

54. Untersuchungen über Enzymaktivitäten der Leberzelle bei Vitamin-E-Mangel

von **Karl Bernhard** und **Rudolf Markstein**

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. *Wettstein* zum 65. Geburtstag gewidmet

(14. I. 72)

Summary. The enzymatic elongation of acyl-CoA esters by malonyl-CoA, respectively *de novo* synthesis of fatty acids from malonyl-CoA by liver microsomes and non particulate fraction of α -tocopherol deficient rats is diminished versus controls. However, liver microsomes of vitamin E deficient rats synthesize more eicosatetraenic acid from γ -linolenic acid and more γ -linolenic acid from linolic acid than do those of tocopherol supplemented animals. It has often been shown that the liver phosphatides of tocopherol deficient rats contain more arachidonic acid than those of controls, a fact which can be explained now by increased activity of the enzymes involved in the biosynthesis of arachidonic acid. Certain polyenic fatty acids are more rapidly synthesized in the absence of naturally occurring antioxidants.

Some enzymes of the respiratory chain have also been examined. No vitamin E deficiency effect has been found on enzymes such as gluconate-6-P-dehydrogenase, isocitrate-dehydrogenase, malate-dehydrogenase and lactate dehydrogenase contained in the non particulate fraction. Sonicated mitochondria of tocopherol deficient rats show a greater activity towards cytochrome-oxidase and β -hydroxy-acetyl-CoA-dehydrogenase than controls, possibly due to ultrastructural alteration of this particle.

Der Wirkungsmechanismus der Tocopherole ist weitgehend ungeklärt. Neben ihrer Beteiligung an der Atmungskette steht im Vordergrund ihre Bedeutung als natürliche Antioxydantien. Wir haben in früheren Versuchen gezeigt, dass bei ausgeprägtem Vitamin-E-Mangel die Leberlipide von Ratten einen höheren Gehalt an Arachidonsäure aufweisen als normal gefütterte Kontrollen [1]. Diese Befunde wurden von *Wittig & Horwitt* bestätigt und treffen auch für die Phospholipide aus Muskulatur zu [2].

Die Hämolyse der Erythrozyten durch Wasserstoffperoxid oder Dialursäure *in vitro* ist ein Mass für einen bestehenden E-Mangel. *Bieri & Mit.* [3] bestimmten die für eine Stabilisierung der Erythrozyten nötigen Mindestgehalte des Serums an Tocopherol und Polyenfettsäuren und ermittelten den α -Tocopherolgehalt von Erythrozyten und Plasma und die Konzentration ersterer an Polyenfettsäuren bei gesunden Probanden und Patienten. Es gelingt also leicht, durch den Hämolysetest einen bestehenden Vitamin-E-Mangel zu erfassen. Er ist bei Ratten, die mit einer Mangeldiät ernährt werden, schon nach vier Wochen manifest.

Seit der Auffindung der Prostaglandine durch *Bergström* begegnet die Arachidonsäure gesteigertem Interesse. Ihre Biosynthese aus Linol- und γ -Linolensäure könnte als sauerstoffabhängige Reaktion durch die Tocopherole beeinflusst werden, d. h. bei Abwesenheit solcher Antioxydantien besser verlaufen, wofür unsere eingangs erwähnten Befunde sprechen würden. Auch wäre denkbar, dass die bei E-Mangel gesteigerte peroxydatische Zerstörung der Polyenfettsäuren durch vermehrte Synthese

derselben wettgemacht würde [2]. Es schien uns angezeigt, eine Klärung dieser Möglichkeiten auf enzymatischer Ebene zu versuchen unter der hypothetischen Annahme, dass dieses fettlösliche Vitamin in Reaktionsfolgen des Lipidstoffwechsels involviert sei.

