

Zusammenfassung

Der Körpersaft aus einer zerdrückten Erdkrötenquappe von *Bufo bufo* in 1 bis 10 l Wasser verdünnt löst eine Fluchtreaktion der lebenden Erdkrötenquappen aus. Die die Fluchtreaktion auslösende Substanz wird auch von lebenden Kaulquappen bei Beunruhigung sezerniert. Die Reaktionsfähigkeit wird in großem Maße vom Ernährungszustand beeinflusst. Die wässrigen Extrakte aus Kaulquappen von *Bufo viridis* und *Rana esculenta* wie auch die Extrakte aus der Haut der erwachsenen Erdkröten verursachen die gleiche Fluchtreaktion. Der Schreckstoff kann in Äther ausgeschüttelt werden. Extrakt aus den Blättern von *Digitalis purpurea* bewirkt die Reaktion in derselben Weise wie Extrakt aus den Erdkrötenquappen. Extrakt aus Erdkrötenquappen löst beim Bitterling (*Rhodeus sericeus* PALL.) die gleiche Fluchtreaktion aus wie der Extrakt aus diesem Fisch.

Sur les protéines de structure des muscles striés

D'après MATOLTSY et GERENDÁS¹, si l'on traite de la pulpe de muscle de Lapin tout d'abord par une solution de Weber (0,6 m KCl, 0,04 m NaHCO₃, 0,01 m Na₂CO₃) pour éliminer l'actomyosine et la myosine, puis par une solution 0,6 m NaI pour éliminer l'actine (sous une forme dépolymérisée), on peut alors préparer, au moyen de solutions de Weber contenant 30 % d'urée, un extrait possédant une biréfringence négative d'écoulement. La protéine responsable de cette propriété serait la même que la protéine de structure signalée, en 1940, par BANGA et SZENT-GYÖRGYI² et qui est si abondamment représentée dans le tissu rénal; elle est riche en P² et possède dans l'U.V. le spectre particulier des nucléoprotéines¹. Elle reçut, de ce fait, la dénomination: *N protéine*¹.

L'intérêt de cette substance réside dans ce fait qu'elle serait localisée *in vivo* dans les disques I où sa biré-

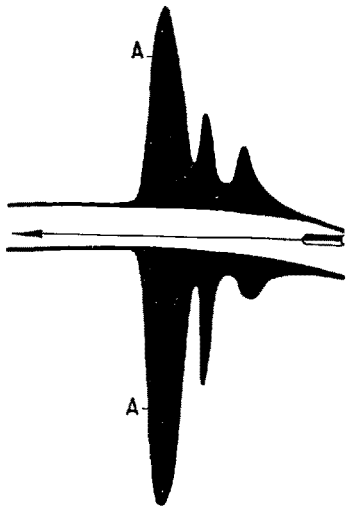


Fig. 1. – Tracé électrophorétique d'un extrait musculaire préparé par l'action de 1,5 vol. de KI 0,6 m sur de la pulpe musculaire de Lapin, débitée au microtome à congélation et de laquelle la myosine avait été enlevée par trois lavages successifs avec trois volumes de la solution de Weber. Au-dessus, frontières ascendantes; en dessous, frontières descendantes, après 7 heures d'électrophorèse (1,5 volt/cm) à μ 0,40 et p_H 7,40. A gradient de l'actine.

¹ A.G.MATOLTSY et M.GERENDÁS, *Nature* 159, 502 (1947); *Hung. acta physiol.* 1, 116 et 128 (1928).
² I.BANGA et A.SZENT-GYÖRGYI, *Enzymologia* 9, 111 (1940).

fringence négative d'orientation y serait exactement compensée par la biréfringence positive d'orientation des filaments d'actomyosine¹.

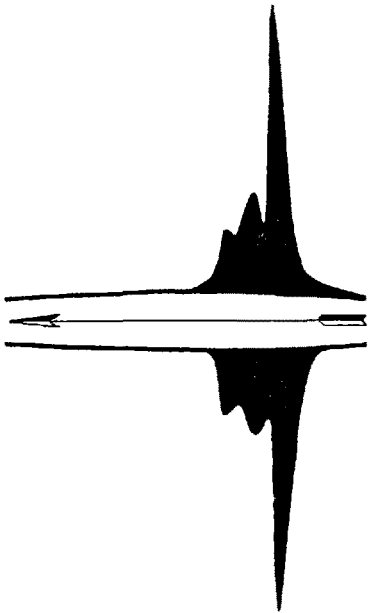


Fig. 2. – Même pulpe musculaire que la fig. 1, mais après action de la solution de Weber et de la solution de KI, la pulpe est extraite maintenant avec la solution de Weber contenant 30 % d'urée. 5 h. 15 min. d'électrophorèse (1,5 volt/cm) à μ 0,40 et p_H 7,40.

