

Gruppe mit der Koordinationszahl 5 auf. Eine Deutung der Ringabhängigkeit wird vermutlich der Konformationsanalyse vorbehalten sein. Einstweilen kommt dem Alternieren der kinetischen Größen in Bild 25 noch der Reiz des Ungeklärten zu.

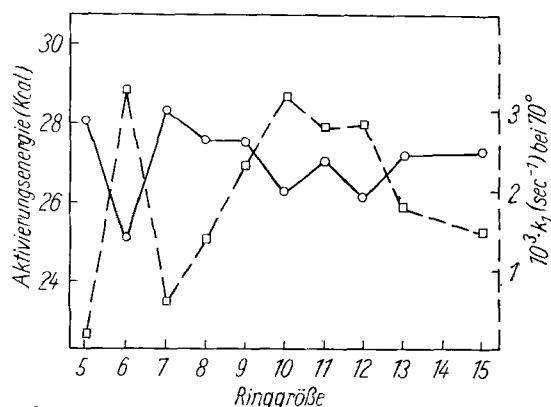


Bild 25

Chapman-Umlagerung der Cyclanon-oxim-trinitrophenyläther in 1,4-Dichlorbutan⁹⁰). Aktivierungsenergien: o-o; Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten: □-□-□

Den vorstehend beschriebenen Ausflügen in recht verschiedene Gebiete der theoretischen organischen Chemie lagen Mittlere-Ring-Effekte als Leitmotiv zugrunde. Zuweilen entfernte sich die Diskussion beachtlich von der Reihe der mittleren Ringe; für die Untersuchung der Aryl-Wanderung bei der Beckmann-Umlagerung etwa hatten Experimente an Ringverbindungen nur den Anstoß gegeben. Es sei erlaubt, aus der Not eine Tugend zu machen: Bei der Erschließung neuer Arbeitsgebiete dürfte es sich empfehlen, nicht im engen Rahmen der Systematik zu verweilen. Erst die lebendige Wechselbeziehung eines Arbeitsgebietes mit dem Gesamtbild der organischen Chemie führt zur Bereicherung und schafft neue Erkenntnis!

Ein Wort dankbarer Anerkennung für die Leistung tüchtiger Mitarbeiter: An den Untersuchungen waren beteiligt die Herren M. T. Assemi, H. Brade, E. Mergenthaler, H. Oertel, H. Ott, W. Rapp, E. Rauenbusch, J. Reinertshofer, U. Rietz, G. Seidl, V. Trescher, I. Ugi, V. Vossius, H. Walz und J. Witte sowie Frau W. Jira und Fräulein J. Glogger. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie sind wir für die Unterstützung dieser Arbeiten sehr zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 25. April 1957 [A 811]

Die Synthese der Fettsäuren mit gereinigten Enzymen des Fettsäurecyclus

Von Dr. W. SEUBERT, G. GREULL und Prof. Dr. F. LYNEN

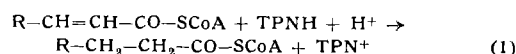
Max-Planck-Institut für Zellchemie, München, und Chemisches Laboratorium der Universität München, Institut für Biochemie

Mit einem künstlich zusammengestellten Enzymsystem, zu dem außer Thiolase, β -Hydroxyacyl-dehydrogenase und Crotonase noch ein neues reduzierendes Enzym, das aus Tierlebern oder Hefe isoliert werden kann, gehört, ließen sich höhere Fettsäuren aus markiertem Acetyl-CoA aufbauen. Das Maximum der Radioaktivität lag — bei Verwendung des reduzierenden Enzyms aus Schweineleber — nicht, wie man erwartet hatte, bei den langkettigen Fettsäuren, sondern bei Caprinsäure, da durch eine Acyl-CoA-Deacylase, die in dem Enzympräparat enthalten war, das im Fettsäurecyclus gebildete Caprynyl-CoA großenteils hydrolytisch gespalten wurde. Bei Verwendung eines Enzympräparats aus Hefe, das diese Deacylase nicht enthielt, nahm die Radioaktivität mit wachsender Kettenlänge zu.

