

BBA 65813

ÉTUDE DE LA FRACTION OXYDANTE DE LA GLYCÉRALDÉHYDE-3-PHOSPHATE DÉSHYDROGÉNASE OBTENUE PAR HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE

B. CANTAU*, C. BRUNEL** ET J. PUDLES

Institut de Biochimie, Faculté des Sciences d'Orsay, Orsay, Essonne (France)

(Reçu le 13 juin, 1968)

SUMMARY

Studies on the oxidative fraction obtained by chymotrypsin hydrolysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

A limited proteolysis of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (D-glyceraldehyde-3-phosphate: NAD⁺ oxidoreductase (phosphorylating), EC 1.2.1.12) by α -chymotrypsin (EC 3.4.4.5) causes a preferential loss of its phosphorylating and arsenolytic activities but oxidative activity is maintained. Besides dehydrogenase properties, the native enzyme possesses various other catalytic functions such as esterolytic, phosphatase activities and NADH-X formation.

We have observed that, during the disappearance of the phosphorolytic and arsenolytic activities, the esterolytic, phosphatase, and NADH-X properties are much more stable and are maintained at the same level as oxidative activity.

By passing the digested enzyme through a chromatographic column of Sephadex G-100 two active peaks, A and B, were separated. Peak A had the same chromatographic and enzymic properties as the native enzyme; in Peak B, where arsenolytic and phosphorolytic activities had disappeared, the oxidative and esterolytic activities were still present; the molecular weight of this fraction based on elution volume was estimated as 60 000 to 70 000.

The fluorescence spectrum of Fraction B was displaced towards the visible by 15 m μ as compared with the native enzyme.

The activity of Peak B was more stable in the presence of high concentration of NAD⁺ than without.

The esterolytic activity was no longer inhibited by NAD⁺; and NADH does not have a limiting effect on the rate of oxidation.

These data confirm previous kinetic results with native enzyme in which the oxidative and esterolytic activities were located on the same site; from the enzymic

Abbreviations: DTNB, acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitro benzoïque); ATEE, N-acétyl-L-tyrosine éthyl ester.

* Le présent travail fait partie d'une Thèse de Doctorat ès Sciences que ce participant soumettra à la Faculté des Sciences d'Orsay dans un proche avenir.

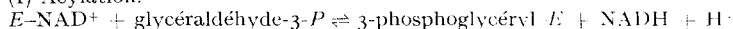
** Adresse actuelle: Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Montpellier, Hérault, France.

results with the total digest the phosphatase activity and NADH-X formation still seem to be near to or on the same site as the two previous activities.

INTRODUCTION

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (D-glycéraldéhyde-3-phosphate : NAD⁺ oxydoréductase (phosphorylante), EC 1.2.1.12) catalyse l'oxydation phosphorylante du glycéraldéhyde-3-phosphate. La réaction a été décrite par RACKER¹ et se déroule en deux étapes essentielles :

(I) Acylation.



(II) Phosphorylation.



En dehors de son activité déshydrogénase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase possède plusieurs autres fonctions catalytiques et en particulier une fonction transacylase qui lui permet de réaliser l'oxydation de divers substrats tel l'acétaldéhyde et le D-glycéraldéhyde^{2,3}, une fonction phosphatasique⁴ (hydrolyse de l'acétyl phosphate), une fonction estérasique⁵ (hydrolyse du *p*-nitrophénylacétate), une fonction NADH-X (réf. 6) (hydratation du noyau nicotinamide du NAD⁺). Ces propriétés ont en commun plusieurs caractères⁷: en dehors de l'activité phosphatasique, elles exigent toutes la présence de la cystéine active de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase⁸ sous sa forme réduite; mis à part l'activité estérasique, toutes font intervenir la liaison NAD⁺-enzyme.

KRIMSKY ET RACKER², à la suite d'une hydrolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase par l' α -chymotrypsine, ont démontré l'existence d'une fraction oxydant le D-glycéraldéhyde mais incapable de le phosphoryler.

Dans quelques autres cas d'enzymes à fonctions multiples, il a été possible par protéolyse de conserver sélectivement une partie des activités enzymatiques; ainsi FITT ET FITT⁹ ont étudié l'effet d'une hydrolyse trypsique sur la polynucléotide phosphorylase. Ils ont pu faire disparaître le site de polymérisation de la cytidine diphosphate tout en conservant celui de l'adénosine diphosphate.

Etant donné ces résultats, il nous a semblé intéressant d'étudier de façon plus systématique le mécanisme de la protéolyse chymotrypsique de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et de déterminer parmi les différentes fonctions catalytiques celles qui nécessitent la présence du site de la phosphorylation et celles qui sont liées au site de l'oxydation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase a été préparée à partir de muscle squelettique de lapin selon la méthode de CORI, SLEIN ET CORI¹⁰; l' α -chymotrypsine (EC 3.4.4.5) a été fournie par les Laboratoires Choay (Lot 521) ou Worthington (3 \times cristallisée, Lot CDI 61 378), la sérum albumine bovine par Pentex, le NAD⁺ et le NADH par Pabst (Lot 2261), la pepsine (EC 3.4.4.1) (2 \times cristallisée TRL 7 E D) et l'acétyl phosphate (Lot ACP 65 A) par Worthington, la D-1-glycéraldéhyde (Lot 49 810) par Fluka, le diisopropylfluorophosphate (DFP) (Lot 4017) par K et K Lab.

