

**Summary**

The intrinsic viscosity of cross-linked copolymers of styrene and *m,m'*-divinyl-azobenzene or *p*-divinyl-benzene was measured for different degrees of polymerization.

It has been shown that the two vinyl groups of the cross-linking agent are taken up by growing chains, each one independently of the other.

The number of cross-linkages is not absolutely identical with the number of the molecules of divinyl compound, but is determined by the magnitude of the various rates of growth.

### Über eine rotfluoreszierende, als Porphyrin anzusehende Substanz in den Augen von *Hirudo medicinalis*

Porphyrine sind, wie bekannt, in der Pflanzen- und Tierwelt weit verbreitet. Kleine Mengen finden sich in den verschiedensten Zellen und Geweben. Über ihre Funktion weiß man nichts Sicherstes<sup>1</sup>.

Vielfach beschrieben, und auch *in vitro* untersucht, ist eine schädigende Wirkung der Porphyrine: Sie sind imstande, biologisches Material gegen Licht zu sensibilisieren. Diese oft deletären photodynamischen Effekte kennt man von zahlreichen, mit Porphyrin angefärbten Objekten.

Die Sensibilisierung durch Porphyrine könnte auch im natürlichen Geschehen eine Rolle spielen, das heißt bei der zweckdienlichen Aufnahme und Verwertung von Lichtreizen. Danach ist aber bisher noch nicht eingehend geforscht worden. Der photodynamische Vorgang müßte in einem solchen Fall derart «gelenkt» oder «gebändigt»<sup>2</sup> sein, daß keine Schäden auftreten.

Bei Untersuchung der Lichtsinnesorgane niederer Tiere mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops konnte ein Befund erhoben werden, der in die Richtung einer natürlichen Sensibilisierung durch Porphyrine weist.

Geprüft wurden die Augen von *Hirudo medicinalis*. Diese bestehen aus einer in das lockere Gewebe des Kopfteils eingesenkten zylindrischen (etwa 0,5 mm langen und etwa 0,2 mm breiten) Ansammlung von großen blasigen Zellen, den eigentlichen Sehzellen. Jedes Auge ist von einer dunklen Pigmenthülle umgeben: Das Licht kann nur von der durchscheinenden Epitheldecke her eindringen<sup>3</sup>.

Bei den Versuchen wurde in folgender Weise vorgegangen: Der Kopfteil eines narkotisierten Blutegels wird ohne jede Fixierung auf das Gefriermikrotom gebracht. Es werden – aus verschiedenen Gründen – nicht die einzelnen Schnitte, sondern nur die jeweils erhaltenen Anschnitte (d. h. also die frischen Schnittflächen des gesamten aufgefrorenen Präparats) im ultravioletten Auflicht betrachtet. Um genau einstellen zu können, ist der Tubus eines (Ultrapak)-Mikroskops mit einem besonderen Kreuztisch verbunden. Das konzentrierte ultraviolette Licht fällt von der Seite schräg auf den gefrorenen Anschnitt. Durch scharfes Abkühlen werden die Fluoreszenzercheinungen erheblich brillanter<sup>4</sup>. Das ist ein besonderer Vorteil des Verfahrens, unmittelbar auf dem Gefriertisch zu untersuchen.

<sup>1</sup> H. FISCHER und H. ORTH, Die Chemie des Pyrrols, Bd. 2 (Pyrrolfarbstoffe), 1. Hälfte (1937), S. 158 ff. – Vgl. auch: H. SCHÜLKE Biochem. Z. 311, dort S. 146 (1941/42).

<sup>2</sup> E. MERKER, Naturwiss. 28, dort S. 627 (1940).

<sup>3</sup> B. L. MAIER, Zool. Jb. (Abt. Anatomie) 5, 552 (1892). – R. HESSE, Z. wiss. Zool. 62, 671 (1897).

<sup>4</sup> Vgl. H. KAUFMANN, Handbuch biol. Arbeitsmethoden (Herausg. von E. ABERHALDEN), Abt. II, Teil 1, S. 166 (1925). – M. HÄTINGER, Die Fluoreszenzanalyse in der Mikrochemie (1937), S. 36, 44 und 164.

