

LES GROUPES ACTIFS DE LA RIBONUCLÉASE

V. OXYDATION PAR L'AIR

L. LEDOUX*

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

INTRODUCTION

En étudiant l'action de différents agents chimiques sur l'activité enzymatique de la ribonucléase (RNase), nous avons montré précédemment:

- (a) que la ribonucléase peut être inhibée par les réactifs des groupes -SH (agents d'oxydation¹, d'alkylation², de formation de mercaptans³);
- (b) que l'inhibition par les agents d'oxydation¹ ou de formation de mercaptans³ peut être renversée par les thiols;
- (c) que la protéine native est normalement sous une forme réduite active enzymatiquement¹;
- (d) que l'hétérogénéité chromatographique des préparations de RNase est due, en partie tout au moins, à la présence de fractions diversement oxydées ou réduites, interconvertibles par oxydo-réduction⁴.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à admettre la présence dans la molécule de groupes thiols peu réactifs, responsables d'une partie importante de l'activité enzymatique.

Vu les conditions nécessaires pour obtenir l'inhibition de l'enzyme et les caractéristiques d'oxydo-réduction de la protéine, nous avons proposé pour la RNase le schéma de structure suivant¹:



dans lequel les groupes sulfurés sont liés à des groupes voisins chargés positivement (NH_3^+ , $\text{C}^+ \text{O}^-$, ...).

Plusieurs chercheurs ont récemment critiqué nos conclusions, en insistant⁶ sur le fait que les inhibitions observées requièrent de grandes quantités d'inhibiteurs et de longues périodes d'incubation, ce qui enlève à l'action observée le bénéfice de la spécificité. D'autres critiques^{5,7,8} portent sur la réalité même des résultats que nous avons obtenus.

C'est pourquoi nous avons réexaminé le problème en nous attachant particulièrement à démontrer la *réversibilité* de l'inactivation par oxydation douce de la ribonucléase dans des conditions telles qu'une hypothèse autre que celle des groupes thiols soit difficilement concevable.

* Chargé de Recherches du Fonds national de la Recherche scientifique.

MATÉRIEL

1. Ribonucléase (RNase): nous avons utilisé différents échantillons de ribonucléase fournis par la General Biochemical Inc., la Worthington Biochemical Sales Co, la Armour Co. et les Laboratoires P.E.V.Y.A. (Barcelone) que nous remercions pour leur don généreux de RNase cristallisée.
2. Acide ribonucléique (ARN): ARN Roche purifié et dialysé, mis en tampon acétique 0.2 M de pH 5.
3. Glutathion réduit ou oxydé: produits Schwarz.
4. Les réactifs minéraux sont tous des produits pour analyse (Merck).
5. Amberlite XE-63: fournie par la Rohm & Haas Co.

MÉTHODES

1. Chromatographie: nous avons suivi à la lettre les indications de HIRS, MOORE ET STEIN⁹. Ces auteurs ont décrit en détails les méthodes de préparation de la colonne de chromatographie ainsi que toutes les opérations qui s'y rapportent.
2. Dosage de l'activité enzymatique: les dosages ont été effectués selon la méthode spectrophotométrique de KUNITZ¹.
3. Dosage de la concentration protéique: nous avons utilisé:
 - a. la méthode de LOWRY *et al.*
 - b. la mesure de l'absorption U.V. à 278.5 m μ .

RÉSULTATS

Puisqu'il existe des différences profondes entre diverses RNases commerciales¹⁰, nous avons soumis à l'analyse chromatographique plusieurs échantillons de ribonucléase cristallisée dissous dans le tampon au phosphate de pH 6.47 employé par HIRS, MOORE ET STEIN⁹.

La Fig. 1 représente les résultats obtenus.

On voit que la proportion de la fraction A⁹ varie de 70 à 95 % selon l'échantillon. La reproductibilité a été vérifiée dans le cas de la RNase Armour. Le Tableau I démontre les résultats obtenus au cours de 4 chromatographies effectuées avec le même échantillon, conservé à sec au deep-freezer. On voit que la reproductibilité de la méthode est excellente.

TABLEAU I

IMPORTANCE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS DE LA RNASE ARMOUR (EN % DE LA QUANTITÉ TOTALE DE PROTÉINE)

Quatre déterminations successives effectuées à partir d'un échantillon conservé à sec.

