

Die Synthese verschiedener Carbonsäuren durch den Multienzymkomplex der Fettsäuresynthese aus Hefe und die Erklärung ihrer Bildung

M. SUMPER, D. OESTERHELT, C. RIEPERTINGER und F. LYNEN

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

(Eingegangen am 6. Mai 1969)

1. The purified multienzyme complex, fatty acid synthetase of yeast, produces palmityl-CoA and stearyl-CoA in equal amounts under standard conditions, with adequate NADPH, and a 1:2 ratio of acetyl-CoA and malonyl-CoA. Based on the known enzymatic properties of fatty acid synthetase a model which rationalizes the chain termination at the level of C_{16} and C_{18} -acid is proposed.

2. The model is based on two assumptions that are supported by experimental evidence: (a) the probability of any covalently enzyme-bound saturated acyl residue forming a product by transfer to CoA is determined by the relative velocities of the condensing and transferring reactions. (b) The growing alkan chain interacts with the enzyme protein only after a chain length of 13 carbon atoms has been attained; this interaction changes the relative velocities in favour of product formation by an energy increment of — 0.9 kcal for each additional methylene group beyond the 13th.

3. To calculate the probability of product release at a particular chain length, an equation was derived from the model describing quantitatively the observed product distribution.

4. The formula suggests conditions under which either short acyl-CoA derivatives or exclusively stearyl-CoA can be produced. Synthesis under these conditions was examined experimentally and results indicated that the formula can be applied to a wide range of experimental conditions.

5. Because the condensation reaction in fatty acid synthesis is the rate limiting step under normal conditions, saturated acyl residues have the longest life-time as intermediates and consequently the highest probability of leaving the enzyme complex as an endproduct. The reduction reactions can be made rate limiting when the NADPH level drops. Under such circumstances β -ketoacyl-CoA's and α,β -unsaturated acyl-CoA's appear as endproducts. With NADH as electron donor the first reduction is slowed to such an extent that predominantly β -ketoacyl-CoA's derivatives are synthesized.

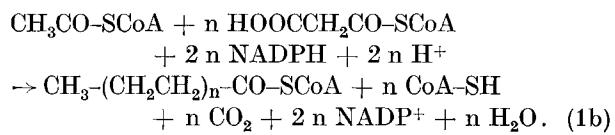
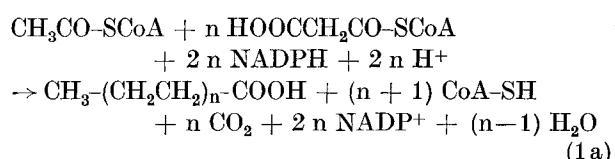
6. The possibility that the enzyme complex catalyses synthesis of short chain fatty acids and β -ketoacids *in vivo* is discussed.

Hauptkomponenten der Fettsäuren in den Lipiden nahezu aller Organismen sind die Verbindungen mit 16 und 18 Kohlenstoffatomen. Seit Ende der 50er Jahre wurden in mehreren Laboratorien Enzymsysteme isoliert, die die Synthese der gesättigten Fettsäuren katalysieren [1—6]. Zum Teil liegen diese Enzymsysteme als Multienzymkomplexe vor, so in Hefe und tierischem Gewebe [4, 7—9], zum Teil können sie aus der Zelle nur in Form ihrer Einzelkomponenten isoliert werden, wie die bakteriellen [10—13] und pflanzlichen Systeme [14, 15]. Alle Enzymsysteme katalysieren die Reaktion von Acetyl-CoA, Malonyl-

Nicht allgemein gebräuchliche Abkürzungen. AcCoA, Acetyl-CoA; MalCoA, Malonyl-CoA; NPGS, Neopentylglykolsuccinat.

Enzyme. Acetyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.2); Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49).

CoA und NADPH zu den höheren Fettsäuren (z.B. in tierischen Geweben) bzw. ihren CoA-Derivaten (z.B. in Hefe) nach folgender Bruttogleichung:



Acetyl-CoA, als der Starter der Synthese, wird in einem cyclischen Prozeß (Fig. 1) sukzessive durch

C_2 -Einheiten aus Malonyl-CoA verlängert. Theoretisch könnten dabei Fettsäuren beliebiger Kettenlänge entstehen. Die Produktanalyse (Fig. 2) der *in vitro* Synthese bestätigte und erklärte jedoch das Vorkommen von hauptsächlich C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren in der Zelle. Palmitin- und Stearinsäure sind die Hauptprodukte, d. h. der cyclische Synthese-
prozeß im Enzymsystem wird auf dieser Stufe spezifisch abgebrochen. Die Frage, warum dies geschieht, ist ein bislang ungeklärtes Problem der Fettsäurebiosynthese. Die vorliegende Arbeit versucht, diese Frage am Beispiel der Fettsäuresynthetase aus Hefe zu beantworten.

EXPERIMENTELLER TEIL

Materialien

Käufliche Präparate. CoA-SH, NADPH, NADH, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim); Tridecansäure, Pentadecansäure, Heptadecansäure, Nonadecansäure, 2-Hexadecensäure (Th. Schuchardt, München); Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure, Methylundekylketon, Methyltridecylketon, Methylpentadecylketon (C. Roth, Karlsruhe); Serumalbumin vom Rind (Behring-Werke, Marburg); Na[1-¹⁴C]Acetat, Na[2-¹⁴C]-Malonat, Na[¹⁴C]Carbonat, [1-¹⁴C]Palmitinsäure (Radiochemical Centre, Amersham). Guanidinhydrochlorid (Th. Schuchardt, München) wurde aus Methanol umkristallisiert.

Acyl-CoA-Präparate. Acetyl-CoA wurde nach [16], [1-¹⁴C]Acetyl-CoA nach [1] dargestellt, Malonyl-CoA nach [17], Palmityl-CoA nach [21]. Gehaltsbestimmung des Acetyl-CoA nach [18], Malonyl-CoA mit Fettsäuresynthetase nach [1], Palmityl-CoA nach [22].

[2-¹⁴C]Malonyl-CoA. Die Vorschrift von Eggerer und Lynen [17] wurde, um eine höhere spezifische Radioaktivität des [2-¹⁴C]Malonyl-CoA zu erzielen, wie folgt modifiziert: 8 mg Na[2-¹⁴C]Malonat werden mit 1 ml peroxidfreiem Äther überschichtet und mit 0,04 ml 12 N H_2SO_4 versetzt. Nach Zugabe von festem Na_2SO_4 wird der Kristallbrei fünfmal mit je 1 ml Äther extrahiert. Aus den vereinigten Äther-extrakten wird das Lösungsmittel mit Stickstoff verblasen und der Rückstand im Vakuum von Resten Wasser befreit. Er wird in 0,5 ml Äther mit 5,5 μ l Thionylchlorid durch 1 stündiges Kochen unter Rückfluß in Malonsäuremonochlorid überführt. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird das Säurechlorid mit einer Lösung von 18 mg *N*-Capryloylcysteamin in 0,1 ml Tetrahydrofuran aufgenommen und das Lösungsmittel sofort mit Stickstoff verblasen. Anschließend wird die Reaktionsmischung im Exsiccator über KOH 30 min gehalten und schließlich in Hydrogencarbonatlösung aufgenommen. Ausbeute 40–60% (bezogen auf [2-¹⁴C]Malonat); Gehalts-

bestimmung durch Extinktionsmessung der Thioesterabsorption bei 236 m μ ($\epsilon = 4900$ [$cm^2 \cdot mMol^{-1}$]).

Umsetzung des Produktes mit CoA-SH nach [17]. Abweichend von der Vorschrift wurde auf einen Überschuß *S*-[2-¹⁴C]Malonyl-*N*-capryloylcysteamin verzichtet. Die Ausbeute lag bei 60%.

Anreicherung der Fettsäuresynthetase aus Bäckerhefe (Scheibe und Scherl KG, Oberkotzau bei Hof) und ihre Aktivitätsbestimmung nach [23]. 1 Enzym-Einheit ist definiert als diejenige Enzymmenge, die in 1 min 1 μ Mol Malonyl-CoA umsetzt. Die in [23] beschriebene Anreicherung wurde um eine Zonalzentrifugation in einem linearen Saccharosegradienten (10–30%) erweitert. Die so nachgereinigte Fettsäuresynthetase ist diselektrophoretisch rein.

