

Purification et analyse des chaînes B et C de la chymotrypsine α

Les ponts disulfure reliant les trois chaînes (A, B et C) de ChT- α peuvent être rompus par oxydation ou réduction. Une note récente¹ a montré qu'après oxydation performique de l'enzyme, la chaîne C "oxydée" est susceptible d'être purifiée par chromatographie sur Sephadex G-50. La présente note décrit un procédé permettant de purifier simultanément les dérivés S-sulfoniques des chaînes B et C après réduction des ponts disulfure par le sulfite en présence de cuivre.

1 g de ChT- α (3 fois cristallisées, inhibée par DFP, cristallisées de nouveau 3 fois à l'état inactif, dialysée et lyophilisée) est traité par le sulfite selon la technique mise au point pour ChTg-A (réf. 2). Après une série de 6 dialyses qui éliminent le dérivé S-sulfonique de la chaîne A et les réactifs utilisés pour la réduction, le rapport alanine N-terminale/soleucine N-terminale (technique au fluorodinitrobenzène) est égal à 0.8. Le produit obtenu est ainsi un mélange à parties sensiblement égales des dérivés S-sulfoniques des chaînes B et C. Sa composition en amino acides est d'ailleurs semblable à celle de ChT- α moins les 13 résidus de la chaîne A (réf. 3). Après lyophilisation, 400 mg sont dissous dans 20 ml d'une solution 0.01 M en phosphate biphosphatique et 8 M en urée*. Le liquide est amené à pH 8.0 par NaOH 0.1 N et il est soumis à une chromatographie sur DEAE-cellulose dans les conditions indiquées par la légende de la Fig. 1.

Traités par le fluorodinitrobenzène, le premier pic donne presque exclusivement naissance à de la DNP-alanine et le deuxième, à de la DNP-soleucine. La chromatographie a donc réalisé la séparation des deux chaînes. Les analyses ultérieures (voir ci-dessous)

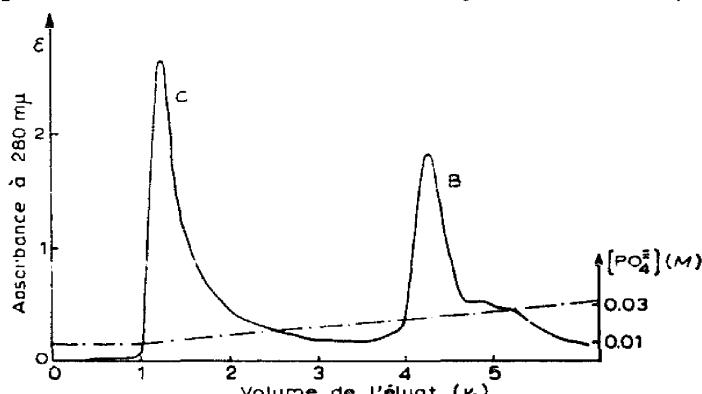


Fig. 1. Séparation sur DEAE-cellulose des dérivés S-sulfoniques des chaînes B et C en présence d'urée 8 M. Colonne (3.2 × 25 cm) de DEAE-cellulose (Brown Type 40, Reagent grade, 0.91 méquiv/g) amenée à pH 8.0 avec une solution 0.01 M en phosphate monopotassique et 8 M en urée. L'élution débute avec une solution 0.01 M en phosphate pH 8.0 et 8 M en urée. Après la sortie du premier volume de rétention ($v_0 = 200$ ml), on établit un gradient linéaire de concentration en phosphate (1er récipient, 1 l de la solution précédente; 2ème récipient, 1 l d'une solution 0.06 M en phosphate pH 8.0 et 8 M en urée). Débit, 0.2 v_0 /h. Volume des fractions, 0.04 v_0 . Température ordinaire. Ordonnées de gauche, absorbance des fractions à 280 m μ . Ordonnées de droite, molarité en phosphate de l'éluat. Abscisses, volume de l'éluat exprimé en v_0 .