Die bei der β -Oxydation der „aktivierten Fettsäuren“ im Fettsäurecyclus beteiligten Enzyme wurden während der letzten Jahre in tierischen Geweben und Mikroorganismen nachgewiesen¹). Wie sich bei der Untersuchung der gereinigten Enzymproteine ergab, arbeitet jeder der beteiligten Katalysatoren reversibel, so daß in ihrer Gegenwart Fettsäureketten aus Acetyl-CoA*) aufgebaut werden sollten. Stansly und Beinert²) prüften diese Annahme experimentell mit den gereinigten Enzymen Thiolase, β -Hydroxyacyldehydrogenase, Crotonase und Acyldehydrogenase und fanden, daß ¹⁴C-Essigsäure aus Acetyl-CoA zwar in Buttersäure, jedoch nicht in die höheren Homologen eingebaut wird. Der Beweis, daß die Enzyme des Fettsäurecyclus bei der Biosynthese der langkettigen Carbonsäuren mitwirken,

stand bisher noch aus, obwohl dies auch auf Grund der Versuche von Hele, Popják und Laurysens³) an Extrakten der Kaninchen-Brustdrüse sehr wahrscheinlich war.

Es ist uns jetzt gelungen, mit einem künstlichen, aus definierten Komponenten zusammengestellten Enzymsystem, höhere Fettsäuren aus Acetyl-CoA aufzubauen. Wie wir fanden, ist bei dieser Biosynthese ein neues Enzym beteiligt, das den Wasserstoff von reduziertem Triphosphopyridin-nucleotid (TPNH) auf α,β -ungesättigtes Acyl-CoA überträgt (1).



Dieses neue Enzym, das vorläufig als „reduzierendes Enzym des Fettsäurecyclus“ bezeichnet sei, tritt bei der Synthese der Fettsäure-Kette an die Stelle der beim Abbau tätigen Acyldehydrogenasen, wie Bild 1 zeigt.

Die Existenz des neuen Enzyms zeigten Versuche Langdons⁴) an Rattenleberhomogenaten an. Es läßt sich im

*) Folgende Abkürzungen werden benützt: Coenzym A = CoA oder CoASH; S-Acyl-Coenzym A-Derivat = Acyl-SCoA oder Acyl-CoA; oxydiertes und reduziertes Diphosphopyridin-nucleotid = DPN⁺ und DPNH; oxydiertes und reduziertes Triphosphopyridin-nucleotid = TPN⁺ und TPNH; oxydiertes und reduziertes Flavin-adenin-dinucleotid = FAD und FADH₂; Phosphat = P; Alkoholdehydrogenase = ADH; „elektron transferring flavoprotein“ = ETF.

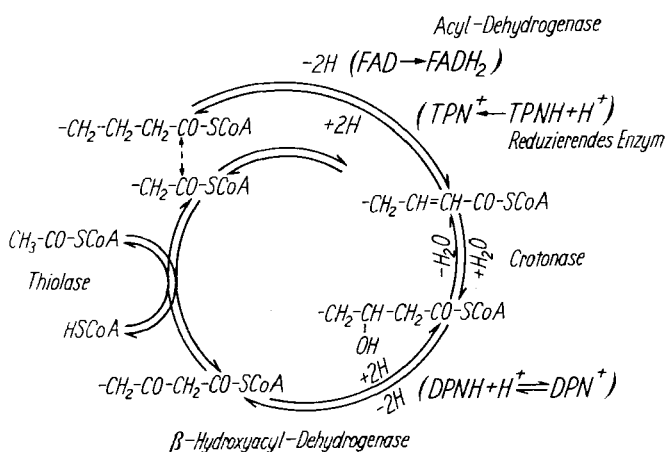
¹) Übersicht vgl. F. Lynen, diese Ztschr. 67, 463 [1955]; Annu. Rev. Biochem. 24, 653 [1955].

