

early index of anoxic myocardial damage; and (c) a comparative evaluation of the changes in the reaction for phosphorylase and in variations in the amount of the stainable, labile fraction of glycogen is of value concerning pathologic differential diagnosis, since it provides a basis for etiologic considerations.

**Résumé.** Il fut démontré que les changements précoce d'activité de la phosphorylase au niveau du myocarde

sont essentiellement différents selon qu'il s'agit d'une cardiomyopathie primaire (non-occlusive) ou secondaire (occlusive).

E. BAJUZZ and G. JASMIN

*Laboratory of Experimental Pathology, Department of Pathology, University of Montreal (Canada), March 26, 1964.*

### Solubilisation de la monoaminoxydase des mitochondries de foie de rat

Depuis la découverte par HARE<sup>1</sup> en 1928 de l'enzyme capable de catalyser l'oxydation de la tyramine, enzyme connu depuis, sous le nom d'amineoxydase, les études concernant sa structure et son mode d'action ont relativement peu progressé. Cela est dû en particulier au fait que cet enzyme qui est essentiellement localisé sur les mitochondries<sup>2</sup> est très difficile à extraire et à solubiliser. Divers auteurs ont essayé l'action d'agents solubilisants tels que le désoxycholate de sodium associé à l'action des ultrasons<sup>3</sup>, l'isoctylphénoloxypolyphénolxyéthanol<sup>4</sup>. Pour obtenir une solubilisation avec un meilleur rendement, nous avons étudié l'action de quatre produits réputés tensioactifs: la digitonine, une saponine, le tween 20 et le laurylsulfate de sodium.

**Matériel et méthodes.** Nous avons choisi comme source enzymatique la suspension de mitochondries de foie de rat, préparées selon WEINBACH<sup>5</sup>. Ces suspensions ont un degré de pureté de 95%.

Les protéines sont dosées par la méthode du biuret<sup>6</sup>.

L'activité monoaminoxydase est évaluée:

Soit manométriquement, par la consommation d'oxygène mesurée au respiromètre de Warburg, en présence de tampon phosphate (pH 7; 0,08 M) et à 38°C, selon CREASY<sup>7</sup>. Le substrat est la sérotonine, sous forme de sulfate double de sérotonine et de créatinine à la concentration de  $3,28 \cdot 10^{-3} M$ .

Soit en dosant l'ammoniac dégagé suivant la méthode de Conway.

**Action de la digitonine.** Nous avons utilisé la digitonine en nous inspirant de la technique de LEHNINGER<sup>8</sup>, pour l'obtention de fragments mitochondriaux. Les mitochondries fraîchement préparées, sont traitées par la digitonine à 0,8%, à pH 7 pendant 30 min à +1°C, puis centrifugées 30 min à 50000 g. Le surnageant est alors centrifugé à nouveau 30 min à 100000 g.

Le surnageant final possède une activité spécifique sensiblement égale à celle de la suspension initiale, mais son activité totale ne représente que 20% au maximum de l'activité initiale.

Le premier culot de centrifugation a une activité spécifique légèrement supérieure et le deuxième une activité spécifique 4 à 5 fois supérieure à celle des mitochondries de départ.

Observant donc que l'activité monoaminoxydase spécifique augmente au fur et à mesure de la rupture des mitochondries nous avons vérifié ce phénomène en soumettant une suspension de mitochondries à l'action d'un broyeur Ultraturax et en la centrifugeant successivement à 20000, 40000, 80000 g: on obtient un accroissement de

l'activité parallèle à la diminution de taille des particules: avant tout traitement nous mesurons une consommation d'oxygène de 6,9 ml de CO<sub>2</sub> par mg de protéine pendant 40 min; après broyage au turax, cette consommation passe à 7,8 pour une accélération centrifuge de 20000 g à 15 pour 40000 g, à 28 pour 80000 g.

