

Experimental. Eggs of *Paracentrotus lividus* were washed several times with sea water, made up to an exact volume and then divided into two equal portions, one of which was fertilized and collected 5 min after the beginning of the elevation of the fertilization membrane while the other one was processed unfertilized. The jelly coat was removed by the usual treatment with acidified (pH 5.0) sea water, the eggs packed by a quick centrifugation and then suspended and homogenized in cold 10% TCA. Samples were withdrawn for the determination of total nitrogen and carbohydrates and then the homogenate was centrifuged at 12000 g in the cold for 10 min. The supernatant was collected and samples taken for the determination of total carbohydrates. The TCA-soluble fraction was then shaken 3 to 5 times with an equal volume of ether in a glass-stoppered cylinder. After the last shaking, the ether was withdrawn and the water phase with the fluffy layer at its surface was decanted to a centrifuge tube and left overnight in the refrigerator. Upon centrifugation, the fluffy layer collected at the surface: using a thin stemmed pipette which reached the bottom of the tube and by carefully regulating the suction of a water pump connected to it, the water phase could be withdrawn almost entirely. The fluff was then suspended in 50% alcohol and sedimented by centrifugation; this washing was repeated five times. The precipitate was then washed three more times with 95% alcohol, twice with 3:1 alcohol-ether, ether-alcohol (3:1), ether and dried.

For the preparation of the alcohol-precipitable components, two volumes of cold 95% ethanol were slowly added, with continual stirring, to one volume of the TCA soluble fraction in a centrifuge tube. After standing overnight in the refrigerator, the precipitate was centrifuged, the supernatant pipetted off, the precipitate resuspended in a small amount of 50% alcohol and transferred quantitatively to a smaller tube in which it was washed and dried as described above.

For the chromatographic analysis of carbohydrates, the material was hydrolyzed in 0.5 N H₂SO₄ at 110°C for about 12 h and the hydrolysate neutralized, desalted (by treatment with IR-B 4 and IR-120 Amberlites) dried, redissolved in a very small amount of water and chromatographed on Whatman No. 1 paper. The chromatogram was irrigated for 24 h with butanol-acetic acid-water (3:1:1) and developed with anilin-phthalate (PARTRIDGE³). For the quantitative determination of carbohydrates, a known amount of material was hydrolyzed as indicated above and the hydrolysate was neutralized, brought to volume and aliquotes were used for the analysis according to PARK and JOHNSON⁴ using glucose as a reference. The anthrone method (HEWITT⁵) has been used in some cases. The chromatographic analysis of the amino acids was done on material hydrolysed with 6 N HCl and desalted by passage through a Dowex-50 column in the acid cycle. The two dimensional paper chromatography was run according to REDFIELD⁶. Glucosamine was determined according to GARDELL⁷. Nitrogen was determined by Nesslerization after combustion and phosphorus according to ALLEN⁸.

This investigation has been supported by a Grant of the Rockefeller Foundation. The technical assistance of Mr. A. O. OLIVA is gratefully acknowledged.

A. MONROY and M. L. VITTORELLI

Istituto di Anatomia comparata, Università di Palermo, August 3, 1959.

Riassunto

Sbattendo con etere la frazione solubile in acido tricloroacetico di uova vergini di *Paracentrotus lividus* si forma un precipitato all'interfacie tra etere e fase acquosa. L'analisi di questo precipitato ha dimostrato che si tratta di una glicoproteina. Il precipitato non si forma da estratti di uova fecondate.

Étude immunologique des Haptoglobines humaines individuelles

Les Haptoglobines individuelles¹ se manifestent dans le sérum humain sous forme de trois phenotypes principaux (Hp 1-1, Hp 2-2 et Hp 2-1) correspondant à deux types I et II d'haptoglobine.

Ceux-ci ont pu être identifiés à une forme monomère ou dimère de l'haptoglobine² et présentent à l'ultra-centrifugation des constantes de sédimentation différentes³. L'étude immunologique de ces constituants (BEARN et FRANKLIN³) par les courbes de précipitation spécifique entre antisérums anti-haptoglobine de chaque type et ces haptoglobines a conclu à une identité antigénique de ces constituants.

