

die AMP-Desaminierung ohne ATP-Zusatz ersichtlich. Abb. 2 zeigt den analogen Effekt mit der gleichen Zytoplasmafraktion in Gegenwart äquimolarer Mengen ATP.

In Abwesenheit von ATP bewirken  $5 \cdot 10^{-3}$  M Ascorbinsäure eine durchschnittliche Hemmung der AMP-Aminohydrolase von 30–50%,  $10^{-3}$  M Ascorbinsäure hat nur noch einen geringen Einfluß und niedrigere Konzentrationen sind gänzlich unwirksam (20 Versuche).

In Gegenwart von äquimolaren Mengen AMP und ATP hingegen wird der Hemmeffekt hoher Ascorbinsäurekonzentrationen aufgehoben. Bei  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  Endkonzentration tritt sogar eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um durchschnittlich 20–30% auf (20 Versuche). Es konnte festgestellt werden, daß der Ascorbinsäureeffekt nicht auf einem Eingriff in den direkten Desaminierungsmechanismus im Sinne einer Eielektronenübertragung beruht. Ein solcher Vorgang wäre über das Monooxidationsprodukt Semidehydroaskorbinsäure denkbar. Durch ständige Erhöhung der Konzentration dieses Radikals während der Reaktion tritt jedoch keine Steigerung der AMP-Desaminierungsgeschwindigkeit auf. Nach vorläufigen Befunden ist vielmehr anzunehmen, daß Ascorbinsäure sowohl analog ATP und GTP als allosterischer Faktor auftreten, als auch auf den Redoxzustand des Enzyms von Einfluß sein kann. Untersuchungen zur Aufklärung der Ascorbinsäurewirkung sind im Gange.

*Klinik für Psychiatrie und Neurologie  
"Hans Berger" der Friedrich-Schiller-Universität,  
Jena (D.D.R.)*

H. KLUGE  
V. WIECZOREK

- 1 B. SETLOW UND J. M. LOWENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 607.
- 2 B. SETLOW, R. BURGER UND J. M. LOWENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 1244.
- 3 H. KLUGE UND V. WIECZOREK, *Acta Biol. Med. Germ.*, 20 (1968) 717.
- 4 H. KLUGE UND V. WIECZOREK, *Acta Biol. Med. Germ.*, 21 (1968) im Druck.

Eingegangen am 23. Juli, 1968

*Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 621–622

BBA 63359

### **Influence du $\beta$ -mercaptoéthanol sur l'état d'agrégation et l'activité ATPasique de la H-méromyosine de carotide de bovidé**

L'isolement et les propriétés de la H-méromyosine de carotide de bovidé ont été étudiés de façon détaillée<sup>1</sup>. Le comportement du gradient d'ultracentrifugation correspondant, apparaissant au cours de la digestion par la trypsine, montre qu'elle se dégrade très rapidement et qu'elle donne lieu à la formation d'agrégats de vitesse de sédimentation s'extrapolant à concentration nulle à 10–12 S. Les préparations obtenues par fractionnement au sulfate ammonique sédimentent à des vitesses légèrement supérieures s'extrapolant à 14 S et possèdent une viscosité intrinsèque de 2.45 dl/g à concentration nulle, 5 fois plus élevée que celles des H-méromyosines de muscle

*Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 622–625

squelettique de lapin<sup>2</sup> et de muscle cardiaque de chien<sup>3</sup>. Cette H-méromyosine donne donc lieu, contrairement à la L-méromyosine de carotide, à un phénomène d'agrégation très accentué dès le début de la digestion.