Wir haben Ratten Vitamin-E-frei ernährt und dann gleichzeitig mit Tieren, die zusätzlich α -Tocopherol erhielten, getötet. Je eine Leberprobe wurde lipidchemisch untersucht, der Hauptanteil des Organes indessen nach erfolgter Homogenisierung einer Fraktionierung in Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol unterworfen. In solchen Zellanteilen wurde die Aktivität folgender Enzyme gemessen: Cytochrom-Oxydase, Succinat-Cytochrom-c-Reduktase, NADH-Cytochrom-c-Reduktase, β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, Gluconat-6-P-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase. Ferner wurde der Einbau von ^{14}C -Natriumacetat in die Fettsäuren der Cytosol-Fraktion geprüft und durch Zugabe von CoA-Derivaten (Acetyl-CoA und Malonyl-CoA) zu Mitochondrien, Mikrosomen und Cytosol das Ausmass der Fettsäurebildung aus diesen Precursors aufgrund des Aktivitätseinbaues verfolgt. Schliesslich haben wir sowohl das Ausmass der Kettenverlängerung signierter γ -Linolensäure mit Malonyl-CoA zu Eicosatriensäure als auch das der Dehydrierung von ^{14}C -Linolsäure zu 18:3 ω 6 γ -Linolensäure durch die Lebermikrosomen von E-Mangeltieren und Kontrollen untersucht.

Experimentelles ¹⁾

Versuchstiere. Mit Altromin-R ernährte männliche weisse *Wistar*-Ratten unseres etwa 40 Jahre alten Inzuchtstammes im Alter von 8 Wochen und im Gewichte von ca. 60 g erhielten eine Vitamin-E-freie Diät [5], die für gleichaltrige Kontrollen durch 3 mg α -Tocopherol pro Woche ergänzt wurde. Die Lipidanalyse des Futters ergab 10% extrahierbare Bestandteile folgender Fettsäurezusammensetzung (% Methyl ester): 12:0: 34,8 – 14:0: 9,2 – 16:0: 17,8 – 16:1: 1,1 – 18:0: 7,0 – 18:1: 16,5 – 18:2: 4,0 – 18:3: 0,2 – 20:0: 0,5%. Der eintretende Vitamin-E-Mangel wurde aufgrund des Hämolysetestes nach *Friedman* [6] verfolgt. Wir töteten die Versuchstiere und Kontrollen jeweils um 9 Uhr morgens, da bekanntlich die Enzymaktivitäten bei der Ratte einem Tag-Nacht-Rhythmus unterworfen sind, also ein Zeitplan strikte einzuhalten ist.

Aufarbeitung der Leber zur Zellfraktionierung. Die frisch entnommene, durch Herzpunktion entblutete Rattenleber wird sofort in 60 ml eiskalter 0,25M Saccharoselösung mit einer Schere fein zerschnitten und mehrere Male ausgewaschen. Man versetzt einen Gewichtsteil des so behandelten Lebergewebes (ca. 12 g) mit 3 Volumenteilen 0,32M Saccharoselösung und homogenisiert in einem *Potter-Elvehjem*-Homogenisator (200 Upm) durch drei Auf- und Abbewegungen. Von diesem Homogenisat wird pro 12 ml mit 0,25M Saccharoselösung auf 20 ml aufgefüllt, damit das Homogenat etwa 15% Gewebsanteile aufweist. Mit Hilfe einer Ultrazentrifuge *Spinco L* mit Rotor 40 erfolgt während 10 Minuten bei 700 g (= 3500 Upm) eine Abtrennung von Zelltrümmern und Zellkernen, worauf der Überstand S_1 nach weiteren 10 Min. bei 7000 g (= 10350 Upm) im Sediment die Mitochondrien liefert und der Überstand S_2 nach 60 Min. bei 100000 g (40000 Upm) die Mikrosomen und den Überstand S_3 , d. h. das Cytosol.

