

## LES GROUPES ACTIFS DE LA RIBONUCLÉASE

I. ACTION DU PARACHLOROMERCURIBENZOATE DE SODIUM  
SUR LE SYSTÈME ARN-RNASE

par

L. LEDOUX\*

*Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)*

## INTRODUCTION

Bien que l'éventualité d'une intervention de groupes -SH actifs dans la ribonucléase parût peu probable en raison des résultats obtenus antérieurement par d'autres auteurs, il nous a semblé utile de reconsidérer le problème.

En effet, HOLMER<sup>7</sup> a inactivé la ribonucléase par les radicaux hydroxyles et il n'a observé aucune action du perhydrol; BURRON *et al.*<sup>2</sup> ne parviennent à inactiver la ribonucléase que par des doses dénatrantes de rayons X; ils ont d'ailleurs choisi cet enzyme comme exemple de "non sulfhydryl-enzyme". ZITTLE, après avoir cru à la nécessité de groupes -SH, s'est tourné vers les groupes aminés<sup>17</sup> (qu'il a pu bloquer par HCHO, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CNO et la ninhydrine). TABORDA *et al.*<sup>15</sup> ont obtenu, eux aussi, des résultats qui semblent incompatibles avec la présence de -SH actifs (inhibition par les réducteurs) tandis que ROTH<sup>13,14</sup> est arrivé à activer une préparation de ribonucléase par le parachloromercuribenzoate de sodium.

D'autres travaux encore mentionnent l'action de divers réactifs à spécificité faible<sup>6,12,15,17</sup>, dont l'interprétation incertaine ne permet pas de conclure. Par contre, certaines indications que nous avons recueillies nous semblaient être en faveur d'une intervention des groupes -SH et c'est pourquoi nous avons réétudié systématiquement la sensibilité de l'enzyme à divers réactifs: nous avons, en effet, signalé précédemment l'action inhibitrice<sup>10</sup> du parachloromercuribenzoate de sodium et le pouvoir activateur<sup>11</sup> des substances réductrices sur la ribonucléase.

Vu les résultats de ROTH<sup>13,14</sup> qui a trouvé, au contraire, une action activatrice du PCMB sur l'enzyme, il nous a semblé utile d'étudier plus complètement l'action de ce réactif, considéré comme l'un des plus spécifiques des groupes -SH.

Nous avions déjà, en effet, indiqué sommairement<sup>10</sup> la dualité d'action du PCMB sur le système RNase-acide ribonucléique (ARN), action caractérisée par une activation apparente de l'enzyme due à une interaction entre le PCMB et l'ARN. Cette activation peut être supprimée et, mieux, inversée par un excès de réactif ou en modifiant les conditions expérimentales. Le présent travail a pour but de décrire plus en détail et d'étendre ces résultats antérieurs.

\* Aspirant du Fonds national belge de la Recherche scientifique.

## MÉTÉRIEL

1. *Ribonucléase*: nous avons utilisé la ribonucléase cristallisée, dépourvue de sels, fournie par la General Biochemicals inc. Des essais ont été effectués, à titre de contrôle, sur un échantillon de ribonucléase préparée dans ce laboratoire selon la méthode de KUNITZ<sup>8</sup> et sur l'enzyme fourni par la Worthington Biochemical Sales Co. Des résultats semblables ont été obtenus dans tous les cas, pour autant que les solutions aient été fraîchement préparées.

2. *Acide ribonucléique*: nous avons également comparé divers substrats:

- ARN préparé à partir de levure fraîche selon la méthode de CHANTRENNE<sup>3</sup>,
- ARN Schwartz purifié et dialysé,

c. nucléate A préparé selon la méthode de CHANTRENNE<sup>3</sup>. Ici aussi les résultats furent en tout point comparables.

