

blood serum was rendered quantitatively saltfree and any coagulation of proteins was avoided.

Under conditions of sterility these highly concentrated saltfree protein solutions show a remarkable stability.

The colloid-chemical and physiological significance of these results is discussed.

Nouvelle méthode de séparation des myosines α et β

L'électrophorèse de solutions de myosine préparée selon GREENSTEIN et EDSALL (myosine de WEBER-EDSALL) a révélé l'existence de trois composantes, les myosines α , β et γ de DUBUISSON¹. Elle a montré que la myosine α est turbide et que son pourcentage dépend fortement de l'état de repos ou de fatigue des muscles utilisés¹.

Une méthode de préparation des composantes α et β , par fractionnement au sulfate ammonique, a déjà été mise au point par DUBUISSON² et a été également employée par SZENT-GYÖRGYI³. Les conditions de force ionique et de p_H utilisées pour le fractionnement varient toutefois d'un auteur à l'autre.

Nous avons personnellement observé qu'il est nécessaire d'abaisser le p_H d'une solution de myosine saturée à 27 % en sulfate ammonique à 5,4–5,5 pour obtenir une précipitation complète de α ⁴. Ces p_H étant généralement préjudiciables à l'intégrité des protéines, nous avons cherché d'autres méthodes de séparation basées sur les différences de solubilité en fonction du p_H et de la force ionique de ces protéines. Nous avons suivi l'insolubilisation de la myosine α par observation directe de la turbidité de nos solutions après centrifugation.

Si l'on recherche les p_H de précipitation de ces protéines dissoutes dans KCl 0,5 m, on trouve que, dans la zone de p_H 5,55–5,65, α précipite complètement, laissant une solution surnageante limpide, riche en protéines; au dessus de 5,70, on n'observe pas de séparation et en dessous de 5,50, la décantation de α est partielle⁵. On peut donc également scinder ces mélanges à de faibles forces ioniques. Toutefois, la zone de précipitation est trop étroite pour que ce procédé soit applicable au point de vue préparatif. Il présente de plus, en commun avec la méthode au sulfate ammonique, l'inconvénient de réaliser la séparation à des p_H relativement acides. Cette difficulté a pu être tournée dans la nouvelle méthode que nous proposons ci-après, grâce à l'insolubilité de la myosine α dans NaAc ou KAc 0,5 m aux p_H neutres. Le mode opératoire est le suivant:

La solution diluée de myosine dans l'acétate molaire à un p_H d'environ 7,2⁶, est amenée au p_H 7,10 (lorsqu'il s'agit

de solutions pauvres en myosine α , telles que les solutions de myosine de WEBER-EDSALL) ou 7,00 (solutions riches en myosine α : myosine B de SZENT-GYÖRGYI). On ajoute lentement, au moyen d'une burette, un même volume d'eau glacée en agitant mécaniquement la solution. La biréfringence disparaît complètement entre 0,6 et 0,5 m. La solution ainsi obtenue de p_H 7,50–7,60 (myosine de WEBER-EDSALL) ou 7,15–7,30 (myosine B) donne, après centrifugation, une solution surnageante, limpide, riche en β lorsqu'on part de myosine de WEBER-EDSALL. A des p_H moindres, α se sépare plus aisément en entraînant une plus forte proportion de β : la solution limpide de β contient 60 à 70 % du mélange, lorsque le p_H final de précipitation est de 7,50–7,60, 40 % environ lorsqu'il est de 7,00–6,50.

Un fractionnement meilleur encore peut être obtenu par dialyse de solutions de myosine 0,85 m en acétate et 0,05 m en phosphate de p_H 7,6 contre des solutions de même composition et p_H et de force ionique moindre. Dans ce cas, α ne se sépare complètement par centrifugation que lorsque la force ionique de la solution de dialyse est inférieure à 0,43 (0,3 m en acétate et 0,046 m en phosphate). Nous avons amené la force ionique de nos solutions à 0,40 et déterminé les concentrations en protéines de la solution contenant en suspension la myosine α et de la solution surnageante limpide obtenue après centrifugation. Quelques résultats ont été consignés dans le tableau ci-dessous:

