

ORIGINALS

LA FORMACIÓ D'UN HOME DE CIÈNCIA *

JORDI FOLCH-PI

Professor de Neuroquímica, Harvard Medical School
Boston, Mass., USA

i

Director de Recerques Biològiques, McLean Hospital
Belmont, Mass., USA

Considero un gran honor de poder adreçar-vos la paraula. Estic molt agraït a la Junta de l'Acadèmia per la invitació que em permet de reunir-me aquí amb vosaltres. Vaig sortir de Barcelona el dia 17 de novembre de 1935, i des d'aquella data les meves activitats professionals s'han desenvolupat en llengües estrangeres. Avui puc de nou expressar-me en català. Ho faig amb emoció, i amb una satisfacció personal que podeu comprendre. Repeteixo el meu deure d'agraïment a tots els qui, entre vosaltres, han fet possible aquesta ocasió.

Per a començar, deixeu-me explicar breument les raons per les quals he escollit el tema de la meva conferència. La meva producció científica ha estat en el camp de la bioquímica dels lípids, o substàncies grasses, i en el camp de la química del sistema nerviós, el que ara se'n diu la neuroquímica. Tant un camp com l'altre poden constituir l'objecte de discussions interessants i àdhuc importants. Això, però, pressuposa un públic especialitzat, no el públic mèdic, culte però no especialitzat, al qual tinc el plaer d'adreçar-me. Hauria potser estat possible de fer una conferència de generalització, però això és sempre perillós, ja que sovint en resulta una conferència massat elemental i, per tant, avorrida. Partint d'aquesta base, m'he estimat més parlar-vos del que es podria descriure com a una autobiografia científica, és a dir, una autobiografia succinta, per a definir un marc de referència en el temps i en les locacions geogràfiques, seguida d'una narració resumida de l'evolució dels meus interessos i treball científic. En el curs de la narració, serà possible d'identificar els punts sobresortints en la meva carrera científica, i tractar-los amb un cert detall. La intenció de la meva conferència és de recórrer, amb vosaltres, l'evolució del pensament

* Conferència donada a la Sessió Inaugural de l'Acadèmia de Ciències mèdiques de Catalunya i de Balears el dia 6 de novembre de 1975.

d'un home de ciència, en el curs de la seva vida, amb l'esperança que això li doni l'oportunitat per a illustrar la formulació lenta, i l'eclosió final, de les idees que formen la base de descobertes originals. D'acord amb aquest tema, el títol de la meva conferència hauria d'ésser «La formació d'un home de ciència», no el títol «L'evolució d'un home de ciència» que s'ha anunciat per error del qual em declaro responsable, i que implica que el conferenciant ha estat sempre un home de ciència, cosa, ensems, incorrecta i arrogant.

Entrant en el tema, vaig néixer a Barcelona el 25 de maig de 1911; vaig seguir l'educació normal de l'època, amb l'excepció important de quatre anys passats a les Escoles Franceses, a les quals dec una disciplina de treball que m'ha ajudat molt en el curs de la meva carrera professional. Després de cursar el Batxillerat de Ciències seguint el pla de 1927, que fou el primer d'una sèrie de plans, vaig cursar Medicina a la Facultat del carrer de Casanova. Com molts contemporanis, vaig passar una part dels meus anys d'estudiant de medicina com a intern en un dels serveis de l'Hospital Clínic, el de Cirurgia del doctor Antoni Trias, al mateix temps que era ajudant a l'Institut de Fisiologia, motivat en aquesta segona selecció per un gran interès per la fisiologia. En graduar-me com a llicenciat el febrer de 1933, vaig continuar el meu treball a l'Institut, on vaig assolir el títol d'alumne intern pensionat, i vaig anar deixant el treball clínic, excepte per uns curts períodes en què vaig fer de metge de poble, com a substitut del meu germà Albert. A mesura que intensificava el meu treball a l'Institut, em decantava més i més cap a la bioquímica i es feia més i més clar que, si volia seguir una carrera seriosa en aquesta disciplina, hauria d'anar a l'estranger per un període de preparació. Era això el curs normal de tots els joves espanyols que volien seguir una carrera científica. Quant a on s'anava per ampliació d'estudis, havíem deixat ja d'anar a França, i s'escollia ja sigui Alemanya, ja el món anglès (Anglaterra o els Estats Units). No em calgué triar entre aquestes tres possibilitats perquè en Francesc Duran i Reynals va aconseguir-me una invitació per a anar a l'Institut Rockefeller de Nova York, institució d'un prestigi internacional en ple creixement en la qual Duran i Reynals treballava aleshores en situació permanent. Amb beques de la Generalitat i de l'Ajuntament em fou possible d'anar a Nova York i aprofitar-me de la invitació que havia arreglat Durant i Reynals. A l'Institut Rockefeller, hi vaig passar nou anys, des del 1935 fins al 1944, quan vaig anar a la Universitat de Harvard, a l'escola de Medicina, on encara estic.

Fóra difícil d'identificar els factors que em portaren gradualment a un treball de recerca bioquímica. La meva família era més aviat de lletres. El meu pare, advocat sense exercir, home de negocis i poeta (va guanyar la Viola d'Or l'any 1916 o 17). La meva mare, amb títol de mestra, però sense ocasió d'exercir. Tenia ella en una gran estima els homes de ciència, i potser això fou la causa que els meus models

fossin sobretot científics. La figura gegantina de Pasteur, presentada a mi en els termes èpics de les celebracions del primer centenari del seu naixement, em causà una impressió profunda. La meua educació espanyola fou el batxillerat i la Facultat de Medicina d'aquell temps. Les diferents assignatures s'ensenyaven per mitjà de conferències, amb poc treball pràctic. El nivell de cada curs depenia molt del professor que el donava, i anava d'excel·lent a francament mediocre. Les ciències pre-clíniques, en general a càrrec d'especialistes de categoria, s'ensenyaven amb poc treball de laboratori, a causa de la manca de mitjans. En aquestes circumstàncies les disciplines clíniques resultaven més interessants que les pre-clíniques perquè era possible, per als estudiants, de treballar com a interns en les clíniques. Els caps de Clínica eren gairebé sempre gent de primera categoria i, si estaven interessats en la funció docent, l'experiència de l'internat podia ésser molt valuosa. Àdhuc en el cas de clíniques sota la direcció de caps menys dedicats a l'ensenyament, l'estudiant intern tenia ocasió d'aprendre autodidàcticament. De fet, l'autodidactisme jugà una part considerable en la meua formació com a estudiant, i en la formació de molts dels meus companys d'estudi. Ja sé que l'autodidactisme té mala fama en medis universitaris densos. En el cas dels nostres medis universitaris abans de la Universitat Autònoma, l'autodidactisme fou responsable de la bona preparació de molts dels nostres universitaris i homes de ciència. No discutiré més els mèrits de l'autodidactisme, i solament us recordaré que, molt sovint, els grans avenços científics hi estan basats.

