

chromoprotein is mainly  $\beta$ -carotene and echinenone, while that of the violet chromoprotein is chiefly echinenone and another ketocarotenoid, suggest a scheme of the metabolism of the carotenoids in *R. americana* as represented in Figure 4.

Basing on Figure 4, it is possible to propose a molecular interpretation of the metabolic disorders found in *R. americana*. The LI-mutant must be a consequence of failure in step I, which obviously results in a complete absence of  $\beta$ -carotene and its derivatives in the larvae.

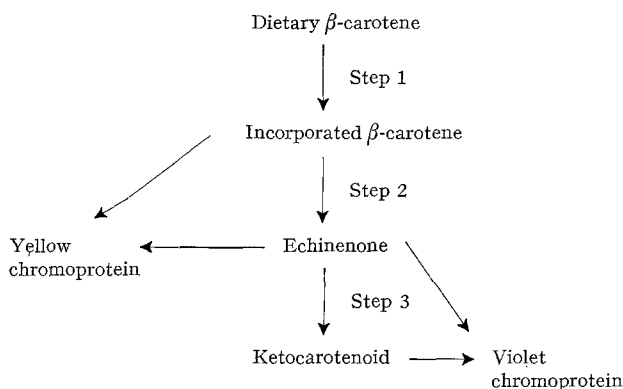


Fig. 4. Possible pathways in the metabolism of carotenoids in *R. americana*.

The absence of the violet pigment in the LII-mutant should be a consequence of failure in the step 2 or in the step 3. The fact that the yellow chromoprotein seems to be normal in the LII-mutant does not discount the possibility of the block being in step 2. It is possible that the yellow chromoprotein carries only  $\beta$ -carotene in the LII-mutant, since that protein is a lipoprotein<sup>14</sup> and the specificity of binding of carotenoids to lipoproteins is not absolute in some known cases<sup>15</sup>.

The O-mutant is hardly a consequence of a disorder in the metabolism of carotenoids since the violet chromoprotein is present in the haemolymph of those animals. The disorder must be due to some failure in the synthesis of the apoprotein. The absence of the yellow chromoprotein, which is the most important lipoprotein in *R. americana* haemolymph<sup>14</sup>, must affect the lipid metabolism of the larvae in which it is lacking. The involvement of haemolymph yellow lipoprotein in the lipid transport has been demonstrated in some insects<sup>16,17</sup>. A serious impairment in the metabolism of lipids could cause the O-mutant larvae to be narrower and the O-mutant imagoes to be smaller than the wild type ones.

<sup>14</sup> A. G. DE BIANCHI and W. R. TERRA, *J. Insect Physiol.*, in press.

<sup>15</sup> D. F. CHEESMAN, W. L. LEE and P. F. ZAGALSKY, *Biol. Rev.* 42, 131 (1967).

<sup>16</sup> H. CHINO, S. MURAKAMI and K. HARASHIMA, *Biochim. biophys. Acta* 176, 1 (1969).

<sup>17</sup> Y. PELED and A. TERTZ, *Insect Biochem.* 5, 61 (1975).

## Caractères différentiels de la 4-aminobutyrate-2-cétoglutarate transaminase (GABA<sub>T</sub>) intra- et extra-synaptosomale de cerveau de porc

### Differential Properties of Two Molecular Forms of 4-Aminobutyrate-2-Ketoglutarate Transaminase (GABA<sub>T</sub>) from Pig Brain

M. TARDY, B. ROLLAND, C. FAGES et P. GONNARD

Département de Biochimie, C. H. U. Henri Mondor, 51, Avenue de Lattre de Tassigny, F-94010 Créteil Cedex (France), 20 octobre 1975.

**Summary.** The two forms isolated exhibit some differences concerning their physicochemical and functional properties. They are identical with the previously purified molecular forms, GABA<sub>T</sub> I and GABA<sub>T</sub> II, separated by DEAE cellulose chromatography.

La destinée de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) dans le système nerveux central, après sa libération dans le compartiment intersynaptique est encore mal connue. Sa dégradation par transamination avec l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique sous l'influence de la GABA transaminase (E.C. 2.6.1.19) ou GABA<sub>T</sub> conduit à la formation de semialdéhyde succinique ultérieurement oxydé en acide succinique, constituant du cycle de Krebs.

Nous avons purifié la GABA<sub>T</sub> à partir de cerveau de porc et mis en évidence l'existence de deux formes moléculaires par chromatographie sur DEAE cellulose et étudié les caractères différentiels de ces deux formes<sup>1</sup>, (GABA<sub>T</sub> I et II). La deuxième forme: GABA<sub>T</sub> II est étroitement associée à une activité aspartate aminotransférase soluble.

