

## SUMMARY

Some new compounds, including  $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy-pregnan-20-one (I) and  $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy-allopregnan-20-one (III), have been isolated from urine of patients with clinically compensated adrenogenital salt-losing syndrome. Compound I seems to be responsible for the original salt loss. This effect could be demonstrated under certain conditions in male adrenalectomized rats. Compound III was also isolated from hog adrenals. The synthesis of these steroids and of a few others, stereoisomeric in positions 3, 5 and 16, and of a 5,6-dehydro analog is described. There is some preliminary evidence for the presence of compound I and III in urines of origin other than patients with adrenogenital syndrome.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung

## 11. Die enzymatische Dehydrirung der Stearinsäure zu Ölsäure<sup>1)</sup>

von **Karl Bernhard, J. von Bülow-Köster** und **H. Wagner**

(1. XII. 58)

Wir zeigten kürzlich<sup>2)</sup>, dass Linolsäure und  $\gamma$ -Linolensäure im Tierkörper nicht zu gesättigten Säuren hydriert werden und entgegen der allgemeinen Annahme auch die Ölsäure nicht in Stearin- bzw. Palmitinsäure, Stearinsäure aber in Bestätigung der Befunde von SCHÖNHEIMER & RITTENBERG<sup>3)</sup> in Ölsäure übergeht. Nach Fütterung <sup>14</sup>C-signierter Stearinsäure an Ratten betrug der Anteil der Ölsäure an der Gesamtaktivität der Leberfettsäuren z. B. 27,5%.

Der Nachweis eines die Stearinsäure in Stellung 9,10 dehydrierenden Enzymes wurde von verschiedenen Autoren versucht<sup>4)</sup>. LANG & ADICKES<sup>5)</sup> fügten Leber- bzw. Muskelextrakten Kaliumstearat zu und schlossen aus dem Nachweis von Azelainsäurealdehyd, nach erfolgter Oxydation des Reaktionsgemisches, auf eine Bildung von Ölsäure. Analoge Extrakte entfärbten in Gegenwart anderer Fettsäuren (Palmitin-, Laurin-, Undecyl-, Caprylsäure usw.) Methylenblau bedeutend rascher als Kontrollen ohne Fettsäurezugabe<sup>6)</sup>.

LE BRETON und Mitarbeiter versuchten in der Folge zu stärker wirksamen Dehydrase-Präparaten aus Leber zu gelangen und beobachteten sehr kurze Entfärbungszeiten des Methylenblaus, wenn Nicotinsäureamid, Pyridoxin oder Pantothenensäure zugefügt wurden<sup>7)</sup>. Diese Ergebnisse wurden mit dem Bodensatz erzielt, während das Überstehende verworfen wurde. Wir stellten fest, dass solche Fermentextrakte,

<sup>1)</sup> Vorgetragen am IV. Internat. Kongress für Biochemie, Wien 1958.

<sup>2)</sup> K. BERNHARD, M. ROTHLIN & H. WAGNER, *Helv.* **41**, 1155 (1958).

<sup>3)</sup> R. SCHÖNHEIMER & D. RITTENBERG, *J. biol. Chemistry* **113**, 505 (1936).

<sup>4)</sup> B. SHAPIRO & E. WERTHEIMER, *Biochem. J.* **37**, 102 (1943); K. LANG, *Z. physiol. Chem.* **261**, 241 (1939).

<sup>5)</sup> K. LANG & F. ADICKES, *Z. physiol. Chem.* **262**, 123 (1939/40).

<sup>6)</sup> K. LANG & H. MAYER, *Z. physiol. Chem.* **261**, 249 (1939).

<sup>7)</sup> J. CHAMPOUGNY & E. LE BRETON, *Compt. rend. Soc. biol.* **139**, 919 (1945).

in Gegenwart genügender Mengen Adenosin, Methylenblau auch dann entfärben, wenn keine Fettsäure-Zugabe erfolgt. Die Entfärbungszeiten sind ferner für gewisse andere Fettsäuren denjenigen sehr ähnlich, die für die Stearinsäure gemessen werden können (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1. Entfärbungszeiten (in Sek.) von Methylenblau durch Leber-Fermentextrakte bei verschiedenen Substratzusätzen

Säure		Behen-	Behenol-	Eruca-	Brassidin-	Öl-	Elaidin-	Stearin-	Stearol-
Ferment- extrakt	I	190	155	240	290	310	215	165	255
	II	105	135	150	120	210	125	110	130
	III	55	50	80	70	165	85	55	160
	IV	60	55	130	85	205	100	80	145

Wenn man im Sinne von LANG hergestellte Leberhomogenate bzw. Enzymauszüge der Verseifung und Extraktion unterwirft, erhält man wesentliche Mengen Fettsäuren. Ölsäure ist also bereits im Substrat vorhanden und die Isolierung eines ihrer Oxydationsprodukte daher kein Beweis für ihre Bildung aus zugeführter Stearinsäure.

