

vollzieht sich am Methylen lediglich die eindeutige, zum dreigliedrigen Ring führende Umsetzung. Im Gegensatz zum Carbonium-Ion ist das Methylen ein bifunktionelles Strukturelement mit Elektronen-Sextett.

Wenn man mit der elektronentheoretischen Betrachtung dem Reaktionsereignis gewissermaßen näherkommt, ist nicht nur das als Erkenntnisgewinn zu buchen. Die Übersicht der fast unermeßlichen Zahl der Reagentien wird

durch die auch vorstehend geübte Klassifizierung hinsichtlich der Reaktivität kaum zu überschätzend vereinfacht. „Eine Theorie ist ein Aussichtspunkt, der gestatten soll, bekannte Tatsachen einheitlich zu übersehen und neue Tatsachen vorauszusehen“ (Joh. Thiele²⁰⁹). Mir scheint, daß Optimismus auch bezüglich der zweiten Konsequenz nicht fehl am Platze ist.

Eingeg. am 18. Juli 1955 [A 667]

²⁰⁹ J. Thiele, Liebigs Ann. Chem. 306, 87 [1899].

Der Fettsäurecyclus

Von Prof. Dr. FEODOR LYNEN^{*})

*Institut für Zellchemie an der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie (Max-Planck-Institut) München und
Chemisches Laboratorium der Universität München, Institut für Biochemie.*

Die Zelle kann in einem Kreisprozeß von vier Reaktionsstufen, dem Fettsäurecyclus, durch Coenzym A aktivierte Fettsäuren auf- und abbauen. Sie benötigt dafür vier Enzyme, von denen drei in Versuchen auch mit Derivaten des N-Acetylcytamins reagieren können. Im Zusammenspiel von Citronensäure- und Fettsäurecyclus wirkt Coenzym A als Katalysator.

Einleitung

Unter den Nahrungsstoffen, deren oxydativer Abbau die Energie für die Erhaltung des Lebens bereitstellt, nehmen die Fette eine Sonderstellung ein. Abgesehen davon, daß unter den Bedingungen einer normalen Diät etwa 30–40% des kalorischen Bedürfnisses beim Menschen aus der Verbrennung von Fett gedeckt werden und dieser Prozentsatz im Hunger oder für den Fall besonderer Ernährungsbedingungen, wie sie etwa bei der Tran-reichen Nahrung des Eskimos gegeben sind, sogar noch wesentlich größer ist, vermag der Tierkörper unter allen zur Verfügung stehenden Nahrungsstoffen einzig und allein das Fett im größeren Umfange zu stapeln. Auf eine solche Energiereserve kann dann der Organismus in Zeiten der Not oder bei erhöhter Arbeitsleistung zurückgreifen. Sehr eindrucksvoll tritt diese besondere Funktion der Fettdepots bei manchen Insekten zutage. So hat man z. B. gefunden, daß die gewaltigen Flugleistungen von Wanderheuschrecken fast ausschließlich aus der Verbrennung von Fett gespeist werden, das in Perioden der Ruhe aus den Kohlehydraten der Nahrung aufgebaut wird¹).

Obwohl eine Reihe namhafter Biochemiker sich mit der Frage des biologischen Fettabbaus intensiv beschäftigte, war bis vor etwa 10 Jahren über den detaillierten chemischen Mechanismus dieses Prozesses wenig bekannt. Durch Knoops²) klassische Untersuchungen aus dem Jahre 1904 war zwar das Prinzip der β -Oxydation als Grundlage des Fettsäureabbaus erkannt worden, aber sowohl die chemische Struktur der bei der β -Oxydation auftretenden Zwischenprodukte als auch die Natur der die Umwandlung der Fettsäure-Ketten in Kohlendioxyd vollziehenden Enzyme, lagen zunächst noch im Dunkeln.

Ein Umstand, welcher das Studium der an der β -Oxydation beteiligten Enzyme stark aufgehalten hat, war das

Unvermögen zerkleinerter Gewebe, Fettsäuren zu oxydieren. Schon Embden beobachtete, daß z. B. die Leber beim Zerreiben oder bei der Bereitung eines Extraktes die Fähigkeit zur β -Oxydation vollständig einbüßt. Damit war aber jene Methode der Biochemie, die zur Entwirrung von Stoffwechselprozessen entscheidend beitragen kann: das Studium solcher Prozesse in einem System gelöster Enzyme, zunächst auf das Problem der Fettsäureoxydation nicht anwendbar.

Als es nun aber nach 1943 gelang, den Wirksamkeitsverlust bei der Zerkleinerung oder der Extraktion der Zelle zu vermeiden und bei Versuchen mit Gewebsbrei, Gewebshomogenaten oder Gewebsextrakten ein Abbau von Fettsäuren erzielt wurde, wurden als unmittelbare Folge dieses methodischen Fortschritts neue Erkenntnisse bezüglich des Fettstoffwechsels gewonnen. Der erste Erfolg dieser neuen Phase, die mit wichtigen Untersuchungen von Muñoz und Leloir³), Breusch⁴), Wieland und Rosenthal⁵) sowie Lehninger⁶) eingeleitet wurde, lag in der Beobachtung, daß CO_2 bei der β -Oxydation ausschließlich im Citronensäurecyclus gebildet wird. Damit konnte es kaum zweifelhaft sein, daß bei der β -Oxydation zunächst das gleiche, in Unkenntnis seiner chemischen Natur als „aktivierte Essigsäure“ bezeichnete C_2 -Brückstück gebildet wird wie bei der über die Stufe der Brenztraubensäure führenden biologischen Oxydation des Zuckers⁷). Bei der Überführung der Fettsäuren in „aktivierte Essigsäure“ wird zwar Sauerstoff verbraucht, aber noch kein Kohlendioxyd gebildet. Dieses entsteht erst bei der Oxydation der „aktivierten Essigsäure“ im Citronensäurecyclus.

Aktivierte Essigsäure

Als zentrales Problem ergab sich damit die Frage nach der chemischen Natur der „aktivierten Essigsäure“ und nach dem Weg ihrer Bildung aus den Fettsäuren. Auch bezüglich dieser Frage hatten die Experimente an Leberhomogenaten oder an reinen Mitochondrien aus Leber be-

¹) Nach einem Vortrag auf der Tagung der Gesellschaft für Physiologische Chemie am 20. 9. 1954 in Kiel.

Die folgenden Abkürzungen werden benutzt: Coenzym A = CoA oder CoASH; S-Acyl-Coenzym A-Derivate = Acyl-SCoA oder Acyl-CoA; Adenosintriphosphat = ATP, ADP-P oder AMP-PP; Adenosindiphosphat = ADP; Adenosin-5'-phosphat = AMP; Pyrophosphat = PP; Orthophosphat = P; Acetyl-adenylat = AMP-acetyl; Acetylphosphat = Acetyl-P; oxydierter und reduziertes Diphosphopyridin-nucleotid = DPN und DPNH; oxydierter und reduziertes Flavin-adenin-dinucleotid = FAD und FADH₂.

²) T. Wels-Fogh, Trans. Roy. Soc. [London] B 237, 1 [1952]; vgl. Nature [London] 170, 996 [1952].

³) F. Knoop, Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 6, 150 [1904].

⁴) J. M. Muñoz u. L. F. Leloir, J. biol. Chemistry 147, 355 [1943]; 153, 53 [1944].

