

## RÔLE DU CALCIUM DANS LE SYSTÈME TRYPSINE-SÉRUMALBUMINE

par

LUIGI GORINI

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences,  
Paris (France)*

Il a été montré précédemment<sup>1</sup> que le calcium joue un rôle fondamental dans la structure et par conséquent dans la stabilité et l'activité d'une série de protéinases bactériennes. Il était utile de rechercher si un tel rôle du calcium se retrouve dans le cas de la trypsine; l'étude de cet enzyme, dont le  $pH$  optimum est voisin de celui des protéinases bactériennes dont il a été question, présente, en plus de son intérêt propre, l'avantage de mettre en œuvre un enzyme cristallisé. D'autre part, on pouvait se demander si le calcium ne joue pas également un rôle dans la constitution d'autres protéines, notamment de protéines susceptibles de servir de substrat à la trypsine. Nous avons considéré à ce point de vue la sérumalbumine cristallisée; cette protéine est ici particulièrement intéressante, puisqu'elle est susceptible d'être étudiée soit sous forme native, soit à l'état complètement dénaturé, soit sous des états intermédiaires entre la forme native et l'état totalement dénaturé. A titre de comparaison, nous avons étudié également le rôle du calcium dans l'action de la trypsine sur la gélatine, cette dernière représentant le type classique d'une protéine complètement dénaturée.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### *Techniques*

La trypsine utilisée est de la trypsine cristallisée\* d'après NORTHROP; cette préparation contient environ 50% de son poids de  $SO_4Mg$ ; on en fait une solution à 0.4% dans de l'eau tridistillée. Cette solution est ensuite dialysée à 0° contre de l'eau tridistillée pendant 48 heures. Elle constitue une solution-mère dont le  $pH$  est voisin de 5.5 et qu'on peut conserver quelques semaines à 0° sans perte sensible d'activité. Pour ces essais, cette solution est extemporanément diluée, comme il est indiqué plus bas, par une solution tampon de borate selon CLARK ET LUBBS à  $pH$  7.9, l'ensemble étant toujours maintenu à 0°.

Les substrats sont soit la gélatine, soit la sérumalbumine. La solution de gélatine, à  $pH$  7.9, dans une solution tampon de borate, est préparée comme il a été dit précédemment<sup>2</sup>. La sérumalbumine utilisée\*\* est la fraction V cristallisée d'après COHN ET EDSALL à partir du plasma de bœuf. On en dissout 2.4 g dans une quantité de solution tampon de borate à  $pH$  7.9 telle que, après y avoir ajouté 0.55 ml de solution de  $NaOH$   $N/10$ , le volume total soit de 100 ml. La solution finale est à  $pH$  7.9. Cette solution est utilisée soit telle quelle, et la protéine s'y trouve alors presque entièrement sous forme native; soit après chauffage à 118° pendant 30 minutes, et la protéine est alors complètement dénaturée, mais elle reste en solution; soit après chauffage à des températures inter-

\* Worthington Biochemical Laboratories, Freehold, New-Jersey.

\*\* Armour Laboratories, Chicago.

médiales pendant des temps divers, ce qui provoque une dénaturation seulement partielle de la protéine.

### Réactifs

Toutes les solutions et les dilutions au cours des essais sont faites avec la solution tampon borate à pH 7.9 d'après CLARK ET LUBBS. Les réactifs employés sont dissous dans le même tampon et les solutions sont éventuellement ramenées à pH 7.9 par de la soude. Dans tous les cas, l'eau utilisée est de l'eau tridistillée dans un appareil entièrement en verre Pyrex. Les molarités indiquées sont celles des solutions finales.

### Protéolyse

a. *Gélatine*. D'une façon générale, les tubes où se fait la protéolyse contiennent finalement 5 ml de solution de gélatine, 1 ml d'une solution de trypsine préparée en diluant 200 fois la solution-mère, et 1 ml soit de tampon, soit de l'une des solutions des réactifs dans le tampon, la façon dont on fait le mélange étant précisée plus bas; la concentration de la gélatine est ainsi de 5%; la protéolyse est effectuée à pH 7.9 et à la température de 36°. On suit la chute de la viscosité après 10 minutes; on exprime cette chute par la quantité  $F_{10}$  dont la définition a été donnée précédemment<sup>3</sup>. Rappelons que la valeur de  $F_{10}$ , d'autant plus grande que l'activité protéolytique est plus forte, n'est toutefois pas proportionnelle à cette activité. La courbe de la Fig. 1 donnant les valeurs de  $F_{10}$  en fonction des quantités de trypsine employées, permet cependant d'exprimer quantitativement les résultats avec une approximation suffisante.

b. *Sérumalbumine*. D'une façon générale, les tubes où se fait la protéolyse contiennent finalement 5 ml de solution de serumalbumine, et 1 ml d'une solution de trypsine préparée en diluant 10 fois la solution-mère, soit avec la solution tampon soit avec l'une des solutions des réactifs dans le tampon, la façon dont on fait le mélange étant précisée plus bas. La concentration de la serumalbumine est ainsi de 2%; la protéolyse est effectuée à pH 7.9, à la température de 26°, et pendant 10 minutes. On interrompt l'action enzymatique par addition de 10 ml d'acide trichloracétique à 5%. Après cen-

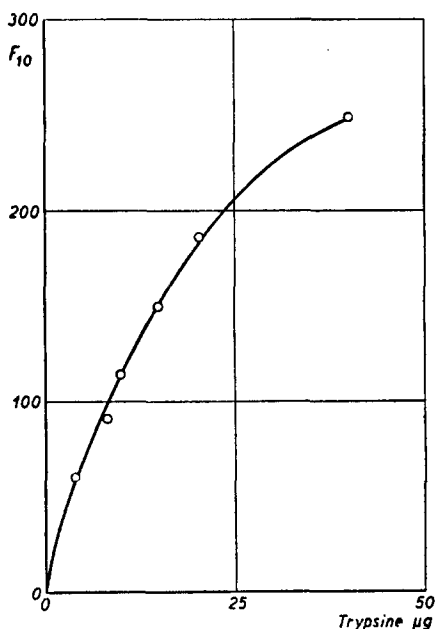


Fig. 1. Degré de protéolyse de la gélatine en fonction de quantités variables de trypsine. Viscosimétrie. Durée de la protéolyse: 10 minutes; température: 36°; pH 7.9 (tampon borate)

Bibliographie p. 334.

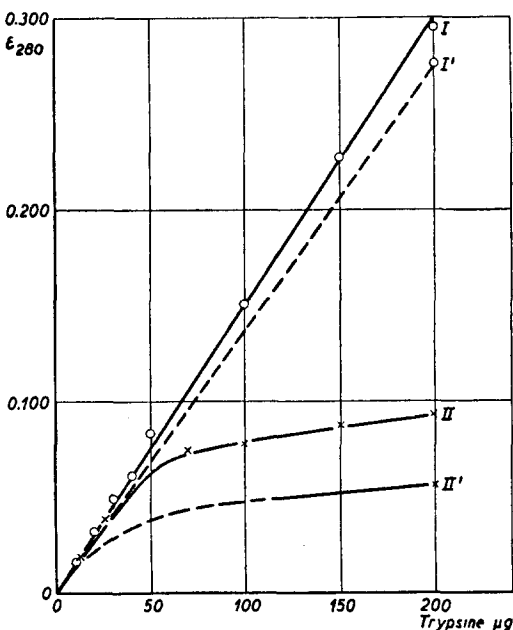


Fig. 2. Degré de protéolyse de la serumalbumine en fonction de quantités variables de trypsine. Mesures photométriques. Durée de la protéolyse: 10 minutes; température: 26°; pH 7.9 (tampon borate)

- I. Serumalbumine complètement dénaturée, protéolyse en présence de  $\text{Ca } M \cdot 10^{-2}$
- I'. Serumalbumine complètement dénaturée, protéolyse en l'absence de calcium
- II. Serumalbumine native, protéolyse en l'absence de calcium
- II'. Serumalbumine native, protéolyse en présence de  $\text{Ca } M \cdot 10^{-2}$

trifugation\*, on mesure le coefficient d'extinction à 280 m $\mu$  de la solution limpide, à l'aide d'un spectrophotomètre de Beckmann, en utilisant une cuve de 10 mm. Les valeurs obtenues sont proportionnelles aux quantités de tryptophane et de tyrosine contenues dans la partie de protéine hydrolysée restée dissoute dans l'acide trichloracétique; avec la sérumalbumine complètement dénaturée, et dans les conditions réalisées ici, les coefficients d'extinction sont d'autre part proportionnels aux quantités de trypsine employées (Fig. 2).