Die kondensierende Teilaktivität wurde nach [7, 19] bestimmt, die der Palmityl-Übertragung nach [20]. Anstelle von CoA-SH wurde hier das Modellsubstrat *N*-Acetylcysteamin als Acceptor in den Test eingesetzt. Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 1 ml: 100 μ Mol K-Phosphat pH 6,5, 5 μ Mol *N*-Acetylcysteamin, 0,4 mg Serumalbumin, 10 μ g Fettsäuresynthetase; nach 5 min Vorinkubation Start mit 14 μ Mol [1-¹⁴C]Palmityl-CoA ($1,8 \times 10^5$ Z./min). Nach 30 sec wird mit Perchlorsäure gestoppt und das mit Petroläther extrahierbare *N*-Acetyl-*S*-palmityl-cysteamin im Szintillationszähler bestimmt. Um bei dieser Bestimmungsmethode reproduzierbare Werte zu erhalten, ist es wesentlich, die angegebenen Versuchsbedingungen, insbesondere hinsichtlich Palmityl-CoA-Konzentration, Enzymmenge und Inkubationszeit einzuhalten.

Bereitung einer Malonyl-CoA-Decarboxylase aus Fettsäuresynthetase. 10–30 mg Enzymprotein werden mit 10^{-2} M Jodacetamid 10 min bei 0° inkubiert, anschließend wird durch Sephadex G 25-Filtration überschüssiges Jodacetamid entfernt. Das so behandelte Enzym hat seine Fähigkeit zur Fettsäuresynthetase verloren, decarboxyliert aber 0,3 μ Mol Malonyl-CoA pro Minute und Milligramm zu Acetyl-CoA (1 Einheit = 1 μ Mol Malonyl-CoA-Verbrauch/Minute).

Acetyl-CoA-Carboxylase, nach [24] gereinigt, wurde von Dr. G. Henniger freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Test nach [24]. Für die Synthese kurzkettiger Fettsäuren in Fig. 9 wurde folgender Inkubationsansatz gewählt: 2 ml enthalten 100 μ Mol Tris pH 7,5, 20 μ Mol $MgCl_2$, 20 μ Mol K-Citrat, 7 μ Mol Glutathion, 7 μ Mol KOH, 50 μ Mol $KHCO_3$, 1,5 mg Serumalbumin, 0,4 μ Mol [1-¹⁴C]Acetyl-CoA (10 μ C/ μ Mol), 1,2 μ Mol NADPH, 600 mE Fettsäuresynthetase, 10,7 mE Acetyl-CoA-Carboxylase. Start nach 5 min mit 7 μ Mol ATP.

Standardansatz der enzymatischen Fettsäuresynthetase

Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen von 2 ml: 200 μ Mol K-Phosphat pH 6,5, 0,8 mg Serum-

albumin, 1,2 μ Mol NADPH, 0,25 μ Mol [$1-^{14}\text{C}$]Acetyl-CoA und 200 μg Fettsäuresynthetase (spez. Akt.: 1500—2500 mE/mg). Die Reaktion wird nach Zugabe von 0,5 μ Mol Malonyl-CoA gestartet und ihr Verlauf optisch an der Extinktionsabnahme bei 366 $\text{m}\mu$ verfolgt. Abstoppen der Synthese nach 1—10 min noch im linearen Geschwindigkeitsbereich durch Zusatz von 1 ml 10% KOH in Methanol, das außerdem je 1 μMol der zu bestimmenden Verbindungen als Träger enthielt.

Für die Synthese ungeradzahliger Fettsäuren in Fig. 4 mit Propionyl-CoA als Starter wurde [$2-^{14}\text{C}$]-Malonyl-CoA als radioaktives Substrat verwendet. Für die Auswertung der Produktverteilung wurde der steigende Gehalt der Fettsäuren an markiertem Kohlenstoff mit wachsender Kettenlänge berücksichtigt.

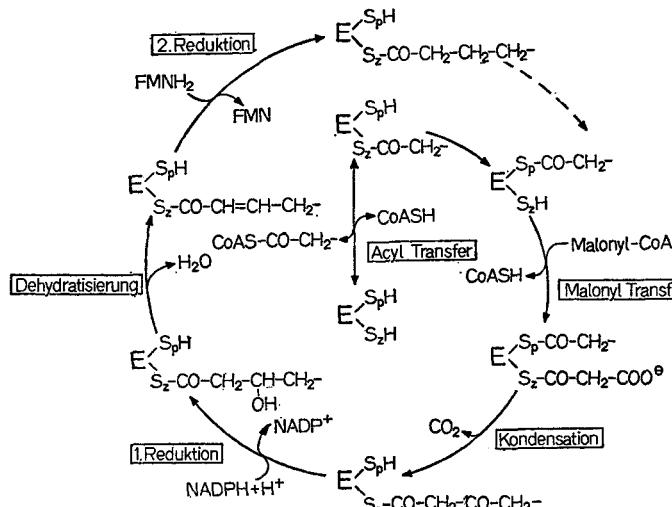


Fig. 1. Reaktionsschema der Fettsäuresynthese am Multienzymkomplex. Links: Fettsäuresynthesecyclus; rechts: chemische Natur der „peripheren“ und „zentralen“ SH-Gruppe

Für die Synthese in Gegenwart limitierender Mengen NADPH wurde der Standardansatz ohne NADPH mit einem NADPH-regenerierenden System gekoppelt. Er enthält zusätzlich 20 μMol MgCl₂, 2,5 μMol Glucose-6-phosphat, 1,25 μMol NADP⁺ und Glucose-6-phosphatdehydrogenase wie in den betreffenden Versuchen angegeben.

Aufarbeitung des Inkubationsansatzes

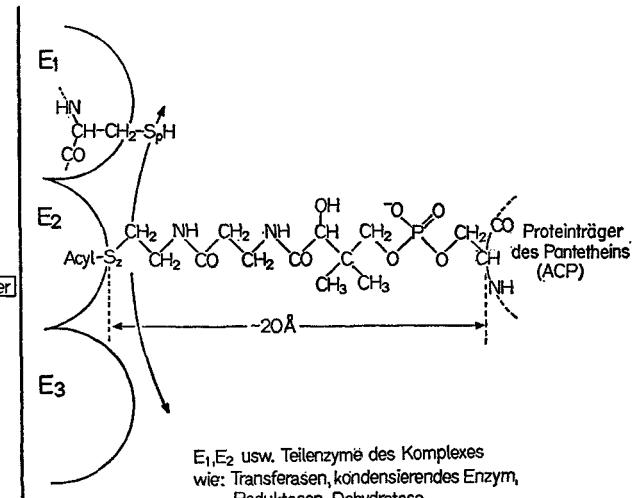
Der abgestoppte Inkubationsansatz wird 30 min bei 70° gehalten. Nach Ansäuern mit 12 N H₂SO₄ wird dreimal mit je 3 ml Petroläther (KP: bis 40°) extrahiert, und der Extrakt über Na₂SO₄ getrocknet. Die eingegangte Petrolätherlösung wird mit Diazomethanlösung versetzt und die gebildeten Fettsäuremethylester radiogaschromatographisch analysiert. Dieses Verfahren erfaßt alle Fettsäuren ab einer Kettenlänge von 8 C-Atomen quantitativ. Bei Ca-

pronsäure (C₈) tritt ein gewisser Verlust auf der Stufe des Methylesters ein, der in der Auswertung (Fig. 9) berücksichtigt wurde.

Radiogaschromatographie der Syntheseprodukte

Für die Gaschromatographie stand ein Varian Aerograph Modell 202-1 B zur Verfügung. Am Ausgang des Detektors ist ein Tricarb-Verbrennungsöfen (Packard, Frankfurt/M.) mit heizbarer Verbundleitung angeschlossen. Das entstehende $^{14}\text{CO}_2$ wird in einer Anthracendurchflußzelle des Tricarb Szintillationspektrometers Modell 3101 gezählt und über ein Einkanal Ratemeter Modell 280 A mit einem Kompressionslinienschreiber (Honeywell Typ 5015) registriert.

