

LES GROUPES ACTIFS DE LA RIBONUCLÉASE

IV. SUR L'HOMOGENÉITÉ DES SOLUTIONS DE PROTÉINES

par

L. LEDOUX*

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

L'homogénéité des solutions de ribonucléase (RNase) a récemment été mise en doute par différents auteurs^{2,10} qui ont établi — par chromatographie — la présence de plusieurs constituants dans des solutions de RNase cristallisée obtenues selon la méthode de KUNITZ⁴ et McDONALD⁹.

L'examen des conditions expérimentales adoptées par les auteurs montre que :

1. les fractions ainsi séparées ont des activités enzymatiques qualitativement semblables, mais quantitativement différentes: celles qui migrent le plus rapidement sont nettement moins actives que les autres, bien qu'elles agissent sur le même substrat ;
2. l'importance relative des pics varie selon les échantillons, bien qu'ils aient été préparés et purifiés de la même façon ;
3. la position de la fraction "la plus active" varie fortement avec le pH, d'une manière imprévue: alors que la ribonucléase a un point isoélectrique de 7.8, la vitesse de la migration croît de façon continue avec l'augmentation du pH, sans présenter de minimum à 7.8.

Ces constatations sont compatibles avec l'hypothèse que les différentes fractions seraient constituées par des ribonucléases de degrés d'oxydation différents; en effet, nous avons montré précédemment⁶ que la RNase contient deux paires de -SH oxydables (dont les potentiels redox normaux valent respectivement 0.27 v et 0.65 v) qui contribuent à l'activité enzymatique de la protéine; dès lors, il est possible que l'oxydation ou la réduction des groupes -SH modifie l'adsorption de la protéine et que les fractions obtenues correspondent en fait à *des formes différemment oxydées ou réduites de la même espèce protéique*.

Afin de préciser ce point, nous avons étudié par chromatographie le comportement de solutions de RNase oxydée ou réduite à des degrés différents. Ainsi que nous l'avons déjà indiqué sommairement⁷, les résultats obtenus montrent, effectivement, que *l'état des groupes -SH détermine les conditions de la chromatographie des solutions de RNase*.

MATÉRIEL

1. *Ribonucléase*: nous avons utilisé la RNase cristallisée, dépourvue de sels, fournie par la Worthington Inc. et celle fournie par la General Biochemical Inc.

* Aspirant du Fonds national belge de la Recherche scientifique.

2. *Acide ribonucléique*: ARN Schwarz purifié et dialysé, mis en tampon acétique 0.2 M de pH 5.
3. *Glutathion oxydé ou réduit*: produits Schwarz.
4. *Amberlite IRC-50*: nous avons broyé de la résine Amberlite IRC-50 fournie par la Cie Rohm et Haas de façon à obtenir des grains de 200-400 mesh environ.
5. *Les réactifs minéraux*: sont tous des produits pour analyse (Merck ou U.C.B.).

MÉTHODES

1. *Chromatographie*: nous avons suivi à la lettre les indications de HIRS, STEIN ET MOORE. Ces auteurs ont décrit en détails les méthodes de préparation de la colonne de chromatographie ainsi que toutes les opérations qui s'y rapportent².

2. *Dosage de l'activité enzymatique*: les dosages ont été effectués selon la méthode spectrophotométrique de KUNITZ⁵.

3. *Dosage de la concentration protéique*: nous avons utilisé:

- a. la méthode de LOWRY *et al.*⁸,
- b. la méthode de dosage des acides aminés par la ninhydrine²,
- c. la méthode de dosages des groupes -SH protéiques par le ferricyanure¹.

RÉSULTATS

Nous avons soumis à l'analyse chromatographique un échantillon de ribonucléase cristallisée dissous dans le tampon phosphate de pH 6.47 employé par HIRS, MOORE ET STEIN.

La Fig. 1 représente les résultats obtenus (dosage de la concentration en protéines et dosage des activités enzymatiques).