Wir versuchten die vornehmlich nur auf Grund der Methylenblau-Entfärbung postulierte Dehydrierung der Stearinsäure durch Leberenzyme, unter Verwendung <sup>14</sup>C-signierten Substrates, zu beweisen.

Es wurden nach den Angaben von LE BRETON und Mitarbeitern angereicherte Extrakte aus Rattenlebern nach dem THUNBERG-Verfahren geprüft, aber auch mit Homogenat und Mitochondrien unter Sauerstoffzutritt gearbeitet. Wir haben den Enzympräparaten mit KOH neutralisierte Stearinsäure bekannter Aktivität zugesetzt und das Reaktionsgemisch später oxydiert. Die Azelainsäure wurde papierchromatographisch abgetrennt und auf ihre Aktivität geprüft.

Tabelle 2. Dehydrierung von signierter Stearinsäure zu Ölsäure durch Rattenleber-Extrakte

Versuchs- anordnung	Art des Enzym- präparates	Aktivitäten c/mg·min		
		Fettsäuregemisch vor Oxydation	Azelain- säure	
im Vakuum nach THUNBERG	Extrakt nach LE BRETON mit Adenosin	22340	0	
		120200	0	
		203000	0	
unter Sauerstoff	a) ohne ATP-Zusatz	Mitochondrien	81400	0
		Mitochondrien	77100	0
		Gesamt-Homogenat	17350	100
	b) mit ATP-Zusatz	Gesamt-Homogenat	22200	3400
		Mitochondrien	27800	20
		Überstehendes	16200	540
		Extrakt nach LE BRETON	14500	0
		Überstehendes davon	31800	90

<sup>8)</sup> J. CHAMPOUGNY & E. LE BRETON, Compt. rend. Soc. biol. 141, 43 (1947).

Mit Gesamthomogenat gelang der Nachweis aus der radioaktiven Stearinsäure gebildeter Ölsäure. Bei der Fraktionierung wurde die wirksame Dehydrase nicht in den Mitochondrien, sondern im *Überstehenden* (Mikrosomen, Cytoplasma) aufgefunden. Der nach LE BRETON durch Ammoniumsulfat-Fällung gewonnene Enzymextrakt war zur Dehydrierung von Stearinsäure nicht befähigt, während das bei den Fällungen abgetrennte Überstehende, wenn auch nur in geringem Masse, Stearinsäure in Ölsäure umzuwandeln vermochte. Einige Resultate sind aus Tab. 2 ersichtlich (vgl. auch J. VON BÜLOW-KÖSTER, Diss. phil.-naturwissensch. Fakultät, Basel).

**Experimentelles.** Das Tiermaterial waren weisse, weibliche, normal ernährte Ratten von einem durchschnittlichen Alter von 12 Monaten und ca. 250 g Gewicht.

1. *Dehydrase-Nachweis auf Grund von Methylenblau-Entfärbungen.* Nach CHAMPOUGNY & LE BRETON<sup>7)</sup> aus Rattenleber gewonnene Fermentextrakte wurden innerhalb 1–2 Std. nach Tötung der Tiere eingesetzt und nach Adenosin-Zusatz die Entfärbungszeiten des Methylenblaus bestimmt. Wir haben gleichzeitig acht Proben von gleichem Volumen in einem Thermostat auf 37° gehalten. Die Substrate bestanden aus 0,01-m. wässrigen Lösungen der Kaliumsalze reiner Behen-, Behenol-, Eruca-, Brassidin-, Öl-, Elaidin-, Stearin-, Stearol-, Arachin-, Margarin-, Palmitin- und Laurin-Säure. Die Beschickung erfolgte mit 1 ml Fermentextrakt, 1 ml Phosphatpuffer, 1 ml Substratlösung, 0,2 ml Methylenblau (1:2000) und 0,1–0,15 ml Adenosinlösung (50  $\gamma$  in 0,1 ml Lösung). Eine Aktivierung durch Nicotinamid, Pyridoxin usw. wurde bereits beschrieben<sup>8)</sup>; wir beobachteten auch für Folsäure eine ähnliche Wirkung.

