

Über die Bildung der Plasmalogene zur Zeit der Myelinisierung bei der Ratte, VI^[1]

Einbau von ¹⁴C, ³²P-markiertem *O*-(1-Alkyl-*sn*-glycerin-3-phosphoryl)äthanolamin zu verschiedenen Zeiten

Hanns Jörg Fürniss, Joanna Strosznajder* und Hildegard Debuch**

(Der Schriftleitung zugegangen am 26. Februar 1973)

Zusammenfassung: In Fortsetzung früherer Versuche wurde jetzt nach intracerebraler Injektion von [¹⁴C, ³²P]Alkylglycerinphosphoryläthanolaminen (II) deren Einbau in die Äthanolaminplasmalogene (I) zu verschiedenen Zeiten (12, 24, 48 und 72 h) nach Applikation des Alkylglycerinphosphoryläthanolamins untersucht. Dabei erhielten wir folgende Ergebnisse:

1. Während das angebotene Substrat ein Verhältnis der ¹⁴C/³²P-Radioaktivität von 0,17 besaß, wurde 12 h später ein solches von 0,31 in den Plasmalogenen gefunden. Bis zu 72 h veränderte es sich weiter zugunsten der ¹⁴C-Aktivität auf 0,50. Daraus kann geschlossen werden, daß der Austausch am hydrophilen Teil dieser Phosphatide schneller erfolgt als am lipophilen Anteil.

2. Enthält das Alkylglycerinphosphoryläthanolamin C₁₆-Alkohole, so wird der Äther schneller als bei den analogen C₁₈-Verbindungen zum Enoläther oxidiert.

3. Da nach 12 h eine deutliche Differenz bestand zwischen der Gesamtradioaktivität der äthanolaminhaltigen Diradylphosphatide und derjenigen, die sich aus der Summe der Äthanolaminplasmalogene und der Phosphatidyläthanolamine ergab, kann die Möglichkeit einer Acylierung des Alkylglycerinphosphoryläthanolamins vor der Bildung des Enoläthers nicht ausgeschlossen werden. Bereits nach 48 h fand sich praktisch die gesamte Radioaktivität der äthanolaminhaltigen Diradylphosphatide in den Äthanolaminplasmalogenen und Phosphatidyläthanolaminen.

The synthesis of plasmalogens during myelination in the rat, VI: The incorporation of ¹⁴C,³²P-labelled O-(1-alkyl-sn-glycerol-3-phosphoryl)ethanolamine after different incubation times

Summary: In continuation of earlier work, investigations are reported on the incorporation of [¹⁴C, ³²P]alkylglycerol-3-phosphorylethanolamines at different times (12, 24, 48, 72 h) after their intracerebral injection.

1) Whereas the substrate contained a ¹⁴C/³²P ratio

of 0.17, this ratio was 0.31 in the plasmalogens recovered 12 h later. Up to 72 h, the ratio continued to increase, in favour of ¹⁴C, to 0.50. It is concluded from this that the hydrophilic part of this phosphatide is metabolized more rapidly than the lipophilic part.

* *Jetzige Adresse:* Dr. J. Strosznajder, Polnische Akademie der Wissenschaften, Warschau, Dworkowastr. 3.

** *Adresse:* Prof. Dr. H. Debuch, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Köln, D-5 Köln 41, Joseph-Stelzmann-Str. 52.

Abkürzungen:

GPÄ: Glycerinphosphoryläthanolamin; PÄ: Phosphatidyläthanolamine = Diacyl-GPÄ; ÄPI: Alk-1'-enylacyl-GPÄ = Äthanolaminplasmalogene; Alkyl-

GPÄ: *O*-(1-Alkyl-*sn*-glycerin-3-phosphoryl)äthanolamin, in früheren Mitteilungen: = Lysoätherphosphatid; PÄ-Fraktion: Gemisch aus Diradylglycerinphosphoryläthanolaminen: Alkylacyl-GPÄ und/oder Alk-1'-enylacyl-GPÄ und/oder Diacyl-GPÄ; DEGS: Diäthylenglykolsuccinat; DEGA: Diäthylenglykoladipat; PPO: 2,5-Diphenyloxazol; Dimethyl-POPOP: 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)benzol.

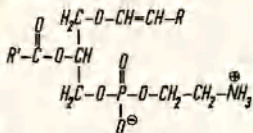
¹ V. Mitteil.: Fürniss, H. & Debuch, H. (1972) *diese Z.* 353, 1377-1384.

2) If the alkyl phosphatide contains C₁₆-alcohols, the ether is oxidized more rapidly to the enol-ether than in the analogous C₁₈-compounds.

