

BBA 65790

SITE ACTIF DES ATP: GUANIDINE PHOSPHOTRANSFÉRASES

I. RÉACTION DES GROUPES ϵ -NH₂ LYSINE ESSENTIELS AVEC LE 1-DIMÉTHYLAMINONAPHTALÈNE-5-SULFOCHLORURE

RIDHA KASSAB, CLAUDE ROUSTAN ET LOUISE-ANNE PRADEL

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

(Reçu le 9 avril, 1968)

SUMMARY

The active site of ATP: guanidine phosphotransferases. I. Reaction of the essential ϵ -NH₂ lysine groups with 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulphonylchloride

1. ATP: creatine phosphotransferase (EC 2.7.3.2) and ATP: L-arginine phosphotransferase (EC 2.7.3.3) are specifically inhibited by 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulphonylchloride, their essential sulphhydryl groups being reversibly masked. The metal complexes Mg-ATP and Mg-ADP are shown to increase the inactivation rate of creatine kinase only.

2. The yellow fluorescent dye-labelled enzymes exhibit a characteristic absorption spectrum with an absorption maximum at 335 m μ . The extent of inhibition is in good agreement with the different degrees of labelling, a fact which suggests that the dye has reacted at an enzymatically active site. Complete loss of activity is associated with the binding of two moles of dansyl per mole of creatine kinase and with one mole of dye per mole of arginine kinase.

3. High voltage electrophoresis and thin-layer chromatography of the single fluorescent derivative isolated after pronase digestion of the dansylated enzymes led to the identification of ϵ -DNS-lysine; these data provide evidence that the residue affected in both proteins is a lysine side chain.

INTRODUCTION

La réaction de transphosphorylation catalysée par les phosphagène kinases (EC 1.2.7.3) exige la présence, au site actif de ces enzymes, d'un ou de deux groupements sulphydriques dont le caractère essentiel a été déjà mis en évidence^{1,2}. Cependant, divers schémas réactionnels³⁻⁵ et un ensemble de données expérimentales concernant les

Abréviations: dansyl ou DNS-, 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulfo-dérivé; DNS-Cl, 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulfochlorure; DNS-OH, acide 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulfonique; DTNB, acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque.

propriétés cinétiques de certaines d'entre elles suggèrent la participation de différents autres résidus d'acides aminés tels que l'histidine et la lysine. A cet égard, l'intervention d'un groupement électropositif, au voisinage des cystéines actives de la créatine kinase, a été supposée pour expliquer, d'une part, la diminution de la vitesse d'inhibition de l'enzyme par l'acide iodoacétique lorsque la force ionique du milieu est augmentée³ et, d'autre part, le renforcement de cette inhibition lorsque l'enzyme est alkylé par le même réactif en présence des complexes ATP-Mg et ADP-Mg (bibl. 6). En outre, les travaux ayant trait à l'inactivation de la créatine kinase native par le *p*-nitrophénylacétate ont amené WATTS^{7,8} puis CLARK ET CUNNINGHAM⁹ à conférer à des résidus basiques comme la lysine un rôle essentiel dans l'activité de cette protéine, bien que l'interaction du réactif avec ces groupements au sein de l'enzyme étudié n'ait pas été dissociée d'une façon certaine de celle qu'il peut avoir avec les groupes -SH essentiels⁸. Enfin, la protection de la créatine kinase par le mélange des substrats contre l'inactivation par la trypsine, récemment rapportée¹⁰, pourrait être due au masquage de résidus basiques situés au niveau du site actif de la protéine.

Le présent travail a pour but de démontrer l'implication des groupements ϵ -NH₂ lysine dans l'activité de la créatine kinase (EC 2.7.3.2) et de l'arginine kinase (EC 2.7.3.3) par leur réaction spécifique avec le 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulfochlorure (DNS-Cl) après blocage réversible des groupes -SH réactifs. De plus, la détermination du nombre de résidus nécessaires à l'activité de chaque enzyme et leur identification à la ϵ -NH₂-lysine ont été effectuées.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel

L'ATP, sel de sodium, et l'ADP, sel de lithium (Calbiochem), sont à 98% de pureté; ils sont employés en solution aqueuse ajustée à pH 7 avec NaOH 1 M. La créatine, l'arginine monochlorhydrate, le dithiothreitol et le *p*-chloromercuribenzoate de sodium (Nutritional Biochemicals Corp.) sont employés en solution 0.1 M dans l'eau distillée. L'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (Aldrich Chemicals) est dissous dans le tampon phosphate 0.01 M (pH 7.3), à la concentration de 10⁻³ M. Le 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulfochlorure ou chlorure de dansyl (Pierce Chemical Co.) est employé en solution dans l'acétone pure aux concentrations désirées; il est titré d'après son absorption à 340 m μ ($\epsilon_M = 4.3 \cdot 10^4$) (bibl. 11).

La L- ϵ -DNS-lysine est préparée en dansylant le complexe cuivrique de l'acide aminé¹² selon la méthode de GRAY ET HARTLEY¹³. Le dérivé fluorescent, après décomposition par H₂S, est extrait par le chloroforme à pH 5 et identifié par chromatographie sur couche mince de silice (feuilles chromatographiques Eastman Kodak type 6060) dans le système butanol-acide acétique-eau (4:1:1, v/v/v); une seule tache de fluorescence jaune et positive à la ninhydrine est obtenue (R_F 0.53).

Le tetrathionate de potassium cristallisé (K₂S₄O₆ · H₂O) est préparé selon le procédé de TRUDINGER¹⁴; il est utilisé en solution aqueuse neutralisée.

Le Séphadex G-25 coarse (Pharmacia, Uppsala) est équilibré à 4° avec le tampon phosphate 0.05 M (pH 8.1).

La créatine kinase de muscle de lapin est purifiée selon le procédé B de la méthode de KUBY, NODA ET LARDY¹⁵ et cristallisée d'après MAHOWALD, NOLTMANN ET KUBY¹⁶; son activité spécifique est de 70.

L'arginine kinase de muscle de homard est préparée selon DER TERROSSIAN *et al.*¹⁷; son activité spécifique est en moyenne de 230.

Avant usage, les solutions enzymatiques sont exhaustivement dialysées contre les tampons bicarbonate de sodium ou phosphate de sodium 0.01 M (pH 8.1), pendant 48 h à 4°.

La pronase (Calbiochem) est utilisée en solution à 16 mg/ml dans l'eau distillée.

Méthodes

La concentration protéique des phosphagène kinases est déterminée d'après leurs coefficients d'extinction respectifs à 280 μ dans le tampon phosphate 0.01 M (pH 8) (créatine kinase, $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 8.8 (bibl. 15); arginine kinase, $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 8.1).

Le dosage des groupes -SH est effectué en l'absence et en présence d'urée 8 M dans le tampon Tris-acétate 0.2 M (pH 8), au moyen du réactif d'ELLMAN¹⁸ selon le protocole que nous avons décrit¹.

L'activité enzymatique des phosphokinases est mesurée dans le sens direct de la réaction de transphosphorylation dans les conditions déjà indiquées^{19,20}.

Préparation des DNS-guanidinophosphokinases

Protection des groupes -SH par le tetrathionate de potassium. A des quantités d'enzyme correspondant à 10-12 mg de protéine dans un volume final de 1 ml de tampon bicarbonate de sodium 0.1 M (pH 8-9) ou phosphate 0.05 M (pH 8.1) et à 4°, on ajoute du tetrathionate de potassium en quantité suffisante pour obtenir au bout de 5 min l'inhibition totale de chaque enzyme (rapports molaires: $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ /créatine kinase = 100; $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ /arginine kinase = 200). Dans quelques expériences, les groupes -SH de la créatine kinase ont été protégés par le *p*-chloromercuribenzoate de sodium employé selon un rapport: réactif/enzyme = 400.

Réaction avec le chlorure de dansyl. Les S-sulfénysulfonate phosphokinases obtenues ainsi que la forme native de l'arginine kinase sont traitées en l'absence et en présence des substrats de la réaction de transphosphorylation avec le chlorure de dansyl en solution dans l'acétone froide, le volume de solvant ajouté ne dépassant jamais 10% du volume du milieu réactionnel. Le mélange est agité de temps en temps et gardé à 4°. Des témoins correspondant à chaque enzyme sont traités dans les mêmes conditions et mis en présence d'acétone seule.

L'effet de la dansylation sur l'activité enzymatique, en fonction du temps et de la concentration du réactif, est déterminé après réduction d'une partie aliquote de chaque protéine par le dithiothreitol $7 \cdot 10^{-3}$ M dans le tampon glycine-NaOH 0.05 M (pH 8.8) pendant 5 min à 4° pour la créatine kinase et 30 min à 25° pour l'arginine kinase.

Purification des DNS-phosphagène kinases. Lorsque le degré d'inhibition voulu est obtenu, le mélange réactionnel est centrifugé à froid à $32\,000 \times g$ pour éliminer l'excès de DNS-Cl. Le surnageant limpide incolore (1 à 2 ml) est filtré immédiatement à 4° sur une colonne de Séphadex G-25 (2 cm \times 20 cm) tamponnée à pH 8.1. Les effluents protéiques récoltés par fractions de 2.5 ml sont réunis et dialysés à 4° pendant 48 h contre tampon phosphate 0.01 M (pH 8.1).

Les dosages des groupes -SH sont effectués après dialyse des protéines dansylées d'abord contre dithiothreitol $1 \cdot 10^{-3}$ M dans le tampon phosphate puis contre ce même tampon.

Analyse spectrophotométrique des DNS-phosphokinases. Le spectre d'absorption des enzymes conjugués, en solution dans le tampon phosphate 0.01 M (pH 8.1), est établi à la température ordinaire entre les longueurs d'onde de 250–550 m μ à l'aide du spectrophotomètre Cary 15 et en utilisant des semi-microcuvettes en quartz de 1 ml de volume et 1 cm de parcours optique.

Le nombre de moles de dansyl incorporées par mole d'enzyme est déterminé d'après le coefficient d'extinction molaire des protéines conjuguées à 335 m μ : $\epsilon_M = 3360$ (bibl. 21) en adoptant pour la créatine kinase le poids moléculaire de 81 000 (bibl. 15) et pour l'arginine kinase le poids moléculaire de 43 000 (bibl. 22).

Identification chimique de la ϵ -DNS-lysine. 8 mg de DNS-protéine en solution dans le tampon phosphate 0.01 M (pH 8.2) sont digérés sous toluène à 40° pendant 16 h par la pronase selon un rapport en poids: substrat/enzyme = 100. L'hydrolysate est desséché sous vide et dissous dans 0.2 ml d'acétone-acide acétique 0.1 M (2:1, v/v). Une partie aliquote est déposée sur du papier Whatman 3 MM et soumise à une électrophorèse à haut voltage à 4000 V, d'une part, dans le tampon pyridine-acide acétique (pH 6.5), pendant 1 h et, d'autre part, dans le tampon acide formique-acide acétique (pH 2) pendant 45 min, en présence de deux témoins: ϵ -DNS-lysine et DNS-Cl. Une autre fraction est chromatographiée sur couche de gel de silice dans le système butanol-acide acétique-eau (4:1:1, v/v/v) en présence des mêmes témoins. Le dérivé de fluorescence jaune obtenu à pH 6.5 est isolé par élution par HCl 6 M après une électrophorèse préparative, et hydrolysé à 110° pendant 24 h; l'hydrolysate est porté à sec puis repris par l'acétone acétique. Il est soumis parallèlement aux analyses électrophorétiques et chromatographiques dans les mêmes conditions que précédemment.

La fluorescence des solutions de DNS-enzymes et la position des taches de DNS-aminoacides est détectée sous lampe ultraviolette.

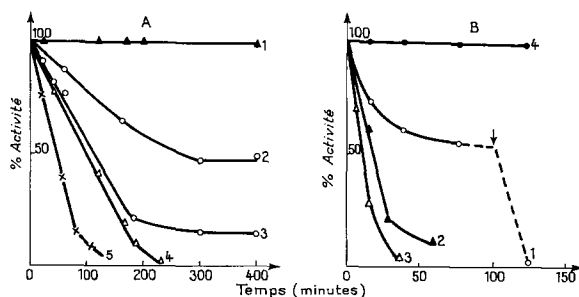


Fig. 1. Cinétique de la réaction d'inhibition des phosphagène kinases par le chlorure de dansyl. A. Dansylation de la S-sulfénylsulfonate créatine kinase en l'absence et en présence d'ADP-Mg. Enzyme = $1.37 \cdot 10^{-4}$ M; tampon NaHCO_3 $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 9.2); $t = 4^\circ$. 1, DNS-Cl = 0; 2, DNS-Cl = $3 \cdot 10^{-3}$ M; 3, DNS-Cl = $3 \cdot 10^{-3}$ M + ADP $1 \cdot 10^{-2}$ M + Mg $2 \cdot 10^{-2}$ M; 4, DNS-Cl = $4 \cdot 10^{-3}$ M + ADP $1 \cdot 10^{-2}$ M + Mg $2 \cdot 10^{-2}$ M; 5, DNS-Cl = $1 \cdot 10^{-2}$ M. B. Dansylation de l'arginine kinase native et de la S-sulfénylsulfonate arginine kinase. Enzyme = $2.44 \cdot 10^{-4}$ M; tampon NaHCO_3 $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 8.3); $t = 4^\circ$. 1, arginine kinase native + DNS-Cl $1 \cdot 10^{-3}$ M, concentration amenée au bout de 100 min à $1.8 \cdot 10^{-3}$ M; 2, S-sulfénylsulfonate arginine kinase + DNS-Cl $5.7 \cdot 10^{-3}$ M; 3, arginine kinase native + DNS-Cl $2.5 \cdot 10^{-3}$ M; 4, enzyme excepte de réactif. Aux temps indiqués, une partie aliquote de chaque protéine est prélevée et diluée dans le tampon glycine-NaOH $5 \cdot 10^{-2}$ M, dithiothreitol $6 \cdot 10^{-3}$ M, (pH 8.8); l'activité enzymatique est immédiatement mesurée pour créatine kinase ($1.3 \mu\text{g}$ de protéine) et après une incubation de 30 min à 25° pour arginine kinase ($0.2 \mu\text{g}$ de protéine).

RÉSULTATS

Inhibition des phosphagène kinases par le chlorure de dansyl

Les expériences de dansylation décrites dans ce travail ont porté sur la modification de l'activité de la créatine kinase dont les groupes -SH essentiels ont été préalablement bloqués par le tetrathionate de potassium; l'enzyme peut être immédiatement réactivé à 95–100% après réduction par le dithiothreitol. La dansylation de l'arginine kinase a été effectuée sur l'enzyme natif et sur la forme S-sulfénysulfonate de la protéine; celle-ci est réactivée à 90–95% en présence de réducteur. Ainsi la perte d'activité de ces deux phosphokinases par réaction avec le chlorure de dansyl peut être étudiée d'une façon plus sélective.

La vitesse d'inhibition de la créatine kinase est fonction de la concentration initiale de réactif: l'enzyme est inactivé à 90% au bout de 100 min pour un rapport initial: DNS-Cl/enzyme = 73 (Fig. 1A, courbe 5). Cela est aussi le cas pour l'arginine kinase dont la vitesse d'inactivation dépend aussi de la forme enzymatique employée: la baisse d'activité de l'enzyme natif est, en effet, plus rapide que celle présentée par arginine kinase S-sulfényl-sulfonate, pour des concentrations de DNS-Cl employées deux fois plus faibles (Fig. 1B, courbes 2 et 3); dans les conditions décrites dans la Fig. 1B, l'arginine kinase est complètement inhibée au bout de 35 min par 10 équivalents de chlorure de dansyl. Enfin, il faut aussi noter que lorsque la dansylation est effectuée à un pH acide (pH 6.75) le taux d'inhibition obtenu est deux fois inférieur à celui trouvé à pH alcalin.

Effet des substrats

L'effet des substrats de la réaction de transphosphorylation sur la vitesse d'inhibition est différent pour les deux enzymes: pour la créatine kinase créatine kinase-*p*-chloromercuribenzoate de sodium, la présence de la créatine est sans effet, alors que celle de l'ATP-Mg ou de l'ADP-Mg provoque une accélération sensible de

TABLEAU I

INFLUENCE DES SUBSTRATS DE LA RÉACTION DE TRANSPHOSPHORYLATION SUR L'INHIBITION PAR LE CHLORURE DE DANSYL DE L'ARGININE KINASE NATIVE ET DE LA CRÉATINE KINASE PRÉTRAITÉE PAR *p*-CHLOROMERCURIBENZOATE DE SODIUM

Substrats	% Inhibition	
	DNS-Cl $2 \cdot 10^{-4}$ M <i>p</i> -Chloromercuri- benzoate de sodium- créatine kinase $5 \cdot 10^{-6}$ M	DNS-Cl $3 \cdot 10^{-5}$ M Arginine kinase $1 \cdot 10^{-5}$ M
—	74	76
ATP-Mg		
0.005 M	100	82
0.010 M	100	62
ADP-Mg		
0.005 M	83	
0.010 M	96	47
Guanidines substituées		
0.01 M	73	61
0.03 M		27
ATP-Mg + créatine	97	

la vitesse d'inhibition, comme l'indique le Tableau I et, plus particulièrement, le tracé des courbes 2 et 3 de la Fig. 1A. Aucun effet de ce genre n'a été observé pour l'arginine kinase dont l'inhibition est, au contraire, retardée par l'ADP-Mg. D'autre part, cet enzyme est partiellement protégé par l'arginine ainsi que, cependant, par d'autres α -NH₂ aminoacides; ce dernier fait rend incertaine l'influence du substrat guanidique et suggère une réaction simultanée du DNS-Cl avec le groupement α -NH₂ de l'arginine et le résidu actif de la protéine enzymatique.

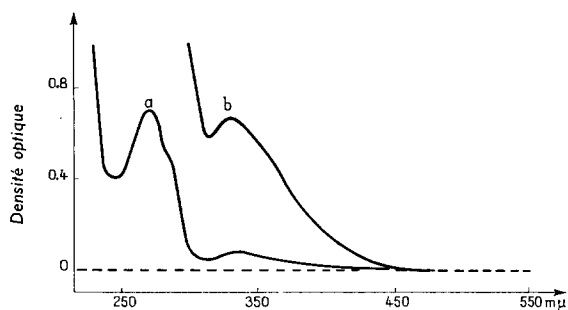


Fig. 2. Spectre d'absorption de la S-sulfénylsulfonate créatine kinase dansylée. Enzyme à la concentration de $7.6 \cdot 10^{-6}$ M, contenant 2 équivalents de DNS et inhibée à 92 %. Tampon phosphate 0.01 M, (pH 8.1). a, spectre établi en densité optique normale; b, spectre établi à l'échelle $\times 10$.

Spectre d'absorption des DNS-phosphokinases et stoechiométrie de la réaction de dansylation

Les deux phosphagène kinases conjuguées à différentes quantités de chlorure de dansyl et présentant différents degrés d'inhibition montrent un spectre d'absorption caractéristique des protéines dansylées²¹, avec un maximum se situant généralement à 335 mμ (Fig. 2b). Les solutions d'enzymes dansylés présentent aussi une fluorescence jaune à la lumière ultraviolette.

La Fig. 3 met en évidence la relation étroite existant entre le nombre de moles de DNS fixées et le degré d'inhibition de la créatine kinase. L'enzyme perd toute son activité par la fixation de 2 moles de DNS. Après traitement par le dithiothreitol et

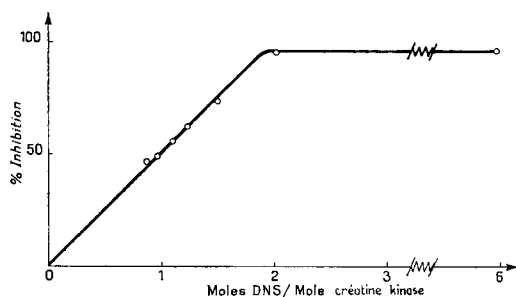


Fig. 3. Relation entre la perte d'activité enzymatique et le nombre de moles de DNS conjuguées par mole de créatine kinase. S-Sulfénylsulfonate créatine kinase: $1.5 \cdot 10^{-4}$ M; tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 8.1); DNS-Cl: $1 \cdot 10^{-2}$ M. Après des temps de réaction différents, on mesure parallèlement l'activité enzymatique après réduction par le dithiothreitol et l'absorption à 335 mμ de l'échantillon purifié (voir PARTIE EXPÉRIMENTALE).

TABLEAU II

STOECHIMÉTRIE DE L'INACTIVATION DE L'ARGININE KINASE PAR LE CHLORURE DE DANSYL

<i>Arginine kinase</i> (10^{-4} M)	<i>DNS-Cl ajouté</i> (M)	<i>DNS fixé</i> (mole/mole <i>arginine kinase</i>)	% <i>Inhibition</i>
1.22	$3 \cdot 10^{-3}$	1.0	98
1.22	$3 \cdot 10^{-3}$	1.2	100
1.22	$3 \cdot 10^{-3}$	0.70	80
2.44	$1.4 \cdot 10^{-3}$	0.90	92
2.44	$1.8 \cdot 10^{-3}$	1.3	100

dialyse, les dosages des groupes -SH de la protéine dansylée inactive montrent la présence, dans l'enzyme natif, des 2 -SH réactifs essentiels et, après dénaturation par l'urée 8 M, celle des 6 groupements -SH totaux.

Le Tableau II indique que l'arginine kinase dansylée à l'état natif est complètement inhibée en fixant une mole de réactif par molécule d'enzyme. Toutefois, quand elle est sous la forme de S-sulfénysulfonate protéine elle fixe une quantité de DNS supérieure à celle correspondant à son degré d'inhibition. De plus, dansylée sous sa forme native et contenant une mole de DNS par mole d'enzyme, elle perd la totalité de ses groupes -SH; cependant, après dialyse exhaustive contre dithiothreitol, la protéine dansylée inactive retrouve ses 6 groupes -SH.

Caractérisation chimique du site de fixation du DNS-Cl sur les phosphagène kinases

Afin d'éviter les réactions de transfert du DNS au sein des enzymes conjugués, pouvant se produire au cours d'une hydrolyse chimique drastique des protéines, celles-ci sont d'abord digérées par la pronase qui, comme l'illustrent les analyses chromatographiques et électrophorétiques (Fig. 4), libère un seul dérivé de fluorescence jaune possédant la même mobilité et le même R_F que la DNS- ϵ -lysine de synthèse utilisée comme témoin. Elué puis hydrolysé par HCl 6 M, ce dérivé conserve les mêmes caractéristiques. Additionné de DNS- ϵ -lysine, il donne à l'électrophorèse à différents pH et à la chromatographie une seule tache fluorescente.

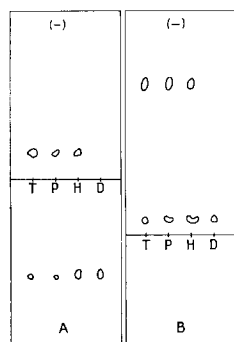


Fig. 4. Identification de la DNS- ϵ -lysine dans les phosphagène kinases dansylées. Electrophorèse à haut voltage des hydrolysats enzymatiques puis acides des DNS-arginine kinase et créatine kinase. A, pH 6.5, B, pH 2. P, hydrolysats par la pronase; H, hydrolysats acides (HCl 6 M) du dérivé dansylé libéré par la pronase et isolé par électrophorèse à pH 6.5; T, témoin DNS- ϵ -lysine; D, DNS-OH.

CONCLUSION

La dansylation des phosphagène kinases et, tout particulièrement, de la créatine kinase après protection réversible des groupes -SH essentiels a permis de mettre en évidence d'une façon sélective le caractère indispensable des résidus lysine dans l'activité de ces enzymes qui, à notre connaissance actuelle, semblent dépourvus de groupements α -NH₂ libres^{23,24}. La recherche de résidus d'acides aminés actifs dans les enzymes possédant des fonctions thiol essentielles, au moyen de réactifs qui ne sont pas d'une spécificité absolue, exige le blocage réversible de ces groupements. Ainsi KRESS ET NODA²⁵ étudient l'alkylation des résidus méthionine de la myokinase dont les groupes -SH réactifs sont protégés par l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB). De même, PFLEIDERER ET JECKEL²⁶ montrent l'importance des résidus histidine ou tyrosine dans les lactico-déshydrogénases traitées par le *p*-chloromercurobenzoate de sodium, le chlorure mercurique ou le DTNB (bibl. 27). Enfin, LIU²⁸ a décrit l'alkylation sélective d'une histidine active dans la protéase streptococcale dont un groupe -SH essentiel a été protégé par le tetrathionate de sodium.

Le chlorure de dansyl a déjà été utilisé comme réactif inhibiteur des enzymes se fixant sur les lysines actives de la myosine ATPase^{29,30} et de la rénine³¹ ainsi que sur l'histidine²¹ ou la sérine³² de la chymotrypsine. Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que l'inhibition de la créatine kinase et celle de l'arginine kinase sont associées respectivement à l'incorporation de deux moles et d'une mole de chromophore par molécule gramme de protéine; grâce à la stabilité et aux caractères analytiques du dérivé fluorescent libéré par les enzymes dansylés et hydrolysés par la pronase, il a été possible d'identifier le site de fixation du DNS comme étant la ϵ -NH₂-lysine.

Bien que les expériences de protection par les substrats ne permettent pas d'assigner un rôle défini à ces résidus dans l'activité enzymatique, l'accélération de l'inhibition de la créatine kinase par le DNS-Cl rappelle celle observée en alkylant, dans les mêmes conditions, la protéine par l'acide iodoacétique⁶ et suggère la proximité du résidu lysine par rapport à la cystéine active. Le rôle du groupement lysine proposé par WATTS^{7,8} dans le maintien d'une conformation stable du site actif peut être souligné par les modifications structurales subies par l'arginine kinase native dont les groupes -SH ont établi, après la fixation d'une mole de DNS, des ponts disulfure facilement réduits par le dithiothreitol. A cet égard, la dansylation d'une lysine active dans la myosine ATPase provoque aussi une perte sensible des groupes -SH, partiellement retrouvés après traitement de la protéine par l'alcool ou l'urée²⁹.

Enfin, l'existence dans la créatine kinase de 2 lysines actives sur 65 résidus lysine³³ confirme la structure dimère de cette protéine³⁴, chaque protomère renfermant un -SH essentiel et un site catalytique³⁵. L'arginine kinase s'apparente à cette dernière par la présence d'une lysine active sur 32 (bibl. 17), d'un -SH essentiel^{1,5} et d'un site catalytique³⁶, associés à une structure monomère qui sera prochainement démontrée par une étude quantitative de sa structure C-terminale³⁷.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce, en partie, au crédit de la R.C.P. No. 99 et à celui du groupe de recherche No. 6 du Centre National de la Recherche Scientifique.

RÉSUMÉ

1. L'ATP:créatine phosphotransférase (EC 2.7.3.2) et l'ATP:arginine phosphotransférase (EC 2.7.3.3) sont spécifiquement inhibées par le 1-diméthylaminonaphthalène-5-sulfochlorure, après protection réversible de leurs groupes SH essentiels.

2. L'étude spectrophotométrique des protéines dansylées, purifiées, montre que la perte d'activité est associée à l'incorporation de deux moles de dansyl par mole de créatine kinase et d'une mole de DNS par mole d'arginine kinase.

3. Le site de fixation du chromophore dans chaque protéine a été identifié comme étant la ε -NH₂-lysine.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. KASSAB, L. A. PRADEL, E. DER TERROSSIAN ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 347.
- 2 S. A. KUBY ET E. A. NOLTMANN, in P. D. BOYER, H. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 6, Academic Press, New York, 2e éd., 1962, p. 515.
- 3 B. R. RABIN ET D. C. WATTS, *Nature*, 188 (1960) 1163.
- 4 D. C. WATTS ET B. R. RABIN, *Biochem. J.*, 85 (1962) 507.
- 5 R. VIRDEN ET D. C. WATTS, *Biochem. J.*, 99 (1966) 162.
- 6 W. J. O'SULLIVAN, H. DIEFENBACH ET M. COHN, *Biochemistry*, 5 (1966) 2666.
- 7 D. C. WATTS, *Biochem. J.*, 87 (1963) 41 P.
- 8 D. C. WATTS, *Biochem. J.*, 89 (1963) 220.
- 9 J. R. CLARK ET L. CUNNINGHAM, *Biochemistry*, 4 (1965) 2637.
- 10 G. JACOBS ET L. W. CUNNINGHAM, *Biochemistry*, 7 (1968) 143.
- 11 G. WEBER, *Biochem. J.*, 51 (1952) 155.
- 12 J. LEGGETT BAILEY, *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2e éd., 1967, p. 166.
- 13 W. R. GRAY ET B. S. HARTLEY, *Biochem. J.*, 89 (1963) 60 P.
- 14 P. A. TRUDINGER, *Biochem. J.*, 78 (1961) 680.
- 15 S. A. KUBY, L. H. NODA ET H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 191.
- 16 T. A. MAHOWALD, E. A. NOLTMANN ET S. A. KUBY, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1535.
- 17 E. DER TERROSSIAN, R. KASSAB, L. A. PRADEL ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 462.
- 18 G. ELLMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 (1959) 70.
- 19 R. KASSAB, Thèse Doctorat ès Sciences, Paris, 1966.
- 20 L. A. PRADEL, R. KASSAB, F. REGNOUF ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 255.
- 21 B. S. HARTLEY ET V. MASSEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 58.
- 22 N. V. THOAI, R. KASSAB ET L. A. PRADEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 110 (1965) 532.
- 23 T. A. MAHOWALD ET S. A. KUBY, *Federation Proc.*, 19 (1960) 224.
- 24 P. ELÖDI ET E. SZORENYI, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 9 (1956) 367.
- 25 L. F. KRESS ET L. NODA, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 558.
- 26 G. PFLEIDERER ET D. JECKEL, *Europ. J. Biochem.*, 2 (1967) 171.
- 27 J. J. HOLBROOK ET R. JECKEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 122 (1967) 519.
- 28 T. H. LIU, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 4029.
- 29 M. KASUYA ET H. TAKASHINA, *Biochim. Biophys. Acta*, 99 (1965) 452.
- 30 M. KASUYA ET H. TAKASHINA, *J. Biochem.*, 60 (1966) 459.
- 31 R. D. HILL ET R. R. LAING, *Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 188.
- 32 A. M. GOLD, *Biochemistry*, 4 (1965) 897.
- 33 R. H. YUE, R. H. PALMIERI, O. E. OLSON ET S. A. KUBY, *Biochemistry*, 6 (1967) 3204.
- 34 N. DAWSON, M. EPPENBERGER ET N. O. KAPLAN, *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, 21 (1965) 346.
- 35 S. A. KUBY, T. A. MAHOWALD ET E. A. NOLTMANN, *Biochemistry*, 1 (1962) 748.
- 36 CL. ROUSTAN, R. KASSAB, L. A. PRADEL ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 326.
- 37 F. REGNOUF, L. A. PRADEL, R. KASSAB ET N. V. THOAI, en préparation.