Behandlung der Sedimente für die Enzymmessung. a) *Mitochondrien:* Vom hellbraunen Mitochondriensediment wird nur die dunklere aus intakten Mitochondrien bestehende untere Schicht verwendet und pro Sediment mit 1 ml 0,25M Saccharoselösung vorsichtig homogenisiert. Je 1 ml dieses Homogenates mit 3 ml 0,25M Saccharoselösung verdünnt, ergibt die sog. U-Fraktion oder die intakten Mitochondrien. Für die B-Fraktion, d. h. die zerstörten Mitochondrien (geplatze Mitochondrienmembran) werden je 1 ml Homogenat mit 3 ml Wasser verdünnt und in der Kälte während 10 sec. in einer Ultraschallwanne behandelt (Ultraschallgerät *Elgasonic*, Schallfrequenz 25 kHz, Leistung 140 Watt). Damit werden latente Enzyme aus dem Innern der Mitochondrien

¹⁾ Vgl. Diss. R. Markstein [4].

exogenem Substrat besser zugänglich (Enzyme der β -Oxydation, Glutamat-Dehydrogenase, Atmungskettenenzyme). b) *Mikrosomen*: Das rötliche, opalisierende Mikrosomensediment wird mit je 1,5 ml 0,25 M Saccharoselösung homogenisiert und ohne weitere Behandlung der Verwendung zugeführt. c) *Cytosol*: Im weiteren wurde nur die lipidfreie Cytosolfraktion, eine rötliche Flüssigkeit für die Enzymbestimmung verwendet.

Lipidanalysen. Leberproben und Mikrosomensediment wurden mit CHCl_3 :MeOH 2:1 erschöpfend extrahiert und die erhaltenen Rohlipide nach *Williams & Merrilees* [7] mit Sephadex G-25 von den wasserlöslichen Anteilen befreit. Die Auftrennung der so resultierenden Reinlipide in Neutralfette und Phospholipide erfolgte nach *Borgström* [8]. Die Reinheit aller Fraktionen prüften wir durch Dünnschichtchromatographie. Aus den Lipidfraktionen wurden die Fettsäuremethylester durch Umesterung mit 12,5% methanolischer HCl gewonnen. Die Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung erfolgte mit dem Gaschromatographen *Perkin-Elmer* Modell 800 mit Flammenionisationsdetektor, Pyrexsäule von 2,5 m Länge, 20% DEGS auf Chromosorb W, Trägergas N_2 20 ml pro Min., Arbeitstemperatur 190°.

Enzymbestimmungen. Die Enzymaktivitäten der einzelnen Zellfraktionen werden im Falle der Oxyreduktasen aufgrund der Extinktionsänderungen bei konstanter Wellenlänge (550 nm für Cytochrom-abhängige Reaktionen, 340 nm für NAD- und NADP-abhängige Reaktionen) ermittelt. Verwendet wurde der 2-Strahl-Spektrophotometer *Unicam-SP 800 B* [9]. Angabe der Aktivitäten in internationalen Einheiten pro mg Biuret-Eiweiss. Die Messungen erfolgen bei einem Totalvolumen von 3 ml bei 23° in Küvetten von 1 cm Schichtdicke. Von den enzymhaltigen Zellfraktionen wurde meistens 0,05 ml mit einem Proteingehalt von 5 und 10 mg pro ml verwendet. Die Bestimmung der einzelnen Enzyme erfolgte zumeist nach von uns modifizierten Angaben der Literatur. Einzelheiten sind aus [4] ersichtlich.

Messung der Radioaktivitäten signierter Verbindungen. Die markierten Verbindungen haben wir nach bekannten Methoden hergestellt, und zwar $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Natriumacetat nach *Lamprecht & Rehberg* [10], $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA nach *Simon & Shemin* [11], $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA nach *Trams & Brady* [12]. *Uniform labelled γ -Linolen- und Linolsäure* gewannen wir wie früher [13] auf biologischem Wege, indem der Fettsäure-synthetisierende Schimmelpilz *Phycomyces Blakesleeanus* in $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Natriumacetat-haltiger Nährlösung gezüchtet wurde. Von den durch Extraktion des Mycels und anschließender Verseifung erhaltenen Fettsäuren wurden durch zweimaliges Auskristallisieren aus Aceton bei -30° (10 ml Aceton pro g Fettsäuren) die gesättigten Säuren abgetrennt und die ungesättigten Fettsäuremethylester in die Quecksilber-Addukte übergeführt [14]. Trennung derselben über eine Kieselsäule in eine gesättigte, eine Monoc- und eine Polycenfraktion. Umwandlung der Addukte in die Methylester mit methanolischer Salzsäurelösung (keine merkliche Isomerisierung). Durch Verteilungschromatographie [15] lassen sich aus den Polyenfettsäuremethylestern reine Linol- und γ -Linolensäure gewinnen.