3. Nucléotides et bases puriques et pyrimidiques: produits Schwartz et Sigma.

4. Les réactifs minéraux sont tous des produits pour analyse (Merck ou U.C.B.).

## MÉTHODES

1. *Méthode spectrophotométrique de KUNITZ<sup>9</sup>*: elle consiste à suivre à 300 m $\mu$  les variations de la densité optique d'une solution de ARN 10% en tampon acétique 0.2 M de pH 5 sous l'action de la RNase.

On mesure les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman, modèle D.U.

Les densités optiques étaient mesurées par rapport à une solution de référence contenant les mêmes constituants que la solution étudiée, exception faite de la ribonucléase.

Substrat employé: nucléate A ou acide nucléique purifié.

2. *Méthode opacimétrique de CHANTRENNE<sup>4</sup>*: elle consiste à faire floculer l'acide ribonucléique non digéré par la RNase et à mesurer le trouble obtenu.

Substrat employé: nucléate A.

3. *Méthode de DUBOS ET THOMPSON<sup>5</sup>*: elle consiste à précipiter l'acide ribonucléique non digéré et à mesurer la densité optique du surnageant à 260 m $\mu$ ; nous avons utilisé comme substrat le nucléate A et, comme précipitant, le mélange acétonique de Chantrenne.

Nous avons choisi les concentrations des différents réactifs de telle sorte que les résultats fournis par les diverses méthodes soient en tous points comparables.

Dans chaque cas, nous avons obtenu des courbes d'activité superposables. Précisons que quelques essais seulement ont été effectués simultanément à l'aide des trois méthodes indiquées ci-dessus; dans la plupart des cas, les résultats ont été obtenus uniquement par la méthode de KUNITZ<sup>8</sup>.

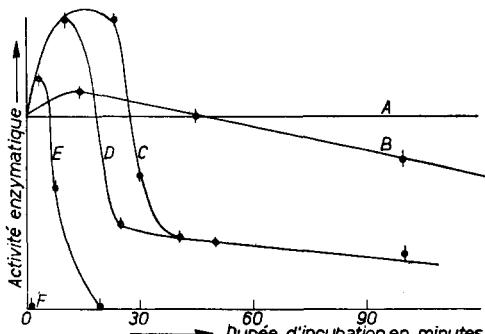


Fig. 1. Action du PCMB sur la ribonucléase (5 γ/ml)

- Solution de référence (RNase pure aux mêmes conditions)
- PCMB 10<sup>-4</sup> M à pH 8
- PCMB 10<sup>-2</sup> M à pH 7
- PCMB 5.10<sup>-4</sup> M à pH 9
- PCMB 10<sup>-3</sup> M à pH 10
- PCMB 10<sup>-2</sup> M et 10<sup>-3</sup> M à pH 11

peut être supprimée par l'adjonction d'un excès d'ions OH<sup>-</sup> ou de glutathion réduit (GSH). Ces résultats sont consignés dans le graphique 2.

## RÉSULTATS

## Interaction PCMB-RNase

Le graphique 1 exprime les variations d'activité d'une solution de ribonucléase à 5 γ/ml incubée, au pH indiqué, en présence de PCMB de concentration donnée.

On voit que, pour des concentrations suffisantes en inhibiteur et à un pH convenable, l'activité enzymatique devient nulle.

Un effet activateur se manifeste pour de courtes durées d'incubation; il précède l'inhibition qui s'obtient dans tous les cas en prolongeant l'action du réactif. Les résultats obtenus en présence de l'inhibiteur sont exprimés par rapport à ceux obtenus avec la solution enzymatique pure dans les mêmes conditions. L'action inhibitrice du PCMB

Le cas du glutathion sera examiné en détails au cours de la discussion terminant cette note. Dès à présent, soulignons que nous avons choisi empiriquement une concentration de GSH qui soit suffisante pour produire une réactivation de l'enzyme bien qu'elle soit insuffisante pour provoquer la "dénaturation" de la protéine<sup>11</sup>.

Il est en effet nécessaire d'employer un excès de thiol<sup>1</sup>, la réactivation étant déterminée par la valeur relative des constantes de dissociation enzyme-PCMB et glutathion-PCMB : mais cet excès ne doit cependant pas être trop considérable, car il provoquerait alors, ainsi que nous l'avons déjà montré<sup>11</sup>, la dénaturation de l'enzyme et, par conséquent, l'inhibition complète de celui-ci.