⁵) F. L. Breusch, Science [New York] 97, 490 [1943]; Enzymologia 11, 169 [1944].

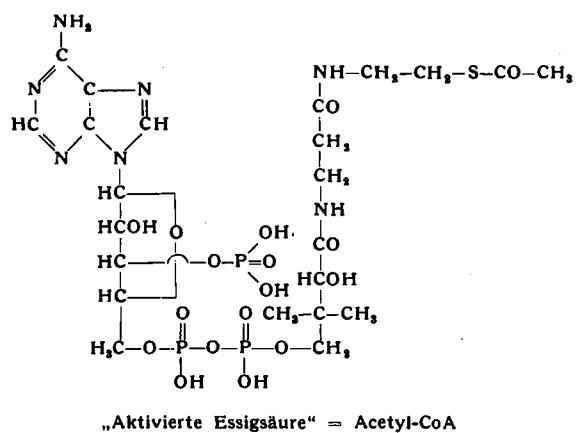
⁶) H. Wieland u. C. Rosenthal, Liebigs Ann. Chem. 554, 241 [1943].

⁷) A. L. Lehninger, J. biol. Chemistry 161, 413, 437 [1945]; 164, 291 [1946].

⁸) Zusammenfassung vgl. C. Martius u. F. Lynen, Advances in Enzymol. 10, 167 [1950].

reits einen wichtigen Beitrag geliefert. Man hatte nämlich zeigen können, daß die Fettsäuren erst nach einer vorausgehenden Aktivierung oxydiert werden und daß für diesen Aktivierungsprozeß Adenosintriphosphat (ATP) benötigt wird^{6, 8}. Die der Fettsäure-Aktivierung zugrundeliegende chemische Reaktion blieb aber unbekannt. Man konnte nur vermuten, daß zwischen den „aktivierten Fettsäuren“ und der „aktivierten Essigsäure“ nahe Verwandtschaft besteht.

Mit der Entdeckung des Coenzymes A, das fast zur gleichen Zeit in den Laboratorien von *Lipmann*⁹, *Nachmansohn*¹⁰, *Feldberg*¹¹ und *Barron*¹²) gefunden wurde, trat die Forschung auf diesem Gebiet in einen neuen Abschnitt ein. Die Pionierarbeiten *Lipmanns* und seiner Gruppe¹³) führten zu der Vorstellung, daß „aktivierte Essigsäure“ ein Derivat aus Essigsäure und Coenzym A sei. Eine Hypothese, die durch Untersuchungen *Stadtmans*¹⁴) und des Arbeitskreises um *Ochoa*¹⁵) eine Bestätigung fand und schließlich im Münchener Laboratorium bewiesen werden konnte. *Lynen*, *Reichert* und *Rueff*¹⁶) isolierten aus Hefezellen eine Substanz mit den Eigenschaften der „aktivierten Essigsäure“ und zeigten, daß es sich dabei um den Thioester aus Essigsäure und Coenzym A handelt.



Diese Arbeit löste nicht nur das Problem der „aktivierten Essigsäure“, sondern lieferte auch den Schlüssel für das Verständnis aller Umsetzungen, bei welchen das Coenzym A als Katalysator beteiligt ist. Die als Wirkungsgruppe erkannte SH-Gruppe kann sich mit Carbonsäuren verbinden.

Mit der Thioester- oder Acylmercaptan-Bindung ist ein neuer Typ energiereicher Verbindungen der lebenden Zelle entdeckt worden, denn die hydrolytische Spaltung liefert 8300 cal je Mol; das ist etwa der gleiche Energiebetrag, der beim Zerfall von Adenosintriphosphat frei wird¹⁷). Die Zelle verfügt nun tatsächlich auch über Wege, auf denen die ATP-Energie in diejenige der Thioester-Bindung übergeführt werden kann und umgekehrt.

- ⁶⁾ A. L. Grafflin u. D. E. Green, J. biol. Chemistry 176, 95 [1948].
- ⁷⁾ F. Lipmann, ebenda 160, 173 [1945].
- ⁸⁾ D. Nachmansohn u. M. Berman, ebenda 165, 551 [1946].
- ⁹⁾ W. Feldberg u. T. Mann, J. Physiology 104, 411 [1946].
- ¹⁰⁾ M. A. Lipton u. E. S. G. Barron, J. biol. Chemistry 166, 367 [1946].
- ¹¹⁾ F. Lipmann, Harvey Lectures, Ser. 44, 99 [1948/49].
- ¹²⁾ E. R. Stadtman, Federation Proc. 9, 233 [1950].
- ¹³⁾ S. Ochoa, Physiol. Rev. 31, 56 [1951].
- ¹⁴⁾ F. Lynen, E. Reichert u. L. Rueff, Liebigs Ann. Chem. 574, 1 [1951].
- ¹⁵⁾ K. Burton, Biochem. J. 59, 44 [1955].

Der Fettsäurezyklus

Nachdem die chemische Struktur der „aktivierten Essigsäure“ erkannt war, ergab sich die Möglichkeit, viele Belege, die man beim Studium des Fettstoffwechsels gesammelt hatte, in ein Schema einzufügen^{18, 19}).

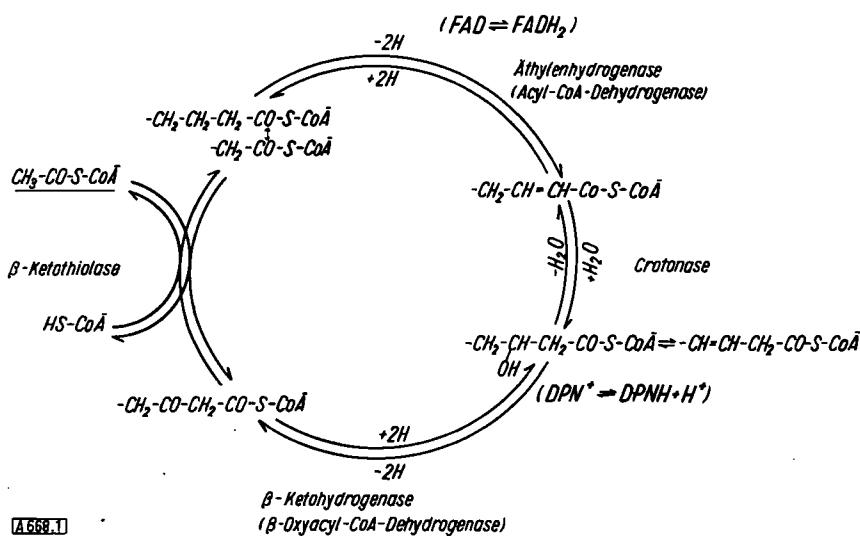


Bild 1
Der Fettsäurezyklus

Voraussetzung für den biologischen Umsatz der Fettsäuren ist, daß sie in Form der Verbindungen mit Coenzym A vorliegen. Nur derartig aktivierte Fettsäuren vermag die Zelle auf- und abzubauen. Chemische Einzelheiten dieses Prozesses, den man als „Fettsäurezyklus“ bezeichnen kann, sind aus Bild 1 zu ersehen. Seine Funktion besteht darin, die Fettsäure-Kette in C_2 -Bruchstücke aufzuspalten, und umgekehrt, die Kette aus C_2 -Bruchstücken aufzubauen.

