

261. Fettsäuresynthese im Rattenhirnvon **Karl Bernhard** und **Winfried Pedersen**

Herrn Prof. Dr. FELIX GEORGI zum 70. Geburtstag

(26. VIII. 63)

Vor kurzem haben wir über den Einbau von [^{14}C]-Acetat¹⁾ und [^{14}C]-Propionat²⁾ in die Fettsäuren der Cerebroside des Rattenhirns berichtet. Zwei Stunden nach intracerebraler Acetatinjektion war am stärksten aktiv die Palmitinsäure, während die unsubstituierten und die hydroxylierten Säuren mit längerer C-Kette nur geringe, nach 48 und 72 Stunden aber gleichfalls hohe Aktivitäten aufwiesen. Damit wurde ein Einblick in die Bildung der Fettsäuren dieser Hirnlipidfraktion erhalten und festgestellt, dass bevorzugt Palmitinsäure entsteht, aus welcher sich höhere Säuren vornehmlich durch Kettenverlängerung aufbauen.

Wir versuchten nachzuweisen, ob für andere Lipidfraktionen des Gehirns ähnliche Verhältnisse im Fettsäureauf- bzw. -abbau bestehen. Nach bereits mitgeteilten Verfahren³⁾ wurden 6 bzw. 72 Stunden nach Acetatinjektion aus den Totallipiden der vereinigten Rattenhirne *Sphingomyeline*, *Cerebroside*, *Lecithine* und *Neutralfett* gewonnen. Die spezifischen Aktivitäten ihrer Fettsäuremethylester-Gemische sind aus der Tabelle 1 ersichtlich. Es erfolgte die gaschromatographische Auftrennung zur Ermittlung der prozentualen Zusammensetzung und Messung der spezifischen Aktivitäten. Die Tabellen 2–5 enthalten die Resultate.

Tabelle 1. *Spezifische Aktivitäten (c/Min·mg) der Fettsäuregemische aus den verschiedenen Lipidfraktionen der Rattenhirne*

Fraktionen	Fettsäuren	nach	
		6 h	72 h
Sphingomyeline	Gesamt	975	2036
	unsubstituiert gesättigt	910	2340
	unsubstituiert ungesättigt	761	1227
Cerebroside	Gesamt	800	1086
	unsubstituiert gesättigt	1434	1590
	unsubstituiert ungesättigt	793	876
	Hydroxy gesättigt	577	951
	Hydroxy ungesättigt	564	894
Lecithine	Gesamt	7125	5279
Neutralfett	Gesamt	7913	3003

¹⁾ K. BERNHARD, A. HANY, L. HAUSHEER & W. PEDERSEN, *Hclv.* 45, 1786 (1962).

²⁾ W. PEDERSEN, L. HAUSHEER & K. BERNHARD, *Helv.* 46, 675 (1963).

³⁾ K. BERNHARD, A. HANY, L. HAUSHEER & W. PEDERSEN, *Helv.* 45, 1298 (1962); L. HAUSHEER, W. PEDERSEN & K. BERNHARD, *Helv.* 46, 601 (1963).

Tabelle 2. *Cerebrosidfettsäuren: Prozentuale Zusammensetzung, spezifische Aktivitäten, (c/Min·mg) und Aktivitätsanteile in Prozenten der Gesamt-Aktivität*

Säuren		C-Zahl der Fettsäuren									
		14	16	18	20	22	23	24	25	26	
unsubst. gesättigt	% der Gesamtfettsäuren		0,3	4,0	6,4	1,8	2,8	0,6	7,2	0,2	
	spez. Aktivitäten nach	6 Std.		4019	991	1040	669	288	945	—	
		72 Std.		3069	1510	1533	988	532	1292		
	Aktivitätsanteil in % nach	6 Std.		20,8	8,1	2,5	2,4	0,2	8,7	—	
		72 Std.		12,0	9,3	2,7	2,7	0,3	9,1	—	
unsubst. ungesättigt	% der Gesamtfettsäuren			0,2	3,7	0,4	0,4	0,1	11,4	0,2	0,3
	spez. Aktivitäten nach	6 Std.			1126				756		
		72 Std.			1144				906		
	Aktivitätsanteil in % nach	6 Std.			5,5				11,1		
		72 Std.			4,2			10,0			
Hydroxy gesättigt	% der Gesamtfettsäuren				0,2	0,8	9,4	3,3	22,9		
	spez. Aktivitäten nach	6 Std.					516	207	645		
		72 Std.					894	383	1054		
	Aktivitätsanteil in % nach	6 Std.					6,2	0,9	19,0		
		72 Std.					7,9	1,2	23,4		
Hydroxy ungesättigt	% der Gesamtfettsäuren				1,0	0,1	1,3	0,4	20,6		
	spez. Aktivitäten nach	6 Std.							552		
		72 Std.							863		
	Aktivitätsanteil in % nach	6 Std.							14,6		
		72 Std.						17,2			