En el meu cas, el procés autodidàctic fou facilitat enormement per la meua assistència a l'Institut de Fisiologia. Aquell Institut, fill de la iniciativa d'August Pi i Sunyer i de Jesús Maria Bellido, constituïa una illa de recerca fonamental on assistents joves formats a l'estranger feien el possible per tal de continuar recerques científiques amb mètodes i idees contemporànies. Jo vaig ésser assistent de Cèsar Pi i Sunyer, que havia passat dos anys amb Carl Neuberg al Kaiser-Wilhelm-Institut, a Dahlem. A més l'Institut de Fisiologia tenia una biblioteca de Fisiologia i Bioquímica de primera classe, i aquella biblioteca fou una oportunitat única per a aprendre autodidàcticament.

Eren aquells els anys de la República del 1931, aquella República que s'instaurà sense devesall de sang, fet del qual estàvem molt orgullosos. Un dels fruits de la República fou l'establiment de la Universitat Autònoma, que en uns pocs mesos va modernitzar l'ensenyament superior, en una forma revolucionària. A més, va posar les bases sobre les quals s'haurien pogut recolzar carreres de recerca a temps complet. Aquest darrer punt fou important en la meua decisió d'escollir una carrera de recerca científica.

Podria anomenar molta gent als quals dec ajuda i encoratjament durant els meus anys formatius. Deixeu-me només esmentar, a part d'August Pi i Sunyer i de Jesús Maria Bellido, Cèsar Pi i Sunyer, que

fou el primer de posar-me en contacte amb treball de laboratori, i, sobretot, Rossend Carrasco i Formiguera, que tingué en mi una confiança que el meu treball en aquell moment no justificava sense una quantitat considerable de generositat. Carrasco fou el meu mentor científic. Fou gràcies a ell que en Francesc Duran i Reynals s'interessà en la meua carrera, i enginyà la meua anada al Rockefeller Institute. Arribat a Nova York, Duran i Reynals exercí sobre mi una influència enorme, no solament com a model científic, si no com a definidor i interpretador dels valors ètics i socials de la societat nord-americana.

Vaig anar al Rockefeller Institute per aprendre bioquímica aplicada a la medicina sota la direcció del doctor Donald D. Van Slyke. Aquest home, d'una estatura científica inatacable, i d'unes qualitats humanes de la mateixa altura, fou per a mi la influència més forta de la meua formació científica. En detall, Van Slyke em posà a ajudar el doctor Irvine Page en un estudi de la fisiopatologia de les hormones pituitàries. La meua contribució era la determinació dels lípids plasmàtics en diversos trastorns pituitaris. Els primers experiments demostraren que els mètodes d'anàlisi de lípids donaven resultats incorrectes, en primer lloc perquè es determinaven com a lípids impureses que acompanyaven els lípids, i, en segon, perquè la identificació dels diferents lípids no era prou especificat. En un esforç dirigit a l'eliminació d'aquestes fonts d'error, calgué obtenir substàncies patró, que s'havien de preparar a partir del cervell de bou. La preparació d'aquestes substàncies patró ens revelà que la *cefalina*, un fosfolípid al qual hom atribuïa una fórmula química definida, contenia un 60 % de carboni, en lloc del 66 % que n'hauria d'haver contingut segons la fórmula acceptada. Aquesta observació ens portà a examinar altres aspectes de la química de la cefalina. Aviat trobarem que, si bé el nitrogen de la cefalina era tot en forma amínica ($-NH_2$) tal com corresponia a la fórmula acceptada, una part considerable del nitrogen formava part d'un grup aminoàcid.¹ Tombé trobarem que la cefalina contenia inositol.² Tant la presència d'un aminoàcid com d'inositol eren fets nous, i l'explotació d'aquesta informació va demostrar que la cefalina de cervell era una barreja de tres substàncies diferents,³ a saber, la *fosfatidil-etanolamina*, que corresponia a la fórmula acceptada, la *fosfatidil-serina*, en la qual l'aminoàcid *serina* reemplaçava l'etanolamina, i els *fosfoinosítids*, un grup nou de fosfolípids que contenien *inositol* com a un de llurs constituents. La continuació d'aquest treball ens portà a la purificació d'un fosfoinosítid, el *difosfoinosítid*.⁴ Aquest treball fou reprès anys més tard en altres laboratoris, i hom va trobar que hi ha almenys tres fosfoinosítids diferents: un que conté un àtom de fòsfor per cada inositol, el *monofosfoinosítid*; el *difosfoinosítid* que conté dos àtoms de fòsfor per cada inositol, i el *trifosfoinosítid*, que conté tres àtoms de fòsfor per cada inositol.⁵

