

IODATION DE LA LEVANE-SUCRASE DE *BACILLUS SUBTILIS*

GEORGES RAPOPORT, JEAN-RÉGIS CHAMBERT ET RAYMOND DEDONDER

Service des Polysaccharides, Institut Pasteur, Paris (France)

(Reçu le 15 août, 1966)

SUMMARY

*Iodination of the levansucrase of *Bacillus subtilis**

Levansucrase (β -D-2,6-fructan:D-glucose 1-fructosyltransferase, EC 2.4.1.10) of *Bacillus subtilis* contains 17 residues of tyrosine per molecule of enzyme of mol.wt. 40 000. Progressive iodination of tyrosyl groups in alkaline medium leads to a concomitant loss of the enzymatic activity. The inactivation is complete when the protein binds 14-15 iodine atoms per mole at pH 9.4 and 28-30 at pH 8.5. Every tyrosyl residue is accessible to iodination. At pH 8.5 where the enzyme is normally active, levans of a low degree of polymerization protect against the inactivation by iodination, without interfering with the fixation of iodine.

INTRODUCTION

Les seuls groupes fonctionnels des sucres non réducteurs sont les groupements alcooliques primaires et secondaires. On peut penser raisonnablement que c'est par leur intermédiaire que le saccharose et les lévanes se lient à la lévane-sucrase (β -D-2,6-fructane:D-glucose 1-fructosyltransférase, EC 2.4.1.10). Parmi les groupes de la protéine qui sont susceptibles d'intervenir dans cette liaison figurent entre autres les groupements carboxyliques et les groupes phénoliques des résidues tyrosyls. La variation de l'affinité pour le saccharose en fonction du pH implique l'intervention d'un groupement carboxyl¹. Par contre, l'affinité pour les lévanes ne varie pas dans toute la zone d'activité de l'enzyme, c'est-à-dire jusqu'à un pH supérieur à 8.5 (réf. 1). Il est donc possible de penser à l'intervention d'un groupe dont le pK serait situé au-dessus de 9. Nous avons par conséquent essayé de mettre en évidence le rôle possible des groupements phénoliques (pK 10).

L'une des méthodes classiques de blocage des résidus de tyrosine est l'iodation par action directe de l'iode. Cette technique a été utilisée avec succès pour déterminer le rôle des résidus tyrosyls dans l'activité de divers enzymes: ribonucléase^{2,3}, carboxy-peptidase A^{4,5}, chymotrypsinogène⁶, lacticodéshydrogénase⁷, lysozyme⁸. C'est elle que nous employons dans ce mémoire avec la lévane-sucrase.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Lévane-sucrase

La préparation de l'enzyme pur de *Bacillus subtilis* a été décrite précédemment⁹.

Iodation

Acides aminés témoins. Les dérivés mono- et diiodés de la tyrosine et de l'histidine marqués par ^{131}I ont été préparés suivant la méthode de ROCHE *et al.*¹⁰ qui consiste à mettre en présence une solution ammonicale de chaque aminoacide et une solution éthérée d'iode radioactif.

Lévane-sucrase. La lévane-sucrase a été iodée selon la méthode de HUGHES ET STRAESSLE¹¹. L'iode est dissous dans une solution aqueuse d'iodure de potassium (2 moles d'iodure pour 1 atome-gramme d'iode). La protéine (500 μg) en solution dans du tampon carbonate-bicarbonate 0.5 M (pH 9.4) ou borate 0.2 M (pH 8.5) est mise en présence d'un nombre d'atomes d'iode croissant; le mélange est agité pendant 1 h à 0°. Une fraction aliquote est alors prélevée et diluée 10 fois dans du tampon phosphate 0.4 M (pH 6.0). Le dosage de l'activité enzymatique s'effectue dans les conditions habituelles⁹. L'iodation de la lévane-sucrase en présence de lévanes (10 mM) de poids mol. 15 000 longuement dialysés contre de l'eau distillée (afin d'éliminer des impuretés qui interfèrent) est effectuée dans les mêmes conditions.