Abréviation: ChT- α , chymotrypsine α obtenue par activation "lente" du chymotrypsinogène A de boeuf (ChTg-A).

* La présence d'urée concentrée a pour but de supprimer les très fortes interactions existant, d'une part, entre les deux chaînes et, d'autre part, entre les chaînes et la phase solide de la chromatographie.

TABLEAU I

COMPOSITION EN AMINO ACIDES DES CHAÎNES B ET C ET BILAN GÉNÉRAL

Amino acide	Chaîne B			Chaîne C			Chaîne C oxydée	Somme A + B + C	ChT- α
	Bruts	Corrigés	Arrondis	Bruts	Corrigés	Arrondis			
Ala	11.45	11.37	11	10.25	10.40	10-11	10-11	22-23	22
Arg	1.09	1.04	1	1.75	1.78	2	2	3	3
Asp	13.19	13.26	13	8.91	8.95	9	10	22-23	21
1/2 Cys*	—	—	—	—	—	—	5	—	10
Glu	10.40	10.60	10-11	4.01	3.90	4	4	15-16	14
Gly	11.51	11.44	11-12	10.41	10.55	10-11	11	23-25	23
His	1.85	1.92	2	0.00	0.00	0	0	2	2
Ileu	5.92	5.98	6	3.07	3.02	3	3	10	10
Leu	9.23	9.16	9	8.08	8.18	8	8-9	19-20	19
Lys	7.92	8.00	8	6.00	6.07	6-7 [§]	7	14-15	13-14 [§]
Met	0.09	0.00	0	1.94	2.02	2	2	2	2
Phe	5.73	6.06	6	0.22	0.00	0	0	6	6-7 [§]
Pro	3.34	3.27	3	4.17	4.30	4	5	9-10	9
Ser	13.90	13.80	14	10.40	10.10	10	11	25-26	26-29 [§]
Thr	11.70	11.70	12	9.12	9.10	9	9	21	22
Try**	—	3.65	4	—	4.20	4	—	8	7-8 [§]
Tyr	1.99	1.96	2	1.90	1.93	2	2	4	4
Val	13.48	12.99	13	8.07	8.03	8	8	23	22-23 [§]
Totaux***		129-131			96-99	101-103	238-247	235-242	

* Déterminée à l'état d'acide cystéique dans la chaîne C et ChTg-A. Les résidus S-sulfoniques des chaînes réduites sont convertis en cystine durant l'hydrolyse, avec, dans le cas présent, un rendement d'environ 60%.

** Déterminé par colorimétrie⁸.

*** Les totaux concernant les dérivés S-sulfoniques des chaînes B et C incluent, respectivement, 4 et 5 résidus de 1/2 cystine. Celui concernant la chaîne C oxydée inclue 4 résidus de tryptophane.

§ L'une des analyses de ChTg-A (réf. 5) donne: Lys, 13; Phe, 6-7; Ser, 29; Val, 22 et Try, 7. L'autre⁶ donne: Lys, 13-14; Phe, 6; Ser, 26; Val, 23 et Try, 8. Les autres résultats concordent exactement dans les deux analyses.

§§ Lorsqu'on considère exclusivement les résultats de la petite colonne de l'analyseur (résidus basiques), on trouve pour 2 résidus d'arginine, 7 résidus de lysine au lieu de 6.

suggèrent toutefois la présence d'environ 4% de chaîne B dans le pic C et réciproquement. Une seconde chromatographie ne permet pas de réduire cette contamination. Les analyses ultérieures montrent également que le rendement global de la préparation est de l'ordre de 20% pour les deux chaînes.