Des études récentes ont considéré certains aspects du rôle de la GABA<sub>T</sub><sup>2,3-6</sup>, mais l'importance de son rôle dans le mécanisme d'inactivation du GABA, in vivo, n'est pas exactement précisé. L'existence d'une forme intrasynaptosomale et extrasynaptosomale de l'enzyme nous a

amené à envisager une relation entre ces deux formes et celles que nous avons isolées au cours de notre purification.

**Matériel et méthodes.** a) Préparation des synaptosomes et des mitochondries. Les cerveaux de porc sont prélevés aux abattoirs immédiatement après la décapitation de l'animal, débarrassés des méninges et de la majeure partie de la matière blanche, homogénéisés en solution saccharose 0,35 M à l'aide d'un appareil de Potter et Elvehjem verre-teflon (clearance 0,25 mm).

<sup>1</sup> M. BLOCH-TARDY, B. ROLLAND, P. GONNARD, *Biochimie* 56, 823 (1974).

<sup>2</sup> S. C. CHENG, *Handbook of Neurochemistry* (Plenum Press, New York 1971), vol. 5, p. 283.

<sup>3</sup> J. C. HYDE and N. ROBINSON, *Brain Res.* 82, 109 (1974).

<sup>4</sup> L. SALGANICOFF, E. DE ROBERTIS, *J. Neurochem.* 12, 287 (1965).

<sup>5</sup> A. WAKSMAN and M. BLOCH, *J. Neurochem.* 15, 99 (1968).

<sup>6</sup> A. WAKSMAN, M. K. RUBINSTEIN, K. KURIYAMA and E. ROBERTS, *J. Neurochem.* 15, 351 (1968).

Propriétés comparatives des formes intra (S) et extra (M) synaptosomales de la GABA<sub>T</sub> et des formes moléculaires de la GABA<sub>T</sub> purifiée (GABA<sub>T</sub> I et GABA<sub>T</sub> II)

	Fraction (M)	GABA <sub>T</sub> I	Fraction (S)	GABA <sub>T</sub> II
Migration électrophorétique	Cationique	Cationique	Anionique	Anionique
$K_M/\alpha$ -KG (mM)	1,2	1,3	0,4	0,4
$K_M$ /GABA (mM)	2,6	2,4	2	2,3
pH <sub>0</sub>	8,5 à 8,7	8,6 à 8,7	8,6 à 8,8	8,7 à 8,8
Activité spécifique	2,6	500	1	100
Coefficient de sédimentation	5,7	5,5	5,5	6,5

Après filtration sur gaze, l'homogénat est traité selon la technique de GRAY et WHITTAKER<sup>7</sup>. Après centrifugation en gradient de saccharose, la fraction médiane synaptosomale est prélevée et la fraction inférieure est reprise dans une solution de saccharose 0,32 M. Les deux fractions sont dialysées 14 h contre un grand volume de solution tampon de phosphates 0,01 M pH 6,8 contenant des protecteurs de l'enzyme: phosphopyridoxal, dithiotreitol, EDTA: 10<sup>-4</sup> M. Dans ces conditions, l'enzyme est libérée du compartiment intramitochondrial.

b) Mesure de l'activité GABA<sub>T</sub>. La méthode radioisotopique précédemment décrite<sup>8</sup> est utilisée. L'acide glutamique formé par transamination à partir des substrats: GABA et activité,  $\alpha$ -céto glutarique est décarboxylé par la glutamate décarboxylase commerciale d'*E. coli* (FLUKA), le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> dégagé stoechiométriquement est mesuré (scintillateur liquide NUCLEAR).

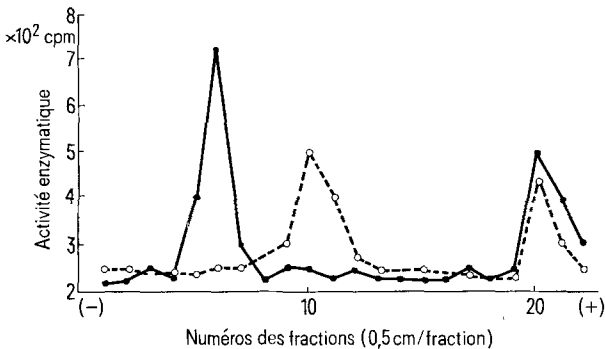


Fig. 1. Migration en gel de polyacrylamide des fractions M (—) et S (----) en tampon Tris-glycine à pH 8,3, 2 h, 10 mA par colonne.

