

order to arrive at values in absolute amounts per 100 g wet weight, the fatty acid methyl esters were subjected to alkaline saponification, the fatty acids, after acidification, recovered in hexane, washed¹⁸ and titrated according to ALBRINK¹⁹. The hexane phase was free of sialic acid, amino nitrogen, phosphorus and short chain fatty acids (C2-C8). The values reported are based on the assumption that the total acidity was present in the form of monocarboxylic fatty acids.

Results. All of the unsaturated fatty acids of the chain lengths and degree of unsaturation reported by KLENK et al.⁵, except the C22:3 and C24:4, could be demonstrated on the chromatograms (Table II). Our analyses, however, were concerned only with white matter, while KLENK used total brain, and the two missing acids may be components of the cortex.

The amount of saturated fatty acids in the 2 pathologic brains was less than in the controls (Table II), with the lower concentration of stearic acid accounting mainly for the difference. In the multiple sclerosis plaques, the lignoceric acid was considerably less than in the controls, probably due to loss of sphingomyelin. A substantial amount of C18:3 was found only in the brain with Hodgkin's disease. The hydroxy fatty acids were tentatively identified by comparing their retention time with authentic samples²⁰. The pathologic brains contained greater quantities of C22- α -hydroxy acid and of an unidentified acid listed as C > 24:0 or C25:0. This unidentified acid would be C25:0 when plotted according to MIWA¹³. It fell between the C24:0 and C26:0 acids on James' plot. Another C > 24:0 acid could not be accommodated on either plot; its peak disappeared after hydrogenation, and it is listed therefore as 'unsaturated'. The problem of these and 2 other unknown long chain acids (ECL 26.6 and 27.7) is under investigation.

The C20:4 and its precursor, C18:2²¹ in the multiple sclerosis brain were within the range of the controls; in the case of Hodgkin's disease they were higher. These acids are abundantly present in the cellular organelles¹⁷ which may not be involved in the biochemical alterations leading to demyelination.

The carboxyl esters in the controls varied from 13.2 to 14.9 mEq; they were only 7.4 mEq in the multiple sclerosis plaques. Aldehydes of chain lengths reported by DEBUCH²² in brain plasmalogens could be identified by gas liquid chromatography.

Discussion. These studies, like others of its kind^{2,6,23}, by virtue of their complexity, were limited to a small number of cases, and a statistical analysis is therefore not feasible. Comparison of the multiple sclerosis and Hodg-

kin's brain with the controls does, however, reveal differences that seem to go beyond the range of variation between individuals. One is the lower concentration of saturated fatty acids in the 2 pathologic brains. This could not be ascribed to differences in water content (Table I) or status of nutrition. The lower content of lignoceric acid and aldehydes in the multiple sclerosis brains corresponds to the loss of sphingomyelin and plasmalogens in these lesions^{2,4}. The brain with Hodgkin's disease showed higher concentrations of C18:3, 20:2 and 20:4. This may be due to glial cell proliferation in the grossly normal tissue or infiltration by lymphocytes. It is noteworthy that the levels of C22:5 and C22:6 acids, which according to KLENK²⁴ originate from C18:3, are also higher than in the controls.

Fatty acid values in this study represent those of total lipids and differ, therefore, somewhat from those given by BAKER⁶ which included only the acylesters of the phospholipids. The absence of hydroxy fatty acids and acids with odd number of carbon in his data may be due to the same factor.

Zusammenfassung. Histologisch unveränderte weisse Substanz eines menschlichen Gehirns mit multipler Sklerose hatte weniger gesättigte Fettsäuren als die 4 Kontrollen. Die multiple Sklerose-Herde hatten fast alle C24:0 verloren, enthielten aber mehr C22- α -Hydroxysäuren. Die weisse Substanz eines Falles von Lymphogranulom zeigte niedrigere Werte für die gesättigten, aber höhere für Polyensäuren.

B. GERSTL, R. B. HAYMAN,
M. G. TAVASTSTJERNA, and J. K. SMITH

Oakland Veterans Administration Hospital, Oakland (Calif. U.S.A.), November 28, 1961.

¹⁸ V. P. DOLE, *J. clin. Invest.* **35**, 150 (1956).

¹⁹ M. J. ALBRINK, *J. Lip. Res.* **1**, 53 (1959).

²⁰ Gratitude is expressed to Dr. J. F. MEAD, Department of Biophysics and Nuclear Medicine, University of California School of Medicine at Los Angeles, for making available purified acids.

²¹ J. F. MEAD, G. STEINBERG, and D. R. HOWTON, *J. biol. Chem.* **205**, 683 (1953).

²² H. DEBUCH, *Physiol. Chem.* **304**, 109 (1956).

²³ P. V. JOHNSTON and F. A. KUMMEROW, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **104**, 2011 (1960).

²⁴ E. KLENK, *Exper.* **17**, 199 (1961).

²⁵ Department of Pathology, School of Medicine, University of California, San Francisco (Calif. USA).