Procédant dans des conditions de préparation aussi semblables que possible à celles signalées par ces auteurs, nous avons constaté ce qui suit:

Lorsque l'on a extrait, de la pulpe musculaire, la totalité de la myosine β et de l'actomyosine extractibles, par trois lavages consécutifs au moyen d'une solution de Weber (KCl 0,6 m, NaHCO₃ 0,04 m, Na₂CO₃ 0,01 m, chaque fois trois volumes de solution), on peut, en utilisant 1,5 volume d'une solution de KI à 9,96 % (0,6 m), enlever de nouvelles protéines qui présentent l'aspect électrophorétique de la fig. 1. On y voit trois composantes dont la plus rapide est l'actine dépolymérisée² (A, vitesse à μ 0,40 et p_H 7,40: $-4,55 \cdot 10^{-5}$ cm/sec (asc.) et $-4,6 \cdot 10^{-5}$ cm/sec (desc.). Les deux autres, de vitesses $-3,4$ et $-2,45$ (asc.) ou $-3,3$ et $-2,2$ (desc.) correspondent à des composantes inconnues).

Si l'on traite ensuite la pulpe par la solution de Weber additionnée de 30 % d'urée, on extrait encore d'autres protéines (25 cm³ contenant de 1,1 à 1,4 mg N/cm³, pour 14 g de muscle) dont les caractéristiques électrophorétiques sont représentées fig. 2. Il y a trois composantes dont les vitesses (à μ 0,40 et p_H 7,4) et les concentrations sont:

asc.	desc.	Conc.
-2,6	-2,05	64,9%
-3,25	-2,95	26,2%
-4,10	-3,75	8,8%

¹ A.G.MATOLTSY et M.GERENDÁS, *Nature* 159, 502 (1947); *Hung. acta physiol.* 1, 116 et 128 (1948).
² M.DUBUISSON, *Biochim. et biophys. acta*, sous presse.

Aucune de ces dernières préparations n'a jamais présenté les moindres propriétés vectorielles vis-à-vis de la lumière polarisée, ni négative ni positive.

M. DUBUISSON et C. FABRY-HAMOIR

Laboratoire de biologie générale de l'Université de Liège, le 15 novembre 1949.

Summary

It is true that after having extracted the myosin, actomyosin, and actin components of a striated muscle, it is possible to obtain still other proteins when Weber's urea solution is used. We could not confirm that those proteins are of a fibrillary nature: their solution never showed negative or positive double refraction of flow.

Sur la polymérisation de la G-actine

Dans un récent travail¹, nous avons signalé que la polymérisation de la G-actine, sous l'influence de sels de K ou de Ca (phénomène décrit pour la première fois par STRAUB²) était accompagnée d'un changement appréciable du point isoélectrique de la protéine, comme le démontrent les différences de vitesses électrocinétiques entre les solutions de G-actine et de F-actine ainsi que la libération d'équivalents acides au moment de la polymérisation.

STRAUB signalait simultanément³ que la G-actine contient toujours environ 1% d'ATP, sous une forme combinée et que, lors de la transformation G-actine-F-actine, cet ATP est transformé en ADP.

Ces résultats étaient intéressants à rapprocher des nôtres: on pouvait penser, *a priori*, que c'est à la libération de H_3PO_4 du groupement prosthétique (ATP) de l'actine qu'est due la libération d'équivalents acides et la modification de la vitesse électrocinétique de la protéine.

Nous avons pu confirmer que les préparations d'actine contiennent, outre une certaine proportion de phosphates, une certaine quantité d'ATP (de 0,6 à 2%, selon les échantillons d'actine: précipitation de la protéine par l'acide trichloracétique et dosage des phosphates, avant et après hydrolyse (7 minutes) par la méthode d'ALLEN, au photomètre). Mais la polymérisation de la G-actine par $CaCl_2$ (0,05 M) ne modifie en rien la distribution de ces phosphates: nous ne pouvons donc confirmer qu'elle s'accompagne de l'hydrolyse, en tout ou en partie, de l'ATP accroché à la G-actine. Ceci exclut la possibilité d'expliquer la libération d'équivalents acides par cette hydrolyse. D'ailleurs, il est aisé de calculer que si 1 g d'actine libère, lors de sa transformation en F-actine, $45 \cdot 10^{-5}$ Equiv. acides¹ – et si celle-ci est due à la transformation ATP–ADP – elle devrait correspondre, au $p_H \sim 7,20$, à un taux de 33% d'ATP accroché à l'actine.

L'origine du changement du point isoélectrique de la G-actine au moment de sa polymérisation en F-actine reste donc indéterminée.

M. DUBUISSON et L. MATHIEU

Laboratoire de biologie générale, Faculté des sciences, Université de Liège, le 15 novembre 1949.