3) After 12 h, there is a marked difference between the total radioactivity of the PE-fraction (a mixture of diradyl-*sn*-glycerol-3-phosphorylethanolamines) and that calculated from the sum of the ethanol-

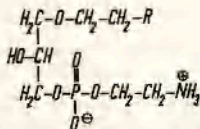
amine plasmalogens and the phosphatidylethanolamines. It is therefore possible that the alkyl-*sn*-glycerol-3-phosphorylethanolamine is acylated before the reduction of the ether bond. As early as 48 h, practically the total radioactivity of the PE-fraction was present in the ethanolamine plasmalogens and the phosphatidylethanolamines.

Im Rahmen der Untersuchungen über die Biosynthese der Plasmalogene (ÄPI)



I Äthanolamin-plasmalogen (ÄPI)

im Rattengehirn zur Zeit der Myelinisierung fanden wir früher bei Verwendung von ¹⁴C-markiertem Alkylglycerinphosphoryläthanolamin (Alkyl-GPÄ)^[2],



II *O*-(1-Alkyl-*sn*-glycerin-3-phosphoryl)äthanolamin (Alkyl-GPÄ)

daß das Maximum der spezifischen Radioaktivität der Aldehyde in den Plasmalogenen 62 h nach der Applikation auftrat, während bei einem anderen unter analogen Bedingungen durchgeführten Versuch^[1] mit ³²P-markiertem Alkyl-GPÄ (II) das Maximum der Radioaktivität der Plasmalogene (I) schon nach 22 h gefunden wurde. Deshalb stellte sich uns die Frage, ob der Umbau im Bereich des Aldehyds – also des lipophilen Teiles – gegenüber dem polaren phosphathaltigen Teil des Moleküls tatsächlich mit verschiedenen Geschwindigkeiten abläuft. Da uns darüber hinaus interessierte, ob die Umwandlungsgeschwindigkeit der Alkyl- in die Alk-1'-enylverbindungen auch von der Länge der Alkylkette abhängt, verwendeten wir nun ein doppelt markiertes [¹⁴C, ³²P]Alkyl-GPÄ (II) (die ¹⁴C-Radioaktivität befand sich in der Alkylkette, die ³²P-Aktivität im polaren Teil des Moleküls), das ein Verhältnis von C₁₆:C₁₈-Alkoholen von 2:3 besaß. So konnte zu verschiedenen Zeiten sowohl die ¹⁴C-Radioaktivität der C₁₆- bzw. C₁₈-Aldehyde als auch die ³²P-Radioaktivität

der Plasmalogene (I) bestimmt und mit dem angebotenen Substrat verglichen werden. Die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse bestätigen, daß der Austausch am lipophilen und polaren Teil der Plasmalogene (I) verschieden schnell vonstatten geht (Abb. 1a). Außerdem schließen wir aus den Ergebnissen, daß ein Alkyl-GPÄ (II) mit einem C₁₆-Alkylrest schneller in die Plasmalogene (I) überführt wird, als die analogen C₁₈-Verbindungen, jedoch auch schneller wieder abgebaut wird (Abb. 1b).

Methoden und Durchführung der Versuche

Die Bestimmung des Phosphors^[8] erfolgte in der i. c.^[4] beschriebenen Modifikation, die von Plasmal nach Feulgen und Mitarb.^[5] in einer leichten Modifikation^[6].

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie der Fettsäuremethylester und Dimethylacetale sowie die der komplexen Lipide wurde wie früher^[7] beschrieben durchgeführt. Zur Dünnschichtchromatographie der Isopropylidenderivate aus Glycerinäthern an Kieselsigel H (Merck) wurde ein Fließmittelsystem Dichlormethan/Methanol: 97/3 (v/v) gewählt. Die Dünnschichtchromatographie der wasserlöslichen Phosphatdiester an Cellulose wurde i. c.^[1] beschrieben.

Säulenchromatographie

Die präparative Darstellung der PÄ-Fraktion erfolgt an Florisil, die des Alkyl-GPÄ an Kieselsäure, in der gleichen Weise wie früher^[1] beschrieben. Die Methode zur Isolierung der Fettsäuremethylester bzw. reiner Dimethylacetale nach Methanolyse wurde ebenfalls früher^[8] mitgeteilt.

³ Bartlett, G. R. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 466–468.

⁴ Debuch, H., Mertens, W. & Winterfeld, M. (1968) *diese Z.* **349**, 896–902.

⁵ Feulgen, R., Boguth, W. & Andresen, G. (1951) *diese Z.* **287**, 90–108.

⁶ Klenk, E. & Debuch, H. (1963) *Progr. Chem. Fats Lipids* **6**, 3–29.

⁷ Etzrodt, A. & Debuch, H. (1970) *diese Z.* **351**, 603–612.