Die Analysen wurden auf Chromosorb WAW, beladen mit 10% NPGS (80—100 mesh), ausgeführt.



E₁, E₂ usw. Teilenzyme des Komplexes
wie: Transferasen, kondensierendes Enzym,
Reduktasen, Dehydratase

Dimensionen der Säule: 3 m \times $1/8$ Zoll. Ofentemperatur: lineares Temperaturprogramm von 175—230° mit Heizrate 4°/min. Gasdurchfluß: 24 ml Helium/min. Zur gaschromatographischen Identifizierung der Methylketone wurden zusätzlich folgende Säulentypen verwendet: 10% SE 30 und 10% Versamid auf Chromosorb WAW.

ERGEBNISSE

Die chemischen Reaktionen der Fettsäuresynthese

Die Fettsäuresynthetase aus Hefe, ein Multi-enzym-Komplex vom Molekulargewicht $2,3 \times 10^6$, vermag, wie mit Modellreaktionen nachgewiesen wurde, 7 verschiedene enzymatische Teilfunktionen auszuüben [25]. Sämtliche Reaktionen verlaufen in covalenter Bindung der Substrate und Zwischenprodukte am Multienzymkomplex. Erst die Endprodukte, Palmitin- und Stearinsäure werden auf Coenzym A übertragen (Fig. 1).

Entscheidende Bedeutung kommt im Syntheseprozess den sogenannten „zentralen“ SH-Gruppen¹ zu. Sie sind Bestandteil von 4'-Phosphopantetheinmolekülen, die über Serinreste an eine Proteinkomponente des Komplexes gebunden sind, deren Eigenschaften und Funktion dem von Vagelos erstmals aus *Escherichia coli* isolierten „acyl carrier protein“ ähneln [27]. Bedingt durch seine chemische Konstitution wird dem 4'-Phosphopantethein (Fig. 1) die Funktion eines Schwingarmes zugeschrieben. Die an seinem SH-Ende gebundenen Zwischenprodukte können so den aktiven Zentren aller Teilenzyme zugeführt werden [25].

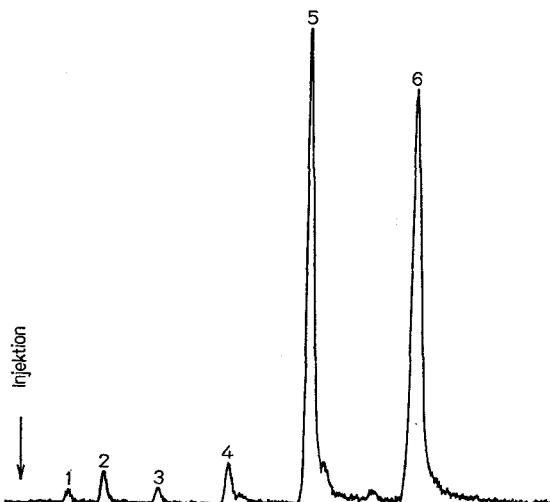


Fig. 2. Radiogaschromatogramm der Endprodukte im Standardansatz der Fettsäuresynthese (siehe exp. Teil). 1) Caprylsäuremethylester; 2) Caprinsäuremethylester; 3) Laurinsäuremethylester; 4) Myristinsäuremethylester; 5) Palmitinsäuremethylester; 6) Stearinsäuremethylester

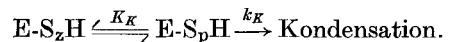
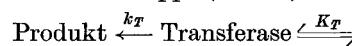
Die Synthese beginnt mit der Übertragung eines Acetylrestes aus Acetyl-CoA über die „zentrale“ zur sogenannten „peripheren“ SH-Gruppe des Komplexes. Diese ist Bestandteil eines Cysteinmoleküls im aktiven Zentrum des kondensierenden Teilenzyms. Der Acetylrest kondensiert mit einem auf eine „zentrale“ SH-Gruppe übertragenen Malonylrest zum Acetacetylrest, der thioesterartig am Pantethein des zentralen Schwingarmes gebunden ist. Reduktion zum β -Hydroxybutyryl-, Dehydratisierung zum Crotonylrest und Flavin-katalysierte Reduktion zum Butyrylrest beenden den ersten Cyclus der Synthese. Nach Übertragung des Acetylrestes auf die „peripherie“ SH-Gruppe wiederholen sich die Reaktionen cyclisch, bis die Stufe des C₁₆- bzw. C₁₈-Kohlenstoffskeletes erreicht ist, auf welcher der gesättigte Acetylrest auf Coenzym A übertragen wird (Fig. 2).

¹ Nach [26] enthält 1 Mol Synthetase mindestens 5 Mol 4'-Phosphopantethein.

Diese geschilderten, experimentell gesicherten Reaktionsschritte erlauben keine Erklärung des Syntheseabbruchs. Ebensowenig erklären sie, warum nur die gesättigten C₁₆- und C₁₈-Säuren auf Coenzym A übertragen werden und nicht auch ihre β -Keto-, β -Hydroxy- und α,β -ungesättigten Derivate. Die einfachste Erklärung eines Syntheseabbruchs auf der C₁₆-C₁₈-Stufe wäre eine hohe Substratspezifität der an der Abschlußreaktion beteiligten Transferase. Schweizer [20] widerlegte diese Erklärungsmöglichkeit jedoch, indem er zeigte, daß die Fettsäuresynthetase für alle Acylreste von C₆ bis C₁₈ etwa vergleichbare Transferaseaktivität besitzt.

Modell des Syntheseabbruches

Ausgangspunkt unserer Modellvorstellung des Syntheseabbruchs ist die zweifache Reaktionsmöglichkeit jedes gesättigten Acylrestes an der „zentralen“ SH-Gruppe (E-S_ZH):



Er kann in reversiblen Reaktionen entweder auf die „peripherie“ SH-Gruppe (E-S_PH) übertragen und um eine weitere C₂-Einheit verlängert werden, oder aber über die Transferase auf Coenzym A übertragen werden und damit Produkt bilden (vgl. Fig. 1). Die Gleichgewichtskonstanten K_T und K_K beschreiben die Verteilung des Acylrestes zwischen „zentraler“ SH-Gruppe und Transferase bzw. „zentraler“ und „peripherer“ SH-Gruppe. k_T und k_K sind die Geschwindigkeitskonstanten der Acylübertragungs- bzw. der Kondensationsreaktion.

Die Wahrscheinlichkeit W für einen gegebenen Acylrest Produkt zu bilden, ist also durch das Geschwindigkeitsverhältnis von Kondensation und Übertragung (V_K und V_T) gegeben.

$$W = \frac{V_T}{V_T + V_K} = \frac{1}{1 + \frac{V_K}{V_T}}. \quad (2)$$

Die Geschwindigkeit der Übertragung beschreibt Gleichung (3)

$$V_T \sim k_T \cdot \alpha, \quad (3)$$

wobei α die im Gleichgewicht an der Transferase befindlichen Acylreste angibt. Entsprechend ergibt sich für die Kondensationsgeschwindigkeit der Ausdruck [Gleichung (4)]:

$$V_K \sim k_K \cdot \beta \cdot \frac{[\text{MalCoA}]}{[\text{MalCoA} + \text{AcCoA}]} . \quad (4)$$

β beschreibt den Bruchteil Acylreste auf der „peripheren“ SH-Gruppe. Acetyl-CoA und Malonyl-CoA konkurrieren um die „zentrale“ SH-Gruppe [19], so daß die maximale Malonatbeladung des Enzyms

und damit die maximal mögliche Kondensationsgeschwindigkeit auch bei Substratsättigung um den Faktor $[MalCoA]/[MalCoA + AcCoA]$ in Gleichung (4) verkleinert wird.

