

Données physiques sur les anhydrases carboniques X₁ et Y

Les protéines érythrocytaires humaines X₁ et Y, récemment identifiées¹ à des anhydrases carboniques (EC 4.2.1.1) et préparées selon la technique de LAURENT *et al.*² se sont révélées être pratiquement homogènes à l'ultracentrifugation. Nous nous sommes proposés d'en déterminer les principales constantes physiques.

Le solvant utilisé au cours de ces déterminations est un mélange tampon de phosphates mono- et dipotassique (pH 6.5, I 0.2). Son pH a été choisi à une valeur voisine du point isoélectrique de ces protéines à la force ionique considérée³ pour éviter les effets perturbateurs de charge électrique. La valeur de la concentration protéique a été obtenue par réfraction différentielle entre solution et solvant placés en équilibre dialytique, en utilisant les incrément de réfraction spécifiques établis à partir des coefficients d'azote Kjeldahl indiqués par NYMAN⁴ (voir Tableau I).

Les constantes de diffusion D₂₀ des protéines X₁ et Y ont été calculées à partir

TABLEAU I
CONSTANTES PHYSIQUES
(système c.g.s.)

	X ₁	Y
<i>Masse moléculaire</i>		
Constante de diffusion D ₂₀	10.66 · 10 ⁻⁷	10.04 · 10 ⁻⁷
Constante de sédimentation s _{20,w} ⁰	3.23 · 10 ⁻¹³	3.30 · 10 ⁻¹³
Volume spécifique partiel (picnométrie) \bar{v}	0.737	—
Masse moléculaire (s, D)	29.6 · 10 ³	32.2 · 10 ³
Masse moléculaire (s/D; SVEDBERG)	29.1 · 10 ³	31.6 · 10 ³
<i>Hydratation</i>		
Volume spécifique partiel anhydre (D ₂ O) \bar{v}	0.740	0.740
Volume spécifique partiel hydraté (saccharose) \bar{v}^*	0.810	0.810
Eau d'hydratation (g/g) w	0.368	0.368
Degré d'hydratation en volume%	33.2	33.2
Degré d'hydratation en poids%	26.9	26.9
Facteur d'hydratation $1 + \frac{w}{\bar{v}_Q}$	1.497	1.497
<i>Forme et dimensions</i>		
Coefficient de friction f/f ₀	1.10	1.12
Viscosité intrinsèque 100[η]	2.74 [§]	—
Rapport axial a/b	≈ 1.0	≈ 1.0
Diamètre (anhydre) (Å)	41.2	42.3
Diamètre de l'unité hydrodynamique (Å)	47.0	48.3
Volume (anhydre) (Å ³)	36 385	39 581
Volume (hydraté) (Å ³)	54 468	59 253
<i>Données optiques</i> ^{§§}		
Coefficient d'absorption spécifique à 280 mμ E _{1 cm} ^{1%}	15.33	17.74
Incrément de réfraction spécifique (H ₂ PO ₄ ²⁻ /HPO ₄ ²⁻ ; I 0.2; pH 6.5)	436 mμ 1.83 · 10 ⁻³ 546 mμ 1.77 · 10 ⁻³ 589 mμ 1.76 · 10 ⁻³	2.01 · 10 ⁻³ 1.95 · 10 ⁻³ 1.94 · 10 ⁻³

[§] En première approximation.

^{§§} Établies d'après les coefficients respectifs d'azote Kjeldahl indiqués par NYMAN⁴.

des diagrammes $dn/dx = f(x)$ enregistrés à faible vitesse. Par ailleurs, l'homogénéité de chacune des deux préparations se manifeste par la relation linéaire unissant le second moment de l'aire de ces diagrammes au temps de sédimentation. La quantité disponible de X_1 , de beaucoup la plus abondante dans l'hématie, nous a permis de vérifier la valeur de cette constante par mesure de diffusion libre selon la méthode classique.

La viscosité cinématique de la protéine X_1 obtenue au moyen du viscosimètre d'UBBELOHDE a été convertie en viscosité dynamique après picnométrie. L'extrapolation à concentration nulle de la viscosité réduite a fourni la valeur de la viscosité intrinsèque $[\eta]$. Cette méthode qui nécessite une quantité relativement importante de matériel (200–300 mg) n'a permis, jusqu'à présent, qu'un nombre restreint de déterminations. Aussi, la valeur indiquée sur le Tableau I n'est-elle donnée qu'à titre indicatif. Toutefois, elle vérifie avec une très bonne approximation la valeur du rapport axial calculé à partir du coefficient de friction.