⁸ Winterfeld, M. & Debuch, H. (1968) *diese Z.* **349**, 903–908.

² Debuch, H., Müller, J. & Fürniss, H. (1971) *diese Z.* **352**, 984–990.

Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivität wurde am Zweikanal-Flüssigkeitszintillationszähler (Packard, Tri-Carb, Modell 3214) gemessen. Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet:

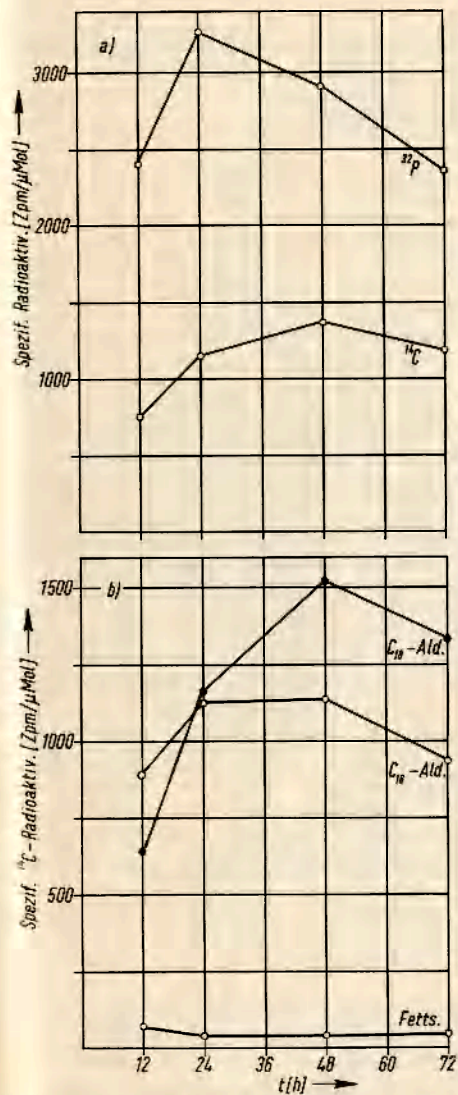


Abb. 1. a) Spezifische ^{14}C - und ^{32}P -Radioaktivitäten in den Äthanolaminplasmalogenen aus Rattengehirn nach intracerebraler Applikation von $[^{14}\text{C}, ^{32}\text{P}]\text{Alkyl-GPÄ}$. b) Spezifische ^{14}C -Radioaktivitäten in den C_{16} - und C_{18} -Aldehyden der ÄPI sowie in den Gesamt-Fettsäuren der PÄ-Fraktion aus Rattengehirn nach intracerebraler Applikation von $[^{14}\text{C}, ^{32}\text{P}]\text{Alkyl-GPÄ}$.

a) Doppelt markierte Lipide

Da die Ausbeute des Gerätes für ^{32}P -Radioaktivität mit Hilfe von wässriger $[^{32}\text{P}]\text{Orthophosphatlösung}$ bestimmt werden mußte, wurde eine Szintillationsflüssigkeit benutzt, die eine toluolhaltige Lösung (2,5 g PPO, 0,15 g Dimethyl-POPOP auf 1 l Toluol) und einen Emulgator („Bio-Solv BBS-3“, Beckman) im Verhältnis 85:15 enthielt. Die Lipidproben wurden in Lösung ins Zählglas gegeben, nach Abdampfen des Lösungsmittels mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit und 0,5 ml Wasser versetzt und bis zum vollständigen Lösen geschüttelt.

b) ^{14}C -markierte Fettsäure-methylester, Dimethylacetale und Isopropylidenderivate^[7]c) ^{32}P -markierte wasserlösliche Phosphatdiester nach Dünnschichtchromatographie an Cellulose

Hier wurde, wie früher^[11] beschrieben, die Cerenkov-Strahlung gemessen.

d) ^{14}C -markierte Fettsäure-methylester, Dimethylacetale und Isopropylidenderivate aus Glycerinäthern nach Radiogaschromatographie

Zur Verbrennung der nach Gaschromatographie aufgetrennten Proben benutzten wir das System Tri-Carb Combustion Furnance, Modell 325 (Packard). Das entstandene CO_2 wurde durch eine Fritte ins Zählglas geleitet, welches 15 ml Szintillationsflüssigkeit (eine Lösung aus 500 ml Toluol, 400 ml Äthylenglykolumonomethyläther, 50 ml Äthanolamin und 5,5 g PPO) enthält.

