

Zur Aktivität der Phospholipase A₂ gegenüber verschiedenen 1-Alk-1'-enyl-2-acyl- und 1-Alkyl-2-acyl-Verbindungen während der multiplen Sklerose*

Helmut Woelk und Katsuyo Peiler-Ichikawa

Neurochemische Abteilung (Direktor: Prof. Dr. K. Kanig)
und Universitäts-Nervenklinik (Direktor: Prof. Dr. H.-H. Meyer), Homburg/Saar

Eingegangen am 29. April 1974

On the Activity of Phospholipase A₂ Compared with 1-Alk-1'-enyl-2-acyl- and 1-Alkyl-2-acyl-glycerophosphatides in Multiple Sclerosis

Summary. The 1,2-diacyl- and 1-alk-1'-enyl-2-acyl portion of ethanolamine-phosphoglycerides was determined in white matter taken from brains of 9 patients with multiple sclerosis and from 9 control brains. MS brains showed a significant decrease of ethanolamine-plasmalogen, whereas the concentration of total ethanolamine-phosphoglycerides was not altered.

2-acyl-1-alk-1'-enyl- and 2-acyl-1-alkyl-sn-glycerin-3-phosphorylcholin, specifically labelled at the 2-position with different fatty acids, were prepared enzymatically by using the acyltransferase system of rabbit sarcoplasmic reticulum. The substrates were subjected to hydrolysis by phospholipase A₂ prepared from pathological (MS) and control brains. Alkyl- and alkenyl-derivatives, esterified with linoleic acid at the 2-position, were hydrolyzed at similar rates by the enzyme. The phospholipase A₂ removed polyunsaturated fatty acids, such as linolenic and arachidonic acids, less actively from choline-plasmalogen. With the multiple sclerosis material an increase of approximately 50% in phospholipase A₂ activity was observed in all substrates studied.

Key words: Multiple sclerosis — White matter — Ethanolamine-phosphoglycerides — Ethanolamine-plasmalogen — Phospholipase A₂.

Zusammenfassung. Bei jeweils 9 Multiple Sklerose- und Kontrollgehirnen wurde die Äthanolamin-Phosphatid-Fraktion der normalen weißen Substanz auf ihren Anteil an 1,2-Diacyl- und 1-Alk-1'-enyl-2-acyl-sn-glycerin-3-phosphoryläthanolamin untersucht. Die MS-Gehirne wiesen eine deutliche Verminderung des Äthanolamin-Plasmalogen-Anteiles auf; die Äthanolamin-Phosphatid-Fraktion war nicht vermindert.

Mit Hilfe von Acyltransferase aus sarkoplasmatischem Reticulum des Kaninchens wurde auf enzymatischem Wege in der 2-Stellung mit verschiedenen Fettsäuren spezifisch markiertes 2-Acyl-1-alk-1'-enyl- und 2-Acyl-1-alkyl-sn-glycerin-

* Herrn Prof. Dr. H.-H. Meyer zum 65. Geburtstag gewidmet.

Abkürzungen: acylalkenyl = 2-acyl-1-alk-1'-enyl; acylalkyl = 2-acyl-1-alkyl; MS = multiple Sklerose.

3-phosphorylcholin dargestellt. Die Substrate wurden der Hydrolyse durch eine Phospholipase A₂, welche aus MS- und Normalgehirnen dargestellt wurde, unterworfen. Die mit der Linolsäure veresterten Alkyl- und Alkenylderivate wurden von dem Enzym etwa gleich schnell gespalten. Die spezifische Aktivität der Phospholipase A₂ nahm ab, sobald sich in der 2-Stellung der Cholin-Plasmalogene höher ungesättigte Fettsäuren wie die Linolen- oder Arachidonsäure befanden. Bei der multiplen Sklerose war die Aktivität der Phospholipase A₂ gegenüber allen untersuchten Substraten signifikant um etwa 50% erhöht.