Els resultats obtinguts en l'estudi de la cefalina no havien resolt el

problema original de la determinació dels lípids plasmàtics. El que feren fou substituir el problema de la determinació dels lípids plasmàtics pel de la determinació dels lípids cerebrals en particular i dels lípids dels diferents teixits animals i vegetals en general. En resum es tractava ara de trobar un mètode d'aplicació general a tots els teixits vivents. Temptatives i exploracions diverses revelaren que, en l'extracció dels lípids de qualsevol teixit vivent, els lípids tenien la propietat de dissoldre, en els solvents emprats, quantitats considerables de substàncies no lipídiques que, d'elles mateixes, no eren solubles en els solvents en qüestió.⁶ També revelaren que la sola forma satisfactòria d'eliminar aquestes impureses era un rentat amb aigua, bé prèviament a l'extracció,⁷ bé per diàlisi,³ bé per distribució de la barreja de lípids i no lípids que s'extreien, en un sistema bifàsic constituït per una fase aquosa i una fase de solvents orgànics.^{8, 9} Finalment, si es volien extreure tots els lípids, s'havien d'emprar, per a l'extracció, solvents de poder molt ample, molt més ample que les barreges d'èter etílic i alcohol etílic que s'empraven aleshores. L'estudi de solvents possibles ens ensenyà que el cloroform era el solvent més adequat. Tenia, però, un inconvenient, a saber, no era miscible amb aigua, i així doncs no es prestava a l'extracció directa dels teixits. Aquest inconvenient fou resolt afegint metanol al cloroform: l'addició de metanol feia el cloroform miscible amb aigua en grau suficient per a permetre l'extracció directa del teixit.⁸ A més, les propietats físiques respectives del cloroform i del metanol ens proporcionaren un procediment molt avantatjós per a separar els lípids de les substàncies no lipídiques. L'extret cloroform-metanol es cobria amb aigua en la proporció de cinc parts d'aigua per una part d'extret. Així es formava un sistema bifàsic, amb una fase inferior, l'extret cloroform-metanòlic, i una fase superior, l'aigua. Aleshores s'esdevenia que, per simple difusió, metanol passava de l'extret a l'aigua, i deixava darrera cloroform pur, el qual, essent més pesant que l'extret, s'enfonsava en la massa de l'extret, i era reemplaçat, a la interfase, per extret. Alhora, en la fase aquosa, la barreja aigua-metanol resultant de la difusió del metanol, pujava en la massa aquosa, perquè era més lleugera que l'aigua, i era reemplaçada, a la interfase, per aigua pura. Aquest procés, continuava fins que tot el metanol s'havia difós de l'extret a l'aigua. Aleshores el sistema bifàsic consistia en una fase inferior de cloroform pur, i una fase superior metanol-aquosa, amb una acumulació, a la interfase, d'una matèria d'aspecte esponjós. La fase metanol-aquosa es podia exhaurir fàcilment per succió. Quedava aleshores la fase inferior, i la matèria esponjosa interfàsica. Si s'afegia una petita quantitat de metanol a la barreja, la substància esponjosa es dissolia en el cloroform, de manera que la fase clorofòrmica i la matèria esponjosa constituïen ara una sola solució.

L'anàlisi de les dues fases, i de la matèria esponjosa interfàsica, revelà que les substàncies no lipídiques es trobaven totes en la fase

superior metanol-aquosa, que els lípids es trobaven en la fase clorofòrmica inferior, i que la matèria esponjosa era una emulsió de lípids. Així doncs, la barreja de fase inferior i de matèria esponjosa interfàsica representava un extret total de lípids sense contaminació per substàncies no lipídiques.⁸

PROTEOLÍPIDS. — La descripció sumària que precedeix resumeix els resultats principals de les meves recerques des de l'any 1935 fins al final dels anys quaranta. Els anys 48 a 51 assenyalaren un canvi marcat en les meves recerques, en el sentit que fins aleshores havia treballat sobretot amb lípids. En els anys del 48 al 51, la lògica del progrés en el meu treball em portà a un interès creixent en les proteïnes del cervell. El punt més sobresortint d'aquest canvi és la descoberta dels *proteolípids*. L'estudi d'aquestes substàncies ha estat el meu treball central en aquests darrers vint-i-cinc anys. En conseqüència, dedicaré la resta d'aquesta narració a la descripció d'aquestes investigacions. A fi que llur exposició sigui com més clara millor, començaré definint els proteolípids tal com els coneixem avui, i després traçaré els passos successius que ens han portat als nostres coneixements actuals. Serà això una narració que recalcarà l'evolució dels nostres conceptes i idees en el curs d'aquest llarg treball. Crec que aquesta forma de presentació és preferible a una discussió detallada dels resultats obtinguts a cada pas de progrés en la marxa del treball.

Els proteolípids són complexos formats d'una meitat proteica (apoproteïna) i una meitat lipídica. Tenen les característiques següents: 1) S'extreuen dels teixits amb barreges de cloroform i metanol, o sigui que s'obtenen originalment barrejats amb lípids. Són solubles en certs solvents orgànics, i insolubles en aigua o en solucions aquoses. Quan l'extret cloroform-metanòlic es renta amb aigua, en la forma descrita anteriorment, els proteolípids es queden quantitativament en la fase inferior hidrofòbica. 2) Per procediments físics em medi de reacció neutral, que descriurem a continuació, els proteolípids poden ésser separats dels lípids que els acompanyen en l'extret dels teixits. El procediment d'elecció és la diàlisi en cloroform-metanol neutre. Després de la separació d'aquests lípids, queda la meitat proteica (apoproteïna) i els lípids amb els quals l'apoproteïna forma un complex. La separació de l'apoproteïna, i d'aquesta meitat lipídica requereix l'ús d'una reacció àcida, com és ara diàlisi en cloroform-metanol acidificat per addició d'àcid clorhídric. Això indica que la meitat lipídica i l'apoproteïna estan combinades, almenys en part, per un lligam iònic, és a dir, la combinació d'un grup àcid amb un grup bàsic. 3) L'apoproteïna completament deslipidada continua éssent soluble en solvents orgànics i insoluble en aigua o solucions aquoses, tal com ho era quan estava combinada amb la meitat lipídica. 4) Mitjançant un procediment purament físic, l'apoproteïna pot ésser transformada en una substància soluble en aigua. La forma

hidrosoluble de l'apoproteïna té una configuració espacial (conformació) diferent de la forma hidrofòbica. Aquesta transformació, que canvia la solubilitat de l'apoproteïna, és reversible, i hom pot passar diverses vegades de la forma hidrofòbica liposoluble a la forma hidrofílica hidrosoluble, i viceversa, sense cap canvi en l'estructura química o en altres propietats de l'apoproteïna. 5) Químicament, els proteolípsids són proteïnes fortament hidrofòbiques caracteritzades per una alta concentració d'àcids amínics no polars, i una concentració relativament petita d'àcids amínics àcids i bàsics. A més, són rics en àcids amínics sulfurats, i en triptòfan. Finalment, tenen la característica única, entre proteïnes d'origen animal, de contenir àcids grassos combinats amb la proteïna mitjançant lligams ester. 6) Els proteolípsids es troben en quasi tots els teixits animals i vegetals, i, generalment, són constituents de membranes cel·lulars o intracel·lulars.