Inc., l'acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitro benzoïque) (DTNB) (Lot 21 820) et le 2-mercapto-éthanol par Aldrich Chem. Corp., le *p*-nitrophénylacétate (Lot 31B-1650), le *N*-acétyl-L-tyrosine éthyl ester (ATEE) (Lot 105 B-0370) et le fructose 1,6-diphosphate (Lot 54 B 7141) par Sigma, l' α -monothioglycérol par Serlabo, la triéthanol amine et le tris (hydroxyméthyl) amino méthane par Merck. L'aldolase (fructose-1,6-diphosphate D-glycéraldéhyde-3-phosphate-lyase, EC 4.1.2.13) a été préparée selon la méthode de TAYLOR, GREEN ET CORI¹¹. Le glycéraldéhyde 3-phosphate a été préparé suivant la méthode de BEISENHERZ *et al.*¹². Le Séphadex G-100 a été fourni par Pharmacia (Lot TO 5967). Tous les tampons ont été préparés avec de l'eau désionisée et distillée sous quartz, en présence d'EDTA 0.001 M.

Méthodes analytiques

Les concentrations en protéines ont été déterminées par la méthode de LOWRY¹³ avec un spectrophotomètre Zeiss PMQ-2 à 660 m μ ou sur la base de $E_{1\text{ cm}}^{280\text{ m}\mu}$, 10 (réf. 14).

Le dosage des groupements sulfhydryles a été fait selon la méthode d'ELLMAN¹⁵ modifiée par BUTTERWORTH, BAUM ET PORTER¹⁶. Le DTNB a été dissous dans un tampon Tris 0.05 M (pH 7.9), la lecture faite à 412 m μ .

Les groupements NH₂ ont été dosés selon la méthode de MOORE ET STEIN¹⁷, les peptides solubles dans l'acide perchlorique 3% par la mesure de l'absorption à 280 m μ dans le surnageant.

Les spectres de fluorescence ont été réalisés avec un spectrofluorimètre Aminco-Bowman (Modèle 1620-847). Les ultracentrifugations ont été faites dans une ultracentrifugeuse Spinco Modèle E; la vitesse de rotation était de 67 770 rév./min et la température de 20°; les valeurs des coefficients de sédimentation ont été exprimés en $s_{20,w}^0$. Les gradients de sédimentation entre 5 et 20% de saccharose ont été réalisés dans une ultracentrifugeuse Spinco L2-65 B avec un rotor S.W. 39 à une vitesse de 36 000 rév./min pendant 13 h à 4°.

Essais enzymatiques

Les activités arsénolytique, oxydante et l'activation de l'oxydation par P_i ont été déterminées selon le processus décrit par KRIMSKY ET RACKER².

On définit l'activité arsénolytique par la variation de l'absorbance à 340 m μ entre 15 et 45 sec après le début de l'essai enzymatique, réalisé en présence d'arséniate comme accepteur d'acyle.

L'activité oxydante a été suivie, en présence de thioglycérol comme accepteur d'acyle, par la variation de l'absorbance à 340 m μ en 5 min avec un spectrophotomètre Lérès DMS 200 enregistreur; l'activité phosphorylante a été définie par l'activation de la réaction lorsqu'on opère en présence de P_i.

Les autres activités ont été déterminées selon les modalités suivantes: (a) la formation de NADH-X par la diminution de l'absorbance à 340 m μ dans un tampon pyrophosphate (pH 7.0), selon HILVERS, WEENEN ET VAN DAM⁶, (b) l'activité estérasique dans un tampon triéthanol amine 0.05 M-EDTA 0.001 M (pH 7.9), par la libération de paranitrophénol à 400 m μ (réf. 5), (c) l'activité phosphatasique⁴ en dosant la liaison ester de l'acétylphosphate par la méthode des hydroxamates¹⁸.

Protéolyse

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase cristallisée 3-4 fois dans une

solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a été centrifugée à $20\,000 \times g$ avec une centrifugeuse Sorvall R.C. 2B. Le culot dissous dans un tampon triéthanol amine ou Tris 0.05 M-EDTA 0.001 M (pH 7.9) a été dialysé contre le tampon pour éliminer le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Le NAD^+ lié à l'enzyme a été retenu sur une colonne de charbon actif¹⁹. Au cours de ce traitement le rapport d'absorption $280\text{ m}\mu/260\text{ m}\mu$ est passé de 1.08 à 1.88 en moyenne; la concentration en protéines a été déterminée en utilisant les coefficients d'extinction molaire données par FOX ET DANDLIKER¹⁹.

La protéolyse a été faite à 30° dans le tampon utilisé pour dissoudre l'enzyme; la concentration finale de l'enzyme était d'environ 15 mg/ml. Des essais préliminaires de protéolyse par la chymotrypsine nous ont amenés à choisir une quantité de 40 μg d'enzyme protéolytique par mg de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, ce qui a permis d'obtenir une réaction d'hydrolyse rapide et sélective. On a prélevé à différents intervalles de temps des parties aliquotes de 0.1 ml de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, qui ont été amenées à 2 ml final avec du tampon triéthanol amine 0.05 M-EDTA 0.001 M (pH 7.9). L'hydrolyse a été bloquée par 25 μl de DFP 0.014 M; l'activité résiduelle de la chymotrypsine après l'action du DFP a été contrôlée par le test d'hydrolyse de l'ATEE selon SCHWERT ET TAKENAKA²⁰.