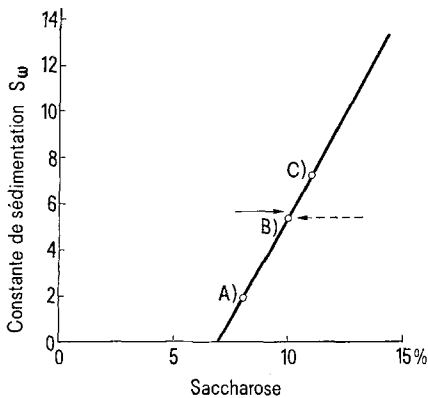


Fig. 2. Détermination de la constante de sédimentation des fractions M (—) et S (----) en gradient continu de saccharose de 7 à 15% en présence de témoins. A) cytochrome c; B) aspartate aminotransférase soluble; C) alcool-déhydrogénase.

c) Electrophorèse en gel de polyacrylamide. Les migrations sont effectuées selon la technique de DAVIS et al.<sup>9</sup>. 200 à 300  $\mu$ l de solution contenant l'enzyme sont déposés sur un gel à 7% pH 8,9 surmonté d'un gel concentrant à pH 6,7, dans un milieu tris-glycine à pH 8,3. La migration dure 2 h à 4 °C sous intensité de 10 mA/colonne. La révélation des bandes de protéines est réalisée par le bleu de Coomassie R-250, 2 h, traitées ensuite par l'acide acétique à 10%. Pour la mesure de l'activité enzymatique, les gels sont découpés horizontalement en fractions de 5 mm, incubés séparément dans 1 ml du milieu réactionnel, soumis à une agitation mécanique 2 h à 4 °C puis congelés 2 h à -20 °C et décongelés. La mesure de l'activité enzymatique est effectuée après une incubation de 1 h à 37 °C en présence du milieu réactionnel.

d) Détermination de la constante de sédimentation. Un gradient de concentration linéaire de 7,5 à 15% en saccharose dans un tampon phosphate-acétate de sodium 0,01 M pH 6,8 est préparé dans des tubes de rotor SW Sol Spinco-Beckman. 0,2 ml de solution contenant l'enzyme y sont déposés. La centrifugation est effectuée à 45000 rpm pendant 8 h à 4 °C.

Résultats. Les résultats sont réunis dans le Tableau.

Discussion. Une activité GABA<sub>T</sub> a bien été mise en évidence dans les fractions sédimentant en saccharose 0,8 M (S) et dans la fraction sédimentant en saccharose 1,2 M (M). L'activité spécifique de la fraction S, correspondant à la GABA<sub>T</sub> intrasynaptosomale, est nettement inférieure à celle de la fraction M extrasynaptosomale.

<sup>7</sup> E. G. GRAY and V. P. WHITTAKER, J. Anat. 96, 79 (1962).  
<sup>8</sup> P. GONNARD, A. WICKER, J. C. KOUYOUMDJIAN and M. BLOCH-TARDY, Biochimie 55, 509 (1973).  
<sup>9</sup> B. J. DAVIES, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964).

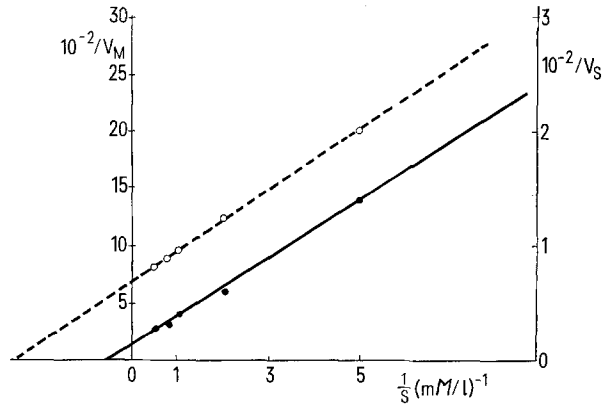


Fig. 3. Représentation de Lineweaver et Burk de l'affinité des fractions M (—) et S (----) pour l' $\alpha$  céto glutarate.

Ces résultats correspondent à ceux obtenus par VAN GELDER et al.<sup>10</sup> sur le cerveau de souris. Nous avons également mis en évidence une charge nettement plus anionique pour la fraction S en migration sur gel de polyacrylamide (Figure 1) par rapport à la fraction M. Les constantes de sédimentations évaluées par rapport aux

3 marqueurs suivants: l'alcool-déshydrogénase ( $S_{20} = 7,4$ ), l'aspartate aminotransférase ( $S_{20} = 5,5$ ) et le cytochrome c ( $S_{20} = 1,9$ ) ont leur valeur comprise entre 5,5 et 5,7 pour les 2 enzymes (Figure 2).

Contrairement aux deux formes identifiées chez la souris<sup>10</sup>, les  $pH_o$  d'activité sont également très voisins (Figure 5). L'affinité par rapport au GABA est la même alors qu'elle était nettement distincte chez la souris (Figure 4).

