

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA PROTÉOLYSE DE LA β -LACTOGLOBULINE PAR LA TRYPSINE

JOHN GRAAE

*Laboratoire de Biologie physicochimique de la Faculté des Sciences,
Institut de Biologie physicochimique, Paris (France)*

(Reçu le 20 juillet 1958)

SUMMARY

Kinetics of proteolysis of β -lactoglobuline by trypsin

The hydrolysis of β -lactoglobulin by trypsin and chymotrypsin is followed to about 90% degradation. It is demonstrated that a simple Henri-Michaelis mechanism (*i.e.* $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$) cannot explain the experimental results. Another mechanism is suggested and discussed.

INTRODUCTION

Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer l'hydrolyse enzymatique des protéines. Ces mécanismes ordinairement ont été proposés après étude des vitesses initiales. Pour examiner s'il est possible de décrire tout le cours d'une réaction protéolytique avec une intégrale "chronométrique" du type Henri-Michaelis, nous avons suivi la protéolyse de la β -lactoglobuline par la trypsine jusqu'à une dégradation de plus de 90% au moyen de la méthode titrimétrique continue.

MATÉRIEL

Trypsine "Worthington" utilisée après dialyse contre HCl 0.01 M pour éliminer le sulfate de magnesium.

β -Lactoglobuline native préparée par YON¹.

RÉSULTATS

Le Tableau I donne les valeurs du temps en minutes t , et le degré d'avancement de la réaction a , pour une expérience avec une concentration d'enzyme de 135 μ g/ml et une concentration initiale de β -lactoglobuline de 2 mg/ml.

La cinétique de la réaction est donnée par l'expression:

$$t = Aa + B (-\log (1 - a))$$

A et B sont des constantes pour une concentration donnée de trypsine et de lactoglobuline.

La Fig. 1 est une représentation de t/a en fonction de $-\log(1-a)/a$ correspondant à l'expérience mentionnée au Tableau I. On obtient une droite dont l'intersection avec l'axe des ordonnées est A et la pente B .

TABLEAU I

t : temps en minutes; a : degré d'avancement de la réaction pour une expérience avec une concentration de trypsine de 135 μ g/ml et une concentration initiale de lactoglobuline de 2 mg/ml. Température 35°; pH 7.0; volume total 10 ml en milieu NaCl N/10.

| | | | | | | | | |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| t | 0 | 2.17 | 2.92 | 3.50 | 4.83 | 6.67 | 7.83 | 8.67 |
| a | 0 | 0.143 | 0.182 | 0.234 | 0.286 | 0.338 | 0.377 | 0.403 |
| t | 10.33 | 11.50 | 13.17 | 15.50 | 17.25 | 19.00 | 19.92 | 22.25 |
| a | 0.442 | 0.468 | 0.506 | 0.558 | 0.597 | 0.636 | 0.662 | 0.688 |
| t | 26.75 | 29.00 | 32.00 | 35.00 | 40.00 | 46.50 | 53.75 | ∞ |
| a | 0.740 | 0.766 | 0.792 | 0.818 | 0.857 | 0.896 | 0.922 | 1.000 |

On trouve d'après la Fig. 1 que la constante B est positive et la constante A négative.

Pour contrôler que ce phénomène est indépendant de notre procédé expérimental, nous avons fait le même calcul à partir de quelques expériences publiées par LINDERSTRØM-LANG ET JACOBSEN² (Tableaux XII-XV). Les degrés d'avancement de la réaction ont été calculés à partir du nombre de liaisons peptidiques hydrolysées, en supposant³ que le nombre total de liaisons peptidiques hydrolysables est de 36. Les valeurs des constantes A et B trouvées pour ces expériences sont données dans le Tableau II.

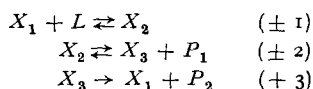
TABLEAU II

a : concentration initiale de la lactoglobuline; A et B : constantes (voir le texte). Concentration de la trypsine 0.05 %. Température 30°; pH 8.0. (Expérience de LINDERSTRØM-LANG ET JACOBSEN²)

| | | | | |
|-------|------|------|------|------|
| a % | 1.44 | 0.90 | 0.90 | 0.72 |
| A | -162 | -87 | -119 | -78 |
| B | 540 | 340 | 380 | 265 |

On voit qu'il y a proportionnalité entre les constantes A et B , et la concentration initiale de lactoglobuline.

