

BBA 63356

### Données physiques comparées sur les anhydrases carboniques érythrocytaires humaines A et B

Des trois formes enzymatiques A, B et C de l'anhydrase carbonique (EC 4.2.1.1) érythrocytaire humaine, la forme A est la seule sur laquelle aucune constante physique n'a actuellement encore été déterminée. Nous avons entrepris de combler cette lacune, et la présente note a pour objet de confronter les résultats de ces recherches à ceux antérieurement obtenus sur la forme B au cours d'une étude hydrodynamique comparée des anhydrases carboniques B et C (réfs. 1, 2) (respectivement désignées par X<sub>1</sub> et Y dans réf. 1).

Les deux enzymes préparés selon la technique de LAURENT *et al.*<sup>3</sup> se sont révélés être pratiquement homogènes à l'ultracentrifugation. Le solvant utilisé au cours de ces déterminations est un mélange tampon de phosphates mono- et dipotassique (pH 6.5,  $I = 0.2$ ).

L'ensemble des constantes physiques de ces deux enzymes est rapporté sur le Tableau I.

TABLEAU I

CONSTANTES PHYSIQUES

Système c.g.s.

	Enzyme A	Enzyme B
<i>Masse moléculaire</i>		
Constante de diffusion, $D_{20,w}^0$	$9.8 \cdot 10^{-7}$	$10.7 \cdot 10^{-7}$
Constante de sédimentation, $s_{20,w}^0$	$3.12 \cdot 10^{-13}$	$3.23 \cdot 10^{-13}$
Volume spécifique partiel (amino-acides), $\bar{v}$	0.725	0.727
Masse moléculaire ( $s, D$ )	$29.0 \cdot 10^3$	$29.6 \cdot 10^3$
Masse moléculaire ( $s/D$ ; Svedberg)	$29.5 \cdot 10^3$	$29.1 \cdot 10^3$
Masse moléculaire ( $s/D$ ; Archibald)	$32.5 \cdot 10^3$	$34.7 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^3$
Masse moléculaire ( $s, [\eta]$ ; MANDELKERN ET FLORY)	$27.7 \cdot 10^3$	$29.8 \cdot 10^3$
<i>Hydratation</i>		
Volume spécifique partiel hydraté (saccharose), $\bar{v}^*$	0.790	0.810
Eau d'hydratation (g/g), $w$	0.295	0.368
Degré d'hydratation (vol. %)	28.8	33.2
Degré d'hydratation (poids %)	22.8	26.9
Facteur d'hydratation, $1 + w/\bar{v}_0$	1.40	1.50
<i>Forme et dimensions</i>		
Viscosité intrinsèque, 100 $[\eta]$	3.65	2.74
Incrément de viscosité, $v'$	5.0	3.7
Rapport axial, $a/b$ ( $v'$ )	2.9	1.0 (environ)
Volume anhydre ( $\text{\AA}^3$ )	$35.7 \cdot 10^3$	$36.4 \cdot 10^3$
Volume hydraté ( $\text{\AA}^3$ )	$49.9 \cdot 10^3$	$54.5 \cdot 10^3$
Diamètre équatorial ( $\text{\AA}$ ) (état hydraté)	32.0	47.0
Axe de révolution ( $\text{\AA}$ ) (état hydraté)	92.9	47.0
<i>Données optiques</i> <sup>†</sup>		
Incrément de réfraction spécifique $\text{PO}_4^{3-}$ ; $I = 0.2$ ; pH 6.5	436 m $\mu$	$1.94 \cdot 10^{-3}$
	546 m $\mu$	$1.87 \cdot 10^{-3}$
	589 m $\mu$	$1.85 \cdot 10^{-3}$

<sup>†</sup> Etablies d'après le coefficient d'azote Kjeldahl de 16.9 indiqué par NYMAN<sup>4</sup>.

Il apparaît que la constante de diffusion de la forme A n'est que légèrement inférieure à celle de la forme B. Si l'on tient compte de la marge d'erreur de  $\pm 0.5 \cdot 10^{-7}$  inhérente à la méthode "hauteur-surface" utilisée pour ces déterminations, cette différence paraît significative.

De nombreuses mesures de  $s_{20, \text{sol.}}$  effectuées à diverses concentrations protéiques permettent de tenir compte de la faible différence relevée entre les  $s_{20, w}^0$  des deux enzymes.

Par contre, les volumes spécifiques partiels  $\bar{v}$  déterminés à partir d'une composition en amino-acides pratiquement identique pour les deux enzymes<sup>5</sup> doivent être considérés comme très voisins.

La valeur du volume spécifique partiel hydraté  $\bar{v}^*$  déterminé par la méthode des gradients de saccharose<sup>6</sup> se révèle être légèrement plus faible pour l'enzyme A. Rapportée à celle du volume spécifique partiel anhydre  $\bar{v}$ , la valeur de  $\bar{v}^*$  permet d'en déduire une teneur en eau d'hydratation  $w$  plus faible pour l'enzyme A.

Les masses moléculaires calculées successivement à partir de l'équation de Svedberg ( $s, D$ ), de l'équilibre de sédimentation vrai ( $s/D$ ; Svedberg) et de la viscosité intrinsèque au moyen de l'équation de MANDELKERN ET FLORY<sup>7</sup> ( $s, [\eta]$ ) sont pratiquement identiques; seules les masses calculées par équilibre approché de sédimentation d'Archibald ( $s/D$ ; Archibald) accusent des valeurs sensiblement plus élevées, mais néanmoins très voisines pour l'un et l'autre enzyme.