DESCOBRIMENT I ESTUDIS INICIALS — El descobriment dels proteolípsids¹⁰ fou conseqüència d'una observació inesperada. Quan estàvem desenvolupant el mètode per a la purificació de lípids tissulars,⁸ després de l'extracció i del rentat de l'extret, recuperàrem els lípids, en forma sòlida mitjançant l'evaporació completa dels solvents. El residu que havíem obtingut fou aleshores dissolt en un volum de cloroform-metanol més petit que el volum de l'extret que havíem concentrat. S'observà que part del residu no es dissolia, àdhuc quan s'empraven quantitats més grans de solvents, o porcions successives de solvents. L'estudi d'aquesta observació demostrà que la quantitat de residu que havia esdevingut insoluble en cloroform-metanol, era una porció aproximadament constant del residu total, i que era insoluble en tots els solvents orgànics i aquosos que es van provar. L'anàlisi química elemental del residu insoluble donà un 14 % de nitrogen, i 1,75 % de sofre. Per hidròlisi amb àcid clorhídric 6 N bullent durant 24 hores, el residu es transformava en una barreja d'àcids amínics. En resum, a base d'aquestes i altres observacions, arribarem a la conclusió que el residu insoluble era una matèria proteica. Com que en aquell temps (1948) no era coneguda cap proteïna que fos soluble en cloroform-metanol, ens pensàrem que es tractava d'un complex físic lipoproteic, en el qual els lípids cobrien un centre proteic. La superfície lipídica que en resultava conferia al complex les solubilitats característiques dels lípids, a saber, solubilitat en solvents orgànics, i insolubilitat en aigua o solucions aquoses. Donàrem el nom de proteolípsids a aquests complexos per tal de distingir-los de les lipoproteïnes plasmàtiques, que també eren constituïdes per la combinació d'una meitat proteica i una meitat lipídica, però que eren solubles en aigua i insolubles en solvents orgànics.

La continuació d'aquestes recerques revelà que els proteolípsids es concentraven en la matèria esponjosa interfàsica que es formava quan l'extret tissular es posava en contacte amb un excés d'aigua. També

trobarem que, si variàvem la concentració d'aigua en l'extret, la quantitat de residu insoluble que s'obtenia augmentava o disminuïa en una proporció aproximada a la concentració d'aigua en l'extret. Com que el residu era sempre matèria proteica, independentment del rendiment que s'obtenia, això volia dir que una porció variable dels proteolípids romanien en solució. De fet trobarem que, si la concentració d'aigua que hi havia en l'extret era insuficient per a causar la formació d'un sistema bifàsic en el curs de l'evaporació dels solvents, no hi havia formació de residu insoluble, és a dir, el proteolípids romanien solubles en la barreja cloroform-metanol. Aquestes observacions suggeriren un corollari a la nostra hipòtesi, a saber, els proteolípids actuaven com a substàncies dipolars que, durant el procés de rentat, s'orientaven a la interfase amb el pol hidròfil cap a l'aigua i el pol hidròfob cap al cloroform, amb el resultat que hi havia una concentració de proteolípids en la matèria esponjosa interfàsica. Durant el procés d'evaporació de solvents, si es produïa un sistema bifàsic, l'orientació dipolar feia que el centre proteic dels proteolípids entrés en contacte amb el cloroform, el qual, aleshores, exercia una acció insolubilitzant (desnaturalitzant) sobre la proteïna (el cloroform ja era conegut per la seva acció desnaturalitzant sobre les proteïnes solubles en general).

Amb aquesta nova informació, fou possible, per simple fraccionament amb solvents neutres, la separació de tres preparacions paral·leles de proteolípids, preparacions que foren designades proteolípids A, B i C. Els rendiments respectius d'aquestes preparacions variaven d'acord amb petits canvis en el procediment emprat, i també variava la composició lipídica de cada fracció. Es tractava simplement d'un mètode empíric que no resultava de la separació d'entitats químiques distintes, sinó de la separació d'un material heterogeni en tres fraccions paral·leles.

En aquest treball inicial trobarem que hi havia proteolípids en molts teixits diferents. El teixit que en contenia més era la substància blanca del sistema nerviós central dels vertebrats, seguida, en ordre descendent de contingut, per la substància grisa central, el miocardi, el ronyó, el fetge i el múscul estriat. Hi havia pocs proteolípids o cap en el sistema nerviós central del fetus; en el curs del desenvolupament post-fetal, els proteolípids apareixien, i augmentaven gradualment en concentració, en una forma aproximadament paral·lela a l'aparició i a l'augment paulatí del contingut de mielina. A base d'aquest paral·lisme, postularem que, en el sistema nerviós central, els proteolípids són principalment components de la mielina.

Treballs posteriors en diferents laboratoris han demostrat que els proteolípids es troben en la majoria de teixits animals i vegetals, i que, generalment, s'hi troben com a components d'estructures membranoses.¹¹

AÏLLAMENT DELS PROTEOLÍPIDS. — En principi, el primer pas en la purificació dels proteolípids era la separació dels lípids lliures, és a dir, els lípids que no formaven part de la meitat lipídica dels proteolípids. Un cop els proteolípids s'haguessin preparat sense lípids lliures, s'hauria de demostrar si els proteolípids eren heterogenis o homogenis, és a dir, si eren una barreja, o bé una substància pura. Si eren una barreja, caldria separar-ne substàncies pures. En la pràctica, aquest pla de treball, conceptualment senzill, presentà dificultats enormes, a causa de les propietats característiques dels proteolípids: d'una banda, la insolubilitat en aigua que tenien els proteolípids impedia l'ús de molts dels procediments que generalment s'empraven en la purificació i identificació de proteïnes; d'una altra banda, la relativa inestabilitat dels proteolípids feia, a priori, difícil llur estudi pels mètodes dels lípids. Aquestes dificultats eren augmentades pel fet, aleshores encara desconegut, que els proteolípids formen combinacions transitòries i reversibles amb molts lípids diferents.

A conseqüència d'aquestes dificultats, passaren uns anys sense que féssim cap progrés cap a la fi immediata de la separació dels proteolípids i els lípids lliures. Assaigs amb barreges de solvents, ens donaren sistemes bifàsics en els quals els proteolípids tenien coeficients de partició que, en teoria, haurien hagut de permetre llur purificació per distribució a contracorrent (*counter-current distribution*). En sotmetre els proteolípids a distribució a contracorrent, s'observà aviat que llur coeficient de partició, en un sistema bifàsic determinat, canviava a mesura que s'eliminaven els lípids. El que passava era que els proteolípids formaven combinacions reversibles amb diversos lípids, i aquestes combinacions transitòries tenien coeficients de partició diferents de les dels proteolípids. La conseqüència d'això era que les particions que s'observaven no corresponien a una sèrie de coeficients de partició constants, sinó de coeficients que canviaven de valor a cada nova distribució. Es perdia, així, el gran avantatge del sistema de distribució a contracorrent, a saber, que el perfil de distribució dels proteolípids entre les fraccions obtingudes en particions consecutives no podia emprar-se com a evidència de la puresa de les diverses substàncies que s'anaven separant.