Nous avons observé que lorsque la digestion tryptique est réalisée à partir du complexe de myosine et d'actine extractible de la paroi artérielle à faible force ionique (tonoactomyosine<sup>4</sup>), l'ultracentrifugation de la solution en présence d'ATP révèle la présence, en plus du gradient lent de L-méromyosine, d'un gradient de H-méromyosine sédimentant à la vitesse normale de 4.9 S environ à la concentration totale de 0.59% (Fig. 1a). Le rôle protecteur de l'actine nous a conduit à examiner l'influence du  $\beta$ -mercaptoéthanol sur l'état d'agrégation et l'activité ATPasique de la myosine de carotide ainsi que de la H-méromyosine correspondante. La myosine et la tonoactomyosine ont été isolées d'extraits obtenus à faible force ionique<sup>5</sup> et purifiées par reprécipitation afin d'éliminer la tropomyosine présente<sup>1</sup>. Elles ont été digérées par la trypsine suivant la méthode décrite par HURIAUX<sup>1</sup>. L'activité ATPasique des préparations a été déterminée à 25°, dans le tampon imidazole 10 mM de pH 7.0, en présence

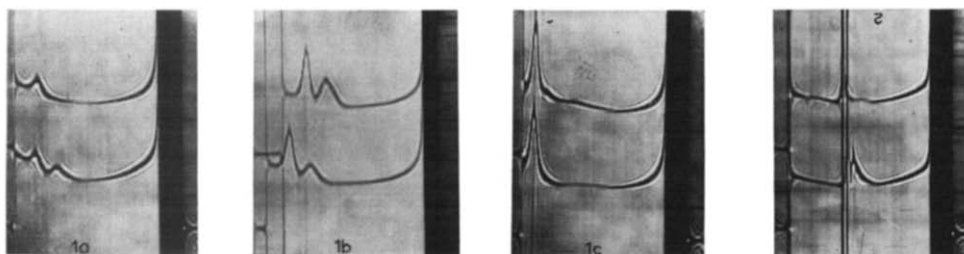


Fig. 1. Diagrammes d'ultracentrifugation (a) d'une préparation de tonoactomyosine digérée 80 min, après 48 min d'ultracentrifugation à la concentration de 0.59% en l'absence d'ATP (diagramme supérieur) et en présence d'ATP 0.2% et de  $Mg^{2+}$  0.01 M (diagramme inférieur), (b) d'une préparation de myosine purifiée en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM, digérée 40 min (diagramme supérieur) et 80 min (diagramme inférieur) après 50 min d'ultracentrifugation à la concentration de 0.67%, (c) d'une préparation de myosine purifiée en l'absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol digérée 40 min (diagramme supérieur) et 80 min (diagramme inférieur) après 26 min d'ultracentrifugation à la concentration de 0.65%. Conditions: 59 780 tours/min; Tris-HCl,  $I$  0.1, NaCl 0.25 M, pH 7.4;  $\theta = 55^\circ$ .

Fig. 2. Diagrammes d'ultracentrifugation d'une préparation de myosine purifiée en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM (diagramme supérieur) et en l'absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol (diagramme inférieur) après 73 min d'ultracentrifugation à 59 780 tours/min, concn. 0.5%; Tris-HCl,  $I$  0.35, pH 7.4;  $\theta = 55^\circ$ .

de 10 mM de Ca, 100 mM de KCl, 2 mM d'ATP et 0.2 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Calbiochem). Le phosphore libéré a été mesuré colorimétriquement à 750  $m\mu$  (ref. 6).

La purification de la myosine de carotide par précipitation à faible force ionique et sa conservation en chambre froide après dialyse, ont eu lieu en présence ou non de  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM. La formation d'agrégats de vitesse de sédimentation de 7 S environ à 0.1% est considérablement réduite en présence de réducteur (Fig. 2) tandis que l'activité  $Ca^{2+}$ -ATPasique devient environ 7 fois plus élevée (Fig. 3a). Lorsque ces deux myosines sont digérées par la trypsine, on observe à l'ultracentrifugation l'apparition de gradients de L-méromyosine identiques et de gradients de H-méromyosine différant considérablement: en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, la H-méromyosine sédimente de façon beaucoup plus homogène et avec une vitesse de 4.8 S, à la concen-

tration de 0.67%, semblable à celle observée dans le cas de la tonoactomyosine (Fig. 1b); tandis qu'en l'absence de réducteur le gradient de H-méromyosine s'étale dès le début de l'ultracentrifugation avant même que la digestion de la myosine ne soit complète (Fig. 1c, diagramme supérieur).