Gaschromatographie, Radiogaschromatographie

Als Gaschromatograph stand uns das Modell 7721 der Firma Packard zur Verfügung^[7]. Fettsäure-methylester wurden bei 170°C , Isopropylidenderivate aus Glycerinäthern bei 180°C an 4% DEGS auf Gaschrom Q, Dimethylacetale bei 170°C an 15% DEGA auf Gaschrom Q analysiert. Für die massenanalytischen Untersuchungen wurde Stickstoff als Trägergas, für die Radiogaschromatographie eine Argon/ CO_2 -Mischung (82% Argon, 18% CO_2) verwandt.

Tiermaterial, radioaktive Isotopen, Testsubstanzen

Die Versuche wurden mit 14 Tage alten Ratten (Wistar/Han, Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) durchgeführt. Natrium $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{acetat}$ und Dinatriumhydrogen $[^{32}\text{P}]\text{orthophosphat}$ bezogen wir von Amersham-Buchler, Heptadecensäure puriss, von der Firma Roth, Karlsruhe.

Darstellung und Analyse des $[^{14}\text{C}, ^{32}\text{P}]\text{Alkyl-GPÄ}$

Die Darstellung des Alkyl-GPÄ erfolgte wie früher^[1] beschrieben, 3,5 mCi Natrium $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{acetat}$ und 1,6 mCi Dinatriumhydrogen $[^{32}\text{P}]\text{orthophosphat}$ wurden als wässrige Lösung sieben Ratten intracerebral injiziert.

Tab. 1. Analyse der Alkohole des als Substrat verwendeten Alkylglycerinphosphoryläthanolamins.

Alkoholkomponente	Menge [%]	¹⁴ C-Radioaktivität		
		[%]	[Zpm/μMol]	C ₁₆ :C ₁₈
C ₁₆	39,2	44,0	109 000	1,22
C ₁₈	60,8	56,0	89 500	

Tab. 2. Analyse der Gesamtlipidfraktionen aus den Gehirnen junger Ratten 12, 24, 48, 72 h nach Injektion von [¹⁴C, ³²P]Alkyl-GPÄ

Zeit nach Injektion	Menge als Phosphat [μMol]	Radioaktivität			
		¹⁴ C Gesamt [Zpm]	% v. verabreicht	³² P Gesamt [Zpm]	% v. verabreicht
12	207,4	91,4 × 10 ³	28,2	504 × 10 ³	25,7
24	214,5	84,8 × 10 ³	26,1	383 × 10 ³	19,5
48	210,0	71,6 × 10 ³	22,1	285 × 10 ³	14,5
72	206,1	75,0 × 10 ³	23,1	233 × 10 ³	11,9

Nach 24 h wurden die Tiere dekapitiert, die Gehirne sofort entnommen und das Gesamtlipid nach Folch und Mitarbeitern⁹) gewonnen. Daraus isolierten wir an Florisil säulenchromatographisch¹¹) die reine PÄ-Fraktion, welche wie früher beschrieben⁷) hydriert und einer „milden“ alkalischen mit nachfolgender „milder“ saurer Hydrolyse nach Dawson¹⁰) unterworfen wurde. Nach Abtrennung der Spaltprodukte an einer Kieselsäuresäule¹¹) erhielten wir ein Alkyl-GPÄ-Präparat, welches nach dünnschichtchromatographischer Prüfung rein war. (Menge: 15,52 mg, P: 5,3% entsprechend 26,5 μMol; spezifische Radioaktivität (Zpm/μMol): ¹⁴C: 97,3 × 10³, ³²P: 587 × 10³).

Die Zusammensetzung dieses Alkyl-GPÄ-Präparates im Hinblick auf die verschiedenen Kettenlängen der Alkoholreste wurde folgendermaßen bestimmt: ca. 1 mg Alkyl-GPÄ wurde mit Lithiumaluminiumhydrid nach Wood und Snyder¹¹) reaktiv gespalten und die entstandenen Glycerinäther in ihre Isopropylidenderivate nach Hanahan und Mitarb.¹²) umgewandelt. Die Isopropylidenderivate wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie (oben) von geringen Mengen Verunreinigungen getrennt und gaschromatographisch analysiert; es handelte sich um ein Gemisch, welches praktisch nur C₁₆- und C₁₈-Alkoholketten enthielt (Tab. 1). Gaschromatographisch bestimmten wir die Radioaktivität der C₁₆- bzw. C₁₈-Ketten und errechneten unter Bezug auf die spezifische Radioaktivität

der Gesamtprobe die spez. Radioaktivität der im Alkyl-GPÄ-Präparat enthaltenen Alkohole (Tab. 1).