Die Kombination von Gleichung (3), (4) und (2) ergibt unter Substitution von α und β durch K_K und K_T ⁽²⁾ folgenden Ausdruck für die Wahrscheinlichkeit der Produktbildung:

$$W \sim \frac{1}{1 + \frac{k_K}{k_T} \cdot \frac{K_K}{K_T} \cdot \frac{[MalCoA]}{[MalCoA + AcCoA]}} \quad (5)$$

Alle Acylreste hätten nach Gleichung (5) die gleiche Wahrscheinlichkeit Produkt zu bilden. Das Modell des Syntheseabbruchs muß aber eine Änderung dieser Wahrscheinlichkeit mit wachsender Kettenlänge beschreiben, mit anderen Worten, das Enzymsystem muß die Fähigkeit besitzen, verschiedene lange Alkanketten unterscheiden zu können. Ein solches Unterscheiden ist durch eine Wechselwirkung der Alkanketten mit einer Meßstrecke möglich, wobei jede durch Verlängerung hinzukommende Methylengruppe zur freien Energie dieser Wechselwirkung einen positiven oder negativen Betrag, je nach Wechselwirkungsart (z.B. hydrophobe oder hydrophile) beisteuert. Für die folgende Betrachtung soll eine hydrophobe Wechselwirkung an der Transferase angenommen werden. Dann bewirkt das Energieinkrement ΔF pro CH_2 -Gruppe eine Veränderung der Gleichgewichtskonstante K_T nach folgender Gleichung:

$$K_T = K_T^\circ \cdot e^{-\frac{m \cdot \Delta F}{RT}} \quad (6)$$

m beschreibt in Gleichung (6) die Zahl der in Wechselwirkung tretenden CH_2 -Gruppen, ΔF das Energieinkrement pro CH_2 -Gruppe. Mit Gleichung (6) ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit der Produktbildung Ausdruck (7).

$$W_n = \frac{1}{1 + c \cdot e^{-\frac{m \cdot \Delta F}{RT}}} ;$$

$$c \sim \frac{k_K}{k_T} \cdot \frac{K_K}{K_T^\circ} \cdot \frac{[MalCoA]}{[MalCoA + AcCoA]} \quad (7)$$

Mit diesen Voraussetzungen lassen sich Produktverteilungskurven für beliebige Energieinkremeante berechnen³ (Fig. 3).

$$K_T = \frac{\alpha}{1 - (\alpha + \beta)} ; \quad K_K = \frac{\beta}{1 - (\alpha + \beta)} .$$

³ Aus der Wahrscheinlichkeit W in (7) errechnet sich der prozentuale Produktanteil (%) P der einzelnen Säuren in folgender Weise:

$$\begin{aligned} \% P_1 &= W_1 \cdot 100 \\ \% P_2 &= W_2 \cdot 100 \cdot (1 - W_1) \\ \% P_3 &= W_3 \cdot 100 \cdot (1 - W_1) \cdot (1 - W_2) \\ &\vdots \\ \% P_{n+1} &= W_{n+1} \cdot 100 \prod_{i=1}^n (1 - W_i) . \end{aligned}$$

Mit einem Energieinkrement von etwa 1 kcal pro Methylengruppe würden in der hypothetischen Endproduktverteilung (Kurve I) nur noch die beiden Säuren C_n und C_{n+2} als Endprodukte auftreten, während mit $\Delta F = -0,4$ kcal (Kurve II) ein breiteres Produktspektrum zu erwarten wäre. Das Maximum bildet im Beispiel (Kurve I) die Säure C_{n+1} . Übertragen auf die Fettsäuresynthetase wären also C_n

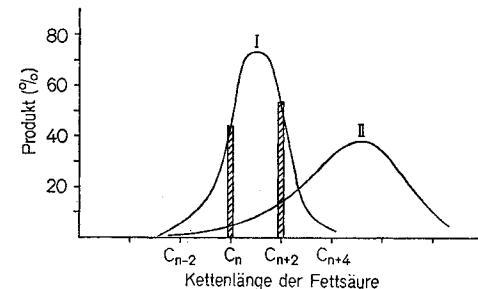


Fig. 3. Mit Gleichung (7) berechnete Endproduktverteilungen für zwei Energieinkremente ΔF . Kurve I: $\Delta F = -1,0$ kcal pro Methylengruppe, Kurve II: $\Delta F = -0,4$ kcal pro Methylengruppe

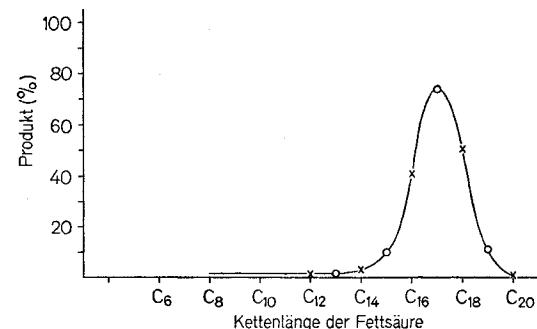


Fig. 4. Prozentuale Verteilung der Endprodukte der Fettsäuresynthese. x , Standardansatz (siehe exp. Teil); \circ , wie Standardansatz, jedoch statt Acetyl-CoA 0,25 μ Mol Propionyl-CoA als „Starter“ der Synthese eingesetzt

bzw. C_{n+2} die Palmitin- bzw. Stearinsäure. Die der Säure C_{n+1} entsprechende Margarinsäure kann als ungeradzahlige Fettsäure unter Normalbedingungen der Synthese nicht entstehen. Ersetzt man jedoch den Starter Acetyl-CoA durch Propionyl-CoA, so wird die homologe Reihe der ungeradzahligen Fettsäuren im Synthesecyclus durchlaufen. Entsprechend der theoretischen Kurve I in Fig. 3 sollte Heptadecansäure (Margarinsäure) als nahezu einziges Endprodukt synthetisiert werden. Die experimentelle Produktverteilung in Fig. 4 bestätigt diese Vorhersage.

Die Lage des Produktmaximums der theoretischen Kurven wird durch die Größe c in Gleichung (7) und das Einsetzen der Wechselwirkung zwischen wachsender Alkanette und Transferaseprotein bestimmt.

In der Produktanalyse wird für die Säuren C₈ bis C₁₂ eine konstante Häufigkeit von durchschnittlich 1,4% des Gesamtproduktes gemessen. In diesem Kettenlängenbereich kann also die angenommene Wechselwirkung noch nicht bestehen. Sie setzt erst zwischen der C₁₃- und C₁₄-Säure ein, wie man Fig.4 entnimmt. Mit dem experimentellen Wert von je 1,4% für C₈–C₁₂ und dem Fehlen einer Wechselwirkung vereinfacht sich Gleichung (7) zu Gleichung (8).

$$W_{8-12} = \frac{1}{1 + c} \approx 0,014. \quad (8)$$

Die Größe c für die Fettsäuresynthese unter Standardbedingungen ist damit zu $c = c_0 \approx 70$ gegeben. Optimale Übereinstimmung von Experiment

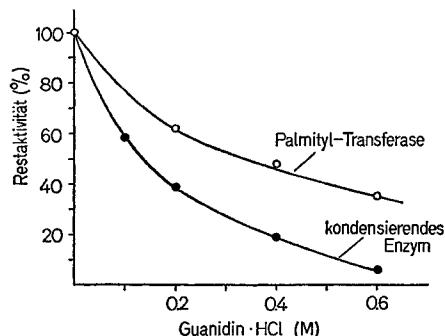


Fig.5. Hemmung der an der Abschlußreaktion beteiligten Acyltransferase und des kondensierenden Enzyms durch Guanidin·HCl. O—O, Hemmung der Transferase; Inkubationsansatz siehe exp. Teil; ●—●, Hemmung der Kondensation; der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 0,3 ml: 50 µMol Tris pH 7,5; 2 µMol KH¹⁴CO₃ (4×10^6 Z./min); 5 µMol Cystein; 5 µMol EDTA; 0,15 µMol CoASH; 30 µMol S-Acetyl-N-acetylcysteamin und die angegebene Menge Guanidin·HCl. Start mit 0–80 µg Enzym. Stop nach 10 min mit 0,2 ml Eisessig. Auftragen eines Aliquots auf Whatman I Papier und Bestimmung der säurestabilen Radioaktivität. Jeder Meßpunkt repräsentiert die durch eine Enzymabhängigkeit mit 10, 20, 40 und 80 µg bestimmte Aktivität in der Kondensation (1 E = 1 µMol CO₂ incorporiert pro min)

und Theorie ergibt sich mit einem Inkrement der Wechselwirkungsenergie pro Methylengruppe von $\Delta F = -0,9$ kcal.