In den gefroren gehaltenen Sehzellen konnte bisher, unter verschiedenen Bedingungen, nichts Auffälliges beobachtet werden. Hingegen macht sich eine intensive rote Fluoreszenz bemerkbar, wenn man das Präparat ein- oder mehrmals kurz an der Oberfläche auftauen, und wieder gefrieren läßt. Der fluoreszierende Körper verläßt hierbei allem Anschein nach die dunklen Pigmentzellen; er diffundiert allmählich in die Sehzellen, und, in geringerem Ausmaß, auch in die Umgebung der Augen. Nach einiger Zeit sind alle Sehzellen angefärbt. Das übrige Gewebe des Kopfteils zeigt keinerlei rote, sondern nur eine intensive bläulich-grüne Fluoreszenz. Durch Alkali oder Säure (in geringer Konzentration) wird die rote Fluoreszenz nicht vernichtet. Der Farbton und die Helligkeit werden hierbei – seltsamerweise – nicht, oder wenigstens nicht augenfällig verändert. Mit der verwendeten Methode und mit den derzeit gegebenen Hilfsmitteln erscheint es indessen schwierig, geringfügige Unterschiede exakt zu bestimmen. Im Mikrospektralokular gibt das Fluoreszenzlicht (ohne Zusatz von Alkali oder Säure) einen Streifen im Rot, der von etwa 605–627 m $\mu$  reicht.

Die Menge des fraglichen Farbstoffes ist sehr klein. Es war deshalb bisher nicht möglich, ihn zu isolieren und damit einwandfrei zu identifizieren. Abgesehen von den Porphyrinverbindungen, sind natürliche, im tierischen Organismus vorkommende, rotfluoreszierende Körper bekanntlich recht selten. Oxydirtes Cytochrom<sup>1</sup> oder Bilicyanin<sup>2</sup> wird man im vorliegenden Fall ausschließen dürfen. Wenn nicht ein besonderer, im Augenblick nicht klassierbarer Farbstoff vorliegt, so darf angenommen werden, daß es sich um ein Porphyrin handelt. Dieser Körper würde spezifisch gerade in der Pigmenthülle der Augen abgelagert: beim Abbau des aufgenommenen Bluts durch *Hirudo* treten Porphyrine sonst nicht, oder zum mindesten nicht in größerer Menge auf.

Die als Porphyrin anzusehende Verbindung ist zwar primär nicht in den eigentlichen Sehzellen nachzuweisen; sie wird aber funktionell wohl kaum bedeutungslos sein. Porphyrine können, wie erwähnt, biologische Objekte gegen Licht empfindlich machen. Deshalb ist es recht wahrscheinlich, daß die rotfluoreszierende Substanz in der Pigmenthülle des *Hirudo*-Auges etwas mit der Aufnahme von Lichtreizen zu tun hat. G. BOEHM

Normal-anatomische Anstalt der Universität Basel, den 6. Mai 1947.

**Summary**

With the aid of the fluorescence microscope a redly fluorescing substance, which can be regarded as a porphyrine, is found in the pigment layer of the eyes of *Hirudo medicinalis*. As is well known, porphyrines are able to sensitize biological objects to light. It may be assumed, therefore, that the pigment in question plays a part in the perception of light stimuli.

<sup>1</sup> C. LICHTENTHALER, Le cytochrome et la respiration cellulaire (1944), S. 55.

<sup>2</sup> J. U. T. GILLMAN und S. BRENNER, Nature 156, 689 (1946).

<sup>3</sup> T. FUKUI, Z. vergl. Physiol. 4, 201 (1926).

### Etude électrophorétique des variations de composition d'extraits musculaires de Lapin sous l'influence de la fatigue et de la contracture par le monobromacétate de soude

On sait que, dans certaines conditions, on extrait moins de protéines d'un muscle fatigué que d'un muscle

au repos (DEUTICKE<sup>1</sup>); cette différence porte exclusivement sur la fraction myosine (KAMP<sup>2</sup>) et la myosine d'Edsall extraite d'un muscle fatigué présente, à l'électrophorèse, une composition différente de celle extraite d'un muscle normal (DUBUSSON<sup>3</sup>).