²) P. G. Stansly u. H. Beinert, Biochim. biophysica Acta 11, 600 [1953].

³) P. Hele, G. Popják u. M. Laurysens, Biochemie. J. 65, 348 [1957].

⁴) G. R. Langdon, J. Amer. chem. Soc. 77, 5190 [1955].

TPNH-Verbrauch der zugesetzten Menge an Octenoyl-CoA gemäß Gleichung (1). In einer weiteren Versuchsreihe wurde außer dem TPNH-Verbrauch auch die Bildung von Octanoyl-CoA gemessen. Man fand es in äquivalenter Menge (Tabelle 1). Die Wirksamkeit des Enzympräparates aus Lebermitochondrien erstreckt sich auf die Coenzym-A-Derivate der normalen α,β -ungesättigten Säuren von C_4 bis C_{16} . Ob auch Dehydrostearyl-CoA und seine höheren Homologen umgesetzt werden, wurde bisher noch nicht geprüft.



A 814.1

Bild 1
Auf- und Abbau der Fettsäuren im Fettsäurecyclus

mit 0,1- bis 0,2proz. Natriumcholat-Lösung und fraktioniertes Zentrifugieren in der Ultrazentrifuge lassen sich enzymatisch wirksame Partikel gewinnen, die nahezu frei von Acyldehydrogenase, β -Hydroxyacyl-dehydrogenase und Thiolase sind und von den enzymatischen Katalysatoren des Fettsäurecyclus nur noch Crotonase in kleiner Menge enthalten. Einen optischen Versuch unter Verwendung des so gereinigten reduzierenden Enzyms zeigt Bild 2. Läßt man dieses Enzympräparat auf Octenoyl-CoA einwirken, so entspricht der aus der Extinktionsabnahme berechnete

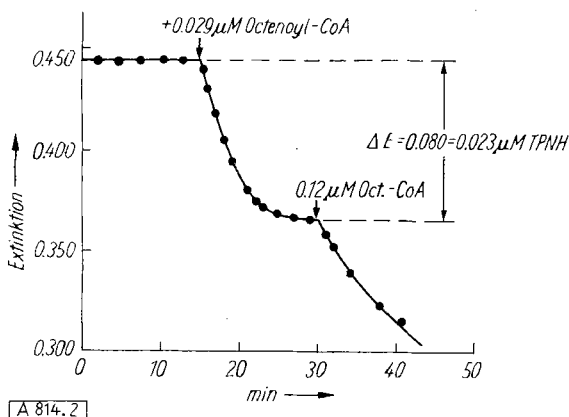


Bild 2

Optischer Nachweis des reduzierenden Enzyms des Fettsäurecyclis
m/15 Phosphat-puffer p_H 7,0; 0,165 μM TPNH; 565 γ red. Enzym (spez. Akt. 125). $\lambda = 366 m\mu$; $d = 1$; Vol. 1 ml. Messung der Extinktionsänderungen gegen eine Kontrollprobe gleicher Zusammensetzung, zu der an Stelle des Substrats Wasser gegeben wurde.
Zur Darstellung des reduzierenden Enzyms wurden frische Mitochondrien aus Schweineleber in einer Rohrzucker- K_2HPO_4 -Lösung (0,25 m-Rohrzucker, 0,5 % K_2HPO_4) suspendiert (Protein-Gehalt 20 mg/ml), mit 0,005 Volumina 40proz. Natriumcholeat-Lösung versetzt und 30 min bei 20000 U/min in der Spinco-Ultrazentrifuge (Rotor Nr. 30) zentrifugiert. Die Partikeln setzten sich dabei in Form eines kompakten und eines darüber befindlichen, spezifisch leichteren Niederschlages ab, der durch mehrmaliges Kippen der Zentrifugenbecher aufgewirbelt, vom festen Niederschlag abdekantiert und 30 min bei 30000 U/min abzentrifugiert wurde. Dieser Niederschlag, in Rohrzucker- K_2HPO_4 suspendiert, wurde bei einem Proteingehalt von 20 mg/ml 30 min bei 40000 U/min (Spinorotor 40) zentrifugiert, die sich wieder abscheidende, spezifisch leichtere Zone abgetrennt und erneut 50 min bei 40000 U/min zentrifugiert. Die vollständige Abtrennung von Thiolase, β -Hydroxyacyldehydrogenase und der Acyldehydrogenasen gelang durch viermalige, ein- bis zweistündige Inkubation der Partikeln mit Natriumcholeat (Endkonzentration 0,1 %; Protein-Gehalt 12 mg/ml) in Rohrzucker- K_2HPO_4 -Lösung. Dabei wurde nach der ersten Choleat-Behandlung erneut bei 40000 U/min, wie schon beschrieben, fraktioniert, bei den darauffolgenden Schritten ohne Fraktionierung eine Stunde bei 40000 U/min abzentrifugiert. Alle Operationen bei 0°C.