#### Interaction PCMB-ARN

Nous avons vu<sup>10</sup> qu'il y a de bonnes raisons de supposer une interaction PCMB-substrat.

Nous avons, par conséquent, étudié les variations du spectre d'absorption de l'acide ribonucléique en tampon acétique de pH 5, en présence de PCMB. La longueur d'onde correspondante au maximum était constante ( $258 \text{ m}\mu$ ), celle du minimum variait avec la concentration de l'acide ribonucléique (le PCMB n'avait aucun effet sur la position de ces extrema).

Le graphique 3 exprime les valeurs du rapport maximum/minimum du nucléate A correspondant à celles du rapport conc. PCMB/conc. ARN. La courbe a été déterminée en faisant varier, dans une première série d'expériences (cercles du graphique), la concentration du PCMB et en maintenant constante celle du nucléate A. Dans une seconde série d'essais (carrés du graphique), nous avons maintenu la concentration du PCMB constante et fait varier celle de l'acide nucléique. On voit que le spectre de l'ARN se modifie très profondément sous l'influence du PCMB.

Malheureusement, les conditions de solubilité et l'absorption élevée du PCMB ne permettent pas de suivre les variations spectrales pour de grandes valeurs du rapport conc. PCMB/conc. ARN\*.

Nous avons alors mesuré la variation de la densité optique produite par le PCMB sur des solutions de concentrations équivalentes de différents nucléotides et de différentes bases puriques et pyrimidiques (en tampon acétique 0.2 M de pH 5).

Nous résumerons ces observations en insistant sur le fait que les résultats sont identiques pour les nucléotides et les bases

\* La densité optique de chaque mélange a été mesurée par rapport à une solution de PCMB de concentration identique.

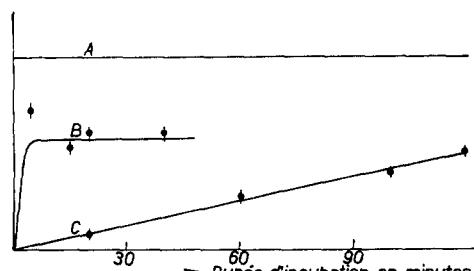


Fig. 2. Réactivation de la ribonucléase inhibée par le PCMB

- A. Solution de référence (RNase)
- B. RNase inhibée par PCMB  $10^{-3} M$   
+ GSH  $10^{-2} M$
- C. RNase inhibée par PCMB  $10^{-3} M$ ,  
mise à pH 10.5

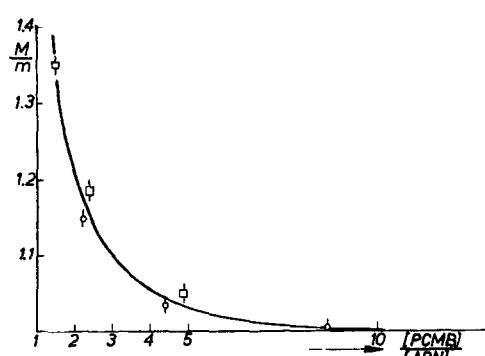


Fig. 3. Action du PCMB sur le spectre de l'acide ribonucléique

correspondantes. Les différentes substances étudiées se comportent de même, exception faite pour l'adénine et l'acide adénylique qui ne présentent pas de variation sensible sous l'influence du PCMB. Notons que les variations spectrales de l'acide nucléique sont égales à celles de chacun des autres nucléotides ou bases puriques.

Les graphiques 4 et 5 donnent un exemple des résultats obtenus.