Pic	No. de l'expérience				Moyenne
	1	2	3	4	
A	72	69	76	68	71 ± 2
C	13	17	8	18	14 ± 3
D	15	14	16	14	15 ± 1

Une partie de l'échantillon de RNase Armour a été conservée, en solution stérile, pendant plusieurs jours, à température ambiante et dans un flacon bouché à l'ouate. La Fig. 2 montre les résultats obtenus en effectuant des chromatographies successives sur des aliquotes de cette préparation. On voit que le vieillissement de la solution s'accompagne de l'apparition progressive de nouvelles fractions (B) séparables par chromatographie. L'activité de ces différentes fractions a été mesurée avant et après

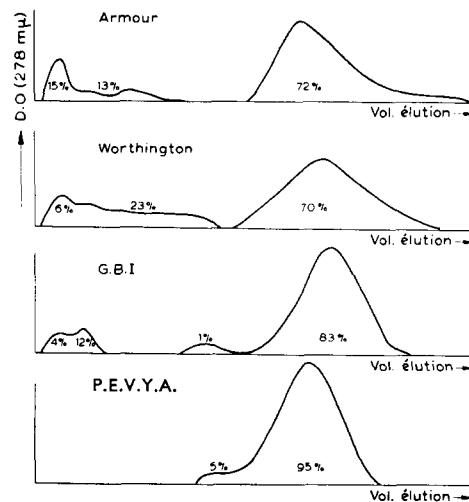


Fig. 1

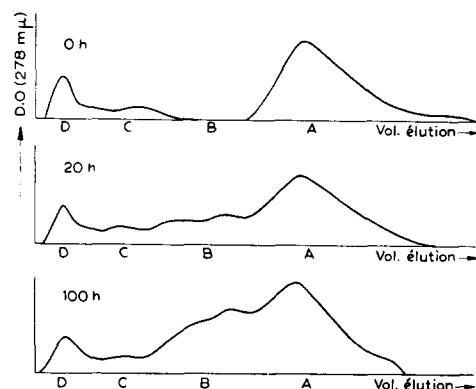


Fig. 2

Fig. 1. Diagrammes de chromatographie de différents échantillons de RNase.

Fig. 2. Diagrammes de chromatographie de l'échantillon de RNase Armour conservé dans de l'eau distillée à température ambiante. Trois déterminations successives: après 0, 20 et 100 heures.

action du glutathion réduit (dans les conditions décrites précédemment¹) ou de la cystéine (E de la solution = 0.20 V).

Le Tableau II décrit les résultats obtenus.

TABLEAU II

CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTES FRACTIONS OBTENUES APRÈS 0, 20 OU 100 HEURES D'INCUBATION DE LA RNASE ARMOUR DANS DE L'EAU DISTILLÉE À TEMPÉRATURE AMBIANTE

	Fraction											
	A			B			C			D		
	0	20	100	0	20	100	0	20	100	0	20	100
% de la quantité totale	72	60	52	0	18	28	13	10	10	15	12	10
Activité spécifique	I	I	I	0.6	0.7	0.5	0.4	0.5	0.5	0	0	0
Activité spécifique en présence de glutathion	I	I	I	1.1	1	1	0.9	1	0.2	0.3	0.2	0.2

On voit que les fractions B qui ont apparu au cours du vieillissement de la ribonucléase, ont une activité spécifique égale à la moitié environ de celle du pic A. *On voit aussi que l'activité initiale peut être restaurée entièrement par réduction.*

Les divers échantillons décrits par la Fig. 1 ont été conservés pendant 78 h dans de l'eau distillée en présence d'air.

Le Tableau III montre la variation d'activité de ces solutions et l'effet des agents réducteurs*. Il est curieux de constater que l'inactivation est d'autant plus grande que la solution était originellement plus hétérogène.

* Cf. A. A. HAKIM, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 581.