Experimentelle Prüfung von Gleichung (7)

Eine Änderung der Größe c in Gleichung (7) muß eine Änderung des Produktanteiles der einzelnen Fettsäuren zur Folge haben. Dies kann etwa über den Faktor k_K/k_T oder das Verhältnis [MalCoA]/[MalCoA + AcCoA] erreicht werden.

Beeinflussung des Geschwindigkeitsverhältnisses von Kondensation und Übertragung durch Guanidin·HCl. Guanidin·HCl verursacht im Konzentrationsbereich von 0–0,8 M eine zunehmende Verlangsamung der

Fettsäuresynthese am Multienzymkomplex. Fig.5 zeigt diese Abnahme für die kondensierende bzw. transferierende Aktivität. Für eine Guanidin·HCl-Konzentration von 0,6 M im Inkubationsansatz sinkt in Fig.5 das relative Geschwindigkeitsverhältnis der beiden Teilenzyme auf $1/6$. Durch Vergleich von Gleichung (2) und (7) ergibt sich unter diesen Bedingungen für c ein neuer Wert von $c = 1/6 \cdot c_0$.

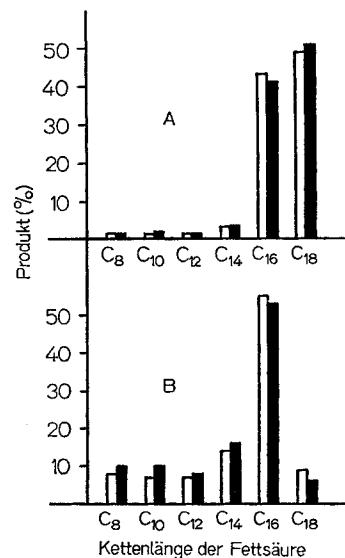


Fig.6. Verschiebung der Endproduktverteilung durch Veränderung des Geschwindigkeitsverhältnisses von Kondensations- und Übertragungsreaktion. A: Normalverteilung des Standardansatzes (siehe exp. Teil). Weiße Balken: berechnet mit Gleichung (7) für $c = 70$; schwarze Balken: experimentell gefunden. B: Produktverteilung des Standardansatzes in Gegenwart von 0,6 M Guanidin·HCl. Weiße Balken: berechnet mit Gleichung (7) für $c = 1/6 \cdot 70$; schwarze Balken: experimentell gefunden

Fig.6B vergleicht die so berechnete mit der für diese Bedingungen experimentell gefundenen Produktverteilung. Gegenüber der Normalverteilung in Fig.6A verschiebt sich das Palmitin-Stearinsäureverhältnis erheblich zugunsten der C₁₆-Säure.

Variation des Faktors [MalCoA]/[MalCoA + AcCoA]. Eine zweite Möglichkeit der Beeinflussung der Produktverhältnisse bietet nach Gleichung (7) die Fettsäuresynthese mit wechselnden relativen Konzentrationen der Substrate Malonyl- und Acetyl-CoA.

In Fig.7A wurde gegenüber den Standardbedingungen bei gleicher Malonyl-CoA-Konzentration die Acetyl-CoA-Konzentration stark erniedrigt, so daß der Faktor [MalCoA]/[MalCoA + AcCoA] statt des Wertes $2/3$ für Standardbedingungen den Wert von nahezu 1 annimmt und $c = 3/2 \cdot c_0$ wird. Eine kleine und konstante Acetyl-CoA-Konzentration wird dadurch erreicht, daß man dem Inkubationsansatz

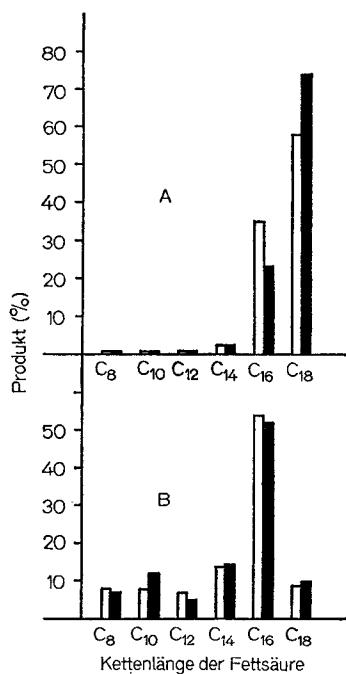


Fig. 7. Verschiebung der Endproduktverteilung durch verschiedene Verhältnisse von $[MalCoA]/[MalCoA + AcCoA]$. A: $[MalCoA]/[MalCoA + AcCoA] \approx 1$; wie Standardansatz, jedoch ohne Acetyl-CoA; zusätzlich 2,6 mM Malonyl-CoA-Decarboxylase. Weiße Balken: berechnet mit Gleichung (7) für $c = 3/2 \cdot 70$; schwarze Balken: experimentell gefunden. B: $[MalCoA]/[MalCoA + AcCoA] = 1/10$; wie Standardansatz, aber mit 4,5 μMol $[1^{14}\text{C}]$ Acetyl-CoA (6 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$). Weiße Balken: berechnet mit Gleichung (7) für $c = 1/6,5 \cdot 70$; schwarze Balken: experimentell gefunden

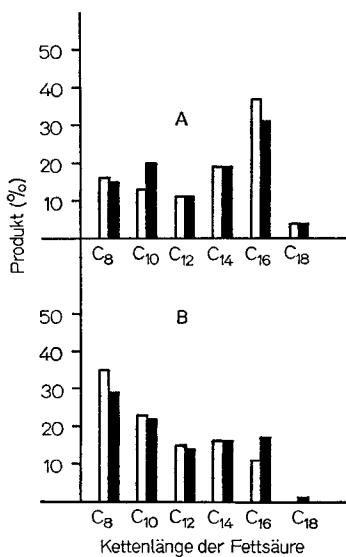
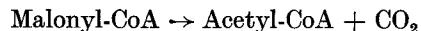


Fig. 8. Verschiebung der Endproduktverteilung durch verschiedene Verhältnisse von $[MalCoA]/[MalCoA + AcCoA]$ in Gegenwart von Guanidin-HCl. A: Standardansatz wie folgt variiert: 4,5 μMol $[1^{14}\text{C}]$ Acetyl-CoA (6 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$), ferner 0,3 M Guanidin-HCl. Weiße Balken: berechnet mit Gleichung (7) für $c = 1/2 \cdot 1/6,5 \cdot 70$; schwarze Balken: experimentell gefunden. B: wie A, nur in 0,6 M Guanidin-HCl. Weiße Balken: berechnet mit Gleichung (7) für $c = 1/6 \cdot 1/6,5 \cdot 70$; schwarze Balken: experimentell gefunden

limitierende Mengen Malonyl-CoA-Decarboxylase zusetzt, die das notwendige Acetyl-CoA nach



entstehen lässt⁴.

Während in Fig. 7 A die Stearinäure das Hauptprodukt bildet, wurde in Fig. 7 B durch einen entsprechenden Überschuss Acetyl-CoA der Faktor $[MalCoA]/[MalCoA + AcCoA]$ von $2/3$ auf $1/10$ (d. h. $c = 1/6,5 \cdot c_0$) verändert und so der inverse Effekt erreicht, d. h. die Synthese der kurzkettigen Säuren stark begünstigt (Fig. 7 B). Die experimentellen Werte in Fig. 7 A und 7 B stehen mit der Berechnung in Übereinstimmung.

Sinkt c durch geeignete experimentelle Bedingungen unter den Wert in Fig. 7 B, so lässt sich eine weitere Zunahme des Anteiles der kurzkettigen Säuren im Produkt erwarten. Für den Fall einer Kombination der Versuchsbedingungen der Fig. 6 B mit denen der Fig. 7 B nimmt c den Wert $c = 1/6 \cdot 6,5 \cdot c_0$ an.