En ce qui concerne le deuxième substrat impliqué dans la transamination, c'est-à-dire l'acide  $\alpha$ -céto-glutarique, les affinités des deux formes (S) et (M) pour ce substrat sont nettement différentes. Cette propriété pourrait avoir une implication importante in vivo car la concentration en acide  $\alpha$ -céto-glutarique est basse dans le compartiment synaptique, inférieure à la  $K_m$  (Figure 3). Les deux formes de la GABA<sub>T</sub> que nous avons séparées à partir de l'enzyme purifié<sup>1</sup> et qui pourraient correspondre l'une à l'enzyme mitochondriale (GABA<sub>T</sub> I), l'autre à l'enzyme cytoplasmique (GABA<sub>T</sub> II) se différencient elles aussi essentiellement par leur affinité pour l'activité  $\alpha$ -céto-glutarique, métabolite essentiel puisqu'il est au centre de tous les processus de transamination.

L'affinité de la GABA<sub>T</sub> II pour ce substrat est identique à celle de l'enzyme synaptosomale et pourrait représenter une forme cytoplasmique de GABA<sub>T</sub>. Cette enzyme pourrait occuper un site sur la membrane pré ou post synaptique. Elle interviendrait ainsi directement dans les phénomènes de régulation synaptique des pools du GABA alors que l'enzyme mitochondriale, extrasynaptique (GABA<sub>T</sub> I) ne paraît pas impliquée directement dans ce mécanisme.

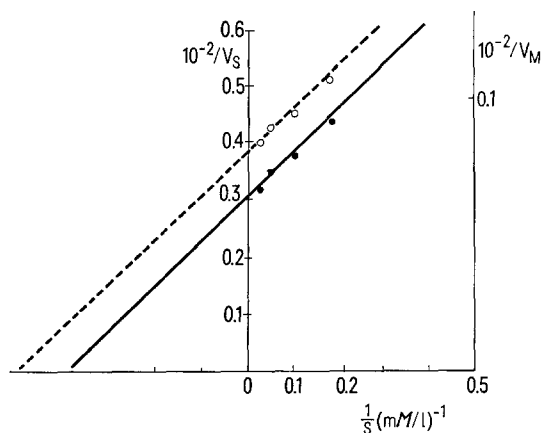


Fig. 4. Représentation de Lineweaver et Burk de l'affinité des fractions M (—) et S (---) pour l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique.

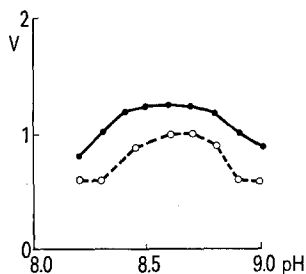


Fig. 5. Variation de l'activité enzymatique en fonction du pH du milieu réactionnel. M, —; S, ---.

<sup>10</sup> T. BUU NGUYEN and N. M. VAN GELDER, Can. J. Physiol. Pharmac. 52, 674 (1973).

## Acrosomal Hydrolases in Buffalo Spermatozoa<sup>1</sup>

S. P. KAUR, P. S. CHAUDHRY and S. R. ANAND<sup>2</sup>

National Dairy Research Institute, Karnal 132001 (Haryana, India), 19 September 1975.

**Summary.** Buffalo sperm acrosome resembles its counterpart in other species, being rich in hydrolytic enzymes. Of the enzyme activities estimated, acid phosphatase,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and hyaluronidase were low compared to those of ram semen. However, the aryl sulphatase activity was high. GOT activity estimated in sperm preparation may not be of acrosomal origin.

Acrosome, a membraneous cap-like structure covering the nucleus of the spermatozoa, is considered to be a modified lysosome. It is a repository of a number of hydrolases and has been shown to play a vital role in the process of fertilization<sup>3</sup>. The levels of 6 hydrolases were estimated in buffalo sperm acrosome, which forms the subject matter of the present communication.

**Materials and methods.** Semen was collected from Murrah buffalo bulls with an artificial vagina. Samples showing high initial motility with a score of 3.5 to 4.5 (0, no motility; 5, the best motility) were used and sperm counts were made with haemocytometer. Semen was diluted with 3 vol. of 50 mM tris-HCl buffer, pH, 7.4

and centrifuged at 1100 g for 10 min. The sperm pellet was washed 3 times more with the same buffer. The acrosomal preparations ( $H_1$  and  $H_2$ ) were prepared by treating a saline suspension of washed sperm with an equal volume of 0.05% hyamine 2389 and 0.05% triton X-100 in 0.067 M tris-maleate buffer<sup>3</sup>, pH 6.1. The seminal plasma free of spermatozoa was prepared by centrifuging fresh semen at 12,000 g for 30 min at 4°C. For total sperm enzyme activities, washed sperm suspension was sonicated for 3 min in the cold with Branson Sonifier Model B-12. The sonicate was centrifuged at 25,000 g for 50 min and the enzyme activities were estimated in the supernatant.