

BBA 66633

ISOLEMENT A PARTIR DE LA D-AMINOACIDE OXYDASE DE PEPTIDES
CONTENANT DES RESIDUS DE LYSINE PARTICULIEREMENT REACTIFS

J. MIZON, K. K. HAN, M. DAUTREVAUX ET G. BISERTE

Unité de Recherches No. 16 de l'I.N.S.E.R.M. sur la Biochimie des Protéines et Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine (Equipe de Recherche Associée au C.N.R.S. No. 32), Lille (France)

(Reçu le 31 janvier, 1972)

SUMMARY

When D-amino acid oxidase (D-amino acid:O₂ oxidoreductase (deaminating), EC 1.4.3.3) is treated with NaBH₄ during the enzymatic reaction, the carbon moiety resulting from the deamination of the substrate is bound to the ε-NH₂ of lysine residues of the enzyme.

The isolation of several peptides containing these "reactive" lysine residues is described. Their characteristics are discussed, regarding the possible role of a particular lysine residue in the enzymatic process.

INTRODUCTION

La D-aminoacide oxydase du rein de porc (EC 1.4.3.3) présente le double avantage de pouvoir être préparée de façon relativement aisée¹, grâce au rôle stabilisateur du benzoate mis en évidence par Kubo *et al.*², et de posséder une activité enzymatique élevée facile à évaluer. En dépit du grand nombre d'études auxquelles a donné lieu cette flavoprotéine, la plupart des problèmes posés par son mécanisme d'action restent encore non résolus: comme le signale une revue récente de Neims et Hellerman³, son rôle biologique est encore inconnu, son mécanisme d'action et la nature de son site actif encore imprécis; en effet, à côté des groupes thiol⁴, ont été considérés comme participant directement à l'activité enzymatique: un résidu de lysine⁵, un résidu d'arginine⁶, un résidu d'histidine^{7,8}, un groupe chargé négativement et un site hydrophobe⁹.

L'implication d'un résidu de lysine dans le site actif de la D-aminoacide oxydase repose surtout sur les observations de Coffey *et al.*¹⁰: par action du NaBH₄ sur le mélange réactionnel constitué par la D-aminoacide oxydase et la D-[1-¹⁴C]alanine comme substrat, ces auteurs ont obtenu une protéine marquée, un équivalent de substrat au maximum étant fixé par équivalent de flavine-adénine-dinucléotide lié à l'enzyme; la participation d'un résidu de lysine au site actif de l'enzyme rend compte de l'apparition de ε-N-(1-carboxyéthyl)-L-lysine dans les hydrolysats acides totaux de l'enzyme marqué: ce dérivé de la lysine provient de la réduction par le

NaBH_4 de la base de Schiff formée par action de l'acide pyruvique (produit de la désamination oxydative de l'alanine) sur le groupe $\varepsilon\text{-NH}_2$ d'un résidu de lysine⁵. Bien qu'il ait été démontré plus tard que l'enzyme ainsi modifié gardait son activité¹¹, il ne faisait pas de doute que le résidu de lysine impliqué dans cette liaison présentait une réactivité particulière, que l'on pouvait supposer liée à l'activité catalytique de l'enzyme: c'est ce qui nous a conduits à effectuer la préparation de la D-aminoacide oxydase pure¹², à la marquer par la méthode de Coffey *et al.*¹⁰, à l'hydrolyser par des endopeptidases et à isoler les peptides radioactifs contenant le résidu de lysine réactive.

La séquence des aminoacides de l'un de ces peptides a déjà été déterminée entièrement¹³ et correspond à l'enchaînement: Asp-Val-Val-carboxyéthyl-Lys-Tyr (carboxyéthyl-Lys = $\varepsilon\text{-N-1-carboxyéthyl-L-lysine}$).

