

LES GROUPES ACTIFS DE LA RIBONUCLÉASE

III. LE COMPLEXE ENZYME-SUBSTRAT

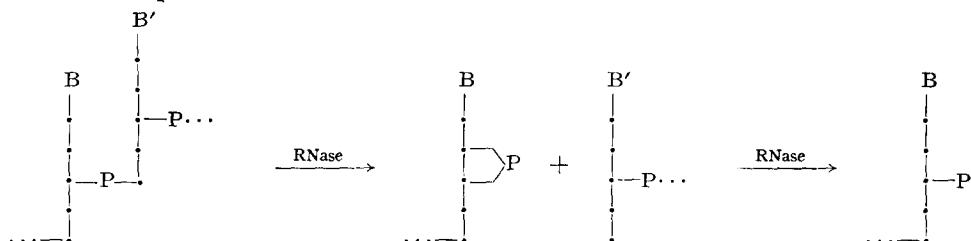
par

L. LEDOUX*

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

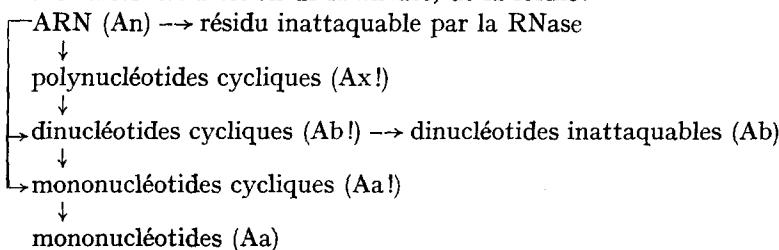
MARKHAM ET SMITH^{10, 11, 12} ont confirmé récemment une hypothèse de BROWN ET TODD¹, selon laquelle l'action de la ribonucléase (RNase) se ferait en deux stades distincts: après une dépolymérisation préalable accompagnée d'une cyclisation du groupe phosphate libéré, il se produirait une décyclisation provoquant l'apparition d'un groupe phosphate libre.

Schématiquement, la réaction s'écrirait donc:



D'autre part, nous avons montré⁸ que la ribonucléase contient des groupes -SH essentiels à son activité enzymatique. Nous avons pu en déterminer les potentiels de demi-réduction (0.27 v et 0.64 v) et préciser que l'action de l'enzyme est une fonction directe du *nombre* de -SH présents. On peut se demander dès lors si ces groupes thiols sont réellement nécessaires aux deux stades de l'action ribonucléasique schématisés ci-dessus. Afin de préciser ce point, nous avons étudié chromatographiquement les effets de l'activation de la ribonucléase par le cyanure.

On peut supposer, a priori, qu'une réaction telle que la digestion de l'ARN par la ribonucléase s'effectue en régime non stationnaire. C'est-à-dire que si nous supposons un schéma formel d'action de la RNase, de la forme:



on observera une cinétique de la forme représentée dans la Fig. 1.

* Aspirant du Fonds national belge de la Recherche scientifique.

En étudiant les vitesses initiales d'apparition des diverses espèces chimiques, il semble qu'il doive être possible de déterminer l'activation due aux réducteurs.

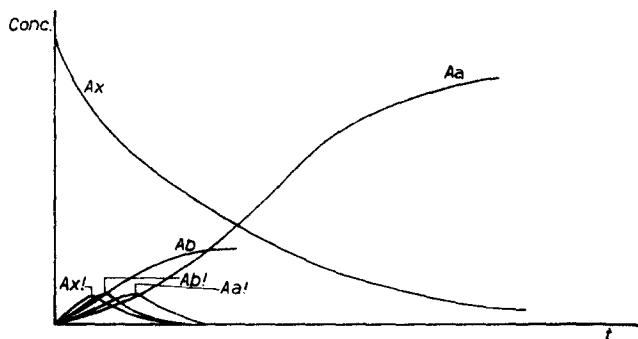


Fig. 1

Si l'apparition de nouveaux groupes $-SH$ actifs provoque l'activation des *deux* stades de la réaction, cette activation se marquera par une augmentation égale de toutes les vitesses initiales et par un glissement des maxima des réactions partielles vers l'origine des temps. Si, par contre, les groupes $-SH$ ne catalysent que l'une des deux réactions, les activations des réactions partielles seront très différentes (on peut aisément les calculer dans chaque cas). Il est évident qu'un tel problème devrait être traité en étudiant l'apparition individuelle de chaque nucléotide, c'est-à-dire que les compositions qualitative et quantitative exactes de chacun des groupes séparés par le solvant utilisé devraient être déterminées à l'aide d'un ou de plusieurs solvants de types différents.