Da zur präparativen Trennung der Monoradyl-GPÄ-Verbindungen keine chromatographischen Methoden zur Verfügung stehen, mußte das dargestellte Alkyl-GPÄ-Präparat auf Verunreinigung mit Monoacyl-GPÄ bzw. Monoalk-1'-enyl-GPÄ geprüft werden. Noch vorhandene Monoacylderivate wurden auf folgende Weise bestimmt: 1,77 μMol des Alkyl-GPÄ-Präparates, die mit der 80fachen Menge Heptadecansäure versetzt worden waren, wurden einer Methanolyse⁷) unterworfen und die entstandenen Fettsäuremethylester an einer Kieselsäuresäule isoliert: Gesamtradioaktivität: 6200 Zpm. Da die Wiederfindung der C₁₇-Fettsäuremethylester 95% betrug, war die [¹⁴C]-Acyl-Verunreinigung 3,8% der Gesamt-¹⁴C-Radioaktivität. Aufgrund früherer Arbeiten^{11,7}) darf angenommen werden, daß auch die ³²P-Verunreinigung durch Monoacylverbindungen in dieser Größenordnung lag.

Für vorhandene Alk-1'-enyl-Analoga im Alkyl-GPÄ-Präparat hatten wir keinen Hinweis: Die Plasmalbestimmung war negativ.

Einbau des [¹⁴C,³²P]Alkyl-GPÄ in die äthanolaminhaltigen Plasmalogene bzw. in die Phosphatidyläthanolamine 12, 24, 48 und 72 h nach Applikation

Aus 16 Ratten wurden 4 gleiche Gruppen gebildet, denen jeweils 3,34 μMol Alkyl-GPÄ (in 200 μl Wasser fein suspendiert) mit einer Radioaktivität von ¹⁴C: 325 × 10³ Zpm, ³²P: 1,96 × 10⁶ Zpm intracerebral injiziert wurden. Nach 12, 24, 48 und 72 h wurden die zu einer Gruppe gehörenden Tiere dekapitiert, die Gehirne entnommen und daraus die Gesamtlipide nach Folch und Mitarbeitern⁹) gewonnen (Analysen und Ergebnisse: Tab. 2).

⁹ Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957) *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.

¹⁰ Dawson, R. M. C. (1960) *Biochem. J.* **75**, 45–53.

¹¹ Wood, R. & Snyder, F. (1968) *Lipids* **3**, 129–135.

¹² Hanahan, D. J., Ekholm, J. & Jackson, C. M. (1963) *Biochemistry* **2**, 630–641.

Mit Hilfe einer Säulenchromatographie an Florisil¹¹ isolierten wir daraus die jeweiligen PÄ-Fractionen (Analysen und Ergebnisse: Tab. 3).

a) Bestimmung der ¹⁴C-Radioaktivität in den Aldehyden bzw. Fettsäuren der PÄ-Fractionen

Aus etwa jeweils 25 mg der PÄ-Fractionen_{12,24,48,72} wurden, wie früher beschrieben¹⁷ methanolytisch die Dimethylacetale und Fettsäure-methylester dargestellt. Durch Chromatographie an einer Kieselsäuresäule konnten die Komponenten getrennt und ihre Mengen bestimmt werden.

x) Die Aldehyde bzw. Dimethylacetale zu verschiedenen Zeiten

In allen Fällen handelte es sich um Präparate, die dünnschichtchromatographisch keine Verunreinigungen erkennen ließen. Die gaschromatographische Analyse zeigte, daß das molare Verhältnis von C₁₆:C₁₈-Aldehyden etwa 2:3 war und in den nach verschiedenen Überlebenszeiten gewonnenen Dimethylacetal-Gemischen praktisch gleich blieb (Tab. 4), so daß sich daraus ein mittleres Molekulargewicht von 303 errechnete.

Ca. 1 µMol der verschiedenen Präparate (Dimethylacetal_{12,24,48,72}) diente zur Bestimmung der jeweiligen Radioaktivitäten (Tab. 4). Aus diesen und den durch die Plasmalbestimmung der PÄ-Fractionen_{12,24,48,72} ermittelten Werte (Tab. 3) ließ sich die Gesamtaktivität der Dimethylacetal_{12,24,48,72}-Gemische berechnen (Tab. 4), nach deren radiogaschromatographischer Analyse wurden die in Abb. 1b aufgeführten Werte für die spez. Aktivitäten der C₁₆- und C₁₈-Aldehyde zu den verschiedenen Zeiten ermittelt und ins Verhältnis zueinander gesetzt (Abb. 2).