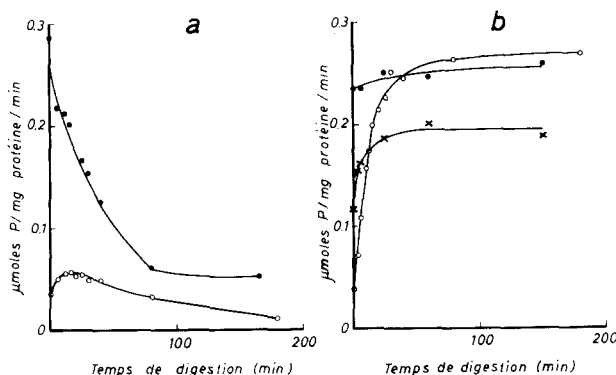


Fig. 3. Influence de la digestion par la trypsine sur l'activité ATPasique (a) de la myosine purifiée en l'absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol (○—○) et en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 mM (●—●) dans KCl 0.1 M, (b) de la tonoactomyosine purifiée en l'absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans KCl 0.1 M (○—○), dans KCl 0.6 M (×—×) et de la tonoactomyosine purifiée en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, dans KCl 0.6 M (●—●). Conditions expérimentales: imidazole 10 mM, pH 7.0; acétate de calcium 10 mM; ATP 2 mM;  $\beta$ -mercaptoéthanol 0.2 mM; 25°.

L'évolution de l'activité  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasique au cours de la digestion révèle également un comportement très différent: en l'absence de réducteur, on observe un maximum d'activité semblable à celui décrit par BARANY *et al.*<sup>7,8</sup> dans le cas des myosines de muscles lisses; en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, l'activité décroît rapidement et tend vers une valeur constante supérieure à celle observée dans l'autre cas (Fig. 3a). Dans le cas de la tonoactomyosine purifiée en l'absence de réducteur, on observe une activité  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasique peu élevée à faible force ionique qui devient 3.5 fois plus grande à force ionique élevée. Cet accroissement d'activité atteint environ 7 fois lorsque le complexe est purifié en présence de réducteur. Lorsqu'on hydrolyse le complexe par la trypsine, la préservation de la H-méromyosine à l'état non agrégé par l'actine va de pair avec une stabilisation de l'activité  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasique qui se maintient à une valeur égale à celle de la myosine purifiée en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol même après 3 h d'hydrolyse (Fig. 3b). Une activation similaire quoique moins élevée a déjà été signalée par NEEDHAM ET WILLIAMS<sup>9</sup> dans le cas de la digestion de l'actomyosine d'utérus par la trypsine.

L'activité  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasique de la myosine de carotide dépend donc fortement, comme dans le cas de la myosine de la portion striée du muscle adducteur de *Pecten irradians*<sup>8</sup>, de la présence d'un réactif SH au cours de son isolement. L'activité maximale trouvée lorsque la purification a lieu en l'absence de réducteur, est du même ordre que celle obtenue dans le cas du gésier de poulet; elle correspond à des myosines partiellement agrégées. Par contre, en présence de réducteur, elle est de l'ordre de celle des myosines de muscles squelettiques rouges de lapin<sup>10</sup> et du muscle cardiaque de lapin<sup>11</sup>. Une augmentation similaire a été observée sous l'influence de concentrations

60 fois plus élevées environ de réducteur, dans le cas de la myosine de muscle strié à pH 9 (réf. 12). Il n'est pas possible à la lumière de ces résultats préliminaires de déterminer si l'activation que nous décrivons est attribuable à la régénération de groupements SH aisément oxydables ou à un changement de conformation.