Eine Abnahme bestimmter Lipide, Veränderungen in der Lipidzusammensetzung und Verschiebungen im Fettsäuremuster der einzelnen Lipidklassen sind bei der multiplen Sklerose und anderen Entmarkungs-erkrankungen in der normalen weißen Substanz und im gereinigten Myelin festgestellt worden [1, 6, 16, 25, 26]. Kürzlich untersuchten Woelk u. Borri [25] bei jeweils 11 Multiple Sklerose- und Kontrollgehirnen die normale weiße Substanz auf Veränderungen im Gehalt und in der Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide und einiger Sphingolipide. Die MS-Gehirne zeigten einen deutlichen Abfall der Serin-Phosphatid-Fraktion und einen leichten Anstieg der Lysophosphatide. Bei allen Phospholipiden zeigte sich in unterschiedlichem Ausmaße eine Verminderung der Ölsäure und eine Zunahme der hochungesättigten langkettigen Fettsäuren. Ähnliche Veränderungen im Lipidgehalt und in der Fettsäurezusammensetzung wurden im gereinigten Myelin von MS-Gehirnen gefunden [26]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß Patienten mit einer MS an Abweichungen des Gehirn-Lipidstoffwechsels leiden, wie z. B. an Veränderungen in der Aktivität der Lipid-spaltenden Enzyme und an einer Schwäche des Fettsäure-verlängernden Systems. Bislang haben wir noch keine Kenntnis über die Aktivität von Phospholipasen während der De- und der Remyelinisierung des Zentralnervensystems. In dem Bemühen, einen Einblick in den Stoffwechsel der Phosphatide während der Demyelinisierung des Zentralnervensystems zu erhalten, fanden wir es notwendig, unsere früheren Arbeiten über Phospholipasen A [23, 24, 27—29] des Gehirns auf Untersuchungen über die Aktivität der Phospholipase A₂ aus Menschengehirn während der multiplen Sklerose auszudehnen. Die Phospholipase A₂ hydrolysiert spezifisch die in der 2-Stellung des Glycerins veresterten Fettsäuren von 1,2-Diacyl-, 1-Alkyl-2-acyl- und 1-Alk-1'-enyl-2-acyl-glycerinphosphatiden. In der vorliegenden Untersuchung interessierten uns insbesondere die Veränderungen in der Äthanolamin-Phosphatid-Fraktion, welche im Gesamtgehirn zu jeweils etwa 48-50% aus 1,2-Diacyl- und 1-Alk-1'-enyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphoryläthanolamin und zu etwa 1—2% aus 1-Alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphoryläthanolamin besteht, bei der multiplen Sklerose sowie die Hydrolyse von 1-Alk-1'-enyl-2-acyl-Verbindungen (Plasmalogene) durch eine im menschlichen Gehirn vorhandene Phospholipase A₂.

Material und Methoden

Gehirngewebe. Bei 9 durch Autopsie gewonnenen MS-Gehirnen (Tabelle 1) wurde die graue von der weißen Substanz getrennt. Unter Aussparung der Plaques und ihrer unmittelbaren Umgebung wurden Proben der weißen Substanz, welche makroskopisch und lichtmikroskopisch frei von pathologischen Veränderungen waren, bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C gelagert. Zu Kontrollversuchen wurde die weiße Substanz von menschlichen Gehirnen verwendet, welche keine pathologischen Veränderungen aufwiesen.

Extraktion des Gewebes. Die Lipide wurden aus der weißen Substanz mit Chloroform/Methanol (2:1; v/v) nach Folch *et al.* [15] extrahiert und die Unterphase entweder direkt oder nach Dialyse gegen Petroläther [12] durch Chromatographie an Florisil oder mit Hilfe der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie in ihre Komponenten aufgetrennt.

Dünnschicht- und Säulenchromatographie zur Gewinnung der Äthanolamin-Phosphatid-Fraktion erfolgte wie bei Woelk u. Borri [25] beschrieben.

Synthetische Substrate. Reines Cholin-Plasmalogen ($P = 3,75\%$; Plasmalogengehalt: 97%) wurde wie früher beschrieben [23] dargestellt, indem der 1,2-Diacylannteil einer Cholin-Phosphatid-Fraktion aus Rinderherz selektiv durch Phospholipase A₂ aus *Crotalus Atrox* gespalten wurde.

Ein Teil des Cholin-Plasmalogens wurde wie früher beschrieben [11, 23] durch katalytische Hydrierung in das entsprechende 1-Alkyl-2-acyl-Derivat überführt.