Nous appellerons les différents pics: O, A, B, C et D. Ces fractions ont des activités différentes: les pics C et D ont la même activité, c'est-à-dire que le rapport activité enzymatique/concentration protéique est le même pour eux; le pic O est peu actif et les fractions A et B ont des activités intermédiaires.

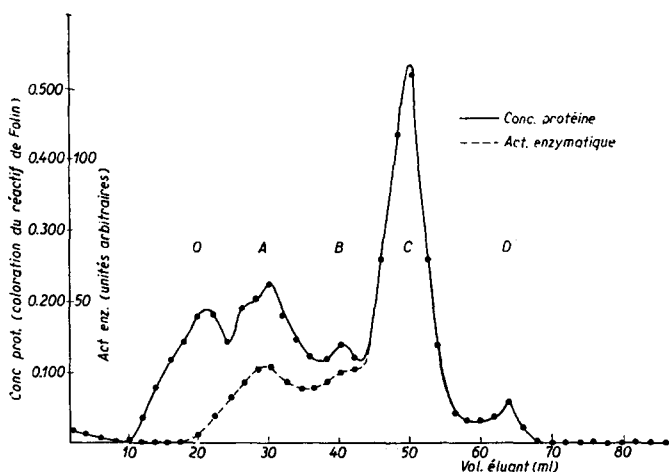


Fig. 1. Chromatographie d'un échantillon de ribonucléase sur une colonne de IRC-50 (0.9 x 30 cm.)

Afin de vérifier notre hypothèse sur la nature réelle de cette hétérogénéité, nous avons soumis le pic C à l'action de l'eau oxygénée dans des conditions où l'inhibition de l'enzyme est réversible⁶.

Dans ce but, les fractions qui le composent ont été rassemblées, puis dialysées et évaporées. On a ajouté 0.5 ml d'eau oxygénée concentrée et 0.01 ml de CNK $10^{-2} M$ (servant de catalyseur⁶) aux 9/10 de la solution C. Après une heure l'eau oxygénée a été détruite par des traces de catalase cristallisée (Armour). Le 1/10 restant de solution C a été alors ajouté et on a effectué la chromatographie du mélange obtenu.

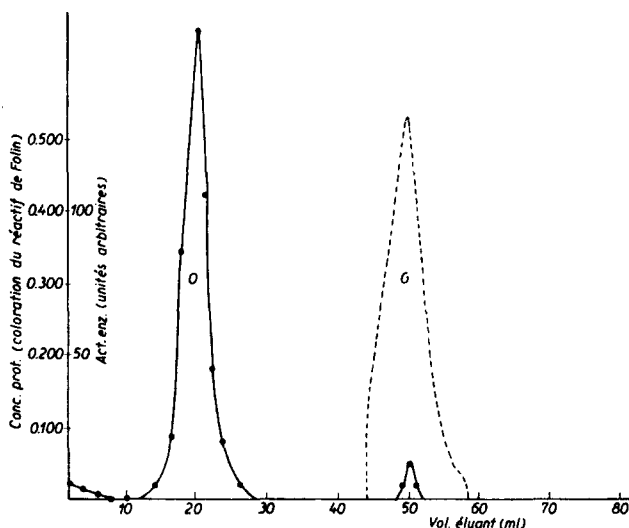


Fig. 2. Chromatographie des fractions C après oxydation par H_2O_2 des 90 % de ces fractions.

Dans une autre expérience, nous avons soumis les fractions A et B à l'action oxydante de 3 mg de glutathion oxydé. La solution enzymatique a été dialysée, évaporée et soumise à l'analyse chromatographique. La Fig. 3 rend compte des résultats obtenus. On voit qu'après l'oxydation les fractions A et B migrent en position O.