Radiogaschromatographie. Der bei der gas-chromatographischen Trennung aus dem Säulende austretende Gasstrom gelangt in eine Verbrennungsapparatur bestehend aus einem 8 cm langen mit Cuprox gefülltem Rohr aus rostfreiem Stahl. Es wird durch an den Rohrenden zugeleiteten Strom von ca. 50 A und 2,5 V auf 750° erhitzt. (Mittels eines Regel-Transformators gelingt eine durch ein Thermoelement kontrollierte Wärmezufuhr.) Die Fettsäuremethylester werden verbrannt. Dazu wird dem aus der Säule austretenden Gasstrom mittelst einer Stahlkapillare Sauerstoff beigemischt. Die Rohrleitungen sind möglichst kurz zu wählen, um das Totalvolumen klein zu halten. Die entstehende Kohlensäure gelangt in 10 ml Äthanolaminlösung (120 ml/lit. MeOH) zur Absorption und kann nach Zusatz von Scintillatorlösung im *Liquid Scintillation Counter* gemessen werden. Um bei den gas-chromatographisch zu trennenden kleinen Substanzmengen genügende Aktivität zu erhalten, haben wir das Splitterverhältnis am Detektor von 1:10 auf etwa 1:100 zugunsten des austretenden Gasstromes geändert.

Ergebnisse. – Aus Tab.1 geht hervor, dass nach 40–54 Wochen andauerndem Vitaminmangel hinsichtlich Körper- und Lebergewicht, Lipidgehalt der Leber und Anteil Neutralfette und Phosphatide gegenüber den Kontrollen kein signifikanter Unterschied besteht. Die Analyse der Phosphatidfettsäuren (Tab.2) ergibt wiederum eine signifikante Zunahme der Arachidonsäure, deren Anstieg indessen zufolge des

gewählten an Polyenfettsäuren armen Futters nicht so beträchtlich ist wie etwa nach Gaben einer viel Linolsäure enthaltenden Nahrung [1].

Tabelle 1. Körper- und Lebergewichte, Lipidmengen usw. nach 40–54 Wochen dauerndem E-Mangel
Mittelwert und Streuungen

	EM ^{a)}		Kontrollen	
	\bar{x}_{10}	s	\bar{x}_7	s
Körpergewicht	460	58	488	19
<i>Leber</i>				
Gewicht	16,2	2,4	17,3	2,5
In % des Körpergewichtes	3,53	0,31	3,55	0,25
Totallipide in %	6,34	0,7	7,4	1,5
davon Neutralfett in %	58,23	4,2	54,8	5,7
davon Phosphatide in %	41,76	4,2	45,2	5,7

^{a)} Vgl. Tab. 2.

Die Aktivitäten der im Cytosol lokalisierten Enzyme (vgl. Tab. 3) Gluconat-6-P-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase werden durch den E-Mangel offenbar nicht beeinflusst. Indessen sind die Enzymaktivitäten der beschallten Mitochondrien für die Cytochrom-Oxydase und die β -Hydroxy-Acetyl-CoA-Dehydrogenase bei den E-Mangeltieren signifikant höher. Die qualitative Zusammensetzung der Fettsäuren aus den durch ¹⁴C-Acetat im Cytosol gebildeten Lipide ist bei E-Mangel gegenüber den Kontrollen wenig verschieden. Palmitin- und Stearinsäure herrschen vor (Tab. 4). Der Hauptanteil des eingesetzten Natriumacetates wird unverändert vorgefunden, der Acetat-Einbau ist also gering.