Tabelle 3. *Sphingomyelinfettsäuren: Prozentuale Zusammensetzung, spezifische Aktivitäten (c/Min·mg) und Aktivitätsanteile in Prozenten der Gesamt-Aktivität*

Säuren		C-Zahl der Fettsäuren						
		16	18	20	22	23	24	
gesättigt	% der Gesamtfettsäuren		4,3	57,2	6,0	4,8	0,9	5,7
	spez. Aktivitäten nach	6 Std.	2899	753	1081	920	314	735
		72 Std.	5488	2219	2042	1514	679	1589
	Aktivitätsanteil in % nach	6 Std.	14,5	49,4	7,5	5,1	0,3	4,8
		72 Std.	11,6	61,9	6,0	3,6	0,3	4,4
ungesättigt	% der Gesamtfettsäuren			1,1		1,5	0,3	18,2
	spez. Aktivitäten nach	6 Std.		1722		624		720
		72 Std.		1768		1112		1188
	Aktivitätsanteil in % nach	6 Std.		2,2		1,1		15,1
		72 Std.		0,9		0,8		10,5

Tabelle 4. *Lecithinfettsäuren: Prozentuale Zusammensetzung, spezifische Aktivitäten und Aktivitätsanteile in Prozenten der Gesamt-Aktivität*

C-Zahl	in % des Fettsäuregemisches	nach 6 Std.		nach 72 Std.	
		c/Min·mg	Aktivitätsanteil	c/Min·mg	Aktivitätsanteil
16:0	50,5	11121	81,8	6899	70,6
18:0	12,4	4454	8,0	4849	12,2
18:1	33,8	1979	9,7	2461	16,9
18:2	0,7	—	—	—	—
20:4	2,6	1361	0,5	654	0,3

Tabelle 5. *Neutralfettsäuren: Prozentuale Zusammensetzung, spezifische Aktivitäten und Aktivitätsanteile in Prozenten der Gesamtaktivität*

C-Zahl	in % des Fettsäuregemisches	nach 6 Std.		nach 72 Std.	
		c/Min · mg	Aktivitätsanteil	c/Min · mg	Aktivitätsanteil
16:0	27,7	18875	66,2	4692	43,8
16:1	1,6	—	—	—	—
18:0	29,1	5818	21,4	3638	35,7
18:1	28,0	3007	10,7	1973	18,6
18:2	2,5	—	—	—	—
20:4	14,1	976	1,7	404	1,9

Experimentelles. – 2 Gruppen von je 60 weissen Ratten (je 53 männliche und 7 weibliche) im Gewichte von 200–250 g und 3,5 Monate alt erhielten intracerebral injiziert 0,1 ml Acetatlösung ($4,78 \cdot 10^7$ c/min). Gruppe A wurde nach 6, Gruppe B nach 72 Std. getötet. Injektion und Aufarbeitung erfolgten wie bereits mitgeteilt. Die vereinigten Hirne der Gruppe A wogen 97 g (Mittel 1,62 g), die der Gruppe B 101 g (Mittel 1,68 g). An Totallipiden erhielten wir 7,19 g (A) bzw. 7,16 g (B).

Zur Abtrennung der *Sphingomyelin-Lecithin-Fraktion* wurden die Totallipide in drei gleichen Teilen auf drei mit 90 g Silicagel beschickte Kolonnen gebracht. Pro Kolonne wurden mit 1200 ml Chloroform-Methanol (3:1) Cholesterin, Neutralfett, Cerebroside, Sulfatide und Kephaleine eluiert und anschliessend mit 600 ml Methanol die Lecithin-Sphingomyelinfraktion herausgewaschen. Ausbeute: 1,714 g (A) bzw. 1,782 g (B). Die verbleibenden Restlipide wogen 5,306 g (A) und 5,254 g (B). Die Trennung der Lecithin-Sphingomyelinfraktion erfolgte durch Umesterung und Abtrennung der unveränderten Sphingomyeline an einer Silicagelkolonne. Wir erhielten 1,231 g (A) bzw. 1,293 g (B) Rohlecithinfettsäuren als Methylester und 601 mg (A) bzw. 598 mg (B) rohe Sphingomyeline.