L'iodation de la protéine par ^{131}I s'effectue de façon identique en absence et en présence de lévanes. Les dilutions sont choisies telles que la radioactivité d'une solution d'iode 0.01 M soit de 50 $\mu\text{C}/\text{ml}$. Après 1 h d'agitation le pH du milieu réactionnel est ramené à 6.0 par addition de HCl 1 M; la protéine est ensuite dialysée extensivement pour éliminer l'iode en excès contre du tampon phosphate 0.1 M (pH 6.0) puis précipitée par l'acide trichloracétique à 7% et centrifugée. Le culot de centrifugation est lavé à l'éther (élimination de l'acide trichloracétique), centrifugé une nouvelle fois et repris dans NaOH 0.1 M (0.1-0.5 ml). Une fraction aliquote est utilisée pour déterminer la concentration en protéine par la technique de LOWRY *et al.*¹². Le comptage de la radioactivité est effectué sur une autre fraction aliquote à l'aide d'un compteur Tracerlab TGC14.

Hydrolyse de la protéine iodée

Selon FINK, DENT ET FINK¹³ les dérivés iodés de l'histidine et de la tyrosine ne sont pas stables dans les conditions de l'hydrolyse acide. L'hydrolyse enzymatique ne présente pas cet inconvénient majeur.

Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique a été réalisée par action de la protéase de *Streptomyces griseus*¹⁴ (Pronase, produit Calbiochem) dans les conditions suivantes: le rapport enzyme/substrat initial est de 1:20; on laisse la réaction s'effectuer en tampon phosphate 0.03 M (pH 7.5) pendant 12 h à 37°. Après 12 et 24 h d'hydrolyse, une nouvelle addition de protéase égale à la quantité initiale est ajoutée au mélange réactionnel. Dans ces conditions l'hydrolyse est pratiquement totale. La déshalogénéation spontanée des dérivés de la tyrosine, observée par LISSITZKY *et al.*¹⁵ est atténuée en réalisant l'hydrolyse à l'obscurité et en absence d'oxygène (tube de Thunberg). Les produits d'hydrolyse sont ensuite analysés par chromatographie sur papier (Whatman No. 1;

butanol-acide acétique-eau, 4:1:1, v/v/v) pendant 24 h. Une électrophorèse rapide (20 min) en tampon phosphate 0.05 M (pH 6.0) sous une tension de 800 V permet au préalable d'éliminer les iodures contaminant les hydrolysats. La position des substances radioactives est mise en évidence par autoradiographie.

RÉSULTATS

Action de l'iode sur l'activité enzymatique

La lévane-sucrase est d'abord mise en présence d'un nombre croissant d'atomes d'iode à pH 9.4 pendant 1 h.

La Courbe a de la Fig. 1 représente les variations de l'activité enzymatique en fonction du nombre d'atomes d'iode mis en présence par molécule d'enzyme. Les points expérimentaux se distribuent sur une droite; la perte totale et irréversible d'activité est atteint pour 30 atomes d'iode réagissant par mole de protéine.

En présence de lévanes de poids mol. 15 000 à la concentration saturante de 10 mM (soit 20 fois la valeur de la constante d'affinité K_A à 0° de l'enzyme pour les lévanes), la Courbe b des variations de l'activité enzymatique en fonction du nombre d'atomes d'iode mis en présence par molécule d'enzyme est aussi une droite mais de pente plus faible, ce qui indique un certain effet protecteur des lévanes.

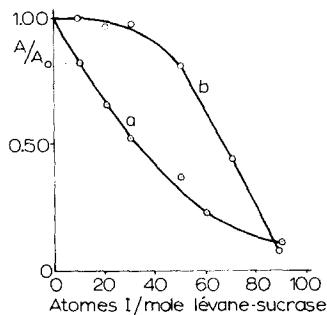
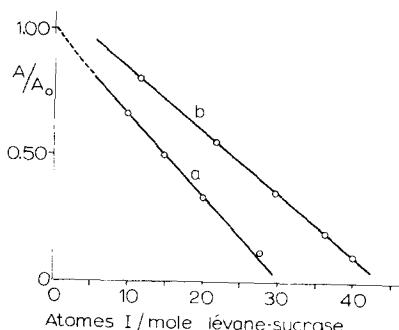


Fig. 1. Iodation de la lévane-sucrase à pH 9.4. Variation de l'activité enzymatique en fonction du nombre d'atomes d'iode présents par mole de lévane-sucrase. Courbe a, lévane-sucrase seule; Courbe b, lévane-sucrase plus lévane 10 mM (poids mol. 15 000).