TABLEAU III

PERTE D'ACTIVITÉ SUBIE EN 78 HEURES PAR LES DIFFÉRENTES ÉCHANTILLONS DE RNASE CONSERVÉS
DANS DE L'EAU DISTILLÉE À TEMPÉRATURE AMBIANTE
(RNase = 0.002 mg/ml)

Echantillon	Act. initiale (unités arbitraires)	Act. après 78 h à l'air (unités arbitraires)	% inhib.	Act. après réac- tivation par le glutathion
Armour	50	23	54	51
Worthington	48	32	35	50
G.B.I.	49	34	31	48
P.E.V.Y.A.	55	41	22	53

Nous avons conservé, à la température du laboratoire, des échantillons de RNase Armour, dissoute dans de l'eau distillée. Le Tableau IV indique l'effet de la concentration en ribonucléase sur l'inactivation obtenue, de même que l'action des agents réducteurs. On voit que le glutathion réduit et la gélatine protègent l'enzyme et empêchent la perte d'activité en présence d'air.

TABLEAU IV

VARIATION D'ACTIVITÉ DE LA RNASE ARMOUR
(EN % DE LA VALEUR AU TEMPS ZÉRO) CONSERVÉE À 5°C DANS DE L'EAU DISTILLÉE

	Concentrations (mg/ml)				
	1	0.1	0.002	+ glutathion $10^{-3} M$	+ gélatine $10^{-3} M$
Variation de l'activité					
a. après 72 h (en %)	0	-38	-50	+5	0
b. après 11 jours	-20	-50	-52		
c. après 72 h et glutathion	0	-2	+1	+3	+6

Nous pouvons donc conclure que le phénomène qui conduit à l'apparition de nouvelles fractions moins actives et réactivables entièrement par les agents réducteurs est un phénomène d'oxydoréduction.

DISCUSSION

Afin d'éviter les critiques soulevées par l'emploi de fortes concentrations d'agents inhibiteurs (H_2O_2 par exemple⁶), nous avons étudié plus en détails l'une des actions inhibitrices signalées précédemment¹: l'oxydation par l'air. Cet agent d'oxydation a l'avantage d'être incapable de provoquer l'oxydation totale et irréversible des thiols en groupes sulfoniques¹¹.

Nos résultats montrent clairement que la ribonucléase native peut être homogène, au point de vue de la chromatographie; elle est constituée d'une espèce protéique qui se transforme lentement à l'air, en d'autres formes moins actives enzymatiquement, mais dont l'activité spécifique initiale peut être restaurée entièrement par les agents réducteurs.

Comme le glutathion réduit empêche cette inhibition réversible, il est vraisemblable que des phénomènes d'oxydo-réduction sont mis en jeu dans l'un et l'autre cas.

Ces observations confirment nos résultats antérieurs où il a été montré⁴ que les fractions obtenues par chromatographie sont interconvertibles par oxydo-réduction. En comparant les diagrammes de chromatographie obtenus précédemment à ceux décrits dans le présent travail, on voit que de nombreuses fractions apparaissent au cours de l'oxydation et que plusieurs de ces fractions possèdent la même activité spécifique.

En outre, il semble que l'on puisse arriver à un équilibre d'oxydo-réduction entre les différentes formes*. Cet équilibre est suffisamment stable pour permettre la conservation du mélange à 5° C pendant plusieurs semaines sans qu'il y ait perte ultérieure d'activité: Les solutions de RNase utilisées lors des mesures d'oxydo-réduction décrites précédemment (ces solutions étaient constituées par un mélange de formes oxydées et réduites⁴) ont été conservées plusieurs mois sans qu'il y ait de modification de l'activité enzymatique.

Ces phénomènes d'oxydation sont donc très complexes. Rappelons d'ailleurs que la vitesse d'inactivation des différents échantillons de RNase (Tableau III) semble dépendre de l'hétérogénéité initiale de la solution; tout se passe comme si les fractions oxydées avaient un effet catalytique sur l'oxydation des fractions réduites ou si elles étaient nécessaires à la formation d'un complexe oxydé. Il est d'ailleurs à noter que la fraction A, isolée, s'oxyde beaucoup moins aisément que le mélange des différentes fractions.

Il est vraisemblable que des réactions secondaires se produisent aussi; les résultats obtenus par TANFORD ET HAUENSTEIN⁸ semblent plaider dans ce sens, puisque ces auteurs observent des différences dans le nombre des groupes carboxyles des RNases isolées par chromatographie.

