

Free and bound phospholipids in unfertilized and fertilized eggs of *Arbacia lixula*. μg phospholipid-P/100 μg total P

Exper. No.	Unfertilized eggs		Fertilized eggs					
	free	bound	3 min		6 min		15 min	
	free	bound	free	bound	free	bound	free	bound
1	4.3 \pm 0.26	17.2 \pm 0.68	1.9 \pm 0.12	17.4 \pm 0.52	2.9 \pm 0.09	16.2 \pm 0.09	3.0 \pm 0.31	16.7 \pm 0.77
2	9.2 \pm 0.51	13.7 \pm 0.30	5.9 \pm 0.28	14.6 \pm 0.11	7.28 \pm 0.80	15.4 \pm 0.57	9.26 \pm 0.32	13.7 \pm 0.61
3	6.1 \pm 0.16	17.9 \pm 0.16	5.0 \pm 0.19	17.9 \pm 0.12	5.2 \pm 0.11	17.8 \pm 0.20	5.8 \pm 0.22	17.7 \pm 0.06

decrease of the amount of the free phospholipids during the very first minutes after fertilization, followed by a recovery up to the amount present in the unfertilized eggs. No evidence, however, has been found of a binding of phospholipids except, perhaps, in the Experiment No 2, in which it looks as if some of the free phospholipids had been extracted with the bound fraction. This point needs further checks. Nor is any evidence at present available as to the process by which the decrease and the recovery of the amount of the free phospholipids occurs.

Experimental. Eggs of *Arbacia lixula*, unfertilized and at various time intervals after fertilization, were freed of their jelly-coat by treatment with acid sea-water (at pH of about 5), quickly collected by centrifugation and lyophilized. 3 batches were examined in which nearly 100% of the eggs were fertilized and showed normal development. About 15 analyses were carried out on each batch and the results were treated statistically. 10 mg samples of the dry material were extracted 3 times with ice-cold ether and the residue then re-extracted 3 times with alcohol-ether (3:1) at 70°C. The former fraction contains the easily extractable (i.e. so-called free) phospholipids while the latter contains the less easily extractable (i.e. so-called bound) phospholipids. The extracts were brought to dryness and the residue re-dissolved in chloroform. After evaporation of the latter, the residue was analyzed for P (by Allen's procedure). Total P in the dry eggs was taken as a reference.

The present investigations were supported by Grants from the Consiglio Nazionale delle Ricerche and Centro Sperimentale della Pesca to the Institute of Comparative Anatomy.

C. M. B. RICOTTA

Institute of Comparative Anatomy, the University, and Experimental Center of Fishery, Palermo, December 6, 1955.

Riassunto

Nelle uova di *Arbacia lixula* si osserva una diminuzione di fosfolipidi liberi nei primi minuti dopo la fecondazione, seguita poi da un aumento che riporta, nel corso di 15 min circa, la quantità di fosfolipidi liberi al valore delle uova vergini. Non pare che vi sia alcuna variazione quantitativa nella frazione dei fosfolipidi legati.

Relations entre oxydation phosphorylante et structure des mitochondries hépatiques de rats carencés en vitamines B₁ et B₂ *

Au cours de notre étude expérimentale des avitaminoses du groupe B, nous avons constaté une diminu-

* Communication présentée au 3^e Congrès International de Biochimie, Bruxelles 1955.

tion de la resynthèse oxydative de l'ATP¹, de la respiration et du quotient d'oxydation phosphorylante dans les homogénats hépatiques de rats carencés en vitamine B₁. L'activité ATP-ase des homogénats d'animaux normaux et carencés étant sensiblement égale, les troubles enregistrés semblent dus à un épuisement de la synthèse - et non à une augmentation de la scission - des phosphates labiles. Nous avons retenu également le fait suivant: Alors que les animaux en état de carence extrême peuvent être sauvés par l'injection intra-péritonéale de vitamine B₁ et présenter quelques jours plus tard un

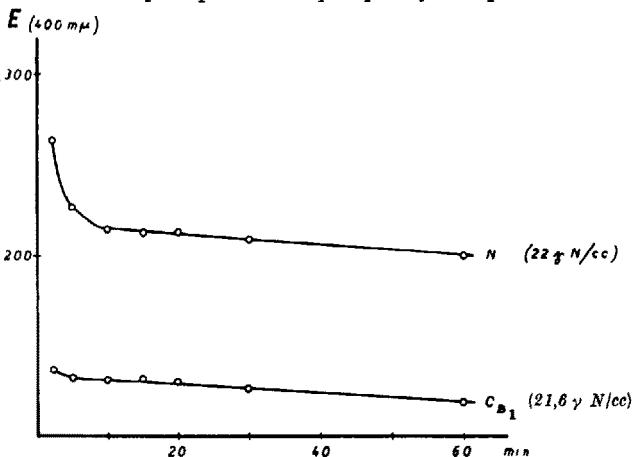


Fig. 1. Chute de densité optique des suspensions de mitochondries en fonction du temps. E = extinction photométrique (400 m μ) des suspensions diluées 200 fois en solution de mannitol isotonique. N = rat normal. CB₁ = rat carencé. Entre parenthèses: valeurs d'azote protidique des suspensions.