Fig. 2. Iodation de la lévane-sucrase à pH 8.5 (mêmes coordonnées que dans la Fig. 1).

En présence d'autres substrats à concentration élevée tels que le saccharose 10 mM ou l'inuline (polyfructoside à liaisons 2→1) 10 mM aucune protection de l'activité n'est mise en évidence.

Il était intéressant de réaliser l'iodation de la protéine à un pH moins alcalin auquel l'enzyme présente encore une activité mesurable. Nous nous sommes donc placés à pH 8.5 et avons observé (Fig. 2): (1) une désactivation plus lente de l'enzyme: la perte totale d'activité est atteinte pour 100 atomes d'iode ajoutés par mole de lévane-sucrase; (2) une protection très efficace des lévanes de poids mol. 15 000 à la concentration de 10 mM.

Les résultats sont identiques lorsque l'iode est laissé en contact avec l'enzyme pendant plusieurs heures.

Fixation d'iode ^{131}I sur la protéine

Iodation à pH 9.4. 1. Les courbes de la Fig. 3 montrent les variations de la quantité d'iode fixée par mole de lévane-sucrase à pH 9.4 en fonction du nombre d'atomes d'iode mis en présence dans le milieu réactionnel par molécule de lévane-sucrase seule (Courbe a) et en présence de lévanes 10 mM (Courbe b).

La désactivation totale de l'enzyme correspond à la fixation de 14-15 atomes d'iode par mole. Le rendement de fixation d'iode sur la protéine que l'on peut définir par le rapport:

$$R = \frac{\text{nombre d'atomes I fixés par mole de lévane-sucrase}}{\text{nombre d'atomes I présents par mole de lévane-sucrase}}$$

est de l'ordre de 0.4, ce qui est très voisin du rendement théorique maximum (0.5) de fixation d'iode selon le schéma réactionnel de Li¹⁶. En présence de lévanes le rendement est légèrement plus faible, mais la désactivation de la protéine correspond à la même fixation d'iode (14-15 atomes/mole lévane-sucrase).

2. Iodation extensive de la protéine: la lévane-sucrase possédant 17 résidus tyrosyls par mole, la fixation maximum d'iode sur la protéine devrait donc atteindre 34 atomes en admettant que seuls les résidus tyrosyls interviennent.

La Courbe a de la Fig. 4 représente les variations du nombre d'atomes d'iode fixés par mole de lévane-sucrase en fonction du nombre d'atomes d'iode présents dans le milieu réactionnel par mole de lévane-sucrase. Un plateau de fixation maximum est atteint lorsque la molécule de protéine a fixé 30-32 atomes d'iode, ce qui permet de penser que la presque totalité des résidus tyrosyls sont iodés.

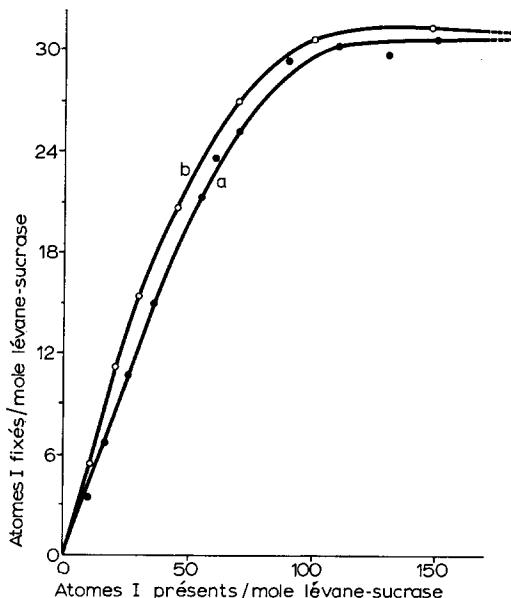
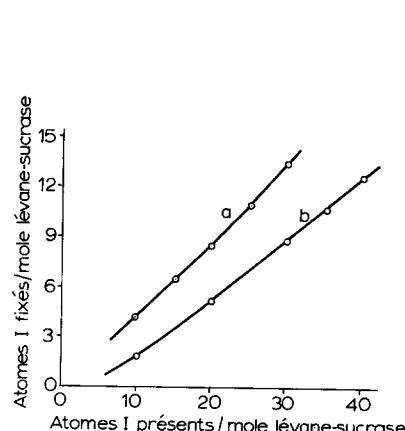


Fig. 3. Quantité d'iode fixée par mole de lévane-sucrase à pH 9.4 en fonction de la quantité d'iode présente dans la réaction. Courbe a, lévane-sucrase seule; Courbe b, lévane-sucrase *plus* lévane 10 mM (poids mol. 15 000).