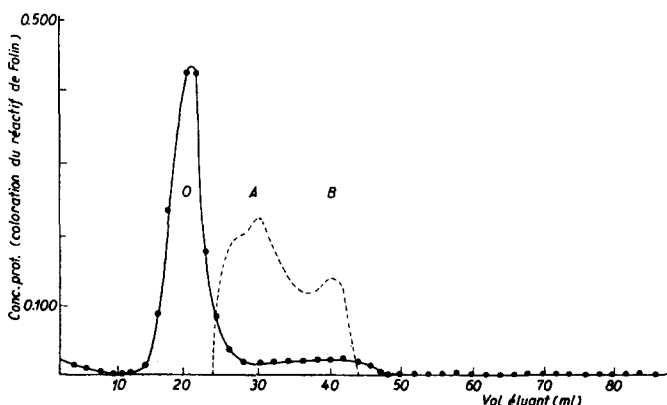


Fig. 3. Chromatographie des fractions A et B après oxydation par du glutathion oxyde (après dialyse).

Les fractions O obtenues au cours de ces deux expériences ont été réunies: après évaporation et dialyse de la solution, celle-ci a été soumise à l'action de 5 mg de glutathion réduit.

Après avoir laissé la réaction s'accomplir pendant 1 heure, la chromatographie du mélange a été effectuée.

La Fig. 4 représente les résultats de cette chromatographie.

On voit que l'on obtient maintenant 6 fractions dont deux nouvelles, que nous appellerons G_1 et G_2 .

Des dosages complémentaires au ferricyanure et à la ninhydrine ont été effectués afin de préciser la nature des pics G_1 , G_2 et O. La Fig. 5 exprime les résultats obtenus. Chacune des fractions obtenues par chromatographie a été dialysée et le dosage des protéines a été refait par la méthode de LOWRY.

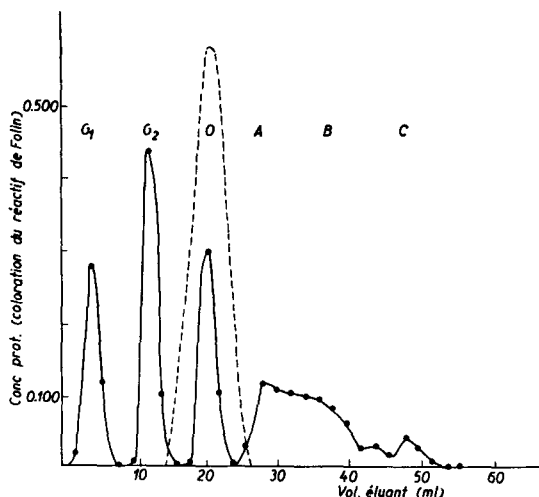


Fig. 4. Chromatographie des fractions O après réduction par du glutathion réduit.

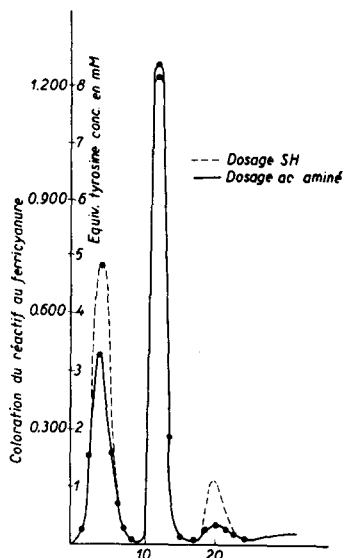


Fig. 5. Dosage des acides aminés et des $-SH$ libres effectués sur les fractions G_1 , G_2 , O.