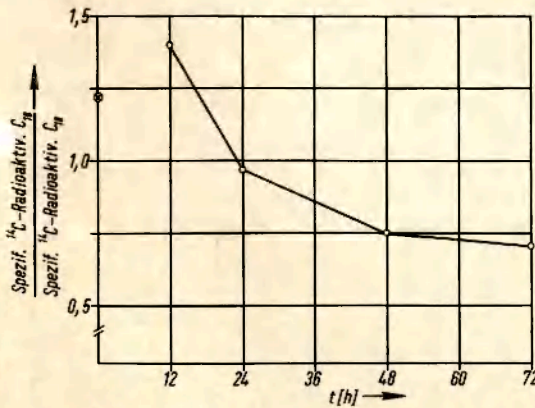


Abb. 2. Verhältnis der spezifischen ¹⁴C-Radioaktivitäten der C₁₆:C₁₈-Aldehyde aus den Äthanolaminplasmalogenen des Rattengehirns nach intracerebraler Applikation von [¹⁴C,³²P]Alkyl-GPÄ.

⊙ = Verhältnis der spezifischen ¹⁴C-Radioaktivitäten der C₁₆:C₁₈-Alkoholketten des injizierten [¹⁴C,³²P]-Alkyl-GPÄ.

Tab. 3. Analysen der PÄ-Fractionen_{12,24,48,72}, isoliert aus den Gesamtlipiden_{12,24,48,72}.

Zeit nach Inj. [h]	P [%]	Menge		Plasmal [%]	Radioaktivität		³² P Gesamt [Zpm]	% v. Gesamt-Lipid
		[mg]	als Phosphat [µMol]		¹⁴ C Gesamt [Zpm]	% v. Gesamt-Lipid		
12	3,94	53,5	68,1	14,7	63,2 × 10 ⁸	288 × 10 ⁸	57,1	
24	4,00	54,5	70,3	15,0	55,3 × 10 ⁸	210 × 10 ⁸	55,0	
48	3,96	53,9	69,0	17,4	45,6 × 10 ⁸	149 × 10 ⁸	52,1	
72	3,82	54,4	67,0	16,9	41,4 × 10 ⁸	120 × 10 ⁸	51,4	

Tab. 4. Molare Zusammensetzung der Aldehyde sowie ^{14}C -Radioaktivitäten der Aldehyde bzw. Fettsäuren aus den nach verschiedenen Zeiten gewonnenen PÄ-Fractionen.

Zeit nach Inj. [h]	Menge		Aldehyde			Fettsäuren
	% v. Gesamt-Aldehyden		Gesamt [Zpm]	Radioaktivität		Radioaktivität Gesamt [Zpm]
	C_{16}	C_{18}		% v. Gesamt	C_{18}	
12	40,2	59,8	$18,6 \times 10^3$	48,4	51,6	$7,45 \times 10^3$
24	40,7	59,3	$30,2 \times 10^3$	39,9	60,1	$4,51 \times 10^3$
48	39,7	60,3	$41,0 \times 10^3$	33,0	67,0	$4,27 \times 10^3$
72	39,2	60,8	$33,4 \times 10^3$	31,2	68,8	$4,88 \times 10^3$

g) Die Fettsäuren bzw. Fettsäure-methylester zu verschiedenen Zeiten

Auch diese Präparate waren dünn-schichtchromatographisch rein. Von den Fettsäure-methylester-Gemischen (Tab. 4) untersuchten wir lediglich jeweils die Radioaktivität, berechneten aufgrund früherer Ergebnisse^[7] das mittlere Molekulargewicht (329) und ermittelten so die spez. Radioaktivität (Abb. 1b).

b) Bestimmung der ^{32}P -Radioaktivität in den Plasmalogenen und Diacylanalogen der PÄ-Fractionen zu verschiedenen Zeiten

Nach „milder“ alkalischer Spaltung^[18] von jeweils etwa 7 mg der PÄ-Fractionen^[2,24,48,72] untersuchten wir die dadurch entstandenen – d. h. den Diacylverbindungen zukommenden – wasserlöslichen Phosphatdiester und führten anschließend eine „milde“ saure Hydrolyse^[18] der noch verbliebenen Phosphatide durch. Dadurch erhielten wir die den Plasmalogenen zukommenden Phosphatdiester.

Um mögliche Verunreinigungen abzutrennen, wurden alle so erhaltenen Spaltprodukte einer Dünnschichtchromatographie an Cellulose unterzogen, die Phosphatdiester wurden danach gewonnen, der jeweilige P-Gehalt und die Radioaktivität wie früher^[1] angegeben bestimmt (Tab. 5) und die spezifischen Radioaktivitäten der Plasmalogene ermittelt (Abb. 1a). Von den genannten Untersuchungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Diskussion

Auch die Ergebnisse dieses Versuchs sind mit unserer früher geäußerten Annahme verträglich, nämlich daß die Alkylglycerinphosphoryläthanolamine (II) im Gehirn Zwischenprodukte der Biosynthese für Plasmalogene (I) sind. Die wieder-gefundene Radioaktivität der Lipide beträgt nach

¹³ Debuch, H. & Winterfeld, M. (1966) *Z. Klin. Chem.* **4**, 149–153.