## RÉSULTATS

### I. Action de la trypsine sur la gélatine

#### A. Influence de quelques réactifs du calcium

Les réactifs du calcium utilisés ici sont les suivants: citrate, oxalate, nitrilotriacétate (Complexone I = C I), éthylènediaminotétracétate (Complexone II = C II), hexaméta-phosphate de sodium (HMP), tous à la concentration initiale de  $2 M \cdot 10^{-3}$ .

Dans une première série d'essais, la solution de trypsine et la solution d'un des réactifs sont mélangées, puis l'ensemble est ajouté, après quelques minutes, à la solution de gélatine. Dans ces conditions, on n'observe guère d'influence des divers réactifs sur la protéolyse. Dans une autre série d'essais, la solution de trypsine et la solution des réactifs sont mélangées; le mélange est maintenu 3 heures à différentes températures, la trypsine se trouvant ainsi en présence de chacun des réactifs à la concentration de  $M \cdot 10^{-3}$ . Après 3 heures, le mélange est ajouté à la solution de gélatine. D'autre part, des essais témoins sont faits en remplaçant la solution tampon contenant les réactifs par la solution tampon seule, ces essais étant soumis aux mêmes conditions que les précédents. L'influence des divers réactifs sur l'activité de la trypsine, dans ces conditions, est indiquée dans le Tableau I.

TABLEAU I  
PROTÉOLYSE DE LA GÉLATINE, EXPRIMÉE PAR  $F_{10}$

Inactivation de la trypsine en présence de divers réactifs du calcium ( $M \cdot 10^{-3}$ ) pendant 3 heures et à différentes températures.

Température	Témoin	Citrate	Oxalate	C I	C II	HMP
0°	84	—	—	—	77	80
18°	78	71	71	63	44	45
26°	48	47	44	30	16	26
36°	8	—	—	—	0	—

Les chiffres du Tableau I montrent que: 1. déjà en l'absence de tout réactif du calcium, la trypsine, à  $p_H$  7.9, subit une inactivation lorsqu'elle a été maintenue 3 heures à des températures supérieures à 0°; cette inactivation, qui témoigne de la dénaturation de la protéine, faible encore à 18°, devient presque totale à 36°. 2. d'une façon générale, aucun des réactifs en question ici n'a d'influence sensible à 0°; mais aux températures supérieures, ils exercent une action dont l'intensité varie d'un réactif à l'autre. Cette

\* Il n'est pas possible ici de filtrer sur papier, car les divers papiers filtres essayés abandonnent plus ou moins dans le liquide des substances possédant une forte absorption à la longueur d'onde utilisée.

action permet de les classer selon un ordre qui est le même que celui que l'on obtient en les rangeant d'après leur aptitude à former des complexes avec le calcium, à l'exception de l'hexamétaphosphate\*. Des résultats comparables ont été observés au cours d'expériences analogues concernant certaines protéinases bactériennes<sup>1</sup>.

#### B. Influence du calcium à diverses concentrations

L'étude de l'influence du calcium à diverses concentrations sur la dénaturation de la trypsine par la chaleur, est faite en ajoutant à la solution de trypsine le même volume soit de la solution tampon contenant du  $\text{CaCl}_2$  à des concentrations variables, soit la solution tampon seule; le tout est ensuite maintenu à la température de  $40^\circ$  pendant des temps différents. Les résultats obtenus (Tableau II) montrent que la présence de calcium à des concentrations supérieures à  $10^{-4} M$  protège partiellement la trypsine contre l'inactivation due à la chaleur. Cette protection est d'autant plus forte que la concentration en calcium est plus grande; toutefois, elle n'est jamais complète, même à la plus forte concentration en calcium employée, quoique cette concentration soit considérable si on la compare à celle de la trypsine. Le calcium ralentit donc l'inactivation sans pourtant l'arrêter.

TABLEAU II

PROTÉOLYSE DE LA GÉLATINE, EXPRIMÉE PAR  $F_{10}$

Protection, par le calcium, de la trypsine contre son inactivation par la chaleur ( $40^\circ$ ) pendant des temps variables

Temps (heures)	Concentration du calcium			
	0	$M \cdot 10^{-5}$	$M \cdot 10^{-4}$	$M \cdot 10^{-3}$
0	87	85	104	114
3	5	5	14	95
6	0	0	4	74
24	0	0	0	45

#### C. Effet de la présence simultanée de Complexone II et de calcium

La Complexone II se montre ici celui des réactifs du calcium dont l'effet accélérateur sur la dénaturation de la trypsine est le plus marqué. Il était intéressant de rechercher si le calcium est capable d'atténuer ou même de supprimer complètement cet effet de la Complexone II. Les expériences sont faites de la façon suivante: à la solution de trypsine on ajoute le même volume soit de la solution de Complexone  $2 M \cdot 10^{-3}$ , soit de cette même solution de Complexone II, mais contenant en outre  $\text{CaCl}_2 M \cdot 10^{-2}$ , soit la solution tampon seule; le tout est maintenu soit à  $0^\circ$ , soit à  $37^\circ$ , les mesures étant faites après 30 minutes et après 1 heure. D'autre part, on fait un essai en maintenant la solution de trypsine seule à  $37^\circ$  pendant 30 minutes, après quoi on lui ajoute le même volume de la solution de  $\text{CaCl}_2 2 M \cdot 10^{-3}$  et on la maintient encore 30 minutes à la même température. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau III.

Les chiffres du Tableau III montrent que le calcium, non seulement annule l'action de la Complexone II, mais en plus, étant à une concentration cinq fois supérieure à celle

\* L'hexamétaphosphate se comporte souvent d'une façon aberrante; il est possible que ce fait soit dû à une décomposition hydrolytique du produit au cours des essais.

de cette dernière, il exerce une action propre en ralentissant l'inactivation de l'enzyme par rapport à celle que l'on observe lorsque la trypsine est dans la solution tampon seule. D'autre part, le calcium  $M \cdot 10^{-3}$ , ajouté au cours de l'exposition à la chaleur de la solution de trypsine dans le tampon seul, arrête à peu près complètement l'inactivation de l'enzyme; cette inactivation reste alors ce qu'elle était au moment de l'addition du calcium.