Fig. 4. Iodation extensive de la lévane-sucrase. Courbe a, lévane-sucrase non dénaturée; Courbe b, lévane-sucrase dénaturée par chauffage.

La Courbe b de la Fig. 4 représente les mêmes variations de fixation d'iode mais sur la protéine ayant subi une complète dénaturation par la chaleur: la solution de protéine en tampon phosphate 0.2 M (pH 6) a été portée pendant 15 min au bain-marie bouillant; le coagulum de protéine a été dissous dans de la soude 0.1 M; la solution obtenue a été amenée à pH 9.4 par addition de tampon carbonate-bicarbonate 0.5 M. L'iodation de la protéine dénaturée a été ensuite réalisée dans les mêmes conditions que précédemment exposées.

Les Courbes a et b sont superposables, ce qui indique que la dénaturation telle que nous l'avons réalisée ne démasque pas de nouveaux résidus pouvant s'ioder.

Iodation à pH 8.5

Nous avons effectué la même expérience d'iodation à pH 8.5. Les quantités d'iode fixées sont identiques en absence et en présence de lévanes 10 mM (poids mol. 15 000), et très voisines des quantités fixées à pH 9.4. La perte d'activité de l'enzyme se produit à pH 8.5 lorsque la molécule a fixé 28-30 atomes d'iode, soit une valeur très proche du maximum possible (Fig. 5).

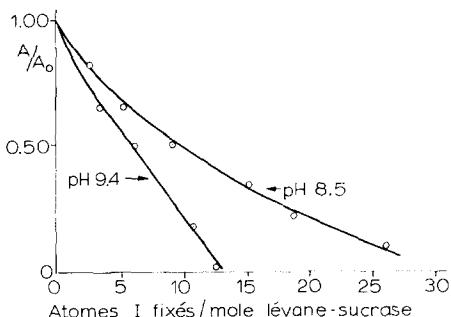


Fig. 5. Activité enzymatique de lévane-sucrase en fonction de la quantité d'iode fixée à pH 8.5 et à pH 9.4.

Effet de la température sur la protéine iodée

La lévane-sucrase a été iodée à pH 8.5 et à 0° pendant 1 h, dans les conditions décrites précédemment en absence et en présence de lévanes 10 mM. Une fraction aliquote a été portée à 15° et une autre à 20°, pendant 1 h supplémentaire.

La perte d'activité enzymatique a été ensuite évaluée, après dilution à pH 6.0, comme indiqué précédemment, par rapport à une solution d'enzyme non iodé maintenu au même pH et à la même température.

Dans ces conditions, nous constatons que: (1) l'enzyme se comporte de façon identique à l'enzyme maintenu à 0°; (2) les lévanes exercent le même effet protecteur qu'à 0°. Autrement dit, l'augmentation de la température n'a pas pour effet de diminuer la stabilité de l'enzyme iodé ni de modifier la nature du complexe enzyme iodé-lévane.

Analyse des produits de l'hydrolyse enzymatique de la protéine iodée

Le radiochromatogramme de la Fig. 6 a été obtenu en déposant sur le papier en T_1 , T_2 et T_3 les témoins synthétisés par la technique de ROCHE *et al.*¹⁰, et en a, b, c une fraction aliquote de l'hydrolysat total de la protéine à divers stades d'iodation