Hinsichtlich der Fettsäuresynthese ist bekannt, dass das Enzymsystem der Mitochondrien Acetyl-CoA-Ester mit Acetyl-CoA und NADH als Wasserstoffdonator verlängert. Wir fanden in den Mitochondrien aus der Leber der E-Mangeltiere eine gegenüber den Kontrollen deutlich gesteigerte Fettsäuresynthese (Tab. 5). In den Mikrosomen findet eine Verlängerung von langkettigen Acyl-CoA-Estern mit Malonyl-CoA und NADPH als Wasserstoffdonator statt. Diese Reaktionsfolge ist bei den E-Mangeltieren stark eingeschränkt. Im Cytosol werden aus Malonyl-CoA und NADPH als Wasserstoffdonator langkettige gesättigte Fettsäuren gebildet. Die *de novo*-Synthese verläuft im Cytosol der E-Mangeltiere gleichfalls in geringerem Ausmasse als bei den Kontrollen. Tocopherol-Mangel wirkt sich demzufolge für diese synthetischen Leistungen von Mikrosomen und Cytosol hemmend aus.

Insbesondere musste der Ablauf der Verlängerung der γ -Linolensäure durch Malonyl-CoA zur Eicosatetraensäure interessieren. Unsere radiogaschromatographischen Messungen (vgl. Tab. 6) liessen erkennen, dass das Verhältnis 18:3 ω 6/20:3 ω 6 bei den Lebermikrosomen der Mangeltiere gegenüber den Kontrollen verschoben ist, die eingesetzte γ -Linolensäure wird vermehrt in die Eicosatetraensäure umgewandelt. Auch die Dehydrierung der Linol- zu γ -Linolensäure findet auf Grund der Aktivitätsverhältnisse der beiden Säuren bei E-Mangel bevorzugt statt (Tab. 7). Diese Beobach-

Tabelle 2. Fettsäurezusammensetzung der Leberphosphatide (% Methyltester)
EM = E-Mangeltiere, K = Kontrollen

Dauer Wochen	40		46		49		50		51		52		54		\bar{x}_7		s			
	EM	K	EM	K	EM	K														
Säuren	EM	K	EM	K	EM	K														
14:0	1,0	0,6	0,7	0,5	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6	1,2	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,75	0,6	0,29	0,05
16:0	11,1	14,3	15,5	22,2	12,6	15,5	13,5	16,2	13,2	13,2	14,0	10,6	12,6	14,8	13,7	13,04	15,5	1,66	2,94	2,94
16:1 ω 7	3,0	4,1	2,6	4,3	1,7	2,3	2,4	3,8	4,1	3,5	4,0	4,0	4,4	2,5	2,2	2,9	3,5	0,81	0,84	0,84
18:0	20,9	19,9	25,2	19,3	24,2	22,3	23,0	22,3	25,0	24,3	23,6	21,6	25,0	25,0	25,5	23,84	22,1	1,42	2,65	2,65
18:1 ω 9	14,4	13,6	12,4	14,2	11,4	14,0	13,1	13,2	17,3	13,7	15,2	15	11,7	10,8	13,64	13,5	1,96	1,22	1,22	1,22
18:2 ω 6	6,8	9,9	7,2	9,1	7,1	8,6	9,7	7,5	7,0	7,1	8,3	9,1	6,8	8,2	7,56	8,5	1,0	0,9	0,9	0,9
20:3 ω 6	2,1	2,7	1,6	1,6	1,4	2,0	1,8	2,3	1,5	2,3	2,7	2,1	1,3	1,5	1,77	2,07	0,45	0,39	0,39	0,39
20:3 ω 9	2,7	3,6	2,4	2,4	2,2	2,4	2,9	3,0	1,8	4,4	4,4	2,5	2,6	1,9	3,1	2,34	3,07	0,37	0,67	0,67
20:4 ω 6	27,4	21,2	24,1	18,9	28,6	18,8	22,5	20,2	20,8	21,0	22,0	21,7	24,3	23,7	24,24	20,78	2,64	1,58	1,58	1,58
20:5 ω 6	0,7	1,2	0,8	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,4	2,6	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5	0,57	0,94	0,14	0,71	0,71
22:5 ω 6					0,2	4,2	1,2	1,0	0,5	0,7	1,1	0,4	0,6	0,9	0,72	1,44	0,38	1,4	1,4	1,4
22:6 ω 3	9,8	8,4	7,5	6,9	9,8	8,3	8,5	9,2	7,0	7,5	8,7	8,7	10,3	8,9	8,80	8,27	1,15	0,75	0,75	0,75