Cette note a pour objet de rapporter les résultats de nos propres expériences concernant l'étude antigénique des types d'haptoglobine.

Protocole expérimental

L'étude du comportement immunoélectrophorétique de chaque type de sérum a été réalisée suivant les modalités décrites par GRABAR et WILLIAMS⁴, soit avec un sérum de cheval anti-sérum humain total, soit avec des sérums de lapins préalablement immunisés par des sérums humains de différents types (anti-Hp 1-1, anti-Hp 2-1, anti-Hp 2-2).

La coloration spécifique du complexe haptoglobine-hémoglobine dans les lignes de précipitation était réalisée par la technique que nous avons décrite avec URIEL⁵.

Enfin, les expériences de double diffusion en gélose ont été réalisées, soit par la méthode d'OUCHTERLONY⁶ soit par la variante de KAMINSKI⁷.

¹ O. SMITHIES, Biochem. J. 61, 629 (1955).

² J. MORETTI, G. BOUSSIER et M. F. JAYLE, Bull. Soc. Chim. biol., Paris 39, 593 (1957).

³ A. G. BEARN et E. C. FRANKLIN, J. exper. Med. 109, 55 (1959).

⁴ P. GRABAR et C. H. WILLIAMS, Biochim. biophys. Acta 10, 193 (1953).

⁵ J. M. FINE, J. URIEL et J. FAURE, Bull. Soc. Chim. biol., Paris 38, 649 (1956).

⁶ O. OUCHTERLONY, Acta path. microbiol. scand. 26, 507 (1949).

⁷ M. KAMINSKI, Biochim. biophys. Acta 13, 216 (1954).

⁸ S. M. PARTRIDGE, Nature 164, 443 (1949).

⁴ J. T. PARK and M. J. JOHNSON, J. biol. Chem. 181, 149 (1949).

⁵ B. R. HEWITT, Nature 182, 246 (1958).

⁶ R. R. REDFIELD, Biochem. Biophys. Acta 10, 344 (1953).

⁷ S. GARDELL, Acta chem. scand. 7, 201 (1953).

⁸ R. J. L. ALLEN, Biochem. J. 34, 858 (1940).

Résultats

A. — *Electrophorèse en gélose et Immunoélectrophorèse.* Après électrophorèse en gélose, les complexes de type Hp 1-1 ont une mobilité plus élevée que ceux de type 2-2, la position des complexes de type Hp 2-1 étant intermédiaire entre les deux précédents. Les lignes de précipitation spécifiques entre les anticorps anti-haptoglobine et ces complexes traduisent encore plus nettement ces différences de mobilité électrophorétique par l'emplacement de centre de l'arc de courbure de la ligne de précipitation colorée à la benzidine (Fig. 1). Deux lignes donnent la réaction à la benzidine dans le sérum humain quelque

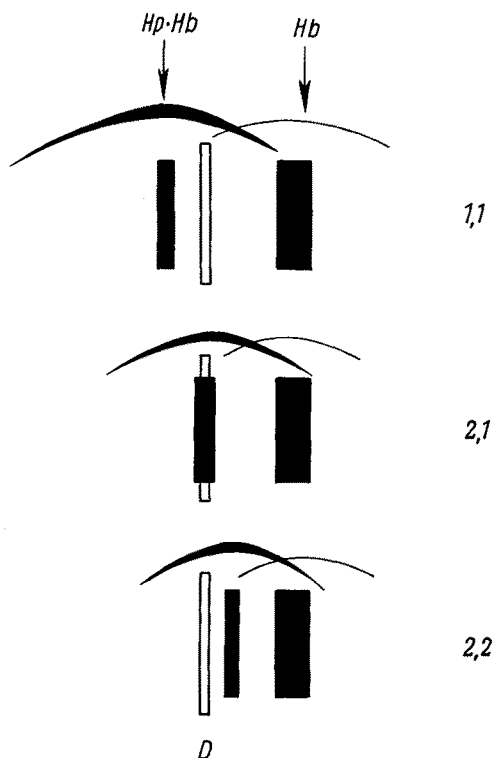
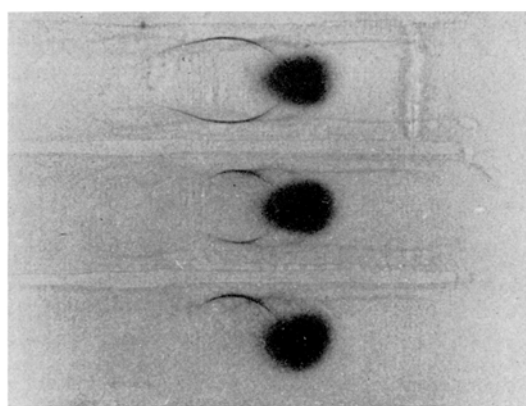