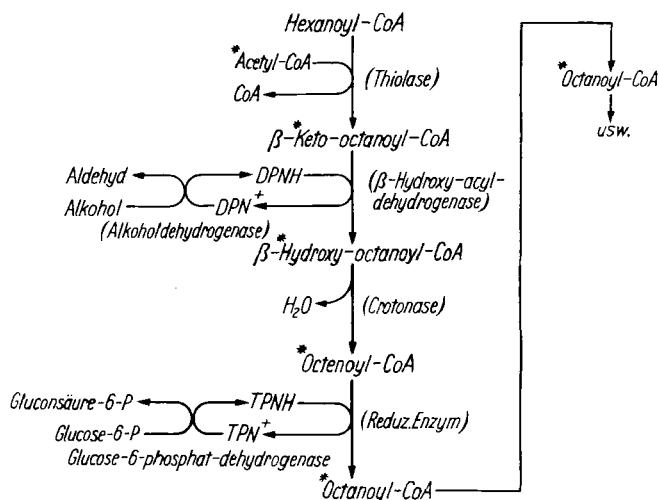
Octenoyl-CoA eingesetzt	TPNH verbraucht	Octanoyl-CoA** gebildet
0,108 μ M	0,097 μ M	0,088 μ M
0,100 μ M	0,095 μ M	0,085 μ M

Tabelle 1

Bilanz der Umsetzung am reduzierenden Enzym des Fettsäurecyclus.
m/15-Phosphat-Puffer, p_H 7,0; 0,25 μM TPNH; 1,1 mg reduz. En-
zym (spez. Aktivität 180). Vol. 1 ml; $T = 30^\circ C$

**) Zur quantitativen Octanoyl-CoA-Bestimmung diente die Entfärbung von Dichlorphenol-indophenol in Gegenwart von gereinigter Acylaldehydhydrogenase ¹⁾ und ETF⁵⁾.

Die Zusammensetzung des Enzymsystems, dessen Fähigkeit zur Fettsäuresynthese aus Acetyl-CoA durch die Inkorporation von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat in höhere Fettsäuren nachgewiesen werden konnte, ist in Bild 3 schematisch wiedergegeben. Außer den Substraten Acetyl-CoA und Capronyl-CoA**), wovon ersteres durch ^{14}C markiert war, erfordert



A 814.3

Bild 3
Zusammensetzung und Wirkung des Enzymsystems
für die Fettsäuresynthese

die Synthese den Zusatz von Thiolase, β -Hydroxyacyl-dehydrogenase und reduzierendem Enzym sowie von Hilfsystemen für die Bereitstellung von DPNH und TPNH (Tabelle 2). Die Unentbehrlichkeit der Crotonase, die in den verwendeten Präparaten des reduzierenden Enzyms noch enthalten war, ließ sich durch die Stimulierung des Acetat-Einbaus nach Zusatz von reiner Crotonase einwandfrei erkennen (Tabelle 2).