pouvoir de phosphorylation tout à fait normal, l'addition d'aneurine ou de cocarboxylase *in vitro* est totalement inopérante. Cette constatation montre que l'avitaminose B₁ provoque au niveau des mitochondries plus qu'un trouble de la décarboxylation des métabolites du cycle de Krebs. La latence nécessaire à la restauration *in vivo* peut faire penser notamment à une atteinte de la structure des mitochondries. Il est actuellement bien établi que l'intégrité de l'infra-structure cellulaire est indispensable à une activité optimale des processus de phosphorylation². Aussi, avons-nous cherché à saisir un équivalent morphologique des altérations rapportées plus haut. A cet effet, nous avons comparé la densité optique des suspensions de mitochondries hépatiques provenant de rats normaux et carencés. La méthode employée, décrite par RAAFLAUB³, se base sur les constatations suivantes: les mitochondries en voie d'altération sont

¹ J. FREI, *Helv. physiol. Acta* (sous presse 1955).

² J. W. HARMAN et M. FEIGELSON, *Exp. Cell Res.* 3, 509 (1952). - J. W. HARMAN et A. KITTYAKARA, *Exp. Cell Res.* 8, 411 (1955).

³ J. RAAFLAUB, *Helv. physiol. Acta* 11, 142 (1953).

Comparaison entre l'activité phosphorylante des homogénats hépatiques et la densité optique des suspensions de mitochondries de rats normaux et carencés en aneurine et en riboflavine.

	Avitaminose B ₁			Avitaminose B ₂		
	Témoins	Carencés	P	Témoins	Carencés	P
Phosphorylation (% P ³² devenu phosphate labile après 20 min d'incubation en milieu succinique)	35,9 ± 3,2	16,3 ± 3,7 (54,5%)	<0,001	34,6 ± 2,7	28,5 ± 4,3 (17,6%)	NS
Densité optique des suspensions de mitochondries (diluées 200 ×) rapportée à l'N-protidique des suspensions (E/γ N: ml × 10 ³ à 400 mμ)	13,7 ± 1,0	8,0 ± 0,7 (41,6%)	<0,01	10,9 ± 1,7	10,3 ± 1,6 (5,5%)	NS
N-protidique des suspensions de mitochondries diluées 200 × (γ N/ml)	22,6 ± 1,3	20,1 ± 0,7 (11,1%)	NS	25,1 ± 4,6	18,9 ± 5,4 (24,8%)	< 0,05

Les valeurs ± donnent l'écart-type des moyennes. Pour les avitaminoses B₁ et B₂ les collectifs de témoins et de carencés comprennent respectivement 10 et 8 animaux d'expérience. P = degré d'assurance statistique dans le test-T. NS = différence non significative. Les chiffres entre parenthèses indiquent les diminutions moyennes en % par rapport au lot normal.

subjectes à un gonflement caractérisé par une chute de leur densité optique, qui, mesurée, au photomètre, peut servir de critère de leur transformation morphologique. Un parallélisme étroit entre «gonflement» et facultés oxydatives a pu être mis en évidence dans différentes conditions physico-chimiques favorisant *in vitro* l'altération ou la régénération des mitochondries en suspensions⁴.

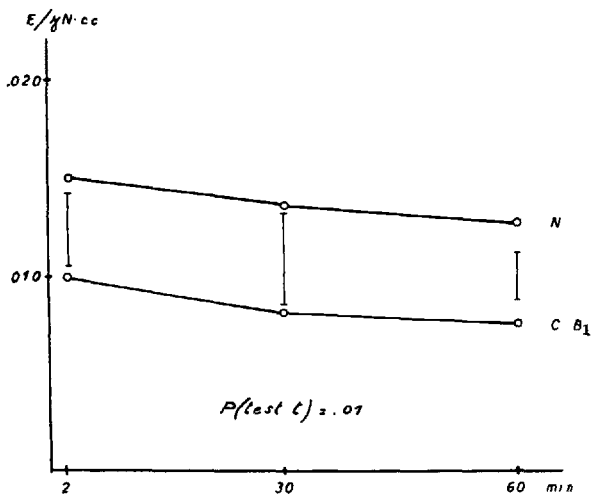


Fig. 2. Analyse statistique des différences de densité optique. Les extinctions sont rapportées à la teneur des suspensions en azote protidique (E/γ N par ml). Les segments verticaux correspondent à la différence nécessaire et suffisante à une assurance statistique de 99% (P 0,01 dans le test t). Moyennes de 10 rats carencés (C_{B1}) et de 10 rats témoins (N).