1-Alk-1'-enyl- und 1-Alkyl-sn-glycerin-3-phosphorylcholin wurden dargestellt, indem wir die entsprechenden Alkenylacyl- und Alkylacyl-Verbindungen einer milden alkalischen Hydrolyse nach Dawson [7, 9] unterwarfen und die Lysophosphatide durch Säulenchromatographie an Kieselsäure [8] oder an Florisil [13] reinigten. Alkenylacyl- und Alkylacyl-sn-glycerin-3-phosphorylcholin, welches in der 2-Stellung des Glycerins mit einer radioaktiven Fettsäure spezifisch markiert war, erhielten wir durch Inkubation von Alkenyl- und Alkyl-sn-glycerin-3-phosphorylcholin mit dem radioaktiv markierten Fettsäure-CoA-Derivat [19], wie bei Waku u. Nakazawa [21] beschrieben, indem wir das Acyl-Transferase-System des sarkoplasmatischen Reticulums des Kaninchens als Enzymquelle verwendeten. Eine genaue Beschreibung zur Darstellung dieser spezifisch markierten Alkenylacyl- und Alkylacyl-Verbindungen haben wir kürzlich veröffentlicht [29].

Tabelle 1. Übersicht über das verwendete Patientengut

Nr.	Normalkontrolle			Multiple Sklerose		
	Autopsiediagnose	Alter	Geschl.	Dauer der MS (Jahre)	Alter	Geschl.
I	Herzinfarkt, Lungenödem	53	m	17	57	w
II	Emphysem	79	m	28	63	w
III	Herzaneurisma	73	w	37	78	m
IV	Lungentuberkulose	59	w	40	76	m
V	Lymphadenose	62	m	42	75	m
VI	Bronchialcarcinom	49	m	10	40	m
VII	Magencarcinom	45	m	8	41	w
VIII	Uteruscarcinom	61	w	25	59	m
IX	Herzinfarkt	54	m	31	65	w

Enzym. Aceton-getrocknetes Gewebepuder stellten wir aus menschlichem cerebralem Cortex wie früher beschrieben dar [24] und gewannen daraus nach der von Cooper u. Webster [5] angegebenen Methode eine teilweise gereinigte Phospholipase A₂.

Inkubation. Die Inkubation, die chromatographische Trennung und Isolierung der Reaktionsprodukte sowie die Messung der Radioaktivität wurden wie bereits ausführlich beschrieben [28] durchgeführt.

Analysen. Der Phosphorgehalt wurde in Anlehnung an die Methode nach Bartlett [3] in der l. c. [10] beschriebenen Modifikation, Plasmal (als Dimethylacetal) nach Feulgen *et al.* [14], variiert nach Klenk u. Debuch [17], ermittelt. Der jeweilige Plasmalogengehalt wurde wie beschrieben [23] berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Bei den früher [25, 26] beschriebenen Veränderungen im Lipidgehalt und in der Zusammensetzung der einzelnen Lipidklassen während der multiplen Sklerose untersuchten wir die Äthanolamin-Phosphatide in ihrer Gesamtheit. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir dagegen die einzelnen Äthanolamin-Phosphatide, welche sich in dem Radikal an der 1-Stellung des Glycerins unterscheiden, getrennt voneinander und konnten eine Abnahme der Äthanolamin-Plasmalogene in der weißen Substanz von MS-Gehirnen bei allen untersuchten Gehirnen feststellen (Tabelle 2). Da die Äthanolamin-Phosphatid-Fraktion nicht vermindert war, dürfte es sich bei der Abnahme des Äthanolamin-Plasmalogen-Anteils um einen Austausch von Plasmalogen-Molekülen mit den entsprechenden 1,2-Diacylderivaten handeln, so daß es zu einer Abnahme der ersteren und zu einer Zunahme der letzteren kommt.

Tabelle 2. Plasmalogengehalt^a in Prozent der Äthanolamin-Glycerinphosphatide in der weißen Substanz von Normal- und Multiple Sklerose-Gehirnen

Probe	Normal- gehirne (9) ^b	MS-Gehirne (9)
I	85,8	67,2
II	84,6	75,4
III	85,3	58,9
IV	87,6	70,4
V	84,3	65,6
VI	88,4	68,7
VII	85,5	70,3
VIII	79,2	60,9
IX	80,1	63,2

^a Berechnet aus den Plasmalwerten durch Multiplikation mit dem Faktor 2,5; dabei wurde ein mittleres Molekulargewicht von 300 für Dimethylacetale und ein solches von 750 für Plasmalogene angenommen.

