

and not only give the staining effect through a solution mechanism.

In conclusion. The cuticle of *Fasciola hepatica* is proteinaceous in nature. It is provided with a rim containing mucopolysaccharides or mucoproteins. The cuticle contains glycogen and sudsophilic substances which might be of lipid nature.

Zusammenfassung. Die Cuticula von *Fasciola hepatica* ist von proteinähnlicher Natur und von einem Saum aus

Mucopolysacchariden oder Mucoproteiden umgeben. Sie enthält Glycogen und sudsophilic, wohl lipidähnliche Substanzen.

N. BJÖRKMAN, W. THORSELL, and E. LIENERT

Department of Anatomy and Histology and Department of Chemistry, Veterinary College, Stockholm (Sweden), and Pharmakologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule, Wien (Austria), September 4, 1962.

Adénosine triphosphatase et pyrophosphatase des chloroplastes

Diverses recherches concernant l'activité de l'adénosine triphosphatase (ATPase)¹ des chloroplastes de feuilles vertes ont donné lieu jusqu'à présent à des conclusions contradictoires. Contrairement à AVRON et JAGENDORF^{2,3} et à ARNON⁴, WESSELS et BALTSCHEFFSKY⁵ ont montré que les chloroplastes de feuilles d'épinards contenaient une ATPase et de plus une pyrophosphatase, chacun de ces deux enzymes étant caractérisé par un pH optimum différent et bien défini. Par ailleurs, FORTI⁶ a purifié à partir d'homogénats de feuilles d'épinards une phosphatase possédant une activité hydrolytique vis-à-vis à la fois de l'ATP et du pyrophosphate. La présente note confirme les résultats de WESSELS et BALTSCHEFFSKY⁵ et apporte des arguments supplémentaires en faveur de la présence dans les chloroplastes de deux enzymes distincts hydrolysant respectivement l'ATP et le pyrophosphate.

Matériel et méthodes. Les chloroplastes de feuilles d'épinards sont préparés selon ARNON et al.⁷, lavés deux fois par une solution de NaCl 0,35 M et finalement mis en suspension dans une solution de NaCl 0,03 M. Le contenu en chlorophylle des chloroplastes est déterminé d'après la valeur de la densité optique à 652 m μ ⁸. Sauf indication contraire, les milieux d'incubation sont constitués ainsi: ATP ou pyrophosphate 3 μ moles, MgCl₂ 1 μ mole, Tris 20 μ moles, pH final 7,6. La réaction commence avec l'addition de la suspension de chloroplastes. Le volume total varie selon les expériences entre 400 μ l et 600 μ l. L'incubation se fait à l'obscurité et est arrêtée par addition de 100 μ l d'acide trichloracétique à 30%. L'activité de l'ATPase et celle de la pyrophosphatase sont évaluées

d'après la quantité d'orthophosphate libérée à partir de l'ATP ou du pyrophosphate. Les techniques d'isolement et de dosage de l'orthophosphate sont analogues à celles décrites dans un article précédent⁹.

Résultats. Effet du pH: En présence d'ions Mg²⁺, le pyrophosphate est hydrolysé plus rapidement que l'ATP de pH 5 à pH 7 et moins rapidement de pH 7,5 à pH 9 (Figure). Ces résultats sont en accord avec ceux de WESSELS et BALTSCHEFFSKY⁵.

Effet de la concentration en ions Mg²⁺: Lorsque l'ATP et le pyrophosphate sont utilisés à pH 7,6 et à des concentrations saturantes¹⁰, leur vitesse d'hydrolyse est dépendante de la concentration en ions Mg²⁺. Les données du Tableau I montrent que la vitesse d'hydrolyse de

Tab. I. Influence de la concentration en ions Mg²⁺ sur l'hydrolyse de l'ATP et du pyrophosphate par les chloroplastes

Exp.	Contenu en chlorophylle des chloroplastes mg	ATP ou PP μ moles	MgCl ₂ μ moles	P _i libéré à partir d'ATP μ mole	P _i libéré à partir de pyrophosphate μ mole
1	1,75	3	0	0,17	0,19
		3	0,5	0,45	0,35
		3	1,0	0,81	0,48
		3	1,3	0,55	0,47
		3	2,5	0,32	0,47
2	2,80	1,5	0,7	0,35	
		2,1	0,7	0,58	
		2,5	0,7	0,48	

Conditions: voir Matériel et méthodes. — Expérience 1: Volume total 600 μ l, Incubation 18 min à 30°. Expérience 2: Volume total 500 μ l, Incubation 15 min à 30°.