Nos résultats montrent que cette corrélation se retrouve dans les mitochondries altérées *in vivo* par la carence en vitamine B₁. Les courbes de la Figure 1 représentent la chute de densité optique de deux suspensions préparées simultanément à partir d'un animal carencé et d'un animal témoin. La différence reste constante en fonction du temps. Elle n'est pas due à une simple diminution du nombre des mitochondries, puisqu'elle reste significative lorsque les valeurs d'extinction sont rapportées à l'azote protidique des suspensions (Fig. 2).

Dans la carence en riboflavine, les troubles de la phosphorylation sont beaucoup moins accentués que dans la carence en aneurine⁵ (Tableau). Pour vérifier le parallélisme entre lésions fonctionnelles et structurales, nous devons trouver dans l'ariboflavine des suspensions de mitochondries de densité optique peu diminuée. Le tableau montre, en effet, que la différence des extinctions rapportées à l'azote protidique est négligeable. En revanche, l'azote des suspensions provenant d'animaux carencés est diminuée de manière significative par rapport au groupe témoin, contrairement à ce que nous avons trouvé dans l'avitaminose B₁. Cette diminution pourrait expliquer la légère réduction (17%) de la resynthèse oxydative de l'ATP dans l'avitaminose B₂. Comme la pauvreté des suspensions en N représente, dans le cadre de ces expériences, le seul point caractéristique de l'ariboflavine, il est permis de penser que cette sorte de carence influence davantage le nombre que la fonction et la structure des mitochondries.

Dans le cas de l'avitaminose B₁, il est plausible d'admettre que les premières altérations soient d'ordre fonctionnel. BRENNER et RAAFLAUB⁶ attribuent notamment le gonflement des mitochondries à leur appauvrissement progressif en ATP. Les troubles de la phosphorylation enregistrés dans nos expériences impliquent une diminution de la resynthèse de l'ATP et pourraient être ainsi la cause des lésions structurales constatées.

Nous adressons nos remerciements au Fonds National Suisse de la Recherche scientifique qui a subventionné ce travail et à la Maison Hoffmann-La Roche, Bâle, qui nous a fourni les animaux normaux et carencés.

J. FREI et H. RYSER

Clinique Médicale Universitaire, Lausanne, 12 décembre 1955.

Summary

In the experimental B₁-avitaminosis a decrease of oxidative ATP-resynthesis in liver homogenates, and a significant diminution of the optical density of mitochondrial suspension were simultaneously observed: in other words a probable parallelism in the alteration of function and structure. In ariboflavine neither oxi-

⁵ J. FREI, en préparation.

⁶ O. BRENNER-HOLZACH und J. RAAFLAUB, Helv. physiol. Acta 12, 242 (1954).

⁴ J. RAAFLAUB, Helv. physiol. Acta 11, 142 (1943). – R. E. BEYER, L. ERNSTER, H. LÖW et T. BEYER, Exp. Cell Res. 8, 586 (1955).

dative phosphorylation nor optical density seems to be notably impaired, but the nitrogen content of mitochondrial suspensions decreases significantly. Therefore this second type of avitaminosis would appear to affect the mitochondrial population rather than energetic metabolism or structural integrity of the protoplasmic granules.

Is Alkali-Resistant Haemoglobin in Cooley's Anaemia Different from Foetal Haemoglobin?

Recently PEROSA and BINI¹ reported in this Journal some differences between the alkali-resistant haemoglobin fraction in Cooley's anaemia and the foetal haemoglobin from cord blood. These differences were found in (1) the rates of denaturation of the carbon monoxide derivatives both by alkali and by acids; (2) the rate of denaturation of the corresponding oxyhaemoglobins by acids, while (3) there were also indications that paper electrophoresis gives evidence of a different behaviour for both haemoglobins.

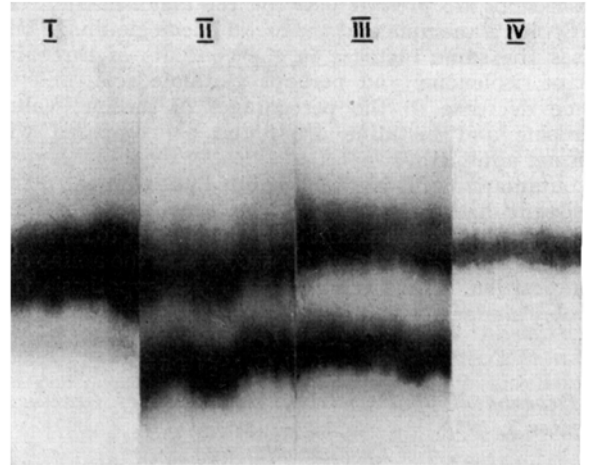
However, a number of other properties have been reported in the literature, in which this haemoglobin and the foetal haemoglobin behave identically: the ultraviolet spectral absorption², immunological behaviour³, the denaturation rate of the oxyhaemoglobins by alkali⁴ and the N-terminal residues⁵. Therefore it is not yet clear whether the abnormal haemoglobin in Cooley's anaemia is identical with the foetal haemoglobin from cord blood or not.