Lichthemmung der Oxydation von Krebszyklus-Säuren durch Blumenkohl-Mitochondrien

Die pflanzlichen Atmungssysteme unterliegen, wie viele Beobachtungen zeigen, einem Einfluss des sichtbaren Lichts. Die Lichtatmung mancher nichtassimilierender Gewebe weicht vorübergehend stark von der Dunkelatmung ab¹. Unsere spärlichen Kenntnisse über den Einfluss von eingestrahltem Licht auf einzelne Atmungsprozesse lassen eine Erklärung dieser Phänomene noch nicht zu². Wir haben uns daher zum Ziel gesetzt, das Problem der Lichtatmung unter anderem auf der Stufe der isolierten Mitochondrien zu studieren.

Mitochondrien wurden aus frischem Blumenkohl nach dem Verfahren von LATIES³ gewonnen. Auch in der Aus-

führung der manometrischen Messungen von Aktivitäten der isolierten Partikel folgten wir zumeist den Angaben dieses Autors. Als Lichtquellen dienten Philips-HPLampen (125 Watt), welche unter der Plexiglaswanne der Warburgapparatur montiert waren. Sie folgten den Schüttelbewegungen der Manometer, so dass eine konstante Bestrahlung der Kölben (ca. 13 mWatt/cm²) gewährleistet war. Gleichzeitig mit der Sauerstoffaufnahme von substratversorgten Mitochondrien im Licht und im Dunkel, wurden die endogenen Aktivitäten unter beiden Bedin-

¹ PH. MATILE, *Beih. Z. Schweiz. Forstver.* **30**, 199 (1960).

² G. ROSENSTOCK und A. RIED, *Handbuch der Pflanzenphysiologie* **12/2**, 259 (1960).

³ G. G. LATIES, *Plant Physiol.* **28**, 557 (1953).

gungen sowie des Substrats allein (Photooxydationen) gemessen, und die Werte als Korrekturglieder verwendet. Verdunkelte Kölben waren lichtdicht in schwarze Plasticfolie eingehüllt. Die Cytochromoxydaseaktivität wurde nach COPPERSTEIN⁴ spektroskopisch bestimmt. Die Belichtungsbedingungen waren dieselben wie im Warburgversuch. Versuchstemperatur: 25°C.

Die Oxydation der Bernsteinsäure durch Blumenkohlmitochondrien wird durch das eingestrahlte Licht stark

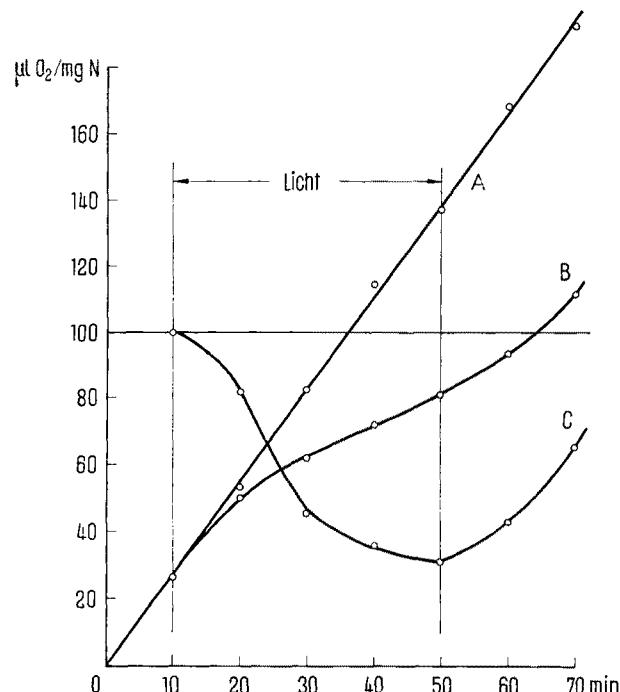


Fig. 1. Succinoxidaseaktivität von Blumenkohl-Mitochondrien im Dauerdunkel (A) und im Licht bzw. in der nachfolgenden Dunkelphase (B). C: Lichtaktivität in Prozent der Dunkelaktivität. Inhalt der Warburgkölbchen: 0,5 m Saccharose, 0,01 m Phosphatpuffer pH 7,2, 0,02 m Na-Succinat, Mitochondrien (0,63 mg Protein-N), total 3 ml.

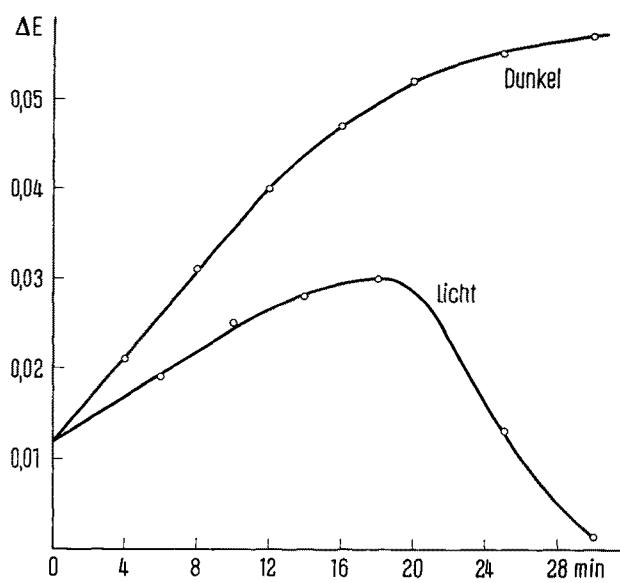


Fig. 2. Cytochrom-c-Oxydase-Aktivität im Dunkeln und im Licht. Küvetteninhalt: Cytochrom c 1,0 mg, 0,03 m Phosphatpuffer pH 7,4, 0,01 ml Mitochondrien (80 μg Protein-N), total 3 ml. Extinktionsmessung bei 550 $\text{m}\mu$.