Les valeurs du volume spécifique partiel anhydre \bar{v} obtenues par picnométrie, par la méthode des gradients d'eau lourde⁵, et à partir du volume spécifique des acides aminés entrant dans la composition de la molécule protéique, sont concordantes. Ainsi, cette dernière méthode appliquée à la composition précédemment indiquée dans ce même journal⁶ fournit pour la protéine X_1 et pour la protéine Y une valeur commune et égale à 0.736 ml/g en parfait accord avec la valeur de 0.737 déterminée par picnométrie pour la protéine X_1 (Tableau I). Par contre, les valeurs fournies par la méthode des gradients d'eau lourde sont légèrement différentes mais demeurent identiques pour les deux protéines (0.740 ml/g). La valeur du volume spécifique partiel hydraté \bar{v}^* déterminée par la méthode des gradients de saccharose⁵ se révèle être identique et égale à 0.810 ml/g pour les deux protéines. Le poids d'eau d'hydratation exprimé par unité de masse a été obtenu à partir des volumes spécifiques partiels anhydre \bar{v} et hydraté \bar{v}^* .

La masse moléculaire des deux protéines a été calculée successivement par sédimentation et par équilibre de sédimentation vrai. La première méthode permet de relier la différence de masse moléculaire des deux protéines à la fois à une différence de constante de diffusion et de constante de sedimentation. Les valeurs obtenues par équilibre de sédimentation vrai sont en bon accord avec les précédentes indépendamment de la concentration protéique utilisée (0.15–0.8 g/100 ml).

Les deux abaques classiques d'ONCLEY⁷ faisant intervenir en même temps que l'eau d'hydratation, d'une part, le coefficient de friction et, d'autre part, la viscosité intrinsèque, indiquent pour les deux protéines un rapport axial voisin de 1. Les dimensions géométriques des deux molécules protéiques ont été calculées sur cette base.

Le Tableau I qui relate l'ensemble des données physiques obtenues met en évidence la parenté étroite qui existe entre les deux types moléculaires d'anhydrase carbonique.

*Laboratoire de Chimie biologique,
Faculté de Médecine et Pharmacie,
Marseille (France)*

J. REYNAUD
G. RAMETTA
J. SAVARY
Y. DERRIEN

- ¹ G. LAURENT, M. CHARREL, M. CASTAY, D. NAHON, C. MARRIQ ET Y. DERRIEN, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 156 (1962) 1461.
² G. LAURENT, C. MARRIQ, D. NAHON, M. CHARREL ET Y. DERRIEN, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 156 (1962) 1456.
³ Y. DERRIEN, G. LAURENT ET J. REYNNAUD, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 152 (1958) 971.
⁴ P. O. NYMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 1.
⁵ M. A. LAUFFER ET I. J. BENDET, *Advan. Virus Res.*, 2 (1954) 241.
⁶ G. LAURENT, M. CASTAY, C. MARRIQ, D. GARCON, M. CHARREL ET Y. DERRIEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 77 (1963) 518.
⁷ J. L. ONCLEY, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 41 (1941) 121.

Reçu le 16 Juillet 1963

Biochim. Biophys. Acta, 77 (1963) 521-523

PN 10070

The metabolism of leucine in tissue culture of skin fibroblasts of maple-syrup-urine disease

KROOTH AND WEINBERG¹ have studied the metabolic defect of galactosemia in skin fibroblasts grown in tissue culture. To apply this approach to other metabolic diseases, it is necessary that the enzyme under study be normally present in skin and that it retain its activity under conditions of tissue culture. In order to be certain that the enzyme in the normal skin fibroblast is under the same genetic control as that responsible for the metabolic defect, it is necessary to demonstrate that the skin fibroblasts grown from patients with the disease either have no activity or markedly reduced activity.

In maple-syrup-urine disease, the enzymic defect is that of oxidative decarboxylation of the ketoacids of leucine, isoleucine and valine²⁻⁴. Enzymes capable of performing this function are widely distributed in the tissues of the experimental animal⁵, suggesting that such activity may also be present in the skin.

In the present study, skin specimens were obtained from four normal subjects and from two patients with maple-syrup-urine disease. The specimens were grown

TABLE I

Results reported as observed counts/min. No correction for self absorption. Ketoacids measure transamination activity; $^{14}\text{CO}_2$ measures decarboxylation.

Source of skin		No. of "generations" [*]	Ketoacid	$^{14}\text{CO}_2$
Normal	I	approx. 15	—	885
	II	7	5475	1183
	III	6	3909	458
	IV	approx. 150	2057	126
<i>Maple-syrup-urine disease</i>				
DoRa		13	3537	0
WaBi		9	4909	0

* "generations" signifies subcultures.