La présente étude ne constitue qu'une première approche du problème, capable seulement d'en dégager les grandes lignes. Nous verrons qu'elle permet néanmoins de préciser l'intervention des groupes $-SH$ actifs dans les deux étapes de la réaction.

L'expérience a consisté à prélever, à des temps variables, des échantillons de solutions contenant un mélange d'acide ribonucléique et de ribonucléase (à 35° C). Ces échantillons ont été déposés sur les chromatogrammes et séchés immédiatement à l'aide d'une soufflerie puissante (séchage complet en 2 minutes environ). Nous avons utilisé des solutions de ribonucléase de concentrations variables afin d'obtenir des actions partielles facilement mesurables.

Comme activateur, nous avons choisi le cyanure de potassium à cause de la stabilité relativement grande de ses solutions aqueuses.

Chaque série d'expériences était conduite simultanément en présence et en l'absence de cyanure. Les divers prélèvements ont été déposés alternativement sur les chromatogrammes, de telle sorte que les échantillons correspondants puissent être chromatographiés en même temps, dans des conditions absolument semblables.

MATÉRIEL

Ribonucléase (RNase)

Nous avons utilisé la ribonucléase cristallisée, dépourvue de sels, fournie par la General Biochemicals Inc.

Bibliographie p. 544.

Acide ribonucléique (ARN)

Nous avons utilisé et comparé différents substrats. Les résultats mentionnés plus loin se rapportent à l'acide ribonucléique de la levure préparé par la méthode de CHARGAFF *et al.*⁴. Des résultats semblables ont été obtenus avec de l'ARN Schwarz purifié et dialysé, ainsi qu'avec du nucléate A préparé selon la méthode de CHANTRENNE³.

Les réactifs minéraux et les solvants organiques sont tous des produits pour analyse (Merck ou U.C.B.).

MÉTHODES

Chromatographie

Nous avons utilisé la technique décrite par MARKHAM ET SMITH^{10,11,12} en utilisant comme solvant le mélange isopropanol 70% — H₂O 30% et en travaillant dans une atmosphère de NH₃ (0.5 ml de NH₃ sont déposés au fond de la cuve, par volume d'un litre). Le support était du papier Whatman n° 1.

Dosage

Après élation des taches dans HCl 0.1 N (1 nuit à la chambre froide et 30 minutes d'agitation vigoureuse) les éluats ont été dosés. Nous avons mesuré leurs densités optiques, à 260 m μ , à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman, modèle D.U., par rapport à une solution témoin d'HCl 0.1 N.

RÉSULTATS

On trouvera dans les Tableau I, II et III et les Figures 3, 4 et 5 les résultats d'une série de mesures; le schéma du chromatogramme est également donné (Fig. 2); les numéros des graphiques et des tableaux correspondent à ce schéma.

Fig. 2. Schéma de chromatogramme (cf. MARKHAM ET SMITH^{10,11,12})