Die Fettsäurekette wird synthetisiert aus Acetyl-CoA durch Wiederholung eines Kreisprozesses, welcher aus vier Reaktionsschritten besteht. Er umfaßt:

- 1.) die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA,
- 2.) die Reduktion von Acetacetyl-CoA zur entspr. β -Oxy-Verbindung, dem L- β -Oxybutyryl-CoA. Der benötigte Wasserstoff stammt aus hydriertem Diphosphopyridin-nucleotid (DPNH).
- 3.) Die Wasserabspaltung von L- β -Oxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA und
- 4.) die Hydrierung von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA durch hydriertes Flavin-adenin-dinucleotid (FADH₂).

Nach diesen vier Schritten ist der Zyklus einmal durchlaufen mit dem Ergebnis, daß die Kohlenstoffkette des Ausgangsstoffes Acetyl-CoA um zwei Kohlenstoffatome verlängert ist, wozu eine Molekel Acetyl-CoA und vier Wasserstoffatome benötigt werden. Das gebildete Butyryl-CoA kondensiert sich nun mit Acetyl-CoA und liefert in einem zweiten Umlauf des Zyklus Capronyl-CoA, das Derivat der Säure mit sechs Kohlenstoffatomen. Die 18-C-Atome umfassenden Stearinsäure wird demnach in Form von Stearyl-CoA in acht derartigen Umläufen synthetisiert.

In umgekehrter Richtung läuft in demselben Kreisprozeß, welchen man im Hinblick auf die veränderliche Länge der Fettsäurekette der Coenzym A-Derivate vielleicht auch „Fettsäure-Spirale“ hätte nennen können, die β -Oxydation der Kohlenstoffkette ab. Dafür muß die

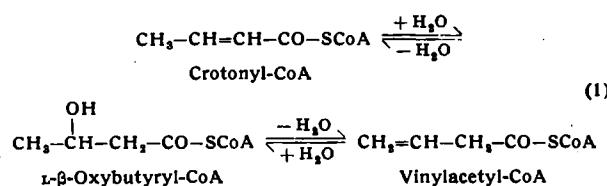
¹⁸⁾ F. Lynen, diese Ztschr. 63, 490 [1951].

¹⁹⁾ H. A. Barker, in W. D. McElroy u. B. Glass: Phosphorus Metabolism, I, 204, John Hopkins Press, Baltimore 1951.

Fettsäure zunächst aktiviert, d. h. in das CoA-Derivat übergeführt werden, welches dann durch Dehydrierung, Wasseranlagerung und abermalige Dehydrierung in das entspr. β -Ketoacyl-CoA umgewandelt wird. Es schließt sich die enzymatische Thiolyse durch Coenzym A an, wobei Acetyl-CoA entsteht und eine Fettsäure-CoA-Verbindung, die zwei Kohlenstoffatome weniger enthält als die Ausgangssubstanz, und die nun unmittelbar einen neuen Umlauf startet. Der Abbau der Fettsäuren führt letzten Endes wieder zur aktivierte Essigsäure zurück, welche dann über den Citronensäurecyclus endgültig verbrannt werden kann.

Für die vier Enzyme dieses Kreisprozesses, von denen jedes reversibel arbeitet, wurden verschiedene Namen vorgeschlagen^{20, 21}). In der Absicht, die thermodynamisch festgelegte, bevorzugte Richtung der Gleichgewichtsreaktion zu bezeichnen, wurden hier die im Bild 1 aufgeführten Namen gewählt²²). Das heißt also, daß das Gleichgewicht am Enzym β -Ketothiolase ganz auf der Seite der thiolytischen Spaltung zu Acyl-CoA liegt; bei den Wasserstoff-Übertragungen liegt es auf der Seite der Hydrierung der Keto-Gruppe bzw. der Äthylen-Bindung. Der Name „Crotonase“ stammt von *Stern*, dem es kürzlich gelang, dieses Enzym des Fettsäurecyclus in reiner, kristallisierte Form darzustellen²³). Er erhielt aus Ochsenleber einen hochaktiven Eiweißkörper, wovon eine Moleköl in der Minute bei p_H 7,5 und 25 °C nicht weniger als 730000 Moleküle Crotonyl-CoA zu β -Oxybutyryl-CoA hydratisiert. Bei der Untersuchung der Spezifität dieses Enzyms fand *Stern*, daß ein einziges Enzym-Individuum Coenzym A-Derivate kleiner und großer Kettenlängen umsetzt, so wie man es bei der Formulierung des Fettsäurecyclus erwartet hatte.

Überraschend war, daß die gereinigte Crotonase auch bei Vinyl-acetyl-CoA wirksam ist, wo sich die Doppelbindung nicht zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3, sondern zwischen 3 und 4 befindet^{23, 24}.



Es ist denkbar, daß diese doppelte Wirkung des Enzyms, die letzten Endes auf eine Isomerisierung der Doppelbindung hinausläuft, beim Abbau und bei der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren eine Rolle spielt. Würden nämlich beim Aufbau der Fettsäurekette unter Umgehung des zweiten Hydrierungsschrittes gelegentlich bereits ungesättigte Fettsäure-Derivate mit Acetyl-CoA kondensieren, so käme man zu Säuren mit Doppelbindungen in der Lage von Linol-, Linolen-, Arachidonsäuren und vielen anderen natürlich vorkommenden, ungesättigten Säuren. Solange eine Nachprüfung dieser Hypothese im Enzymversuch noch aussteht, muß man auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß die Doppelbindungen erst nachträglich durch Dehydrierung der fertigen Fettsäureketten eingeführt werden²⁵.

Auf die Frage, welchen Zweck es hat, daß in der Zelle nicht freie Fettsäuren, sondern ihre Derivate mit Coenzym A oxydiert werden, ist zu antworten, daß durch die Bin-

²⁰) F. Lynen u. S. Ochoa, *Biochim. biophysica Acta* 12, 299 [1953].
²¹) H. Mahler, *Federation Proc.* 12, 694 [1953].
²²) F. Lynen, ebenda 12, 683 [1953].
²³) J. R. Stern, in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*, I, 559, Academic Press, New York 1955.
²⁴) S. J. Wakil u. H. R. Mahler, *J. biol. Chemistry* 207, 125 [1954].
²⁵) K. Lang, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 261, 240 [1939].

dung der Säuren an Schwefel die Wasserstoff-Atome in der Nachbarschaft der Carboxyl-Gruppe reaktionsfähiger werden²⁶), und somit die Mittel der Zelle ausreichen, um eine Dehydrierung vorzunehmen. Außerdem kann auf diese Weise die Spaltung der Fettsäurekette reversibel geleitet werden, wodurch für das gleiche Enzym Abbau und Aufbau der Kohlenstoffkette möglich wird. Eine Kondensation zwischen Essigsäure und freien Fettsäuren zur homologen β -Ketosäure wäre aus thermodynamischen Gründen im Milieu der Zelle unmöglich. Denn wie sich aus dem von *Lipmann*²⁶) berechneten Wert von + 12000 cal für die freie Energie der Reaktion:



ergibt, ist die Gleichgewichtskonstante:

$$K = \frac{(\text{Acetessigsäure})x(\text{H}_2\text{O})}{(\text{Essigsäure})^2} = 4 \cdot 10^{-3}$$

Weiterhin ist zu bedenken, daß durch die Bindung an das Coenzym auch die höheren Fettsäuren leicht wasserlöslich werden, was ihrer Umsetzung im Intermediärstoffwechsel förderlich sein könnte.