L'esforç considerable que ens va permetre d'arribar a aquesta conclusió negativa no resultà totalment eixorc: 1) ens ensenyà que els proteolípids, si bé inestables en les condicions relativament innòcues d'evaporació de certes barreges d'aigua, cloroform i metanol eren molt estables en una sèrie de condicions teòricament molt més dràstiques; 2) va permetre el desenvolupament d'un mètode senzill per a la preparació de sulfatids;¹² 3) un benefici inesperat d'aquest estudi fou el descobriment fortuït que els proteolípids es podien determinar quantitativament en solucions, per llur absorció en la zona ultraviolada pròxima a la longitud d'onda de 280 nanòmetres, un procediment ràpid

i no destructiu, que va reemplaçar el mètode anterior de determinar els proteolípidos per anàlisi química, mètode que requeria molt de temps i quantitats relativament grans de proteolípidos; 4) finalment, la investigació sistemàtica de sistemes bifàsics fou la base del procediment de rentat dels extrems lípidics pel procediment de partició, que ha assolit un ús universal.⁹ En aquest procediment, l'extret cloroformo-metanòlic del teixit es dilueix amb aigua, en la proporció d'un millilitre d'aigua per cada cinc mil·lilitres d'extret. S'obté un sistema bifàsic que, per centrifugació, se separa en una fase superior de metanol i aigua i una fase inferior de metanol gairebé pur. La fase clorofòrmica conté els lípids i proteolípidos, i la fase metanòlico-aquosa conté les substàncies no lípidiques. La fase clorofòrmica pot concentrar-se per evaporació sense formació d'un sistema bifàsic i, en conseqüència, sense insolubilització dels proteolípidos.

EL MÈTODE D'EMULSIÓ-CENTRIFUGACIÓ PER A LA PREPARACIÓ DELS PROTEOLÍPIDS. — Per primera vegada, des del descobriment dels proteolípidos, llur barreja total s'havia pogut obtenir de forma sòlida, sense cap canvi en llur solubilitat. El residu que s'havia preparat per evaporació completa del cloroform, fou assajat per tal de conèixer-ne la solubilitat en diversos solvents, a fi d'aprofitar al màxim aquella observació novella. Entre altres coses, es trobà que el residu podia emulsionar-se en aigua sense dificultat, ja fos per contacte per unes hores a la cambra freda, ja fos més ràpidament, agitant la barreja aigua-residu, a temperatura ambient o a la de la cambra freda. Aquesta emulsificació, ofería la possibilitat que els lípids lliures poguessin separar-se dels proteolípidos per centrifugació diferencial, per tal com les proteïnes són més denses que els lípids. Això es posà a prova, amb el resultat que la simple centrifugació de l'emulsió del residu lípid-proteolípid, donava un sediment que contenia tots els proteolípidos, i un sobrenedant que contenia una quantitat considerable de lípids lliures. De fet, amb una sola operació, la proporció de proteolípidos en la barreja lípid-proteolípid augmentava cinc vegades i es passava d'un residu amb 8 % de proteïnes, a un sediment de centrifugació amb 40 % de proteïna. Combinant aquesta centrifugació amb fraccionament mitjançant solvents, aconseguírem de concentrar els proteolípidos 8 vegades, amb un rendiment quantitatiu considerable.¹³

ESTUDI DEL LLIGAM ENTRE LA MEITAT PROTEICA I LA MEITAT LÍPIDICA DELS PROTEOLÍPIDS. — La facilitat amb què els proteolípidos formaven combinacions transitòries amb molts lípids diferents, ens obligà a estudiar, com a problema urgent, el tipus de lligam que hi havia entre la meitat proteica i la meitat lípídica dels proteolípidos. Fins aleshores, havíem suposat que aquesta meitat lípídica era un o més lípids determinats, però l'existència de lligams transitoris entre proteolípidos

i molts lípids diferents suggeria la possibilitat que la meitat lipídica no fos de composició constant sinó de composició que dependria dels lípids que estaven en solució juntament amb la meitat proteica. La forma més directa de resoldre aquest problema era demostrar el tipus de lligam que existia entre la meitat proteica i la meitat lipídica. D'aquest lligam, només sabíem que en certes condicions es dissociava, i, aleshores, segons la nostra hipòtesi de treball, la meitat proteica quedava exposada a l'acció insolubilitzant del cloroform-metanol. La primera possibilitat que investigàrem fou si l'ió calci feia part del lligam que intentàvem de definir. Havíem observat que la barreja proteolípids-lípids tenia una gran afinitat pels ions calci¹⁴ i que quan afegíem ions càlcics a una emulsió aquosa de la barreja, l'emulsió s'acalaria, cosa que indicava una interacció entre ions càlcics i els lípids-proteolípids en emulsió. Com a primera aproximació, investigàrem l'efecte dels citrats i oxalats sobre les propietats dels proteolípids. Això es féu en el sistema bifàsic cloroform-metanol-aigua, 8:4:3, és a dir, el sistema que s'emprava en el rentat dels extrems lipídics. Les substàncies a assajar s'afegien a la fase superior metanòlico-aquosa ensems que la barreja proteolípids-lípids estava en la fase clorofòrmica. Les dues fases es barrejaven i la barreja se separava per centrifugació. Si el lligam es trencava, la meitat proteica esdevenia insoluble, i s'acumulava a la interfase. Trobàrem que els citrats i els oxalats no tenien cap efecte; en canvi trobàrem que, en el medi alcalí, qualsevol sal inorgànica o metallo-orgànica, trencava el lligam en proporció directa al logaritme de la força iònica (*ionic strength*) del medi.¹⁵