Sur ces aliquots ont été dosés les peptides solubles dans l'acide perchlorique 3%, les groupements sulfhydriles et aminés libres. On a suivi également les activités arsénolytique, oxydante, phosphorylante, estérasique, phosphatasique et NADH-X.

Séparation des fractions du protéolysat sur colonne

La solution d'enzyme protéolysé, contenant 60-70 mg de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase à 15 mg/ml, a été stabilisée par du NAD^+ 0.8 mM et la réaction d'hydrolyse stoppée par 100 μl de DFP à 0.014 M; elle a été ensuite placée sur une colonne de Sephadex G-100 équilibrée avec un tampon triéthanol amine 0.05 M-EDTA 0.001 M-NaCl 0.1 M- NAD^+ 0.8 mM (pH 7.9). Le poids moléculaire des constituants a été déterminé selon la méthode de WITAKER²¹ sur une colonne de Séphadex équilibrée comme précédemment; l'élution des protéines a été suivie avec un enregistreur L.K.B.

RÉSULTATS

Activité arsénolytique

La vitesse d'oxydation du glyceraldéhyde 3-phosphate, en présence d'arséniate comme accepteur d'acyle, par la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, diminue rapidement au cours de la protéolyse jusqu'à une valeur égale à 35% de l'activité initiale; puis la variation décroît en fonction du temps (Fig. 1). D'après l'expression $\log A_0/A_t$ en fonction du temps, où A_0 est l'activité initiale et A_t l'activité au temps t , on détermine les constantes de vitesse de la disparition de l'activité en fonction du temps de protéolyse: Entre 100 et 35% d'activité arsénolytique $K_1 = 2.93\text{ min}^{-1}$, au-dessous de 35% $K_2 = 1.29\text{ min}^{-1}$.

Activités oxydante et phosphorylante

(Fig. 1). L'oxydation du glyceraldéhyde en présence de thioglycérol comme accepteur d'acyle permet d'étudier isolément l'activité oxydante de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; dans la première étape de la protéolyse, elle reste stable

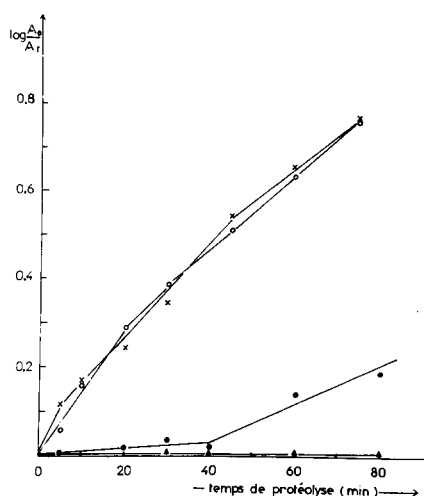


Fig. 1. Variation des activités oxydante, phosphorylante, arsénolytique et estérasiqne pendant la protéolyse. Le test oxydant a lieu dans un tampon triéthanol amine 0.05 M-EDTA 0.001 M (pH 7.9) contenant NAD^+ $1.38 \cdot 10^{-2}$ M, D,L-glycéraldéhyde $2.5 \cdot 10^{-2}$ M, thioglycérol $6 \cdot 10^{-4}$ M, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase 1.1 mg/ml (●—●); l'activité phosphorylante est testée dans les mêmes conditions en présence de P_i 10^{-2} M (×—×). L'activité arsénolytique est testée dans un tampon triéthanol amine 0.05 M-EDTA 0.001 M (pH 8.6) contenant NAD^+ $0.46 \cdot 10^{-2}$ M, glycéraldéhyde-3-P $0.093 \cdot 10^{-2}$ M, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase 1 $\mu\text{g/ml}$, arséniate $0.4 \cdot 10^{-2}$ M (○—○). L'activité estérasiqne a lieu dans un tampon triéthanol amine 0.05 M-EDTA 0.001 M (pH 7.9) contenant glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase 0.334 mg/ml, *p*-nitrophénylacétate 10^{-3} M (▲—▲).

et sa constante de vitesse de disparition est de $K_1 = 0.14 \text{ min}^{-1}$; puis à partir de 35% d'activité arsénolytique elle passe à une valeur $K_2 = 0.92 \text{ min}^{-1}$.

La cinétique de disparition de l'activité phosphorylante est la même que celle de l'activité arsénolytique.

Activité phosphatasique

L'hydrolyse de l'acétylphosphate est catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; le Tableau I montre la variation de l'activité phosphatasique au cours de la protéolyse; elle suit la cinétique de l'activité oxydante.

Activité NADH-X

HILVERS, WEENEN ET VAN DAM⁶ ont montré qu'en présence d'un anion tel que le phosphate, le citrate ou le pyrophosphate une molécule d'eau se fixe sur la double

TABEAU I

VARIATION DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE EN FONCTION DU DEGRÉ DE PROTÉOLYSE

Activité phosphorylante (%)	Activité oxydante (%)	Acétylphosphate hydrolysé (μg)	Activité phosphatasique (%)
100	100	17	100
38	60	11	64.7