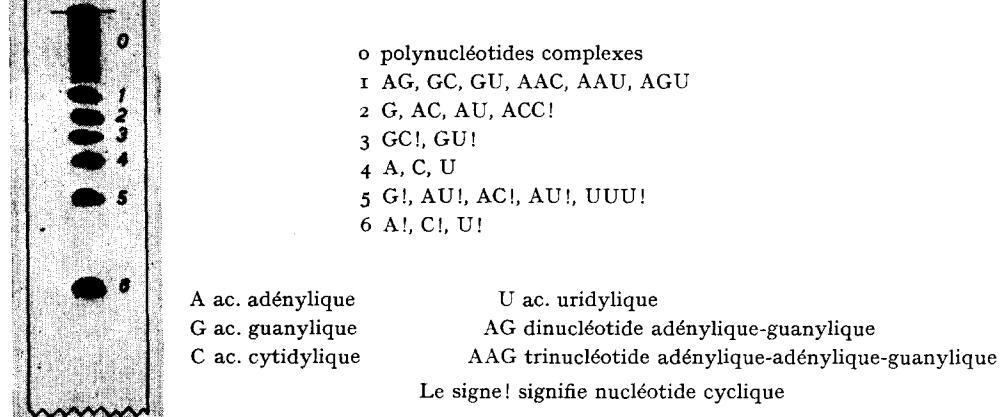


TABLEAU I

Expérience 1: ARN = 5 mg, RNase = 0.3 γ , KCN = 5 \cdot 10⁻³ M, vol. solvant = 0.11 ml, Densités optiques à 260 m μ des différents éluats.

No. des taches	0 min	0 min CN	10 min	10 min CN	20 min	20 min CN	30 min	30 min CN
0	0.069	0.062	0.093	0.115	0.120	0.166	0.149	0.197
1	0.030	0.027	0.037	0.048	0.046	0.060	0.055	0.075

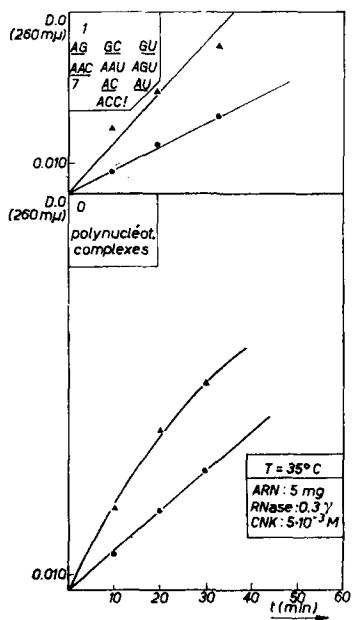


Fig. 3. Expérience 1. Action (de la RNase sur l'ARN (voir texte)

- RNase seule
 - △ RNase activée par le cyanure
- $$\frac{\text{RNase}}{\text{ARN}} = 0.06 \cdot 10^{-3}$$

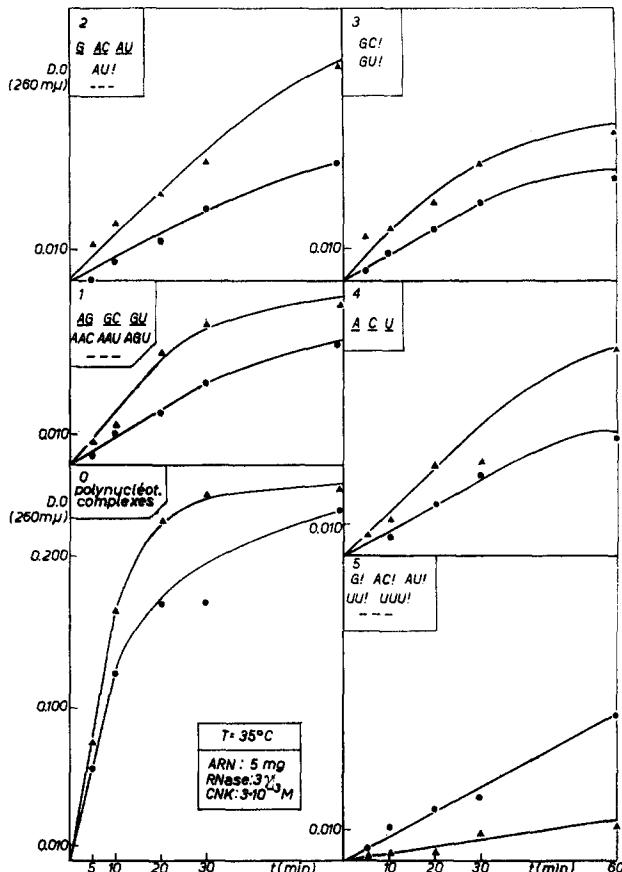


Fig. 4. Expérience 2. Action de la RNase sur l'ARN (voir texte)