1 Abréviations: Tris: Tri(hydroxymethyl)aminométhane, FMN: Flavine mononucléotide, PMS: phénazine méthosulfate, PCMB: Para-chloromercuribenzoate de sodium, ATP: adénosine triphosphate de sodium, PP: pyrophosphate.

² M. AVRON et A. T. JAGENDORF, J. biol. Chem. 234, 967 (1959).

³ M. AVRON, Biochim. biophys. Acta 40, 257 (1960).

⁴ D. I. ARNON, Ann. Rev. Plant Physiol. 7, 325 (1956).

⁵ J. S. C. WESSELS et H. BALTSCHEFFSKY, Acta chem. scand. 14, 233 (1960).

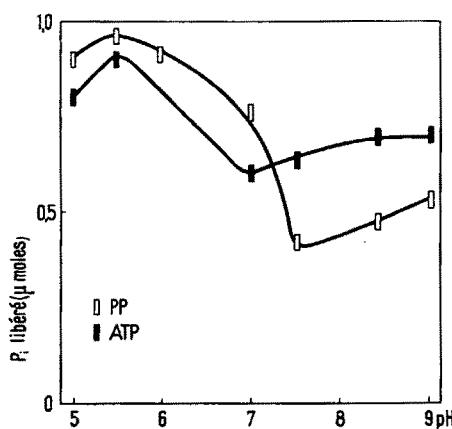
⁶ G. FORTI, Biochim. biophys. Acta 48, 200 (1961).

⁷ D. I. ARNON, M. B. ALLEN et F. R. WHATLEY, Nature 174, 394 (1954).

⁸ D. I. ARNON, Plant Physiol. 24, 1 (1949).

⁹ P. V. VIGNAIS et P. M. VIGNAIS, Biochim. biophys. Acta 43, 431 (1960).

¹⁰ A pH 7,6, la constante de Michaelis relative à l'ATP est de 1,1 \times 10⁻³ M; celle relative au pyrophosphate est de 1,8 \times 10⁻³ M.



Conditions: voir Matériel et méthodes. — Contenu des chloroplastes en chlorophylle 3,6 μ g. Volume total 550 μ l. Incubation 18 min à 30°.

l'ATP est maximum lorsque le rapport μ moles $MgCl_2$ / μ moles ATP est égal à 1/3. Par ailleurs, la vitesse d'hydrolyse du pyrophosphate devient également maximum lorsque le rapport μ moles $MgCl_2$ / μ moles PP est égal à 1/3, mais elle reste maximum lorsque la valeur de ce rapport augmente.

Tab. II. Influence du PCMB sur l'hydrolyse de l'ATP et du pyrophosphate

Exp.	Contenu en chlorophylle des chloroplastes mg	PCMB $\times 10^{-4} M$	Glutathion $\times 10^{-4} M$	P_i libéré à partir d'ATP μ mole	P_i libéré à partir de pyrophosphate μ mole
1	3,5	0	—	0,82	0,62
		1	—	0,44	0,60
		10	—	0,15	0,61
2	3,2	0	0	0,68	
		5	0	0,18	
		5	10	0,53	

Conditions: voir Matériel et méthodes. – Expérience 1: Volume total 600 μ l, Incubation 18 min à 30°. Expérience 2: Volume total 500 μ l, Incubation 16 min à 30°.

Tab. III. Effet du «vieillissement» des chloroplastes sur l'hydrolyse de l'ATP et du pyrophosphate

Temps de «vieillissement» à 30° min	P_i libéré à partir d'ATP μ mole	P_i libéré à partir de pyrophosphate μ mole
0	0,66	0,44
30	0,43	0,49
120	0,35	0,41

Conditions: voir Matériel et méthodes. – Contenu en chlorophylle des chloroplastes 3,3 mg. Volume total 400 μ l. Incubation 15 min à 30°.

Effet du PCMB: Le PCMB inhibe l'hydrolyse de l'ATP, mais non celle du pyrophosphate. L'activité ATPasique inhibée par le PCMB est régénérée par le glutathion (Tableau II).