Il n'est pas possible d'expliquer la constante négative par les mécanismes de réaction que l'on suppose ordinairement^{3,6}. C'est pourquoi, dans le présent travail, je propose un mécanisme qui donne par analyse mathématique une intégrale "chronométrique" de la même forme que celle que nous avons trouvée empiriquement.



où X_n représente l'enzyme ou des combinaisons de l'enzyme avec son substrat. L et P_n représentent respectivement la lactoglobuline et les produits de la réaction. Si l'on utilise le procédé proposé par CHRISTIANSEN^{4,5} on trouve les équations:

$$s = x_1 w_1 - x_2 w_{-1} \quad (1)$$

$$s = x_2 w_2 - x_3 w_{-2} \quad (2)$$

$$s = x_3 w_3 \quad (3)$$

où s représente la vitesse, x_n la concentration de X_n et w_n la probabilité de la n -ième réaction.

Si nous appelons a la concentration initiale de lactoglobuline, c la concentration au temps t , et E la concentration de la trypsine, nous avons: $1/s = -dc/dt$ et $E = x_1 + x_2 + x_3$. En introduisant ces valeurs en (1), (2) et (3) on obtient finalement:

$$-E \cdot dt/dc = 1/w_1 + w_{-1}/w_1 w_2 + w_{-1} w_{-2}/w_1 w_2 w_3 + 1/w_2 + w_{-2}/w_2 w_3 + 1/w_3; \quad (4)$$

Avec le schéma de réaction proposé, nous avons pour les probabilités des différentes réactions:

$$w_1 = k_1 c; w_2 = k_2; w_3 = k_3; w_{-1} = k_{-1}; w_{-2} = k_{-2} (a-c)$$

En introduisant ces valeurs en (4) et après intégration, on obtient l'intégrale "chronométrique" suivante correspondant au schéma de la réaction proposée:

$$E \cdot t = \left[\frac{k_1 k_3 + k_1 k_2 - k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2 k_3} \right] \cdot a \cdot \alpha - \left[\left(\frac{1}{k_1} + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \right) + \left(\frac{k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2 k_3} \right) \cdot a \right] \ln (1 - \alpha) + \frac{1}{2} \frac{k_{-2}}{k_2 k_3} \cdot a^2 \cdot \alpha^2 \quad (5)$$

Ceci donne une constante négative comme facteur de a si l'on admet que

$$k_{-1} k_{-2} > k_1 k_2 + k_1 k_3$$

Cette constante doit être proportionnelle à la concentration initiale de lactoglobuline. Pour expliquer que la constante du deuxième terme est aussi proportionnelle à la concentration initiale de lactoglobuline, il faut accepter que l'on ait $k_{-1} k_{-2} \gg k_{-1} k_3 + k_2 k_3$. Le troisième terme contient α^2 comme facteur et il est permis de croire que ce terme a seulement une valeur significative pour de très hauts degrés de la réaction.

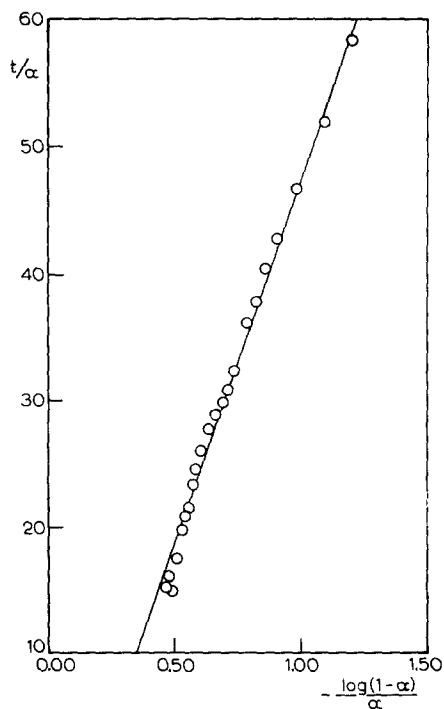


Fig. 1. t/α en fonction de $(-\log(1 - \alpha))/\alpha$ d'après l'expérience indiquée dans le Tableau I.