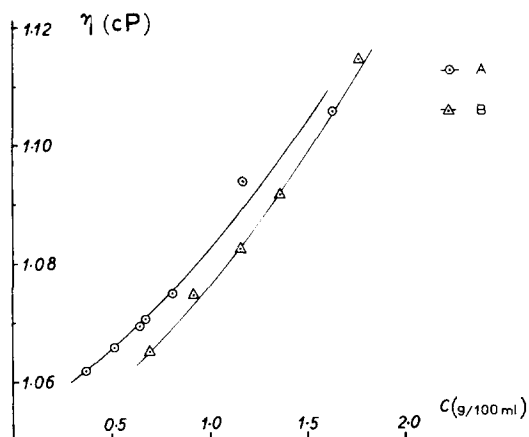


Fig. 1. Viscosités dynamiques comparées des enzymes A et B.

La Fig. 1 met en évidence, à une concentration donnée, une augmentation sensible de la viscosité dynamique  $\eta$  de l'enzyme A par rapport à celle de l'enzyme B. De ce fait, la viscosité réduite ( $\eta/\eta_{\text{sol.}}$ ) ( $1/c$ ), fonction linéaire de la concentration  $c$ , extrapolée à concentration nulle par la méthode des moindres carrés, se traduit par une valeur de la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  de 3.65 pour l'enzyme A alors qu'elle n'est que de 2.74 pour l'enzyme B (réf. 1). Cette dernière valeur a été confirmée par la valeur de 2.76 publiée par ARMSTRONG *et al.*<sup>8</sup>. La valeur de 3.65 permet de conclure à la forme ellipsoïdale de la molécule de A alors que la valeur exceptionnellement basse de 2.74 n'est compatible qu'avec la sphéricité de la molécule de B.

Les fonctions  $\beta_D$  et  $\beta_s$  de SCHERAGA ET MANDELKERN<sup>9</sup> permettent d'attribuer à la molécule A la forme d'un ellipsoïde de révolution allongé équivalent. Le rapport axial, égal à 2.9, a été déterminé à partir de l'abaque classique d'Oncley faisant intervenir la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  et la quantité d'eau d'hydratation  $w$ .

Le fait essentiel mis en évidence par la comparaison de ces constantes physiques est la très importante différence de forme, mais non de masse moléculaire, des enzymes A et B. Ces derniers, qui n'avaient pu être distingués jusqu'ici que par la charge nette de leur molécule, s'apparentent si étroitement par leur teneur en zinc, leur activité enzymatique spécifique, leur composition en amino-acides, leurs "finger-prints" tryptiques et chymotryptiques, leurs propriétés antigéniques et leurs extrémités N- et C-terminales que l'identité de leur structure primaire a été considérée comme très probable<sup>10</sup>. Dès lors, la différence de charge nette des molécules des types A et B pouvait résulter soit de la perte dans A de certains groupements amide de B, soit de différences dans la structure tridimensionnelle de ces deux enzymes. La première de ces deux hypothèses paraît être infirmée par NYMAN ET LINDSKOG<sup>4</sup>. La seconde est compatible avec les résultats de notre travail.

Si l'on tient compte, par ailleurs, du fait qu'à pH 12.7 l'anhydrase carbonique B se transforme partiellement en A (réf. 11) ces deux formes enzymatiques semblent devoir être considérées comme des "conformers", selon la signification que KITTO, WASSARMAN ET KAPLAN<sup>12</sup> ont donnée à ce terme.

Laboratoire de Chimie biologique,  
Faculté de Médecine et de Pharmacie,  
Marseille (France)

J. REYNAUD  
PH. SANTINI  
M. BOUTHIER  
J. SAVARY  
Y. DERRIEN

- 1 J. REYNAUD, G. RAMETTA, J. SAVARY ET Y. DERRIEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 77 (1963) 521.
- 2 J. REYNAUD, J. SAVARY ET Y. DERRIEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 1125.
- 3 G. LAURENT, M. CHARREL, F. LUCCIONI, M. F. AUTRAN ET Y. DERRIEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 1101.
- 4 P. O. NYMAN ET S. LINDSKOG, *Biochim. Biophys. Acta*, 85 (1964) 141.
- 5 G. LAURENT, M. CHARREL, C. MARRIQ, D. GARÇON ET Y. DERRIEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 1125.
- 6 M. A. LAUFFER ET I. J. BENDET, *Advan. Virus Res.*, 2 (1954) 241.
- 7 L. MANDELKERN ET P. J. FLORY, *J. Chem. Phys.*, 20 (1952) 212.
- 8 J. McD. ARMSTRONG, D. V. MYERS, J. A. VERPOORTE ET J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 5137.
- 9 H. A. SCHERAGA ET L. MANDELKERN, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 179.
- 10 G. LAURENT, D. GARÇON, M. CHARREL, L. A. ARDOINO ET Y. DERRIEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 49 (1967) 1021.
- 11 G. LAURENT, M. CHARREL, D. GARÇON, M. CASTAY, C. MARRIQ ET Y. DERRIEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 603.
- 12 G. B. KITTO, P. M. WASSARMAN ET N. O. KAPLAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 56 (1966) 578.

Received October 21st, 1968