

Fig. 2. Optical scan of acrylamide gels. Stained acrylamide gels (see Figure 1 for details) were scanned at 555 nm in a Gilford Spectrophotometer Gel Scanner and superimposed for this comparison. —, 0.3 M NaCl soluble rat liver chromatin proteins; ····, rat liver cytoplasmic soluble protein; ---, rat liver chromatin 0.3 M NaCl soluble proteins after exposure to the cytoplasmic protein.

however, that chromatin prepared from whole cells<sup>1</sup> is not contaminated by non-nuclear material, since membranes, divalent cations, etc., could effect non-specific adsorption<sup>12</sup>.

**Résumé.** Des mesures quantitatives et des modèles sur gels d'acrilamide ont permis de conclure que les protéines cytoplasmiques préparées de cette manière ne produisent pas de contamination appréciable.

J. A. WILHELM<sup>13</sup>, CARLLEEN M. GROVES and  
L. S. HNILICA<sup>14</sup>

Department of Biochemistry,  
M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, and  
Graduate School of Biochemical Sciences at Houston,  
Houston (Texas 77025, USA), 28 October 1971.

<sup>12</sup> Supported by grant No. CA-07746 from the United States Public Health Service and grant No. G-138 from the Robert A. Welch Foundation.

<sup>13</sup> Current address: Department of Animal Biology, The University, 154 Rt. de Malagnou, 1224 Geneva (Switzerland).

<sup>14</sup> To whom reprint requests should be sent.

## Localisation des glycosyl-transférases dans les membranes endoplasmiques des splénocytes de rat

Des travaux antérieurs<sup>1,2</sup> ont montré que les glycosyl-transférases spléniques, et spécialement la mannosyl-transférase, sont localisées au niveau des structures microsomiques. Dans le cadre de ces organites subcellulaires, les membranes endoplasmiques occupent une place prépondérante sous l'angle des activités de transglycosylation<sup>3,4</sup>. Il est possible grâce à une adaptation de la technique de fractionnement cellulaire de GLAUMANN et DALLNER<sup>5</sup>, de répartir le long d'un gradient de densité, les activités glycosyl-transférases localisées dans les membranes endoplasmiques préalablement individualisées.

Les rates, obtenues par laparotomie de rats mâles (souche Wistar) de 250 g, sont broyées, à l'aide d'un homogénéiseur de Potter, en saccharose 0,25 M, tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7 (2 g/10 ml). Le surnageant d'une première centrifugation de 20 min à 10,000 g est ramené

au volume initial par addition de saccharose 0,25 M. La suspension obtenue est amenée à 15 mM de CsCl. On en dépose 24 ml sur 12 ml de saccharose 1,31 M, CsCl 15 mM et on centrifuge 7 h à 105 000 g. On recueille les membranes du reticulum endoplasmique («smooth microsomes») à l'interface, et on les reprend en suspension dans 20 ml d'eau distillée; 20 ml de cette suspension sont déposés sur

<sup>1</sup> M. RICHARD, P. BROQUET, R. GOT et P. LOUISOT, *Biochimie* 53, 107 (1971).

<sup>2</sup> M. RICHARD, P. BROQUET et P. LOUISOT, *Experientia* 27, 1029 (1971).

<sup>3</sup> P. LOUISOT et R. GOT, *Bull. Soc. Chim. biol.* 52, 455 (1970).

<sup>4</sup> P. LOUISOT, *Lyon Méd.* 226, 33 (1971).

<sup>5</sup> H. GLAUMANN et G. DALLNER, *J. Cell Biol.* 47, 34 (1970).

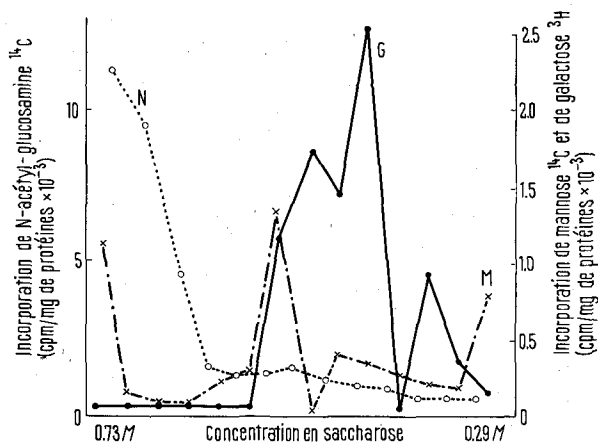
10 ml de saccharose 1,6 M et centrifugés pendant 30 min à 75 000 g, une butée de 2 ml de saccharose 1 M servant d'intermédiaire entre les deux couches, permettant ainsi une meilleure récupération de la fraction dans une concentration de saccharose connue. Les membranes endoplasmiques, recueillies dans le saccharose 1 M, sont amenées à une concentration en saccharose 0,24 M. Cette dernière suspension est centrifugée pendant 75 min, à 20 000 t/m, contre un gradient linéaire de saccharose 0,29 M–0,73 M (en tampon *Tris*-HCl 0,05 M, pH 7), dans le rotor SW 25–1 d'une ultracentrifugeuse Spinco. On recueille des fractions aliquotes, dont on apprécie l'activité glycosyl-transférase en système acellulaire *in vitro*. Pour chaque fraction étudiée, les systèmes acellulaires de biosynthèse comprennent: 400  $\mu$ l de la suspension de membranes endoplasmiques contenant de 40 à 120  $\mu$ g/ml de protéines. 10  $\mu$ l de  $\text{MnCl}_2$  (concentration finale  $5 \cdot 10^{-3}$  M). 10  $\mu$ l d'une solution de précurseur radioactif contenant, selon l'activité glycosyl-transférase étudiée: soit 2,5  $\mu$ Ci d'UDP-galactose- $^3\text{H}$  (NEN Corporation); soit 2  $\mu$ Ci de GDP-mannose- $^{14}\text{C}$  (NEN Corporation); soit 1  $\mu$ Ci d'UDP-N-acétyl-glucosamine- $^{14}\text{C}$  (NEN Corporation).