2. *Versuche mit <sup>14</sup>C-Stearinsäure als Substrat.* Wir synthetisierten eine carboxylsignierte Stearinsäure, die chromatographisch rein eine spezifische Aktivität von z. B. 1015000 c/mg·min aufwies.

*Aufarbeitung des Reaktionsgemisches:* Nach Beendigung der Versuche wurde mit 10-proz. Schwefelsäure angesäuert, mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt und ca. 1 Std. stehen gelassen. Das Aceton haben wir mehrmals erneuert und den Rückstand schliesslich abfiltriert. Er wurde darauf mehrere Std. im Soxhlet-Apparat mit Äther zur möglichst quantitativen Isolierung aller Fettanteile extrahiert, was auf Grund von Aktivitätsbestimmungen leicht zu verfolgen war. Aceton- und Ätherextrakte haben wir vereinigt, die Lösungsmittel abdestilliert und die verbleibende wässrige Phase dreimal mit Petroläther ausgeschüttelt und nochmals im Rührextraktor mit Äther ausgezogen. Dieser Ätherextrakt enthielt nur noch Spuren aktiver Substanz. Die so erhaltenen Lipide wiesen ausser der zugefügten Stearinsäure merkliche Mengen Neutralfett aus der Leber auf. Um eine Verdünnung der aktiven Säuren zu verhindern, haben wir eine Abtrennung des Neutralfettes durch eine Silicagelsäule in Anlehnung an die Ölent säuerungsmethode von KAUFMANN<sup>9)</sup> vorgenommen. Die Oxydation der auf der Säule verbleibenden Fettsäuren vollzogen wir nach RUDLOFF<sup>10)</sup> mit Natriumperjodat. Anschliessend wurden die Fettsäuren nach unserer Methode<sup>11)</sup> und die Dicarbonsäuren nach ISHERWOOD<sup>12)</sup> chromatographiert. Die Aktivitätsauszählung erfolgte direkt auf dem Papier.

*Fermentanreicherung nach LE BRETON<sup>7)</sup>.* Ansätze: 100 ml Extrakt, 100 ml Pufferlösung, 6 mg Adenosin, 8 ml 0,01-m. Methylenblau, 25 ml 0,01-m. Kaliumstearat. Zur Aufarbeitung wurden vier solcher Ansätze vereinigt und durch Extraktion z. B. 2100 mg Lipide bzw. 600 mg Fettsäuren erhalten. Die nach Oxydation isolierte Azelainsäure war inaktiv. Zwei analoge Serien von vier Ansätzen führten zum selben Ergebnis. Trotz sehr rascher Entfärbung des Methylenblaus konnte in keinem Fall aktive Azelainsäure nachgewiesen werden. Die Aktivität blieb völlig auf die Stearinsäure beschränkt.

*Versuche mit Mitochondrien.* Für die Mitochondrien-Isolierung hielten wir uns an die Angaben von HOGEBOOM & SCHNEIDER<sup>13)</sup>. Ansätze: 8 ml 0,01-n. Kaliumstearat, 50 ml Puffer mit den aufgeschlemmten Mitochondrien von 10 g Leber. Es wurde 2½ Std. im Wasserbad bei 37° in einer Sauerstoffatmosphäre geschüttelt. Die aus den vereinigten Ansätzen isolierte Lipidmenge betrug z. B. 200 mg, woraus 100 mg Fettsäuren resultierten. Die Azelainsäure war inaktiv. Ein analoger Ansatz, ausgehend von 90 g Rattenleber, ergab dasselbe Ergebnis.

<sup>9)</sup> H. P. KAUFMANN & O. SCHMIDT, *Fette u. Seifen* **47**, 294 (1940).

<sup>10)</sup> E. v. RUDLOFF, *J. Amer. Oil Chemists Soc.* **33**, 126 (1956).

<sup>11)</sup> H. WAGNER, L. ABISCH & K. BERNHARD, *Helv.* **38**, 1537 (1955).

<sup>12)</sup> F. A. ISHERWOOD & C. S. HANES, *Biochem. J.* **55**, 824 (1953).

<sup>13)</sup> G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER & G. E. PALLADE, *J. biol. Chemistry* **172**, 619 (1948).