^b Anzahl der untersuchten Gehirne.

Tabelle 3. Phospholipase A₂-Aktivität in Normal- und Multiple Sklerose-Gehirnen gegenüber verschiedenen Cholin-Glycerinphosphatiden

Substrat	Normalgehirne	MS-Gehirne	Differenz (%)	P*
1-Alk-1'-enyl-2-[¹⁴ C] linoleoyl-sn-glycerin-3-phosphorylcholin	82,6 ± 1,4	122,8 ± 3,0	+ 48,7	0,01
1-Alkyl-2-[¹⁴ C] linoleoyl-sn-glycerin-3-phosphorylcholin	84,2 ± 1,7	128,4 ± 1,8	+ 52,5	0,01
1-Alk-1'-enyl-2-[¹⁴ C] linolenoyl-sn-glycerin-3-phosphorylcholin	78,5 ± 2,0	119,1 ± 2,5	+ 51,7	0,05
1-Alk-1'-enyl-2-[¹⁴ C] arachidonyl-sn-glycerin-3-phosphorylcholin	53,4 ± 1,1	81,4 ± 1,5	+ 52,4	0,02

Werte ausgedrückt in nmol abgespaltene Fettsäuren × mg⁻¹ prot. × h⁻¹. Jeder Wert ist der Mittelwert von 9 Gehirnen ± Standardabweichung**.

* t-Test nach Student.

** Die Standardabweichung (s) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\text{Quadratsumme}}{n - 1}}$$

Die Abnahme des Plasmalogen-Anteiles an der Athanolamin-Phosphatid-Fraktion (Tabelle 2) veranlaßte uns, nach Abbauwegen der Plasmalogene des Gehirns zu suchen; insbesondere interessierte uns die Entstehung von Lysoplasmalogenen durch enzymatische Hydrolyse der in der 2-Stellung des Plasmalogen-Moleküls sich befindenden Fettsäuren. Zu diesem Zwecke synthetisierten wir mit Hilfe der Acyltransferase des sarkoplasmatischen Reticulums des Kaninchens 1-Alk-1'-enyl-2-acyl- und 1-Alkyl-2-acyl-sn-glycerin-3-phosphorylcholine, welche in der 2-Stellung mit verschiedenen ¹⁴C-markierten Fettsäuren besetzt waren. Diese Substrate unterwarfen wir der Hydrolyse durch eine Phospholipase A₂, welche wir aus Normal- und MS-Gehirnen dargestellt hatten. Aus der Tabelle 3 geht hervor, daß die Alkyl- und Alkenyl-derivate, welche sich in dem Radikal in der 1-Stellung unterscheiden und welche in der 2-Stellung mit der Linolsäure verestert sind, etwa gleich schnell von der Phospholipase A₂ gespalten werden. Die spezifische Aktivität des Enzyms nimmt ab, sobald sich in der 2-Stellung der Cholin-Plasmalogene höher ungesättigte Fettsäuren wie die Linolen- oder Arachidonsäure befinden (Tabelle 3). Weiterhin geht aus der Tabelle 3 hervor, daß die spezifische Aktivität des Enzyms bei der multiplen Sklerose gegenüber allen untersuchten Substraten signifikant um etwa 50% erhöht ist.

Über die Fettsäureveränderungen der Glycerinphosphatide und Sphingolipide der normalen weißen Substanz und des Myelins bei der

multiplen Sklerose haben wir in zwei früheren Arbeiten berichtet [25, 26]. Aus den dort beschriebenen Befunden folgerten wir, daß in der weißen Substanz von MS-Gehirnen eine Phospholipase A₂ überwiegen müßte, welche die Esterbindung der 2-ständigen, hauptsächlich ungesättigten Fettsäuren von Glycerinphosphatiden hydrolysiert.