Die Enzyme des Fettsäurecyclus

Jedes der vier Enzyme des Cyclus läßt sich in Leberextrakten oder in Auszügen anderer, zur Oxydation von Fettsäuren befähigter tierischer Organe, ebenso wie in gewissen Bakterien-Extrakten nachwelsen, wenn man die spezifischen Substrate, d. h. die Thioester der Säuren mit Coenzym A benutzt. Vor vier Jahren aber, als wir im Münchener Laboratorium anschließend an die Isolierung von Acetyl-CoA und an die Formulierung des Fettsäurecyclus, die Arbeit an diesem Problem aufnahmen, war außer Acetyl-CoA noch kein anderes Coenzym A-Derivat bekannt. Es fehlten die Methoden, um solche Fettsäure-Coenzym-A-Verbindungen aus dem freien Coenzym darzustellen.

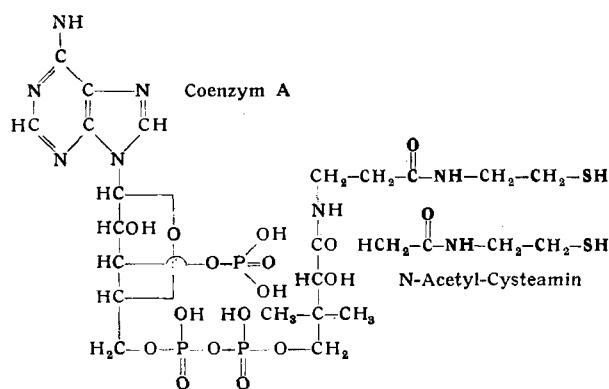
Inzwischen wurde diese Lücke geschlossen. Die Gewinnung der verschiedenen Derivate ist zu einer relativ einfachen Aufgabe geworden, seit *Simon* und *Shemin*²⁷) gefunden haben, daß die Umsetzung von Coenzym A mit Säureanhydrid in schwach alkalischer, wässriger Lösung in guter Ausbeute den Thioester liefert. Auf diesem Wege können CoA-Derivate gesättigter und ungesättigter Säuren präparativ dargestellt werden. Aber auch Derivate der β -Oxy- oder β -Ketosäuren sind nach diesem Verfahren zugänglich, wenn man nach der Vorschrift von *Wieland* und *Rueff*²⁸) die gemischten Anhydride mit Äthylkohlensäure oder die Thiophenylester verwendet.

Bei einer anderen Methode zur präparativen Darstellung der CoA-Derivate werden spezifische Enzyme gebraucht. Hierfür sind in erster Linie die Enzyme der „Fettsäure-Aktivierung“ geeignet^{29, 30}.

Unter Verwendung der verschiedenen CoA-Derivate konnten in den Arbeitskreisen um *Ochoa*^{20, 31}) und um *Green*³²) bei der Bearbeitung des Fettstoffwechsels schöne Erfolge erzielt werden. Für den Erfolg der eigenen Bemühungen auf dem Gebiet des Fettsäurecyclus war die Entdeckung verantwortlich, daß bei drei Enzymen des Cyclus, bei Äthylenhydrogenase, β -Ketohydrogenase und β -Ketothiolase die natürlichen CoA-Derivate durch einfache Modellsubstanzen ersetzt werden können, in

²⁶) F. Lipmann: *Advances in Enzymol.* 6, 231 [1946].
²⁷) E. J. Simon u. D. Shemin, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 2520 [1953].
²⁸) T. Wieland u. L. Rueff, *diese Ztschr.* 65, 186 [1953].
²⁹) H. Beinert, *Federation Proc.* 12, 681 [1953].
³⁰) A. Kornberg u. W. E. Pricer Jr., *J. biol. Chemistry* 204, 329 [1953].
³¹) S. Ochoa, *Advances in Enzymol.* 15, 183 [1954].
³²) D. E. Green, *Biol. Rev. Cambridge philos. Soc.* 29, 330 [1954].

denen das kompliziert gebaute Coenzym durch das einfache Bauelement N-Acetyl-cysteamin ersetzt ist.



Diese drei Enzymproteine besitzen noch Affinität zu den Derivaten des N-Acetyl-cysteamins und ziehen sie in dieselben chemischen Umsetzungen ein wie die CoA-Derivate. Allerdings muß man von den künstlichen Substanzen wesentlich größere Substanzmengen anwenden, weil ihnen Gruppen, wie etwa Adenin oder die Phosphat-Reste, fehlen, die beim Wechselspiel zwischen Enzym und CoA-Derivat mitbeteiligt sind.

Damit hatten wir die Möglichkeit, bei der Suche nach den Enzymen des Fettsäurezyklus und dem sich anschließenden systematischen Studium ihrer Eigenschaften unter weitgehendem Verzicht auf die kostbaren CoA-Derivate mit den billigen Modellen zu arbeiten, die auf dem Weg der Totalsynthese in beliebigen Mengen zugänglich sind.

Diese N-Acetyl-cysteamin-Derivate, von denen bisher die in Tabelle 1 aufgeführten Vertreter dargestellt wurden, förderten die Untersuchungen aber auch noch in anderer Hinsicht nachhaltig. Ohne ihre Eignung als Substrat bei



Acyle (R-CO)	Fp °C	Bearbeiter
CH ₃ -CO-	30	{ R. Kuhn u. G. Quadbeck ³³), G. Vogelmann ³⁴)
CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CO-	28	W. Seubert ³⁵)
CH ₃ -CH=CH-CO-	62-63	W. Seubert ³⁵)
CH ₃ -CH-CH ₂ -CO-	fl.	{ T. Wieland u. A. Bernhard, K. Decker ³⁷)
CH ₃ -C-CH ₂ -CO-	60	G. Vogelmann u. L. Wessely ³⁸)
CH ₃ -(CH ₂) ₃ -CO-	22	W. Seubert ³⁵)
CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CO-	45-46	W. Seubert ³⁵)
CH ₃ -(CH ₂) ₆ -CO-	60	W. Seubert ³⁵)

Tabelle 1
Derivate des N-Acetyl-cysteamins

Enzymversuchen zu kennen, hatten wir diese Verbindungen synthetisiert, um an ihnen die chemischen Eigenschaften der als Zwischenprodukte des Fettsäureabbaus vorausgesagten Thioester kennen zu lernen. Im Rahmen dieser systematischen Arbeit haben L. Wessely³⁶) und W. Seubert³⁵) im Münchener Laboratorium die spezifischen Absorptionsbanden von Acetacetyl-mercaptopanen sowie Crotonyl-mercaptopanen entdeckt und damit den Grundstein gelegt für die Anwendung der optischen Methode von O. Warburg auf das Studium der Enzyme des Fettsäurezyklus.

Das Prinzip dieser optischen Teste ist an Hand der Absorptionspektren der verschiedenen Thioester (Bild 2) einfach zu zeigen. Die Derivate der gesättigten Säuren und der β -Oxybuttersäure absorbieren nur im kurzwelligen Ultravioletten bei 233 m μ , während die Thioester der α, β -ungesättigten Crotonsäure oder der Acet-

³³) R. Kuhn u. G. Quadbeck, Chem. Ber. 84, 844 [1951].

³⁴) G. Vogelmann, Dipl.-Arb., Univ. München 1952.

³⁵) W. Seubert, Dissert., Univ. München 1955.

