

SUR LES FACTEURS CONDITIONNANT L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE
DE LA CARBOXYPEPTIDASE

par

LUIGI GORINI ET JULIE LABOUESSE-MERCOUROFF

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

La présence de Mg^{++} a été considérée comme nécessaire pour le fonctionnement de la carboxypeptidase¹ et il a été suggéré que ce métal est un agent de chélation permettant la formation du complexe enzyme-substrat². Ultérieurement ce rôle de Mg^{++} a été mis en doute³ et on a observé que l'activité de l'enzyme est fortement influencée par la force ionique du milieu. Etudiant les facteurs conditionnant l'activité de la carboxypeptidase, nous avons fait diverses observations susceptibles d'expliquer leur mode d'action. Nous pensons utile de les signaler dès maintenant, les détails de ce travail faisant l'objet d'une publication ultérieure dans ce même journal.

On prépare une solution saturée à + 2° dans $NaCl\ M$ de carboxypeptidase à partir de cristaux de l'enzyme*. Cette solution, dont la teneur en azote (Kjeldahl) est de l'ordre de 0.3 mg/ml, est dialysée contre $NaCl\ M$; on ne peut guère la conserver à la glacière plus de deux semaines: on observe en effet une précipitation progressive de protéines et une diminution parallèle d'activité. La solution saturée est diluée par du tampon véronal sodium-HCl $2 \cdot 10^{-2}\ M$, pH 7.5. L'activité enzymatique est déterminée à 25° sur l'hippuryl-DL-phénylalanine $1.6 \cdot 10^{-2}\ M$ dans le même tampon. La force ionique (μ) dans le mélange réactionnel lorsqu'on ne fait aucune addition supplémentaire de sels, est de 0.02. Les substances étudiées, sels ou détergents, sont ajoutées soit à la solution d'enzyme soit à celle du substrat. On détermine la L-phénylalanine libérée par la méthode colorimétrique à la ninhydrine⁵, et l'on compare les vitesses initiales d'hydrolyse (réaction d'ordre zéro). Suivant le temps de sa conservation, la concentration d'enzyme dans le mélange réactionnel est de 5000 à 10,000 fois plus faible que celle de la solution mère de façon à avoir, à $\mu = 0.62$ ($NaCl$), une vitesse d'hydrolyse de 30 μmol par litre de L-phénylalanine libérée par minute.

1. Nous avons vérifié l'action de certains chlorures métalliques sur l'activité enzymatique. Lorsque la carboxypeptidase est très diluée (5000 à 10,000 fois), elle n'agit qu'en présence d'une certaine concentration en sels et, entre certaines limites, son activité est fonction de cette concentration (Tableau I). A des molarités faibles, les cations bivalents ont une action plus grande que les cations monovalents. Cette différence est évidente même si l'on compare l'action des cations non en fonction de leur concentration moléculaire, mais en fonction de la force ionique résultante dans le milieu. A une force ionique élevée ($\mu = 0.62$), l'action des cations bivalents et monovalents devient comparable.

TABLEAU I
INFLUENCE DE DIVERS SELS SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA CARBOXYPEPTIDASE

Sels ajoutés	$\mu = 0.02$	$\mu = 0.05$		$\mu = 0.32$		$\mu = 0.62$	
	Act.	(C)	Act.	(C)	Act.	(C)	Act.
Rien	4.3						
NaCl		$3 \cdot 10^{-2}$	14.8	$3 \cdot 10^{-1}$	54.0	$6 \cdot 10^{-1}$	100
KCl		$3 \cdot 10^{-2}$	9.6	$3 \cdot 10^{-1}$	52.0	—	—
LiCl		$3 \cdot 10^{-2}$	6.1	$3 \cdot 10^{-1}$	47.0	—	—
MgCl ₂		10^{-2}	52.0	10^{-1}	92.0	$2 \cdot 10^{-1}$	102
CaCl ₂		10^{-2}	42.7	10^{-1}	84.0	—	—
SrCl ₂		10^{-2}	49.5	10^{-1}	70.5	—	—

μ = Force ionique du mélange réactionnel.

(C) = Concentration moléculaire dans le mélange réactionnel du sel ajouté.

Act. = % de l'activité maximum mesurée à $\mu = 0.62$ ($NaCl$).