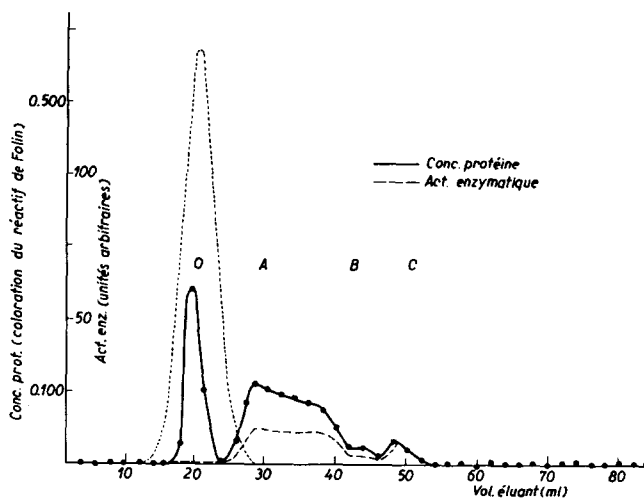


Fig. 6. Chromatographie des fractions O après réduction par du glutathion réduit (après dialyse des fractions obtenues).

Nous avons obtenu les résultats indiqués par la Fig. 6. On voit donc que les fractions G_1 et G_2 proviennent sans doute de l'échantillon de glutathion utilisé.

Nous avons alors essayé de réduire davantage les fractions O recueillies précédemment: dans ce but nous avons soumis ces solutions à l'action de l' H_2S gazeux pendant cinq heures, à pH 7.

Nous avons effectué la chromatographie de cette solution sous une atmosphère inerte, l'air étant chassé des solutions par barbotage d'azote. Dans ces conditions, nous avons obtenu les résultats indiqués dans la Fig. 7.

Nous avons ensuite tenté de réduire un échantillon de ribonucléase par l' H_2S gazeux en le soumettant pendant 10 heures à l'action d'un réducteur. La Fig. 8 montre le diagramme de chromatographie obtenu. Ce diagramme peut être comparé utilement à celui de la Fig. 1, car il s'agit dans les deux cas, de la même préparation enzymatique. Ce diagramme exprime aussi les résultats des mesures d'activité effectuées sur les différentes fractions.

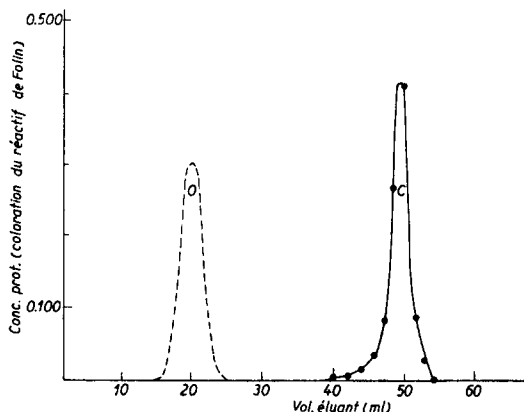


Fig. 7. Chromatographie des fractions O après réduction par H_2S

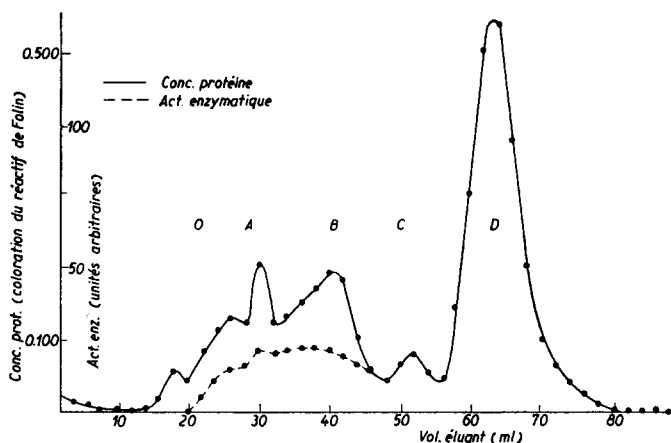


Fig. 8. Chromatographie de la RNase cristallisée (Fig. 1) après réduction par H_2S .