Bislang wissen wir erst wenig über die Aktivität von Lipid-hydrolysierenden Enzymen während der De- und der Remyelinisierung. Ansell u. Spanner [2] wiesen im Jahre 1968 einen Anstieg in der Aktivität der Plasmalogenase, welche die Enol-Ätherbindung des Plasmalogenanteils der Äthanolamin-Glycerinphosphatide spaltet, bei der Entmarkung des Rückenmarkes sowie in MS-Plaques nach. Vasan u. Bachhawat [20] sowie Maggio *et al* [18] berichteten über einen Anstieg in der Aktivität der Arylsulfatase A, welche die Konzentration der Sulfatide steuert, während der Demyelinisierung des Zentralnervensystems. Kürzlich beschrieb Webster [22] bei der Wallerschen Degeneration des Ischiasnerven der Ratte eine 6fache Erhöhung der Phospholipase A₁- und eine 9fache Erhöhung der Phospholipase A₂-Aktivität. Diese stark erhöhten Werte für die Phospholipasen A wurden 3 Wochen nach der Durchtrennung des Nerven gemessen und stehen in Übereinstimmung mit einem deutlichen Anstieg des Gehaltes an Lysophosphatidylcholin während der Degeneration des Ischiasnerven der Katze [4]. Kürzlich veröffentlichten wir Ergebnisse über die Aktivität von Phospholipasen A₁ und A₂ gegenüber verschiedenen Glycerinphosphatiden bei der experimentellen allergischen Encephalitis [30, 31]. Die dort beschriebenen Steigerungen der Phospholipase A-Aktivitäten sowie die in der vorliegenden Untersuchung festgestellte Erhöhung der Phospholipase A₂-Aktivität scheinen nicht von einer entsprechenden Zunahme der Lyso-Glycerinphosphatide begleitet zu sein, wie man nach den Beobachtungen bei der Degeneration des peripheren Nerven hätte erwarten können. Die Entmarkung des peripheren Nerven nach Durchtrennung desselben kann offenbar nicht direkt mit der Demyelinisierung des Zentralnervensystems verglichen werden, da letztere hauptsächlich durch einen gesteigerten Phosphatidumsatz, begleitet von einer aktiven Remyelinisierung, charakterisiert ist, welche die Anhäufung von größeren Mengen an Lyso-Glycerinphosphatiden verhindert.

In früheren Arbeiten stellten wir eine Verminderung der 20:1-Fettsäure in der normalen weißen Substanz und im Myelin von MS-Gehirnen fest [25, 26]. Da der größte Teil der 20:1-Fettsäure aus den Äthanolamin-Plasmalogenen stammen soll, könnte die gesteigerte Freisetzung dieser Fettsäure aus den Plasmalogenen durch eine während der Entmarkung erhöhte Aktivität an Phospholipase A₂ bedingt sein.