Nous avons souligné, à plusieurs reprises^{1,10}, que les groupes sulfurés de la ribonucléase devaient être de la forme



puisque leur équilibre d'oxydo-réduction est indépendant du pH¹. On s'explique ainsi que TANFORD ET HAUENSTEIN⁸ n'aient pas pu observer, par titrimétrie, de différences dues à des -SH entre les fractions qu'ils ont étudiées. Cette structure a d'ailleurs, ainsi que nous l'avons souligné précédemment, l'avantage d'expliquer¹ la réactivité faible de la ribonucléase envers les inhibiteurs des groupes thiols (puisque il faut d'abord briser la liaison S-X avant de complexer le groupe S-).

Ainsi que l'ont souligné RABINOVITCH ET BARRON⁶, les conditions nécessaires pour obtenir l'inhibition de la RNase par certains réactifs des groupes thiols peuvent faire craindre un effet non spécifique. Il n'en reste pas moins vrai que les inhibitions obtenues sont *réversibles* en présence de réducteurs ou d'autres thiols tels que la cystéine et le glutathion; cette réversibilité constitue un critère important de la spécificité de la réaction^{11,6}.

Par exemple, les seuls groupes des protéines *connus à ce jour*, qui puissent être oxydés *réversiblement* dans des conditions aussi douces que celles dans lesquelles

* Quand la protéine native a perdu environ 50 % de son activité.

agissent l'oxygène atmosphérique, sont des groupes thiols, quelle que soit leur réactivité propre; celle-ci peut d'ailleurs dépendre de causes stériques ou autres.

Il est clair, également, que même si—comme le supposent RABINOVITCH ET BARRON⁶—l'inhibition de la RNase par certains inhibiteurs s'accompagnait de l'arrachement de groupes —OH ou —NH₂, il faudrait admettre que ces groupes sont indifférents du point de vue enzymatique, puisque l'activité peut être restaurée dans une mesure appréciable en présence de réducteurs ou de thiols.

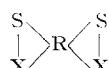
En outre, on a montré^{12,13} que la dégradation de la ribonucléase peut être profonde (perte de 40 % de lalanine, de 22 % de la valine, etc...) sans qu'il y ait perte d'activité. Il est clair que la molécule de RNase ne doit pas être entière et intacte pour être active¹⁴.

Quant aux résultats obtenus par GAWRON *et al.*⁷, qui ont placé la protéine à 50° en présence de cyanure et qui ont observé à pH 8 une augmentation initiale de l'activité enzymatique accompagnée de l'apparition de groupes thiols, il est curieux de constater qu'ils négligent ce résultat volontairement et qu'ils ne retiennent que les effets dénaturants produits par le cyanure à pH 10.14 et à 45°, évidemment accompagnés d'une perte d'activité.

Il est établi que même si, comme nous le croyons, la RNase contient des groupes sulfurés, elle possède également au moins trois disulfures¹⁵; la rupture de ces liaisons S-S et l'apparition de —SH de dénaturation n'ont rien à voir avec celle des groupes actifs.

Il nous semble, par conséquent, que, dans l'état *actuel* de nos connaissances de la chimie des protéines, les résultats qui viennent d'être décrits rendent vraisemblable l'hypothèse, émise précédemment, de la présence de groupes sulfurés lents, importants pour l'activité enzymatique, dans la RNase. Une remarque s'impose encore au sujet de cette hypothèse: nous savons maintenant que les échantillons utilisés¹⁻⁴ précédemment—and considérés à l'époque comme représentatifs de la ribonucléase native¹—étaient en fait constitués par un mélange complexe de formes diversement oxydées.

Nos conclusions antérieures ne sont donc plus valables *quantitativement* et le nombre des groupes sulfurés *possibles*¹ doit sans doute être ramené à deux: c'était d'ailleurs là le nombre de groupes sulfurés supposés pour la protéine native. Nous proposons donc comme schéma de structure des groupes actifs de la RNase native (responsables d'une grande partie au moins de l'activité) la forme¹:



où S représente un groupe sulfuré peu réactif et X un groupe chargé positivement, capable de neutraliser la charge du groupe sulfuré et de former avec celui-ci un lien chimique *relativement stable*.

RÉSUMÉ

La ribonucléase s'inactive spontanément en présence de l'oxygène atmosphérique. Cette inactivation peut être supprimée à l'aide de glutathion réduit de cystéine.