TABLEAU III  
 PROTÉOLYSE DE LA GÉLATINE EXPRIMÉE PAR  $F_{10}$

Inactivation de la trypsine en présence de Complexone II ( $M \cdot 10^{-3}$ ) et de  $\text{CaCl}_2$  ( $5 M \cdot 10^{-3}$ )

Temps (minutes)	0°			37°			
	Tampon	C II	C II + Ca	Tampon	Tampon + Ca introduit après 30 min	C II	C II + Ca
30	—	—	—	51	—	43	—
60	86	77	81	36	51	15	70

#### D. Influence de quelques autres métaux bivalents

Il était utile de rechercher jusqu'à quel point l'action du calcium ainsi mise en évidence était spécifique de ce métal. Aussi avons-nous étudié l'action éventuelle des métaux bivalents suivants: Sr, Ba, Co, Mg, Zn, Mn, les trois premiers étant utilisés sous la forme de chlorure, les trois autres sous la forme de sulfate. Les expériences sont faites de la façon suivante: à un volume de la solution de trypsine, on ajoute un volume de la solution des métaux en question à la concentration de  $2 M \cdot 10^{-3}$ . Le tout est maintenu 3 heures à 36°. On en prélève ensuite, comme d'habitude, 2 ml que l'on ajoute à 5 ml de la solution de gélatine et l'on détermine  $F_{10}$ . Les résultats obtenus (Tableau IV) montrent que seul Mn manifeste une action comparable à celle du calcium.

TABLEAU IV  
 PROTÉOLYSE DE LA GÉLATINE EXPRIMÉE PAR  $F_{10}$

Influence de quelques métaux sur l'inactivation de la trypsine par la chaleur (3 heures à 36°).

Métal	$F_{10}$	Métal	$F_{10}$
o (témoin)	13	Mg	12
Ca	37	Zn	0
Sr	13	Co	16
Ba	19	Mn	34

#### II. Action de la trypsine sur la sérualbumine complètement dénaturée

La protéolyse de la sérualbumine présente sur celle de la gélatine, l'avantage d'une part de pouvoir être étudiée d'une façon rigoureusement quantitative (Fig. 2) et d'autre part de pouvoir s'exercer sur une protéine dont on peut obtenir des états intermédiaires entre la forme native et l'état complètement dénaturé. Nous étudions tout d'abord le comportement de la trypsine vis à vis de la sérualbumine complètement dénaturée. Les expériences concernent en premier lieu la protection de l'enzyme, par

le calcium, contre la dénaturation irréversible par la chaleur; en second lieu le rôle joué par le calcium dans la réversibilité de la phase réversible de la dénaturation.

#### A. Inactivation irréversible

Les solutions de trypsine sont obtenues en diluant 10 fois la solution-mère, soit avec la solution tampon seule, soit avec la solution tampon additionnée de quantités de  $\text{CaCl}_2$  telles que les solutions de trypsine résultant contiennent  $\text{CaCl}_2$  à des concentrations variant de  $M \cdot 10^{-2}$  à  $M \cdot 10^{-5}$ , soit avec la solution tampon additionnée d'une quantité de Complexone II telle que la solution de trypsine résultant contienne cette complexone à la concentration de  $M \cdot 10^{-3}$ ; ces solutions de trypsine sont maintenues à diverses températures. De la solution de trypsine dans la solution tampon seule et maintenue à  $36^\circ$ , on prélève de temps en temps 1 ml et on y introduit 0.01 ml (soit un volume négligeable) d'une solution de  $\text{CaCl}_2$   $M$ ; les échantillons ainsi traités, contenant dorénavant  $\text{CaCl}_2$   $M \cdot 10^{-2}$ , continuent à être maintenus à  $36^\circ$ . D'autre part, on prélève à des temps déterminés des échantillons des divers essais dont on mesure l'activité protéolytique après les opérations suivantes: on ajoute éventuellement à ces échantillons, dès leur sortie du thermostat, le 1/100 de leur volume d'une solution de  $\text{CaCl}_2$  à une concentration telle que la concentration finale du calcium soit de  $M \cdot 10^{-2}$  puis on les plonge rapidement dans un autre thermostat à  $26^\circ$  où on les abandonne 10 minutes. Au bout de ce temps, on introduit dans chacun des échantillons la solution de sérumalbumine dénaturée, contenant, elle aussi, du calcium  $M \cdot 10^{-2}$  et on laisse la protéolyse se faire dans les conditions habituelles. D'après les résultats obtenus (Fig. 3, 4, 5, 6) on voit que, comme les essais avec la gélatine l'avaient déjà montré, l'inacti-

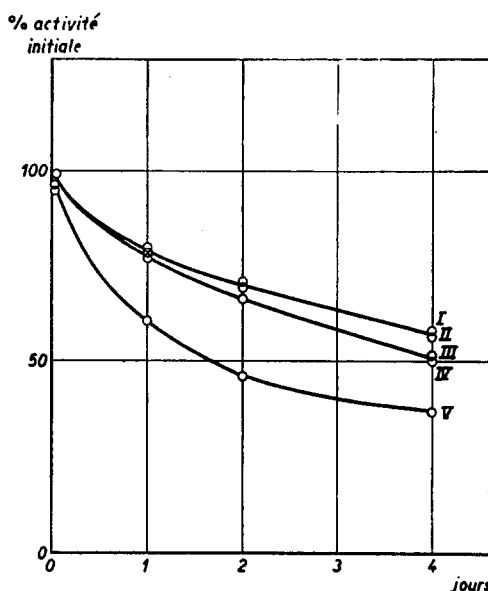


Fig. 3. Inactivation de la trypsine en fonction du temps, à pH 7.9, en présence de calcium à diverses concentrations ou de Complexone II, à  $0^\circ$ . Courbes I à III en présence de calcium: I, Ca  $M \cdot 10^{-2}$ ; II, Ca  $M \cdot 10^{-3}$ ; III, Ca  $M \cdot 10^{-5}$ . Courbe IV en absence de calcium. Courbe V en présence de Complexone  $M \cdot 10^{-3}$ .

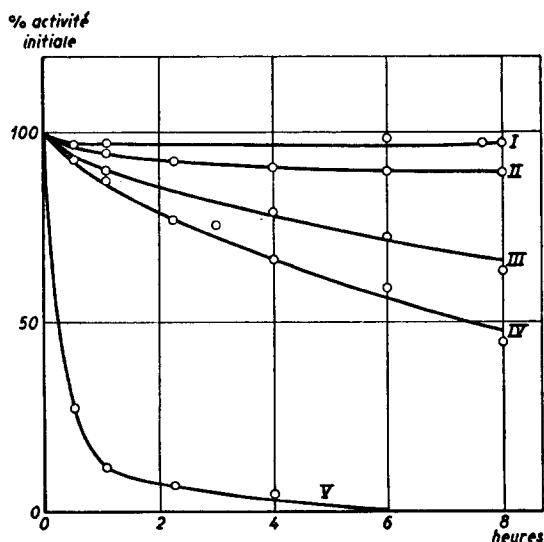


Fig. 4. Inactivation de la trypsine en fonction du temps, à pH 7.9, en présence de calcium à diverses concentrations ou de Complexone II, à  $26^\circ$ . Mêmes explications que dans la Fig. 3.