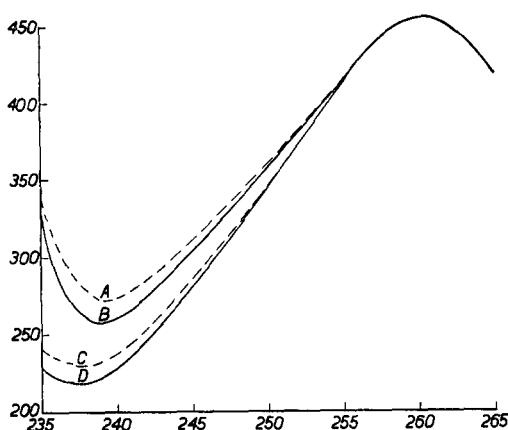


Fig. 4. Action du PCMB sur l'adénine et l'acide adénylique en tampon acétique de pH 5

- A. Ac. adénylique + PCMB
- B. Ac. adénylique
- C. Adénine + PCMB
- D. Adénine

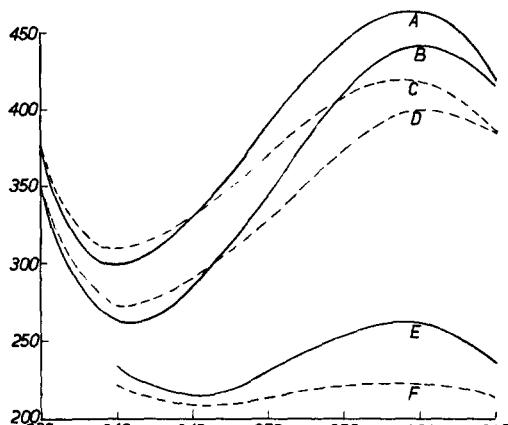


Fig. 5. Action du PCMB sur l'uracile, l'acide uridylique et l'acide ribonucléique en tampon acétique de pH 5

- A. Uracile
- B. Ac. uridylique
- C. Uracile + PCMB
- D. Ac. uridylique + PCMB
- E. Ac. ribonucléique
- F. Ac. ribonucléique + PCMB

## DISCUSSION

### PCMB + RNase

On peut donc affirmer que le *parachloromercurobenzoate de sodium* agit sur la ribonucléase en produisant une baisse sensible de l'activité enzymatique.

Cette action est favorisée par une élévation du pH (à l'intérieur de certaines limites) et par une augmentation de la concentration en réactif et de la durée d'incubation du mélange PCMB + RNase.

Puisque l'inhibition peut être supprimée par l'augmentation de la concentration en OH<sup>-</sup> ou l'adjonction de thiol, on est en droit de supposer que des -SH sont nécessaires à l'activité enzymatique. Le PCMB, en effet, est l'un des réactifs les plus spécifiques des thiols que l'on connaisse à l'heure actuelle, du moins quand son action est réversible<sup>1</sup>. On ne connaît, en outre, pas d'exemple où le PCMB aurait produit l'inhibition réversible d'un enzyme ne contenant pas de groupes -SH essentiels à l'activité<sup>1</sup>.

Lors de la réactivation par le glutathion réduit, il est évident que nous nous trouvons en présence d'un ensemble de réactions fort complexe:

- a. PCMB + RNase → RNase — PCMB (inhibition)
- b. GSH + PCMB → GSH — PCMB
- c. GSH + RNase — PCMB → RNase + GSH — PCMB (réactivation)
- d. GSH + RNase → RNase activée<sup>11</sup>
- e. GSH + RNase activée → RNase inhibée<sup>11</sup>

Selon la concentration en glutathion réduit, la réaction s'arrête à l'un ou l'autre

stade. La prévision quantitative du résultat global nécessiterait la connaissance des constantes des diverses étapes de la réaction et nous ne pouvons donc encore que constater, qualitativement, l'effet de réactivation d'une concentration donnée de glutathion.