Les incubations sont réalisées à 30°C pendant 30 min. Au terme du temps de biosynthèse, les macromolécules glycoprotéiques sont précipitées sur filtres Watman et la radioactivité est évaluée en scintillation liquide, dans des conditions précédemment décrites<sup>6,7</sup>.

La figure rend compte des résultats obtenus. Elle met en évidence une hétérogénéité de répartition des activités glycosyl-transférases, à partir des formes coenzymatiques

actives des oses ou osamines, sur des accepteurs protéiques endogènes: galactosyl-transférase, mannosyl-transférase et N-acétyl-glucosaminyl-transférase. On localise dans la fraction lourde des membranes endoplasmiques (fond de gradient) une double activité de transfert: mannosyl-transférase et N-acétyl-glucosaminyl-transférase. Dans la fraction de densité moyenne, on retrouve principalement les activités de transfert du mannose et du galactose. Dans la zone des structures membranaires légères, on retrouve également la mannosyl-transférase et la galactosyl-transférase, mais pas d'activité N-acétyl-glucosaminyl-transférase.

Il apparaît ainsi que les différents systèmes enzymatiques membranaires de transfert des oses ou dérivés d'oses occupent des zones variables dans la structure des membranes endoplasmiques. Ceci pourrait éventuellement être utilisé comme un argument favorable à l'organisation séquentielle des enzymes dans les membranes proposée par SPIRO<sup>8</sup> ou SCHACHTER<sup>9</sup>. En fait, la méthode utilisée ne permet de séparer, sur le critère de densité, que des structures préférentielles de localisation. Ces résultats sont plutôt en faveur d'une dispersion de groupes de glycosyl-transférases dans l'ensemble du reticulum endoplasmique et de ce fait, peuvent s'intégrer dans le cadre de la théorie «de l'espace vital» émise par l'un d'entre nous<sup>4</sup>, selon laquelle l'organisation tridimensionnelle de la protéine conditionne à elle seule, grâce aux espaces disponibles qu'elle tolère entre les résidus amino-acyls, la fixation secondaire des éléments glucidiques, grâce à des systèmes enzymatiques à répartition ubiquitaire.



Répartition des activités glycosyl-transférases dans les membranes du reticulum endoplasmique, sur des accepteurs protéiques endogènes à partir des formes coenzymatiques actives des oses ou osamine. M, mannosyl-transférase; G, galactosyl-transférase; N, N-acétyl-glucosaminyl-transférase. Gradient de saccharose 0,29 M–0,73 M.

**Summary.** In smooth endoplasmic membranes of rat splenic cells, glycosyl-transferase activities are located in various structures. These structures are separated by sucrose density gradient centrifugation. At the bottom are mannosyl- and N-acetyl-glucosaminyl-transferases; in the medium are mannosyl- and galactosyl-transferases; at the top are also mannosyl- and galactosyl-transferases, but no N-acetyl-glucosaminyl-transferase.

M. RICHARD et P. LOUISOT

Université de Lyon,  
Unité Médicale d'Enseignement  
et de Recherches Lyon-Sud,  
Laboratoire de Biochimie, B.P. 12,  
F-69 Oullins (France), 14 Octobre 1971.

<sup>6</sup> R. LETOUBLON, M. RICHARD, P. LOUISOT et R. GOT, *Europ. J. Biochem.* 18, 194 (1971).

<sup>7</sup> P. BROQUET, M. RICHARD et P. LOUISOT, *J. Neurochem.*, sous presse.

<sup>8</sup> R. G. SPIRO, *New Engl. J. Med.* 281, 991 (1969).

<sup>9</sup> G. R. LAW FORD et H. SCHACHTER, *J. biol. Chem.* 241, 5408 (1966).

## Guaiacol-O-Methyltransferase: A Mammalian Enzyme Capable of Forming Di-O-methyl Catecholamine Derivatives<sup>1</sup>

We have reported previously that N-acetyl-3-hydroxy-4-methoxyphenethylamine (iso-N-acetylmethoxytyramine, referred to as i-NAMT in this report) can be converted to N-acetyl-3,4-dimethoxyphenethylamine (NADMPEA) by mammalian tissues<sup>2</sup>. The methyl donor for this reaction was shown to be S-adenosyl-methionine. The product

of the reaction, NADMPEA, is biologically active<sup>3</sup> and the substrate, i-NAMT, has been shown to be a dopamine metabolite<sup>4</sup>. In this report evidence is presented that this reaction is catalyzed by a previously undescribed methyltransferase which is active against various guaiacol derivatives, principally 3-hydroxy,4-methoxy substituted