

were killed and the livers homogenized with 4 volumes of 0.08 M phosphate buffer pH 6.3. Aliquots of homogenate were incubated in a shaker at 37°C for 2 h under nitrogen with 10 mg L-serine and 10 mg D,L-homocysteine; the final volume was 11 ml. The reaction was stopped by autoclaving, and methionine formed in the systems was assayed microbiologically with *Leuconostoc mesenteroides*, P. 60 ATCC 8042.

The data of the Table show that in the systems with the liver homogenate of biotin-deficient rats, and in those of folic acid-deficient rats, the quantity of methionine formed is significantly lower than in control rats ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively). In the systems with the liver homogenate of biotin and folic acid-deficient rats, the quantity of methionine formed is lower, not only when compared with control rats ($P < 0.001$) but also with folic acid-deficient rats ($P < 0.05$).

It appears from these results that methionine is synthesized in the liver of biotin-deficient, and biotin and

folic acid-deficient rats less effectively from homocysteine and serine than in control rats and folic acid-deficient rats respectively.

This finding is in agreement with the observations of MARCHETTI and TESTONI⁵, who reported that the methylation processes in biotin deficiency are markedly impaired. In fact *N*-methylnicotinamide excretion in urine is lower in biotin-deficient rats than in the animals fed on vitamin.

Besides, the methionine synthesis from homocysteine and betaine in the liver homogenates of biotin-deficient rats is lower than that in rats receiving biotin. Therefore, from the results it may be deduced that biotin is able to influence, through its action on the storage of folate co-enzymes, the synthesis of methionine and probably the process of methylation generally.

Riassunto. La sintesi di metionina da serina e omocisteina risulta notevolmente diminuita nel fegato di ratti carenti di acido folico e biotina, non solo rispetto ad animali controllo, ma anche a quelli carenti solo di acido folico. La biotina pertanto sembra influenzare l'utilizzazione del β -carbonio della serina per la sintesi del metile della metionina probabilmente attraverso il suo effetto sulla disponibilità dei coenzimi dell'acido folico nel fegato.

L. LANDI, P. PASQUALI,
and M. MARCHETTI

Istituto di Chimica Biologica, Università di Bologna (Italy), December 16, 1965.

⁵ M. MARCHETTI and S. TESTONI, *J. Nutr.* 84, 249 (1964).

Effect of biotin and folic acid on the synthesis of methionine by rat liver homogenate. Values give the mean result $\pm$ S.E. of mean of 6 determinations

Group	Animals in experiment	μ g Methionine formed/g fresh tissue
1	Control	198 $\pm$ 11.64
2	Biotin deficient	162 $\pm$ 12.09
3	Folic acid deficient	139 $\pm$ 7.39
4	Biotin and folic acid deficient	116 $\pm$ 5.00

Die Zahl der Mitochondrien im Aortenendothel bei experimenteller Stenose

Bei vergleichenden Untersuchungen des Endothels der grossen Blutgefässe vom Kalb und anderen Tierspezies konnten HACKENSELLNER et al. statistisch signifikante Unterschiede im Mitochondrienbesatz des Endothels der verschiedenen Standorte des Kreislaufes feststellen¹⁻⁴. Sie führten diese auf die Stoffwechselbedingungen des Endothels zurück, wobei Beziehungen zwischen dem Sauerstoffgehalt des Blutes und dem Druck in den einzelnen Kreislaufabschnitten wahrscheinlich gemacht werden konnten.

Wir stellten uns die Aufgabe, die Zahl der Mitochondrien des Endothels der Aorta von Kaninchen bei veränderten Kreislaufbedingungen zu untersuchen. Wir bedienten uns dazu eines Modells der Aortenstenose, das durch Einengung des Durchmessers der Aorta abdominalis um etwa die Hälfte erzielt wurde (nähere Einzelheiten bei GÖTZE und MEYER⁵). Wir erreichten dabei deutliche Druckdifferenzen in den Gefässabschnitten ober- und unterhalb der Drosselungsstelle; ausserdem Zeichen einer Linksherzüberlastung. Von Gruppen zu je fünf operierten Kaninchen wurden nach 1, 3, 7, 14 und 21 Tagen die Mitochondrien des Endothels der Aorta ober- und unterhalb der Stenose ausgewertet; weiterhin gelangte eine gleich starke Kontrollgruppe zur Untersuchung.