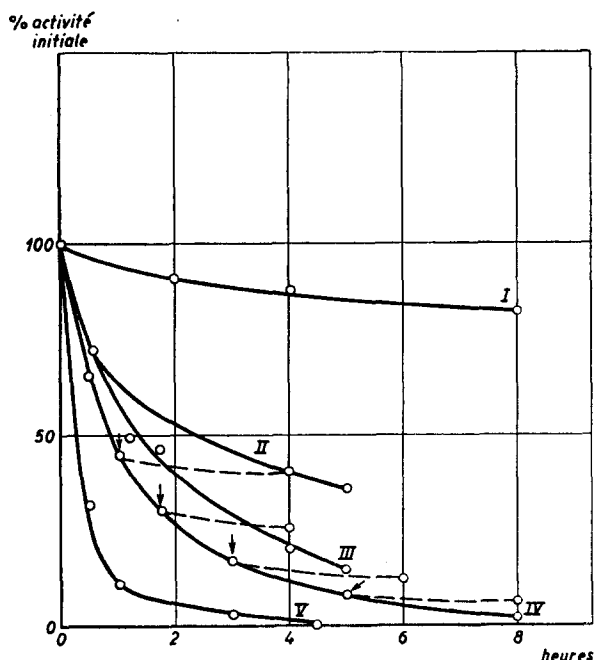


Fig. 5. Inactivation de la trypsine en fonction du temps à pH 7.9, en présence de calcium à diverses concentrations ou de Complexone II, à 36°. Mêmes explications que dans la Fig. 3. Les courbes en pointillé représentent le cours de l'inactivation après addition de  $\text{Ca } M \cdot 10^{-2}$  aux temps indiqués par les flèches

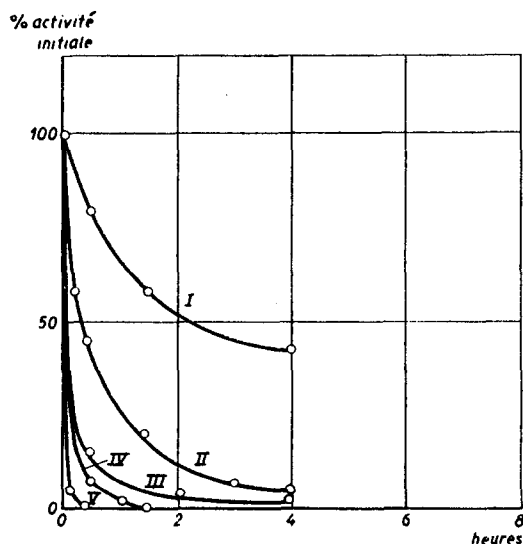


Fig. 6. Inactivation de la trypsine en fonction du temps, à pH 7.9, en présence de calcium à diverses concentrations ou de Complexone II, à 47°. Mêmes explications que dans la Fig. 3

Bibliographie p. 334.

tion de la trypsine provoquée par la température est d'autant moins marquée que la quantité de calcium présente est plus forte; toutefois, même une concentration en calcium de  $M \cdot 10^{-2}$ , qui ralentit fortement l'inactivation, ne suffit pas à la supprimer. On voit en outre que l'addition de calcium, au cours de l'inactivation de la solution d'enzyme qui n'en contient pas encore, modifie immédiatement la vitesse de cette inactivation: la courbe correspondante devient alors sensiblement parallèle à celle qui représente l'inactivation de la trypsine en présence d'une concentration égale en calcium lorsque celui-ci est introduit dès le début.

#### B. Inactivation réversible

On sait<sup>3</sup> que la dénaturation de la trypsine par la chaleur, à pH 7.9, dont il vient d'être question, avant de devenir irréversible, passe par une phase réversible; on pouvait se demander si le calcium intervient dans l'existence de cette dernière. Chaque expérience effectuée dans cette direction comporte deux séries parallèles d'essais: dans chacune de ces séries, la solution de trypsine dans le tampon seul (solution-mère diluée 10 fois) est maintenue à des températures déterminées pendant des temps donnés (première partie de la colonne "traitement" du Tableau V); au bout de ces temps, on sort les essais du thermostat et on y introduit 1/100 de leur volume, soit de solution tampon seule, soit de solution tampon contenant  $\text{CaCl}_2 M$ ; cette introduction est représentée dans le Tableau V par  $\downarrow$ . Les essais de la première série, additionnés ou non de calcium, sont placés à 26°, température à laquelle on les maintient 10 minutes avant d'y ajouter la solution de sérulalbumine contenant elle-même  $\text{CaCl}_2 M \cdot 10^{-2}$  lorsque la solution de trypsine a été additionnée de calcium, ou la solution

de sérumalbumine dans le tampon seul lorsque la solution de trypsine n'a pas reçu de calcium. La protéolyse s'effectue comme toujours à 26° pendant 10 minutes. Les essais de la deuxième série sont, les uns mis immédiatement en contact avec la solution de sérumalbumine qui là encore a reçu ou non du calcium  $M \cdot 10^{-2}$  selon que la solution enzymatique a été ou non préalablement additionnée de ce métal, les autres refroidis et maintenus à 0° pendant 10 minutes avant l'addition de la sérumalbumine. De toute façon, la protéolyse s'effectue à 26° et pendant 10 minutes. Bien qu'on ne réalise pas ainsi des conditions telles que les états de la trypsine aux températures d'exposition différentes de 26° se maintiennent intégralement pendant la protéolyse à 26°, on obtient des chiffres suffisamment différents de ceux de la première série pour pouvoir être comparés avec eux, et cela parce que la quantité de trypsine active n'a guère le temps de s'écarter sensiblement de celle qui existait au moment de l'addition de la sérumalbumine.

Dans ces conditions, si la phase réversible de l'inactivation de la trypsine dépend de la présence de calcium, la différence ( $\Delta Ca$ ) entre les quantités de trypsine active lorsqu'on a ajouté du calcium, et lorsqu'on n'a pas ajouté de calcium, doit rester à peu près la même dans les divers essais au cours desquels les solutions de trypsine ont été maintenues au moins 10 minutes à 26° juste avant la protéolyse; cette différence doit au contraire varier dans les autres essais. Les chiffres du Tableau V sont les moyennes de quatre expériences identiques faites comme il vient d'être dit.

TABLEAU V  
INFLUENCE DU CALCIUM SUR LA PHASE RÉVERSIBLE DE LA DÉNATURATION  
DE LA TRYPSINE PAR LA CHALEUR

Protéolyse à 26° pendant 10 minutes

Traitement subi par la trypsine	Activité protéolytique		$\Delta$ Ca
	Sans calcium	Avec calcium	
1ère série:			
10 min 0° ↓ 10 min 26°	0.278	0.301	23
10 min 26° ↓ 10 min 26°	0.278	0.301	23
4 min 52° ↓ 10 min 26°	0.079	0.105	26
2ème série:			
10 min 0° ↓	0.287	0.300	13
10 min 26° ↓ 10 min 0°	0.287	0.300	13
4 min 52° ↓	0.086	0.116	30

Ces chiffres montrent que: 1. Dans tous les cas, la protéolyse est plus intense lorsqu'on a ajouté du calcium; 2. les valeurs de  $\Delta Ca$  sont sensiblement les mêmes, de l'ordre de 24, dans tous les cas où les solutions de trypsine ont été maintenues au moins 10 minutes à 26° avant la protéolyse, et ce, quelle qu'ait été la température à laquelle ces solutions ont été soumises auparavant, et quoique les valeurs absolues de la protéolyse diffèrent par suite de l'inactivation irréversible subie par la trypsine à 52°; 3. l'intensité de la protéolyse lorsque la trypsine a été préalablement maintenue à 26° en l'absence de calcium, est plus forte lorsque la trypsine a été ensuite placée à 0° avant d'être en contact avec la sérumalbumine; une telle différence n'existe pas lorsque les solutions ont été additionnées de calcium.



### C. Influence de quelques autres métaux bivalents

Les expériences sont faites de la façon suivante: on prépare la solution de trypsine en diluant 10 fois la solution-mère soit avec la solution tampon seule, soit avec la solution tampon contenant l'un des sels suivants aux concentrations suivantes:

$M \cdot 10^{-1}$ :  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{SO}_4\text{Mg}$ ,  $\text{SO}_4\text{Mn}$ .