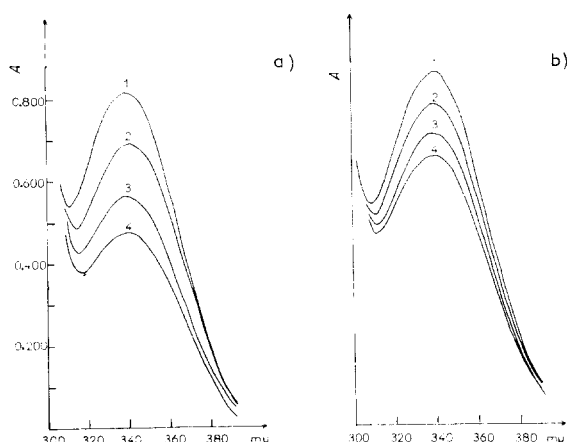


Fig. 2. Spectres montrant la formation de NADH-X avant (a) et après protéolyse (b) (19% d'activité phosphorylante et 50% d'activité oxydante résiduelles). Les incubations ont lieu à 25° dans un tampon pyrophosphate 0.05 M-EDTA 0.001 M (pH 7.0) contenant glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase 1.05 mg/ml, NAD^+ $1.43 \cdot 10^{-6}$ M, acétylphosphate $5.4 \cdot 10^{-3}$ M, NADH $13.65 \cdot 10^{-5}$ M. On fait un spectre entre 300 et 390 mμ toutes les 25 min: (1) 0-min incubation, (2) 25 min incubation, (3) 50 min incubation, (4) 75 min incubation. Le spectre de NADH fait dans les mêmes conditions reste constant pendant la durée de l'expérience.

liaison 5-6 du noyau nicotinamide réduit du coenzyme; la bande d'absorption caractéristique du NADH se trouve déplacée de 340 mμ à 290 mμ; on suit la formation de ce composé, nommé NADH-X, par la diminution de l'absorbance à 340 mμ ou par son augmentation à 290 mμ.

La Fig. 2 montre la variation de l'activité NADH-X en fonction du degré de la protéolyse; elle varie comme l'oxydation. Alors que l'activité phosphorylante est à 19% de sa valeur initiale, l'oxydation résiduelle est de 50% et l'activité NADH-X résiduelle de 61.6%.

Dosage des groupements sulphydriles

Le nombre de groupements sulphydriles dosés en 3 min par le DTNB augmente dès le début de la digestion chymotrypsique; en prenant comme référence un poids

TABLEAU II

VARIATION DES ACTIVITÉS OXYDANTE ET PHOSPHORYLANTE COMPARÉE AU NOMBRE DE NH_2 LIBRES ET SH DOSES

Activité phosphorylante (%)	Activité oxydante (%)	SH (mμM/mg de glycéralde- hyde-3-phos- phate déshydro- génase dosés en 3 min)	NH_2 libres (μM/mg)
100	100	26.6	0.760
50	94.5	33.8	1.120
17	66	40.4	1.460
9	53	38	1.510

moléculaire de 140 000 (réf. 22), on dose 3.6 équiv de SH avant la protéolyse et 5.7 équiv pour une activité oxydante résiduelle de 66% (Tableau II).

Dosage des groupements aminés libres

(Fig. 3). Le nombre de NH_2 libres augmente parallèlement à la diminution de l'activité phosphorylante; les deux vitesses de libération de NH_2 correspondent à la décroissance d'abord rapide puis lente de l'activité phosphorylante.

Dosage des peptides solubles dans HClO_4

(Fig. 3). Les peptides solubles dans HClO_4 3% ne sont pas libérés dès le début de la protéolyse; lorsqu'ils commencent à apparaître, l'oxydation n'a pas varié, mais l'activité phosphorylante résiduelle est tombée de 30%.

Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation (Fig. 4) met en évidence deux pics, pour lesquels les coefficients de sédimentation sont respectivement 6.60 S et 4.40 S. KRIMSKY ET

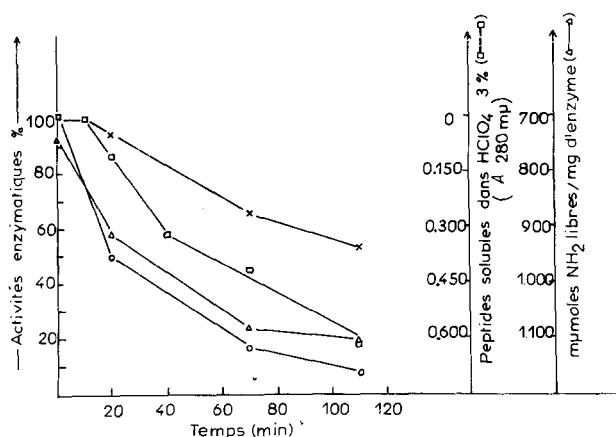


Fig. 3. Dosage des NH_2 libres et de peptides solubles dans HClO_4 3% pendant la protéolyse. $\times-\times$, activité oxydante; $\circ-\circ$, activité phosphorylante; $\square-\square$, peptides solubles; $\triangle-\triangle$, NH_2 libres.

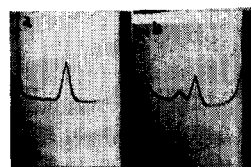


Fig. 4. Ultracentrifugation de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase native (a) et protéolysée (b), tampon triéthanol amine 0.05 M-EDTA 0.001 M- NAD^+ 0.8 mM (pH 7.9). a montre le déplacement de l'enzyme natif; b représente l'ultracentrifugation d'un enzyme protéolysé jusqu'à 22% d'activité phosphorylante et 78% d'activité oxydante résiduelles. (Photos prises après 38 min à 67 770 rév./min.)

RACKER² avaient déjà mis en évidence par gradient de sédimentation la formation d'une fraction de 4.83 S pendant l'hydrolyse par la chymotrypsine. Le $s_{20,w}^0$ de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase native est de 7.1.

