

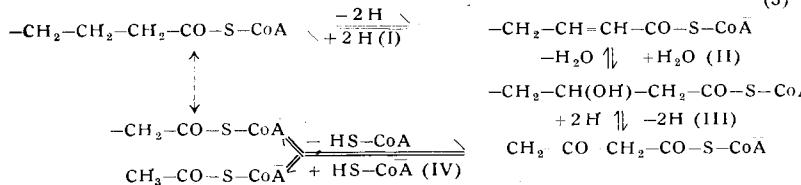
Zur β -Oxydation der Fettsäuren

Von Prof. Dr. FEODOR LYNNEN,
Dipl.-Chem. LUISE WESSELY, Dr. OTTO WIELAND
und LUIS STRAUD RUEFF

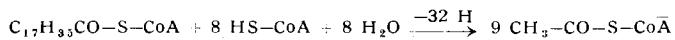
Aus dem Chemischen Universitäts-Laboratorium München,
Biochemische Abteilung

F. Knoop¹⁾ hat 1904 entdeckt, daß der oxydative Abbau der Fettsäuren im lebenden Organismus in β -Stellung erfolgt und unter Abspaltung eines C_2 -Bruchstücks zu der um zwei Kohlenstoffatome kürzeren, und von neuem durch β -Oxydation angreifbaren Fettsäure führt. Versuche mit Lebermitochondrien und Bakterienextrakten, sowie auch die Anwendung von Isotopen auf dieses Problem haben die Knoopsche Theorie in glänzender Weise bestätigt und darüber hinaus gezeigt, daß der gleiche C_2 -Körper, dessen Abspaltung beim oxydative Abbau zur Verkürzung der Fettsäuremolekel führt, umgekehrt auch als Baustein den Aufbau der Fettsäuren in der lebendigen Substanz vermittelt und identisch mit der im Zuge des Kohlehydratabbaus gebildeten „aktivierten Essigsäure“ ist²⁾.

Die vor zwei Jahren gelungene Identifizierung der „aktivierten Essigsäure“ als das der Klasse der Acylmercaptane angehörende Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA, $CH_3-CO-S-CoA$) führte unmittelbar zu folgender Vorstellung über den detaillierten Mechanismus der β -Oxydation^{3),4)}:



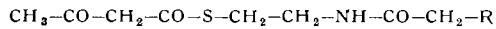
Demnach durchläuft eine „aktivierte“, d. i. eine am Schwefel des Coenzymes A gebundene Fettsäure einen vierstufigen Cyklus unter Abgabe von vier Wasserstoff-Atomen neben einer Moleköl Acetyl-CoA, wobei die um zwei Kohlenstoffatome verkürzte Fettsäure — gebunden an Coenzym A — entsteht. Diese kann dann von neuem in den Kreisprozeß einbezogen werden, bis die ganze Kette der eingesetzten Fettsäure in „aktivierte Essigsäure“ umgewandelt ist⁵⁾. Im Falle der Stearinäure mit 18 C-Atomen muß dieser Cyklus achtmal durchlaufen werden, unter Freisetzung von 32 H-Atomen und der Bildung von 9 Acetyl-CoA nach folgender Gleichung:



Der Aufbau der Fettsäuren aus „aktivierter Essigsäure“ wird durch die Umkehrung des geschilderten Vorgangs bewerkstelligt.

Es ist nunmehr gelungen, unsere Vorstellung durch Nachweis und Isolierung der Fermente III und IV experimentell zu unterbauen. Wir nennen sie entsprechend der von ihnen bevorzugt ausgelösten chemischen Reaktionen β -Keto-Hydase und β -Keto-Thiolase, räumen aber ein, daß man sie, da ihre Wirkung im Leben reversibel ist, auch als β -Oxy-Dehydrase und kondensierendes Ferment des Fettstoffwechsels bezeichnen könnte.

β -Keto-Hydase ist der Katalysator der reversiblen Reaktion (1). Wir haben gefunden, daß an Stelle von Acetacetyl-CoA ($R = C_{18}H_{36}O_5N_6P_3$) auch das ähnlich gebaute, synthetisch



leicht zugängliche S-Acetacetyl-N-acetyl-cysteamin⁶⁾ ($R = H$) vom Ferment umgesetzt wird, und haben auf dieser Reaktion einen einfachen „optischen Test“ nach O. Warburg zur Isolierung des Ferments aufgebaut (Bild 1). Das Verschwinden von DPN-H wird bei 366 m μ , wo hydriertes Pyridin im Gegensatz zu Pyridin starke Absorption zeigt, im Photometer „Eppendorf“ verfolgt. In drei Reinigungsschritten: Alkohol-Fällung, Denaturierung von inaktivem Eiweiß bei 55°C und fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung, ließ sich die Hydase aus Schafslbeerextrakt bisher 300-fach anreichern. Diese Protein-Faktion zeigt Ansätze zur Kristallisation. Systematische Versuche am gereinigten Ferment ergaben, daß die Testreaktion zwar reversibel ist, aber bei $pH = 7,35$ und

¹⁾ Beitr. chem. Physiol. Pathol. 6, 150 [1904].

²⁾ Vgl. Zusammenfassung: C. Martius u. F. Lynen, Adv. Enzymol. 10, 167 [1950].

³⁾ F. Lynen u. E. Reichert, diese Ztschr. 63, 47 [1951]; Liebigs Ann. Chem. 574, 1 [1951].

⁴⁾ Diese Ztschr. 63, 490 [1951].