Fig. 1. — Immunoélectrophorèse de sérums humains de type Hp 1-1, Hp 2-1 et Hp 2-2 additionnés d'hémoglobine. Les lignes de précipitation des complexes Hb/Hp sont révélés par la réaction à la benzidine

soit le groupe d'haptoglobine. Une ligne, de mobilité α_2 , correspond au complexe Hp/Hb, la deuxième de mobilité β_1 correspond à l'hémoglobine résiduelle entraînée dans la précipitation d'une β_1 globuline.

Des expériences réalisées sur 10 échantillons de sang de cordon montrent, non pas une absence totale d'haptoglobine, mais une ligne α_2 donnant une réaction faible à la benzidine, et ayant une position analogue aux haptoglobines adultes de type Hp 1-1.

Des expériences analogues ont été réalisées, non plus en tampon véronal de pH 8,2 mais en tampon phosphaté de pH 7. Les sérums de type Hp 2-1 et Hp 2-2 montrent une ligne de précipitation à double courbure deux fois plus étendue que la ligne correspondant aux sérums de type Hp 1-1.

B. — *Double diffusion en gélose.* Comme on peut le voir sur la Figure 2a il est possible de dénombrer, en plus de la ligne correspondant à l'hémoglobine résiduelle, deux lignes de précipitation colorables par le réactif à la benzidine dans les sérums de types Hp 2-2 et Hp 2-1 et une seule ligne de précipitation dans les sérums de type Hp 1-1. La ligne unique de précipitation observée chez les sujets du type Hp 1-1 donne une réaction d'identité complète avec une des lignes des sujets de types Hp 2-1 et Hp 2-2 (Fig. 2b).