Gradient en saccharose

Un gradient de sédimentation entre 5 et 20% de saccharose permet de séparer une fraction oxydante et une fraction qui a les activités enzymatiques et le déplacement

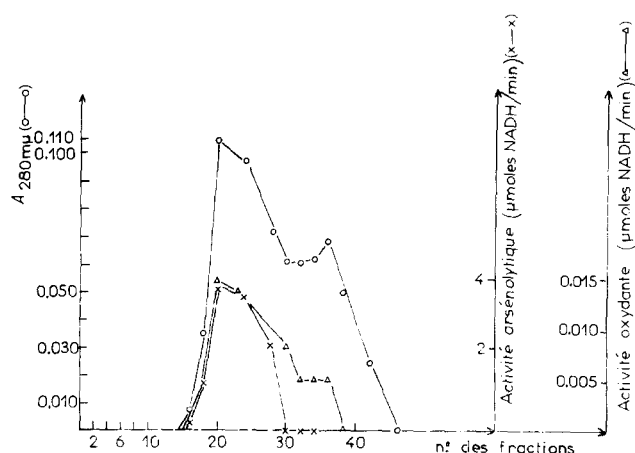


Fig. 5. Gradient de sédimentation. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase a été protéolysée jusqu'à 30% d'activité phosphorylante et 70% d'activité oxydante résiduelles. Le gradient entre 5 et 20% de saccharose a lieu dans un tampon triéthanol amine 0.05 M-EDTA 0.001 M-NAD⁺ 0.8 mM (pH 7.9). ○—○, A; ×—×, activité arsénolytique; △—△, activité oxydante.

de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase native (Fig. 5). Un essai de gradient préparatif n'a pas permis de séparer suffisamment ces deux fractions pour pouvoir les étudier séparément.

Chromatographie sur colonne de Séphadex G-100

Fig. 6 montre la séparation de trois constituants de haut poids moléculaire sur une colonne de Séphadex G-100, après protéolyse. Le déplacement chromatographique du Pic A est identique à celui de l'enzyme natif; le poids moléculaire apparent du Pic B est compris entre 60 000 et 70 000 comme le montre Fig. 7. On identifie le Pic C à la chymotrypsine, par son déplacement chromatographique. Il ne possède plus d'activité hydrolytique à l'égard de l'ATEE. Le Pic D qui représente les peptides de petit poids moléculaire, n'a pas été analysé.

Propriétés enzymatiques du Pic A

Les propriétés enzymatiques du Pic A ont été comparées à celles d'une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase passée sur colonne de Séphadex G-100 dans les mêmes conditions d'élution. Il a la même activité spécifique que l'enzyme natif (Fig. 8), et par rapport à la quantité de protéines déposées sur la colonne, le pourcentage d'activité arsénolytique résiduelle est égal au pourcentage du Pic A en protéines. Le NADH inhibe la réaction d'arsénolyse de la même façon que dans l'enzyme natif²³. Ce pic, qualitativement et quantitativement, possède toutes les propriétés de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase native.

Propriétés enzymatiques du Pic B

Le Pic B a perdu la presque totalité des activités arsénolytique et phosphorylante; mais il a conservé une activité oxydante de l'ordre de 30–35% de celle de l'enzyme natif (Fig. 8). Pour le Pic B, la vitesse de la réaction d'oxydation est constante pendant toute la durée du test enzymatique; dans le cas de l'enzyme natif au contraire,

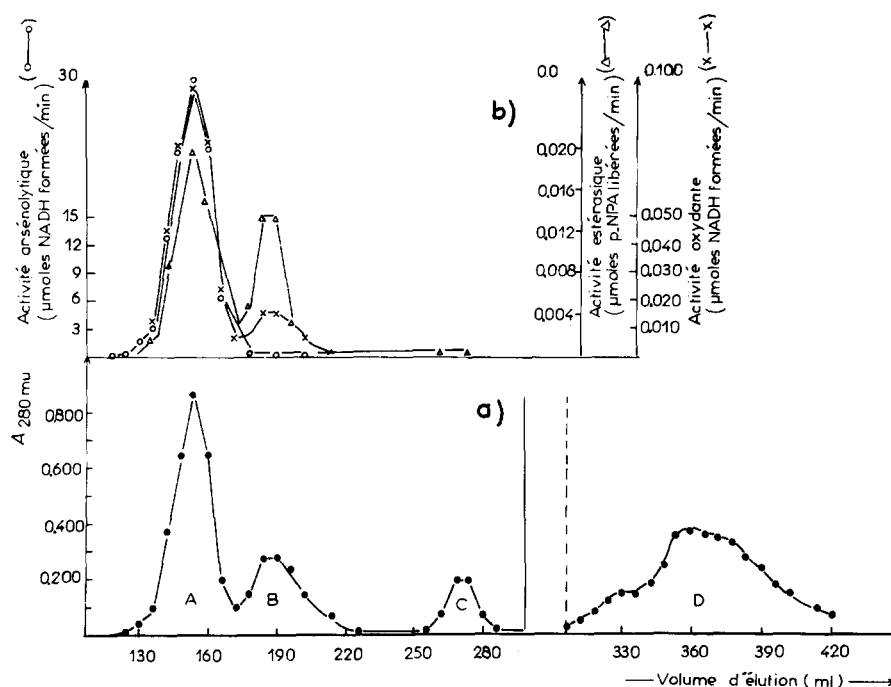


Fig. 6. Séparation des fractions issues de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase pendant la protéolyse, sur colonne de Séphadex G-100. Les conditions de la protéolyse sont les mêmes que dans Fig. 5. ●—●, $A_{280 \text{ m}\mu}$; ○—○, activité arsénolytique; ×—×, activité oxydante; △—△, activité estérasiq. (*p*-NPA, *p*-nitrophénylacétate). (a) représente le profil d'élution de la colonne suivi à 280 $\text{m}\mu$. (b) représente les activités enzymatiques testées au cours de la chromatographie, exprimées en unités totales par ml présentes dans chaque fraction.