Im dazugehörigen Experiment werden in 0,6 M Guanidin-HCl mit einem $[MalCoA]/[MalCoA + AcCoA]$ -Verhältnis von $1/10$ Fettsäuren synthetisiert. Unter diesen Bedingungen sollen nur mehr geringe Mengen Palmitin- und verschwindende Mengen Stearinäure als Endprodukt auftreten.

Fig. 8 B bestätigt experimentell diese Voraussage.

Synthese kurzkettiger Fettsäuren bei Malonyl-CoA-Mangel

Sinkt die Malonyl-CoA-Konzentration unter den Sättigungswert für Synthetase, so wird die Kondensationsgeschwindigkeit beliebig verlangsamt. Mit Acetyl-CoA als alleinigem Substrat kann die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese durch definierte Mengen Acetyl-CoA-Carboxylase und die damit sich einstellende Stationär-Konzentration an Malonyl-CoA gesteuert werden.

Analog zu den oben geschilderten Versuchen wird auch hier das Verhältnis von Kondensations- und Übertragungsgeschwindigkeit und damit die Größe c beliebig verkleinert. Die Synthese kurzkettiger Säuren ist die Folge. Fig. 9 zeigt das Endproduktverhältnis eines solchen Inkubationsansatzes, in dem die Bildungsgeschwindigkeit von Malonyl-CoA $1/50$ mal kleiner als der maximal mögliche Verbrauch durch die eingesetzte Menge Fettsäuresynthetase war.

β -Ketoacyl-CoA-Derivate als Syntheseprodukte

Durch das vorgeschlagene Modell wird die Kettenlängenspezifität der Fettsäuresynthetase in befriedigender Weise erklärt. Das Modell kann auch das

⁴ Die verwendete Malonyl-CoA-Decarboxylase wurde aus Fettsäuresynthetase durch Umsetzung mit Jodacetamid nach [19] erhalten. Durch Jodacetamid werden die „peripheren“ SH-Gruppen alkyliert und damit die Fähigkeit des Enzyms zur Fettsäuresynthese vernichtet.

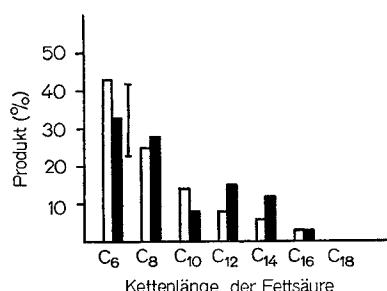


Fig. 9. *Synthese kurzkettiger Fettsäuren durch Malonyl-CoA-Mangel.* Die Synthesegeschwindigkeit von Malonyl-CoA durch Acetyl-CoA-Carboxylase betrug 1/56 des maximal möglichen Verbrauchs durch die eingesetzte Fettsäuresynthetase (siehe exp. Teil). Weiße Balken: berechnet mit Gleichung (7) für $c = 1/56 \cdot 70$; schwarze Balken: experimentell gefunden

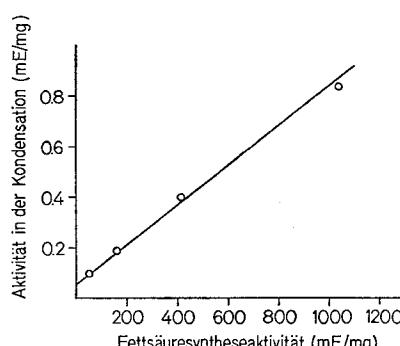


Fig. 10. Zusammenhang zwischen Fettsäuresyntheseaktivität und kondensierender Teilaktivität verschiedener aktiver Fettsäuresynthetasepräparate. Kondensationstest wie in Fig. 5; Fettsäuresynthetasetest: wie Standardtest (siehe exp. Teil) zusätzlich 20 µMol Cystein

alleinige Auftreten der gesättigten Acyl-CoA-Verbindungen als Endprodukte unter Normalbedingungen erklären. Frühere Versuche hatten gezeigt, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettsäuresynthese die Kondensationsreaktion ist [19]. Stellvertretend für diese Versuche zeigt Fig. 10 den Zusammenhang zwischen Gesamtaktivität und kondensierender Aktivität verschiedener aktiver Fettsäuresynthetasepräparate. Die beobachtete Proportionalität wird für keine andere Teilaktivität gefunden.

Übertragen auf den Synthesecyclus am Multienzymkomplex besitzt also nur der gesättigte Acylrest eine hinreichend lange Lebensdauer, um Produkt zu bilden. Nach einmal erfolgter Kondensation wird der entstandene β -Ketosäurerest offensichtlich so schnell wieder zum gesättigten Acylrest umgewandelt, daß eine Übertragung auf Coenzym A nicht konkurrieren kann.

Diese Interpretation kommt ohne die Annahme einer absoluten Spezifität der Transferase für ge-

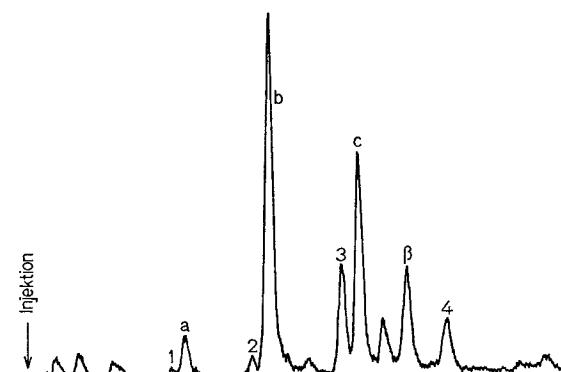
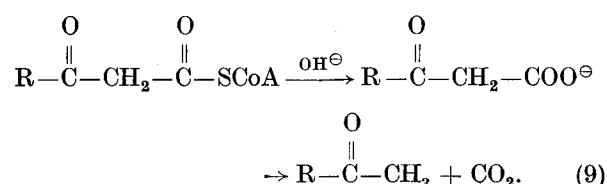


Fig. 11. Radiogaschromatogramm der Endprodukte in der Fettsäuresynthese limitiert durch die NADPH-Konzentration. Standardsatz ohne NADPH, jedoch mit 240 mE Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Die NADPH-Synthese war fünfmal langsamer als der maximal mögliche Verbrauch durch die eingesetzte Fettsäuresynthetase (siehe exp. Teil). 1) Laurinsäuremethylester; 2) Myristinsäuremethylester; 3) Palmitinsäuremethylester; 4) Stearinäuremethylester; a) Methylundecylketon; b) Methyltridecylketon; c) Methylpentadecylketon; β) 2-Hexadecensäuremethylester

sättigte Acylreste aus. Wenn sie richtig ist, muß es möglich sein, auch die β -Keto-, β -Hydroxy- oder α,β -ungesättigten Acyl-CoA als Endprodukte aufzufinden, sofern eine der entsprechenden Teilaktivitäten, wie erste Reduktion, Dehydratation oder zweite Reduktion verlangsamt werden können. Dies ist für die Reduktionen experimentell durch starke Erniedrigung der NADPH-Konzentration zugänglich. Fällt diese unter den Wert der Enzymsättigung, so werden die Reduktionsreaktionen zunehmend verlangsamt und schließlich geschwindigkeitsbestimmend. Dann sollte man β -Ketoacyl-CoA- und α,β -ungesättigte Acyl-CoA-Verbindungen als Endprodukte erwarten. Im Experiment in Fig. 11 wurde die Fettsäuresynthetasereaktion mit einem NADPH-erzeugenden System gekoppelt. Der Inkubationsansatz enthielt an Stelle von NADPH NADP⁺ sowie Glucose-6-phosphat und limitierende Mengen Glucose-6-phosphatdehydrogenase, so daß die NADPH-Synthese etwa fünfmal langsamer war als der Maximalverbrauch durch die Fettsäuresynthetase.