$M \cdot 10^{-2}$ :  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{SO}_4\text{Mg}$ ,  $\text{SO}_4\text{Zn}$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{SO}_4\text{Mn}$ .

$M \cdot 10^{-3}$ :  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{SO}_4\text{Mg}$ ,  $\text{SO}_4\text{Mn}$ .

La solution d'enzyme ainsi obtenue est maintenue 3 heures à  $36^\circ$ , puis son activité protéolytique est mesurée sur la sérumalbumine à  $26^\circ$  dans les conditions habituelles.

TABLEAU VI  
 PROTÉOLYSE DE LA SÉRUMALBUMINE COMPLÈTEMENT DÉNATURÉE

Influence de quelques métaux sur l'inactivation de la trypsine par la chaleur (3 heures à  $36^\circ$ )

Concentration	Activité résiduelle en % de l'activité de la trypsine non chauffée						
	Ca	Sr	Ba	Mg	Zn	Co	Mn
$M \cdot 10^{-1}$	89	49	18	39	—	—	69
$M \cdot 10^{-2}$	74	24	21	20	15	19	73
$M \cdot 10^{-3}$	50	—	—	14	—	—	42

Solution de trypsine témoin, non additionnée de métal: 15

De même que dans le cas de la gélatine, les résultats obtenus (Tableau VI) montrent que seul Mn possède une action protectrice comparable à celle du calcium vis à vis de l'inactivation de la trypsine.

Ainsi, de l'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici, ressort nettement une première conclusion: le calcium s'oppose à l'inactivation, c'est-à-dire à la dénaturation de la trypsine par la chaleur à  $p_H$  7.9.

### III. Action de la trypsine sur la sérumalbumine plus ou moins dénaturée

Dans toutes les expériences précédentes, dans lesquelles la trypsine agissait sur des protéines déjà profondément dénaturées, la question du rôle du calcium dans la dénaturation de ces dernières ne se posait pas. Il était intéressant de rechercher si, de même que le calcium protège la trypsine contre la dénaturation à  $p_H$  7.9 par la chaleur, de même ce métal est capable de protéger la sérumalbumine sous forme native contre sa dénaturation au même  $p_H$ , également par la chaleur. Il est possible d'étudier expérimentalement cette question: en effet, on admet classiquement que la trypsine n'attaque que difficilement les protéines non dénaturées; dans le cas de la sérumalbumine, nous avons constaté que la trypsine exerce son activité protéolytique uniquement sur la fraction dénaturée qui accompagne toujours plus ou moins la forme native: c'est ce qu'indique les courbes II et II' de la Fig. 2. Ces courbes sont obtenues dans les mêmes conditions que les courbes I et I'. La courbe II montre de façon évidente que le facteur limitant la vitesse de la protéolyse (quantité de sérumalbumine hydrolysée en 10 minutes), lorsque la quantité d'enzyme croît, est la concentration en substrat réel; cette

concentration se révèle ici très inférieure à celle de la sérumalbumine totale présente (2%), relativement élevée. On verra plus loin que ce substrat réel est précisément la sérumalbumine à l'état dénaturé soit réversiblement, soit irréversiblement. On a donc là la possibilité de mesurer la quantité de sérumalbumine dénaturée, et par conséquent d'étudier l'influence éventuelle du calcium sur sa dénaturation.

Comme dans le cas de la dénaturation de la trypsine, il convient d'envisager l'action éventuelle du calcium vis à vis de la sérumalbumine au point de vue de la dénaturation irréversible de cette dernière, et au point de vue de sa dénaturation réversible.

#### A. Dénaturation irréversible

Chaque essai est fait de la façon suivante: 5 ml de solution de sérumalbumine native sont maintenus à 52° en l'absence de calcium ou en présence de calcium  $M \cdot 10^{-2}$  ou  $M \cdot 10^{-3}$ . Après des temps déterminés, on sort les essais du thermostat, on les refroidit à 26° et on y ajoute 0.05 ml d'une solution tampon contenant du  $\text{CaCl}_2$  à une concentration telle que la concentration finale en Ca soit de  $M \cdot 10^{-2}$ , puis 1 ml de la solution de trypsine dans la solution tampon contenant du calcium  $M \cdot 10^{-2}$ . Indiquons tout de suite que, si avant de placer les essais à 26°, on les maintient, même plusieurs heures, à 0°, on observe exactement les mêmes résultats. La protéolyse a lieu, comme d'habitude, à 26° pendant 10 minutes. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau VII.

TABLEAU VII  
INFLUENCE DU CALCIUM SUR LA DÉNATURATION IRRÉVERSIBLE DE  
LA SÉRUMALBUMINE PAR LA CHALEUR (52°)

Protéolyse de la sérumalbumine à 26°, en présence de Ca  $M \cdot 10^{-2}$ , pendant 10 minutes

Temps d'exposition à la chaleur	Concentration en calcium		
	0	$M \cdot 10^{-3}$	$M \cdot 10^{-2}$
0	0.060	0.059	0.058
5 min	0.082	—	0.060
10 min	0.100	—	0.061
2 heures	0.134	0.088	0.072
4 heures	0.156	—	0.076
6 heures	0.210	0.180	0.081
8 heures	0.200	—	0.101
12 heures	0.240	0.202	0.120
24 heures	0.260	0.204	0.144
30 min à 118°	0.320	0.284	—

Les chiffres du Tableau VII montrent que la sensibilité de la sérumalbumine à l'action de la trypsine, en présence d'une concentration en calcium donnée, augmente avec la durée du chauffage; mais pour une durée donnée, cette sensibilité diminue lorsque la concentration en calcium augmente. Ainsi se trouve démontrée l'action protectrice exercée par le calcium sur la dénaturation irréversible de la sérumalbumine.

A titre de comparaison et de contrôle, nous avons fait des expériences analogues, mais dans lesquelles la sérumalbumine utilisée avait été préalablement complètement dénaturée (Tableau VIII).

D'après les chiffres du Tableau VIII, on voit que la sérumalbumine complètement dénaturée ne présente aucune différence de sensibilité à la trypsine lorsqu'elle est

maintenue à 52° même pendant 25 heures, et ce, aussi bien en présence qu'en l'absence de calcium.

TABLEAU VIII

INFLUENCE DU CALCIUM SUR LA PROTÉOLYSE DE SÉRUMALBUMINE COMPLÈTEMENT DÉNATURÉE (30 min à 118°) PUIS MAINTENUE À 52° PENDANT DES TEMPS DONNÉS, EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE DE Ca  $M \cdot 10^{-3}$

Protéolyse à 26° en présence de Ca  $M \cdot 10^{-2}$

Temps d'exposition à 52° (heures)	En absence de Ca	En présence de Ca
0	0.318	0.316
9	0.313	0.312
25	0.305	0.307

La concentration de  $\text{CaCl}_2$  dans la solution de sérumalbumine complètement dénaturée ne peut pas dépasser  $M \cdot 10^{-3}$  parce qu'une concentration plus élevée fait précipiter la sérumalbumine lorsqu'on chauffe à 52°.

### B. Phase réversible de la dénaturation

De même que dans le cas de la dénaturation réversible de la trypsine, on a réalisé deux conditions différentes de protéolyse de la sérumalbumine plus ou moins dénaturée, l'une en l'absence de calcium, l'autre en présence de calcium  $M \cdot 10^{-2}$ .