Nous avons abordé ce problème en réalisant des électrophorèses d'*extraits musculaires totaux*; de cette façon, les divers constituants protéiniques du muscle subissent un minimum d'altérations et l'on peut vérifier si les modifications de la myosine sont effectivement les seules importantes.

La pulpe musculaire est extraite pendant 1 heure, à 0° C, avec un volume et demi d'une solution de  $\mu = 0,35$  et de  $p_H \approx 7,40$  ( $Na_2HPO_4$  0,048 m,  $NaH_2PO_4$  0,006 m,  $NaCl$  0,2 m). On centrifuge à 0° C; le liquide surnageant est dialysé contre des solutions phosphatiques de  $p_H$  compris entre 7 et 7,5 et de  $\mu = 0,35$ .

La dialyse ne s'accompagne, dans aucun cas, de la formation d'un précipité appréciable: nos diagrammes représentent donc fidèlement toutes les protéines qui ont été extraites.

**Muscles normaux.** — La dénomination «muscles normaux» est utilisée ici avec certaines réserves: en effet, le procédé d'extraction comporte une réduction en pulpe susceptible d'exciter ces muscles, même lorsque toutes les opérations sont effectuées à 0° C. Nous ne sommes donc pas certains d'avoir extrait des protéines réellement à l'état de repos.

Nous avons déjà démontré que les extraits «normaux» de  $\mu = 0,35$  diffèrent des extraits «normaux» de  $\mu = 0,15$ , par la solubilisation de *plusieurs* globulines supplémentaires (JACOB<sup>4</sup>). Les diagrammes publiés antérieurement sont toutefois aberrants en ce sens que les extraits contenaient une quantité relativement faible de ces globulines. Pour des raisons qui ne sont pas encore complètement élucidées, les extraits étudiés ultérieurement en contenaient beaucoup plus; comme ils constituent la majorité des cas (21 sur 24), ce sont eux que nous décrirons ici.

Sur les diagrammes électrophorétiques, les globulines solubilisées entre  $\mu = 0,15$  et  $\mu = 0,35$  déforment considérablement le seul groupe médian (groupe II<sup>4</sup>, fig. 1A) dont la concentration relative est de 40 à 60% (au lieu de 20% à  $\mu = 0,15$ ) et la concentration absolue 3 mg N/cm<sup>3</sup>  $\pm$  1 mg (au lieu de 0,8 mg  $\pm$  0,2). Il ne nous a pas été possible d'enregistrer, entre les extraits de  $\mu = 0,35$  et ceux de  $\mu = 0,15$ , des variations certaines dans la concentration absolue des deux autres groupes (I et III<sup>5</sup>).

Les caractéristiques des gradients apparus au niveau du groupe II sont, en tous points, celles décrites par DUBUSSON<sup>3</sup> pour les composantes  $\alpha$  et  $\beta$  de la myosine d'Edsall: leurs vitesses ascendantes de migration sont, au même  $p_H$ , pratiquement identiques ( $\alpha: 2,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V/sec}$ ;  $\beta: 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V/sec}$ ) et il existe également, entre les diagrammes ascendant et descendant, une asymétrie importante qui semble témoigner d'interactions entre ces composantes. Le rapport des concentrations  $\alpha/\beta$  est compris entre  $\frac{1}{4}$  et  $\frac{1}{2}$ .

Dans la plupart des cas, il n'a pas été possible de discerner la troisième composante électrophorétique de la myosine d'Edsall ( $\gamma$ ), qui est masquée par le groupe I et  $\beta$ .