	Activité <sup>a</sup> globale	Activité spécifique
Suspension de mitochondries de départ	6900	6,7
C <sub>1</sub> <sup>b</sup>	3900	11
S <sub>1</sub>	2000	2,6
C <sub>2</sub>	2100	15,7
S <sub>2</sub>	1000	3,6
C <sub>3</sub>	900	16,2
S <sub>3</sub>	0	0

<sup>a</sup> Activité globale:  $\mu\text{LO}_2$  consommée/40 mn/1 ml; spécifique:  $\mu\text{LO}_2$  consommée/40 mn/mg protéine.

<sup>b</sup> Centrifugation de la suspension de mitochondries de départ, traitée par le laurylsulfate de Na à 0,2%.

→ Surnageant S<sub>1</sub>

Culot C<sub>1</sub> (remis en suspension dans du saccharose 0,25 M) même traitement que la suspension de départ

→ S<sub>2</sub>

↓  
C<sub>2</sub> (traitement identique à celui de C<sub>1</sub>)

→ S<sub>3</sub>

↓  
C<sub>3</sub>

<sup>1</sup> M. L. C. HARE, Biochem. J. 22, 968 (1928).

<sup>2</sup> J. HAWKINS, Biochem. J. 50, 577 (1952).

<sup>3</sup> J. BARSKY, E. R. BERMAN and E. A. ZELLER, Abstr. Communs. 19th Intern. Physiol. Congr. (1953), p. 191.

<sup>4</sup> G. C. COTZIAS, I. SERLIN and J. J. GREENOUGH, Science 120, 144 (1954).

<sup>5</sup> E. C. WEINBACH, Anal. Biochem. 2, 335 (1961).

<sup>6</sup> A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL and N. H. DAVID, J. biol. Chem. 177, 751 (1949).

<sup>7</sup> N. H. CREASY, Biochem. J. 64, 178 (1956).

<sup>8</sup> T. M. DEVLIN and A. L. LEHNINGER, J. biol. Chem. 233, 1586 (1958).

*Action de la saponine.* Les résultats sont semblables à ceux obtenus avec la digitonine: il ne nous a pas été possible de solubiliser plus de 20% de l'activité initiale.

Nous avons fait varier la concentration en saponine de 0,5% à 5% et le pH de 7 à 8,5. La concentration optimum nous paraît être 2% et le pH 7.

*Action du tween 20* (dérivé polyoxyalkylénique du mono-laurate de sorbitol): Les surnageants obtenus se sont révélés inactifs bien que particulièrement riches en protéines; les culots sont également inactifs, et ceci semble dû à une action dénaturante importante du Tween 20.

*Action du laurylsulfate de sodium.* Nous avons essayé le laurylsulfate de sodium à diverses concentrations (0,05 à 0,5%), entre pH 7 et 8,5 et pendant des temps variables. Les conditions suivantes nous ont donné la meilleure solubilisation: concentration, 0,2% pendant 1 h; pH 7, température +2°C; centrifugation, 135 000 g/1 h. Le surnageant contient alors 30% de l'activité initiale totale, avec une activité spécifique légèrement inférieure à celle des mitochondries.

Le culot a une activité spécifique 2 à 3 fois plus élevée que l'initiale. En retraitant le culot par le laurylsulfate dans les mêmes conditions on obtient de nouveau un surnageant actif. L'activité totale des surnageants réunis représente suivant les opérations 40 à 50% de l'activité totale. Un troisième traitement du culot ne nous a pas

donné de surnageant actif, quelques soient les modifications de pH et de concentration en laurylsulfate apportées; mais on observe alors une nette diminution de l'activité des culots traduisant soit une dénaturation soit une inhibition de l'enzyme (Tableau).

Le surnageant actif, de couleur jaune, conserve son activité au moins 15 jours à -15°C et au moins 24 h à +4°C.

Comparativement aux autres tensioactifs essayés, le laurylsulfate nous a donc donné les meilleurs résultats. Il permet d'obtenir, avec un rendement satisfaisant, une solution à partir de laquelle peut être tentée une purification de l'enzyme.