Chaque expérience comporte deux séries parallèles d'essais: dans chacune de ces séries, la solution de sérumalbumine dans tampon seul est maintenue à des températures déterminées pendant des temps donnés (première partie de la colonne "traitement" du Tableau IX); au bout de ces temps, on sort les essais du thermostat et on y introduit 1/100 de leur volume, soit de solution tampon seul, soit de solution tampon contenant  $\text{CaCl}_2 M$ ; cette introduction est représentée dans le Tableau IX par  $\downarrow$ . Les essais de la première série, additionnés ou non de calcium, sont placés à 26°, température à laquelle on les maintient 10 minutes avant d'y ajouter la solution de trypsine contenant elle-même  $\text{CaCl}_2 M \cdot 10^{-2}$ , lorsque la solution de sérumalbumine a été additionnée de calcium, ou la trypsine en solution tampon seule, lorsque la solution de sérumalbumine n'a pas reçu de calcium. La protéolyse s'effectue comme toujours à 26° pendant 10 minutes. Les essais de la deuxième série sont mis immédiatement en contact avec la solution de trypsine qui, là encore, a reçu ou non du calcium  $M \cdot 10^{-2}$  selon que la solution enzymatique a été ou non préalablement additionnée de ce métal, et la protéolyse est effectuée comme toujours à 26° et pendant 10 minutes. Les mêmes commentaires faits à propos des expériences analogues effectuées dans le cas de la dénaturation de la trypsine, s'appliquent aux essais de cette deuxième série.

On peut se demander si la fraction de sérumalbumine qui se trouve sous la forme réversiblement dénaturée, à côté de celle qui existe à l'état de dénaturation irréversible, est déjà susceptible d'être attaquée par la trypsine et si le calcium exerce une influence sur cette fraction. S'il en est ainsi, les différences ( $\Delta \text{Ca}$ ) entre les quantités de sérumalbumine sensibles à la trypsine lorsqu'on a ajouté du calcium et lorsqu'on n'a pas ajouté de calcium, doivent rester à peu près les mêmes dans les divers essais au cours desquels les solutions de sérumalbumine ont été maintenues au moins 10 minutes à 26° avant la protéolyse; ces différences doivent au contraire varier notablement dans les autres essais. Les chiffres du Tableau IX montrent à ce point de vue que:

TABLEAU IX  
INFLUENCE DU CALCIUM SUR LA PHASE RÉVERSIBLE DE LA DÉNATURATION  
DE LA SÉRUMALBUMINE PAR LA CHALEUR

Protéolyse à 26° pendant 10 minutes

Traitement subi par la sérumalbumine	Activité protéolytique		$\Delta$ Ca
	Sans calcium	Avec calcium	
1ère série:			
10 min 26° ↓ 10 min 26°	0.084	0.064	20
4 min 52° ↓ 10 min 26°	0.100	0.082	18
6 min 52° ↓ 10 min 26°	0.129	0.107	22
2ème série:			
10 min 0° ↓	0.075	0.066	9
4 min 52° ↓	0.143	0.082	61
6 min 52° ↓	0.185	0.116	69

1. Dans tous les cas, la sensibilité de la sérumalbumine, soit sous forme native, soit à l'état partiellement dénaturé, à l'action de la trypsine, est plus grande lorsque la protéolyse se fait dans les milieux où l'on n'a pas ajouté de calcium; 2. les valeurs de  $\Delta$ Ca sont sensiblement les mêmes, de l'ordre de 20, dans tous les cas où les solutions de sérumalbumine ont été maintenues au moins 10 minutes à 26° avant la protéolyse, et cela indépendamment du temps pendant lequel on a maintenu préalablement ces solutions à 52°, et quoique les valeurs absolues de la protéolyse diffèrent par suite de la dénaturation irréversible de la sérumalbumine à 52°.

A titre de contrôle et de comparaison, nous avons fait des expériences analogues portant sur de la sérumalbumine complètement dénaturée. Des essais contenant 5 ml de solution de cette protéine sont placés à 0°, 26° ou 52°; après 10 minutes, on y ajoute 0.05 ml de solution tampon seule ou de solution tampon contenant  $\text{CaCl}_2$   $M$ ; tout de suite après, on y introduit 1 ml de solution de trypsine dans la solution de tampon seul, ou dans la solution tampon contenant  $\text{CaCl}_2$   $M \cdot 10^{-2}$ , et on plonge le tout au thermostat à 26°. La protéolyse est mesurée comme d'habitude après 10 minutes (Tableau X).

TABLEAU X  
PROTÉOLYSE, EN ABSENCE ET EN PRÉSENCE DE CALCIUM  $M \cdot 10^{-2}$  DE LA SÉRUMALBUMINE  
COMPLÈTEMENT DÉNATURÉE, SOUMISE À DES TEMPÉRATURES DONNÉES

Traitement subi par la sérumalbumine	Activité protéolytique		$\Delta$ Ca
	Sans calcium	Avec calcium	
10 min à 0° ↓	0.244	0.268	24
10 min à 26° ↓	0.253	0.280	27
10 min à 52° ↓	0.306	0.327	21

Comme on pouvait s'y attendre, la protéolyse est ici plus élevée en présence de calcium, et les différences  $\Delta$ Ca ont à peu près la même valeur qui est celle déjà trouvée dans les expériences faisant l'objet du Tableau V.

## DISCUSSION

Les investigations dont il vient d'être question concernent l'influence du calcium sur la dénaturation par la chaleur de deux protéines distinctes, la trypsine d'une part et la sérumalbumine de bœuf (fraction V) de l'autre, ces deux protéines étant toujours maintenues à  $p_H$  7.9. Nous soulignons à nouveau que les considérations et interprétations suivantes sont basées sur les résultats obtenus à ce  $p_H$ .

La dénaturation de la trypsine a été suivie par l'inactivation de l'enzyme, cette inactivation étant elle-même mise en évidence par l'allure de l'action de la trypsine soit sur la gélatine, soit sur la sérumalbumine complètement dénaturée; ces substrats se trouvent sous des formes immédiatement attaquables par l'enzyme actif, et ces formes apparaissent indifférentes à la présence de calcium. Les résultats obtenus avec ces deux substrats sont les mêmes: Tout d'abord, le calcium ralentit considérablement la dénaturation de la trypsine par la chaleur ( $0^\circ$ ,  $26^\circ$ ,  $36^\circ$ ,  $46^\circ$ ,  $52^\circ$ ); en outre, toute substance capable de donner avec le calcium un complexe suffisamment peu dissocié, la Complexone II par exemple, agit en accélérateur puissant de la dénaturation de l'enzyme. Ces résultats permettent de conclure que la forme active stable de la trypsine est un composé de protéine et de calcium\*; dans ce composé, le calcium n'est pas sous forme ionisé, comme l'indique le fait qu'une dialyse, même prolongée contre de l'eau distillée à  $0^\circ$ , ne réussit pas à inactiver l'enzyme, qui reste pourtant facilement inactivable par la Complexone II. Il s'agit donc d'un complexe trypsine-calcium.

On doit donc admettre, et les expériences avec la Complexone II le démontrent, que même dans la trypsine active ainsi dialysée, c'est sous forme d'un tel complexe que se trouve l'enzyme qui doit toujours contenir une certaine quantité du métal. La trypsine apparaît alors, de même que les protéinases bactériennes étudiées précédemment, comme étant une métalloprotéine. Mais ceci, comme on le verra plus bas, ne signifie nullement que le calcium joue un rôle direct dans l'activité protéolytique de l'enzyme, par exemple en servant de trait d'union entre l'enzyme et le substrat, comme l'a envisagé SMITH<sup>4</sup> pour d'autres métaux dans le cas des peptidases. Le métal ne doit donc pas être considéré ici comme jouant le rôle de co-enzyme, mais comme une pièce de la molécule de trypsine lui assurant la structure nécessaire à son activité.