Notons également que quelques essais d'orientation nous ont montré que le cyanure est également capable de réactiver l'enzyme bloqué par le PCMB. Mais, dans ce cas, la réaction est plus compliquée et les résultats ne sont guère reproductibles, trop de facteurs intervenant simultanément. Quoiqu'il en soit, ces résultats semblent bien confirmer que les groupes actifs de la ribonucléase sont — en partie tout au moins — des groupes thiols. Rappelons que ROTH<sup>13,14</sup> a obtenu récemment une activation d'une ribonucléase de foie de rat par le PCMB ; mais cet auteur a travaillé sur un homogénéisat de foie où, à côté de la ribonucléase, existent des enzymes et des substances de toutes sortes ; l'examen des conditions expérimentales semble montrer d'ailleurs que ce résultat était tout-à-fait prévisible et qu'il est dû à l'activation apparente de l'enzyme par l'action du PCMB sur le substrat. Rien ne prouve d'ailleurs qu'il s'agisse de la même ribonucléase dans le foie et le pancréas<sup>13</sup>.

En ce qui concerne nos propres résultats, soulignons que l'inhibition par le PCMB exige des concentrations en réactif et des pH assez élevés (supérieurs aux pH des groupes -SH habituels). Ce fait semble indiquer que les groupes thiols sont difficiles à atteindre dans la molécule de l'enzyme.

Remarquons encore que la variation d'activité est beaucoup plus rapide dans le cas des solutions de ribonucléase fraîchement préparées que dans celui des solutions conservées un certain temps en glacière. Ce fait s'explique peut-être en supposant qu'en milieu aqueux les groupes -SH et d'autres groupes de la protéine acquièrent la possibilité de réagir pour former soit des ponts, soit des cycles intramoléculaires. Une telle configuration résisterait évidemment mieux à l'action des réactifs.

Nous poursuivons actuellement l'étude de ce phénomène et, dès à présent, il semble acquis que les oxydations y jouent un grand rôle.

#### *PCMB + ARN*

Il est indéniable que le PCMB agit sur l'acide ribonucléique en produisant une modification de structure favorisant l'action de la ribonucléase.

Comme les spectres d'absorption des bases azotées et des nucléotides subissent des modifications parallèles, on peut conclure que le PCMB agit sur les bases puriques et pyrimidiques de l'acide ribonucléique.

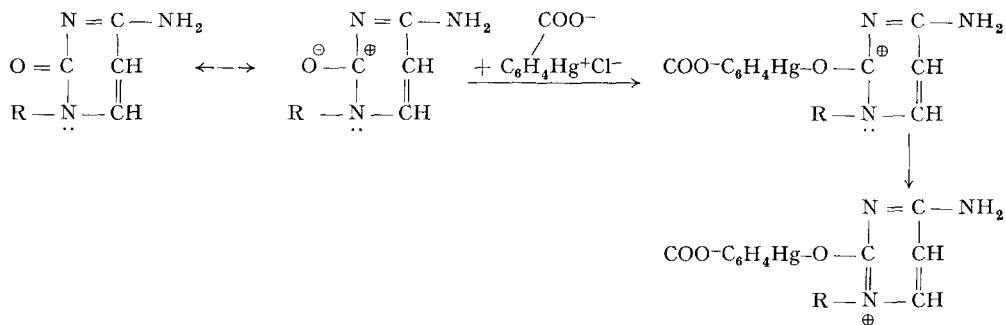
L'effet obtenu est du même ordre dans le cas de la molécule de l'ARN et de chaque nucléotide (sauf l'acide adénylique) alors que l'on pourrait s'attendre à la voir triplée (à concentration molaire égale) dans le cas de l'acide. Il faut évidemment tenir compte des interactions possibles entre les différentes parties du polynucléotide ; ces interactions doivent, selon toute vraisemblance, tendre à diminuer l'efficacité du réactif.

Tentons maintenant d'interpréter cette action d'un réactif que l'on sait être spécifique, dans le cas des protéines, des groupes -SH : nous avons vu que, parmi tous les nucléotides et les bases azotées, seuls l'acide adénylique et l'adénine ont un comportement particulier : ils sont seuls, en effet, à ne pas être influencés significativement par la présence du PCMB.