Die Methylester der Lecithinfettsäuren wurden in wenig Äthylchlorid gelöst und auf eine Kolonne von 2 cm Durchmesser, beschickt mit 40 g Silicagel (0,05–0,20 mm) gebracht. Mit 500 ml Äthylchlorid liessen sich die Methylester der reinen Lecithinfettsäuren eluieren. Ausbeute: 985 mg (A) bzw. 998 mg (B).

Die Reinigung der Rohsphingomyeline erfolgte mit einer Aloxkolonne, Ausbeute: 245 mg (A) bzw. 249 mg (B). Zur Gewinnung der Fettsäuremethylester haben wir 245 mg Sphingomyeline während 6 Stunden mit 12,5 ml 10-proz. methanolischer Schwefelsäure auf 85–90° erwärmt, anschliessend mit Petroläther und Äther extrahiert und diese Extrakte zur völligen Veresterung noch mit Diazomethan behandelt. Ausbeute 87 mg (A) bzw. 89 mg (B).

Diese Ester brachten wir auf eine Kolonne von 1,5 cm Durchmesser, enthaltend 20 g in Petroläther aufgeschlammtes Silicagel (0,05–0,20 mm). Mit 100 ml Petroläther haben wir unpolare, nicht fettsäureartige Verunreinigungen ausgewaschen (1 mg), darauf mit 70 ml Äthylchlorid die unsubstituierten gesättigten und ungesättigten Fettsäuremethylester eluiert und anschliessend mit 150 ml Äthylchlorid-Äther (4:1) eine noch nicht identifizierte Fettsäure. Die Trennung wurde auf einer Silicagelplatte (Laufmittel Äthylchlorid, Sprühreagens Bromthymolblau) kontrolliert. Die gesättigten und ungesättigten nicht substituierten Fettsäuremethylester zeigten einen Rf-Wert von 0,65, eine nicht identifizierbare Komponente einen solchen von 0,27. Ausbeuten: unsubstituierte Fettsäuremethylester 73 mg (A) und 75 mg (B), unbekannte Fettsäure aus A und B je 6 mg. Ersterc wurden wie bereits angegeben in gesättigte und ungesättigte Ester getrennt. Ausbeuten je 56 bzw. 14 (A) und 15 mg (B).

Aus den oben erwähnten Restlipiden trennten wir die Rohcerebroside ab (Ausbeuten 696 und 703 mg) und erhielten schliesslich 596 bzw. 601 mg reine Cerebroside mit einem Zuckergehalt von 20,1%. Aus je 570 mg dieser Cerebroside erhielten wir 243 (A) bzw. 245 mg (B) Fettsäuremethylester.

Für die Trennung der unsubstituierten und Hydroxy-Fettsäuremethylester diente eine Kolonne von 1,5 cm Durchmesser, beschickt mit 30 g Kieselgel MERCK, 0,05–0,20 mm, aufgeschlammmt in

Äthylenchlorid. Die Ester der Hydroxysäuren eluierten wir mit Äthylenchlorid-Äther (4:1). Gewicht der unsubstituierten Ester: 89 mg (A) bzw. 90 mg (B), der Hydroxyester je 132 mg. Die Auftrennung in gesättigte und ungesättigte Ester lieferte 49 bzw. 50 mg gesättigte unsubstituierte und je 36 mg ungesättigte unsubstituierte Ester. An Hydroxyfettsäureester erhielten wir 77 bzw. 78 mg gesättigte und je 50 mg ungesättigte Ester. Die Hydroxyfettsäuren mussten zur Gaschromatographie mit Methyljodid und Silberoxid in die Methyläther umgewandelt werden.

Die Reinigung der Cholesterin-Neutralfett-Fraktion erfolgte auf einer Kolonne von 2,5 cm Durchmesser, beschickt mit 90 g Silicagel (0,05–0,20 mm) aufgeschlämmt in über KOH getrocknetem Äther, durch Eluierung mit ebensolchem Äther. Auf der Kolonne verblieb ein gelber Rückstand. Gewichte der P-freien Cholesterin-Neutralfett-Fraktion: 1,019 g (A) bzw. 1,029 g (B). Die Auftrennung lieferte schliesslich 905 bzw. 917 mg Cholesterin und 55 bzw. 51 mg Neutralfett-Fettsäuren, die mit Diazomethan verestert wurden. Die spezifischen Aktivitäten der Totallipide sind aus der Tabelle 6 ersichtlich.