Il est malaisé d'établir des relations certaines entre les composantes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  du groupe II à la force ionique

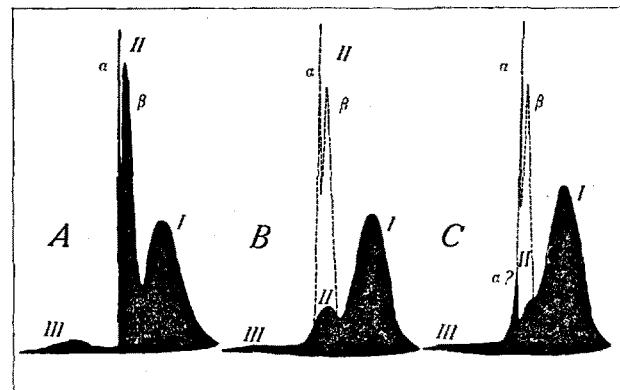


Fig. 1. Diagrammes électrophorétiques (selon LONGSWORTH) d'extraits de muscles de Lapin. Force ionique 0,35. A Muscles normaux.  $p_H$  7,05-1,35 V/cm  $\cdot$  52600 sec d'électrophorèse. B Muscles fatigués.  $p_H$  7,30-1,38 V/cm  $\cdot$  53700 sec d'électrophorèse. C Muscles contracturés.  $p_H$  7,10-1,30 V/cm  $\cdot$  52200 sec d'électrophorèse. En traits interrompus, représentation schématique des gradients  $\alpha$  et  $\beta$  des muscles normaux témoins.

0,35 et les composantes  $j$ ,  $k_2$  et  $k_1$  de ce même groupe à la force ionique 0,15. Ces dernières contiennent vraisemblablement un peu de myosine (JACOB<sup>1</sup>) et les phosphorylases  $\alpha$  et  $\beta$  (JACOB<sup>2</sup>). Il n'est peut-être pas inutile de souligner la parenté électrocinétique des phosphorylases et des myosines.

**Muscles fatigués.** — Les muscles sont fatigués *in situ* et jusqu'à épuisement par faradisation de leur nerf moteur: la phase terminale de cette faradisation est effectuée en conditions anaérobiques grâce à l'interruption de la circulation sanguine. Les résultats ont été comparés chaque fois avec ceux fournis par les muscles symétriques, normaux, du même animal.

Les extraits sont moins concentrés en protéines (30 à 50%) et beaucoup moins turbides que les extraits normaux témoins. Sur les diagrammes électrophorétiques (fig. 1B), le groupe II ( $\mu = 0,35$ ) est représenté par un gradient peu homogène, dont le sommet migre avec une vitesse voisine de celle de  $\beta$ ; la bande  $\alpha$  n'y peut-être décelée; les asymétries anode-cathode n'apparaissent plus. La concentration relative du groupe II est tombée à 20-25%, sa concentration absolue très approximativement à 1 mg de N/cm<sup>3</sup>. L'aspect et la concentration des autres groupes ne semblent pas modifiés.

Ces résultats confirment ceux de KAMP<sup>3</sup>, en limitant à la fraction myosine les modifications de solubilité que l'on peut déceler au moyen des méthodes utilisées jusqu'à présent; ils confirment aussi ceux de DUBUSSON<sup>4</sup>, en ce qui concerne l'insolubilisation massive de la myosine  $\alpha$ . Enfin, le taux de  $\beta$  est fortement réduit par rapport au témoin, mais il est vraisemblable que la bande diffuse du groupe II en contient encore une certaine quantité. Les modifications d'aspect du groupe II des

<sup>1</sup> H. J. DEUTICKE, Z. physiol. Chemie 210, 97 (1932).

<sup>2</sup> F. KAMP, Biochem. Z. 307, 226 (1941).

<sup>3</sup> M. DUBUSSON, Exper. 2, 258 (1945).

<sup>4</sup> J. JACOB, Biochem. J., 41, 83 (1946) et Exper. 2, 110 (1946).

<sup>5</sup> Les mesures sont assez imprécises pour les raisons suivantes: le caractère très aigu d'un gradient ( $\alpha$ ), l'étalement considérable et la fragmentation médiocre des groupes I et III relevant de la force ionique élevée que nous avons dû utiliser, enfin et surtout la différence considérable du contraste entre deux moitiés d'un même diagramme (du type LONGSWORTH) qu'occasionne la turbidité intense migrant avec  $\alpha$ .