DISCUSSION

Les résultats qui viennent d'être exposés montrent que la ribonucléase est loin d'être aussi hétérogène qu'on aurait pu le supposer en considérant uniquement les diagrammes de chromatographie obtenus à partir de la protéine cristallisée: on constate, en effet, qu'une grande partie de l'hétérogénéité est due, en réalité, aux conditions d'oxydo-réduction dans lesquelles s'effectue la chromatographie.

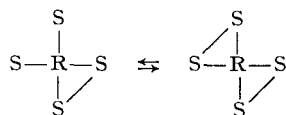
On voit que les fractions O, A, B, C et D sont parfaitement interconvertibles si on modifie leur état d'oxydo-réduction. On peut donc en conclure qu'elles correspondent à des formes différentes d'une même protéine.

Nous avons effectué sur les différentes fractions des mesures d'activation à l'aide de milieux à potentiel d'oxydo-réduction imposé⁶. Par l'emploi de solutions de glutathion et de cyanure de sodium, nous avons essayé de déterminer à quelle forme d'oxydo-réduction correspondent les différentes fractions obtenues⁶. Les résultats montrent que les fractions C et D sont peu activables: 20 à 50 % selon les cas, tandis que les fractions A et B sont activables de 100 à 150 %.

La fraction O est réactivable totalement par le cyanure; c'est-à-dire que l'activité enzymatique se superpose, sur nos graphiques, à la concentration en protéines. En plaçant ces différentes fractions dans des milieux à potentiel d'oxydo-réduction imposé, nous avons observé que les pics C et D ne sont pas activés à un potentiel d'oxydo-réduction de 0,37 v (= 2 -SH), tandis que les pics A et B le sont, à raison de 100% environ.

L'ensemble de ces résultats permet de supposer que les pics C et D correspondent à la ribonucléase à 2 -SH, alors que les pics A et B correspondent à un mélange de RNase oxydée et de RNase à 2 -SH en proportions à peu près équivalentes.

Ainsi se vérifie donc une partie du schéma de structure que nous avons précédemment proposé⁶: c'est celui qui concerne le couple:

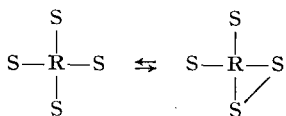


dont le potentiel rédox normal vaut 0.64 v.

La séparation de ces deux formes n'est possible que parce que la vitesse absolue de la réaction d'oxydation est lente vis-à-vis du processus chromatographique.

Nous ne pouvons toutefois pas encore expliquer pourquoi on obtient cinq fractions différentes. Dès à présent, il semble cependant possible que les pics A et B correspondent à des zones d'entraînement mécanique. Les dosages d'activité montrent, en effet, que les activités enzymatiques de ces fractions A et B sont variables d'une expérience à l'autre. Rappelons à ce propos que HIRS, MOORE ET STEIN signalent qu'ils ne sont pas parvenus à cristalliser, à partir de ces fractions qui étaient cependant actives, une protéine ayant une activité enzymatique quelconque. Ce résultat négatif s'explique aisément par l'oxydation (due à l'air) au cours des manipulations d'isolement. Il est normal que cette oxydation soit plus rapide dans le cas d'un mélange de ribonucléase oxydée et de ribonucléase à deux -SH que dans celui d'une solution de ribonucléase contenant seulement la forme à deux -SH; on comprend dès lors que les auteurs américains aient pu isoler — dans les mêmes conditions — la fraction qui correspond à notre pic C sans que son activité soit modifiée de façon appréciable.

Remarquons, en outre, qu'on ne peut pas espérer séparer par chromatographie la RNase à 2 paires de groupes -SH, qui s'obtient par réduction complète de l'enzyme⁶. En effet, la chromatographie est très lente et les possibilités d'oxydation multiples; on ne peut donc pas effectuer l'ensemble des opérations dans des conditions permettant le maintien du couple



En effet, le potentiel rédox normal de ce couple est de 0.27 v, correspondant à la valeur du potentiel normal du couple cystéine-cystine. Or on sait qu'il est extrêmement malaisé de séparer la cystéine par chromatographie, surtout à des pH voisins de la neutralité.