D'autre part, par le jeu d'expositions à des températures différentes, il se manifeste dans certaines conditions des états d'équilibres différents, correspondant à une réversibilité partielle d'une forme inactive de l'enzyme en forme active, c'est-à-dire à une dénaturation réversible; le calcium apparaît alors comme provoquant la formation de la forme active à partir de la forme inactive réversible (Tableau V). Il apparaît ainsi que le complexe trypsine-calcium est réversiblement dissociable, la partie protéique privée de calcium est susceptible de rester pendant quelque temps au moins, dans certaines conditions, capable de fixer à nouveau le calcium et de redevenir active. Mais la durée de vie de cette partie protéique réversiblement activable n'est jamais très longue; elle dépend de la température; par exemple, les courbes de la Fig. 5, correspondant à des expériences faites à  $36^\circ$ , montrent que si le calcium arrête la dénaturation de la trypsine active, lorsqu'on l'ajoute à l'enzyme en cours d'inactivation, il ne fait pas, à cette température, rétrograder sensiblement cette inactivation, ce qui indique que la

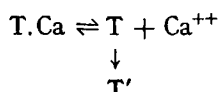
---

\* Ou peut-être d'un autre métal; seul jusqu'ici le manganèse semble pouvoir remplacer le calcium à ce point de vue.

concentration de la protéine privée de calcium et restée à l'état réactivable, est pratiquement nulle.

C'est que la protéine ainsi privée de son métal perd toute stabilité, et se transforme plus ou moins rapidement en protéine irréversiblement inactive. Cette transformation, très sensible à la température, est indépendante de la présence de calcium. On conçoit alors facilement que même en présence d'une concentration élevée en calcium,  $10^{-2} M$  par exemple, l'inactivation de la trypsine, quoique très fortement ralentie, ne puisse pas être complètement supprimée.

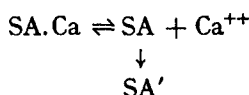
L'ensemble de ces résultats concernant la trypsine aboutit ainsi à la représentation schématique suivante:



dans laquelle: T.Ca représente le complexe Trypsine-Calcium, qui est la forme active stable de la trypsine; T la protéine privée de son calcium, dont la structure est alors suffisamment déformée pour qu'elle ait perdu son activité protéolytique, mais reste néanmoins assez proche de la structure initiale pour, en fixant à nouveau le calcium, retrouver cette structure et par conséquent son activité; T représente ainsi la forme réversiblement dénaturée de l'enzyme; T' la protéine irréversiblement déformée, incapable de reprendre, en présence de calcium, sa forme initiale: elle est à l'état irréversiblement dénaturée.

La dénaturation de la sérumalbumine a été suivie par le fait que seule la forme dénaturée de cette protéine est sensible à l'action de la trypsine (Fig. 2). Or il apparaît que le calcium diminue considérablement la proportion de sérumalbumine dénaturée par exposition de la protéine à la chaleur; il agit donc en protecteur de la protéine native. De même que dans le cas de la trypsine, ce résultat conduit à la conclusion que la forme native de la sérumalbumine est stable lorsqu'elle est sous forme de complexe protéine-calcium\*. De même également que dans le cas de la trypsine, par le jeu d'expositions à des températures différentes, il se manifeste dans certaines conditions des états d'équilibre différents correspondant à une dénaturation réversible. Il apparaît ainsi que le complexe sérumalbumine-calcium est réversiblement dissociable, la partie protéique privée de calcium étant susceptible de rester pendant quelque temps au moins, dans certaines conditions, capable de fixer à nouveau le calcium et de reprendre ainsi la forme native résistante à l'action de la trypsine. La durée de vie de cette partie protéique est toujours brève; nous avons vu qu'elle dépend de la température, une fois de plus, comme dans le cas de la trypsine.

On est ainsi conduit à représenter les résultats obtenus avec la sérumalbumine par le schéma suivant, superposable à celui que nous avons donné plus haut, à propos de la trypsine:



dans lequel: SA.Ca représente le complexe Sérumalbumine-Calcium qui est la forme native stable, résistante à la trypsine; SA la protéine privée de son calcium, dont la

\* Ici encore le manganèse peut remplacer le calcium.

structure est alors suffisamment déformée pour qu'elle puisse subir la protéolyse, mais reste néanmoins assez proche de la structure initiale pour, en fixant à nouveau le calcium, retrouver cette structure et par conséquent sa résistance à l'action enzymatique; SA représente ainsi la forme réversiblement dénaturée de la protéine; SA' la protéine irréversiblement déformée, incapable de reprendre, en présence de calcium, sa forme initiale: elle est à l'état irréversiblement dénaturé et essentiellement protéolysable.

Ces résultats sont évidemment à rapprocher de ceux, bien connus, obtenus par ANSON ET MIRSKY<sup>5</sup>. On sait que, d'après ces auteurs, il existe un premier stade de dénaturation de diverses protéines, stade qui est complètement réversible et en équilibre avec la forme native de ces protéines; NORTHROP ET KUNITZ<sup>3</sup> ont montré que la trypsine se comporte de même. Cet équilibre est déterminé par les conditions de température, de  $pH$ , et la présence éventuelle de certaines substances (urée, guanidine, acide salicylique)<sup>3,5</sup>. Ce premier stade de dénaturation est suivi par un deuxième qui, lui, n'est pas réversible<sup>3,5</sup>. On voit maintenant que le calcium joue un rôle fondamental dans ces diverses transformations.

Ainsi donc, il apparaît que le calcium, constituant de deux protéines aussi différentes que la trypsine et la sérumalbumine, y joue le même rôle, celui de stabilisateur de la structure de la forme native de ces protéines. Il ne nous est pas encore possible de dire jusqu'à quel point ce fait est général; mais il pose dès maintenant la question de savoir si la structure, et par conséquent le fonctionnement biologique de nombreuses protéines considérées jusqu'ici comme constituées uniquement par des acides aminés, n'est pas sous la dépendance du calcium ou d'un autre métal\*.

Enfin, un résultat à première vue paradoxal, est dû au fait que le calcium empêche la dénaturation de la trypsine, qui correspond à l'inactivation de l'enzyme, et la dénaturation de la sérumalbumine, qui correspond à la sensibilisation de la protéine vis à vis de la trypsine; le calcium joue ainsi un rôle fondamental dans la protéolyse de la sérumalbumine par la trypsine. On peut imaginer que, dans les milieux physiologiques où le calcium n'est pas en excès, celui-ci se répartit entre les deux protéines selon les affinités relatives de l'une et de l'autre pour ce métal. Cette répartition constitue un facteur de régulation de la protéolyse, celle-ci ayant lieu d'autant plus que le calcium est davantage fixé sur la trypsine et moins sur le substratum.

## RÉSUMÉ

L'étude de l'influence du calcium sur la dénaturation de la trypsine à  $pH$  7.9 par la chaleur, montre que le calcium ralentit considérablement la dénaturation de l'enzyme et que toute substance, comme la Complexone II, capable de donner avec le calcium un complexe suffisamment peu dissocié, accélère fortement la dénaturation de la trypsine. On doit donc conclure que la forme active stable de l'enzyme est un complexe protéine-calcium, le métal jouant dans la molécule de trypsine un rôle assurant à cette dernière la structure nécessaire à son activité.