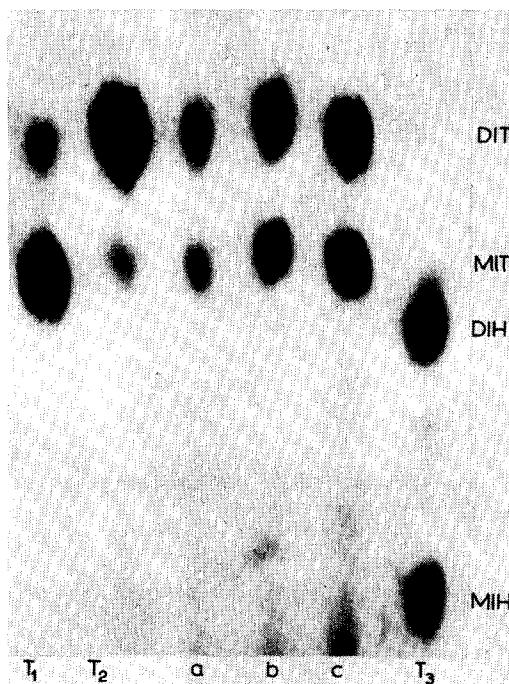


Fig. 6. Analyse radiochromatographique de l'hydrolysat enzymatique de la lévane-sucrase iodée. T_1 et T_2 , monoiodotyrosine (MIT) et diiodotyrosine (DIT) témoins; T_3 , monodiodohistidine (MIH) et diiodohistidine (DIH) témoins. a, lévane-sucrase ayant fixé 4.5 I par mole; b, lévane-sucrase ayant fixé 8.8 I par mole; c, lévane-sucrase ayant fixé 14 I par mole.

(pH 9.4): Stade a: 4.5 atomes d'iode fixés par mole de lévane-sucrase; Stade b: 8.8 atomes d'iode fixés par mole de lévane-sucrase; Stade c: 14 atomes d'iode fixés par mole de lévane-sucrase (inactivation totale).

Aux 3 stades d'iodation de la protéine étudiés, seuls les dérivés iodés de la tyrosine (mono- et diiodo) sont mis en évidence. On ne distingue pas de tache individualisée par autoradiographie au niveau des dérivés iodés de l'histidine.

La présence de diiodotyrosine dans les premières étapes d'iodation est compatible avec le schéma proposé par Li¹⁶, qui indique que l'iodation de la monoiodotyrosine en diiodotyrosine est beaucoup plus rapide que la formation du dérivé monoiodé.

La distribution de la radioactivité a été étudiée en effectuant des comptages directement sur le chromatogramme au niveau des dérivés iodés (mono- et diiodotyrosine) formés au cours de l'iodation (Fig. 7).

Pour 15 atomes d'iode fixés par la protéine, correspondant à l'inactivation totale, il y a formation de 10 moles de monoiodotyrosine et 2.5 moles de diiodotyrosine. Pour 30 atomes d'iode fixés, il n'existe essentiellement que de la diiodotyrosine.

DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus montre que l'iodation des résidus de tyrosine a pour conséquence une diminution de la stabilité de l'enzyme. La désactivation est

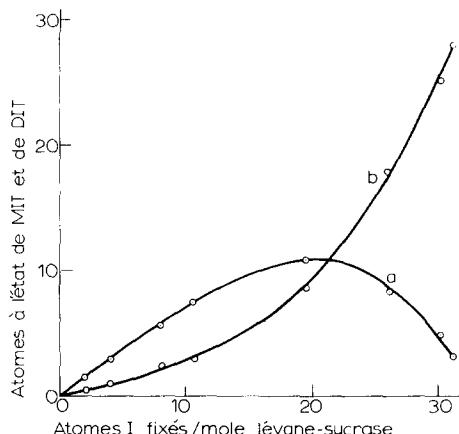


Fig. 7. Répartition des atomes d'iode à l'état de monoiodotyrosine (MIT) (a) et de diiodotyrosine (DIT) (b), en fonction de la quantité d'iode fixée par la lévane-sucrase.

en effet plus élevée à pH 9.4 qu'à pH 8.5, alors que la quantité d'iodé fixée demeure identique.

La protection spécifique de l'activité enzymatique exercée par les lévanes vis-à-vis de l'iodation à un pH où l'enzyme présente encore pour ceux-ci une affinité mesurable (pH 8.5) n'est cependant pas un argument en faveur de la fixation de ces polymères sur des résidus de tyrosine, car elle ne se traduit pas par une diminution de la quantité d'iode fixée.

Le fait que seuls les résidus de tyrosine soient iodés au moment de l'inactivation totale permet de penser malgré tout que parmi ceux-ci un certain nombre sont essentiels à l'activité, soit parce qu'ils interviennent directement dans le mécanisme chimique de la catalyse par leur groupe phénolique, soit plus vraisemblablement qu'ils contribuent à maintenir la structure active de la protéine, comme cela a été envisagé au cours de la photooxydation de la lévane-sucrase (J. R. CHAMBERT, résultats non publiés).