* Carboxypeptidase Worthington recristallisée trois fois; les cristaux sont soigneusement lavés à l'eau distillée avant leur utilisation.

TABLEAU II

INFLUENCE DE DÉTERGENTS SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA CARBOXYPEPTIDASE

Déturgent ajouté		Activité		
Mode d'addition	Nature	(C) (10^{-3} g %)	$\mu = 0.02$	$\mu = 0.62$ (NaCl)
A l'enzyme	Rien		4	100
	Tween 20	0.1	46.5	—
	Tween 20	0.5	122	—
	Tween 20	1	133	—
	Tween 20	5	142	—
	Tween 20	10	142	155
	Tween 20	15	142	—
	Tween 20	20	142	—
	Tween 80	5	138	—
	Saponine	1	13	—
Au substrat	Saponine	10	78	—
	Tween 80	5	106	—
	Tween 80	50	116	—

(C) = Concentration finale du détergent dans le mélange réactionnel.

Activité = Activité en % de l'activité mesurée en absence de détergent et à $\mu = 0.62$ (NaCl).

2. Nous avons observé que l'activité optima obtenue en présence de sels peut aussi bien être obtenue en présence de certaines substances non ionisables. Le Tableau II montre en effet qu'en présence d'un détergent tel que le Tween 20 ou 80, et à un moindre degré la saponine, l'activité presque négligeable en absence de détergent, atteint une valeur même supérieure à la valeur maximum obtenue à $\mu = 0.62$. On constate d'ailleurs que les actions du détergent et de NaCl ne sont pas additives. Pour observer l'effet maximum, le Tween doit être ajouté à la solution de l'enzyme et non à celle du substrat.

3. A $\mu = 0.02$ et en absence de détergent, l'activité de l'enzyme n'est pas une fonction linéaire de sa concentration. La Fig. 1 montre en effet que dans ces conditions, le rapport $d(\text{activité})/d(\text{concentration})$ n'est pas constant, mais croît avec la concentration. Ce n'est qu'à partir d'une certaine valeur de cette dernière que la courbe devient une droite parallèle à celle qu'on obtient à $\mu = 0.62$ ou en présence de Tween à $\mu = 0.02$. La carboxypeptidase est donc active, non seulement en présence d'une certaine concentration de sels ou de détergent, mais aussi lorsqu'on réalise une concentration suffisante de protéine enzymatique ou d'une substance accompagnant la carboxypeptidase cristallisée.

4. Nous avons observé que le Tween ($5 \cdot 10^{-2}$ g %) tout en n'augmentant pas la solubilité de la carboxypeptidase, rend pratiquement stable la solution saturée en empêchant la précipitation de protéine et la perte d'activité. D'autre part les différents sels utilisés à $\mu = 0.62$ et le Tween à $5 \cdot 10^{-2}$ g % ne changent pas d'une façon significative la vitesse d'inactivation à 50° de la carboxypeptidase en solution diluée.

Tout se passe comme si les facteurs conditionnant l'activité de la carboxypeptidase s'opposaient à la formation d'une association moléculaire inactive.

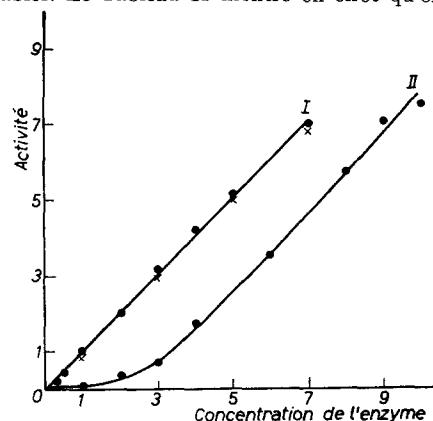


Fig. 1. Activité de l'enzyme en fonction de sa concentration. Influence de NaCl et du Tween.

Courbe I: ● = Tween $5 \cdot 10^{-3}$ g % ($\mu = 0.02$)
+ = NaCl $6 \cdot 10^{-1}$ M ($\mu = 0.62$)Courbe II: $\mu = 0.02$

La valeur 1 de l'échelle des abscisses correspond à une concentration d'enzyme dans le mélange réactionnel de $1/5610$ de la solution saturée. La valeur 1 de l'échelle des ordonnées correspond à l'activité de l'enzyme à la concentration 1, mesurée soit à $\mu = 0.62$ (NaCl), soit en présence de Tween $5 \cdot 10^{-3}$ g % ($\mu = 0.02$).