Tabelle 3. Mittelwerte (Milli-Einheiten) der Aktivitäten verschiedener Enzyme^{a)} aus unbeschallten (A) und beschallten (B) Mitochondrien und aus Cytosolfractionen

EM = E-Mangeltiere, K = Kontrollen, () = Anzahl der Messungen

Enzyme	EM			Kontrollen		
	\bar{x}	(n)	s	\bar{x}	(n)	s
Cytochromoxydase EC 1.9.3.1						
A	68,3	(8)	29,5	56,4	(6)	21,0
B	158,6	(8)	39,9	118,9	(6)	20,2
Succinat Cyt. c Red. EC 1.3.99.1						
A	25,4	(8)	6,8	18,9	(7)	8,6
B	35,0	(8)	10,0	27,0	(7)	4,3
NADH-Cyt. c Red. EC 1.6.2.1						
A	82,5	(6)	31,3	86,7	(3)	15,3
B	65,9	(6)	17,8	79,1	(3)	15,1
β -Hydroxyacyl-CoA-Deh.						
B	10,9	(3)	5,4	6,2	(7)	3,2
Gluconat-6-P-Dehydrog. EC 1.1.1.44						
Cytosolfraction	30,1	(9)	7,7	34,4	(7)	12,7
Isocitratdehydrogenase 1.1.1.42						
Cytosolfraction	84,5	(9)	13,5	88,3	(7)	10,6
Malatdehydrogenase 1.1.1.40						
Cytosolfraction	8,1	(5)	4,4	4,2	(5)	9,9
b) Lactatdehydrogenase 1.1.1.28						
Cytosolfraction	2,3	(8)	0,6	2,5	(6)	0,8

^{a)} Nomenklatur und Numerierung entsprechen den *Recommendation of the International Union of Biochemistry*. Elsevier Publ. Co. Amsterdam 1965.

^{b)} Angaben in Einheiten.

Tabelle 4. Enzymatischer Einbau von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Na-Acetat in die Fettsäuren der Cytosol-Lipide in % ihrer Total-Aktivität

(Die Menge der Cytosolfraction entspricht 120 mg Biureteiweiss)

Dauer Wochen	EM-Tiere				Kontrollen			
	46	50	52	54	46	50	52	54
<i>Säuren</i>								
12:0	0,5	0,7	0,9	2,4	0,7	1,2	2,3	7,8
14:0	4,6	1,4	2,9	3,3	5,5	5,8	5,9	6,1
16:0	36,4	34,3	43,0	38,5	32,6	33,6	36,2	27,6
16:1 ω 7	4,5	4,2	5,0	5,0	4,4	5,2	6,7	4,9
18:0	18,0	12,2	24,8	19,0	16,2	15,9	16,6	14,8
18:1 ω 9	12,1	11,2	8,9	9,0	14,0	12,1	10,8	11,4
18:2 ω 6	1,0	2,6	1,0	1,8	1,1	1,9	2,2	1,2
20:0	5,7		4,0	5,0	6,3	5,4	5,8	4,1
20:1 \rightarrow 20:2	4,5	16,3	4,9	4,5	4,2	6,5	5,6	12,8
20:3 \rightarrow 20:5	4,7		5,6	5,0	4,2	6,8	7,8	8,9

tungen befinden sich in guter Übereinstimmung mit der wiederholt festgestellten Zunahme des Arachidonsäuregehaltes der Leberphosphatide bei E-Mangel. Infolge Fehlens des als Antioxydans wirkenden Tocopherols tritt ein vermehrter Zerfall der Polyenfettsäuren ein, deren Regeneration durch vermehrte Synthese über den Weg ein tretender Enzyminduktion kompensiert wird. Dass eine solche bei E-Mangel auf treten kann, haben wir kürzlich für das Enzymsystem der oxydativen Demethylierung bewiesen [16].