D'autre part, la lévane-sucrase possède une affinité pour les lévanes de faible poids mol. qui dépend de la température. Ainsi la constante K_A est environ 10 fois plus faible (soit 0.5 mM) à 0° qu'à 37°. Il existe une température de transition, située aux environs de 28° (réf. 17). Déjà EBERT ET STRICKER¹⁸ avaient obtenu un résultat voisin avec l'enzyme d'*Aerobacter levanicum* en ce qui concerne la vitesse maximum de synthèse des lévanes à partir du saccharose. Ces faits peuvent s'interpréter par un changement de configuration de la protéine, induit par le substrat à basse température. Ils sont compatibles avec l'hypothèse que nous avons émise concernant l'intervention des lévanes dans le maintien d'une certaine structure active de la protéine au cours de l'iodation. Il est alors tout à fait logique que l'iodation se traduise par une diminution de la stabilité de la protéine quand on élève le pH.

On pouvait penser que l'élévation de la température provoquerait le même effet. Néanmoins, les expériences réalisées à 15 et 20° montrent clairement qu'il n'en est rien.

Le rôle réel des résidus de tyrosine ne pourra être définitivement éclairci qu'après

l'étude des variations des constantes physiques de la protéine provoquées par l'iодation et après l'étude des effets secondaires sur d'autres résidus (Trp, His et Met) qui peuvent partiellement s'oxyder, comme l'ont montré FILMER ET KOSHLAND¹⁹.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec l'aide du Centre National de la Recherche Scientifique et avec celle du Commissariat à l'Energie Atomique pour la fourniture des produits marqués.

RÉSUMÉ

L'iодation progressive des résidus de tyrosine de la lévane-sucrase (β -D-2,6 fructose:D-glucose 1-fructosyltransférase, EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* entraîne la perte concomitante de l'activité enzymatique. Elle est totale lorsque la protéine a fixé 14-15 atomes d'iode par mole à pH 9.4 et 28-30 atomes d'iode par mole à pH 8.5. Tous les résidus de tyrosine (17 par mole d'enzyme) sont accessibles au réactif. La lévane-sucrase est protégée par des lévanes de faible poids moléculaire, à un pH (8.5) où elle possède encore une activité enzymatique.

REFERENCES

- 1 G. RAPOPORT, *Propriétés Générales et Activités Enzymatiques de la Lévane-Sucrase Purifiée de B. subtilis*, Thèse Paris, 1966.
- 2 C. Y. CHA ET H. A. SCHERAGA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 5 (1961) 67.
- 3 C. Y. CHA ET H. A. SCHERAGA, *Biochem. Biophys. Res. Res. Commun.*, 6 (1961) 369.
- 4 R. T. SIMPSON, J. F. RIORDAN ET B. L. VALLEE, *Biochemistry*, 2 (1963) 616.
- 5 R. T. SIMPSON ET B. L. VALLEE, *Biochemistry*, 5 (1966) 1760.
- 6 A. N. GLAZER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 90 (1964) 92.
- 7 S. K. DUBE, O. ROHOLT ET D. PRESSMAN, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 613.
- 8 I. COVELLI ET J. WOLFF, *Biochemistry*, 5 (1966) 860.
- 9 R. DEDONDER, E. JOZON, G. RAPOPORT, Y. JOYEUX ET A. FRITSCH, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45 (1963) 477.
- 10 J. ROCHE, S. LISSITZKY, O. MICHEL ET R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 439.
- 11 W. L. HUGHES, JR. ET R. STRAESSLE, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 452.
- 12 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 13 R. M. FINK, C. E. DENT ET K. FINK, *Nature*, 160 (1947) 801.
- 14 M. NÖMOTO, Y. NARAHASHI ET M. MURAKAMI, *J. Biochem. Tokyo*, 48 (1960) 593.
- 15 M. T. BENEVENT, M. ROQUES, J. TORRESANI ET S. LISSITZKY, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45 (1963) 969.
- 16 C. H. LI, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1147.
- 17 A. DELOBBE ET R. DEDONDER, *Compt. Rend.*, 262 D (1966) 2187.
- 18 K. H. EBERT ET H. STRICKER, *Z. Naturforsch.*, 19b (1964) 287.
- 19 D. L. FILMER ET D. E. KOSHLAND, JR., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17 (1964) 189.