12 bis 72 h für ^{14}C : 28–23%, für ^{32}P : 26–12% (Tab. 2), davon finden sich in beiden Fällen 70 bis 50% in der PÄ-Fraktion (Tab. 3).

Allerdings erreicht die spezif. Aktivität der Aldehyde deutlich später ein Maximum als die des Phosphatrestes. Schon nach 12 h war bedeutend mehr ^{32}P als ^{14}C ausgetauscht worden, denn das $^{14}\text{C}/^{32}\text{P}$ -Verhältnis hatte sich gegenüber dem verabreichten Alkyl-GPÄ (II) zugunsten des ^{14}C verschoben. Dies konnte bis zum Ende des Versuchs, also über einen Zeitraum von 72 h hin beobachtet werden (Abb. 3).

Während im Phosphatidyläthanolamin nur eine gleichbleibend sehr geringe ^{14}C -Aktivität gefunden wurde, betrug die ^{32}P -Aktivität ein Drittel von der der PÄ-Fraktion, ein Zeichen dafür, daß der Umbau am hydrophilen Teil des Alkyl-GPÄ (II) wesentlich schneller vor sich geht als der am lipophilen Teil (Tab. 5).

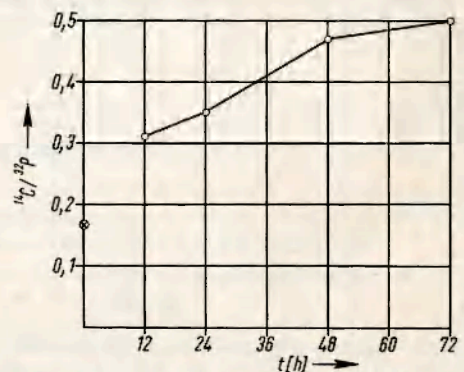


Abb. 3. Verhältnis der ^{14}C : ^{32}P -Radioaktivitäten im ÄPI des Rattengehirns nach intracerebraler Applikation von [^{14}C , ^{32}P]Alkyl-GPÄ.

⊗ = Verhältnis der ^{14}C : ^{32}P -Radioaktivität des injizierten [^{14}C , ^{32}P]Alkyl-GPÄ.

Tab. 5. Mengen und Radioaktivitäten der Äthanolaminplasmalogene und Phosphatidyläthanolamine aus den nach verschiedenen Zeiten gewonnenen PÄ-Fractionen.

Zeit nach Inj. [h]	Äthanolaminplasmalogene (ÄPI)				Phosphatidyläthanolamine (PÄ)			
	Menge ^b		Radioaktivität ^c		Menge ^b		Radioaktivität ^c	
	als Phosphat [μ Mol]	[Zpm]	^{14}C [% von PÄ-Fr.]	^{32}P [Zpm]	als Phosphat [μ Mol]	[Zpm]	^{14}C [% von PÄ-Fr.]	^{32}P [Zpm]
12	24,9	$18,6 \times 10^3$	29,4	$60,0 \times 10^3$	43,2	$7,45 \times 10^3$	11,8	$32,4 \times 10^3$
24	26,4	$30,2 \times 10^3$	54,6	$86,3 \times 10^3$	43,9	$4,51 \times 10^3$	8,2	$49,7 \times 10^3$
48	29,9	$41,0 \times 10^3$	89,9	$87,1 \times 10^3$	39,1	$4,27 \times 10^3$	9,4	$40,1 \times 10^3$
72	28,3	$33,4 \times 10^3$	81,7	$67,1 \times 10^3$	38,7	$4,88 \times 10^3$	11,8	$44,9 \times 10^3$

^a Errechnet aus dem Gewicht der Dimethylacetale durch Multiplikation mit dem Faktor 2,5.

^b Errechnet aus dem Gewicht der PÄ-Fraktion abzüglich dem Plasmalogenanteil.

^c Bei der Berechnung der ^{14}C -Gesamtradioaktivität von ÄPI und PÄ wurde die gesamte Radioaktivität in den Fettsäuren dem PÄ zugerechnet.

Hier muß ein weiterer Befund besonders hervorgehoben werden. Wie aus Tab. 5 ersichtlich, fanden wir nach 12 h im ÄPI und Phosphatidyläthanolamin insgesamt nur 40% der ^{14}C - bzw. 32% der ^{32}P -Aktivität der PÄ-Fraktion, d. h. in dieser Fraktion, die nur aus Diradylglycerinphosphoryläthanolaminen bestand, mußten noch sehr geringe Mengen hochmarkierter, dem ÄPI und Phosphatidyläthanolamin analoger Phosphatide enthalten sein. Deren Aktivitätsanteil an der PÄ-Fraktion wurde stetig kleiner: Nach 48 h war praktisch die gesamte ^{14}C -Aktivität in den Aldehyden und Fettsäuren zu finden und 94% der ^{32}P -Aktivität in den Phosphodiestern der Plasmalogene und Phosphatidyläthanolamine (Abb. 4).