Literatur

1. Alling, C., Vanier, M. T., Svennerholm, L.: Lipid alterations in apparently normal white matter in multiple sclerosis. *Brain Res.* **35**, 325—336 (1971)
2. Ansell, G. B., Spanner, S.: Plasmalogenase activity in normal and demyelinating tissue of the central nervous system. *Biochem. J.* **108**, 207—209 (1968)
3. Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. biol. Chem.* **234**, 466—468 (1959)
4. Berry, J. F., Cevallos, W. H., Wade, R. R.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **42**, 492—500 (1965)
5. Cooper, M. F., Webster, G. R.: On the phospholipase A₂ activity of human cerebral cortex. *J. Neurochem.* **19**, 333—340 (1972)
6. Cumings, J. N., Goodwin, H.: Sphingolipids and phospholipids of myelin in multiple sclerosis. *Lancet* **1968 II**, 664—665
7. Dawson, R. M. C.: A hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological samples. *Biochem. J.* **75**, 45—53 (1960)
8. Debuch, H.: Über die Bildung der Plasmalogene zur Zeit der Myelinisierung bei der Ratte. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **338**, 1—9 (1964)
9. Debuch, H., Winterfeld, M.: Die Zusammensetzung der Glycerinphosphatide einiger Organe vom Menschen. *Z. klin. Chem.* **4**, 149—153 (1966)
10. Debuch, H., Mertens, W., Winterfeld, M.: Quantitative Bestimmung der Phosphatide mit Hilfe einer zweidimensionalen dünnschichtchromatographischen Methode. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **349**, 896—902 (1968)
11. Debuch, H., Friedemann, H., Müller, J.: Über die Bildung der Plasmalogene zur Zeit der Myelinisierung bei der Ratte, III. Einbau von ¹⁴C-markiertem 0-(1,2-Diacyl)- bzw. 0-(1-Alkyl-2-acyl-sn-glycerin-3-phosphoryl)-äthanolamin in Plasmalogen. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **351**, 613—621 (1970)
12. Eberhagen, D., Betzing, H.: An improved technique for dialysis of lipids. *J. Lipid Res.* **3**, 382—383 (1962)
13. Etzrodt, A., Debuch, H.: Über den Einbau von [1—¹⁴C] Acetat in die Fettsäuren und Aldehyde der äthanolaminhaltigen Phospholipoide des Gehirns junger Ratten. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **351**, 603—612 (1970)
14. Feulgen, R., Boguth, W., Andresen, G.: Quantitative Bestimmung der Acetalphosphatide (Plasmalogen) im Serum unter Berücksichtigung des „Waelsch-Effektes“. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **287**, 90—108 (1951)
15. Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* **226**, 497—509 (1957)
16. Gerstl, B., Kahnke, M. J., Smith, J. K., Tavaststjerna, M. G., Hayman, R. B.: Brain lipids in multiple sclerosis and other diseases. *Brain* **84**, 310—319 (1961)
17. Klenk, E., Debuch, H.: Progress in the chemistry of fats and other lipids, Holman, R. T., Lundberg, W. O., Malkin, T., Eds., Vol. 6, pp. 3—29. London: Pergamon Press 1963
18. Maggio, B., Maccioni, H. J., Cumar, F. A.: Arylsulfatase A (EC 3.1.6.1) activity in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurochem.* **20**, 503—510 (1973)
19. Seubert, W.: S-Palmityl Coenzyme A. *Biochem. Prep.* **7**, 80—83 (1960)
20. Vasan, N. S., Bachhawat, B. K.: Enzymic studies on sulphatide metabolism in different stages of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurochem.* **18**, 1853—1859 (1971)
21. Waku, K., Nakazawa, Y.: Acyltransferase activity to 1-0-Alkyl-glycero-3-phosphorylcholine in sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.* **68**, 459—466 (1970)

22. Webster, G. R.: Phospholipase A activities in normal and sectioned rat sciatic nerve. *J. Neurochem.* **21**, 873—876 (1973)
23. Woelk, H., Debuch, H.: Die Wirkung der Phospholipase A aus Schlangengift auf Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin und auf die entsprechenden Plasmalogene. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **352**, 1275—1281 (1971)
24. Woelk, H., Füniss, H.J., Debuch, H.: Enzymkinetische Untersuchungen einer Phospholipase A₁ dargestellt aus Menschenhirn. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **353**, 1111—1119 (1972)
25. Woelk, H., Borri, P.: Glycerinphosphatide und Sphingolipide der normalen weißen Substanz bei der Multiplen Sklerose. *Z. Neurol.* **205**, 243—256 (1973)
26. Woelk, H., Borri, P.: Lipid and fatty acid composition of myelin purified from normal and MS brains. *Europ. Neurol.* **10**, 250—260 (1973)
27. Woelk, H., Goracci, G., Gaiti, A., Porcellati, G.: Phospholipase A₁ and A₂ activities of neuronal and glial cells of the rabbit brain. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **354**, 729—736 (1973)
28. Woelk, H., Porcellati, G.: Subcellular distribution and kinetic properties of rat brain phospholipases A₁ and A₂. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **354**, 90—100 (1973)
29. Woelk, H., Goracci, G., Porcellati, G.: The action of brain phospholipases A₂ on purified, specifically labelled 1,2-diacyl-, 2-acyl-1-alk-1'-enyl- and 2-acyl-1-alkyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **355**, 75—81 (1974)
30. Woelk, H., Kanig, K.: Phospholipid metabolism in experimental allergic encephalomyelitis: activity of brain phospholipase A₁ towards specifically labelled glycerophosphatides. *J. Neurochem.* (in press, 1974)
31. Woelk, H., Kanig, K., Peiler-Ichikawa, K.: Phospholipid metabolism in experimental allergic encephalomyelitis: activity of mitochondrial phospholipase A₂ of rat brain towards specifically labelled 1,2-diacyl-, 1-alk-1'-enyl-2-acyl- and 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *J. Neurochem.* (in press, 1974)

Dr. H. Woelk
Universitäts-Nervenlinik
Neurochemische Abteilung
D-6650 Homburg/Saar
Bundesrepublik Deutschland