³⁶) L. Wessely, Dissert. Univ. München 1955.

essigsäure zusätzlich Absorptionsmaxima bei 263 m μ oder bei 302 m μ aufweisen. Die Bande der Acetacetyl-Verbindung bei 302 m μ tritt allerdings nur in schwach alkalischer Lösung auf, weil sie dem Salz des Enols zukommt^{22, 36}). Bemerkenswerterweise tritt die Salzbildung beim Thioester schon beim Neutralpunkt ein und ist oberhalb p_H 9 abgeschlossen. In den Derivaten des Coenzymes A sind die gleichen Absorptionsbanden nachzuweisen. Nur sind sie dort überlagert von der starken Absorptionsbande des Adenosinbausteins, die in Bild 2 als gestrichelte Kurve zu sehen ist.

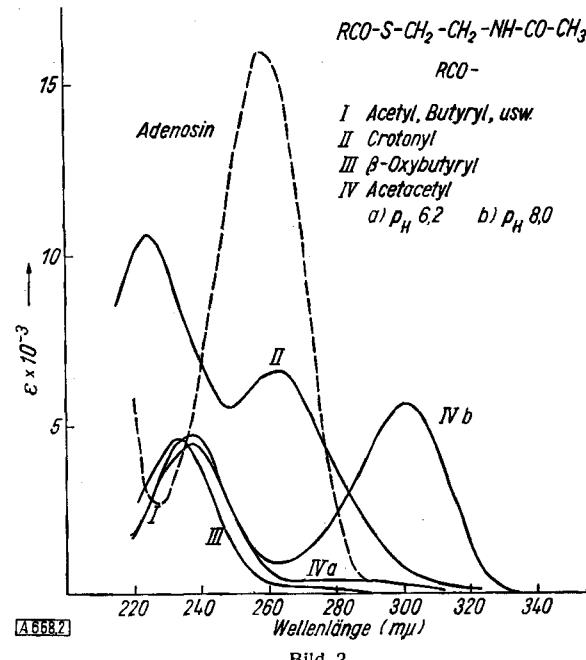
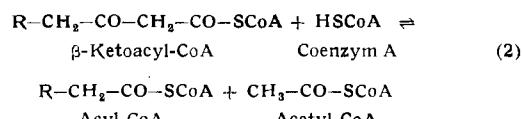


Bild 2
Absorptionsspektren verschiedener Derivate von N-Acetyl-cysteamin und des Adenosins^{35, 36})

Wenn nun unter der Wirkung des Enzyms Crotonase β -Oxybutyryl-CoA unter Abspaltung von Wasser in Crotonyl-CoA übergeht (Gleichung 1), dann tritt dabei die Crotonylmercaptopan-Bande bei 263 m μ auf und der Reaktionsablauf kann mit monochromatischem Licht dieser Wellenlänge im Spektralphotometer verfolgt werden^{20, 23}). Will man dagegen die Aktivität des Enzyms β -Ketothiolase messen, so muß man bei der Wellenlänge 302 m μ arbeiten. Die thiolytische Spaltung von Acetacetyl-CoA durch Coenzym A, unter Bildung von zwei Molekülen Acetyl-CoA, führt zum Verschwinden der Acetacetylmercaptopan-Bande²⁰).

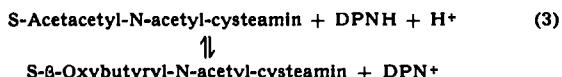


Selbstverständlich läßt sich auf diesem Wege auch die Kondensation von Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA verfolgen, doch muß man dann, wegen der schon erwähnten ungünstigen Gleichgewichtslage, mit großen Mengen Acetyl-CoA arbeiten²²). Unter Anwendung der optischen Methode hat sich die Lage des Gleichgewichts bestimmen lassen. Es wurde gefunden, daß im stationären Zustand nur etwa 4 Moleküle Acetacetyl-CoA neben 1000 Molekülen Acetyl-CoA anzutreffen sind³⁷). Dennoch können in der lebenden Zelle die Fettsäureketten auf diese Weise verlängert werden (s. u.).

Bei den optischen Testen zum Nachweis der beiden Wasserstoff-übertragenden Enzyme des Fettsäurezyklus, β -Ketohydrogenase und Äthylenhydrogenase, wurde die von Warburg entdeckte Absorptionsbande des hydrierten Pyridins bei 340 m μ ausgenutzt oder die Farbänderung eines Redox-Indikators bei der Hydrierung. Im modernen biochemischen Laboratorium sind beide Methoden geläufig. Für die eigenen Untersuchungen an diesen Enzymen war es eine wesentliche Erleichterung, daß wir mit den leicht zugänglichen Modellen an Stelle der natürlichen CoA-Verbindungen arbeiten konnten. So entdeckte

³⁷) K. Decker, Dissert. Univ. München 1955.

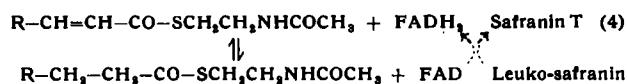
O. Wieland³⁹⁾ im Münchener Laboratorium das Enzym β -Ketohydrogenase als den Katalysator der Reaktion 3, wobei das Verschwinden der DPNH-Bande bei 340 m μ beobachtet wurde.



Mit Hilfe dieses optischen Tests konnte das Enzym aus Hammelleber isoliert werden³⁹⁾. Systematische Versuche am gereinigten Ferment ergaben, daß die Reaktion zwar reversibel ist, aber bei physiologischem p_H und bei äquivalenten Mengen DPNH und Acetacetyl-Verbindung zu 95% in der Richtung der Hydrierung der Acetacetyl-Verbindung verläuft. Dabei ist es gleichgültig, ob mit Acetacetyl-CoA oder mit dem einfachen Derivat des Cysteamins gearbeitet wird.

Die bevorzugte Bildung des β -Oxysäurederivates in Gegenwart von DPNH ist für den biologischen Vorgang von weittragender Bedeutung. Denn auf diese Weise können in der Zelle, wo β -Ketothiolase und β -Ketohydrogenase zusammen vorkommen, Fettsäureketten aufgebaut werden. Das unter Mitwirkung des ersten Enzyms gebildete β -Ketoacyl-CoA wird durch das zweite Enzym reduktiv entfernt und muß deshalb laufend nachgeliefert werden. Man kommt damit zu der Erkenntnis, daß im Organismus je nach der Stoffwechsellage, ob viel oder wenig DPNH zur Verfügung steht, Fettsäure-Ketten synthetisiert oder eingeschmolzen werden.

In groben Zügen sei auch die optische Methode geschildert, mit deren Hilfe W. Seubert^{40, 41)} im Münchener Laboratorium das Enzym Äthylenhydrogenase entdeckt und angereichert hat. Die Gleichung der stöchiometrischen Fermentreaktion ist:



Seubert studierte die Hydrierung der Crotonyl-Verbindung zur Butyryl-Verbindung und benutzte als Wasserstoff-Donator Leukosafranin. Das beim enzymatischen Prozeß gebildete FAD wird in seinem System durch den Leukofarbstoff in spontaner Reaktion wieder reduziert. Wie Bild 3 zeigt, wird der rote Farbstoff Safranin, gemessen im Licht der Wellenlänge 546 m μ , umso schneller gebildet, je mehr von dem wirksamen Enzym anwesend ist. Mit Hilfe dieser Testmethode ließ sich Äthylenhydrogenase aus Hammelleber isolieren und beweisen, daß es sich dabei um ein konjugiertes Protein mit Flavin-adenin-dinucleotid als Wirkungsgruppe handelt. Man kann es, wie bei einem gelben Ferment H. Theorell⁴²⁾ zum erstenmal gezeigt hat, in saurer Lösung spalten und kann dann das unwirksame, farblose Protein durch Zusatz der Wirkungsgruppe FAD wieder reaktivieren. Im Rekombinationsversuch erwies sich auch Riboflavinphosphorsäure wirksam; allerdings mußte von ihr rund zehnmal mehr zugesetzt werden⁴¹⁾.