Tabelle 5. Fettsäuresynthese in Leberzellfraktionen von E-Mangel-Ratten und Kontrollen aus CoA-Derivaten bezogen auf 1 mg Biureteiweiss

Dauer Wochen	20	46	49	50	51	52	54
<i>Mitochondrien</i>							
Kontrolltiere cpm		425		151		90	
E-Mangeltiere cpm		607		209		88	
Relative Aktivität ^{a)}		142		138		97,7	
<i>Mikrosomen</i>							
Kontrolltiere cpm		4 780	3 423	2 628	2 449	1 564	1 913
E-Mangeltiere cpm		1 400	1 328	1 007	1 783	1 733	1 238
Relative Aktivität ^{a)}		29,3	38,8	38,3	72,8	110	64,7
<i>Cytosol</i>							
Kontrolltiere cpm	98 048	104 368	99 534	116 335	194 005	103 601	110 493
E-Mangeltiere cpm	69 017	104 639	73 260	76 094	125 344	95 951	106 783
Relative Aktivität ^{a)}	70,4	100	73,6	65,4	64,6	92,6	96,6

a) Bezogen auf die Aktivität der Kontrolltiere = 100.

Tabelle 6. Kettenverlängerung von ¹⁴C- γ -Linolensäure durch Lebermikrosomen-Enzyme
Radio-gas-chromatographisch bestimmtes Aktivitäts-Verhältnis von γ -Linolensäure zu Eicosatriensäure (18:3 ω 6/20:3 ω 6)

Tier	K	EM	K	EM	K	EM
Wochen	52	52	51	51	50	50
18:3 ω 6/20:3 ω 6	6,6	3,1	4,0	3,3	4,0	3,7

Tabelle 7. Dehydrierung von Linolsäure zu γ -Linolensäure durch Lebermikrosomen-Enzyme
Radio-gas-chromatographisch bestimmtes Aktivitätsverhältnis von Linolsäure zu γ -Linolensäure (18:2 ω 6/18:3 ω 6)

Tier	K	EM	K	EM	K	EM	K	EM
Wochen	52	52	51	51	50	50	46	46
18:2 ω 6/18:3 ω 6	4,6	2,7	3,6	2,3	5,9	4,6	7,9	2,6

Wir danken Fräulein H. Reinert und Herrn M. Tottoli für ihre geschickte experimentelle Hilfe.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. Bernhard, S. Leisinger & W. Pedersen, *Helv.* 46, 1767 (1963); K. Bernhard, F. Lindlar, P. Schwed, J.-P. Vuilleumier & H. Wagner, *Z. Ernährungswissensch.* 4, 42 (1963).
 [2] L. A. Witting, J. J. Thevon & M. K. Horwitt, *Lipids* 2, 97 (1967); L. A. Witting & M. K. Horwitt, *Lipids* 2, 89 (1967).