- RNase seule
 - △ RNase activée par le cyanure
- $$\frac{\text{RNase}}{\text{ARN}} = 0.6 \cdot 10^{-3}$$

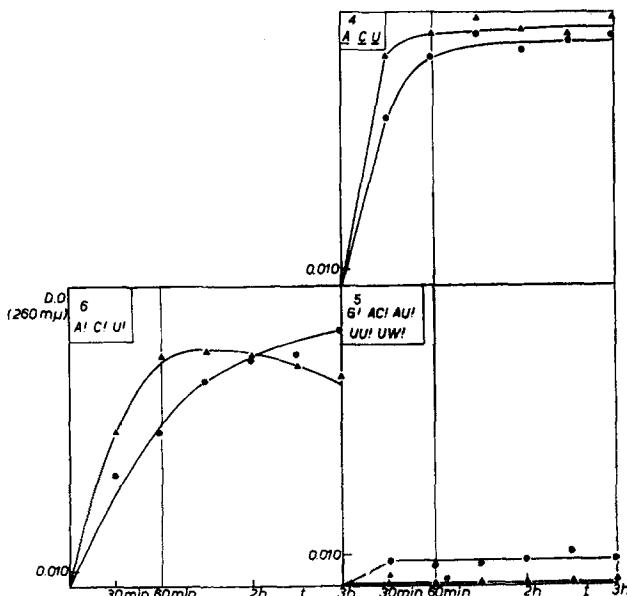


Fig. 5. Expérience 3. Action de la RNase sur l'ARN (voir texte)

- RNase seule
 - △ RNase activée par le cyanure
- $$\frac{\text{RNase}}{\text{ARN}} = 3 \cdot 10^{-3}$$

TABLEAU II

Expérience 2: ARN = 5 mg, RNase = 3.0 γ , KCN = $3 \cdot 10^{-3}$ M, vol. solvant = 0.2 ml.

No. des taches	10 sec	10 sec CN	5 min	5 min CN	10 min	10 min CN	20 min	20 min CN	30 min	30 min CN	60 min	60 min CN
0	0.102	0.107	0.163	0.183	0.225	0.270	0.270	0.325	0.270	0.338	0.330	0.340
1	0.025	0.040	0.028	0.047	0.035	0.052	0.042	0.076	0.052	0.084	0.064	0.090
2	0.027	0.030	0.027	0.042	0.033	0.049	0.040	0.057	0.050	0.069	0.065	0.100
3	0.020	0.030	0.023	0.044	0.029	0.046	0.036	0.055	0.045	0.067	0.053	0.077
4	0.024	0.049	0.032	0.055	0.036	0.060	0.040	0.078	0.050	0.079	0.067	0.115
5	0.026	0.026	0.030	0.027	0.037	0.029	0.042	0.029	0.045	0.035	0.073	0.037

TABLEAU III

Expérience 3: ARN = 3 mg, RNase = 9.2 γ , KCN = $3 \cdot 10^{-3}$ M, vol. solvant = 0.2 ml.

No. d'ordre	10 sec	10 sec CN	30 min	30 min CN	1 h	1 h CN	1 1/2 h	1 1/2 h CN	2 h	2 h CN	2 1/2 h	2 1/2 h CN	3 h	3 h CN
4	0.100	0.086	0.210	0.235	0.250	0.260	0.265	0.270	0.255	0.265	0.260	0.260	0.265	0.280
5	0.049	0.057	0.057	0.061	0.055	0.057	0.055	0.050	0.057	0.055	0.060	0.052	0.049	0.055
6	0.051	0.055	0.124	0.157	0.154	0.207	0.191	0.210	0.205	0.205	0.209	0.199	0.217	0.190

La composition des bandes 2, 3, 4 et 6 a été vérifiée par hydrolyse acide ou alcaline des éluats et chromatographie à l'aide du solvant: *isobutanol-HCl*¹³ ou *isopropanol-H₂O/NH₃*¹¹.

DISCUSSION

On voit que le cyanure provoque une activation identique de toutes les réactions partielles: les vitesses initiales d'apparition de chaque groupe de nucléotides sont en effet doublées en présence de cyanure.