Tabelle 6. *Spezifische Aktivitäten der Totallipide und der verschiedenen Lipid-Fractionen*

Lipidfraktionen	c/Min·mg	
	6 Std.	72 Std.
Totallipide ohne Lecithine und Sphingomyeline	1487	1292
Lecithine und Sphingomyeline	4233	3201
Cholesterin und Neutralfett	1275	1309
Cholesterin	1023	1160
Cerebroside	535	696
Sphingomyeline	579	1193

Diskussion der Ergebnisse. In Erweiterung früherer Untersuchungen wurden nach intracerebraler [¹⁴C]-Acetatinjektion auch die Fettsäuren der Sphingomyeline, Lecithine und Neutralfette aus den Rattenhirnen isoliert. Dabei waren die Lipidausbeuten bei beiden gleichaltrigen Tiergruppen für alle Fraktionen gleich, ebenso bis auf geringfügige Abweichungen die Fettsäurezusammensetzungen. Das erlaubt einen Vergleich der nach 6 und 72 Stunden gemessenen spezifischen Aktivitäten der einzelnen Fettsäuren.

Von den Fettsäuren der *Cerebroside* besass die Palmitinsäure die höchste spezifische Aktivität, alle übrigen Säuren mit Ausnahme der Ölsäure zeigten nach 6 Stunden niedrigere Aktivitäten als nach 72 Stunden. Unsere früheren Befunde erfahren damit eine Bestätigung. Indessen waren nach 72 Stunden die spezifischen Aktivitäten der normalen gesättigten Säuren und der gesättigten Hydroxysäuren höher, die der ungesättigten Hydroxysäuren tiefer als vordem.

Die Palmitinsäure aus den gesättigten Fettsäuren der *Sphingomyeline* wies ebenfalls eine hohe spezifische Aktivität auf. Letztere war für alle gesättigten Säuren nach 72 Stunden zwei- bis dreimal höher als nach 6 Stunden. Die spezifische Aktivität blieb für die C₂₃- und C₂₄-Säuren gleich, für die C₁₆-, C₂₀- und C₂₂-Säuren nahm sie geringfügig ab, für die Stearinsäure merklich zu. Die Ölsäure wies sowohl nach 6 Stunden als nach 72 Stunden praktisch dieselbe spezifische Aktivität auf. Die ungesättigten Säuren C₂₂ und C₂₄ zeigten jedoch nach 72 Stunden höhere Werte als nach 6 Stunden. Wie bei den Cerebrosiden dient offenbar für den Fettsäureaufbau die Palmitinsäure als Vorläufer.

Auch die Palmitinsäure aus den *Lecithinen* zeigte eine hohe spezifische Aktivität, welche nach 72 Stunden aber um etwa 40% geringer war. Die Stearinsäure-Aktivität

stieg leicht an, was auch für die Ölsäure der Fall war, deren spezifische Aktivität aber anfänglich nur einen Fünftel derjenigen der Palmitinsäure betrug. Die Arachidonsäure wies nach 72 Stunden nur noch die Hälfte des nach 6 Stunden gemessenen Wertes auf. In Analogie mit dem bereits mitgeteilten Verhalten der Palmitin-, Öl- und Stearinsäure aus den Gesamtlipiden¹⁾ fiel also die spezifische Aktivität der Palmitinsäure ab, während diejenige der Ölsäure anstieg. Nachdem die Lecithine mengenmässig stark ins Gewicht fallen, sind sie für dieses Verhalten der Gesamtlipide mitverantwortlich. Die Aktivitätszunahme der Ölsäure ist durch ihre Bildung durch Dehydrierung der stärker aktiven Stearinsäure erklärbar; die Aktivitätsabnahme der einem intensiven Auf- und Abbau unterworfenen Arachidonsäure kam dadurch zustande, dass für die Kettenverlängerung der Linolsäure kein aktives Acetat mehr vorhanden war.

Bei den *Neutralfettsäuren*, welche mengenmässig nur gering vertreten waren, kam mit 18875 c/Min · mg wieder die weitaus höchste spezifische Aktivität der Palmitinsäure zu. Letztere war prozentual wie die Stearin- oder Ölsäure vorhanden, welche aber spezifische Aktivitäten von nur 5818 bzw. 3007 zeigten. Alle diese Werte be-

Tabelle 7. Übersicht der in die einzelnen Fettsäuren eingebauten Aktivitäten bezogen auf die applizierte [¹⁴C]-Acetat-Aktivität