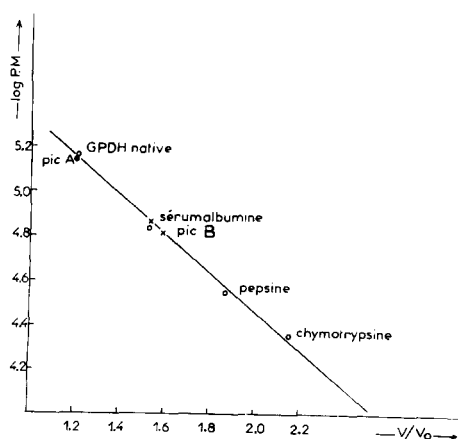


Fig. 7. Détermination du poids moléculaire des Pics A et B sur colonne de Séphadex G-100. (GPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) ○, protéines témoins; ●, Pic A; ×, Pic B.

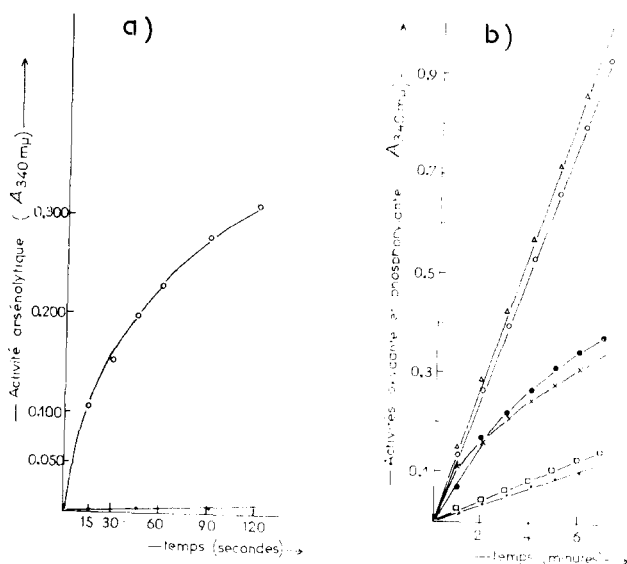


Fig. 8. Activités enzymatiques des Pics A et B isolés sur colonne. (a) représente l'activité arsénolytique du Pic B et de l'enzyme natif: $\bullet-\bullet$, arsénolyse Pic B; $\circ-\circ$, enzyme natif. Conditions des tests: cf. Fig. 1. (b) montre l'activité oxydante en absence et en présence de P_i de l'enzyme natif, du Pic A et du Pic B. $\bullet-\bullet$, oxydation E natif; $\times-\times$, Pic A; $\cdot-\cdot$, Pic B. Oxydation en présence de P_i : $\triangle-\triangle$, E natif; $\circ-\circ$, Pic A; $\square-\square$, Pic B. On utilise 100 μg d'enzyme/ml de test oxydant.

on observe une vitesse initiale très rapide, puis une seconde étape au cours de laquelle la vitesse de réaction est lente; la désacylation du complexe ternaire est l'étape limitante de la réaction.

Le pic oxydant a également conservé une activité estérasique dont la valeur par mg de protéines est plus élevée que celle du Pic A; il n'hydrolyse pas l'ATEE, son activité ne peut être attribuée à la présence de chymotrypsine.

Stabilité des Pics A et B

Lorsque la colonne est éluée par un tampon sans NAD^+ , le Pic A ne subit aucune dénaturation; il conserve la même activité spécifique que l'enzyme natif; le rapport $280 \text{ m}\mu/260 \text{ m}\mu$ varie entre 1.10 et 1.20, ce qui montre qu'il a toujours une forte affinité pour son coenzyme. Le Pic B au contraire retient peu le NAD^+ puisque le rapport $280 \text{ m}\mu/260 \text{ m}\mu$ est de 1.45; le pourcentage de Pic B à la sortie de la colonne, est beaucoup plus faible que si l'élué a été faite avec un tampon contenant NAD^+ 0.8 mM.

Le Pic A placé à 4° pendant 7 jours dans son tampon d'élué en présence de NAD^+ 0.8 mM conserve toute son activité enzymatique; le Pic B dans les mêmes conditions la perd entièrement en 3 jours.

La Fraction B perd totalement son activité après une dialyse contre un tampon Tris ou triéthanol amine (pH 7.9) ou à la suite d'une précipitation par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Au contraire, elle la conserve totalement au cours d'une concentration par dialyse contre le saccharose de 1-2 h, mais n'est pas stabilisée, car son activité décroît par la suite à la même vitesse que lorsqu'elle se trouve dans son tampon d'élué.

La rechromatographie du Pic A sur Séphadex G-100 n'influe ni sur son activité,

ni sur son déplacement qui sont toujours ceux de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase native. Le Pic B au contraire est complètement dénaturé au cours d'une rechromatographie.

Dosage des groupements sulfhydriles sur les Pics A et B

Dans l'enzyme natif, on dose en 3 min 3.2 équiv de SH par mole de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, on en dose 10.4 dans le Pic A. Dans le Pic B, on dose 8 équiv de SH par mole d'enzyme modifié en 3 min en prenant comme référence un poids moléculaire de 70 000.

Spectre de fluorescence du Pic B

Pour une excitation à 290 m μ la bande de fluorescence du Pic B caractéristique du tryptophane se trouve déplacée de 15 m μ vers les grandes longueurs d'onde (Fig. 9).

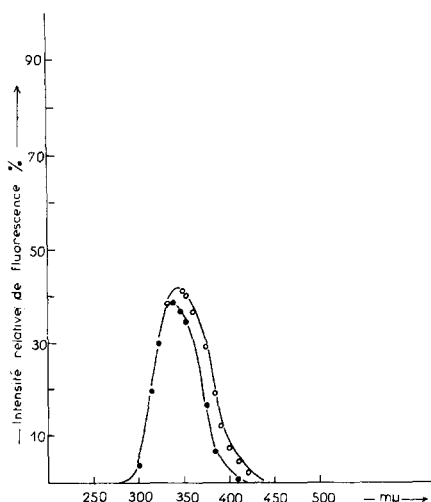


Fig. 9. Spectre de fluorescence caractéristique du tryptophane dans le Pic B (○—○) et dans l'enzyme natif (●—●). L'excitation est faite à 290 m μ , la concentration en glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase est de 8.5 μ g/ml. L'enzyme est placé dans un tampon triéthanol amine 0.05 M-EDTA 0.001 M (pH 7.9).

Ce déplacement indique une exposition des résidus tryptophanes beaucoup plus grande que dans l'enzyme natif. On observe aussi un tel déplacement au cours de la protéolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

DISCUSSION

Ces résultats mettent en évidence la formation d'une fraction oxydante pendant la protéolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, comme l'avaient déjà montré KRIMSKY ET RACKER². Son poids moléculaire est compris entre 60 000 et 70 000; le nombre de SH par mole de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase modifiée est compris entre 8 et 9; elle a peu d'affinité pour le NAD⁺; ses résidus tryptophanes sont beaucoup plus exposés que ceux de la glycéraldéhyde-3-phosphate dés-

hydrogénase native. Ceci laisse prévoir qu'il s'est produit une modification de la conformation de l'enzyme pendant la protéolyse.

L'activité oxydante de cette fraction n'est plus augmentée en présence de P_i ; sa vitesse de réaction est constante; la désacylation de l'enzyme n'est pas un facteur limitant, tandis que dans le cas de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase native la vitesse de réaction est limitée par la désacylation; cela est sans doute dû à la disparition de l'effet inhibiteur du NADH, phénomène déjà observé dans le protéolysat brut par KRIMSKY ET RACKER².

Il n'a pas été possible de mesurer l'activité estérasique de la fraction oxydante en absence de NAD^+ du fait de son instabilité. Toutefois, le Pic B, qui a conservé seulement 30-35 % d'activité oxydante résiduelle possède une activité estérasique par mg de protéines 2 fois plus importante que celle du Pic A, lorsque l'essai enzymatique a lieu en présence de NAD^+ ; peut-être est-elle moins sensible aux modifications de conformation intervenues pendant la protéolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase que l'activité oxydante. Mais il est plus vraisemblable de penser que la fraction oxydante n'est plus inhibée par la présence de NAD^+ parce que son affinité pour le coenzyme est très faible; l'activité estérasique de l'enzyme natif dans les mêmes conditions d'expériences est inhibée par le NAD^+ . MATHEW, MERIWETHER ET PARK²⁵ avaient interprété cette inhibition par un encombrement stérique rendant plus difficile l'approche du site actif par le substrat.

L'activité phosphatasique et la formation de NADH-X n'ont pas été suivies dans la fraction oxydante, parce que le premier essai exige de fortes concentrations d'enzyme, et que l'autre ne peut avoir lieu en présence de NAD^+ 0.8 mM.

La chute de l'activité phosphatasique pendant la protéolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase suit la même cinétique que la diminution de l'activité oxydante.

OLSON ET PARK²⁴, puis MATHEW, MERIWETHER ET PARK²⁵, ont étudié les activités hydrolytiques (estérasique et phosphatasique) de l'enzyme natif; ils ont été conduits à faire l'hypothèse que ces activités utilisent le même site que l'oxydation. Nos résultats sont en plein accord avec leurs données en particulier en ce qui concerne l'hydrolyse du *p*-nitrophénylacétate qui a toujours lieu dans la fraction oxydante.

L'activité NADH-X qui persiste également dans le protéolysat brut a déjà été étudiée sur la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase native par HILVERS, WEENEN ET VAN DAM⁶; ils font intervenir dans le mécanisme de réaction qu'ils proposent un site capable de fixer P_i . On aurait pu s'attendre dans ces conditions à voir l'activité NADH-X suivre la cinétique de l'activité phosphorylante, or elle suit celle de l'activité oxydante. Il se peut que le site de fixation de P_i sur la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase modifiée soit toujours présent mais ne puisse jouer son rôle de site de transfert de P_i sur le substrat à cause des modifications dans la conformation de la protéine.