Die Darstellung der Mitochondrien wurde nach einer von MEYER und HACKENSELLNER angegebenen Methode durchgeführt⁶. Die Auszählung erfolgte als Blindversuch am Projektionsbild der Schwarz-Weiss-Negative. Dem Untersucher waren weder die Herkunft der abgebildeten Mitochondrien noch die Versuchsdauer bekannt. Die gewonnenen Werte stellen ein relatives Äquivalent dar; es entspricht etwa einem optischen Flächenschnitt durch die Endothelzelle. Die Ergebnisse unserer Versuche sind aus der Tabelle zu entnehmen.

Es ist daraus folgendes ersichtlich: (1) Die Kontrolltiere weisen in jedem Falle unterhalb der angenommenen Stenose mehr Mitochondrien pro Zelle auf als oberhalb. (2) Unter dem Einfluss der Einengung kommt es oberhalb zu einer Erhöhung der Werte und unterhalb zu einer Erniedrigung. Diese Zu- bzw. Abnahme ist schon einen Tag

¹ H. A. HACKENSELLNER und R. MEYER, *Acta med. biol. germ.* 9, 428 (1962).

² H. HUYOFF und H. A. HACKENSELLNER, *Naturwissenschaften* 52, 163 (1965).

³ R. MEYER und H. A. HACKENSELLNER, *Naturwissenschaften*, im Druck.

⁴ R. MEYER und H. A. HACKENSELLNER, *Arch. exp. VetMed.*, im Druck.

⁵ J. GÖTZE und R. MEYER, in Vorbereitung.

⁶ R. MEYER und H. A. HACKENSELLNER, *Mikroskopie* 18, 349 (1963).

nach der Drosselung zu beobachten und bleibt fast unverändert während der gesamten Versuchsdauer. Die festgestellten Differenzen zwischen Versuch und Kontrolle sind in beiden Gefäßabschnitten nicht sehr gross. (3) Die Kontrollgruppe und die Versuchsgruppen weisen ein umgekehrtes Verhältnis zwischen den Mitochondrienwerten ober- und unterhalb der angenommenen bzw. bestehenden Stenose auf. Während bei den Kontrollen bei jedem Tier unterhalb grössere Zahlen als oberhalb vorhanden sind, ist bei 20 von 25 operierten Kaninchen oberhalb ein grösserer Wert als unterhalb zu beobachten. Das bedeutet

nach dem sogenannten «Vorzeichentest» sowohl bei der Kontrolle als auch bei den Versuchen Signifikanz der Differenzen.

Die erzielten Ergebnisse lassen wesentliche Hinweise eines physiologischen Anpassungsvorganges nicht erkennen, obgleich ein solcher nicht abzulehnen ist. Wir nehmen aber an, dass die geringen Verschiebungen der Mitochondrienwerte den veränderten Druckverhältnissen zuerkannt werden müssen. Es kommt durch die Erhöhung bzw. Erniedrigung des Druckes zu einer Änderung der Zellform und -grösse, die in einer Vergrösserung bzw. Verkleinerung der Kernflächen ihr Maximum erreicht⁵. Dadurch bedingt werden in einer optischen Ebene mehr bzw. weniger Mitochondrien abgebildet.

Versuchsdauer in Tagen	oberhalb der Stenose			unterhalb der Stenose		
	K	M	M/K	K	M	M/K
Kontrolle	538	10296	19,1	542	11491	21,2
1	635	13972	22,0	582	10670	18,3
3	630	13936	22,1	551	10237	18,6
7	623	13770	22,1	499	9328	18,7
14	586	12602	21,5	463	8759	18,9
21	655	14194	21,7	566	10223	18,1

K = erfasste «Kernbereiche» (= Zellen); M = Zahl der zu K gehörenden Mitochondrien; M/K = Mitochondrienbesatz pro Zelle.