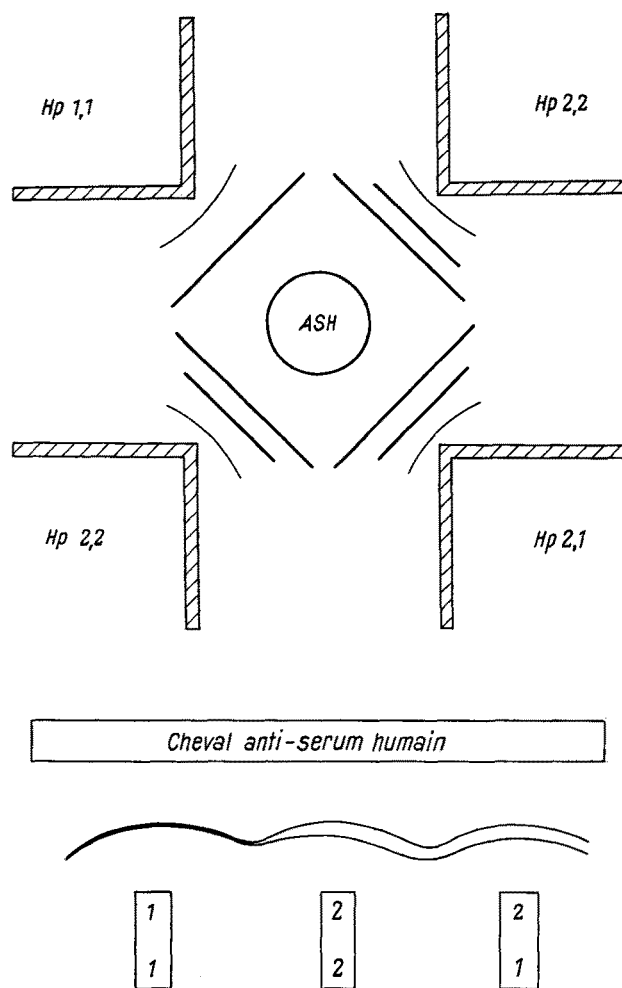


Fig. 2. — Double diffusion en gélose de sérums de différents types d'haptoglobine et d'un sérum de cheval anti-sérum humain (Institut Pasteur): a) Méthode d'OUCHTERLONY; b) méthode de KAMINSKY montrant l'identité antigénique des trois types d'haptoglobine

Les sangs de cordon ne montrent qu'une seule ligne de précipitation colorable à la benzidine. Cette ligne montre une identité antigénique complète dans les 10 échantillons de sangs de cordon examinés. Par rapport aux lignes de

précipitation données par les groupes de type 1-1, 2-1 et 2-2, cette ligne se situe entre la ligne commune entre les Hp 1 et les Hp 2, et la ligne supplémentaire observée chez les sujets de type 2-1 et 2-2.

C. – *Expériences d'épuisements d'anti-sérums de lapins anti-sérums de différents type d'haptoglobine.* Des sérums de lapins anti-sérum humain de type Hp 1-1 épuisés par du sérum humain de type Hp 2-2 ne donnent plus de réaction de précipitation avec aucun sérum des trois types. Inversement, des sérums de lapins anti-sérum humain de type Hp 2-2 épuisés par du sérum humain de type Hp 1-1 ne réagissent plus en double diffusion contre les sérums des trois types.

Conclusion

Comme BEARN et FRANKLIN, nous pensons à la suite de ces expériences que les trois types d'haptoglobine ont une communauté antigénique indiscutable comme en font foi la ligne de précipitation commune aux trois types de sérum et les expériences d'épuisement des anti-sérums.

On peut cependant soulever l'hypothèse devant l'existence d'une deuxième ligne de précipitation dans les sérums de type 2-1 ou 2-2, soit d'une différence antigénique partielle entre les complexes de l'haptoglobine dimère et ceux de l'haptoglobine monomère, soit de l'extériorisation de phénomène de diffusion distincts entre deux parties du même complexe (dépolymérisation partielle de l'haptoglobine dimère).

J. M. FINE et A. BATTISTINI

Centre National de Transfusion Sanguine, Paris et
Clinique Pédiatrique de Parme (Italie), le 20 juillet 1959.

Summary

Immunological studies of the haptoglobin-hemoglobin complexes of different serum groups show different mobility by immuno-electrophoretic technique, and the antigenic relationship of these haptoglobins.

Zur Wirkungsweise einiger Katalase-Inhibitoren

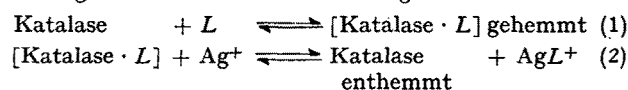
Eine grosse Anzahl von Verbindungen der verschiedenartigsten Struktur hemmen die Katalase. Drei anorganische Partikel zeichnen sich durch besonders hohe Wirksamkeit aus: CN^- , N_3^- und SH^- ¹. Von diesen Verbindungen ist zugleich bekannt, dass sie im Tierversuch gegen harte Strahlung einen gewissen Schutz auszuüben vermögen². Aus verschiedenen Arbeiten³ geht hervor, dass im Mechanismus der chemischen Strahlenschutzwirkung die Katalase eine bedeutende Rolle spielt. Es war daher von Interesse, zu untersuchen, auf welchem Wege die Katalasehemmung durch CN^- , N_3^- und SH^- zustande kommt.

Die drei erwähnten Partikel können sich als starke einzählige Komplexligenanden betätigen. Von Komplexen des Ferrihämoglobins, das der Katalase strukturell nahesteht, mit diesen Liganden L sind Stabilitätskonstanten bekannt⁴ (Tab.).