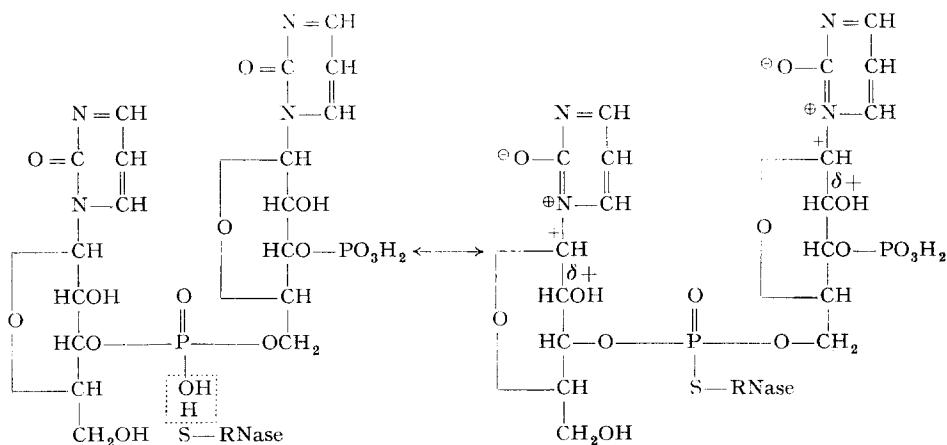
Les résultats figurant ci-dessus ont été reproduits à plusieurs reprises avec des acides nucléiques différents. Ces essais ont montré que l'activation des différentes vitesses initiales est reproductible, quel que soit l'acide ribonucléique utilisé.

Considérons cependant le cas particulier des nucléotides de la bande 5 (AC! AU! G! UU! UUU! . . .): on voit (expérience 2) que la présence du cyanure paraît inactiver la libération de ces nucléotides. Cependant, l'expérience 3, qui a été vérifiée à de nombreuses reprises, montre que l'augmentation de la concentration en ribonucléase exerce le même effet inactivateur: quelle que soit l'explication de ce phénomène, on voit qu'ici aussi la présence de cyanure (donc l'augmentation du nombre des groupes -SH actifs) conduit à une augmentation de l'activité enzymatique.

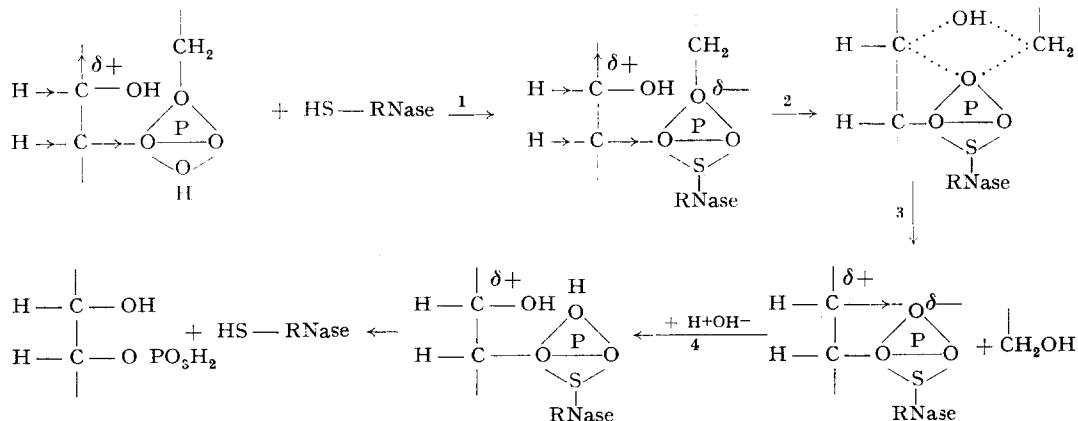
Puisque l'apparition des autres nucléotides cycliques (bandes 3 et 6) est également activée par le cyanure, nous pouvons en conclure que les deux étapes de l'action de la ribonucléase semblent être catalysées par les mêmes groupes actifs, des groupes -SH.

D'autre part, nous avons montré que l'activité de la ribonucléase dépend du *nombre* des -SH présents (et non de leur pouvoir oxydo-réducteur). C'est ce qui nous a conduit à formuler une hypothèse sur le mécanisme intime de la réaction enzymatique.