Il est d'autre part possible de mettre en évidence une réversibilité partielle d'une forme inactive de l'enzyme en forme active, le calcium provoquant la formation de la forme active à partir de la forme inactive réversible. Le complexe trypsine-calcium est donc réversiblement dissociable; mais la durée de vie de la partie protéique réversiblement activable est toujours brève: la protéine privée de son métal se transforme plus ou moins rapidement en protéine irréversiblement inactive. Cette dernière transformation est indépendante de la présence de calcium.

Il est d'autre part possible d'étudier la dénaturation de la sérumalbumine grâce au fait que seule la forme dénaturée de cette protéine est sensible à l'action de la trypsine. Cette étude montre que le calcium diminue considérablement la proportion de sérumalbumine dénaturée par exposition à la

\* Signalons à ce point de vue l'étude quantitative faite par E. HULTIN<sup>6</sup> de l'effet stabilisateur du calcium sur l' $\alpha$ -amylase.

chaleur. De même que dans le cas de la trypsine, on est conduit à la conclusion que la forme native de la sérumalbumine est stable lorsqu'elle se trouve sous forme de complexe protéine-calcium. Comme dans le cas de la trypsine également, le complexe sérumalbumine-calcium est réversiblement dissociable, la partie protéique privée de métal tendant à se dénaturer irréversiblement.

Si l'on rapproche ces résultats des résultats classiques obtenus par ANSON ET MIRSKY et par NORTHROP ET KUNITZ, on doit attribuer au calcium un rôle fondamental dans les transformations correspondant, chez les protéines, à l'apparition d'une dénaturation réversible avant la dénaturation irréversible.

De toute façon, il apparaît que le calcium est un constituant de la trypsine et de la sérumalbumine sous forme native, et qu'il y joue le même rôle, celui de stabilisateur de la structure de cette forme native. Empêchant la dénaturation de la trypsine et celle de la sérumalbumine, le calcium joue un rôle contradictoire dans la protéolyse de la sérumalbumine par la trypsine. Il est vraisemblable qu'il y a là un mécanisme de régulation de la protéolyse, celle-ci étant d'autant plus forte que le calcium est davantage fixé sur la trypsine et moins sur son substratum.

### SUMMARY

The study of the effect of calcium on the denaturation of trypsin at pH 7.9 by heat shows that it retards considerably the denaturation of the enzyme and that all substances, such as complexone II, capable of forming complexes with the calcium sufficiently little dissociated, accelerate powerfully the process. It must therefore be concluded that the active stable form of the enzyme is a complex protein-calcium, the metal in the trypsin molecule playing a part which assures this last the structure necessary for its activity.

On the other hand, there is evidence of a partial reversibility of an inactive form of the enzyme into an active form. The calcium promotes the formation of the active form from the reversible inactive form. The complex trypsin-calcium is thus reversibly dissociable, but the life of the reversibly activable protein part is always short: the protein stripped of its metal is converted more or less rapidly into irreversibly inactive protein. This last transformation is independent of the presence of calcium.

It is, however, possible to study the denaturation of serum albumin thanks to the fact that only the denaturated form of this protein is attacked by trypsin. This study shows that calcium considerably diminishes the proportion of serum albumin denatured on exposure to heat. Just as in the case of trypsin, it is to be concluded that the native form of serum albumin is stable when it is in the form of the complex protein-calcium. Likewise, as with trypsin, the complex serum albumin-calcium is reversibly dissociable, the protein part when deprived of its metal tending to be denatured irreversibly.

If these results are compared with the classical results of ANSON AND MIRSKY and of NORTHROP AND KUNITZ, then it can be seen that a fundamental rôle must be attributed to calcium in the transformations, in the proteins, corresponding to the appearance of a reversible denaturation before the irreversible denaturation.

In any case, it appeared that calcium is a constituent of trypsin and serum albumin in the native form and that it plays the same rôle in both cases, that of stabilizing the structure of this native form. While preventing the denaturation of trypsin and of serum albumin, calcium assumes a contradictory part in the proteolysis of serum albumin by trypsin. It is probable that here there is a mechanism for regulating the proteolysis which is all the stronger as the calcium is fixed more to the trypsin and less to its substratum.

### ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung des Einflusses von Calcium auf die Wärme-Denaturierung von Trypsin bei pH 7.9 zeigt, dass das Calcium die Denaturierung des Enzyms bedeutend verlangsamt und dass jede Substanz die, wie Komplexon II, mit dem Calcium einen genügend wenig dissoziierten Komplex liefern kann, den Prozess sehr beschleunigt. Man muss also schliessen, dass die aktive stabile Form des Enzyms ein Eiweiss-Calcium-Komplex ist, die Rolle, welche das Metall in dem Trypsin-Molekül spielt, sichert letzterem die für seine Aktivität erforderliche Struktur.

Andererseits kann man eine teilweise Umkehrbarkeit einer inaktiven Form des Enzyms in eine aktive Form aufzeigen, wobei das Calcium die Bildung der aktiven aus der inaktiven reversiblen Form bewirkt. Der Komplex Trypsin-Calcium ist also reversibel dissoziierbar; die Lebensdauer des reversibel aktivierbaren Proteinanteils ist jedoch immer kurz: das seines Metalles beraubte Eiweiss verwandelt sich mehr oder weniger rasch in irreversibel inaktives Eiweiss. Diese letztgenannte Umwandlung ist von dem Vorhandensein von Calcium unabhängig.

Es ist andererseits möglich, die Denaturierung von Serumalbumin zu untersuchen, dank der



Tatsache, dass allein die denaturierte Form dieses Eiweisstoffes von Trypsin angegriffen wird. Diese Untersuchung zeigt, dass das Calcium den Serumalbumin-Anteil, der durch Wärme denaturiert wird, bedeutend vermindert. Wie im Falle des Trypsins kommt man zu dem Schlusse, dass die native Form des Serumalbumins stabil ist, wenn sie als Protein-Calcium-Komplex vorliegt. Gleichfalls ist, wie beim Trypsin, der Serumalbumin-Calcium-Komplex reversibel dissozierbar, während der seines Metalles beraubte Proteinanteil zu irreversibler Denaturierung neigt.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den klassischen Befunden von ANSON UND MIRSKY und von NORTHROP UND KUNITZ, so muss man dem Calcium in den Umwandlungen, welche, bei den Proteinen dem Auftreten einer reversiblen Denaturierung vor der irreversiblen entsprechen, eine grundlegende Rolle zuschreiben.

Jedenfalls zeigt es sich, dass das Calcium ein Bestandteil des Trypsins und des Serumalbumins in nativer Form ist und dass es in beiden Fällen die gleiche Rolle spielt, nämlich die eines Stabilisators der nativen Form. Während das Calcium die Denaturierung von Trypsin und Serumalbumin verhindert, spielt es bei der Proteolyse des Serumalbumins durch Trypsin eine entgegengesetzte Rolle. Es ist wahrscheinlich, dass wir es hier mit einem Regulierungsmechanismus der Proteolyse zu tun haben: letztere ist nämlich um so stärker, je mehr das Calcium an das Trypsin und je weniger es an sein Substrat gebunden ist.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 237.
- <sup>2</sup> L. GORINI ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 524.
- <sup>3</sup> J. H. NORTHROP, *Crystalline Enzymes*, Columbia University Press, New York, 1948.
- <sup>4</sup> E. L. SMITH, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 35 (1949) 80.
- <sup>5</sup> M. L. ANSON, *Adv. Protein Chem.*, 2 (1945) 361.
- <sup>6</sup> E. HULTIN, *Arkiv f. Kemi*, 2 (1950) 135, 173.

Reçu le 19 décembre 1950