Nature de la myosine	Teneur en protéines %		Teneur en α en %
	avant centrifugation	après centrifugation	
Myosine de WEBER-EDSALL, temps d'extraction: 1 h 30 min no 1	1,56 1,65	1,30 1,45	17 12
Myosine de WEBER-EDSALL, temps d'extraction: 1 h 30 min no 2	1,13	0,99	12,3
Myosine de WEBER-EDSALL, temps d'extraction: 20 min	1,34	1,2	10,4

Ces chiffres ne peuvent être comparés avec la valeur de 25 % trouvée par électrophorèse (DUBUISSON¹), étant donné que les muscles utilisés au cours de nos expériences avaient été préalablement plongés dans l'eau glacée, et que DUBUISSON a montré récemment² que dans ce cas on a affaire à des muscles stimulés et, par conséquent, livrant peu de myosine α . Les teneurs peu élevées obtenues montrent néanmoins que la coprecipitation est très faible dans ces conditions malgré les fortes concentrations en protéines auxquelles le fractionnement a lieu. La méthode semble donc susceptible d'être également utilisée pour le dosage de la myosine α dans différents extraits musculaires.

G. HAMOIR

Laboratoire de biologie générale, Faculté des sciences, Université de Liège, le 3 septembre 1947.

¹ M. DUBUISSON, Exper. 2, 258 (1946).

² M. DUBUISSON, Exper. 2, 412 (1946).

³ A. SZENT-GYÖRGYI, Muscular contraction. Acad. Press, N. Y., 1947.

⁴ Sauf indication contraire, il s'agit de myosines préparées selon GREENSTEIN et EDSALL⁷ mais avec un temps d'extraction de vingt minutes seulement.

⁵ L'insolubilisation bien connue de la myosine d'EDSALL dissoute dans KCl 0,5 m, en dessous du p_H 6 (EDSALL⁸) ou 5,8 (DUBUISSON⁹), correspond donc surtout à la précipitation de la composante α .

⁶ La myosine à fractionner peut aussi être dissoute dans une solution 0,85 m en acétate et 0,05 m en phosphate, de façon à éviter les modifications de p_H par dilution.

⁷ J. P. GREENSTEIN et J. T. EDSALL, J. biol. Chem. 123, 397 (1940).

⁸ J. T. EDSALL, J. biol. Chem. 89, 289 (1930).

⁹ M. DUBUISSON, Arch. intern. Physiol. 51, 133 (1941).

¹ M. DUBUISSON, Exper. 2, 258 (1946).

² M. DUBUISSON, Exper. 3, 372 (1947).

Summary

Myosin α is insoluble in KAc or NaAc 0.5 M at neutral p_H values and can be easily separated from myosin β under these conditions. The yield in myosin β is 80 to 90% of the total protein content of our solutions (WEBER-EDSALL myosin solutions prepared after 20 minutes extraction).

Experimental Investigations of the Proliferative Activity of Erythroblasts in their Different Stages of Maturation

The estimation of the proliferative activity of bone marrow cells is commonly based on the mitotic index and on FIESCHI's karyologic curve. These two elements have only a relative value. The former, in fact, is the result of two factors: the duration of the kinetic period and the duration of the medium interkinetic one. The latter does not only depend on the number of the cells entering into mitosis but also on the duration of each mitotic stage. We ought therefore to gain a more precise knowledge about the manner of reproduction of bone marrow cells; we are for instance at present unable to state whether the reproductive activity of leucæmic cells is higher than the reproductive activity of corresponding normal hæmopoietic cells.

In regard also to the erythroblasts of different stages of maturation, it is not yet established whether more basophilic or more polychromatophilic erythroblasts are reproduced. The small degree of reproductiveness of orthochromatic erythroblasts may, on the contrary, be assumed with considerable probability.

In order to reach a more exact estimation of the proliferative activity of bone marrow cells, it seemed justified to us to work out a method of investigation that is based upon the karyoclastic action of colchicine. It is known that this substance, in suitable concentrations, stops the mitotic process at the beginning of the metaphase (stathmokinesis). Thus, a progressive accumulation of mitotic divisions is formed in the examined tissue and it is to be presumed that the greater the number of these mitotic shapes is, the higher the reproduction must be. If it is so, it should be possible to estimate the proliferative activity of the tissue examined by the number of mitoses after the colchicinic check.