*Versuche mit Leberhomogenat.* Wir homogenisierten im POTTER-Apparat 30 g Leber mit 100 ml eiskalter 0,25-m. Saccharoselösung und zentrifugierten 15 Min. bei 600 g und  $-3^{\circ}$ . Von dem Überstehenden haben wir 100 ml mit 100 ml 0,15-m. KCl-Lösung, 250 ml Phosphatpuffer (0,15-m., pH 7,6), 10 ml 0,15-m.  $MgCl_2$ , 20 ml 0,01-m. Kaliumstearat, 20 ml Trockenplasmalösung zur Stabilisation und 1,4 g Nicotinamid auf 4 Erlenmeyer von 200 ml verteilt und bei Sauerstoffatmosphäre 2 Std. bei  $37^{\circ}$  geschüttelt. Bei der Aufarbeitung der vereinigten Ansätze erhielten wir 850 mg Lipide, nach Trennung mit Silicagel 400 mg Fettsäuren. Die Azelainsäure daraus war aktiv. Ein analoger Versuch mit ATP-Zusatz ergab Azelainsäure mit rund 25mal höherer Aktivität als im Versuch ohne ATP-Zusatz. Versuche mit *Mitochondrien*, jedoch mit ATP-Zusatz, zeigten, dass dieselben die Dehydrogenase nicht enthielten. Daher wurde das *Überstehende* (Mikrosomen, Cytoplasma) geprüft. Die nach Anwendung von Überstehendem aus dem Reaktionsprodukt erhaltene Azelainsäure war rund 50mal aktiver als bei den Versuchen mit den Mitochondrien. Zwei weitere Ansätze unter Fermentanreicherung nach LE BRETON, diesmal mit ATP-Zusatz (statt Adenosin) und unter Sauerstoff geschüttelt (statt im Vakuum nach THUNBERG), bewiesen das Vorhandensein der Dehydrogenase im ersten Überstehenden der Fraktionierung, das von diesen Autoren verworfen wird, während die «Fermentanreicherung» nur in einem Falle sehr schwach aktive Azelainsäure ergab.

### Diskussion der Ergebnisse

Der Nachweis eines die Stearinsäure in Stellung 9,10 dehydrierenden Enzymes aus Rattenleber konnte unter Verwendung einer carboxylsignierten Säure erbracht werden.

Ein mit Rohrzucker gewonnenes Rattenleber-Homogenisat vermochte nach Abtrennung der Zellkerne Stearinsäure schätzungsweise im Ausmasse von etwa 5% zu dehydrieren. Durch Fraktionierung in Mitochondrien und Überstehendes (Mikrosomen, Cytoplasma) gelangten wir zur folgenden Feststellung: Die Mitochondrien erwiesen sich praktisch als unwirksam. Eine sehr geringe Enzymaktivität wurde durch Verunreinigung mit dem Überstehenden bedingt. Die Dehydrase findet sich vielmehr im *Überstehenden* vor, das sich besonders in Gegenwart von ATP zur Ölsäurebildung befähigt erweist.

Die Entfärbung von Methylenblau in Gegenwart von Stearinsäure ist kein Beweis für ihre Dehydrierung zur Ölsäure. Obwohl nach LE BRETON hergestellte Leberextrakte sehr rasch Methylenblau entfärben, gelang in keinem Falle die Auffindung aktiver Azelainsäure als sicherer Hinweis stattfindender Ölsäurebildung.

Nach Einwirkung solcher Leberextrakte auf  $^{14}C$ -Stearinsäure konnte aus dem Oxydationsgemisch papierchromatographisch stets *Oxalsäure* erhalten werden. Sie war aber immer inaktiv, womit sich das Vorhandensein einer in Stellung 1,2 wirksamen Dehydrase, die zu  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Säuren führt, ausschliessen lässt.

Wir danken der CIBA-Stiftung für die finanzielle Unterstützung vorliegender Arbeit.

### SUMMARY

We tried to prove the conversion of stearic acid into oleic acid by liver extracts.

The method described by LE BRETON and co-workers results in enzyme preparations from rat liver which decolorize methylenblue very rapidly but do not dehydrogenate stearic to oleic acid.

After fractionation of liver cell particles in sucrose solution we were able to prove the existence of a dehydrogenase in the supernatant containing microsomes and cytoplasma, which converts  $^{14}C$  stearic acid into oleic acid. The mitochondrial fraction showed no activity.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel