

BBA 65532

COMPARAISON DES GROUPES SH REACTIFS DES ATP:GUANIDINES  
PHOSPHOTRANSFERASES

R. KASSAB, L. A. PRADEL, E. DER TERROSSIAN ET N. V. THOAI

*Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, Collège de France, Paris, et Laboratoire de Biochimie Marine, Collège de France, Concarneau (France)*

(Reçu le 3 août, 1966)

## SUMMARY

*Comparative study of the reactive SH groups of ATP:guanidine phosphotransferases*

1. With 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in the presence of urea, 6 SH groups are titrated in ATP:creatine phosphotransferase (EC 2.7.3.2), ATP:arginine phosphotransferase (EC 2.7.3.3) and ATP:lombricine phosphotransferase (EC 2.7.3.5); 14 SH groups are found in ATP:taurocyamine phosphotransferase (EC 2.7.3.4) and 16 in ATP:guanidinoacetate phosphotransferase (EC 2.7.3.1).

In the absence of urea, only 1 SH group is titrated in lombricine kinase, 2 in creatine and taurocyamine kinases, and 6 in arginine and glycocyamine kinases.

2. At pH 8.5, 3 of the SH groups of arginine kinase react at once with DTNB; at pH 7, only one SH is immediately titratable. The blocking of this SH group results in the complete inhibition of the enzyme. L-Arginine efficiently antagonizes the inhibitor; Mg-ATP and Mg-ADP decrease the rate of alkylation but do not restore the inactivation of arginine kinase.

3. Stoichiometric inhibition by DTNB reveals the presence of one reactive SH group in arginine and lombricine kinases and of 2 essential SH groups in glycocyamine, creatine and taurocyamine kinases. Guanidine substrates, arginine and lombricine, efficiently protect their respective enzymes against inactivation by DTNB; in contrast glycocyamine and creatine do not protect their corresponding enzymes. Moreover, Mg-ATP protects glycocyamine and creatine kinases but not the arginine and lombricine kinases. Taurocyamine kinase is intermediate between these 2 groups of enzymes: it is protected from DTNB by both guanidine and nucleotide substrates.

4. Fingerprints of *N*-[1-<sup>14</sup>C]ethylmaleimide-labelled creatine, taurocyamine and lombricine kinases show the presence of approximately the same number of peptides, 46, which are mainly neutral or basic. Arginine kinase, the molecular weight of which is half that of the other 3 enzymes, produces nearly the same number of peptides, 45-48. On autoradiograms of the fingerprints of the 4 enzymes, the main radioactivity seems to be situated in the same peptide.

Abréviations: DTNB, acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque; PCMB, *p*-chloromercuribenzoate.

## INTRODUCTION

On peut supposer, *a priori*, que toutes les ATP:guanidines phosphotransférases (EC 1.2.7.3) agissent par le même mécanisme de réaction et possèdent le même site actif. Des travaux antérieurs ayant suggéré que les groupes SH participeraient à la fixation des substrats et même à la catalyse enzymatique<sup>1,2</sup>, nous avons été conduits à rechercher si le nombre de groupes SH réactifs était le même pour tous ces enzymes.

En fait, selon les méthodes et les conditions de dosage employées, le nombre de ces groupements peut varier d'une façon appréciable. Ainsi, il a été trouvé que l'ATP:créatine phosphotransférase (EC 2.7.3.2) renferme 2 groupes SH rapidement titrables par ampérométrie<sup>3</sup>; l'ATP:arginine phosphotransférase (EC 2.7.3.3) en présente 1 ou 3 selon que la protéine est dosée au moyen de l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque<sup>4</sup> (DTNB) ou la *N*-éthylmaléimide<sup>5</sup>; dans le cas de l'ATP:taurocyamine phosphotransférase (EC 2.7.3.4) ces 2 réactifs révèlent respectivement 2 et 4 SH (réf. 6); enfin dans l'ATP:lombricine phosphotransférase (EC 2.7.3.5) ils indiquent la présence d'un seul SH réactif<sup>6</sup>. Ces variations, ainsi que celles observées sur des préparations différentes d'un même enzyme<sup>7</sup> rendent difficile toute interprétation du rôle des groupements sulfhydryles dans les guanidines kinases. Nous avons pensé qu'en uniformisant la technique de titration et en utilisant un réactif très sensible, le DTNB, il serait possible d'obtenir des résultats plus homogènes et plus facilement comparables.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Matériel et méthodes**Matériel*

L'ATP et l'ADP sont des produits commerciaux; ils sont à 98% de pureté et sont employés en solution aqueuse neutralisée par NaOH 1 M.

Les composés guanidiques: créatine, arginine, glycocyamine sont d'origine commerciale; la taurocyamine est synthétisée au laboratoire<sup>8</sup>; la lombricine est extraite et purifiée à partir des vers de terre<sup>9</sup>. Ces produits sont à 95-99% de pureté. L'arginine phosphate est préparé d'après<sup>10</sup>.

Le DTNB est un produit commercial. Les solutions exactes de DTNB sont préparées dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 7) par dosage du réactif au moyen d'une solution de glutathion, cette dernière étant elle-même titrée par spectrophotométrie à l'aide d'une solution étalon de *p*-chloromercuribenzoate (PCMB)<sup>11</sup>.

La *N*-[1-<sup>14</sup>C]éthylmaléimide à 95% de pureté, est un produit commercial en solution dans l'éthanol à 50%; son activité spécifique est de 2.9 mC/mme.

L'urée cristallisée R.P. est utilisée à la concentration 8 M en solution tamponnée préparée juste avant usage.

La créatine kinase est obtenue à l'état cristallisé selon la méthode de KUBY, NODA ET LARDY<sup>12</sup>, procédé B; son activité spécifique est de 70 (réf. 13). L'Arginine kinase cristallisée, la lombricine kinase et la taurocyamine kinase sont préparées à l'état homogène selon les méthodes déjà décrites<sup>6,14</sup>; elles présentent une activité spécifique respectivement égale à 230, 80 et 82. La glycocyamine kinase (activité spécifique, 75) est purifiée selon la méthode de PRADEL, KASSAB ET THOAI<sup>15</sup> améliorée<sup>16</sup>. Avant usage, les protéines sont dialysées pendant 24 h à 4° contre tampon Tris-acétate 0.01 M, EDTA 10<sup>-4</sup> M (pH 7.5).

La trypsine d'origine commerciale est employée en solution à 5 mg de protéine/ml après dialyse de 24 h contre HCl  $10^{-3}$  M.

### Méthodes

La concentration protéique est déterminée par spectrophotométrie à 260 et 280 m $\mu$  selon WARBURG ET CHRISTIAN<sup>17</sup>. Le dosage des groupements SH au moyen du DTNB est effectué selon ELLMAN<sup>18</sup>: le réactif est utilisé en solution  $10^{-3}$  M dans les tampon Tris-acide acétique ou Tris-acide nitrique 0.1 M ou glycine-NaOH 0.1 M (pH 8.5).

Le milieu réactionnel comprend 1–5 mg de protéine, tampon choisi (0.1 M), 0.5 ml de solution de DTNB  $10^{-3}$  M. Le volume total est de 3 ml. Après 20–30 min à la température ordinaire, les lectures sont faites à 412 m $\mu$ , contre témoin contenant le tampon et le DTNB.

En se basant sur les poids moléculaires des protéines enzymatiques obtenus par ultracentrifugation analytique<sup>19</sup> et l'extinction molaire de l'ion thionitrobenzoïque  $\epsilon_m = 13\,600$  à 412 m $\mu$  (réf. 18), les lectures obtenues sont converties en nombre de groupements SH dosés par molécule d'enzyme. La disparition des groupements SH de l'arginine kinase est suivie dans le temps à 412 m $\mu$ , aux 2 pH de la réaction de transfert. La détermination des groupements SH essentiels est effectuée selon la méthode de l'inhibition stoechiométrique.<sup>13</sup>

Les dosages au moyen de *N*-[1-<sup>14</sup>C]éthylmaléimide et la préparation des hydrolysats tryptiques des guanidines kinases radioactives sont réalisés de la manière suivante: après dialyse de 24 h contre tampon Tris-HCl 0.05 M, EDTA  $10^{-4}$  M (pH 7.5) (créatine kinase, lombricine kinase, taurocyamine kinase) ou contre tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 8.5) (arginine kinase), 50 mg de chaque protéine sont traités à 0° par 1.3 (arginine kinase, lombricine kinase), 2 (créatine kinase), 4 (taurocyamine kinase) équivalents de *N*-[1-<sup>14</sup>C]éthylmaléimide. Après 4 h de contact à 0°, la perte d'activité de chaque préparation est mesurée. Les enzymes inhibés sont alors dénaturés par addition d'urée cristallisée jusqu'à la concentration finale de 8 M. Après 4–6 h à 0°, les solutions sont dialysées à froid contre eau distillée pendant 48 h avec plusieurs changements du liquide de dialyse. La lombricine kinase, l'arginine kinase et la taurocyamine kinase précipitent au cours de cette dialyse; seule la créatine kinase, qui a la propriété de se recombinaison après élimination de l'urée, reste en solution, sa dénaturation complète est achevée à pH 5 par précipitation au moyen de quelques gouttes d'HCl 0.01 M. Les précipités de créatine kinase, de lombricine kinase, de taurocyamine kinase sont recueillis par centrifugation et mis en suspension dans 5 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0.2 M (pH 8.5). L'arginine kinase après dialyse contre eau distillée est soumise à une seconde dialyse contre tampon bicarbonate d'ammonium 0.2 M (pH 8.5) pendant 36 h. La protéine se redissout au cours de cette seconde dialyse.

Les préparations ainsi obtenues sont incubées à 37° pendant 20 min; on ajoute alors la trypsine au temps 0, selon un rapport enzyme/substrat, 1/100. Au bout de 6 h le rapport enzyme/substrat est amené à 1/50, par addition d'une nouvelle quantité de trypsine. L'hydrolyse est conduite pendant 18 h sous toluène. A la fin de la réaction l'hydrolysate est refroidi et une partie aliquote est prélevée pour la mesure de la radioactivité incorporée. Le reste est desséché sous vide sur KOH et P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Les cartes peptidiques sont obtenues en déposant sur une bande de papier

Whatman No. 4 (4 cm  $\times$  40 cm) une quantité d'hydrolysate tryptique correspondant à 0.10, 0.15  $\mu$ mole de protéine. Les peptides sont séparés en première dimension par électrophorèse sous 6000 V, 30 min, dans le tampon EDTA  $10^{-4}$  M, pyridine acide acétique (pH 6.5) (refs. 20,21). Après séchage, la bande de papier est très soigneusement cousue sur une grande feuille de papier Whatman No. 4 (40 cm  $\times$  70 cm) selon la technique de RICHMOND ET HARTLEY<sup>22</sup> et les peptides sont soumis à une chromatographie descendante dans le solvant pyridine-butanol-acide acétique-eau (20:30:6:24) pendant 13 h à 20°.

La révélation des peptides est effectuée par pulvérisation à la ninhydrine; la position des peptides radioactifs est déterminée par autoradiographie, les électrochromatogrammes étant exposés 5 à 15 jours contre film Kodak Kodirex.

La radioactivité en solution est mesurée par comptage en scintillation liquide au spectrophotomètre Packard Tricarb.

## RÉSULTATS

### *Dosage des groupements SH au moyen du DTNB*

(a) En présence d'urée. Le DTNB réagit immédiatement, en présence d'urée 8 M, sur les groupements SH de l'arginine kinase, de la créatine kinase, de la lombricine kinase, de la taurocyamine kinase et de la glycocyamine kinase. Il révèle 6 groupes SH pour les 3 premiers enzymes et 14 et 16 SH pour les 2 derniers (Tableau I).

TABLEAU I

DOSAGE DES GROUPES SH DES GUANIDINES PHOSPHOTRANSFÉRASES PAR LE DTNB

Pour chaque protéine (en mg): créatine kinase, 3.2; arginine kinase, 1.58; taurocyamine kinase, 0.80 et 4; lombricine kinase, 1.87; glycocyamine kinase, 1 et 3. Tampon Tris-acide acétique (0.1 M, pH 7) en absence ou en présence d'urée 8 M, DTNB: 0.5 ml d'une solution  $10^{-3}$  M. Vol. final, 3 ml. Lecture après 20 min à 412 m $\mu$  contre témoin DTNB sans protéine.

Enzymes	SH par mole de protéine	
	Sans urée	Avec urée
Créatine kinase	2.0	5.0
Arginine kinase	6.0	6.0
Lombricine kinase	1.2	6.1
Taurocyamine kinase	2.0	14.0
Glycocyamine kinase	6.0	16.0

(b) En absence d'urée. A l'état natif, les 5 enzymes réagissent d'une façon différente vis-à-vis du DTNB. Les 6 SH de l'arginine kinase sont titrés au bout de 20 min tandis qu'on dose 1 SH dans la lombricine kinase, 2 SH dans la créatine kinase et la taurocyamine kinase et 6 SH dans la glycocyamine kinase.

### *Cinétique de la réaction du DTNB vis-à-vis des SH de l'arginine kinase*

Seule l'arginine kinase native révèle en présence de DTNB, la totalité de ses groupements SH. La réaction du DTNB n'est pas immédiate; la vitesse de fixation du DTNB sur les différents SH de cet enzyme peut être suivie en fonction de 2 facteurs

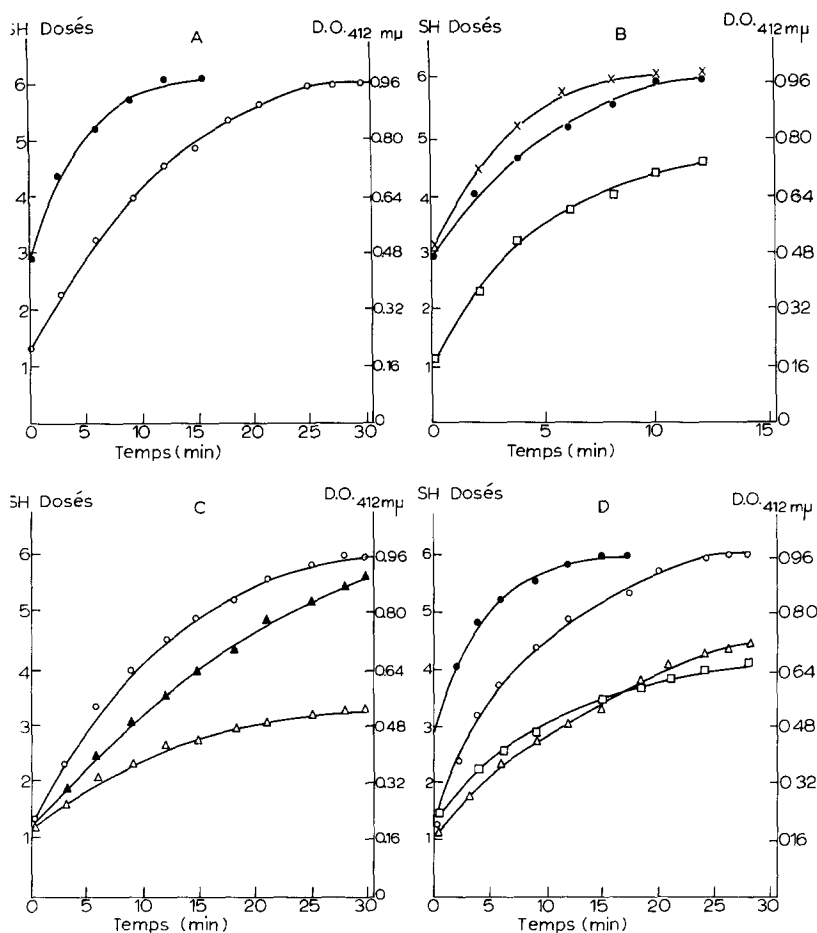


Fig. 1. Cinétique de la réaction du DTNB vis-à-vis des groupements SH de l'arginine kinase en absence et en présence des substrats. Arginine kinase (1,58 mg de protéine) préincubée 5 min à température ordinaire, en absence ou en présence des différents substrats, DTNB  $10^{-4}$  M. Vol., 3 ml. Lecture à 412 mμ contre témoin. A. Effet du temps et du pH. ●—●, Réaction directe; tampon glycine-NaOH 0.33 M (pH 8.5); ○—○, réaction inverse; tampon Tris-acide acétique 0.33 M (pH 7.1). B. Effet des substrats de la réaction directe. ●—●, Enzyme témoin sans substrats; ×—×, enzyme plus arginine 0.01 M; □—□, enzyme plus ATP = acétate de Mg 0.01 M. C. Effet des substrats de la réaction inverse. ○—○, Enzyme témoin sans substrats; ▲—▲, enzyme plus phosphoarginine 0.01 M; △—△, enzyme plus ADP = acétate de Mg 0.01 M. D. Effet du mélange des substrats de la réaction directe et inverse. ●—●, Enzyme témoin sans substrats (pH 8.5); ○—○, enzyme témoin sans substrats (pH 7.1); □—□, enzyme plus Mg-ATP 0.01 M plus arginine 0.01 M; △—△, enzyme plus Mg-ADP 0.01 M plus phosphoarginine 0.01 M.

de la réaction: le pH et la présence dans le milieu de divers substrats de la réaction.

(a) Effet du pH. A pH 8.5, le réactif se fixe immédiatement sur 3 groupements SH, la titration des autres SH s'effectuant plus lentement; la réaction est terminée au bout de 12 min. A pH neutre, la réaction est moins rapide, mais elle provoque, dès son départ, la disparition d'un groupement SH; l'enzyme est saturé au bout de 30 min (Fig. 1A).

(b) Effet des substrats de la réaction de transphosphorylation sur la vitesse de

fixation du DTNB. La Fig. 1B montre qu'à pH 8.5, le Mg-ATP ralentit la fixation du DTNB sur les SH de l'enzyme et réduit le nombre des SH dosables, sans éviter la titration immédiate d'un groupement. Par contre, l'arginine semble accélérer légèrement la réaction et permet la titration des 6 SH en 6 min.

La Fig. 1C montre qu'à pH 7 les courbes obtenues en ajoutant la phosphoarginine ou le Mg-ADP sont encore différentes de celle du témoin. Le phosphagène ralentit la réaction mais n'empêche pas la titration presque complète des SH de l'enzyme. L'effet du Mg-ADP est plus spectaculaire que celui du Mg-ATP, il fait disparaître la moitié des SH titrables. Cependant il n'empêche pas le DTNB de réagir d'emblée sur un SH.

La Fig. 1D montre le ralentissement appréciable de la vitesse de titration provoquée par l'addition des mélanges Mg-ATP *plus* arginine et Mg-ADP *plus* phosphoarginine. Le dosage d'un SH est immédiat dans les 2 cas.

*Relation entre la réactivité des SH des guanidines phosphokinases vis-à-vis du DTNB et la diminution de l'activité enzymatique*

La Fig. 2A montre pour l'arginine kinase la relation linéaire existant entre la perte de l'activité enzymatique et le blocage d'un SH pour 1 mole de DTNB. Cette même relation est mise en relief dans le cas de la taurocyamine kinase, pour laquelle

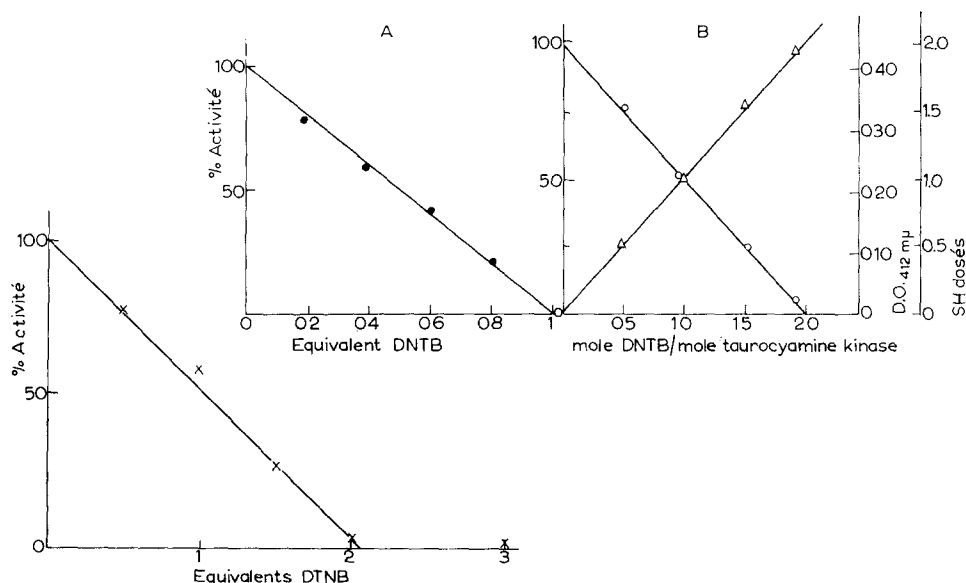


Fig. 2. Inhibition stoechiométrique des guanidines phosphotransférases par le DTNB. Ordonnées: % activité par rapport à l'enzyme non inhibé. Abscisses: équivalents de DTNB mis en contact 5 à 15 min à température ordinaire avec la protéine: 1 mg (arginine kinase), 4 mg (taurocyamine kinase), 0.210 mg (glycocyamine kinase) dans tampon Tris-acétate 0.033 M (pH 7). Vol. final, 1 ml (arginine kinase, glycocyamine kinase) ou 3 ml (taurocyamine kinase). Témoins: mêmes conditions, sans inhibiteur. Une partie aliquote des essais et témoins est prélevée et diluée dans le tampon glycine-NaOH 0.01 M (pH 8.5) à 4°. L'activité enzymatique est respectivement mesurée sur 0.3  $\mu$ g (arginine kinase) et 1  $\mu$ g (taurocyamine kinase, glycocyamine kinase) dans les conditions habituelles. Pour taurocyamine kinase, lecture de chaque essai à 412 m $\mu$ . A, arginine kinase. B, taurocyamine kinase.  $\circ$ — $\circ$ , % activité;  $\triangle$ — $\triangle$ , absorption à 412 m $\mu$  et nombre de SH dosés. C, Glycocyamine kinase.

le degré de fixation des équivalents de réactif utilisés et le pourcentage d'inhibition correspondant ont été mesurés parallèlement (Fig. 2B).

En ce qui concerne la glycoamine kinase l'inhibition totale de cet enzyme est obtenue lorsque 2 groupements SH ont disparu (Fig. 2C).

*Effet des substrats sur l'inhibition des différentes guanidines phosphokinases par le DTNB. Définition des différents types d'inhibition*

(a) Inhibition irréversible de l'arginine kinase et de la taurocyamine kinase par des concentrations élevées de DTNB. En utilisant à pH neutre la solution de DTNB à la concentration de  $1.6 \cdot 10^{-4}$  M dans des conditions analogues à celles décrites dans la Fig. 1, nous avons mesuré simultanément le nombre de SH disparus et le degré d'inhibition de l'arginine kinase. Celle-ci est totalement inactivée dès le début de la réaction après fixation du DTNB sur un SH. Dans ces conditions, les substrats employés à la concentration de 0.01 M, qu'ils soient ajoutés séparément ou mélangés, ne protègent pas l'enzyme. En ce qui concerne la taurocyamine kinase, le DTNB réagit sur seulement 2 SH par mole d'enzyme; la protéine est totalement inhibée, les substrats sont sans effet.

(b) Effet des substrats sur l'inhibition de l'arginine kinase, en présence de quantités stoechiométriques de DTNB. En diminuant la concentration de DTNB et en employant des quantités stoechiométriques de réactif, correspondant à 1, 2, 3, 4 et 6 équiv/mole d'arginine kinase, on constate que le substrat guanidique, l'arginine,

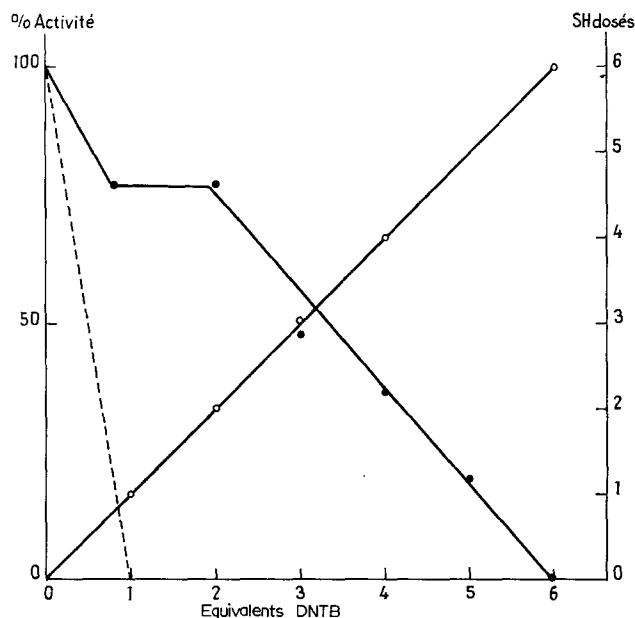


Fig. 3. Protection de l'arginine kinase par l'arginine contre l'inhibition par le DTNB. 1-6 équiv sont mis en contact 20 min à température ordinaire, en absence et en présence d'arginine 0.01 M dans le tampon glycine-NaOH 0.35 M (pH 8.5). Sur chaque essai on détermine le nombre de SH disparus, après lecture à 412 m $\mu$  et on mesure l'activité enzymatique correspondante par rapport à un témoin identique exempt de DTNB. ---, % activité en absence d'arginine; ●—●, activité en présence d'arginine; ○—○, nombre de groupes SH disparus.

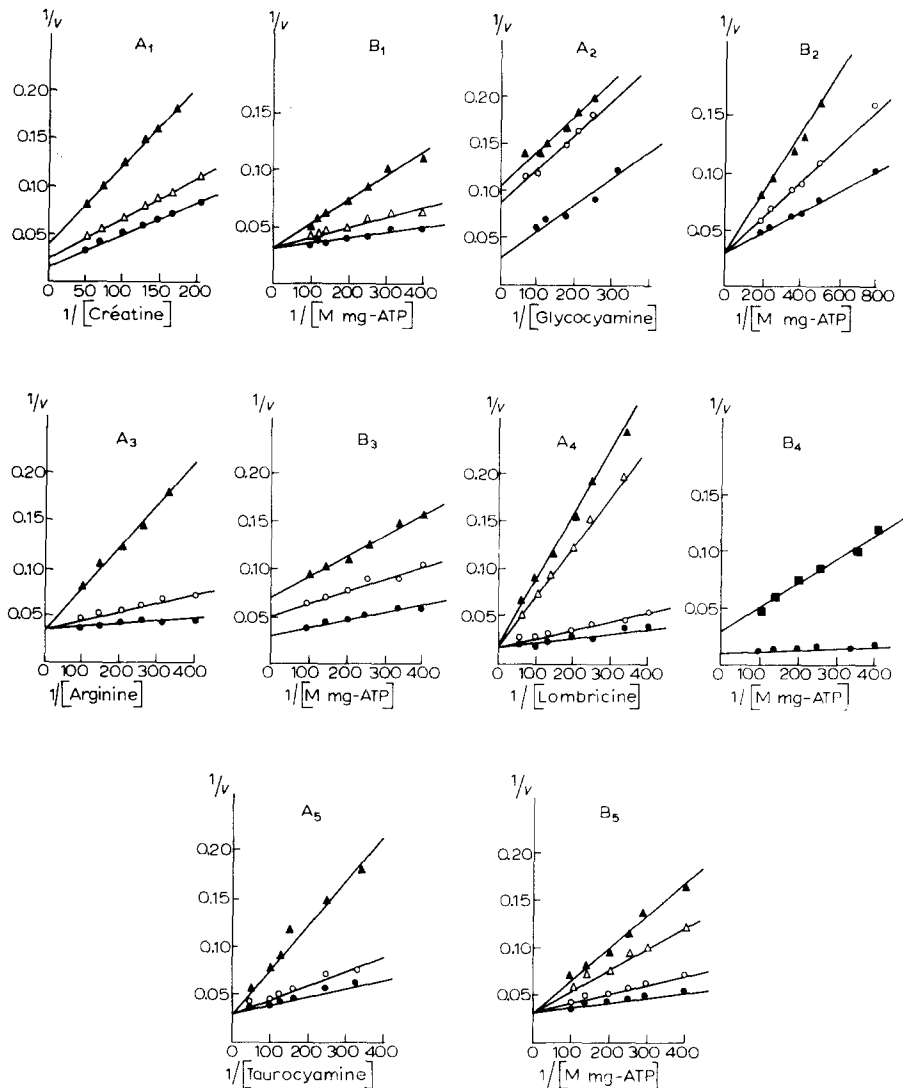


Fig. 4. Effet des substrats de la réaction directe sur l'inhibition des guanidine phosphokinases par le DTNB. Effet des concentrations variables du substrat guanidique. Préincuber la protéine: 0.8  $\mu$ g (créatine kinase), 2  $\mu$ g (glycocyamine kinase), 0.5  $\mu$ g (arginine kinase), 1  $\mu$ g (lombricine kinase ou taurocyamine kinase), 5 min à 25° ou 30° avec le mélange: substrat guanidique aux concentrations indiquées dans les Figs. A1 – A6 plus DTNB dans tampon glycine-NaOH 0.2 M (pH 8.5) (arginine kinase, glycocyamine kinase, lombricine kinase, taurocyamine kinase) ou 9 (créatine kinase). Ajouter ATP-acétate de Mg, 5  $\mu$ moles. Vol. 1 ml. Incuber 10 min à 30° (créatine kinase, lombricine kinase), 10 min à 24° (glycocyamine kinase, taurocyamine kinase), 15 min à 24° (arginine kinase). Inhibition non compétitive vis-à-vis de la créatine ou de la glycocyamine aux concentrations suivantes de DTNB: A1,  $\bullet$ — $\bullet$ , 0;  $\circ$ — $\triangle$ ,  $2 \cdot 10^{-7}$  M;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ,  $8 \cdot 10^{-7}$  M. A2,  $\bullet$ — $\bullet$ , 0;  $\circ$ — $\circ$ ,  $4 \cdot 10^{-9}$  M;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$  M. Inhibition compétitive vis-à-vis de l'arginine, de la lombricine ou de la taurocyamine aux concentrations suivantes de DTNB: A3,  $\bullet$ — $\bullet$ , 0;  $\circ$ — $\circ$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$  M;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$  M. A4,  $\bullet$ — $\bullet$ , 0;  $\circ$ — $\circ$ ,  $1 \cdot 10^{-8}$  M;  $\triangle$ — $\triangle$ ,  $1.5 \cdot 10^{-7}$  M;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ,  $2 \cdot 10^{-7}$  M. A5,  $\bullet$ — $\bullet$ , 0;  $\circ$ — $\circ$ ,  $3.3 \cdot 10^{-7}$  M;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$  M. Effet des concentrations variables du Mg-ATP. Préincuber la protéine: 0.8  $\mu$ g (créatine kinase), 2  $\mu$ g (glycocyamine kinase), 0.5  $\mu$ g (arginine kinase), 1  $\mu$ g (lombricine kinase ou taurocyamine kinase), 5 min à 25° ou 30° avec



protège efficacement l'enzyme. Par contre le Mg-ATP et le Mg-ADP sont sans effet; la protection n'est pas augmentée quand ils sont ajoutés à l'arginine ou à la phospho-arginine. Par ailleurs, la protection par l'arginine est maintenue en présence de 1 et 2 équiv de réactif (Fig. 3); elle diminue progressivement pour des concentrations plus fortes de DTNB; le Mg-ATP est sans effet sur cette diminution de l'activité enzymatique.

Dans les mêmes conditions et en présence de 2 équiv de DTNB, il est impossible de mettre en évidence une protection exercée par le substrat guanidique ou le Mg-ATP dans le cas de la taurocyamine kinase et de la lombricine kinase. Par contre celle-ci est observée d'une façon nette en employant de faibles quantités d'enzyme (Fig. 4).

(c) Types d'inhibition. La mise en compétition du DTNB et des substrats de la réaction de transphosphorylation nous a permis d'établir pour les phosphokinases étudiées, le type d'inhibition provoqué par ce réactif à l'égard de chaque dérivé guanidique et du Mg-ATP. Les droites de LINEWEAVER-BURK<sup>23</sup> ainsi obtenues montrent pour la créatine kinase (Fig. 4 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) et la glycoyamine kinase (Fig. 4 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) des résultats semblables, l'inhibition par le DTNB est compétitive vis-à-vis du Mg-ATP et non compétitive à l'égard de la créatine et de la glycoyamine. Par contre pour l'arginine kinase (Fig. 4 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>) et la lombricine kinase (Fig. 4 A<sub>4</sub>B<sub>4</sub>), le caractère compétitif de l'inhibition se manifeste vis-à-vis des substrats guanidiques correspondants, l'arginine et la lombricine. L'inhibition de la taurocyamine kinase par le DTNB (Fig. 4 A<sub>5</sub>B<sub>5</sub>) est antagonisée aussi bien par la taurocyamine que par le Mg-ATP.

TABLEAU II

MARQUAGE DES GROUPES SH ESSENTIELS DES GUANIDINES PHOSPHOTRANSFÉRASES AU MOYEN DE LA N-[1-<sup>14</sup>C]ÉTHYLMALÉIMIDE

Enzymes	Radioactivité (coups/ min $\times 10^6$ )		Moles N- éthylmalé- imide/mole enzyme	Inhibition (%)
	Initiale	Finale		
Lombricine kinase	2.5	2.2	0.9	100
Arginine kinase	25.7	15.2	0.8	80
Créatine kinase	4.4	4.0	1.8	94
Taurocyamine kinase	5.0	2.5	2.0	—

#### Marquage spécifique des SH essentiels par la N-[1-<sup>14</sup>C]éthylmaléimide

Dans le Tableau III, les différents résultats obtenus au cours de la préparation des 4 S-[1-<sup>14</sup>C]succinyl guanidines phosphokinases sont présentés. Le protocole expérimental qui a été choisi permet de mettre en évidence, une fois de plus, la relation

Suit légende Fig. 4.

d'abord ATP = acétate de Mg aux concentrations indiquées, ensuite avec DTNB dans tampon glycine-NaOH 0.2 M (pH 8.5 ou 9). Ajouter le substrat guanidique: 20  $\mu$ moles (créatine kinase), 10  $\mu$ moles (taurocyamine kinase, glycoyamine kinase, lombricine kinase, arginine kinase). Incuber dans les conditions décrites ci-dessus. Inhibition compétitive vis-à-vis du Mg-ATP, aux concentrations suivantes de DTNB: B<sub>1</sub>, ●—●, 0; △—△,  $1 \cdot 10^{-7}$  M; ▲—▲,  $2 \cdot 10^{-7}$  M. B<sub>2</sub>, ●—●, 0; ○—○,  $2 \cdot 10^{-8}$  M; ▲—▲,  $2.5 \cdot 10^{-8}$  M. B<sub>5</sub>, ●—●, 0; ○—○,  $2 \cdot 10^{-7}$  M; △—△,  $4 \cdot 10^{-7}$  M; ▲—▲,  $1 \cdot 10^{-6}$  M. Inhibition non compétitive vis-à-vis du Mg-ATP aux concentrations suivantes de DTNB: B<sub>3</sub>, ●—●, 0; ○—○,  $2.5 \cdot 10^{-7}$  M; ▲—▲,  $5 \cdot 10^{-7}$  M. B<sub>4</sub>, ●—●, 0; ■—■,  $1.5 \cdot 10^{-7}$  M.

existant entre l'activité enzymatique et le nombre de SH essentiels et de s'assurer du marquage sélectif de ces derniers par des mesures parallèles du taux d'incorporation de  $N$ -[ $1$ - $^{14}$ C]éthylmaléimide et du degré d'inhibition. Le marquage de la lombricine kinase et de la créatine kinase a pu être aisément effectuée en faisant réagir des quantités stoechiométriques d'inhibition; la plus grande partie de la radioactivité employée est retrouvée au niveau des protéines, provoquant 94–100% d'inactivation et le blocage de 1 SH (lombricine kinase) et 2 SH (créatine kinase).

En ce qui concerne l'arginine kinase des conditions expérimentales particulières ont été choisies dans le but de marquer spécifiquement le groupement SH lié à l'activité de cet enzyme et dont la présence a été révélée par le DTNB. En présence d'un léger excès de réactif (1.3 équiv) à la température de 30° et après 1 h de contact, le degré d'inhibition de l'enzyme (80%) correspond à la fixation de 0.8 équiv de  $N$ -éthylmaléimide sur la protéine.

Enfin, pour la taurocyamine kinase, le contact avec 4 équiv de réactif pendant plusieurs heures à 0°, provoque le marquage de 2 SH. La mesure de la perte d'activité obtenue n'a pu être effectuée car la protéine précipite. Il est cependant vraisemblable de penser que la  $N$ -[ $1$ - $^{14}$ C]éthylmaléimide n'a touché que les SH essentiels à l'activité de cet enzyme et que nous avons précédemment mis en évidence au moyen du DTNB.

L'examen des cartes peptidiques fournies par les hydrolysats tryptiques des 4 S-[ $1$ - $^{14}$ C]succinyl-phosphokinases que nous avons préparées apporte certaines informations (Fig. 5).

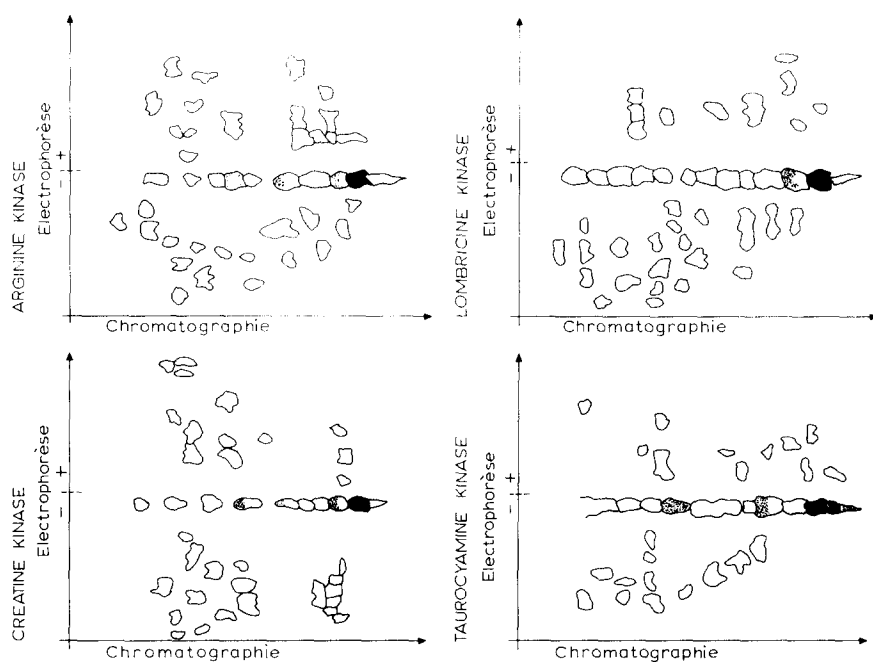


Fig. 5. Cartes peptidiques des ATP:guanidines phosphotransférases. Première dimension: électrophorèse à 6000 V, 30 min. Tampon pyridine-acide acétique, EDTA  $10^{-4}$  M (pH 6.5). Deuxième dimension: chromatographie descendante dans le solvant: pyridine- $n$ -butanol-acide acétique-eau (20:30:6:24, v/v/v/v) à 20° pendant 13 h. Révélation par la ninhydrine et autoradiographie.

La créatine kinase, la lombricine kinase et la taurocyamine kinase présentent le même nombre de peptides (en moyenne 46) dont la plupart sont neutres ou basiques. En ce qui concerne la créatine kinase en particulier, ce nombre correspond à la moitié environ de celui correspondant à la somme de arginine *plus* lysine = 99 trouvé dans la protéine<sup>24</sup>. Sur la carte peptidique d'arginine kinase on peut compter en moyenne 45-48 peptides ce qui correspond à la composition en acides aminés basiques de cet enzyme (arginine *plus* lysine = 50)<sup>14</sup>.