<sup>1</sup> J. JACOB, loc. cit.

<sup>2</sup> J. JACOB, Biochem. J., sous presse (1947).

<sup>3</sup> F. KAMP, loc. cit.

<sup>4</sup> M. DUBUSSON, loc. cit.

extraits de Lapin sont très semblables à celles que nous avions observées sur des diagrammes d'extraits de muscles de Grenouille (DUBUSSON et JACOB<sup>1</sup>); toutefois chez ce dernier animal, elles pouvaient être observées à la force ionique 0,15, alors que, chez le Lapin, nous n'avons pu les mettre en évidence qu'en utilisant une force ionique de 0,35.

*Muscles contracturés par le monobromacétate de sodium.* - 1 cm<sup>3</sup> d'une solution à 15% de monobromacétate de sodium a été injectée dans une des artères iliaques; après une demi-heure environ, les muscles sont rigides; l'autre patte, dont les vaisseaux ont été obturés<sup>2</sup> reste souple et sert de témoin.

Les extraits de muscles contracturés sont moins concentrés et moins turbides que ceux des muscles témoins. Les différences portent, encore une fois, sur le groupe II. Celui-ci comprend deux gradients (fig. 1C): le plus rapide est assez aigu, relativement peu développé, accompagné de turbidité et légèrement asymétrique; il migre avec une vitesse voisine de celle de la myosine  $\alpha$ . Le plus lent est diffus, et son sommet migre avec une vitesse nettement inférieure à celle de la myosine  $\beta$ . L'ensemble représente 20 à 30% des protéines totales de l'extrait, soit très approximativement 1,2 mg N/cm<sup>3</sup>.

Il y a donc, comme dans le cas du muscle fatigué, une diminution importante de la solubilité des myosines  $\alpha$  et  $\beta$ ; toutefois, dans le cas de la contracture monohalogénée, la composante  $\alpha$  serait moins affectée tandis que, au contraire, la bande diffuse contiendrait moins de myosine  $\beta$ . Une action directe du monobromacétate sodique sur les protéines musculaires est peu probable: l'addition de 1,5% de monobromacétate à un extrait «normal» (durée d'action 12 heures) n'en modifie pas la composition.

*En conclusion: les principales fractions de la myosine (myosines  $\alpha$  et  $\beta$  de DUBUSSON) sont toutes deux entreprises lorsqu'on soumet un muscle à une excitation extrême ou à la contracture monohalogénée. Leurs variations, toujours considérables, n'évoluent toutefois pas de façon absolument parallèle, ce qui impliquerait une espèce de spécialisation fonctionnelle pour chacune d'elle.*

J. JACOB

Laboratoire de biologie générale, Faculté des sciences, Université de Liège, le 2 avril 1947.

### Summary

Rabbit muscular globulins soluble between the ionic strengths 0.15 and 0.35 are, in an almost native state, the  $\alpha$  and  $\beta$  myosins of DUBUSSON. The extractability of both,  $\alpha$  and  $\beta$ , by salt solutions is greatly reduced when the rabbit muscle has been stimulated to exhaustion or poisoned with the sodium salt of monobromacetic acid till a state of rigor is obtained. This reduction however does not proceed in an absolutely similar way for  $\alpha$  and  $\beta$ , indicating probable functional differences between these two myosins. The other soluble muscular proteins are practically not affected, as far as the method permits this to be ascertained.

<sup>1</sup> M. DUBUSSON et J. JACOB, Rev. Can. Biol. 4, 426 (1945); Exper. 1, 273 (1945).

<sup>2</sup> Cette ischémie, pas plus que l'anesthésie de l'animal, ne modifie les diagrammes «normaux» de façon appréciable.