De nouvelles formes de la protéine, séparables par chromatographie, apparaissent au cours de l'oxydation. Ces formes ont des activités spécifiques faibles; elles peuvent être activées à l'aide d'agents réducteurs.

L'oxydabilité des échantillons utilisés est très variable et semble dépendre de leur état initial. La présence de glutathion réduit ou de gélatine empêche l'oxydation par l'air tandis que la dilution de la solution la favorise.

Ces résultats confirment l'hypothèse que la RNase contient des groupes S⁻ peu réactifs et responsables d'une partie importante de l'activité enzymatique.

SUMMARY

Ribonuclease is spontaneously inactivated in the presence of atmospheric oxygen. This inactivation can be suppressed by reduced glutathione or cysteine.

New forms of the protein appear during the oxidation process. These forms, which are separable by chromatography, have low enzymic activity; they can be activated by reducing agents.

The oxidizability of the samples is very variable and apparently depends on their initial state.

The presence of reduced glutathione or gelatin prevents oxidation, dilution of the solution favours it.

The results confirm the hypothesis that RNase contains sluggish S⁻ groups, essential for an important part of the enzymic activity.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, **13** (1954) 121.
- ² L. LEDOUX, *Arch. intern. physiol.*, **61** (1953) 428.
- ³ L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, **11** (1953) 517.
- ⁴ L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, **14** (1954) 267.
- ⁵ L. WEIL ET T. S. SEIBLES, *Arch. Biochem. Biophys.*, **54** (1955) 368.
- ⁶ M. RABINOVITCH ET G. E. S. BARRON, *Biochim. Biophys. Acta*, **18** (1955) 316.
- ⁷ O. GAWRON, J. KEIL ET A. J. GLAID, *Biochim. Biophys. Acta*, **19** (1956) 170.
- ⁸ C. TANFORD ET J. D. HAUENSTEIN, *Biochim. Biophys. Acta*, **19** (1956) 535.
- ⁹ C. H. W. HIRS, S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, **200** (1953) 493.
- ¹⁰ L. LEDOUX ET J. BRACHET, *Biochim. Biophys. Acta*, **16** (1955) 290.
- ¹¹ G. E. S. BARRON, *Advances in Enzymology*, **11** (1951) 201.
- ¹² G. KALNITSKY ET E. E. ANDERSON, *Biochim. Biophys. Acta*, **16** (1955) 302.
- ¹³ S. M. KALMAN, K. LINDERSTRØM-LANG, M. OTTESEN ET F. M. RICHARDS, *Biochim. Biophys. Acta*, **16** (1955) 297.
- ¹⁴ C. B. ANFINSEN, W. F. HARRINGTON, AA. HVIDT, K. LINDERSTRØM-LANG, M. OTTESEN ET J. SCHELLMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, **17** (1955) 141.
- ¹⁵ C. H. W. HIRS, W. H. STEIN ET S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, **211** (1954) 941.

Reçu le 26 avril 1956

ENZYMIC HYDROLYSIS OF CEPHALIN IN RAT INTESTINAL MUCOSA*

GERHARD SCHMIDT, MAURICE J. BESSMAN** AND S. J. THANNAUSER

*Research Laboratories of the Boston Dispensary and the Department of Biochemistry,
Tufts University Medical School, Boston, Mass. (U.S.A.)*

In contrast to the enzymic hydrolysis of lecithin, very little information is available concerning the enzyme systems involved in the hydrolysis of the cephalin fraction in tissues of higher animals. In an earlier paper from this laboratory¹, the rapid disappearance of lipide phosphorus during the incubation of minced mucosa of the small intestines of the rat was reported. Aqueous emulsions of brain cephalin are rapidly transformed to water-soluble phosphorus compounds by this material. The results of the experiments reported in this paper show that the enzyme system which catalyzes this transformation is closely associated with a particle fraction of the mucosa, and that

* This study was aided by grants of the National Institutes of Health (RG B-356 and RG H-599), of the Godfrey H. Hyams Trust Fund, and of the Charlton Fund.

** A part of the data reported in this paper was taken from a thesis submitted by MAURICE J. BESSMAN to the Graduate School of Tufts University, Medford, Massachusetts in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, January, 1956.