beeinträchtigt. Mit fortschreitender Belichtungszeit verstärkt sich diese Hemmung, scheint aber einem Endwert entgegenzustreben (Figur 1). Bei Wiederverdunkelung der Kölben stellt man eine deutliche Rückläufigkeit der Hemmung fest, ein Hinweis dafür, dass das Licht keine irreversible Schädigung der Mitochondrien verursacht. Äpfel- bzw. α -Ketoglutaric acid werden ebenfalls im Licht bedeutend langsamer oxydiert.

Diese Befunde deuten auf eine lichtbedingte Störung innerhalb des Enzymkomplexes hin, der die Übertragung des Wasserstoffs von den Substraten *via* Dehydrogenasen und Atmungsketten auf den Sauerstoff besorgt. Die Messung der Cytochromoxydaseaktivität im Licht führte zu einem ersten Anhaltspunkt hierüber. Wie aus Figur 2 ersichtlich ist, verläuft die Oxydation im Licht zunächst wesentlich langsamer als im Dunkeln, um dann nach ca. 18 min einer vollständigen Reduktion des Pigments zu weichen. Über die Herkunft der hierzu nötigen Elektronen fehlen vorläufig noch jegliche Anhaltspunkte. Eine Verdunkelung nach vollzogener Reduktion brachte ein erneutes Einsetzen der Oxydation.

Es erhebt sich nun natürlich die Frage, ob diese, an isolierten Partikeln erzielten Ergebnisse auch für die intakte Zelle Gültigkeit haben. Mit grosser Wahrscheinlichkeit ist dies der Fall, denn es hat sich gezeigt, dass der aerobe Umsatz von Glucose durch intakte Hefezellen ebenfalls einem hemmenden Lichteinfluss unterliegt⁵. Überdies konnten wir im Spektroskop beobachten, dass die Cytochrome der Hefe im lichtunterbundenen Zustand der Atmung in reduzierter Form vorliegen. Der beschriebene Lichteinfluss auf den oxydativen Umsatz von Krebszyklussäuren durch Blumenkohl-Mitochondrien darf somit als Hinweis auf eine Hemmung des Krebszyklussystems *in vivo* gewertet werden. Als Orte der Lichteinwirkung sind, nach unseren Ergebnissen mit Blumenkohl-Mitochondrien und Hefe, die Redoxpigmente der Atmungsketten, die Cytochrome, anzusprechen. Es scheint, dass auch die Mitochondriencytochrome, wie die entsprechenden Pigmente der Chloroplasten und Chromatophoren⁶⁻¹⁰, durch das Licht in ihrem Redoxzustand beeinflusst werden. Dass sich hieraus eine Veränderung der Fließgleichgewichte zunächst in der Atmungskette, dann aber auch im Krebszyklus ergeben muss, ist leicht einzusehen.

Die endogene Atmung der Blütenknospen des Blumenkohls wird durch Licht nicht beeinflusst. Wenn der Krebszyklus tatsächlich lichtempfindlich ist, dann muss im Licht ein anderes Atmungssystem aktiviert werden, so dass ein unveränderter Gesamtumsatz resultiert. Der Abklärung dieses Problems sind unsere laufenden Untersuchungen gewidmet¹¹.

Summary. The oxidation of succinic-, malic-, and α -ketoglutaric acid by cauliflower mitochondria is slowed down by strong visible light. The cytochrome-c-oxidase activity is also inhibited by light and the pigment is completely reduced in time. It is concluded that the Krebscycle is inhibited by light.

PH. MATILE

Institut für allgemeine Botanik, Eidg. Technische Hochschule, Zürich (Schweiz), 9. Oktober 1961.

⁴ S. J. COPPERSTEIN and A. LAZAROW, J. biol. Chem. 189, 665 (1951).

⁵ PH. MATILE, Planta, im Druck.

⁶ B. CHANCE and R. SAGER, Plant Physiol. 32, 548 (1957).

⁷ L. M. N. DUYSENS, Nature 173, 692 (1954).

⁸ H. LUNDEGÅRDH, Physiol. Plantarum 7, 375 (1954).

⁹ R. H. NIEMAN and B. VENNESLAND, Plant Physiol. 34, 255 (1959).

¹⁰ L. P. VERNON, Biochem. biophys. Acta 32, 589 (1959).

¹¹ Die Arbeit wurde durch ein Stipendium des Schweiz. Nationalfonds ermöglicht.