

BBA 63454

Purification de la phosphoglycérate kinase de cerveau de mouton

La phosphoglycérate kinase (ATP:3-phospho-D-glycérate 1-phosphotransférase, EC 2.7.2.3) a été purifiée et cristallisée pour la première fois par BÜCHER¹ à partir de la levure. Ensuite AXELROD ET BANDURSKI² l'ont purifiée partiellement des graines de pois. Celle du muscle de lapin l'a été par BUBE *et al.*³ tandis que celle des hématies humaines fut isolée et cristallisée par HASHIMOTO ET YOSHIKAWA⁴. Peu après GOSSELIN-REV⁵ mit en évidence les propriétés de cet enzyme après l'avoir isolé des muscles de bréchet de poule.

La phosphoglycérate kinase a été considérée comme un enzyme régulateur de la glycolyse⁷. Il nous a donc paru utile de la purifier à partir du cerveau de mouton, ce travail à notre connaissance n'ayant pas été effectué. Nous nous sommes inspirés pour cette purification de procédés combinés de travaux ci-dessus⁴⁻⁶. Les opérations sont effectuées à 2°. Le cerveau est coupé en dés, puis homogénéisé avec un piston en Téflon, rotatif, dans un tampon contenant du pyrophosphate de sodium 40 mM et de l'EDTA 5 mM (pH 7). Les particules et les membranes cellulaires sont centrifugées à 100 000 × g avec le Rotor A.147 sur centrifugeuse IEC Type B60. Le surnageant est recueilli et soumis à des précipitations successives de 20 min au (NH₄)₂SO₄ soit à 50%, 65%, 70%, 90% de saturation. La séparation des précipités d'avec les sursauts est effectuée à 25 000 × g (Rotor I.E.C. A.147).

L'activité enzymatique est dosée dans chaque surnageant et dans chaque précipité après que ceux-ci aient été dialysés contre du pyrophosphate de sodium 1 mM et de l'EDTA 1 mM (pH 7). Le précipité obtenu à 90% de saturation et repris par la solution précédente est lyophilisé après dialyse sans qu'il perde d'activité notable. Il est repris par 2 ml de tampon de dialyse juste avant d'être déposé sur une résine de CM-cellulose préalablement équilibrée avec ce même tampon, dans une colonne de type Séphadex (1.7 cm × 30 cm). L'élution est faite avec un tampon en gradient linéaire de concentrations: 1 à 200 mM de pyrophosphate de sodium et 1 à 4 mM d'EDTA (pH 6.2). L'éluat correspondant à l'activité enzymatique est dialysé, lyophilisé avant d'être déposé sur une résine de DEAE-Sephadex A-50, puis élut avec le même éluant et le même gradient de concentration que pour la chromatographie sur CM-cellulose, mais à pH 8.

La méthode de dosage de BÜCHER¹ est utilisée, soit à 340 nm et à 25°: NADH 107.5 μM, 3-phosphoglycérate 1.5 mM, ATP de sodium neutralisé 0.15 mM, MgSO₄ 0.5 mM, tampon triéthanolamine-HCl 37.5 mM (pH 7.4). La réaction est initiée par 50 μg de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12) (Sigma) préalablement débarrassée de son (NH₄)₂SO₄ par centrifugation et reprise par du pyrophosphate de sodium 17 mM (pH 7.55) et du GSH 0.2 μM pour 0.5 mg d'enzyme. La vitesse initiale de la réaction est déterminée par la pente à l'origine. Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY *et al.*⁸. Une unité d'activité est définie comme 1 μmole de 3-phosphoglycérate transformée par ml de solution à doser et par min. La purification est calculée à partir des protéines solubles du cytoplasme (surnageant 0%) obtenues après centrifugation. L'activité maximale est obtenue au dernier stage de purification dans un petit pic de protéines inabsorbées par le DEAE-Sephadex à pH 8 (Fig. 1) soit

TABLEAU I

PURIFICATION DE LA PHOSPHOGLYCÉRATE KINASE DE CERVEAU DE MOUTON

Satn. en $(NH_4)_2SO_4$ (%)	Surnageant Ppt.	Protéines (mg)	Activité (μmoles de phospho- glycérate par ml par min) (unités)	Activité spécifique (unités/ mg de protéines)	Rapport de purifi- cation	Rendement (%)
0		1200*	600	0.5	1	
55		126	378	3	6	
65		100		5.9	11.8	
	65	12		0.75		
70		30	270	9	18	45
	70	66		0.25		
90		4		3		
	90	24	188	7	14	28

Suite de la purification par deux chromatographies:

CM-cellulose (pH 6.2)	0.84	13.8**	16.5	33	2.3
	7.5	51***	6.8	13.6	8.5
DEAE-Sephadex A-50 (pH 8)	0.18	58.5***,§	325	650	9.75
	0.69	117.3***,§§	170	340	18.6

* Protéines du surnageant obtenu à partir d'un cerveau de mouton.