Or l'adénine est la seule base azotée présente dans l'ARN qui ne contienne pas de groupements C = O et on sait que ces groupes peuvent, dans les bases puriques et pyrimidiques, acquérir une structure qui les rend assez semblables aux groupes -SH :

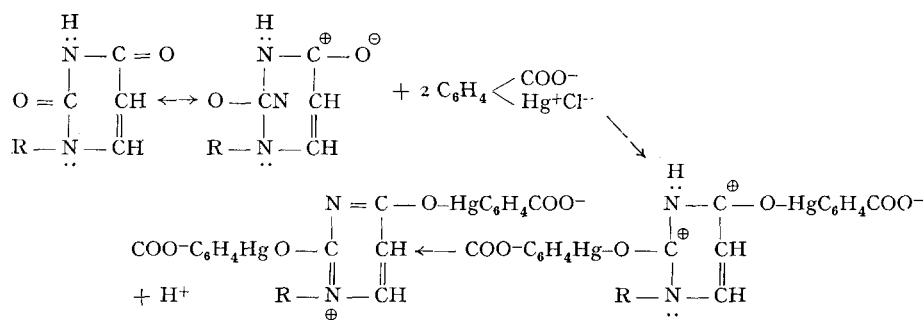
Ils s'énolissent, en effet, et ils sont susceptibles de s'ioniser. On peut, dès lors, nous semble-t-il, supposer que leur réactivité serait assez semblable à celle des  $-\text{SH}$  protéiques pour qu'une interaction entre la base azotée et le PCMB soit possible.

Considérons, par exemple, le cas du nucléotide cytidylique: la base pyrimidique est liée au sucre par l'azote en  $\alpha$  du groupe  $\text{C} = \text{O}$ . On peut imaginer comme suit l'action du PCMB:



Une telle action du PCMB n'est pas accompagnée de l'apparition de protons. Nous ne sommes d'ailleurs pas parvenu, au cours d'essais électrométriques, à déceler, dans ce cas, une baisse du pH.

Pour l'acide uridylique, par contre, nous avons constaté une libération d'ions hydrogènes, ainsi que notre hypothèse le faisait prévoir:



Cette libération de  $\text{H}^+$  produit un saut du pH de 0.4 unités, correspondant à la fixation de  $7.5 \cdot 10^{-6}$  moles de PCMB sur  $7.2 \cdot 10^{-6}$  moles d'acide uridylique. L'adjonction ultérieure de PCMB ne produit plus de variations du pH (les solutions réagissantes sont évidemment ajustées au même pH; le milieu est alcalin).

Il est par conséquent permis de supposer que le PCMB réagit effectivement avec les groupes  $\text{C} = \text{O}$  polarisés des bases puriques et pyrimidiques; mais on doit cependant ajouter que l'action du PCMB sur le polynucléotide ne se limite pas nécessairement à cette action directe sur les bases azotées; d'autres mécanismes, tendant à favoriser l'action ribonucléasique sont concevables également.

Nous tenons à remercier Messieurs les Professeurs BRACHET ET CHANTRENNE pour l'intérêt avec lequel ils ont suivi ce travail et les conseils qu'ils nous ont prodigués.

Nous remercions également Monsieur M. C. DURAND pour l'échantillon de ribonucléase qu'il nous a gracieusement offert.

## RÉSUMÉ

Le *p*-chloromercuribenzoate de sodium agit sur la ribonucléase en provoquant, selon les conditions expérimentales, soit une inhibition, soit une activation.

1. L'inhibition provient d'une interaction réelle entre le PCMB et la RNase; elle dépend du pH, des concentrations relatives et du temps d'incubation. Elle est réversible (sous l'action des ions OH<sup>-</sup> et du glutathion notamment) et elle correspond vraisemblablement à un blocage de l'enzyme au niveau de groupes -SH actifs.

2. L'activation provient d'une interaction acide nucléique-PCMB favorisant l'action enzymatique.

3. L'étude des variations spectrales des nucléotides et des bases azotées sous l'action du PCMB montre que vraisemblablement le réactif agit sur les groupes C = O polarisables de ces substances. Des mesures électrométriques paraissent confirmer cette hypothèse.