### Sur le rôle des groupes thiol dans la coagulation du plasma sanguin

L'hypothèse que la transformation du fibrinogène en fibrine est accompagnée de l'oxydation de groupes thiol

de la protéine en groupes disulfure a été récemment défendue d'une manière particulièrement frappante par LYONS<sup>1</sup>. Suivant cet auteur l'action de la thrombine sur le fibrinogène serait double et s'exercerait en deux étapes. Au cours de la première les groupes -SH «cachés» du fibrinogène seraient mis en évidence. Au cours de la seconde il se formerait à partir d'eux des ponts -S-S- unissant les molécules les unes aux autres. Cette dernière transformation résulterait de l'action de la vitamine K présente dans la thrombine sur les -SH libérés. L'analogie existant à première vue entre le mécanisme de la formation de la fibrine conçue de cette manière et le mécanisme de la kératinisation pourrait indiquer le caractère général de pareil processus et son intérêt pour l'étude cytochimique du mécanisme de l'édification des structures intracellulaires. Cette perspective nous a incité à tenter en premier lieu une vérification du rôle des -SH dans la coagulation du plasma sanguin. Nous avons profité à cet effet de l'expérience acquise au cours de ces dernières années par BACQ, DESREUX et leurs collaborateurs dans l'étude de l'action exercée sur les protéines par de nombreux corps organiques halogénés susceptibles de réagir avec leurs groupes -SH «libres» et «cachés» en donnant naissance à des composés de substitution de type R-S-R' ou en provoquant l'apparition de groupes disulfure (bibliographie dans BACQ<sup>2</sup>). Parmi les corps de cette catégorie nous avons utilisé l'iodacétamide, la chloropicrine, la sulfone et le sulfure de dichloroéthyle<sup>3</sup>. Nous avons en outre fait appel à la propriété que possède l'acide maléique de se combiner avec les fonctions thiol des protéines (MORGAN et FRIEDMAN<sup>4</sup>).

Tous ces corps, dissous ou, s'ils sont peu solubles dans l'eau, mis en suspension dans un faible volume de tampon au borate de  $p_H$  8,4 sont ajoutés à du plasma de poule non oxalaté et laissés au contact de celui-ci pendant quelques heures à 20°C. Le plasma ainsi traité et du plasma témoin auquel seul du tampon au borate a été ajouté sont portés à 30°C. Dans ces conditions la coagulation du plasma témoin s'effectue en 30 à 60 minutes. Celle du plasma traité par l'iodacétamide 0,05 M, l'acide maléique 0,1 M, la sulfone et le sulfure de dichloroéthyle est par contre totalement inhibée. Enfin, en présence de chloropicrine, une influence opposée se manifeste: la coagulation se produit en quelques minutes ou même se trouve déjà réalisée pendant le séjour du plasma à la glacière. Les mêmes différences s'observent lorsque de la thromboplastine, préparée suivant la technique de CHARGAFF<sup>5</sup>, est ajoutée aux divers tubes en petite quantité et que le temps de coagulation se trouve ainsi notablement diminué.

L'analyse du mécanisme des deux types d'influences qui peuvent s'exercer ainsi sur la coagulation du plasma total a été ébauchée. Les résultats obtenus jusqu'à présent sont les suivants:

<sup>1</sup> Le blocage des -SH libres et cachés de la thromboplastine par l'iodacétamide ou la chloropicrine, contrôlé par la disparition de toute réaction avec le ferri-cyanure, ne modifie pas son activité de manière appréciable. Ce n'est donc pas à ce niveau qu'agissent les corps étudiés.

<sup>1</sup> R. N. LYONS, Austr. J. exp. Biol. Med. 22, 131 (1944); Nature 155, 633 (1945).

<sup>2</sup> Z. M. BACQ, Exper. 2, 349, 385 (1946).

<sup>3</sup> Nous sommes redevables à M. Z. M. BACQ d'avoir pu utiliser ces divers corps et le prions de trouver ici nos remerciements.

<sup>4</sup> E. J. MORGAN et E. FRIEDMAN, Biochem. J. 32, 733, 862 (1938).

<sup>5</sup> E. M. CHARGAFF, H. DAN et A. BENDICH, J. biol. Chem. 145, 593 (1942).