Fig. 11 zeigt die Erwartungen bestätigt: bei milder alkalischer Verseifung des Inkubationsansatzes entstehen aus den β -Ketoacyl-CoA-Verbindungen die freien β -Ketosäuren, welche spontan unter Decarboxylierung in die entsprechenden Methylketone übergehen:



Die gaschromatographische Analyse des aufgearbeiteten Reaktionsansatzes zeigt neben Palmitin- und Stearinsäure den β -Ketostearyl-CoA-Abkömmling Methylpentadecylketon und den β -Ketopalmityl-CoA-Abkömmling Methyltridecylketon sowie die entsprechenden α,β -ungesättigten Säuren in beträchtlichen Mengen.

Auch der Ersatz von NADPH durch NADH als Coenzym der Fettsäuresynthetase verlangsamt die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese. Die Untersuchung der Teilreaktionen mit Substratmodellen

c) Ein Inkubationsansatz, der die vermuteten β -Ketoacyl-CoA-Verbindungen enthielt, wurde nach Verseifung mit den Trägern Palmitin- und Stearin-säure sowie mit Methylundecyl-, Methyltridecyl- und Methylpentadecylketon versetzt und ein Aliquot nach Aufarbeitung und Veresterung gaschromatographisch analysiert (Fig. 13 A). Der Restansatz wurde mit Kaliumboranat reduziert. Dabei werden die Ketone zu den entsprechenden Alkoholen umgesetzt, die Fettsäuren bleiben unverändert. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit Diazo-

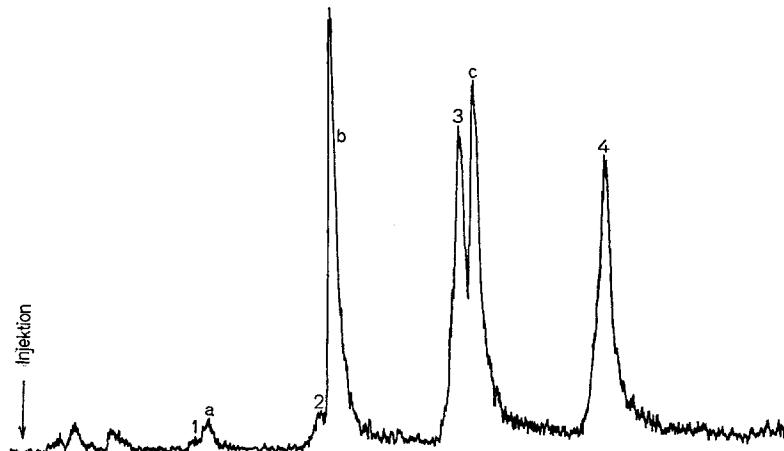


Fig. 12. Radiogaschromatogramm der Endprodukte der Fettsäuresynthese mit NADH statt NADPH als Reduktionsmittel. Wie Standardansatz (siehe exp. Teil), jedoch mit 1,2 μ Mol NADH und 1,3 μ Mol Malonyl-CoA. 1) Laurinsäuremethylester; 2) Myristinsäuremethylester; 3) Palmitinsäuremethylester; 4) Stearinsäuremethylester; a) Methylundecylketon; b) Methyltridecylketon; c) Methylpentadecylketon

ergab, daß hierbei die erste Reduktion betroffen und geschwindigkeitsbestimmend wird. Erwartungsgemäß treten die β -Ketoacyl-CoA-Verbindungen zu mehr als 50% neben den gesättigten Acyl-CoA-Verbindungen als Endprodukte auf (Fig. 12).

Die Identität der Methylketone wurde auf folgenden unabhängigen Wegen gesichert:

a) Das gaschromatographische Verhalten der betreffenden radioaktiven Produkte wurde mit den authentischen Methylketonen auf verschiedenen Säulentypen verglichen. Sowohl auf 10%igem NPGS- wie auf 10%igem SE 30 als stationärer Phase verhalten sich die Radioaktivitätsgipfel a), b) und c) in Fig. 11 und 12 identisch den Methylketonen Methylundecylketon, Methyltridecylketon und Methylpentadecylketon.

b) Das radioaktive Material des Gipfels b) wurde nach präparativer gaschromatographischer Isolierung mit 20 mg Methyltridecylketon versetzt, welches anschließend in sein Semicarbazons überführt wurde. Dieses wurde nacheinander aus 4 verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert. Die Tabelle zeigt, daß die spezifische Radioaktivität auch nach der vierten Kristallisation konstant blieb.

Tabelle. Umkristallisation des Semicarbazons des Methyltridecylketons
Insgesamt eingesetzte Radioaktivität des Gipfels b) der Fig. 12: 150000 Imp./min

	Aktivität Imp./min \times mg	Lösungsmittel
1. Kristallisation	6100	Äthanol
2. Kristallisation	5760	Äthanol-Wasser (2,5:1)
3. Kristallisation	6000	Dioxan
4. Kristallisation	5990	Essigsäuremethylester

methan unter Bortrifluorid-Katalyse methyliert, um die Alkohole in ihre Methyläther überzuführen. Diese haben auf der verwendeten NPGS-Säule wesentlich kürzere Retentionszeiten als die entsprechenden Ketone (Fig. 13 B). Die Radioaktivitäten der vermuteten Ketongipfel a), b) und c) verhalten sich bei diesen Operationen identisch den Massengipfeln der zugesetzten Trägerketone bzw. ihren entstandenen Derivaten. Alle anderen Radioaktivitätsgipfel zeigen dagegen keine Änderung ihrer Retentionszeiten.

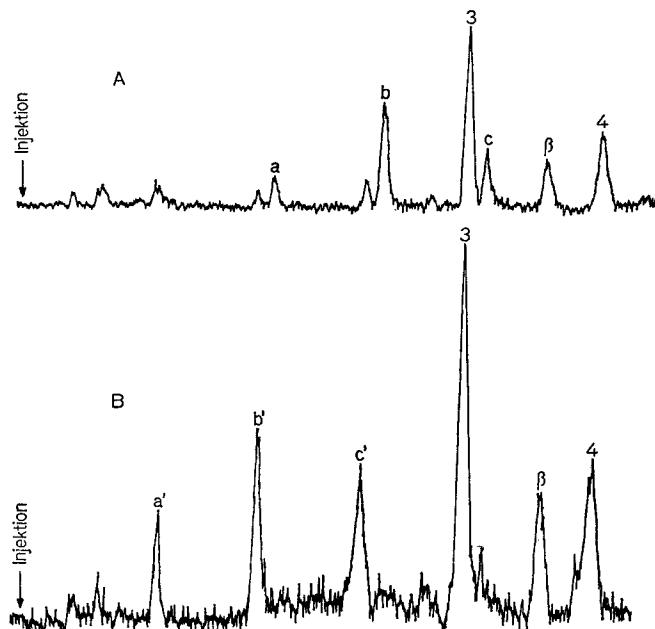


Fig. 13. Identifizierung der Methylketone durch Radiogaschromatographie ihrer chemischen Umwandlungsprodukte. A: Vergleichsansatz. B: A nach Reduktion mit Kaliumboranat und Methylierung mit Diazomethan unter Bortrifluorid-Katalyse. 3), 4), a), b), c), β) wie in Fig. 11. a') Methylätherderivat aus Methylundecylketon; b') Methylätherderivat aus Methyltridecylketon; c') Methylätherderivat aus Methylpentadecylketon

Die Identität der 2-Hexadecensäure wurde ebenfalls durch gaschromatographischen Vergleich der Radioaktivität des Gipfels β mit der authentischen Verbindung gesichert (NPGS, SE 30 und Versamid). Um ihre Identität auch durch einen chemischen Abbau zu beweisen, wurde die radioaktive Substanz des Gipfels β gaschromatographisch isoliert. Nach Zusatz von 2-Hexadecensäuremethylester wurde der Ansatz einer Oxidation mit Kaliumpermanganat in Aceton unterworfen. Die radiogaschromatographische Analyse lieferte erwartungsgemäß [^{14}C]Myristinsäure als Produkt.