L'étude des phénomènes d'agrégation auxquels la myosine donne lieu n'a pas permis d'observer jusqu'à présent une modification de ce processus dans le cas de la myosine squelettique de morue sous l'influence de composés sulfhydrylés<sup>13,14</sup>. Bien que le nombre de groupements SH de la myosine de carotide de bovidé soit le même que celui de la myosine squelettique de lapin<sup>15</sup>, l'état de groupements SH aisément oxydables influence de toute évidence les phénomènes d'agrégation de cette myosine de muscle lisse.

Lorsque la myosine est isolée à l'état de tonoactomyosine en l'absence de réducteur, on observe un effet protecteur de l'actine sur les groupements SH de la myosine, semblable à celui décrit pour la myosine de la partie striée du muscle adducteur de Pecten<sup>8</sup>, étant donné l'activité obtenue à force ionique élevée. L'accroissement supplémentaire observé lorsque la tonoactomyosine est purifiée en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol suggère toutefois que cet effet protecteur n'est pas complet. La digestion du complexe par la trypsine entraîne une augmentation d'activité remarquable à faible force ionique, se stabilisant à une valeur constante alors qu'en l'absence d'actine, l'activité décroît rapidement. L'actine inhibe le groupement actif de la myosine-SH de muscle lisse de vertébré; cette inhibition disparaît dans le cas de l'acto-H-méromyosine-SH bien que le groupement actif de celle-ci reste préservé du point de vue de sa dégradation, par la présence d'actine.

L'étude des myosines de carotide de bovidé et de gésier de poulet montre que ces protéines font partie, avec les myosines d'invertébrés, du groupe des myosines instables<sup>8,16</sup> du fait de leur rapide agrégation mais qu'elles se caractérisent par contre par une résistance à la trypsine très élevée<sup>1,7</sup> contrastant avec la résistance nettement moindre des myosines squelettiques et la dégradation rapide des myosines d'invertébrés.

Nous remercions Monsieur le Professeur G. HAMOIR pour ses conseils et ses encouragements et Madame JAMSIN pour son aide technique.

Laboratoire de Biologie générale,  
Université de Liège, Liège (Belgique)

A. GASPAR-GODFROID

- 1 F. HURIAUX, *Angiologica*, 2 (1965) 153.
- 2 D. M. YOUNG, S. HIMMELFARB ET W. F. HARRINGTON, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2822.
- 3 H. MUELLER, M. THEINER ET R. E. OLSON, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2153.
- 4 L. LASZT ET G. HAMOIR, *Biochim. Biophys. Acta*, 50 (1961) 430.
- 5 G. HAMOIR ET A. GASPAR-GODFROID, *Angiologica*, 1 (1964) 317.
- 6 M. ROCKSTEIN ET P. W. HERRON, *Analyt. Chem.*, 23 (1951) 1500.
- 7 M. BARANY, K. BARANY, E. GAETJENS ET G. BAILIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 113 (1966) 205.
- 8 M. BARANY ET K. BARANY, *Biochem. Z.*, 345 (1966) 37.
- 9 D. M. NEEDHAM ET J. M. WILLIAMS, *Biochem. J.*, 89 (1963) 552.
- 10 M. BARANY, K. BARANY, T. RECKARD ET A. VOLPE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 109 (1965) 185.
- 11 M. BARANY, E. GAETJENS, K. BARANY ET E. KARP, *Arch. Biochem. Biophys.*, 106 (1964) 280.
- 12 D. HARTSHORNE ET M. MORALES, *Biochemistry*, 4 (1965) 18.
- 13 J. J. CONNELL, *Biochem. J.*, 70 (1958) 81.
- 14 J. J. CONNELL, *Biochem. J.*, 75 (1960) 530.
- 15 F. HURIAUX, J. F. PECHERE ET G. HAMOIR, *Angiologica*, 2 (1965) 15.
- 16 J. J. CONNELL, *Biochem. J.*, 80 (1961) 503.

Reçu le 23 juillet, 1968

*Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 622-625