Wie Tabelle 2 zeigt, war auch in Abwesenheit von DPNH, d. h. in Abwesenheit von Alkohol, Alkohol-dehydrogenase (ADH) und DPN^+ , eine merkliche Fettsäuresynthese nachzuweisen. Hierfür ist die Fähigkeit der β -Hydroxyacyl-dehydrogenase, TPNH an Stelle von DPNH zu verwerten, verantwortlich zu machen. Zwar ergab die Untersuchung des gereinigten Enzyms aus Schweineherz für das

**) Auch bei Abwesenheit von Capronyl-CoA wurden radioaktive Fettsäuren gebildet. Die Inkorporation des markierten Acetats in die langkettigen Säuren konnte aber durch Zugabe von Capronyl-CoA, das als „Rumpf“ für die Anheftung der C₂-Bausteine unter Verlängerung der Kohlenstoff-Kette diente, wesentlich gefördert werden.

⁵) F. L. Crane u. H. Beinert, J. biol. Chemistry 218, 717 [1956].

Verhältnis der Aktivitäten mit TPN⁺ und DPN⁺ den Wert 1:80. Da aber in unseren Versuchen die Aktivität des reduzierenden Enzyms die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese begrenzte, gab sich die Unterlegenheit des TPNH bei dem von β -Hydroxyacyl-dehydrogenase katalysierten Schritt nicht im gleichen Ausmaß zu erkennen.

Bei der Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Fettsäuren lag das Maximum bei Verwendung des reduzierenden Enzyms aus Schweineleber bei Caprinsäure (C₁₀); aber auch Laurin-(C₁₂), Myristin-(C₁₄), Palmitin-(C₁₆)

Die Aktivität dieser Deacylase ist gegenüber Capronyl-CoA gering, steigt jedoch mit der Verlängerung der Kohlenstoff-Kette im Acyl-CoA beträchtlich an. Somit wurde in unserem System das nach zweimaligem Umlauf im Fettsäurecyclus gebildete Capriny-CoA grobenteils hydrolytisch gespalten und fiel daher für die Synthese längerer Kohlenstoff-Ketten aus.

Ein aus Hefemacerationssaft isoliertes Präparat des reduzierenden Enzyms erwies sich frei von dieser Deacylase.

	Reaktionsansatz	Caprylsäure (C ₈)		Caprinsäure (C ₁₀)		> Laurinsäure (C ₁₂)		Verteilg. d. Aktivität von C ₁₀ -C ₁₆
		Imp/min	mμM C ₂ -Einbau	Imp/min	mμM C ₂ -Einbau	Imp/min	mμM C ₂ -Einbau	
I	Komplett	3100	28	7950	72	5310	48,5	C ₁₀ »C ₁₂ >C ₁₄ <C ₁₆
	ohne Crotonase	2830	26	3340	30	1380	12,6	C ₁₀ »C ₁₂ >C ₁₄ <C ₁₆
	ohne β -Hydroxyacyl-dehydrogenase	1140	10	420	3,8	0	0	
II	Komplett	4300	39	11000	100	2500	32	
	ohne Thiolase	730	6,5	0	0	0	0	
	ohne red. Enzym	150	1,4	0	0	0	0	
	ohne TPN ⁺	1470	13	425	4	0	0	
	ohne DPN ⁺ , ADH und Alkohol	4280	39	820	7,5	950	8,5	C ₁₀ >C ₁₂ >C ₁₄ <C ₁₆

Tabelle 2. Abhängigkeit der Fettsäure-Synthese von den Enzymen des Fettsäurecyclus.