Effet du «vieillissement» des chloroplastes: Après «vieillissement» des chloroplastes (séjour de la suspension de chloroplastes à 30° en absence de substrat), l'hydrolyse de l'ATP est notablement ralentie tandis que celle du pyrophosphate n'est pas modifiée (Tableau III).

L'ensemble de ces résultats permet de différencier dans les chloroplastes de feuilles d'épinards l'activité de l'ATPase de celle de la pyrophosphatase et indique qu'à pH 7,6 l'hydrolyse de l'ATP est due probablement en grande partie à une ATPase spécifique. Cette ATPase sensible aux ions Mg^{2+} et mise en évidence dans les chloroplastes maintenus à l'obscurité est insensible à des effecteurs positifs de la photophosphorylation: FMN, PMS, vit. K₃; elle semble donc différente de l'ATPase stimulée par la lumière, par le PMS ou le FMN^{11,12}. Ses relations avec le système plurienzymatique qui catalyse la photophosphorylation restent à préciser.

Summary. ATP hydrolysis and inorganic pyrophosphate hydrolysis in chloroplasts of spinach leaves are characterized by a different pH optimum, a different sensitivity to magnesium ions, to *p*-chloromercuribenzoate and to aging. It is concluded that ATP and inorganic pyrophosphate are likely hydrolyzed by two different enzymes in chloroplasts.

G. ABOAB¹³ et P. V. VIGNAIS¹⁴

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie et Institut d'Énergie Solaire Alger (Algérie), le 28 septembre 1962.

¹¹ B. PETRACK, Fed. Proc. 19, 329 (1960).

¹² M. AVRON, J. biol. Chem. 237, 2011 (1962).

¹³ Adresse actuelle: Département de Biologie, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Gif-sur-Yvette (France).

¹⁴ Adresse actuelle: Department of Physiological Chemistry, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore (Md., U.S.A.).

Über die Herkunft der Isovaleriansäure im Magnamycin¹

Im Magnamycin² ist die 4-Hydroxylgruppe der Mycarose mit Isovaleriansäure (I) verestert. Auch in den Antimycinen kommt I als Esterkomponente vor³. Wie unsere früheren Untersuchungen zur Biogenese des Magnamycins zeigten, werden Acetat, Propionat und *d*-Glucose nicht in die Isovaleriansäure eingebaut⁴. Es war daher zu vermuten, dass I durch Abbau des Leucins gebildet wird⁵. Um dies zu prüfen, wurde einem normalen Fermentationsansatz⁶ (250 ccm) von *S. halstedii* *L*-Leucin-[U-¹⁴C] (5 μ C = 0,11 mg, Radiochemical Centre Amersham) zugesetzt und nach 2 Tagen das nach Trägerzusatz (200 mg) isolierte Magnamycin bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt (Einbaurate 0,16%) und abgebaut⁴. Die Aktivitätsverteilung zeigt Tabelle I.

Beim direkten Übergang von *L*-Leucin-[U-¹⁴C] in Isovaleriansäure sollte man auch in der Säure eine Gleichverteilung der Aktivität erwarten. Dies ist der Fall, wie sich durch Kuhn-Roth Oxydation von I zeigen lässt (Tabelle II)⁷.

Tab. I. Aktivitätsverteilung im Magnamycin mit *L*-Leucin-[U-¹⁴C] als Vorstufe. Messungen im Proportionalzährohr mit Antikoinzidenz-anlage. Messfehler $\pm 2\%$

	ipm/mMol	% Aktivität
Magnamycin	6030	100
Carimbose	820	14
Mycarose	470	8
Isovaleriansäure ^a	4740	79

^a als *p*-Bromphenacylester.

¹ IX. Mitt. Zur Biogenese der Makrolide. VIII. Mitt. W. HOFHEINZ, H. GRISEBACH und H. FRIEBOLIN, Tetrahedron, im Druck.

² R. B. WOODWARD, Angew. Chem. 69, 50 (1957).

³ The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites (Ed. M. W. MILLER, Mc Graw-Hill Book Co., New York 1961), p. 134.

⁴ H. GRISEBACH und H. ACHENBACH, Z. Naturforsch. 17b, 63 (1962).

⁵ Metabolic Pathways (Ed. D. M. GREENBERG, Academic Press, New York 1961), vol. II, p. 102.

⁶ H. GRISEBACH und H. ACHENBACH, Z. Naturforsch. 17b, 6 (1962).

⁷ Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.