De toute façon et bien qu'il reste encore des points à préciser, il semble dès à présent certain que les *diverses fractions obtenues par chromatographie à partir de RNase cristallisée correspondent à des états d'oxydo-réduction différents d'un même édifice protéique.*

Une telle conclusion permet d'attirer l'attention sur le point suivant: l'obtention, par chromatographie, de fractions différentes à partir d'une même préparation de protéine ne signifie pas, nécessairement, que l'on se trouve en présence d'espèces protéiques profondément différentes.

Il serait intéressant de reconsidérer, à la lumière de cette conclusion, le cas d'autres enzymes qui, tel le trypsinogène³, ont pu être fractionnés par chromatographie. Il est probable que la même réserve devra être étendue à des méthodes d'analyse voisines de la chromatographie: des essais préliminaires paraissent montrer qu'elle est également valable pour les méthodes d'électrophorèse.

RÉSUMÉ

L'étude chromatographique (sur amberlite IRC-50) de l'homogénéité des préparations de ribonucléase montre que les diverses fractions qui peuvent être obtenues correspondent à des états d'oxydo-réduction différents d'un même édifice protéique. Ces fractions sont interconvertibles par oxydation (H_2O_2 , glutathion oxydé) et par réduction (H_2S , glutathion réduit). A l'aide de cette méthode, on peut séparer la RNase oxydée de la RNase contenant 2 -SH par molécule.

L'obtention, par chromatographie, de fractions différentes à partir d'une même solution de protéine ne signifie donc pas nécessairement que l'on se trouve en présence d'espèces protéiques profondément différentes.

SUMMARY

Chromatographic study (on amberlite IRC-50) of the homogeneity of preparations of ribonuclease shows that the various fractions that can be obtained correspond to different oxido-reduction states of the same protein edifice. These fractions are interconvertible by oxidation (H_2O_2 , oxidized glutathione) and by reduction (H_2S , reduced glutathione). With this method, it is possible to separate oxidized RNase from RNase containing two -SH groups per molecule.

The fact that different fractions are obtained from the same protein solution, by chromatography, does not necessarily signify that profoundly different proteic species are present.

ZUSAMMENFASSUNG

Die chromatographische Untersuchung (auf Amberlit IRC-50) der Homogenität von Ribonuclease-Präparaten zeigt, dass man verschiedene Fraktionen erhalten kann, welche verschiedenen Oxydations- und Reduktionszuständen eines selben Proteingerüsts entsprechen. Diese Fraktionen können durch Oxydation (H_2O_2 , oxydiertes Glutathion) und durch Reduktion (H_2S , reduziertes Glutathion) in einander verwandelt werden. Mit Hilfe dieser Methode kann man die oxydierte RNase von derjenigen RNase scheiden, die 2 SH-Gruppen pro Molekel enthält.

Die Tatsache, dass man aus ein und derselben Proteinlösung chromatographisch verschiedene Fraktionen erhält, bedeutet also noch nicht unbedingt, dass man mit grundsätzlich verschiedenen Eiweissarten zu tun hat.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. L. ANSON ET J. T. EDSALL, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1941) 399.
- ² C. N. W. HIRS, S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 493.
- ³ C. N. W. HIRS, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 93.
- ⁴ M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1940) 15.
- ⁵ M. KUNITZ, *J. Biol. Chem.*, 164 (1946) 569.
- ⁶ L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 121.
- ⁷ L. LEDOUX, *Arch. Intern. Physiol.*, 62 (1954) 153.
- ⁸ O. K. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ⁹ M. R. McDONALD, *J. Gen. Physiol.*, 32 (1948) 33.
- ¹⁰ A. J. P. MARTIN ET P. R. PORTER, *Biochem. J.*, 49 (1951) 215.

Reçu le 13 février 1954