Das komplette System bestand aus:

I) 1 ml m/5-Kaliumphosphat-puffer, p_H 7,4; 0,1 ml Äthanol; 10 μM Glucose-6-phosphat; 0,39 μM Capronyl-CoA; 1,0 μM 1-¹⁴C-Acetyl-CoA (110 000 Imp./min); 0,5 μM TPN⁺; 1,0 μM DPN⁺; 150 γ Glucose-6-phosphat-dehydrogenase⁶⁾; 300 γ Alkohol-dehydrogenase⁷⁾; 720 γ Thiolase aus Leber (spez. Akt. 20000)⁸⁾; 350 γ β -Hydroxyacyl-dehydrogenase (spez. Akt. 9400)⁹⁾; 270 γ Crotonase¹⁰⁾; 2,9 mg red. Enzym aus Schweineleber (spez. Akt. 240). Vol. 1,9 ml; T = 37 °C; Inkubationszeit 4 Std.

II) 970 γ Thiolase aus Schweineherz (spez. Akt. 7.150)¹¹⁾; dieses Präparat enthielt noch β -Hydroxyacyl-dehydrogenase. Weitere Komponenten wie unter I.

Nach der Inkubation wurde der Ansatz 30 min bei p_H 10 auf 100 °C erhitzt, eine Mischung aus je 1 μM Capryl-, Caprin-, Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure zugesetzt, die Säuren mit Petroläther extrahiert, in die Hydroxamsäuren übergeführt und auf Schleicher-Schüll-Filtrierpapier 2043b (acetyliert) mit Essigester-Tetrahydrofuran-Wasser (1:6:8) aufsteigend getrennt. Die Radioaktivität der durch Besprühen mit FeCl₃-Lösung sichtbar gemachten Hydroxamsäure-Flecken wurde im Radiopapierchromatograph bestimmt.

und Stearinsäure (C₁₈), zeigten merkliche Aktivität. Berücksichtigt man aber, daß als Folge der successiven Anlagerung markierter Acetyl-Gruppen an stabiles Capronyl-CoA die spezifische Radioaktivität der gebildeten Caprin-, Laurin-, Myristin- oder Palmitinsäure zwei-, drei-, vier- oder fünfmal größer sein muß als diejenige der Caprylsäure, dann ist zu erkennen, daß in dieser Versuchsreihe hauptsächlich Caprinsäure und nur kleine Mengen höherer Fettsäuren gebildet wurden. Für dieses Resultat ist eine Acyl-CoA-Deacylase verantwortlich, die in den Präparaten des reduzierenden Enzyms aus Schweineleber enthalten war und eine hydrolytische Spaltung (2) bewirkte:



⁶⁾ W. Lamprecht, unveröffentl.

⁷⁾ E. Racker, J. biol. Chemistry 184, 313 [1950].

⁸⁾ D. Reinwein, unveröffentl.

⁹⁾ M. Grassl, Diss. München 1957.

¹⁰⁾ J. R. Stern, A. del Campillo u. I. Raw, J. biol. Chemistry 218, 791 [1956].

¹¹⁾ G. Hartmann, unveröffentl.

Verwendete man es an Stelle des Enzyms aus Lebermitochondrien, so nahm die Radioaktivität der gebildeten Fettsäuren in der erwarteten Weise mit wachsender Kettenlänge zu. Die obere Grenze für die Verlängerung der Kohlenstoff-Kette wurde bisher nicht bestimmt. Sie dürfte durch die Spezifitätsbereiche der beteiligten Enzyme gegeben sein, über die wir nur mangelhaft unterrichtet sind. Wir konnten keinen Anhaltspunkt finden, daß die Spezifität der Thiolase in erster Linie dafür maßgebend ist¹²⁾. Unsere gereinigten Enzympräparate aus Schafsleber wie aus Schweineherz erwiesen sich den CoA-Derivaten mit kurzer und langer Kohlenstoff-Kette gegenüber als wirksam¹²⁾.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, sind wir für die Gewährung einer Sachbeihilfe zu großem Dank verpflichtet.

Eingegangen am 30. April 1957 [A 814]

¹²⁾ Vgl. dagegen: D. E. Green, Physiol. Rev. 29, 330 [1954]; S. Ochoa, Advances in Enzymol. 15, 183 [1954].