¹ M. DUBUISSON, First Int. Congress of Biochemistry, Cambridge, 1949, p. 132, et *Biophys. acta*, sous presse.

² F. B. STRAUB, *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* 2, 3 (1942); 3, 23 (1943) et *Hung. acta physiol.* 1, 150 (1948).

³ F. B. STRAUB, First Int. Congress of Biochemistry, Cambridge, 1949, p. 127.

Summary

It is true that a certain amount of ATP is bound to the G-actin extracted by STRAUB's method, but we could not confirm that ATP is hydrolysed when G-actin is transformed in F-actin.

The changes of isoelectric point when G-actin is polymerized in F-actin remain thus unexplained.

Über den Chemismus von Zustandsänderungen des Aktomyosins

Einleitung. Aus den Versuchen von H. H. WEBER¹ an Aktomyosinfäden, und von SZENT-GYÖRGYI² auch an Muskelfasern, geht deutlich hervor, daß Aktomyosin³ das kontraktile Element des Muskels ist. Da die Verwendung der Fäden gewisse Schwierigkeiten bietet, benutzen wir eine einfachere Methode, die quantitative, exakt reproduzierbare Messungen von Zustandsänderungen des Aktomyosins (AM) und den Einsatz der für chemische Untersuchungen notwendigen größeren Substanzmengen gestattet. Trotz Verwendung von unorientiertem Gel liefert sie für unsere Fragestellung die gleichen Ergebnisse wie Versuche mit Fadenknäueln (BUCHTHAL⁴).

Mit dieser Methode haben wir Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Ionen, von p_H -Verschiebungen, von Adenylsäureabkömmlingen und Phosphokreatin auf die «Kontraktion» und «Erschlaffung» des Aktomyosins unternommen (Kontraktion und Erschlaffung werden im folgenden im Sinn einer Volumenverringerung bzw. Vermehrung des Gels verwendet). Um die Beteiligung bestimmter Gruppen im AM bei der Kontraktion zu prüfen, haben wir ferner der Reihe nach SH -, NH_2 - und $COOH$ -Gruppen blockiert.

Methodik. Eine genau abgemessene Menge Aktomyosin wird in kalibrierten Mikroröhrchen (1 cm³ Fassung) nach Zufügen von Magnesiumchlorid, Kaliumchlorid, Adenosintriphosphat (ATP) bzw. Adenylsäure (AS) und der zu untersuchenden Substanzen und Mischen bei 1500 Umdrehungen pro Minute 5 Minuten zentrifugiert; die Säulenhöhe des Gels im Vergleich zu dem Kontrollversuch gibt ein Maß für die erfolgte Zustandsänderung des AM (Abb. 1). Die Streuung der so erhaltenen Werte geht aus Abb. 2 hervor. Es ist gleichgültig, ob man vor dem Zentrifugieren $\frac{1}{2}$ oder 10 Minuten wartet, ebenso ob man bei etwa 5° oder Zimmertemperatur arbeitet.

Wirkung von ATP, Magnesium und Kalium. Mit gleichem Ergebnis wie SZENT-GYÖRGYI⁵ erreichen wir eine optimale Kontraktion mit Konzentrationen von ATP bei $2 \cdot 10^{-6}$ mol/cm³, von Magnesium bei $2 \cdot 10^{-6}$ mol/cm³ (Abb. 3) und von Kaliumchlorid in einem Bereich von etwa 0,1 bis 0,05 mol/cm³. Bei etwa 0,2 M KCl vermag sich das AM-Gel auf ATP-Zugabe nicht mehr zu kontrahieren; entsprechendes Verdünnen mit Wasser stellt die Kontrahierbarkeit wieder her (Abb. 4). Vielleicht geben diese Befunde eine Erklärungsmöglichkeit für das Vorhandensein von ATP in der ruhenden Muskelzelle⁶.

p_H -Abhängigkeit der Kontraktion und Erschlaffung. Einen bemerkenswerten Einfluß auf die Kontraktion haben wir bei p_H -Änderungen gesehen. Schon eine Verschiebung des p_H im Reaktionsmilieu von 6,9, bei dem die oben geschilderten Grundversuche angestellt wurden, um wenige Zehntel- p_H etwa nach 7,3, führte statt

¹ H. H. WEBER, *Erg. Physiol.* 36, 109 (1933).

² A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction*, Acad. Press., Inc., Publishers, New York, 1947, S. 73.

³ Identisch mit dem «wasserunlöslichen Myosin» der älteren Literatur.

⁴ F. BUCHTHAL, A. DEUTSCH, G. G. KNAPPEIS und A. MUNCH-PETERSEN, *Acta physiol. Scand.* 16, 326 (1949).

⁵ A. SZENT-GYÖRGYI, l.c., S. 36.

⁶ F. BUCHTHAL, A. DEUTSCH und G. KNAPPEIS, *Nature* 153, 774 (1944).