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. L. SMITH ET H. T. HANSON, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 997; 179 (1949) 802.
² E. L. SMITH, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 35 (1949) 80. *The Enzymes*, Vol. I, p. 831, Academic Press New York 1951.
³ H. NEURATH ET G. DE MARIA, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 653.
⁴ R. LUMRY, E. L. SMITH ET R. R. GLANTZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 4330.
⁵ S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.

Reçu le 30 décembre 1953

SYNTHETIC POLYANIONIC INHIBITORS OF HYALURONIDASE

by

H. J. ROGERS AND P. C. SPENSLEY

The National Institute for Medical Research, Mill Hill, London (England)

In recent years several different types of high molecular weight polyanions have been shown to be inhibitors of hyaluronidase and certain other enzymes. Thus heparin¹, cellulose trisulphate and chitin disulphate², nitrated and acetylated hyaluronic acid³, phosphate polymers derived from a number of aromatic hydroxy and amino compounds^{4,5,6}, and "humic acid" (an undialysable polyacid formed from benzoquinone)^{7,8} are active in this respect.

Gentisic acid when pure is inactive but when allowed to oxidize in alkaline solution yields a hyaluronidase inhibitor, possibly of structure similar to "humic acid"^{7,8,9}. Gentisic acid may also be polymerized with formaldehyde and in this way HAHN^{10,11,12} obtained the highly potent anti-hyaluronidase "rehibin" which was the best of a series of active formaldehyde polymers produced from various mono-, di- and tri-hydroxybenzoic acids. The initial condensation was carried out by vigorous stirring of a suspension of gentisic acid in 50% (v/v) sulphuric acid with formaldehyde at 100° C for 5 hours. We find that equally active material can be more simply obtained by adding formaldehyde to a solution of gentisic acid in 25% sulphuric acid and collecting the insoluble product after 1 hour's heating under reflux. Exclusion of air has little or no effect. Active material can also be obtained by heating equimolecular proportions of sodium gentisate and formaldehyde in aqueous solution under reflux for 5 hours, acidifying and collecting the precipitate.

In view of the existence of sulphate groups in heparin and chondroitin sulphate and because of the rather poor solubility of the substituted benzoic acid-formaldehyde polymers at physiological pH's attention was directed to polymers based on substituted benzenesulphonic acids. Such of these substances as have been examined, condense with formaldehyde under acid conditions to give water and alkali insoluble materials due presumably to elimination of sulphonate acid groups; this is probably a general reaction. Under alkaline conditions condensation takes a different course and, providing a slight excess over 1 molecular equivalent of alkali has been employed, a fair proportion of high molecular weight, highly water soluble polymer is obtained. Thus if equimolecular quantities of hydroquinone sulphonic acid and formaldehyde and 1.2 moles of sodium hydroxide are heated together in aqueous solution under reflux for 5 hours and the resulting dark brown solution neutralized and evaporated to dryness a very dark resin (PS 53) remains. This has a similar order of activity as an inhibitor of testicular hyaluronidase to "rehibin" but is very soluble in water over a wide range of pH's; a neutral, homogeneous syrup containing 50% of the material can be produced. Its toxicity is low, the LD₅₀ in mice being greater than 1250 mg/kg given subcutaneously and greater than 250 mg/kg intravenously. Mice fed 400 mg/kg/day for 21 days were without toxic symptoms. This, in our experience, is even less toxic than the gentisic acid-formaldehyde polymers.

On dialysis of PS 53 in cellophane approximately a quarter (PS 53D) is retained. This latter is the most active anti-hyaluronidase so far examined. A small proportion of the original activity also passed through the cellophane.

The method used for estimating inhibitor potency was to incubate buffered solutions of the polymers at pH 6.0 together with partially purified testicular hyaluronidase (Rondase, Evans Medical Supplies Ltd. England) for 30 min at 37° C. The enzyme was first diluted in a 0.2 g/100 ml solution of gelatin containing $2 \cdot 10^{-4}$ M sodium pyrophosphate; this diluent protects the enzyme against inactivation by incubation and heavy metal ion contamination¹³. After incubation enzyme activity was estimated by the turbidity reduction technique¹⁴. Four concentrations of each polymer