Dans le présent mémoire, nous rapportons l'isolement et l'étude d'autres fragments peptidiques contenant de la carboxyéthyl-lysine radioactive; la comparaison de leurs compositions et de leurs séquences démontre l'existence de plusieurs résidus de lysine réactive au sein de la D-aminoacide oxydase, ce qui met en doute la spécificité du marquage du site actif par le borohydrure en présence de D-alanine.

MATERIEL ET METHODES

La D-aminoacide oxydase est préparée selon la méthode de Brumby et Massey¹, puis purifiée par chromatographie ascendante sur colonne de Sephadex G-200¹². Le traitement de l'enzyme par le NaBH_4 est effectué en présence de D-[1-¹⁴C]alanine selon les modalités décrites par Hellerman et Coffey⁵ et qui conduisent à un marquage optimum de la protéine. Le mélange réactionnel est ensuite additionné d'un volume égal de solution saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Le précipité est redissous dans un volume minimal de tampon phosphate de sodium 0.025 M de pH 6.3 contenant du benzoate de sodium $2 \cdot 10^{-4}$ M, et la solution est purifiée par chromatographie descendante sur une colonne (40 cm \times 3 cm) de Sephadex G-25 équilibrée puis éluée par le même tampon. L'éluion est contrôlée par enregistrement de l'absorbance à 278 nm; les fractions contenant la protéine sont rassemblées, et la solution est dialysée et lyophilisée. Pour des raisons d'économie, un autre lot d'enzyme a été traité dans des conditions identiques par de la D-alanine non radioactive, l'enzyme ainsi modifié a été ajouté à la préparation radioactive obtenue par action de la D-[1-¹⁴C]alanine et c'est le mélange des deux préparations qui a été utilisé dans cette étude.

Avant d'être hydrolysée enzymatiquement, la protéine est dénaturée par le chlorhydrate de guanidine et l'éthanol selon Biserte et Holleman¹⁴. Les hydrolyses trypsique et chymotrypsique sont conduites dans une solution de sesquicarbonate d'ammonium à 1% avec un rapport enzyme/substrat de 2% en poids, pendant 24 h à 37 °C. La réaction est arrêtée par congélation et l'hydrolysat est lyophilisé. Il est fractionné tout d'abord par chromatographie descendante sur une colonne (100 cm \times 3 cm) de Sephadex G-25 en milieu pyridine-acide acétique 0.1 M de pH 4.9. La radioactivité de l'éluat est suivie en continu par passage sur une colonne d'anthracène (dispositif à scintillation Packard), tandis que le dosage automatique par la réaction de Lowry (Autoanalyseur Technicon), effectué sur les fractions recueillies dans un collecteur, permet de tracer la courbe d'éluion des peptides.

Les fractions les plus intéressantes sont alors chromatographiées sur résine

échangeuse d'ions "Chromobeads P" (Technicon). L'élution est effectuée par un gradient continuellement croissant de pH et de molarité en pyridine¹⁵. La courbe d'élution des peptides est établie par dosage automatique à la ninhydrine des fractions recueillies et la radioactivité des peptides ainsi localisés est déterminée par comptage par scintillation effectué directement sur l'éluat à l'aide du mélange de Bray¹⁶.

La composition en peptides des fractions recueillies et la pureté des peptides purifiés sont contrôlées par électrochromatographie sur papier Whatman 3 selon Plaquet *et al.*¹⁷ et les taches radioactives repérées par autoradiographie (films Kodirex, émulsionnés sur une seule face).

La composition en acides aminés des peptides est déterminée après hydrolyse par HCl 6 M pendant 24 h à 105 °C, en tube scellé sous vide, par analyse chromatographique automatique (Autoanalyseur Technicon). La position de l' ϵ -N-(1-carboxy-éthyl)-L-lysine a été établie préalablement à l'aide d'un échantillon préparé par action de l'acide α -bromopropionique sur l' α -N-carbobenzoxy-L-lysine, selon Hellerman et Coffey⁵: la carboxyéthyl-lysine est éluée de la colonne juste avant l'isoleucine.

La séquence des acides aminés est déterminée par la méthode de dégradation récurrente d'Edman avec identification à chaque étape du dansyl-aminoacide N-terminal du peptide résiduel, selon la méthode de Hartley¹⁸ (technique chromatographique de Gros et Labouesse¹⁹).

RESULTATS

Un premier lot de D-aminoacide oxydase (environ 500 mg) (*cf.* réf. 13) a été traité par le borohydrure en présence de D-[1-¹⁴C]alanine; après dénaturation par le chlorhydrate de guanidine et l'éthanol, les groupements guanidyliques des résidus d'arginine ont été bloqués par la cyclohexanedione selon Toi *et al.*²⁰, afin de limiter l'hydrolyse trypsique aux liaisons "lysyl" et d'obtenir ainsi une séquence peptidique plus importante au niveau de la carboxyéthyl-lysine. Dans ces conditions, l'hydrolyse trypsique, effectuée ici pendant 2 h à 37 °C avec un rapport enzyme/substrat de 4% en poids, n'a été que très partielle, puisqu'il a été possible de récupérer à partir de cet hydrolysate un adialysable qui, après lyophilisation, pesait 475 mg, soit 95% de la protéine mise en jeu au départ; la fraction dialysable ne contient aucun peptide radioactif.

L'adialysable a été traité par la chymotrypsine, puis fractionné sur une colonne de Sephadex G-25 (100 cm \times 3 cm): la courbe d'élution (Fig. 1) obtenue après réaction de Lowry montre qu'il est possible de séparer trois fractions radioactives; celles-ci ont été analysées par électrochromatographie sur papier et autoradiographie. La Fraction I, qui correspond aux constituants exclus du gel, a été soumise à l'électrochromatographie, mais aucune tache radioactive bien localisée n'ayant été décelée, l'étude de cette fraction a été abandonnée. La Fraction III, correspondant aux petits peptides, contient, dans la zone des peptides acides, deux taches radioactives d'intensité différente; une chromatographie sur résine "Chromobeads P" a été effectuée et a permis d'obtenir deux peptides radioactifs représentant l'essentiel de la radioactivité de cette fraction (Peptides S III R3 et S III R4).

La Fraction II qui, d'après le diagramme de la Fig. 1, est la plus riche en peptides et la plus radioactive, ne présente en électrochromatographie sur papier que des

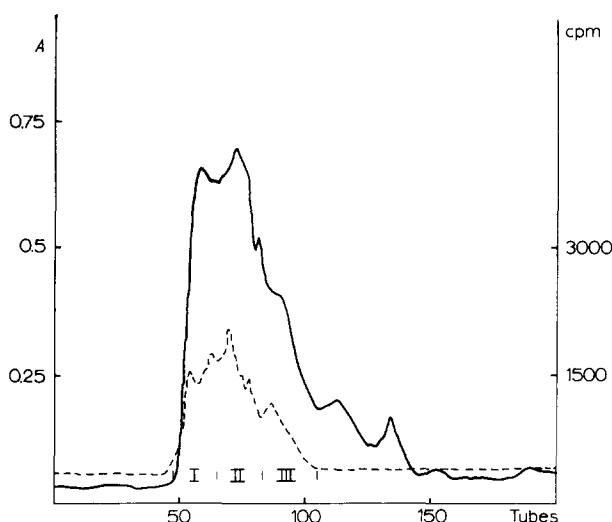


Fig. 1. Chromatographie descendante sur colonne (100 cm \times 3 cm) de Sephadex G-25 de l'hydrolysats tryptique et chymotryptique de D-aminoacide oxydase. Tampon pyridine-acide acétique 0.1 M de pH 4.9. Fractions de 6 ml en 10 min. —, enregistrement de l'absorbance obtenue par dosage des protéines de l'éluat par la réaction de Lowry; — — —, radioactivité.

taches faibles et mal localisées par révélation à la ninhydrine ainsi que par autoradiographie. Elle a été néanmoins chromatographiée sur colonne de résine "Chromobeads P": plusieurs pics radioactifs ont été décelés, mais, malgré des purifications ultérieures sur papier, ils n'étaient pas assez homogènes et la quantité obtenue était trop faible pour qu'il pussent être analysés.

Devant la résistance à l'hydrolyse enzymatique manifestée par la D-aminoacide oxydase réduite en présence de D-alanine et bloquée par la cyclohexane-dione, une hydrolyse tryptique a été effectuée sur un deuxième lot (411 mg) de protéine marqué, dénaturée, mais non traitée par la cyclohexanedione; l'hydrolysats a été fractionné comme précédemment. Le diagramme d'éluion de la colonne de Sephadex G-25 (Fig. 2) permet de constater la diminution relative de la Fraction I exclue du gel, ce qui traduit une hydrolyse plus complète. La Fraction IV présente en électrochromatographie sur papier une seule tache faiblement radioactive que l'on ne retrouve pas après chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

L'électrochromatographie de la Fraction II révèle trois taches radioactives majeures. Par chromatographie sur une colonne de résine échangeuse d'ions, il est possible d'isoler deux de ces peptides: l'un, que nous avons appelé S II R₁, est isolé dans la zone des peptides acides, l'autre, S II B, est élué dans la zone des peptides neutres.

La Fraction III apparaît plus complexe en électrochromatographie sur papier, par révélation à la ninhydrine; sur l'autoradiogramme, quatre à cinq taches peuvent être décelées, dont l'une est nettement plus intense: elle correspond au Peptide S III R₂, qui a été isolé par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions, et dont la séquence en acides aminés a été établie.

Au total, nous avons donc obtenu cinq peptides contenant un résidu de lysine réactif. Leurs compositions en acides aminés sont rassemblées dans le Tableau I:

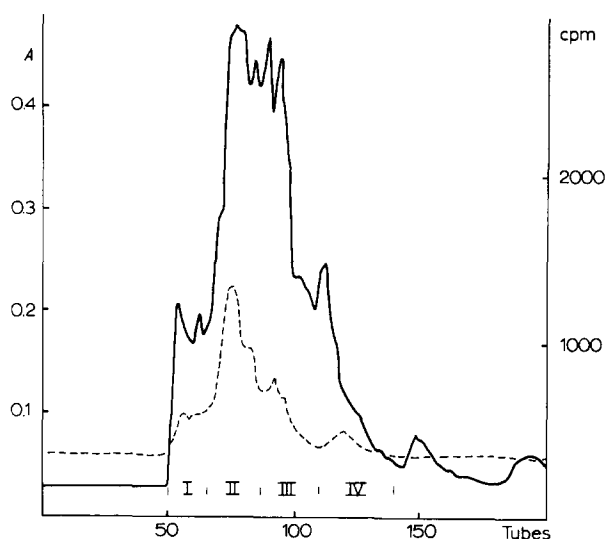


Fig. 2. Chromatographie descendante sur colonne (100 cm \times 3 cm) de Sephadex G-25 de l'hydrolysats trypsique de D-aminoacide oxydase. Tampon pyridine-acide acétique 0.1 M de pH 4.9. Fractions de 6 ml en 10 min. —, enregistrement de l'absorbance obtenue par dosage des protéines de l'éluat par la réaction de Lowry; ---, radioactivité.

TABLEAU I

COMPOSITION EN AMINOACIDES DES PEPTIDES CONTENANT DE LA CARBOXYETHYL-LYSINE

Acides aminés trouvés	Hydrolysats trypsique et chymotrypsique		Hydrolysats trypsique		
	S III R ₃	S III R ₄	S II R ₁	S II B	S III R ₂
Acide aspartique	1.12	1.17	1.21		
Acide glutamique		0.89	1.10	2.14	
Glycocolle	0.76	1.02	0.89	1.16	1.01
Alanine			0.92		
Valine	1.93			0.87	1.01
Carboxyéthyl-lysine	1.16	1.00	1.02	1.06	1.12
Isoleucine					
Leucine		1.12		1.90	
Tyrosine	1.02	0.78	0.85		
Phénylalanine				0.87	0.86
Arginine				1.00	

elles montrent qu'il doit exister dans la molécule de D-aminoacide oxydase au moins quatre résidus de lysine différents intervenant comme site de fixation du radical carboxyéthyle. On peut en effet admettre que le Peptide S III R₂ dérive d'une coupure secondaire du Peptide S II B.