Fraktionen bzw. Säuren			eingebaute Akt. *) nach		
			6 Std.	72 Std.	
<i>Cerebroside</i>	unsubst., gesättigte Säuren	C16	11,8	9,2	
		C18	4,6	7,2	
		C20	1,4	2,1	
		C22	1,0	2,1	
		C24	4,9	6,9	
	unsubst., ungesättigte Säuren	C18	3,2	3,2	
		C24	6,4	7,7	
	subst., gesättigte Säuren	C20	3,5	6,2	
		C22	0,5	0,9	
		C24	10,9	18,0	
	<i>Sphingomyeline</i>	subst., ungesättigte Säuren	C24	8,5	13,2
			gesättigte Säuren	C16	3,1
		C18	10,7	31,3	
		C20	1,6	3,3	
		C22	1,1	1,8	
		C24	1,0	2,2	
ungesättigte Säuren		C18	0,4	0,5	
		C22	0,2	0,4	
	C24	3,0	5,3		
<i>Lecithine</i>	C16:0	1929	1205		
	C18:0	190	209		
	C18:1	230	289		
<i>Neutralfette</i>	C16:0	100	23		
	C18:0	32	19		
	C18:1	16	10		

*) eingebaute Aktivität = $\frac{\text{mg Substanz (Fettsäuren)} \cdot \text{spez. Akt.}}{\text{applizierte Aktivität}} \cdot 10^6$

trugen nach 72 Stunden viel weniger, im Falle der Palmitinsäure nur noch einen Viertel des anfänglichen Betrages. Auch der Wert für die Arachidonsäure ging zurück, das aktive Acetat war aufgebraucht. Aus der Aktivitätsverteilung folgt für die Palmitinsäure ein rascher Umsatz im Gehirn.

Etwa ein Siebtel der Totallipide bestand aus Cholesterin, dessen spezifische Aktivität sich im Verlauf von 66 Stunden wenig änderte, was auf einen langsamen Turnover dieses Sterins im Vergleich zu den Fettsäuren, besonders der Palmitinsäure, schliessen lässt.

Aus den erhaltenen experimentellen Daten lässt sich berechnen, wieviel von der applizierten Aktivität in die einzelnen Fettsäuren eingebaut wurde. Tabelle 7 gibt darüber Auskunft und lässt deutliche Unterschiede erkennen. Die Fettsäuren der Lecithine und Neutralfette weisen verglichen mit derjenigen der Cerebroside und Sphingomyeline ein Vielfaches des Einbaubetrages auf. Ihr Turnover ist viel intensiver als der der letzteren beiden Fraktionen. Wir können ausrechnen, dass sich im Verlaufe von 66 Stunden der in die Palmitinsäure eingebaute Aktivitätsanteil um einen Wert von 804 verringerte, die höheren Säuren der Cerebroside und Sphingomyeline usw. aber einen Aktivitätsgewinn von 127 aufwiesen.

Bei unseren Versuchen wurden aber nur etwa 50% der Totallipide weiterverarbeitet, d. h. der Fettsäureisolierung und Aktivitätsmessung zugeführt. Die Kephaline, bekanntlich Palmitinsäure-reich, berücksichtigten wir nicht, sie tragen aber offenbar wesentlich zum Aktivitätsverlust der Palmitinsäure bei. Gleichwohl ist ersichtlich, dass die Palmitinsäure-Aktivität zur Deckung des in den höheren Säuren angereicherten Aktivitätsbetrages weitaus genügt. Sie kann daher durchaus als Vorläufer für diese Komponenten in Betracht gezogen werden.

Indessen sind sowohl bei den Fettsäuren der Cerebroside als der Sphingomyeline die Einbauraten höher als die Abnahmen der Palmitinsäure-Aktivitäten, was darauf hindeutet, dass Palmitinsäure aus anderen Fraktionen, also z. B. aus den Lecithinen oder den Neutralfetten, für die Bildung der Cerebrosid- und Sphingomyelin-Fettsäuren verwendet wird.

Wir danken dem SCHWEIZ. NATIONALFONDS für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

SUMMARY

Pure cerebroside, sphingomyelins, lecithines and neutral fats were isolated from brains of young rats 6 and 72 hours after intracerebral injection of ^{14}C acetate. We detected the composition of their fatty acids and determined the specific activities. The highest value was always found in palmitic acid which obviously is the precursor for the formation of the other fatty acids. The applied activity incorporated in the fatty acids of lecithines and neutral fats was much higher than the amount concerning cerebroside and sphingomyelins. Therefore these two lipid fractions showed a much lower turnover.

Physiologisch-Chemisches Institut
der Universität Basel