nach Besprühen mit ZINZADZE-Reagenz[20] keine Blaufärbung, während das Kaliumsalz der Phosphatidsäure ZINZADZE-positiv (Blaufärbung) reagierte. Phosphatbestimmung: P ber. 4,24, gef. 4,08. Phosphatidsäure-dimethylester wird durch Phospholipase A nicht gespalten.

Die *Zellfraktionierung* erfolgte nach SIEKEVITZ[21], die Eiweißbestimmung nach der Biuretmethode oder nach WARBURG und CHRISTIAN[22]. Zur Hemmung der in Rattenleber sehr aktiven Acyl-CoA-Hydrolase[3] wurden die Mikrosomen (20 mg Protein/m*l*) vor dem Versuch mit Diisopropylfluorophosphat ($c$ = 5mM) während 60 Min. bei Zimmertemperatur gerührt.

*Optischer Test zur Kinetik der Acylierung von gesättigtem und ungesättigtem Lysolecithin mit einzelnen Fettsäure-CoA-Estern:* jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 m*l*: 1 μMol ELLMAN-Reagenz[6] in neutraler wäßr. Lösung; 0,1 μMol Acyl-CoA; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 2 mg Mikrosomenprotein. Der Leerwert enthielt kein Acyl-CoA. Die Reaktion wurde zur Zeit 0 gestartet durch Zugabe von 0,1 μMol gesättigtem oder ungesättigtem Lysolecithin in wäßr. Lösung. Die Zunahme der Extinktion innerhalb von 15 Min. bei 412 mμ wurde im Spektralphotometer Zeiss PMQ II gemessen.

*Optischer Test zur Kinetik der Acylierung von Lysophosphatidsäure und gesättigtem und ungesättigtem Lysolecithin mit Kombinationen von zwei verschiedenen Fettsäure-CoA-Estern:* jede Küvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 m*l* 1 μ Mol ELLMAN-Reagenz[6] in neutraler wäßr. Lösung; je 0,1 μMol beider Acyl-CoA-Ester; 100 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 2 mg Mikrosomenprotein. Der Leerwert enthielt kein Acyl-CoA. Start der Reaktion durch Zugabe von 0,1 μMol Mononatriumsalz der Lysophosphatidsäure oder gesättigtem oder ungesättigtem Lysolecithin in wäßr. Lösung. Messung der Extinktionszunahme innerhalb von 15 Min. bei 412 mμ.

Aus der gemessenen Extinktionsdifferenz ließ sich mit Hilfe einer Eichkurve mit authentischem CoA oder des spezifischen Absorptionskoeffizienten ($\varepsilon$ = 13600 $cm^2 \cdot Mol^{-1}$) der Chinonform der 2-Nitro-5-mercapto-benzoesäure[6] die Menge an freigesetztem CoA berechnen.

Um die Reaktionsprodukte isolieren und analysieren zu können, wurden die Ansätze verfünffacht: jeder Inkubationsansatz enthielt je 0,5 μMol beider Acyl-CoA-Ester; 500 μMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 10 mg Mikrosomenprotein und 0,5 μMol Mononatriumsalz der Lysophosphatidsäure oder gesättigtes oder ungesättigtes Lysolecithin. Die Ansätze wurden während 15 Min. bei 20°C inkubiert, durch Einfrieren (−70°C) gestoppt und lyophilisiert.

Die Inkubationsansätze mit Lysophosphatidsäure wurden mit Chloroform/Methanol/1N wäßr. HCl 60:30:5 (v/v) mehrfach extrahiert, die Extrakte zur Trockne eingedampft, in Äther gelöst und mit Diazomethan über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Äther und überschüssiges Diazomethan wurden unter Stickstoff abgedampft. Der Rückstand wurde mit inaktivem Phosphatidsäure-dimethylester als Träger versetzt, in Chloroform gelöst und auf nicht-aktivierten Kieselgel-H-Schichten präparativ dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: Chloroform) aufgetrennt. Durch Cochromatographie von Testsubstanzen (Phosphatidsäure-dimethylester, $R_F$ = 0,25—0,30; Fettsäure-methylester, $R_F$ = 0,76—0,80; Lecithin, $R_F$ = 0; Acyl-CoA, $R_F$ = 0), deren Banden nach Besprühen mit wäßr. Rhodamin-Lösung unter dem UV-Licht sichtbar wurden, wurde die Bande des Phosphatidsäure-dimethylesters lokalisiert. Die Substanz wurde aus dem Kieselgel mit Chloroform/Methanol 2:1 eluiert, der Extrakt zur Trockne eingedampft und mit 5proz. methanol. HCl 2 Std. unter Stickstoff umgeestert. Die Fettsäure-methylester wurden mit Petroläther extrahiert und aliquote Teile radiogaschromatographisch untersucht.

Die Inkubationsansätze mit Lysolecithin wurden mit Chloroform/Methanol 2:1 mehrfach extrahiert, die Extrakte zur Trockne eingedampft und in wenig Chloroform/Methanol 9:1 gelöst. Die Gesamtlipoide wurden an 2 g Kieselsäure + 1 g Hyflo Supercel chromatographiert: mit 40 m*l* Chloroform/Methanol 9:1 wurden die freien Fettsäuren und Neutralfette, anschließend mit 100 m*l* Methanol die Phosphatide eluiert. Die Lipoidfraktionierung wurde dünnschichtchromatographisch

[18] W. STOFFEL u. G. D. WOLF, diese Z. **347**, 94 [1966].
[19] F. M. DAVIDSON u. C. LONG, Biochem. J. **69**, 458 [1958].
[20] J. C. DITTMER u. R. L. LESTER, J. Lipid Res. **5**, 126 [1964].
[21] P. SIEKEVITZ, Methods in Enzymol. **5**, 61 [1962].
[22] E. LAYNE, Methods in Enzymol. **3**, 451 [1957].

(Kieselgel-H-Schichten, Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4) kontrolliert. Die Gesamtphosphatide wurden in 5 ml peroxydfreiem Äther gelöst und mit 1 mg *Crotalus-adamanteus*-Toxin in 0,2 ml 0,1M Boratpuffer, pH 7,0, der 0,04M an Calciumacetat war, 6 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Die Hydrolyseansätze wurden zur Trockne eingedampft, in wenig Chloroform/Methanol 9:1 gelöst und säulenchromatographisch an 2 g Kieselsäure + 1 g Hyflo Supercel fraktioniert: mit 25 ml Chloroform/Methanol 9:1 wurden die im Lecithin 2-ständigen, mit Phospholipase A abgespaltenen Fettsäuren eluiert. Sie wurden mit Borfluorid-Methanol[23] verestert, aliquote Teile wurden radiogaschromatographisch untersucht.

Die radiogaschromatographischen Analysen wurden wie beschrieben[8] ausgeführt. Aus der gemessenen Radioaktivität und der bekannten spezifischen Aktivität konnte der relative Einbau der einzelnen Fettsäuren in das Phosphatidmolekül bestimmt und auf den nach dem optischen Test aus der Menge des freigesetzten CoA gemessenen Gesamteinbau umgerechnet werden.

[23] L. D. METCALFE u. A. A. SCHMITZ, Analytic. Chem. **33**, 363 [1961].