- [3] J. G. Bieri & R. K. H. Poukka, *Int. J. Vit. Res.* **40**, 344 (1970); J. G. Bieri & R. K. H. Poukka, *J. Nutrition* **100**, 557 (1970).
- [4] R. Markstein, *Diss. phil.* II, Basel, 1971.
- [5] U. Schwietzer, R. Tamm, H. Weiser & O. Wiss, *Helv.* **49**, 2297 (1967).
- [6] L. Friedman, W. Weiss, F. Wherry & O. L. Kline, *J. Nutrition* **65**, 143 (1958).
- [7] J. P. Williams & P. A. Merrilees, *Lipids* **5**, 367 (1970).
- [8] B. Borgström, *Acta Physiol. Scand.* **25**, 101 (1952).
- [9] H. v. Bergmeyer, *Z. Analyt. Chem.* **212**, 77 (1965).
- [10] W. Lamprecht & H. Rehberg, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **301**, 46 (1955).
- [11] E. J. Simon & D. Shemin, *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 2520 (1953).
- [12] E. G. Trams & R. O. Brady, *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 2972 (1960).
- [13] K. Bernhard, L. Abisch & H. Wagner, *Helv.* **41**, 850 (1958).
- [14] E. Jantzen & H. Andreas, *Chem. Ber.* **94**, 628 (1961).
- [15] O. S. Privett & E. C. Nickell, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **40**, 189 (1963).
- [16] K. Bernhard, R. Markstein & W. Zimmerli, *Helv.* **54**, 2568 (1971).

55. Intramolekulare Diels-Alder-Additionen in 6-Methyl-6-(penta-2,4-dienyl)-cyclohexa-2,4-dien-1-on-Systemen

Vorläufige Mitteilung¹⁾

von H. Greuter^{a)}, Gy. Fráter^{b)} und H. Schmid^{a)}

a) Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich

b) F. Hoffmann-La Roche & Co., Basel

Herrn Prof. Dr. A. Wettstein zum 65. Geburtstag gewidmet

(17. XI. 71)

Summary. Thermal rearrangement of *trans*-penta-2,4-dienyl mesityl ether (*trans*-**1**) gave, besides *trans*,*cis*-**2** and *trans*,*trans*-**2**, the homotwistanone derivative 1,3,10-trimethyl-tricyclo[5.4.0.0^{3,8}]undeca-5,10-dien-2-one (**3**) as well as its isomer 1,3,9-trimethyl-tricyclo[5.3.1.0^{3,8}]undeca-5,9-dien-2-one (**4**). The tricyclic ketones **3** and **4** were shown to be products of intramolecular *Diels-Alder* addition in the intermediate 2,4,6-trimethyl-6-(penta-2,4-dienyl)-cyclohexa-2,4-dien-1-one (**5**). Preparation of 2,6-methyl-6-(3-methyl-penta-2,4-dienyl)-cyclohexa-2,4-dien-1-one (**6**) and subsequent heating of **6** in benzene gave the homotwistanone derivative 1,3,6-trimethyl-tricyclo[5.4.0.0^{3,8}]undeca-5,10-dien-2-one (**7**) together with its isomer 1,3,6-trimethyl-tricyclo[5.3.1.0^{3,8}]undeca-5,9-dien-2-one (**8**) in good yield.

Im Zusammenhang mit Arbeiten über thermische [5s, 5s]-sigmatropische Umlagerungen von (Penta-2,4-dienyl)-phenyl-äthern [1] [2] wurde auch das thermische Verhalten von *trans*-(Penta-2,4-dienyl)-mesityl-äther (*trans*-**1**) untersucht. Erhitzen dieses Äthers in der hundertfachen Menge (g/ml) Nonan (Sdp. 145–148°) während 29 Std. unter Rückfluss gab 22,5% Mesityl²⁾, 24,4% *trans*-**1**, *cis*-3-(Penta-1,3-dienyl)-mesityl-äther (*trans*,*cis*-**2**)³⁾, 2,6% *trans*-**1**, *trans*-3-(Penta-1,3-dienyl)-mesityl-äther

¹⁾ Eine ausführliche Mitteilung soll in dieser Zeitschrift erscheinen.

²⁾ Die Identifizierung der Produkte geschah durch Vergleich mit authentischen Verbindungen bzw. anhand der IR-, NMR- und Massen-Spektren.

³⁾ Entstanden durch [1, 5s]-H-Verschiebung im *cis*-Penta-2,4-dienyl-äther, der durch reversible [3s, 3s]- bzw. [5s, 5s]-Umlagerung aus *trans*-**1** gebildet worden ist (vgl. [2]).