Summary. After inducing experimentally a stenosis of the aorta abdominalis in rabbits, the mitochondria of the aortic endothelium were fluorescence-optically demonstrated, and quantitatively investigated above as well as below the stenosis. The changes in the number of the mitochondria are proportional to the values of blood pressure, and are discussed in relation to changes in the shape of the endothelial cells.

R. MEYER und J. GÖTZE

Pathologisches Institut der Humboldt-Universität, 105 Berlin (DDR), 30. Dezember 1965.

ATP-Dependent Ca^{++} -Extrusion from Human Red Cells

From the work of DUNHAM and GLYNN¹ it is known that low Ca^{++} -concentrations (0.1 mM) inhibit the Na-K-activated membrane ATPase of human red cells which is held responsible for the active Na-K-transport across the membrane. For obvious reasons this Ca^{++} -sensitive site must be located on the internal surface of the membrane, and therefore the intracellular Ca^{++} -concentration in intact cells must be considerably lower than the Ca^{++} -concentration in the plasma or else the Na-K-pump would be incapacitated. The possibility was considered that this low intracellular Ca^{++} -concentration might be maintained by an active transport of Ca-ions out of the cell. DUNHAM and GLYNN¹ had further pointed out that the membrane of red cells contains an ATPase which is strongly activated by Ca^{++} . This ATPase might be connected to active outward transport of Ca^{++} in the same way as the sarcotubular ATPase in muscle is related to the Ca-accumulation into these structures^{2,3}.

The question was approached making use of the reversal of hemolysis devised by SZÉKELY, MANAY and STRAUB⁴ in the version of WHITTAM⁵. Human red cells from freshly drawn defibrinated blood or from 1-2 days old citrated blood were washed 5 times at room temperature with a fourfold volume of glucose-free solution containing 130 $\mu\text{M}/\text{ml}$ NaCl and 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$ tris-chloride at pH 7.2. Subsequently 8 ml of cells were hemolysed in 42 ml of water containing 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ tris-buffer, 1 μM CaCl_2 and various amounts of Mg-ATPase (0.5–4 $\mu\text{M}/\text{ml}$). After 130 sec isotonicity was restored by adding 2.15 ml of a 3M KCl-solution. After 5 min standing at room temperature, the ghosts were washed with about 100 ml of an

ice-cold solution containing 130 $\mu\text{M}/\text{ml}$ NaCl, 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$ tris-buffer, 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ KCl and 1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ CaCl_2 and incubated in the same solution at 37°C. The medium to ghost volume ratio was 1.85 on an average. Ca was determined in the medium directly with a complexometric titration in 0.2 ml samples⁶ and in packed ghosts without previous washing after deproteinization with approximately the twofold volume of 10% trichloroacetic acid (TAA) and neutralization with 1-N NaOH. Magnesium, hemoglobin, inorganic phosphate and mersalyl in concentrations higher than those present in the samples did not interfere with the titration, nor did the TAA-precipitation remove any Ca from samples in recovery experiments.

The hemolysing procedure resulted in ghosts containing Mg-ATPase, Ca^{++} and, as major osmotic constituent, KCl. It caused the internal Ca-concentration ($\mu\text{M}/\text{ml}$ ghosts) to be higher than 1 $\mu\text{M}/\text{ml}$. This effect is probably due both to the shrinking of the ghosts upon reversal of hemolysis and some binding of Ca. The initial Ca-content of ATP-treated and control ghosts was not different however. Figure 1 shows that at 37°C Ca emerged from ATP-loaded ghosts at a high rate and that the release proceeded to a higher external concentration than with control ghosts treated in the same way except for the addition of Mg-ATPase. The Table and Figure 2 present evidence

¹ E. T. DUNHAM and I. M. GLYNN, *J. Physiol.* 156, 274 (1961).

² W. HASSELBACH and M. MAKINOSE, *Biochem. Z.* 333, 518 (1961).

³ S. EBASHI and F. LIPMANN, *J. Cell Biol.* 14, 389 (1962).

⁴ M. SZÉKELY, S. MANAY, and F. B. STRAUB, *Acta physiol. hung.* 3, 571 (1952).

⁵ R. WHITTAM, *Biochem. J.* 84, 110 (1962).

⁶ J. RAAFLAUB, personal communication.