*Summary.* The monoamineoxidase of the mitochondria of rat liver may be dissolved up to 50% of the initial activity by treatment with a tensioactive agent followed by ultracentrifugation. The best experimental conditions are obtained with 0.2% of sodium laurylsulphate (pH 7) during 1 h at +2°C.

M. H. COQ et C. BARON

*Laboratoire de Thérapeutique du Centre d'Etudes du Bouchet, Vert le Petit (Seine et Oise) et Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Dijon (Côte d'Or, France), le 14 février 1964.*

## Glutamate Decarboxylase and $\gamma$ -Aminobutyrate Transaminase in Developing Rat Brain

### Maturational Changes in Cerebral Cortex IV.

Apart from the detailed investigations by HIMWICH<sup>1</sup> on the changes in glutamate decarboxylase (GAD, E.C.4.1.1.15) in the developing mammalian brain, no information is available on other enzymes of the glutamate- $\gamma$ -aminobutyrate pathway. This report deals with an analysis of the activity of glutamate decarboxylase (GAD) and  $\gamma$ -aminobutyrate- $\alpha$ -ketoglutarate transaminase (GABAT, E.C.2.6.1.-) during postnatal development of the rat brain. This study is part of a programme on maturation of changes in the cerebral cortex.

Wistar albino rats were killed by decapitation. The brain was quickly removed. 20% (w/v) homogenates were prepared in a Potter homogenizer. Water-mercaptoethanol (0.01) or water-sucrose (0.25) -mercaptoethanol (0.01) was used as a medium. Both enzymes were determined in the same homogenate. GAD was determined according to HILGERSOM<sup>2</sup> and GABAT according to SALVADOR and ALBERS<sup>3</sup> with slight modifications.

After a 45 min incubation period (37°C, shaking, aerobic conditions), the reaction was stopped and the protein denatured by heating for 5 min at 100°C. Thereupon 2 ml of 0.25M 3,5-diaminobenzoic acid (Aldrich), pH 6 (with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), and 1 ml of 0.5M phosphate buffer, pH 5.8, were added and the mixture heated for 60 min at 60°C. After a brief centrifugation the resultant supernatant was diluted with 0.01M phosphate buffer, pH 6.0. Fluorescence was measured with a Unicam SP 500 spectrophotometer with fluorometer attachment and a filter (Schott Jena PIL, 212017). The excitation wavelength was 418 m $\mu$  and the fluorescence wave-length

505 m $\mu$ . By using succinic semialdehyde synthesized, according to SCHENCK<sup>4</sup>, calibration curves were made. The purity of the succinic semialdehyde used was controlled by determinations of the two functional groups.

The activities of the two enzymes in water homogenates are presented in Table I. The most striking result is the approximately constant ratio of the two enzymes, particularly during the greatest change in enzyme activity.

Table I. Activity of enzymes in water homogenate

Age (days)	GAD-act $\pm$ S.D.	GABAT-act $\pm$ S.D.	No. of determinations	GABAT/GAD ratio
0	4	13	1	3.3
5	4	17	1	4.3
10	11 $\pm$ 2	32 $\pm$ 5	4	2.9
15	20	49	2	2.5
20	27 $\pm$ 2	75 $\pm$ 2	4	2.8
25	29	84	1	2.9
30	34 $\pm$ 2	99 $\pm$ 10	4	2.9
40	35	88	1	2.5
Adult ( $\pm$ 3 months)	36 $\pm$ 3	115 $\pm$ 15	4	3.2

The activities are expressed as  $\mu$ mol product formed per g wet weight per h.

<sup>1</sup> W. H. HIMWICH, Int. Rev. Neurobiol. 4, 117 (1962).

<sup>2</sup> A. J. C. HILGERSOM, Thesis, Leiden (1962).

<sup>3</sup> R. A. SALVADOR and R. W. ALBERS, J. biol. Chem. 234, 922 (1959).

<sup>4</sup> G. O. SCHENCK, Liebigs Ann. 584, 156 (1953).