CROMATOGRAFIA DELS PROTEOLÍPIDS. — Cap al 1959, les tècniques de cromatografia de lípids havien arribat a un punt de desenvolupament que permetia llur aplicació a la separació dels proteolípids. Aconsegüírem aquesta separació cromatogràfica¹⁶ emprant àcid silícic com a fase sòlida i fent l'elució mitjançant un gradient discontinu de barreges de cloroform, metanol i aigua, de polaritat més i més marcada, amb una elució final, amb una barreja de parts iguals de cloroform i metanol que contenien àcid clorhídric a concentració 0.004 N. La meitat proteica s'obtenia en tres o quatre pics diferents, tots ells consistents en 95 a 97 % de proteïna, i 2 a 5 % de fosfolípids. Els diferents pics de proteïna tenien la mateixa composició en àcids amínics, i tots ells contenien difosfoinosítid com a fosfolípid més abundant. En recromatografiar, cada pic se separava en tres pics, el més gran corresponent a la posició del pic d'origen. En resum, havíem trobat que la cromatografia podia ésser aplicada a la separació dels proteolípids, però que les diferents fraccions que havíem obtingut no eren realment homogènies malgrat d'ésser idèntiques en composició química. El progrés més important que havíem assolit era la preparació de proteolípids que contenien no més d'un 5 % de lípids; aquests lípids eren tots acídics, la qual

cosa suggeria un lligam electrostàtic entre la meitat proteica i la meitat lipídica. Observàrem, també, que el darrer pic proteic, el que s'el·luïa amb cloroform i metanol i contenia àcid clorhídric, es repartia entre les dues fases del sistema bifàsic cloroform-metanol-aigua, 8:4:3, en la proporció d'una part en la fase aquosa i tres parts en la fase clorofòrmica. Com que en aquest sistema els proteolípids romanien quantitativament en la fase clorofòrmica, el canvi que havíem observat en la partició indicava que, al menys una porció dels proteolípids, havien sofert un canvi en solubilitat.

PURIFICACIÓ DELS PROTEOLÍPIDS PER DIÀLISI EN SOLVENTS ORGÀNICS. — Ja que les proteïnes són de mida molecular més gran que els lípids, era d'esperar que, per diàlisi en solvents orgànics, fos possible de separar els proteolípids que no podien travessar la membrana dels lípids que podien travessar-la. Vam explorar aquesta possibilitat, emprant barreges de cloroform i metanol com a solvent, i membranes de cel·lulosa. Trobàrem que les membranes retenien els proteolípids i deixaven passar els lípids lliures. La fracció no dialitzable que finalment s'obtenia, contenia un 85 % de proteïna i un 15 % de lípids. Els lípids eren gairebé tots àcids, i devien estar combinats amb la part proteica per lligams iònics. El fet que, per cromatografia, el contingut en lípids quedava reduït a 5 % o menys, suggeria que els lípids àcids es combinaven amb la meitat proteica mitjançant lligams de diversos graus d'estabilitat.

PREPARACIÓ DE LA MEITAT PROTEICA DELS PROTEOLÍPIDS (APOPROTEÏNA) MITJANÇANT DIÀLISI EN SOLVENTS ORGÀNICS ACIDIFICATS. — El canvi observat en el coeficient de partició de la darrera fracció de proteïna eluïda de l'àcid silícic amb cloroform-metanol acidificat, indicava que, per acció de l'àcid, el proteolípide esdevenia més soluble en medis polars. Exploràrem aquest canvi sotmetent els proteolípids a diàlisi en cloroform-metanol que contenia àcid clorhídric, a concentració 0.04 N. Trobàrem que l'acidificació del medi augmentava la quantitat de lípids que es dialitzaven sense que es dialitzés cap proteïna. En completar-se la diàlisi, només quedava material proteic en la fracció no dialitzable. A més, trobàrem que, si el medi de diàlisi es canviava gradualment del cloroform-metanol acidificat a aigua pura, mitjançant passos successius per barreges intermèdies, la fracció dialitzable final era una solució aquosa d'apoproteïna.¹⁷ Si la solució era liofilitzada, el residu proteic que s'obtenia podia dissoldre's, bé en aigua lleugerament acidificada (pH, 5.0), bé en barreges de cloroform i metanol. Malauradament, aquesta preparació era inestable i en pocs dies perdia la seva solubilitat, tant en aigua com en solvents orgànics. A conseqüència d'aquesta inestabilitat, no fou possible d'estudiar aquesta apoproteïna per les tècniques de la purificació i identificació de proteïnes. Fou possible,

però, de mesurar la dispersió rotatòria òptica de les solucions d'apoproteïna. Trobarem que, en solució en cloroform-metanol, l'apoproteïna contenia una proporció considerable d'hèlix alfa, i que, en solució en aigua, en contenia poca o no gens.¹⁸ Aquesta observació indicava que l'apoproteïna existia en dues conformacions diferents, una de no polar, soluble en cloroform-metanol i insoluble en aigua, i una altra de polar, que era soluble en aigua

PURIFICACIÓ DELS PROTEOLÍPIDS PER FILTRACIÓ PER GELS. — L'ús de la filtració per gels per a purificar proteolípids fou iniciada per Autilio,¹⁹ en el nostre laboratori, l'any 1966. Emprant un gel de poliestirè, Autilio va estudiar les proteïnes de la mielina central. Va aconseguir d'aïllar, entre altres fraccions, una que tenia les propietats dels proteolípids. Representava el 55 % de les proteïnes de la mielina, xifra que correspon al contingut de proteolípids de la mielina, i que fou posteriorment confirmada en altres laboratoris.

Quan el Sephadex LH20 esdevingué disponible, la filtració per gels fou més pràctica. El 1967, Mokrasch²⁰ combinà la precipitació dels proteolípids afegint èter etílic a la solució cloroform-metanòlica, amb la filtració per una columna de Sephadex LH20. Els proteolípids passaren per la columna amb el volum exclòs, en una forma similar a la preparació que s'obtenia per diàlisi en cloroform-metanol neutre, és a dir, amb un 15 % de lípids. Quan aquesta preparació es reprecipitava amb èter etílic, i es feia passar per una columna de Dowex 1-X2, s'obtenia un producte comparable a la preparació que Matsumoto i col·laboradors¹⁶ havien obtingut emprant una columna d'àcid silícic.

En 1969, Soto i col·laboradors,²¹ van emprar Sephadex LH20 per a la purificació de proteolípids de la substància grisa i de la substància blanca centrals. De la primera, pogueren separar-ne una fracció definida que tenia moltes de les propietats que havien estat postulades per a un receptor de l'acetilcolina. S'ha pretès que aquesta fracció és el receptor fisiològic de l'acetilcolina. A més d'aquesta fracció, Soto i col·laboradors observaren que una proporció important de l'apoproteïna es quedava en la columna, i que l'apoproteïna que travessava la columna sortia en diversos pics de proteïna que no estaven completament separats. Concloïen que la separació assolida amb Sephadex LH20 era en part deguda a filtració per gel, i en part a cromatografia de partició.