Im Arbeitskreis Greens⁴³⁾ ist dieses neue gelbe Ferment ebenfalls aufgefunden und eingehend studiert worden. Es konnten dabei drei Enzyme mit der Eigenschaft einer Äthylenhydrogenase (= Acyl-CoA-Dehydrogenase) aus Lebergewebe isoliert werden, die sich in ihrer Substratspezifi-

tät voneinander unterscheiden. Eines der im Greenschen Laboratorium von Mahler⁴⁴⁾ isolierten Enzyme, das bevorzugt mit Butyryl-CoA reagiert, enthält außer FAD auch noch Kupfer, während zwei weitere Kupfer-freie Enzyme bevorzugt Acyl-CoA-Derivate größerer Kettenlängen umsetzen⁴⁵⁾. Dem Absorptionsspektrum nach ist unser gelbes Ferment mit keinem dieser Enzyme identisch.

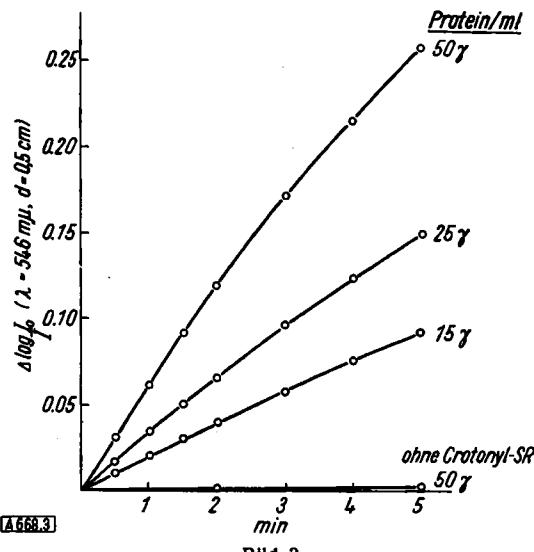
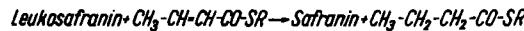


Bild 3

Optischer Test auf Äthylenhydrogenase⁴¹⁾
In der gegen Sauerstoff verschlossenen Kuvette befanden sich 138 μM Phosphatpuffer p_H 7,1, 2,6 μM S-Crotonyl-N-Acetyl-cysteamin, 0,5 μM Leuko-safranin T und Enzymprotein, wie angegeben. Gesamtvolume 2,1 ml, $d = 0,5$ cm, $\lambda = 546$ m μ , Temperatur 18 °C

Bei diesem Reaktionsschritt ist das im Fettsäurecyclus sonst übliche Prinzip, daß ein einziges Enzym mit den CoA-Derivaten verschiedener Kettenlängen reagiert, nicht uningeschränkt gültig. Nach den Untersuchungen von Ochoa und Hartling⁴¹⁾ scheint in dieser Hinsicht auch das Ferment β -Ketothiolase eine Ausnahme zu machen.

Mit Hilfe der einfachen optischen Teste konnte die Enzymverteilung im Tier- und Menschenkörper studiert werden. Ein Ergebnis solcher Experimente, welche auch auf klinische Probleme ausgedehnt werden können, gibt Tabelle 2 wieder. Es zeigt den Gehalt verschiedener Organe der Ratten an β -Ketohydrogenase und β -Ketothiolase. Wie man es von vornherein erwarten würde, verlaufen die Verteilungskurven bei beiden Fermenten gleichsinnig. In Leber und Niere, — deren Vermögen zur Fettsäure-Oxydation bekannt ist —, erreicht ihre Konzentration die höchsten Werte, während das Gehirn, das in hohem Maß auf ständige Zufuhr von Kohlehydraten angewiesen ist, nur un-

	β -Ketohydrogenase	β -Ketothiolase
Leber	41,5	15,0
Niere	19,6	17,6
Herzmuskel	37,6	25,8
Nebenniere	22,0	7,1
Pancreas	8,3	—
Hirn	1,2	2,0
Fettgewebe	11,6	8,7
Brustdrüse, normal	3,5	2,2
Brustdrüse, lactierend	8,6	4,4
Lunge	6,6	2,6
Milz	4,1	4,2
Skelettmuskel	3,0	1,7

Tabelle 2
Verteilung von β -Ketohydrogenase und β -Ketothiolase in der Ratte⁴⁴⁾
Bei den Zahlenwerten handelt es sich um Enzymeinheiten /mg lösliches Protein

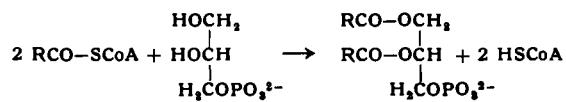
⁴⁴⁾ H. R. Mahler, ebenda 206, 13 [1953].

⁴⁵⁾ F. L. Crane, J. G. Hauge u. H. Beinert, Biochim. biophysica Acta 17, 292 [1955].

⁴⁶⁾ D. Reinwein u. O. Wieland, unveröffentl. Versuche.

geradzahlige Fettsäuren angetroffen werden. Die Synthese einer ungeradzahligen Fettsäure würde ja voraussetzen, daß beim paarweisen Aufbau der C-Kette aus Acetyl-CoA der Grundstein nicht Acetyl-CoA, sondern Propionyl-CoA ist. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß die Bakterienflora im Pansen des Schafes und auch anderer Wiederkäuer Cellulose zu Propionsäure vergärt, die dann vom Blut resorbiert wird und dort nachzuweisen ist⁶²). Das ist der Grund, daß das Fett dieser Tiere regelmäßig ungeradzahlige Fettsäuren enthält.

Bei dem Vorgang, durch den das Coenzym aus den Acyl-CoA-Verbindungen wieder in Freiheit gesetzt wird, spielt nach dem heutigen Wissensstand eine Hydrolyse keine Rolle. In dem Bestreben, eine Vergeudung der in der Acylmercaptan-Bindung ruhenden Energie zu vermeiden, benutzt die Zelle diese Energieform unmittelbar zu synthetischen Leistungen. Durch Übertragung der Acyl-Reste auf die OH-Gruppen der Phosphoglycerinsäure werden Phosphatidsäuren gebildet, aus denen dann echte Phosphatide entstehen können⁶³). Außerdem besteht die Möglichkeit, daß die Phosphatidsäuren auch Zwischenprodukte beim Aufbau der echten Fette sind.



Beim Studium dieses „Säureresteübertragenden Enzyms“, das von Kornberg und Pricer⁶⁴) in der Leber nachgewiesen werden konnte, ergab sich ein ausgeprägtes Wirksamkeitsoptimum für die Derivate der Fettsäuren mit 16–18 Kohlenstoffatomen, also der Palmitin-, Stearin- und Ölsäure (Bild 5). Es ist naheliegend, damit das bevorzugte Auftreten dieser Säuren im tierischen Organismus zu erklären. In Gegenwart des Enzyms werden aus der Reihe der verschiedenen, den Bereich von C_4 bis hinauf zu C_{18} und noch höher umspannenden Fettsäure-CoA-Derivate, die während der Biosynthese der Kohlenstoffketten nebeneinander vorhanden sind, vorwiegend Palmitin- und Stearinsäure auf Glycerin übertragen, so daß gerade diese Säuren durch den Fettsäurecyclus laufend nachgeliefert werden müssen.