Some other techniques, by which differences between the normal adult Hb and the foetal Hb have been found, are: salting-out experiments⁶, chromatographic analyses⁷ and the estimation of the amino acid composition⁸. By applying these 3 methods to the alkali-resistant haemoglobin in Cooley's anaemia, it may be possible to contribute towards the resolution of the problem.

For the investigations reported here, a blood sample was used of a little boy suffering from Cooley's anaemia. Besides the normal adult Hb and the alkali-resistant fraction, the blood also contained a certain amount of the abnormal haemoglobin E⁹. As it was possible to separate the alkali-resistant fraction completely from the other 2 Hb's by means of a chromatographic procedure, the presence of the abnormal haemoglobin E did not influence the results obtained.

The salting-out experiments were carried out as described by DERRIEN¹⁰ using a 3.5 molar phosphate buffer solution, pH 6.5. 2 haemoglobin samples were investigated: the haemoglobin of the patient (41% alkali-resistant fraction, measured by the method of BRINKMAN and JONXIS¹¹ and by a chromatographic technique⁷) and an artificial mixture, containing 41% of Hb-F and

59% of Hb-A. No differences were found. In both cases a fraction was present which was salted out at a somewhat higher phosphate concentration than the normal adult haemoglobin and the abnormal Hb-E that has the same solubility as Hb-A⁸.



The chromatographic behaviour of the alkali-resistant haemoglobin in Cooley's anaemia.

- I. Cooley trait (father of the patient studied; alkali resistant fraction 9%);
- II. Cooley trait after addition of Hb-F.
- III. Cooley's anaemia.
- IV. Normal adult Hb.

Also the chromatographic behaviour of the alkali-resistant haemoglobin, present in the blood of the patient studied was identical with that of foetal haemoglobin. The Figure shows some results obtained with the "cuvette method" using the cation exchanger Amberlite IRC-50 (XE-64)⁷. It will be noted that Hb-A and Hb-E have practically the same rate of displacement.

The amino acid composition of a 48 h hydrolysate of the alkali-resistant fraction in Cooley's anaemia.

Amino Acid	Alkali-resistant fraction	Hb-F	Hb-A
Aspartic	10.9	10.25	10.5
Threonine	6.3	6.5	5.5
Serine	5.5	5.85	4.45
Glutamic	7.85	7.65	7.25
Proline	4.05	4.2	4.95
Glycine	4.3	4.6	4.55
Alanine	9.65	9.7	9.95
Cystine/2	0.95	0.95	1.00
Valine	9.35	9.5	10.9
Isoleucine	1.75	1.85	0.35
Leucine	15.1	15.3	15.15
Tyrosine	3.15	3.2	3.85
Phenylalanine	7.9	7.85	7.85
Lysine	9.7	9.85	9.9
Histidine	7.25	7.4	8.3
Arginine	3.3	3.35	3.35

The values are given as g/100 g protein.

By complete elution on an Amberlite IRC-50 (XE-64) column, it was possible to isolate the alkali-resistant

¹ L. PEROSA and L. BINI, *Exper.* 10, 469 (1954).
² A. M. LIGUORI, *Nature* 167, 950 (1951).
³ A. I. CHERNOFF, *Blood* 8, 413 (1953).
⁴ F. VECCHIO, *Pediatria* 54, 545 (1946).
⁵ G. SCHAPIRA and J. C. DREYFUS, *C. r. Soc. biol. Paris* 148, 895 (1954).
⁶ J. ROCHE and Y. DERRIEN, *Sang* 24, 97 (1953).
⁷ H. K. PRINS and T. H. J. HUISMAN, *Nature* 175, 903 (1955).
⁸ P. C. VAN DER SCHAAF and T. H. J. HUISMAN, *Biochim. biophys. Acta* 17, 81 (1955).
⁹ J. H. P. JONXIS, T. H. J. HUISMAN, H. K. PRINS and P. C. VAN DER SCHAAF (to be published).
¹⁰ Y. DERRIEN, *Biochim. biophys. Acta* 8, 631 (1952).
¹¹ R. BRINKMAN and J. H. P. JONXIS, *J. Physiol.* 85, 117 (1935); 88, 162 (1936).