As to the techniques followed we refer to the publication *in extenso*. Here we shall merely mention that the observations were carried out on cultures of normal human bone marrow *in vitro*. The cultures were prepared in hanging drops with a medium composed of 1 cm³ of human plasma, 0.4 cm³ of chicken plasma (the plasmas were treated with Liqueur Roche), 0.4 cm³ of embryonic extract, and 0.2 cm³ of colchicine solution. The colchicine concentrations varied from 1:1 million to 1:40 millions. Control cultures were made in which the colchicine solution was replaced by 0.2 cm³ of Tyrode. In the course of 36 hours, smears were made of the cultures every 2 hours. The preparations were stained with May-Grünwald-Giemsa and the following data were determined: (1) The total erythroblastic mitotic index, (2) the separate mitotic indices for basophilic, polychromatophilic and orthochromatic erythroblasts, (3) PONTE's maturation curves.

The concentrations of 1:1 million appeared particularly suitable to the purpose, as they completely stop the evolution of all erythroblastic mitoses. With colchicine solutions in a greater dilution a certain percentage

of mitoses on the contrary can evolve more or less slowly beyond the metaphase up to the accomplishment of the whole mitotic cycle.

The global mitotic index was, in the beginning, 12 to 20%. In control cultures (without colchicine) the global mitotic coefficients are inferior to the initial values during the first hours, whilst the initial or slightly higher values are reached at about the 16th hour. In the cultures containing 1:1 million colchicine the mitotic index is lower during the first 4–6 hours. During the next hours it reaches progressively higher values, until it attains, within the 14th–20th hour, the highest values of 40–100%. The lower values may be observed in those cultures where during the first 24 hours there is already a striking tendency of the erythroblasts to become mature. The highest values are reached in those cultures where such a phenomenon is not observed. We can therefore state that there is an antagonism between maturation and global reproductive activity.

Let us now examine erythroblasts in their single stages of maturation. As to orthochromatic erythroblasts, no mitosis is observed, except in rare cases. We can therefore state that orthochromatic erythroblasts may be reproduced as an exception; their mitotic reproduction has therefore no significant influence on the proliferative activity of the erythroblastic tissue as a whole.

With regard to the mitotic coefficient of basophilic and polychromatophilic erythroblasts, the former is generally at the beginning but slightly superior to the latter. In colchicine cultures with checking doses, the mitotic coefficient of basophilic erythroblasts within the 15th–20th hour usually shows values of which some amount to 200%; this is observed as well when the transplanted marrow shows a striking maturative tendency as when, on the other hand, it remains indifferent. Polychromatophilic erythroblasts reach mitotic coefficients of about 45–90%. Also in this case there is no significant difference between marrows showing a clear maturative tendency and marrows indifferent in this respect. *We can therefore state that the proliferative activity of basophilic erythroblasts is decidedly superior to that of the polychromatophilic erythroblasts: during cellular maturation the proliferative activity is then progressively prevented* (reduction of cells entering in mitosis and extension of the kinetic period). Moreover, the mitotic activity of the single reproductive cells (basophilic and polychromatophilic erythroblasts) does not show any variation in regard to the maturative activity. Therefore, if there is an antagonism between maturation and global proliferative activity, this appears only for the increased number of the erythroblasts of those stages which are unsuitable (or less suitable) for reproduction.

G. ASTALDI, A. ALLEGRI, and C. MAURI

Istituto di Clinica medica dell'Università di Pavia,
September 15, 1947.

Zusammenfassung

Die Proliferationsintensität der Knochenmarkszellen ist noch nicht genau bekannt. Die Verfasser haben an menschlichen Knochenmarkkulturen die stathmokinetische Kolchizinmethode (DUSTIN) angewendet. Hiermit sollte ein Test für die Proliferationsaktivität der Markzellen gefunden werden.

Nach Kolchizinblockade zeigt sich ein Erythroblasten-/Mitosen-Index von 40–100%. Dieser Index ist als Vergleichswert für die Erythroblasten-Proliferationsintensität in pathologischen Zuständen zu benutzen. Versuche in dieser Richtung sind im Gang.