## SUMMARY

Sodium *p*-chloromercuribenzoate affects the action of ribonuclease by causing, depending on experimental conditions, either an inhibition or an activation.

1. Inhibition results from a real interaction between PCMB and ribonuclease; it is dependent on pH, on relative concentrations and on time of incubation. It is reversible (*i.e.* under the action of OH<sup>-</sup> ions and glutathione) and probably corresponds to an inactivation of functional -SH groups.

2. Activation is due to an interaction of ribonucleic acid with PCMB favouring enzymic activity.

3. A study of spectral variations of the nucleotides and nitrogen bases under the action of PCMB suggests that this reagent is active on polarisable C = O groups of these substances.

Electrometric measurements give further evidence for this interpretation.

## ZUSAMMENFASSUNG

*p*-Chloromercuribenzoisches Natrium beeinflusst die Ribonucleasewirkung je nach den experimentellen Bedingungen, indem es eine Hemmung oder Aktivierung veranlasst.

1. Die Hemmung führt von einer tatsächlichen Reaktion der PCMB und der Ribonuclease her. Sie hängt ab vom pH, den relativen Konzentrationen und der Inkubationszeit. Sie ist reversibel (d.h. bei der Einwirkung von OH<sup>-</sup> und Glutathion) und wahrscheinlich mit der Inaktivierung der funktionellen -SH-Gruppen gleichzusetzen.

2. Die Aktivierung ist einer Reaktion der Ribonukleinsäure mit PCMB zu zuschreiben, welche die enzymatische Aktivität begünstigt.

3. Eine Untersuchung der Veränderungen des Spektrums der Nucleotide und Stickstoffbasen bei der Einwirkung von PCMB lässt vermuten, dass dieses Reagenz auf die polarisierbaren CO-Gruppen dieser Substanzen einwirkt.

Elektrometrische Messungen geben weitere Anhaltspunkte für die Interpretation.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> G. E. S. BARRON, *Advances in Enzymol.*, 11 (1951) 201.
- <sup>2</sup> G. E. S. BARRON, S. DICKMAN, J. A. MUNTZ ET T. P. SINGER, *J. Gen. Physiol.*, 32 (1949) 4, 537.
- <sup>3</sup> H. CHANTRENNE, *Bull. soc. chim. belges*, 55 (1946) 5.
- <sup>4</sup> H. CHANTRENNE, *Bull. soc. chim. belges*, 55 (1946) 110.
- <sup>5</sup> R. J. DUBOS ET R. H. S. THOMPSON, *J. Biol. Chem.*, 124 (1938) 501.
- <sup>6</sup> W. F. GOEBEL, P. R. OLITSKY ET A. C. SAENZ, *J. Exptl. Med.*, 87 (1948) 445.
- <sup>7</sup> B. HOLMER, *Nature*, 165 (1950) 266.
- <sup>8</sup> M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1940) 1, 15.
- <sup>9</sup> M. KUNITZ, *J. Biol. Chem.*, 164 (1946) 569.
- <sup>10</sup> L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1953) 10, 190.
- <sup>11</sup> L. LEDOUX, *Arch. intern. de Physiol.*, (1953) Vol. LXI, Fasc. 2, 264.
- <sup>12</sup> J. S. ROTH, *Federation Proc.*, 11 (1952) 277.
- <sup>13</sup> J. S. ROTH, *Biol. Bull.*, 103 (1952) 2, 228.
- <sup>14</sup> J. S. ROTH, *Nature*, 171 (1953) 127.
- <sup>15</sup> A. R. TABORDA, L. C. TABORDA, J. N. WILLIAMS ET C. A. ELEVERJEM, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 222.
- <sup>16</sup> C. A. ZITTLE, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 111.
- <sup>17</sup> C. A. ZITTLE, *J. Franklin Inst.*, 246 (1953) 266.

Reçu le 26 février 1953