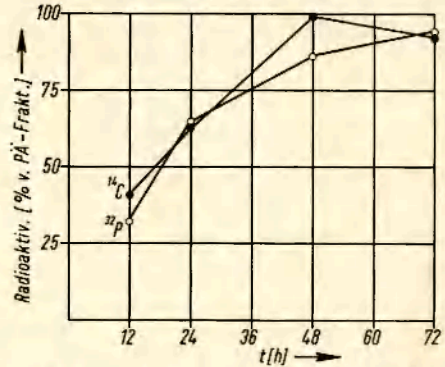


Abb. 4. Prozentualer Anteil der ^{14}C - bzw. ^{32}P -Radioaktivitäten in ÄPI + Phosphatidyläthanolamin an der PÄ-Fraktion des Rattengehirns nach intracerebraler Applikation von [^{14}C , ^{32}P]Alkyl-GPÄ.

Dieser Befund könnte seine Erklärung in der Annahme finden, daß das verabreichte Alkyl-GPÄ (II) nach 12 h z. T. als Alkylacyl-GPÄ vorlag, so daß auch dieses Substrat als Vorläufer der Plasmalogene in Frage kommt.

Früher^[2] diskutierten wir aufgrund unserer Versuchsergebnisse die Möglichkeit der Dehydrierung des Äthers zum Enoläther auf der Stufe des Alkyl-GPÄ (II), da wir damals^[2] ebenfalls praktisch die gesamte Radioaktivität der PÄ-Fraktion in den Plasmalogenen und Diacylverbindungen fanden. Denn wir isolierten die PÄ-Fraktion nur z. Z. des maximalen Einbaues des Alkyl-GPÄ (II). Inzwischen berichteten andere Autoren über die Oxidation der Ätherphosphatide, wobei sie sowohl in

vivo^[14] als auch in vitro^[15,16] mit Alkylacylphosphatiden gute Einbauraten erzielten. Kürzlich erhielten Wykle u. Mitarb.^[17] unter Verwendung einer mikrosomalen Fraktion aus Fischer-Sarkomzellen Hinweise für ein Vorläufer-Produkt-Verhalten zwischen Alkylacyl-GPÄ und ÄPl. Trotzdem bleiben die Befunde der In-vivo-Versuche^[2,14,18], bei denen ein besserer Umbau des Alkyl-GPÄ verglichen mit dem Alkylacyl-GPÄ beobachtet wurde, bisher ungeklärt.

Die Ergebnisse der hier dargelegten Versuche zeigen ein weiteres: C₁₆-Alkylphospholipide werden schneller in die entsprechenden Plasmalogene

umgewandelt als die analogen C₁₈-Verbindungen. In einem nicht veröffentlichten Vorversuch fanden wir 12 h nach Applikation von [¹⁴C]Alkyl-GPÄ ein Verhältnis der spezif. Aktivität der C₁₆/C₁₈-Aldehyde von 1,99, nach 72 h war es nur noch 0,81. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, fanden wir jetzt ähnliche Verhältnisse. Besonders deutlich wird der schnellere Umbau der C₁₆-Verbindungen 12 h nach Applikation, da zu dieser Zeit das Verhältnis der C₁₆/C₁₈-Aktivitäten – im Vergleich zum Ausgangssubstrat – zugunsten der C₁₆-Aldehyde angestiegen war. Da die C₁₈-Aldehyde wohl auch langsamer abgebaut werden, erreichten sie eine höhere spezif. Aktivität als die C₁₆-Homologen (Abb. 1b).

¹⁴ Paltauf, F. (1971) *FEBS Lett.* **17**, 118–120.

¹⁵ Paltauf, F. (1972) *FEBS Lett.* **20**, 79–82.

¹⁶ Horrocks, L. A. & Radomska-Pyrek, A. (1972) *FEBS Lett.* **22**, 190–192.

¹⁷ Wykle, R. L., Blank, M. L., Malone, B. & Snyder, F. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5442–5447.

¹⁸ Paltauf, F. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **260**, 352–364.

Frau *Annegret Blachetta* und Frau *Christa Geyer* danken wir für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche. Die Arbeit wurde aus Mitteln der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* in dankenswerter Weise unterstützt. J. St. dankt der *Alexander-von-Humboldt-Stiftung* für ein Stipendium.