En conclusion, l'intérêt essentiel de l'hydrolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase par la chymotrypsine est sa sélectivité qui permet de séparer en deux groupes ses fonctions catalytiques; les propriétés phosphorylante et arsénolytique disparaissent rapidement, les autres propriétés en revanche sont beaucoup plus stables. Cela démontre que les sites actifs des fonctions hydrolytiques et NADH-X de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase doivent être proches ou se situer sur le centre actif de l'activité oxydante.

Nous étudions actuellement différentes méthodes permettant d'obtenir la fraction oxydante en plus grandes quantités, de façon à déterminer ses constantes cinétiques et sa structure chimique.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué grâce à des subventions de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique (Contrat No. 67 000 676) et du C.N.R.S.

Nous remercions vivement le Prof. H. CLAUSER d'avoir bien voulu faire l'analyse critique du manuscrit, le Prof. J. TONNELAT ainsi que Mlle J. YON, Directeur de Recherches au C.N.R.S., d'avoir mis à notre disposition une ultracentrifugeuse Spinco et un spectrofluoromètre Aminco-Bowman, et Mlle A. BARNEOUD d'avoir eu l'amabilité de réaliser les ultracentrifugations analytiques.

RÉSUMÉ

Une protéolyse ménagée de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de muscle de lapin (D-glycéraldéhyde-3-phosphate: NAD⁺ oxydoréductase (phosphorylante) EC 1.2.1.12) par l' α -chymotrypsine (EC 3.4.4.5) provoque une perte préférentielle de ses activités phosphorylante et arsénolytique. Mais l'activité oxydante persiste. En plus de ses propriétés déshydrogénases, l'enzyme natif possède de nombreuses autres fonctions catalytiques telles que les activités phosphatase et estérolitique ainsi que la formation de NADH-X.

Au cours de ce travail, nous avons observé que pendant la disparition des activités phosphorylante et arsénolytique, les propriétés estérasique, phosphatase et NADH-X sont beaucoup plus stables et se maintiennent au même niveau que l'oxydation.

Nous avons pu séparer deux pics actifs en passant l'enzyme protéolysé sur une colonne de Séphadex G-100. Le Pic A possédait les mêmes propriétés chromatographiques et enzymatiques que l'enzyme natif. Le Pic B a conservé les activités oxydantes et estérasiques, mais a perdu les activités arsénolytiques et phosphorylantes. Le volume d'élution a permis de déterminer pour ce pic un poids moléculaire de 60 000 à 70 000.

Le spectre de fluorescence de la Fraction B possède un maximum à 350 m μ pour une excitation à 290 m μ , ce qui représente un déplacement du maximum de 15 m μ vers le visible vis-à-vis de l'enzyme natif.

L'activité du Pic B était beaucoup plus stable en présence de NAD⁺ en forte concentration qu'en absence du coenzyme. L'activité estérasique n'était plus inhibée par le NAD⁺; le NADH n'avait plus d'effet limitant sur la vitesse d'oxydation.

Ces données confirment les études cinétiques faites avec l'enzyme natif qui localisaient les activités estérasique et oxydante sur le même site. En outre nos résultats enzymatiques sur le protéolysat brut permettent de penser que l'activité phosphatasique et la formation de NADH-X ont lieu près ou sur le site des deux activités citées précédemment.

RÉFÉRENCES

- 1 E. RACKER, *Physiol. Rev.*, 35 (1955) 1.
- 2 I. KRIMSKY ET E. RACKER, *Biochemistry*, 2 (1963) 512.
- 3 J. H. PARK ET S. F. VELICK, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 857.
- 4 J. H. PARK ET S. F. VELICK, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 867.
(1961) 136.
- 5 J. H. PARK, B. P. MERIWETHER, P. CLODFELDER ET L. W. CUNNINGHAM, *J. Biol. Chem.*, 230
(1961) 136.
- 6 A. G. HILVERS, J. N. M. WEENEN ET K. VAN DAM, *Biochim. Biophys. Acta*, 128 (1966) 74.
- 7 S. P. COLOWICK, J. VAN-EYS ET J. H. PARK, in M. FLORKIN ET E. H. STOTZ, *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 14, Elsevier, Amsterdam, 1965, p. 1.
- 8 J. I. HARRIS, B. P. MERIWETHER ET J. H. PARK, *Nature*, 198 (1963) 154.
- 9 P. S. FITT ET E. A. FITT, *Biochem. J.*, 105 (1967) 25.
- 10 G. T. CORI, M. W. SLEIN ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 605.
- 11 J. F. TAYLOR, A. A. GREEN ET G. T. CORI, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 591.
- 12 G. BEISENHERZ, T. BUCHER ET K. H. GARBADE, in S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 391.
- 13 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 14 W. S. ALLISON ET N. O. KAPLAN, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2140.
- 15 G. L. ELLMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 (1959) 70.
- 16 P. H. W. BUTTERWORTH, H. BAUM ET S. W. PORTER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 118 (1967) 710.
- 17 S. MOORE ET W. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- 18 F. LIPMANN ET L. C. TUTTLE, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 21.
- 19 J. B. FOX ET W. B. DANDLIKER, *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 1005.
- 20 G. T. SCHWERT ET Y. TAKENAKA, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 570.
- 21 J. R. WITHAKER, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 1950.
- 22 W. F. HARRINGTON ET G. M. KARR, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 885.
- 23 C. S. FURFINE ET S. F. VELICK, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 844.
- 24 E. J. OLSON ET J. H. PARK, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2310.
- 25 E. MATHEW, B. P. MERIWETHER ET J. H. PARK, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 5024.

Biochim. Biophys. Acta, 467 (1968) 511-524