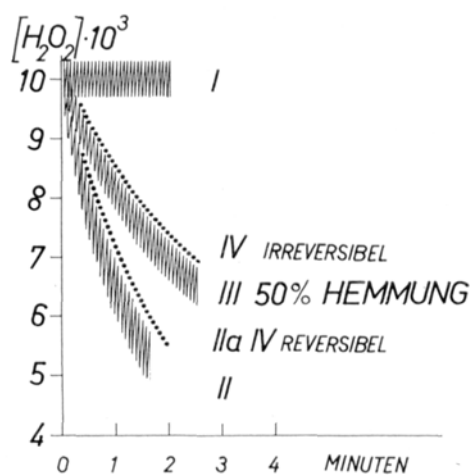
Tabc

L	$\log K$	5%ige Katalasehemmung ¹
CN^-	7,2	$6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
N_3^-	5,1	$4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
SH^-	5,3	$8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
CNS^-	2,5	$> 10^{-1} \text{ M}$
F^-	2,2	$> 10^{-1} \text{ M}$
Imidazol	2,6	$> 10^{-1} \text{ M}$

Ein Vergleich der Stabilitätskonstanten mit der Ligandenkonzentration, die eine 50%ige Hemmung hervorzurufen vermag, legt den Gedanken nahe, dass die Hemmreaktion primär durch Besetzung einer Koordinationsstelle am zentralen Fe der Katalase zustande kommt. Es wird dadurch die Ausbildung des aktiven «compound I»⁵ verhindert. Wenn dies der Fall ist, dann muss – mindestens für kurze Zeit – ein reversibles Komplexbildungsgleichgewicht (1) existieren, und durch Zugabe geeigneter Partikel, zum Beispiel Ag^+ , müsste sich dieses Gleichgewicht wieder nach links verschieben lassen (2), was notwendigerweise zu einer Enthemmung der Katalase führt.



Um diesen Sachverhalt für die Liganden CN^- , N_3^- und SH^- zu überprüfen, bedienten wir uns für die Aktivitätsbestimmungen der polarographischen Methode, die zur Messung der anfänglichen hohen « α -Aktivität» der Katalase⁶ besonders geeignet ist. H_2O_2 zeigt bei $-1,1$ Volt eine Reduktionsstufe, die quantitativ gut auswertbar ist. Wir bestimmten die Stufenhöhe bei $-2,0$ Volt. Bei konstant gehaltener Spannung liefert das Polarogramm direkt eine kontinuierliche H_2O_2 -Konzentrations-Zeitkurve (Abb.).



Polarographische Verfolgung
der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (Hg-Tropfelektrode- Ag/AgCl), $E = -2,0 \text{ V}$ konstant

¹ E. BOYLAND und E. GALICO, Brit. J. Cancer 6, 160 (1952).
² Z. M. BACQ und H. HERVÉ, Brit. J. Radiol. 24, 617 (1951). – N. W. LUTSCHNIK und J. A. TIMOFEEJEW-RESSOWSKAJA, Ber. Akad. Wiss. UdSSR 116, 407 (1957). – G. GUIDOTTI und F. PASSALACQUA, Farmaca, Ediz. sci. 10, 214 (1955). – H. P. RILEY, Genetics 42, 593 (1957). – Z. M. BACQ, H. MUGARD und A. HERVÉ, Acta radiol. 38, 489 (1952).

³ O. WARBURG, W. SCHRÖDER, H. GEWITZ und W. VÖLKER, Naturwissenschaften 45, 192 (1958). – R. N. FEINSTEIN, G. J. COTTER und M. M. HAMPTON, Amer. J. Physiol. 177, 156 (1954).

⁴ C. D. CORYELL, Chemical Specificity in Biological Interactions (New York 1954), p. 108.

⁵ D. KEILIN und D. NICHOLS, Biochim. biophys. Acta 29, 302 (1958).

⁶ P. GEORGE, Biochem. J. 44, 197 (1949).