Après dialyse*, lyophilisation et hydrolyse (24, 48 et 72 h), les deux chaînes sont analysées à l'aide de l'appareil automatique Spinco Beckman selon la technique classique⁴. Les résultats bruts, exprimés en moles de résidus par mole de chaîne dans le Tableau I, sont corrigés afin de tenir compte de la faible contamination mentionnée ci-dessus, puis ils sont arrondis au nombre entier le plus proche. Le Tableau I rappelle également, à titre de comparaison, l'analyse de la chaîne C "oxydée"¹ et la somme des résidus identifiés jusqu'ici dans les chaînes A, B et C. La dernière colonne du tableau donne la composition de ChT- α telle qu'elle est trouvée en retranchant de la composition de ChTg-A (réfs. 5, 6) les 4 résidus (Arg, Ser, Thr, Asp(NH₂)) scindés durant l'activation "lente" de ce précurseur⁷.

* La teneur en cuivre des préparations n'excède pas à ce moment 0.09 atome/mole.

L'examen du Tableau I montre qu'un accord très satisfaisant existe entre: (a) la composition du dérivé S-sulfonique de la chaîne C et celle de cette même chaîne après oxydation; (b) la somme des résidus trouvés dans les trois chaînes A, B et C, et la composition de ChT- α . La composition en amino acides des trois chaînes, dont la connaissance est utile à la poursuite des travaux sur la structure primaire de ChTg-A, paraît donc être établie maintenant avec une précision raisonnable. Prises dans l'ordre A, B, C, ces trois chaînes contiennent, respectivement, 13, environ 130 et environ 100 résidus. La chaîne B est dépourvue de méthionine et la chaîne C, de phénylalanine et d'histidine.

Notons pour terminer que le fait de disposer pour la première fois d'une technique satisfaisante pour la séparation des chaînes B et C permet de savoir dans quelle partie de la molécule de ChT- α se fixe le radical diisopropylphosphoryle durant l'inhibition stoechiométrique de l'enzyme par DFP. Lorsque ChT- α inhibée par DFP marqué au ^{32}P est soumise aux traitements précédents, la totalité de la radioactivité est retrouvée dans le pic C. Cette observation confirme que la sérine "active" de ChT- α est bien dans la chaîne C (réf. 9), et non dans la chaîne B (réfs. 10, 11). Si le pouvoir catalytique de ChT- α est vraiment déterminé par l'interaction d'une sérine "active" et d'une histidine, il est intéressant de savoir que l'un des éléments du système (la sérine) est dans la chaîne C et que l'autre (l'histidine) est dans la chaîne B.

Durant ce travail, nous avons bénéficié de l'aide financière du Fonds de Développement de la Recherche Scientifique et Technique (Convention 61-FR-113), du Commissariat à l'Energie Atomique et du Public Health Service (Grant A-4642).

*Institut de Chimie Biologique, Faculté des Sciences,
Marseille (France)*

DINH VAN HOANG
M. ROVERY
A. GUIDONI
P. DESNUELLE

- ¹ DINH VAN HOANG, M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 58 (1962) 613.
- ² J. F. PECHÈRE, G. H. DIXON, R. H. MAYBURY ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1364.
- ³ B. MEEDOM, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 429.
- ⁴ D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN ET S. MOORE, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1190.
- ⁵ P. E. WILCOX, E. COHEN ET W. TAN, *J. Biol. Chem.*, 228 (1957) 999.
- ⁶ M. ROVERY, M. CHARLES, O. GUY, A. GUIDONI ET P. DESNUELLE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 1235.
- ⁷ M. ROVERY, M. POILROUX, A. YOSHIDA ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 608.
- ⁸ J. R. SPIES ET D. C. CHAMBERS, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 1249.
- ⁹ B. S. HARTLEY, in *Molecular Basis of Enzyme Action and Inhibition*, IVth Symp. 5th Intern. Congr. Biochem. Moscow, 1961, Pergamon Press, London, sous presse.
- ¹⁰ B. MEEDOM, *Acta Chem. Scand.*, 10 (1956) 150.
- ¹¹ B. S. HARTLEY, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 54 (1959) 203.

Reçu le 13 octobre, 1962

Biochim. Biophys. Acta, 69 (1963) 188-190