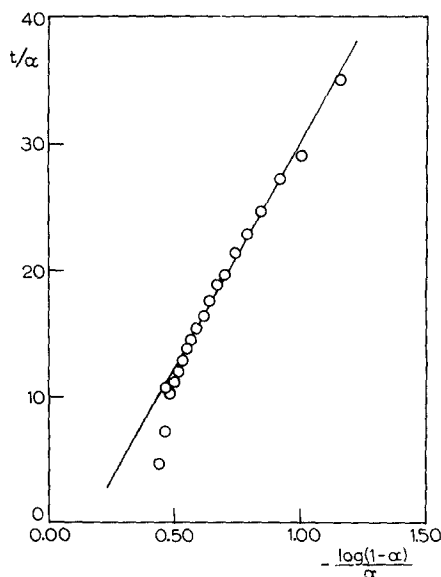


Fig. 2. t/a en fonction de $(-\log(1 - \alpha))/\alpha$ pour l'hydrolyse de la lactoglobuline par la chymotrypsine.

Il n'est pas possible d'expliquer les résultats obtenus en supposant une inactivation de l'enzyme pendant la réaction. Dans ce cas les droites représentées Fig. 1 et Fig. 2 devraient couper l'axe des ordonnées pour une valeur positive si les lignes passaient seulement par les points correspondant au début de la réaction. Les figures montrent clairement qu'il n'en est pas ainsi.

L'action de la chymotrypsine sur la lactoglobuline est probablement analogue. Avec les données de l'expérience publiée par YON¹, si l'on utilise la représentation de t/a en fonction de $-\log(1-a)/a$, on obtient la courbe Fig. 2 (les données expérimentales ont été aimablement mises à ma disposition par YON).

Il est naturellement possible qu'il existe d'autres mécanismes conduisant à une intégrale "chronométrique" du même genre, pouvant décrire une telle réaction. Cependant il paraît nécessaire que les schémas proposés indiquent la présence dans l'un au moins des équilibres, d'un produit de la réaction ayant une concentration proportionnelle à $(a-c)$ (par exemple: P_1). Le mécanisme proposé ici représente une modification du mécanisme proposé par LABEYRIE³ ($E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons ES^* \rightarrow E + P$). Cette modification est nécessaire si l'on veut avoir une correspondance entre l'intégrale "chronométrique" calculée et la droite trouvée empiriquement.

Tout d'abord il paraît possible que la réaction (± 2) soit la dénaturation proposée par LINDERSTRØM-LANG⁶. Mais ceci est en opposition avec l'analogie trouvée entre la cinétique d'hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine. En effet LINDERSTRØM-LANG a trouvé que la dénaturation préalable catalysée par l'enzyme existe seulement si la lactoglobuline est hydrolysée par la trypsine et non si elle est hydrolysée par la chymotrypsine.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mr. le Professeur RENÉ WURMSER de l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Ce travail a pu être effectué grâce à une bourse du "Statens almindelige videnskabsfond", Copenhague, Danemark.

RÉSUMÉ

La protéolyse de la β -lactoglobuline par la trypsine et la chymotrypsine est suivie jusqu'à une dégradation de 90%. Il est démontré que le mécanisme de Henri Michaelis ($E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$) ne peut pas expliquer les résultats expérimentaux. Un autre mécanisme est proposé et discuté.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. YON, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 45.
- ² K. LINDERSTRØM-LANG ET C. F. JACOBSEN, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 24 (1941) 1.
- ³ F. LABEYRIE, *Etude Cinétique de la Protéolyse Trypsique des Formes Native et Dénaturée de la β -Lactoglobuline*, Thèse, Paris (1955).
- ⁴ J. A. CHRISTIANSEN, *Acta Chem. Scand.*, 3 (1949) 493.
- ⁵ J. A. CHRISTIANSEN, *Advances in Catalysis*, 6 (1953) 311.
- ⁶ K. LINDERSTRØM-LANG, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 14 (1950) 117.