PREPARACIÓ DE L'APOPROTEÏNA DE LA SUBSTÀNCIA BLANCA CENTRAL EN UNA FORMA HIDROSOLUBLE ESTABLE. — La informació que havíem obtingut en els diversos estudis que acabem de resumir havia canviat les nostres idees sobre els proteolípids. El concepte inicial havia estat el d'un complex amb un centre proteic i una closca lipídica que conferia al complex les propietats físiques dels lípids, i que quan es trencava,

permetia l'accés del cloroform al centre proteic, i la insolubilització de la proteïna per l'acció del cloroform.

El fet que la separació gradual dels lípids, fins a deslipidació total, no tenia cap efecte sobre la solubilitat dels proteolípids en cloroform i llur insolubilitat en aigua, indicava que aquestes propietats depenien de la proteïna mateixa, no de cap closca lipídica. El que en el darrer pic proteic obtingut per cromatografia amb àcid silícic, aparegués sobtadament una fracció proteolipídica més polar que els proteolípids abans de cromatografiar, i la preparació de l'apoproteïna en una forma soluble en aigua, constituïen la prova final que els nostres conceptes inicials de l'estructura dels proteolípids s'havien de revisar. De fet ens trobàvem amb una proteïna, l'apoproteïna, que era soluble bé en cloroform-metanol, bé en aigua, i que aquestes dues solubilitats corresponien a dues conformacions diferents, una d'hidrofòbica i una d'hidrofílica, i que la conformació adoptada per l'apoproteïna depenia segurament de la constant dielèctrica del medi solvent. Aquests conceptes nous tenien quelcom més que un valor teòric. Ens obligaven a considerar de nou l'estratègia que havíem seguit fins aleshores en les nostres recerques sobre proteolípids. Havíem de reexaminar immediatament els procediments de preparació de l'apoproteïna a fi d'eliminar tot tractament dràstic i tot procediment perllongat. Com que ja sabíem que el millor procediment de preparació de l'apoproteïna era la diàlisi en cloroform-metanol, seguida de diàlisi en cloroform-metanol acidificat, la primera etapa en la nostra investigació fou un estudi minuciós de la diàlisi en solvents orgànics. Les condicions finalment adoptades foren diàlisi en solvents neutres, seguida de diàlisi en solvents acidificats, i completada amb diàlisi en solvents neutres altre cop, per a eliminar completament l'àcid, tot això fet a temperatura de cambra freda, i en absència de llum. Per aquest procediment s'obtingué una preparació soluble en cloroform-metanol, amb una concentració elevada d'hèlix alfa. Amb la idea que la diàlisi perllongada en una sèrie de barreges successives, que canviaven gradualment de cloroform-metanol a aigua pura, era potser deletèria per a l'apoproteïna, investigàrem una sèrie d'alternatives possibles.

Al final, trobàrem que podíem fer passar l'apoproteïna de solució en cloroform-metanol a solució en aigua, pel procés de fer passar un corrent de nitrogen per la solució. A mesura que els solvents s'eliminaven per evaporació, eren reemplaçats per aigua que hom afegia en petites quantitats fins que la solució s'enterbolia, indicant immiscibilitat. Per aquest procediment, en menys d'una hora, es podia preparar una solució aquosa d'apoproteïna a partir d'una solució en cloroform-metanol.^{22, 23} L'apoproteïna hidrosoluble que s'obtenia era molt estable. Es podia obtenir en forma sòlida per evaporació de l'aigua en el buit, i la substància sòlida així preparada es redissolia en aigua amb una gran facilitat. Era possible de preparar solucions aquoses d'apoproteïna de

3 %, i de més concentrades. Aquestes solucions eren completament clares, i tenien molt poca absorció no específica àdhuc en l'ultraviolat. L'apoproteïna en solució en cloroform-metanol tenia una concentració elevada d'hèlix alfa, de l'ordre del 67 %; aquest contingut baixava aproximadament a la meitat quan l'apoproteïna era en solució aquosa. El canvi de conformació era fàcilment reversible, i la simple dilució de la solució aquosa d'apoproteïna amb cloroform-metanol restablí el contingut en hèlix alfa a l'alt nivell que tenia en la solució cloroform-metanòlica original. La preparació d'apoproteïna es prestava a tota mena d'estudis físics i químics. Donava un sol pic, tant en ultracentrifugació com en electroforesi a la Tiselius.¹¹ Malgrat aquesta homogeneïtat física, el pes molecular era molt elevat i variava de preparació a preparació, suggerint que, en solució aquosa, l'apoproteïna estava molt agregada. Que aquest era el cas, es podia demostrar analitzant l'apoproteïna per electroforesi per gel de poliacrilamida: es veien diverses bandes, la qual cosa indicava, o bé una barreja de proteïnes, o bé un estat de políagregació del monòmer d'una sola proteïna. La banda més abundant corresponia a un pes molecular de 34 a 36.000 dàltons.²⁴ Estudis posteriors han donat una banda principal de 22 a 24.000 dàltons.²⁵ Aquests resultats demostraven que els pesos moleculars de 500.000, i més elevats, que s'obtenien per ultracentrifugació, i per electroforesi a la Tiselius, corresponien a agregacions de molècules molt més petites. Respecte al pes molecular de la proteïna més abundant, s'havia calculat, ja feia anys, un pes mínim de 12.000, pel mètode del constituent menys abundant, i a base de dues metionines per molècula.¹³ A base d'una metionina, aquest pes molecular mínim esdevenia 6.000. En favor d'aquests monòmers de petita dimensió, hi havia l'observació, també ja vella, que una fracció variable dels proteolípid és dialitzable. Aquesta fracció dialitzable, s'havia estudiat, i s'havia trobat que tenia la mateixa composició química que la resta dels proteolípid.²⁶ A més, s'havia vist que la fracció dialitzable esdevenia no dialitzable després de la seva separació, és a dir que la molècula prou petita per a poder travessar la membrana de diàlisi s'agregava i formava una nova molècula d'una mida massa gran per a ésser dialitzable. En resum, hi ha una forta possibilitat que les diferents bandes observades en electroforesi en poliacrilamida siguin polímers d'un monòmer de mida 6.000 o 12.000.