Supposons que les $-SH$ de la ribonucléase forment des liaisons S-P avec les groupes phosphate du substrat. En tenant compte de la résonance du noyau pyrimidique, nous aurions, dans le cas d'un dinucléotide pyrimidique :



Nous représenterons plus commodément la suite de réactions envisagée de la façon suivante :



Le soufre étant moins électronégatif que l'oxygène (il a la même électronégativité que le carbone), la formation du thioester (1) provoquera une augmentation de la densité électronique aux sommets du tétraèdre du groupe phosphate. Il en résulte un affaiblissement de la liaison PO_2-CH_2 . Si l'électronégativité du groupe $-OH$ (du ribose) voisin le permet, une réaction *d'échange* deviendra possible avec formation (2) d'un complexe transitoire. Il y aura formation d'un anhydride interne (3). Un second effet—toujours dû à la fixation de l'enzyme—résultera de la présence du solvant (4). Un nouvel échange de particules négatives se produira et le cycle sera rompu en faisant apparaître un groupe acide libre. Un stade ultérieur consistera en une hydrolyse du thioester (5), libérant l'enzyme.

Voyons maintenant quels sont les arguments en faveur de ce schéma : tout d'abord,

rappelons que COHN ET VOLKIN⁵ ont montré que la chaîne primaire de l'ARN est en b-5 et que les nucléotides pyrimidiques libérés possèdent un groupe phosphate lié au carbone b. D'autre part, CAVALIERI² et LORING *et al.*⁶ ont apporté des arguments convaincants en faveur de la position 3 du carbone b dans la chaîne du ribose. C'est sur la base de ces résultats que nous avons schématisé le dinucléotide pyrimidique figuré ci-dessus. BROWN ET TODD¹, qui ont étudié l'action de la RNase sur des esters monophosphates du type nucléoside-phosphate-R, ont montré que la nature du groupe estérifié (R) est indifférente pour l'action enzymatique. On voit qu'une telle conclusion démontre l'influence prédominante de l'une des parties seulement des nucléotides, celle qui possède la liaison ribose (C₃)-phosphate.

On sait aussi que, pour que la ribonucléase agisse, il faut que la base fixée en B soit une base pyrimidique¹, c'est-à-dire qu'elle possède un C=O en alpha de l'azote lié au ribose. Il en résulte que la partie importante du nucléotide contenant la liaison ribose (C₃)-phosphate est constituée par la base azotée. De plus, on voit que la nature de cette base, substituant le ribose en C₁, est importante.

C'est ainsi que, d'après MARKHAM ET SMITH^{11,12}, les corps suivants ne sont pas digérés par la ribonucléase :

- a. les dinucléotides puriques
- b. les dinucléotides purine 3'-pyrimidine 5'
- c. les nucléotides puriques cycliques.

Toutes ces substances ont ceci de particulier, qu'elles ne contiennent pas de C=O en alpha de la liaison base- ribose (C₃)-phosphate.

De plus, on sait que les dinucléotides purine 3'-pyrimidine (ou purine) 5', lorsqu'on élimine la base purique (avec apparition du groupe aldéhydique libre) deviennent attaquables par la RNase. Cet effet montre bien que ce qui importe réellement est l'augmentation de la positivité du carbone I du ribose (renforcé ici par l'apparition du groupement C=O aldéhydique).

En outre, nous avons déjà montré que le *parachloromercuribenzoate de sodium*⁷ (et peut-être la *chloropicrine*⁸) active la digestion enzymatique en fixant le C=O en alpha sous la forme $-C^+-O^-$: or il est évident qu'une telle réaction renforcera la positivité du carbone I en fixant une configuration de résonance favorable.

On constate encore que le deuxième stade de l'action de la ribonucléase est très lent. Ce fait est à prévoir s'il est déterminé par la diffusion des ions OH⁻, comme nous le supposons. Le premier stade, lui, dépend de facteurs tout différents, et principalement, semble-t-il, de la possibilité des mouvements des groupes réagissants. A priori, il semble qu'un abaissement de température puisse inhiber plus fortement la cyclisation que le second stade, puisqu'il diminue la mobilité relative de ces mêmes groupes réactifs.