Pour les 4 protéines étudiées la radioactivité est localisée, après électrophorèse, au niveau des peptides neutres. Après chromatographie, elle est en majeure partie concentrée sur un peptide unique qui semble occuper la même position sur toutes les cartes peptidiques.

## DISCUSSION

L'emploi du DTNB a permis de mettre en évidence dans les guanidines phosphokinases étudiées, 2 types de groupements SH: les uns inaccessibles au DTNB mais dosables après dénaturation par l'urée 8 M, les autres particulièrement réactifs, et immédiatement dosés dans les protéines natives. Ainsi la créatine kinase, l'arginine kinase, la lombricine kinase présentent le même nombre de groupements SH totaux, 6 par molécule d'enzyme; le dosage par le DTNB confirme donc les résultats déjà obtenus par les méthodes spectrophotométriques<sup>5,6</sup>. La taurocyamine kinase diffère de ces dernières par la présence de 14 SH déterminés par le DTNB en présence de Tris-acétate à pH neutre et en présence d'urée. Ce chiffre qui diffère de celui obtenu en présence de tampon phosphate<sup>6</sup>, est proche de celui mesuré par le *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) sur la protéine dénaturée et à pH acide (SH = 12).

L'intérêt principal du DTNB est d'avoir mis en relief dans chaque enzyme natif la présence de fonctions thiols particulières dont la réactivité est directement liée à l'activité enzymatique. En effet, le réactif, même utilisé à concentration élevée, réagit sélectivement et immédiatement sur 2 SH de la créatine kinase et de la taurocyamine kinase et n'affecte qu'un seul SH dans la lombricine kinase. Par contre il bloque 6 SH de l'arginine kinase aussi facilement qu'en présence d'agent dénaturant.

Cependant les groupes SH totaux de l'arginine kinase ne réagissent pas à l'égard de ce réactif d'une manière uniforme. A pH 8.5 3 SH sont dosés immédiatement et de préférence aux 3 autres groupements, comme dans le cas de la *N*-éthylmaléimide<sup>5</sup>. A pH 7 la réaction est plus lente et l'emploi du DTNB permet de distinguer une groupe SH immédiatement accessible à celui-ci, même en présence des substrats. En plus de sa très grande sensibilité au DTNB, ce groupe SH présente 2 caractéristiques: d'une part sa disparition provoque l'inactivation complète de l'enzyme, et d'autre part, il présente une forte affinité pour l'arginine qui le protège efficacement contre l'inhibition par le DTNB.

Les nucléotides, bien qu'ils provoquent un ralentissement appréciable de la vitesse de fixation du DTNB ne semblent pas être en rapport direct avec les groupements SH de l'enzyme, puisqu'ils n'exercent aucun effet protecteur et que l'inhibition par le DTNB n'est pas compétitive à l'égard du Mg-ATP. Leur effet sur la vitesse de la réaction paraît être le résultat d'une modification de la conformation de la molécule protéique entraînant le masquage de 2 ou 3 groupements SH.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'arginine kinase possède un SH in-

dispensable à l'activité enzymatique et nécessaire à la fixation du substrat guanidique sur la protéine. Ces faits sont dans l'ensemble en accord avec ceux rapportés dans une publication récente par VIRDEN ET WATTS<sup>7</sup>, sur la vitesse d'alkylation des groupements SH de l'arginine kinase de homard au moyen de l'acide iodoacétique et de l'iodoacétamide. L'étude des SH de la taurocyamine kinase au moyen du DTNB a également mis en évidence la relation existant entre le nombre de groupements réactifs dans la protéine native et ceux nécessaires à l'activité enzymatique. Bien que celle-ci possède 14 SH, le DTNB réagit sélectivement sur 2 d'entre eux, provoquant l'inactivation complète de l'enzyme.

La glycoyamine kinase se comporte comme la créatine kinase et la taurocyamine kinase: son activité est liée à la présence de 2 SH essentiels.

L'inhibition stoechiométrique de l'arginine kinase<sup>5</sup> et de la taurocyamine kinase<sup>6</sup> par la *N*-éthylmaléimide a suggéré que l'activité de ces enzymes est liée à la présence de 3 SH dans le premier et de 4 dans le second; les résultats obtenus à l'aide du DTNB montrent que cette interprétation est due à un défaut de sélectivité de l'inhibiteur. La très grande sensibilité du DTNB à l'égard de certains de ces groupements, a permis d'individualiser parmi l'ensemble celui qui, dans l'arginine kinase, et ceux qui, dans la taurocyamine kinase, sont essentiels à la catalyse enzymatique.

Ainsi, il est possible de classer les guanidines phosphokinases en 2 groupes: l'un est représenté par l'arginine kinase et la lombricine kinase qui possèdent 1 SH indispensable à l'activité enzymatique; l'autre, par la créatine kinase, la glycoyamine kinase et la taurocyamine kinase dont l'activité est liée à 2 SH.

Les droites de LINEWEAVER ET BURK montrent que les substrats de la réaction directe sont capables de protéger de manière différente les guanidines kinases contre l'inhibition par le DTNB. A ce point de vue on peut classer les enzymes en 3 catégories: la première est représentée par l'arginine kinase et la lombricine kinase qui sont efficacement protégées par leur substrat guanidique et dont l'inhibition par le DTNB est non compétitive du Mg-ATP; la seconde renferme la créatine kinase et la glycoyamine kinase dont l'inhibition est compétitive vis-à-vis du Mg-ATP et non compétitive à l'égard de la créatine et de la glycoyamine; enfin dans la troisième catégorie, se trouve la taurocyamine kinase dont l'inhibition peut être combattue à la fois par le substrat guanidique et par le Mg-ATP, l'effet protecteur de ce dernier étant cependant plus important.

Les propriétés présentées par la taurocyamine kinase placent cet enzyme à mi-chemin entre l'arginine kinase et la lombricine kinase d'une part et la créatine kinase et la glycoyamine kinase d'autre part. Sa protection, ainsi d'ailleurs que celle des 2 premières phosphokinases, par les substrats guanidiques correspondants, peut être due à la présence, dans ces dérivés, de groupements polaires particuliers, permettant la formation d'un complexe enzyme-substrat relativement stable. De plus, si l'on suppose que les 2 SH essentiels de la taurocyamine kinase servent, comme ceux de la créatine kinase à la fixation des nucléotides<sup>13,25,26</sup> et qu'ils sont situés au niveau du site de fixation du dérivé guanidique, on comprend que la présence de taurocyamine empêche l'inhibition de cet enzyme par le DTNB. Cette même hypothèse avait été envisagée par MAHOWALD, NOLTMAN ET KUBY<sup>13</sup>.