L'apoproteïna no conté glúcids. No conté lípids complexos, però conté d'un 2 a un 3 % d'àcids grassos combinats en forma d'esters.²⁷ Com que, fora d'aquests radicals d'àcids grassos, l'apoproteïna no conté cap altre constituent conegut dels lípids, s'ha d'arribar a la conclusió temptativa que aquests àcids grassos estan esterificats amb la cadena peptídica de l'apoproteïna, segurament com a esters de la treonina, la serina o la tirosina. Els àcids grassos constitutius són palmític, esteàric i oleic en les proporcions molars 12:2:5.

ESTUDIS ACTUALS SOBRE ELS PROTEOLÍPIDS. — Aquest sembla el lloc oportú per a posar punt final a aquesta història personal de l'evolució d'una vida científica. Queda com a obra en continuació el treball sobre els proteolípids. Les recerques sobre aquestes substàncies s'estenen arreu pel món, en molts laboratoris diferents. Els resultats publicats, i els que estan en formulació, son massa nombrosos, a voltes divergents, i en tot cas, massa recents per a poder descriure'ls com a cos d'informació congruent, amb una avaluació objectiva. Aquests treballs inclouen la química, el metabolisme, la biosíntesi, la distribució al nivell de la microestructura cel·lular, i les funcions possibles dels proteolípids. Algunes observacions són contradictòries, i moltes no han estat encara confirmades. Tot això, però, no és treball d'aquest conferenciant, i queda fora del camp de la nostra discussió.

BIBLIOGRAFIA

1. FOLCH, J.: The isolation of phosphatidyl serine from brain cephalin and identification of the serine component, *J. Biol. Chem.*, 139, 973 (1941).
2. FOLCH, J., WOOLLEY, D. W.: Inositol, a constituent of a brain phosphatide, *J. Biol. Chem.*, 142, 963 (1942).
3. FOLCH, J.: Brain cephalin, a mixture of phosphatides. Separation from it of phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine and a fraction containing an inositol phosphatide, *J. Biol. Chem.*, 146, 35 (1942).
4. FOLCH, J.: Brain disphosphoinositide, a new phosphatide having inositol meta diphosphate as a constituent, *J. Biol. Chem.*, 177, 505 (1949).
5. GRADO, C., BALLOU, C. E.: Myo-inositol phosphates obtained by alkaline hydrolysis of beef brain phosphoinositide, *J. Biol. Chem.*, 236, 54 (1961).
6. FOLCH, J., VAN SLYKE, D. D.: Nitrogenous contaminants in petroleum ether extracts of plasma lipids, *J. Biol. Chem.*, 129, 539 (1939).
7. FOLCH, J., VAN SLYKE, D. D.: Preparation of blood lipid extracts free from non-lipid extractives, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 41, 514 (1939).
8. FOLCH, J., ASCOLI, I., LEES, M., MEATH, J. A., LEBARON, F. N.: Preparation of lipid extracts from brain tissue, *J. Biol. Chem.*, 191, 833 (1951).
9. FOLCH, J., LEES, M., SLOANE STANLEY, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226, 497 (1957).
10. FOLCH, J., LEES, M.: Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins. Their isolation from brain, *J. Biol. Chem.*, 191, 807 (1951).
11. FOLCH-PI, J., STOFFYN, PIERRE, J.: Proteolipid from Membrane Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 195, 86-107 (1972).
12. LEES, M., FOLCH, J., SLOANE STANLEY, G. H., CARR, S.: A simple procedure for the preparation of brain sulfatides, *J. Neurochem.*, 4, 9 (1959).
13. FOLCH-PI, J.: Études Récentes sur la chimie du cerveau. *Exposés Annuels de Biochimie Médicale*, 21, 81 (1959).
14. FOLCH, J., WEBSTER, G. R., LEES, M.: The preparation of proteolipids, *Fed. Proc.*, 18, 228 (1959).
15. FOLCH, J., LEES, M., SLOANE STANLEY, G. H.: The role of acidic lipides in the electrolyte balance in the nervous system of mammals, in *Homenaje al Dr. A. Pi i Sunyer*, pp. 70-76, Mèxic, D. F. (1956).
16. WEBSTER, G. R., FOLCH, J.: Some studies on the properties of proteolipids, *Biochim. et Biophys. Acta*, 49, 399 (1961).
17. MATSUMOTO, M., MATSUMOTO, R., FOLCH-PI, J.: The chromatographic fractionation of brain white matter proteolipids, *J. Neurochem.*, 11, 829 (1964).
18. TENENBAUM, D., FOLCH-PI, J.: The preparation and characterization of water soluble proteolipid protein from bovine brain white matter, *Biochim. Biophys. Acta*, 115, 141 (1965).

18. ZAND, R.: Solution properties and structure of brain proteolipids, *Biopolymers*, 6, 939 (1968).
19. AUTILIO, L.: Fractionation of myelin proteins, *Fed. Proc.*, 25, 764 (1966).
20. MOKRASCH, L. C.: A rapid purification of proteolipid protein adaptable to large quantities, *Life Sciences*, 6, 1905 (1967).
21. SOTO, E. F., PASQUINI, J. M., PLÁCIDO, R., LA TORRE, J. L.: Fractionation of lipids and proteolipids from cat grey and white matter by chromatography on an organophilic dextran gel, *J. Chromatog.*, 41, 400 (1969).
22. SHERMAN, G., FOLCH-PI, J.: Rotatory dispersion and circular dichroism of brain «Proteolipid» protein, *J. Neurochem.*, 17, 597 (1970).
23. FOLCH-PI, J., SHERMAN, G.: Preparation and study of brain proteolipid apoprotein, Second International Meeting of the International Society for Neurochemistry; R. Paolletti, R. Fumagalli and E. Galli, Editors, Tamburini, Milà, 1969, p. 169 (abstract).
24. THORUN, W., MEHL, E.: Determination of molecular weights of microgram quantities of protein components from biological membranes and other complex mixtures: Gel electrophoresis across linear gradients of acrylamide, *Biochim. Biophys. Acta*, 160, 132 (1968).
25. ENG, L. F.: Molecular weights of the major myelin proteins. *Fed. Proc.*, 30, 1.248 (abstract).
26. FOLCH-PI, J.: Nature of the dialyzable brain white matter proteolipid, Third International Meeting of the International Society for Neurochemistry, Akademi Kiado, Budapest, 1971, p. 239 (abstract).
27. STOFFYN, P., FOLCH-PI, J.: On the type of linkage binding fatty acids present in brain white matter proteolipid apoprotein, *Biochemical and Biophysical Res. Commun.*, 44, 157 (1971).