DISKUSSION

Die Gültigkeit von Gleichung (7) wird durch die verschiedenen Versuche über einen weiten Bereich experimenteller Bedingungen gestützt. In ihrer allgemeinsten Formulierung beschreibt sie den Kettenabbruch der Fettsäuresynthese durch folgende zwei Prinzipien:

a) Das Geschwindigkeitsverhältnis von Kondensations- und Übertragungsreaktion bestimmt für alle Acylreste die Wahrscheinlichkeit der Übertragung auf Coenzym A.

b) Ab einer Kettenlänge von 13 C-Atomen setzt eine Wechselwirkung der Alkankette mit dem Enzym ein. Die aus dieser Wechselwirkung resultierende freie Energie ΔF beeinflußt das Verhältnis von Kondensations- und Übertragungsgeschwindigkeit zugunsten der Übertragungsgeschwindigkeit oder zuungunsten der Kondensationsgeschwindigkeit. Mit dem Er-

reichen einer Kettenlänge von C_{16} oder C_{18} ist dieses Geschwindigkeitsverhältnis unter Normalbedingungen so verschoben, daß ein Acylrest dieser Länge minimale Wahrscheinlichkeit für eine weitere Verlängerung hat.

In der Interpretation von Gleichung (7) sind folgende Möglichkeiten der Beeinflussung des Geschwindigkeitsverhältnisses durch die Wechselwirkungsenergie denkbar:

a) Durch eine Wechselwirkung mit negativen ΔF (z.B. hydrophobe Bindung) an der Transferase wird, wie bereits gezeigt, mit wachsender Kettenlänge das Verhältnis zugunsten der Übertragungsgeschwindigkeit verschoben.

b) Völlig identische Verhältnisse liegen bei einer Wechselwirkung mit positiven ΔF (z.B. hydrophile „Abstoßung“) am kondensierenden Enzym vor. Hier würde das Gleichgewicht K_K beeinflußt und durch das jetzt positive Inkrement der Wechselwirkungsenergie ergäbe sich ein mit Gleichung (7) identischer Ausdruck.

Das gefundene Energie-Inkrement von -0.9 kcal pro Methylengruppe läge größtenteils im Bereich der von Nemethy und Scheraga [35] angegebenen Werte für hydrophobe Wechselwirkungen. Andererseits spräche das Ergebnis der Versuche von Ayling, Fries und Lynen [29] für die zweite Möglichkeit.

Das Modell begründet die Variation der Endprodukte mit der Variation der Substrate Malonyl-CoA, Acetyl-CoA und NADPH.

Insbesondere erklärt es den Einfluß der Malonyl-CoA-Konzentration auf die Kettenlänge der synthetisierten Säuren, der zuerst von Lynen, Hopper-Kessel und Eggerer mit reiner Fettsäuresynthetase und von Bartley, Abraham und Chaikoff in Rohextrakten aus Brustdrüsen gefunden wurde [1, 30]. Diese Fähigkeit zur Synthese kurzkettiger Fettsäuren, übertragen auf die Synthese *in vivo* könnte also durch Regulation der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität ein spezifisch kurzkettige Fettsäuren produzierendes Enzymsystem vortäuschen. Die Bedeutung der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität für die Kettenlänge der gebildeten Fettsäuren wurde schon früher von Smith und Dils, sowie Barthley, Abraham und Chaikoff in Versuchen mit Extrakten aus laktierenden Milchdrüsen gefunden [30, 31].

Weiter von Bedeutung für die Synthese *in vivo* ist der NADPH-Spiegel sowie das NADH/NADPH-Konzentrationsverhältnis. Je kleiner die NADPH-Konzentration ist, desto stärker muß eine Synthese von β -Ketosäuren in den Vordergrund treten. Deren Vorkommen in Glyceriden ist seit langem bekannt [32–34]. Ferner machten [14 C]Acetat-Einbau-Versuche von Lawrence und Hawke wahrscheinlich, daß diese β -Ketosäuren nicht durch β -Oxidation gesättigter Fettsäuren, sondern in einer *de novo* Synthese gebildet werden [28]. Die geschilderten Versuche an der Fettsäuresynthetase zeigen, daß sie für diese Synthese in der Zelle verantwortlich sein könnte.

Das Modell des Kettenabbruches der Fettsäurebiosynthese wurde für den Enzymkomplex aus Hefe abgeleitet. Da alle bekannten fettsäuresynthetisierenden Systeme weitgehende Analogie aufweisen, liegt der Schluß nahe, daß für sie, zumindest die Multienzymkomplexe unter ihnen, derselbe Mechanismus des Kettenabbruches gilt.

LITERATUR

1. Lynen, F., Hopper-Kessel, I., und Eggerer, H., *Biochem. Z.* 340 (1964) 95.
2. Majerus, P. W., Alberts, A. W., und Vagelos, P. R., *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 4723.
3. Pugh, E. L., und Wakil, S. J., *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 4727.
4. Hsu, R. Y., Wasson, G., und Porter, J. W., *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 3736.
5. Brooks, J. L., und Stumpf, P. K., *Biochim. Biophys. Acta*, 98 (1965) 213.
6. Lennarz, W. J., Light, R. J., und Bloch, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 48 (1962) 840.
7. Lynen, F., *Federation Proc.* 20 (1961) 941.
8. Martin, D. B., Horning, G. M., und Vagelos, P. R., *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 663.
9. Becker, E. M., und Kumar, S., *Biochemistry*, 4 (1965) 1839.
10. Alberts, A. W., Goldman, P., und Vagelos, P. R., *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 557.
11. Goldman, P., Alberts, A. W., und Vagelos, P. R., *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1255.
12. Norris, A. T., und Bloch, K., *J. Biol. Chem.* 238 (1963) PC 3133.
13. Pugh, E. L., Sauer, F., und Wakil, S. J., *Federation Proc.* 23 (1964) 166.
14. Overath, P., und Stumpf, P. K., *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 4103.
15. Brooks, J. L., und Stumpf, P. K., *Arch. Biochem. Biophys.* 116 (1966) 108.
16. Simon, E. J., und Shemin, D., *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 2520.
17. Eggerer, H., und Lynen, F., *Biochem. Z.* 335 (1962) 540.
18. Buckel, W., und Eggerer, H., *Biochem. Z.* 343 (1965) 29.
19. Oesterhelt, D., Dissertation, Universität München 1967.
20. Schweizer, E., Dissertation, Universität München 1963.
21. Wieland, T., und Rueff, L., *Angew. Chem.* 65 (1953) 186.
22. Seubert, W., In *Biochemical Preparations* (edited by H. A. Lardy), Wiley, New York 1960, B. VIII, S. 80.
23. Lynen, F., *Methods in Enzymology*, 14 (1969) im Druck.
24. Goto, T., Ringelmann, E., Riedel, B., und Numa, S., *Life Science*, 6 (1967) 785.
25. Lynen, F., Oesterhelt, D., Schweizer, E., und Willecke, K., *Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism*, Universitetsforlaget, Oslo 1968, S. 1–24.
26. Winnewisser, W., Diplomarbeit, Universität München 1969.
27. Vagelos, P. R., Majerus, P. W., Alberts, A. W., Larabee, A. R., und Ailhaud, G. P., *Federation Proc.* 25 (1966) 1485.
28. Lawrence, R. C., und Hawke, J. C., *Biochem. J.* 98 (1966) 25.
29. Ayling, J., Fries, R., und Lynen, F., *Federation Proc.* 28 (1969), im Druck.
30. Bartley, J. C., Abraham, S., und Chaikoff, I. L., *Biochim. Biophys. Acta*, 144 (1967) 51.
31. Smith, S., und Dils, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 116 (1966) 23.
32. Van der Ven, B., Havercamp-Begemann, P., und Schoot, J. C. M., *J. Lipid Res.* 4 (1963) 91.
33. Wong, N. P., Patton, S., und Forss, D. A., *J. Dairy Sci.* 41 (1958) 1699.
34. Parks, O. W., Keeney, M., Katz, I., und Schwartz, D. P., *J. Lipid Res.* 5 (1964) 232.
35. Nemethy, G., und Scheraga, H. A., *J. Chem. Phys.* 36 (1962) 3401.

M. Sumper, C. Riepertinger, F. Lynen
Max-Planck-Institut für Zellchemie
BRD-8000 München 2, Karlstraße 23, Deutschland

D. Oesterhelt
Institut für Biochemie der Universität
BRD-8000 München 2, Karlstraße 23, Deutschland