⁵⁾ Im Falle einer normalen paarzahligen Fettsäure.

⁶⁾ G. Vogelmann, Unveröffentl. Versuche.

bei Einsatz äquivalenter Mengen DPN-H und Acetacetylverbindung zu 95 % in der Richtung der Hydrierung der Acetacetylverbindung verläuft. Im übrigen reagiert die Hydase nur mit an Schwefel gebundener Acetessigsäure; freie Acetessigsäure oder Acetessigsäure-äthylester werden von ihr nicht umgesetzt.

Der Nachweis der β -Keto-Thiolase gelang in einem zusammengesetzten optischen Test. So findet in einer Mischung von Acetyl-CoA

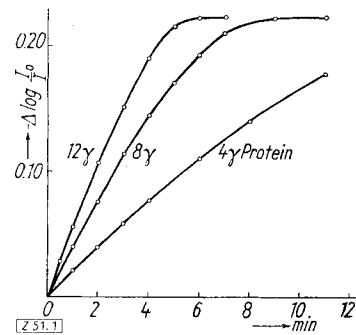
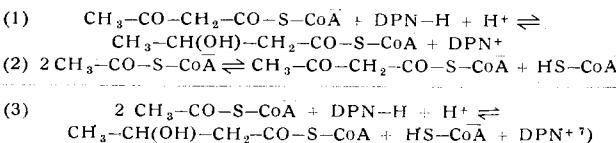


Bild 1. Optischer Test auf β -Keto-Hydase. 5 μ Mol S-Acetacetyl-N-acetyl-cysteamin, 0,13 μ Mol DPN-H in 2 cm³ m/40-Pyrophosphat, pH 7,4; 25°. Auf der Ordinate ist die Extinktionsabnahme bei 366 m μ aufgetragen; $d = 1$ cm.



und DPN-H erst dann Wasserstoff-Übertragung statt, wenn außer Hydase noch eine zweite Protein-Faktion aus Schafslbeer hinzugefügt wird (Bild 2). Die in dieser Fraktion enthaltene β -Keto-Thiolase kondensiert Acetyl-CoA in umkehrbarer Reaktion zu Acetacetyl-CoA (Gleichung 2), das dann von der Hydase gebunden und durch den Wasserstoff des DPN-H zu β -Oxybutyryl-CoA reduziert wird. Den Reaktionsablauf gibt die Bilanzgleichung (3)

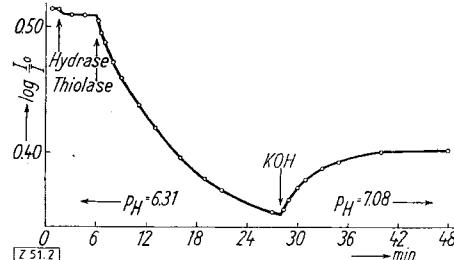


Bild 2. Bildung von β -Oxybutyryl-CoA
0,35 μ Mol Acetyl-CoA, 0,13 μ Mol DPN-H in 1,7 cm³ m/15-Phosphat, pH 6.31. Nach 1 Min. 20 γ Hydaseprotein, nach 6 Min. 0,5 mg Thiolaseprotein, nach 28 Min. 0,055 cm³ n-KOH zugesetzt. Ordinate: Extinktion bei 366 m μ ; $d = 1$ cm.

wieder. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, das bei $pH = 7,1$ auf der Seite von Acetyl-CoA und DPN-H liegt, weil Reaktion (2) fast vollständig in der Richtung der Acetyl-CoA-Bildung, d. h. der Thiolyse verläuft.

Die nach Bilanzgleichung (3), entsprechend der Entstehung von β -Oxybutyryl-CoA, frei werdenden SH-Gruppen wurden nachgewiesen, ebenso wie die Beteiligung von H^+ an der Reaktion. Stumpft man nämlich einen auf $pH = 6,3$ gepufferten Ansatz, wo wegen der relativ hohen H^+ -Konzentration die Bildung von β -Oxybutyryl-CoA begünstigt ist, durch Zugabe von Kalilauge nachträglich ab, dann reagieren die in der ersten Phase gebildeten β -Oxybutyryl-CoA und DPN⁺ zum Teil wieder zurück (Bild 2).

Wird β -Oxybutyryl-CoA, das sich durch p-Kresol dem „sauren“ Reaktionsansatz entziehen läßt, mit Hydroxylamin inkubiert, so entsteht β -Oxybutyryl-hydroxamsäure, die sich papierchromatographisch einwandfrei identifizieren ließ (RF-Wert in wäßrigem Butanol: 0,29). Andererseits liefert die bei $pH = 9,05$ in größerem Umfang verlaufende Umsetzung mit DPN⁺ in Gegenwart von β -Keto-Hydase Acetacetyl-CoA, wie man am Auftreten der den alkalischen Lösungen von Thioestern der Acetessigsäure eigenen Absorptionsbande bei 303 m μ erkennen kann. Damit ist nunmehr dieses zentrale, auch im Hinblick auf die Entstehung der Ketonkörper, Sterine und Terpene⁸⁾ bedeutungsvolle Zwischenprodukt des Fettstoffwechsels über Acetyl-CoA und β -Oxybutyryl-CoA präparativ zugänglich.

Eingeg. am 22. November 1952 [Z 1]

⁷⁾ DPN-H = Hydro-cozymase, DPN⁺ = Cozymase.

⁸⁾ F. Lynen, Vortrag in Freiburg am 16. 11. 1951.