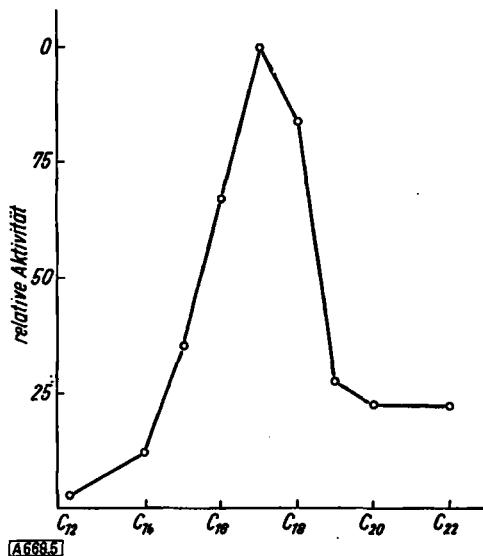


Bild 5

Substratspezifität des Enzyms der Phosphatidsäure-Synthese⁶⁴)
Abszisse: Anzahl der Kohlenstoffatome im an CoA gebundenen Fettsäurerest

Ordinate: relative Geschwindigkeit der enzymatischen Acyl-Übertragung, wobei Geschwindigkeit mit Margaryl-CoA (C_{17}) = 100

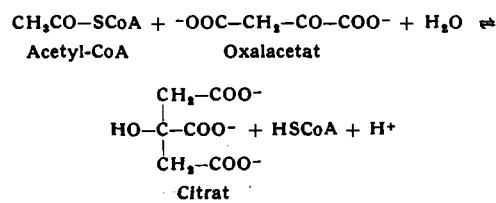
⁶²) Vgl. R. J. Pennington, Biochem. J. 56, 410 [1954].

⁶³) E. P. Kennedy, Federation Proc. 13, 241 [1954].

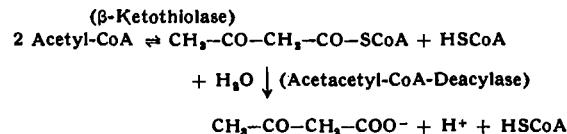
⁶⁴) A. Kornberg u. W. E. Pricer Jr., J. biol. Chemistry 204, 345 [1953].

Reaktionen des Acetyl-CoA

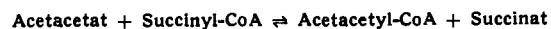
Das beim Prozeß der β -Oxydation aus den Fettsäuren gebildete Acetyl-CoA kann vom Organismus in doppelter Weise weiter umgesetzt werden. Die Kondensation mit Oxalacetat unter der katalytischen Wirkung des „kondensierenden Enzyms“ leitet die vollständige Verbrennung im Citronensäurecyclus ein, wobei schließlich Kohlenstoffdioxid und Wasser entstehen.



Da nun aber im Organismus zur Synthese von Eiweißständig Ketosäuren aus dem Citronensäurecyclus entnommen werden, kann dieser Prozeß nur durch laufende Zufuhr von Oxalesigsäure in Betrieb gehalten werden. Für diesen Zufluß von Oxalesigsäure sind im Tierkörper Carboxylierungsprozesse maßgebend, bei denen Brenztraubensäure oder auch Phosphor-brenztraubensäure mit CO_2 vereinigt werden^{65, 66}). Da diese Säuren beim biologischen Abbau von Zucker gebildet werden, ist es verständlich, warum im höheren Organismus zwischen der Verbrennung von Fetten und dem Kohlehydratstoffwechsel enge Beziehungen bestehen. Wird dieses Zusammenspiel gestört, dann bleibt, wie man seit langem weiß, der Fettsäureabbau auf der Stufe der Keton-Körper stehen. Heute kann man dies damit erklären, daß unter solchen Bedingungen zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA zusammentreten, durch dessen hydrolytische Spaltung dann Acetessigsäure gebildet wird⁶⁷).



Das Vorkommen großer Mengen des hydrolysierenden Fermentes, einer sog. Deacylase, in der Leber, ist für die Entstehung von Acetessigsäure in diesem Organ verantwortlich^{21, 67, 68}). Breusch⁶⁸) vertritt die Ansicht, daß dieser Prozeß auch beim gesunden Organismus eine wichtige Rolle spielt. Die Oxydation der Fettsäuren in der Leber soll demnach nur bis zur Stufe der Acetessigsäure führen, die dann durch das Blut den peripheren Organen angeboten und dort über den Citronensäurecyclus definitiv zu H_2O und CO_2 verbrannt wird. Als Transportform kommt auch die durch Reduktion aus der Ketosäure gebildete D- β -Oxybuttersäure in Betracht, die wie Acetessigsäure noch etwa $\frac{2}{3}$ des Verbrennungswertes der Fettsäuren enthält. Der enzymatische Mechanismus einer Verbrennung von Acetessigsäure in der Peripherie ist durch neue Arbeiten aus den Laboratorien in Madison⁶⁹) und New York⁷⁰) klar gestellt worden. In beiden Arbeitskreisen konnte ein neues Enzym als Bestandteil der Muskulatur nachgewiesen werden, das eine reversible CoA-Übertragung von Succinyl-CoA auf Acetacetyl katalysiert.



⁶⁵) S. Ochoa, in J. B. Sumner u. K. Myrbäck: The Enzymes, Bd. II, S. 929, Academic Press, New York 1952.

⁶⁶) M. F. Utter u. K. Kurahashi, J. biol. Chemistry 207, 821 [1954].

⁶⁷) J. R. Stern, M. J. Coon u. A. del Campillo, Nature [London] 171, 28 [1953].

⁶⁸) F. L. Breusch, diese Ztschr. 62, 66 [1950].

Da Succinyl-CoA im Citronensäurecyclus auftritt⁶¹), wird auf diesem Wege die Energie für die Aktivierung von Acetessigsäure, also für die Bildung von Acetacetyl-CoA unmittelbar dem Citronensäurecyclus entnommen. Anschließend kann dann Acetacetyl-CoA unter Mitwirkung von β -Ketothiolase und „kondensierendem Enzym“ des Muskels in bekannter Weise in den Citronensäurecyclus eingeschleust werden (Bild 6).