VAN DEN DRIESSCHE¹³ a précisément relaté des expériences de dilatométrie, effectuées à différentes températures, où on voit la dilatation initiale, correspondant à la cyclisation¹⁴, diminuer régulièrement de 35° C à 5° C pour disparaître à 0° C. De plus, cet auteur a observé qu'une augmentation du pH accélère considérablement le second stade de la réaction sans modifier le premier. Il semble donc que le mécanisme proposé résume d'une façon satisfaisante les données actuelles du problème.

RÉSUMÉ

1. L'étude chromatographique de l'activation de la ribonucléase par le cyanure de potassium semble démontrer que les mêmes groupes -SH actifs interviennent dans les différentes réactions catalysées par cet enzyme.

2. Sur la base de ces résultats, un mécanisme d'action de la ribonucléase est proposé; il met en jeu la formation d'un lien P-S entre le substrat et l'enzyme. Il montre que les deux étapes successives de l'action de la ribonucléase peuvent être considérées comme des réactions d'échange essentiellement semblables et permet en outre d'expliquer l'inactivité de la ribonucléase vis-à-vis des nucléotides ne contenant pas de groupe C=O en alpha de la liaison base-ribose.

De plus, il est d'accord avec tout ce que l'on sait actuellement sur l'interaction ARN-RNase.

SUMMARY

1. Chromatographic investigation of the activation of ribonuclease by potassium cyanide seems to demonstrate that the same active -SH groups act in the different reactions catalysed by this enzyme.

2. On the basis of these results an action mechanism of ribonuclease is proposed; it involves the formation of a P-S bond between the substrate and the enzyme. It shows that the two successive stages of the action of ribonuclease can be considered as essentially similar exchange reactions and also helps to explain the inactivity of ribonuclease towards nucleotides that do not possess a C=O group in the α -position of the base-ribose bond.

Moreover, it is in accordance with all that is at present known about the RNA-RNase interaction.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die chromatographische Untersuchung der Aktivierung der Ribonuclease mit KCN scheint zu beweisen, dass die selben aktiven SH-Gruppen bei den verschiedenen durch dieses Enzym katalysierten Reaktionen Anteil nehmen.

2. Auf Grund dieser Ergebnisse wird ein Wirkungsmechanismus der Ribonuclease vorgeschlagen. Er enthält die Bildung einer P-S-Bindung zwischen dem Substrat und dem Enzym. Er zeigt, dass die beiden aufeinanderfolgenden Stufen der Wirkung der Ribonuclease als im wesentlichen ähnliche Austauschreaktionen betrachtet werden können und erlaubt außerdem die Inaktivität der Ribonucleinsäure gegenüber Nucleotiden, die keine CO-Gruppe in α -Stellung zur Basen-Ribosebindung haben zu erklären.

Er steht ferner im Einklang mit allem, was man gegenwärtig über die Reaktion RNS-RNase weiß.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ D. M. BROWN ET A. R. TODD, *J. Chem. Soc.*, (1953) 2040.
- ² L. F. CAVALIERI, *J. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5804.
- ³ H. CHANTRENNE, *Bull. soc. chim. belge*, 55 (1946) 63.
- ⁴ E. CHARGAFF, B. MAGASANIK, E. VISCHER, C. GREEN, R. DONIGER ET D. ELSON, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 51.
- ⁵ W. E. COHN ET E. VOLKIN, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 319.
- ⁶ L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 517.
- ⁷ L. LEDOUX, *Arch. intern. Physiol.*, 61 (1953) 428.
- ⁸ L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 121.
- ⁹ H. S. LORING, M. L. HAMMEL, L. W. LEVY ET H. W. BOTNER, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 821.
- ¹⁰ R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 552.
- ¹¹ R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 558.
- ¹² R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 565.
- ¹³ R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 46 (1950) 509.
- ¹⁴ L. VAN DEN DRIESSCHE, *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg*, 27 (1951) No 15.
- ¹⁵ L. VAN DEN DRIESSCHE, *Arch. intern. Physiol.*, 61 (1953) 430.

Reçu le 26 octobre 1953