** Activité maximale en sommet de pic.

*** Activité totale du pic.

§ Fraction 10 (Fig. 1).

§§ Fractions 7-13.

325 unités/mg de protéines (activité spécifique) avec un taux de purification de 650 (voir résultats généraux, Tableau I).

Cette activité spécifique serait supérieure à celle de travaux précédents⁴⁻⁶ et le

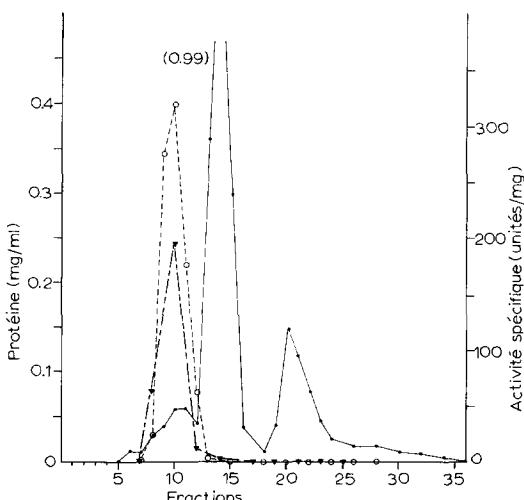


Fig. 1. Séparation de la phosphoglycérate kinase de cerveau de mouton par chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 à partir de l'éluat de chromatographie sur CM-cellulose. ○—○, ○, activité spécifique; ●—●, protéines; ▼—▼, unités d'activité.

degré de purification serait identique^{5,6} ou très supérieur⁴ à ceux qui ont déjà été obtenus. La phosphoglycérate kinase de cerveau de mouton se comporte de la même manière que celle des muscles du bréchet de poule quant à sa précipitation par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. D'autre part, elle présente des propriétés identiques à celles de la phosphoglycérate kinase d'hématies humaines⁴. Adsorbée par le CM-cellulose au niveau initial du second pic de protéines (contenant notamment de l'hémoglobine), elle est inadSORBÉE par le DEAE-Sephadex. Cette résine a donc la propriété de la séparer de protéines, dont celles contenant l'hémoglobine.

La pureté de la phosphoglycérate kinase a été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide⁹ à pH 4.5 et 8.6. Une bande majeure et quatre bandes très mineures montrent que la protéine enzymatique n'est pas absolument pure et est accompagnée de traces d'enzymes^{5,6}. Sa faible migration à pH 4.5 et son absence de migration à pH 8.6 d'une part, son adsorption sur CM-cellulose à pH 6.2 et son inadSORption à pH 8 sur DEAE-Sephadex d'autre part, laissent penser que cette protéine est basique. La forte saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (90%) nécessaire à sa précipitation la classe comme une protéine polaire.

*Laboratoire de Chimie des Protéines, Faculté de Médecine,
Sherbrooke, Province du Québec (Canada)*

Y. LELIÈVRE

- 1 TH. BÜCHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 232.
- 2 B. AXELROD ET R. S. BANDURSKI, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 939.
- 3 BUBE *et al.*, dans R. CZOK ET TH. BUCHER, *Advan. Protein Chem.*, 15 (1960) 315.
- 4 T. HASHIMOTO ET H. YOSHIKAWA, *J. Biol. Chem.*, 56 (1964) 279.
- 5 C. GOSSÉLIN-REY, *Biochim. Biophys. Acta*, 67 (1963) 140.
- 6 C. GOSSÉLIN-REY, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 73 (1965) 313.
- 7 S. A. NEIFAKH, J. A. AVRAMOV, V. S. GAITSKHOKL, T. B. KAZAKOVA, N. K. MONAKHOV, V. S. REPIN, V. S. TUROVSKI ET I. M. VASSILETZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 100 (1965) 329.
- 8 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARRAND ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 9 R. A. REISFELD, U. J. LEWIS ET D. E. WILLIAMS, *Nature*, 21 (1962) 281.

Reçu le 13 janvier, 1970

Biochim. Biophys. Acta, 206 (1970) 187-189