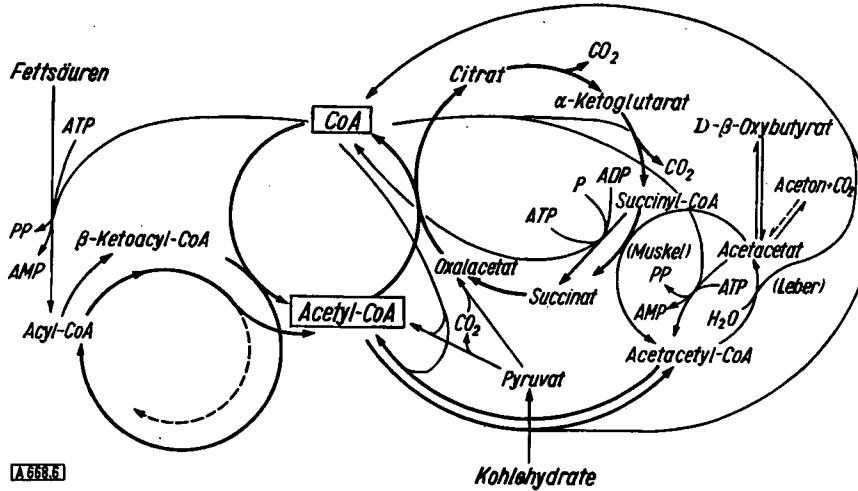
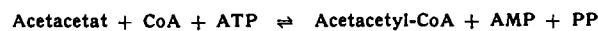


Bild 6. Zusammenspiel von Fettsäure- und Citronensäurecyclus

Außer im Muskel ist diese CoA-Transferase bisher auch noch in der Niere angetroffen worden. Dort findet sie sich vergesellschaftet mit einem anderen Enzym der Acetacetat-Aktivierung, bei welchem, — analog der Aktivierung gesättigter Fettsäuren — die Spaltung von ATP die Energie liefert⁶²).



Das Zusammenspiel zwischen Fettsäure- und Citronensäurezyklus, ist in Bild 6 noch einmal schematisch wiedergegeben. Dieses Schema läßt erkennen, daß beide Alternativen für den Umsatz von Acetyl-CoA, die Bildung von

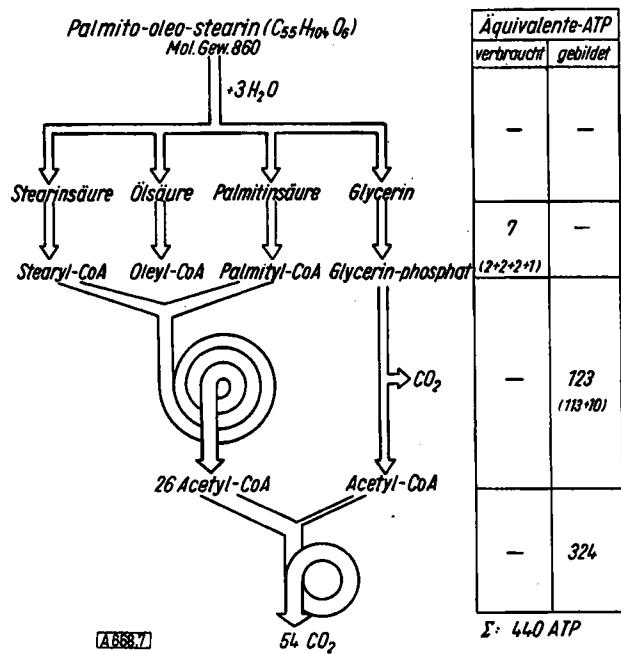


Bild 7

ATP-Bilanz der Fettsäureoxydation
1 Äquivalent ATP entspricht einer Pyrophosphat-Bindung. Wenn somit bei der Aktivierung der Fettsäuren AMP gebildet wird, so entspricht dies 2 Äquivalenzen, da das gleichzeitig gebildete Pyrophosphat in der Zelle wahrscheinlich sofort hydrolysiert wird

⁶¹) Vgl. T. Bücher, diese Ztschr. 62, 256 [1950].

Citrat sowohl wie die Bildung von Acetacetat, freies Coenzym A an den Fettsäurezyklus zurückgeben, wo es zur Aktivierung neuer Fettsäure-Moleküle und beim Thiolyse-Schritt laufend benötigt wird. Somit kann man verstehen, daß Coenzym A im Leben katalytisch wirkt und in der Bilanzgleichung der β -Oxydation der Fettsäuren nicht erscheint.

Die ATP-Bilanz der Fettoxydation

Es ist heute bekannt, daß für den energetischen Wirkungsgrad von Stoffwechselvorgängen einzig und allein die Bildung energiereicher Phosphat-Bindungen maßgeblich ist, die in Form von Adenosintriphosphat den Energiebedarf des Organismus speisen können⁶³). Nimmt man nun an, daß die über die Glieder der Atmungskette ablaufende Oxydation des hydrierten gelben Fermentes (Äthylenhydrogenase) zwei energiereiche Phosphat-Bindungen, jene des hydrierten Pyridins (β -Ketohydrogenase) aber deren drei liefert, so ergibt sich die in Bild 7 wiedergegebene ATP-Bilanz für die biologische Fettoxydation. Bild 7 läßt zweierlei erkennen. Einmal, daß jene ATP-

Äquivalente, die bei den Prozessen der Fettsäure- oder Glycerin-Aktivierung verbraucht werden, bezogen auf den Gesamtvorgang, überhaupt nicht ins Gewicht fallen. Im Falle des Palmito-oleostearins macht dieser Verbrauch noch nicht einmal 2% des gebildeten ATP aus. Außerdem zeigt diese Bilanz, daß der Organismus beim Abbau von Fett bis zur Stufe des Acetyl-CoA bzw. der diesem stoffwechselmäßig nahezu gleichwertigen Acetessigsäure*) nur etwa ein Viertel der möglichen ATP-Menge gewinnen kann. Der Rest wird erst bei der Oxydation des Acetyl-Restes im Citronensäurezyklus entbunden. Auf die Frage, was der Grund für die energetische Sonderstellung des Fets unter den Nahrungsstoffen ist, lautet daher die Antwort: Der bei Abbau gleicher Gewichtsmengen verschiedener Nahrungsstoffe wesentlich größere Anfall an Acetyl-CoA. Zur Bildung von 1 Mol Acetyl-CoA sind nämlich 81 g Stärke, aber nur 31,7 g Fett nötig.

Eingeg. am 26. Juli 1955 [A 668]

Nachtrag: Anlässlich der 11. Internat. Konferenz über biochemische Probleme der Lipoide (28.–30. Juli 1955 in Gent), wurde zwischen den verschiedenen Arbeitskreisen folgende Nomenklatur für die Enzyme des Fettsäure-Stoffwechsels vereinbart:

Systematischer Name	Trivialname	Bisheriger Name
Acyl-dehydrogenase (z. B. Butyryl-dehydrogenase)	—	Athylenhydrogenase
Enoyl-hydrolase (z. B. Crotonyl-hydrolase)	Crotonase	Crotonase
β -Oxyacyl-dehydrogenase	—	β -Ketohydrogenase
β -Ketoacyl-thiolase (z. B. Acetacetyl-thiolase)	Thiolase	β -Ketothiolase
Thiokinase (z. B. Acetat-thiokinase)	—	„aktivierendes Enzym“
Thiophorase (z. B. Acetacetyl-succinat-thiophorase, Acetyl-butyrat-thiophorase)	—	CoA-Transferase
		CoA-Transphorase

*) In der Leber entsteht Acetacetat aus Acetyl-CoA ohne Bildung von ATP. Der gleiche Vorgang im Muskel kann jedoch 1 ATP liefern, weil hier die Freisetzung von Acetacetat aus Acetacetyl-CoA nicht hydrolytisch, sondern durch Umsetzung mit Succinyl-CoA stattfindet:
 $\text{Acetacetyl-CoA} + \text{Succinat} \rightleftharpoons \text{Acetacetat} + \text{Succinyl-CoA}$
 $\text{Succinyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P} \rightleftharpoons \text{Succinat} + \text{CoA} + \text{ATP}^{64})$