Le marquage des SH essentiels à l'activité des différentes phosphokinases a pu être réalisé grâce à la mise en oeuvre de la *N*-[1-<sup>14</sup>C]éthylmaléimide, dans des conditions permettant de contrôler la spécificité de la réaction vis-à-vis de chaque protéine.

A cet égard, les résultats obtenus pour l'arginine kinase et la taurocyamine kinase montrent que l'affinité de l'inhibiteur vis-à-vis de ces 2 enzymes est moins grande que celle qu'il manifeste pour les autres phosphokinases et qu'un excès de réactif est indispensable pour assurer le blocage sélectif des SH liés à l'activité. Ceci étant, la relation étroite existant entre la quantité de  $N$ -[ $1^{14}\text{C}$ ]éthylmaléimide incorporée et le degré d'inhibition de chaque enzyme confirme définitivement les résultats déjà obtenus au moyen du DTNB.

Dans ces conditions, l'étude des séquences entourant les groupes SH essentiels peut être convenablement réalisée pour chaque phosphokinase. Nous avons abordé ces recherches en comparant les hydrolysats tryptiques des enzymes marqués sur les cartes peptidiques.

La taurocyamine kinase et la lombricine kinase semblent, comme la créatine kinase, fournir la moitié du nombre des peptides attendu. Si le nombre d'acides aminés basiques contenus dans ces protéines est le même que celui connu pour la créatine kinase, leur structure dimère peut être alors envisagée. Cependant l'intérêt principal de ces cartes peptidiques réside dans la présence et la position d'un peptide fortement radioactif et occupant la même position sur les 4 électrochromatogrammes.

Ces premiers résultats semblent indiquer que les sites actifs des phosphokinases étudiées possèdent des structures très peu différentes.

#### RÉSUMÉ

1. L'emploi de DTNB a permis de titrer, en présence d'urée, 6 groupes SH dans l'ATP:créatine phosphotransférase (EC 2.7.3.2), l'ATP:arginine phosphotransférase (EC 2.7.3.3), l'ATP:lombricine phosphotransférase (EC 2.7.3.5); 14 groupes SH dans l'ATP:taurocyamine phosphotransférase (EC 2.7.3.4) et 16 dans l'ATP:guanidinoacétate phosphotransférase (EC 2.7.3.1).

En absence d'urée on ne dose qu'un SH dans la lombricine kinase, 2 dans la créatine kinase et la taurocyamine kinase, 6 dans l'arginine et la glycocyamine kinases.

2. A pH 8.5, 3 groupes SH de l'arginine kinase réagissent immédiatement avec le DTNB, à pH 7 un seul. Le blocage de ce dernier entraîne l'inhibition complète de l'enzyme. L'arginine le protège efficacement contre l'inhibiteur; le Mg-ATP et le Mg-ADP ralentissent la vitesse de fixation du réactif sans éviter l'inactivation de l'arginine kinase.

3. L'inhibition stoechiométrique par le DTNB montre la présence d'un groupe SH réactif dans l'arginine et la lombricine kinase et celle de 2 SH essentiels dans la glycocyamine kinase, la créatine kinase et la taurocyamine kinase. Les substrats guanidiques, l'arginine et la lombricine, protègent efficacement leurs enzymes respectifs contre l'inhibition par le DTNB. Au contraire la glycocyamine et la créatine n'exercent pas le même effet vis-à-vis des enzymes correspondants. Inversement le Mg-ATP qui ne protège pas l'arginine kinase et la lombricine kinase le fait efficacement pour la glycocyamine kinase et la créatine kinase. Intermédiaire entre ces 2 groupes d'enzymes, la taurocyamine kinase est protégée contre le DTNB à la fois par les substrats guanidique et nucléotidique.

4. Les cartes peptidiques des enzymes marqués à  $N$ -[ $1^{14}\text{C}$ ]éthylmaléimide montrent que la créatine kinase, la taurocyamine kinase et la lombricine kinase

possèdent approximativement le même nombre de peptides (46) surtout neutres et basiques. L'arginine kinase, qui possède un poids moléculaire 2 fois plus petit, présente à peu près le même nombre de peptides (45-48). Sur les autoradiogrammes des "fingerprints" des 4 enzymes, la radioactivité semble se concentrer sur le même peptide.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. A. KUBY ET E. A. NOLTMANN, dans P. D. BOYER, H. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 6, Academic Press, New York, 2ième édition, 1962, p. 515.
- 2 R. R. RABIN ET D. C. WATTS, *Nature*, 188 (1960) 1163.
- 3 R. E. BENESCH, H. A. LARDY ET R. BENESCH, *J. Biol. Chem.*, 216 (1955) 663.
- 4 L. A. PRADEL, R. KASSAB, E. DER TERROSSIAN ET N. V. THOAI, *Compt. Rend.*, 260 (1965) 3212.
- 5 L. A. PRADEL, R. KASSAB, F. REGNOUF ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 255.
- 6 R. KASSAB, L. A. PRADEL ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 99 (1965) 397.
- 7 R. VIRDEN ET D. C. WATTS, *Biochem. J.*, 99 (1966) 162.
- 8 N. V. THOAI ET Y. ROBIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 533.
- 9 N. V. THOAI ET Y. ROBIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 76.
- 10 N. V. THIEM, N. V. THOAI ET J. ROCHE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 285.
- 11 P. D. BOYER, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 4331.
- 12 S. A. KUBY, L. H. NODA ET H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 191.
- 13 T. A. MAHOWALD, E. A. NOLTMANN ET S. A. KUBY, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1535.
- 14 E. DER TERROSSIAN, R. KASSAB, L. A. PRADEL ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 462.
- 15 L. A. PRADEL, R. KASSAB ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 81 (1964) 86.
- 16 L. A. PRADEL, R. KASSAB ET N. V. THOAI, en préparation.
- 17 O. WARBURG ET W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 310 (1941) 348.
- 18 G. ELLMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 (1959) 70.
- 19 N. V. THOAI, R. KASSAB ET L. A. PRADEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 110 (1965) 532.
- 20 U. GROSCHEL-STEWART ET F. TURBA, *Biochem. Z.*, 337 (1963) 104.
- 21 U. GROSCHEL-STEWART ET F. TURBA, *Biochem. Z.*, 337 (1963) 109.
- 22 U. RICHMOND ET B. S. HARTLEY, *Nature*, 184 (1959) 1869.
- 23 H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- 24 E. A. NOLTMANN, T. A. MAHOWALD ET S. A. KUBY, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1146.
- 25 S. A. KUBY, T. A. MAHOWALD ET E. A. NOLTMANN, *Biochemistry*, 1 (1962) 748.
- 26 D. C. WATTS, B. R. RABIN ET E. M. CROOK, *Biochem. J.*, 82 (1962) 412.

*Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 347-360