Bien que la trypsine ait été préalablement traitée par la L-1-*p*-toluène-sulfonyl-amido-2-phényl-éthyl-chlorométhylcétone (TPCK), il est curieux de constater qu'il subsiste une activité chymotrypsique résiduelle expliquant la formation des Peptides S II R₁ et S III R₂.

Les études de séquence ont porté sur les Peptides S III R₃ (cf. réf. 13) et S III R₂ et ont donné les résultats suivants:

S III R₃: (H₂N) Asx-Val-Val-carboxyéthyl-Lys-Tyr (CO₂H)
 S III R₂: (H₂N) Gly-Val-carboxyéthyl-Lys-Phe (CO₂H)

Une certaine analogie peut donc être notée en ce qui concerne la localisation de la carboxyéthyl-lysine dans une région hydrophobe de la molécule.

DISCUSSION

L'obtention d'une protéine marquée par action du NaBH₄ sur la D-aminoacide oxydase en présence de D-[1-¹⁴C]alanine semblait être une réaction extrêmement spécifique, puisque des expériences témoins ¹⁰avaient mis en évidence la non-fixation du radical carboxyéthyle quand on opérait soit en présence de L-alanine ou d'acide pyruvique marqués, soit en mettant en oeuvre l'enzyme dénaturé ou privé de flavine-adenine-dinucléotide. La spécificité paraissait aussi démontrée par l'inhibition de la réaction en présence d'une surcharge en benzoate et par la stoechiométrie du marquage: fixation de 0.9 équivalent de substrat marqué par équivalent de coenzyme flavinique. Si le groupement ε-aminé de la lysine exerce une fonction importante dans le mécanisme d'action enzymatique, le fait que l'enzyme modifié garde son activité a conduit Massey *et al.*¹¹ à admettre l'existence d'au moins deux résidus de lysine pouvant jouer le même rôle.

Les conditions de marquage que nous avons adoptées dans cette étude (utilisation du mélange d'un lot d'enzyme traité par la D-alanine radioactive et d'un lot d'enzyme traité par la D-alanine non radioactive) ne nous ont pas permis de déterminer le taux de marquage de l'enzyme et de vérifier les résultats de Coffey *et al.*¹⁰. L'identification qualitative des séquences peptidiques entourant les résidus de lysine marqués montre cependant que le nombre de résidus de lysine "réactifs" est nettement plus élevé et il devient donc plus difficile de leur assigner un rôle précis dans le processus de la désamination.

La fixation du phosphate de pyridoxal sur l'apoenzyme de la D-aminoacide oxydase a été observée²¹: elle porte aussi sur la fonction ε-aminée d'un résidu de lysine et diminue l'activité enzymatique. La stoechiométrie de la réaction paraît différente, puisque deux molécules se fixent par équivalent de coenzyme. On peut se demander si la fixation d'un dérivé carbonyle aussi réactif que le phosphate de pyridoxal n'est pas seulement une manière supplémentaire et non spécifique de mettre en évidence certains résidus de lysine: ceux-ci présenteraient au sein de la D-aminoacide oxydase une analogie de réactivité en raison d'une localisation dans des régions assez semblables de la molécule, comme peuvent en témoigner les séquences des Peptides S III R₂ et S III R₃. L'isolement des peptides contenant les résidus de lysine capables de lier le phosphate de pyridoxal et leur comparaison avec les peptides carboxyéthylés décrits plus haut pourraient confirmer une telle hypothèse.

Parmi les groupements essentiels à l'activité enzymatique, le site hydrophobe est l'un des mieux caractérisés²²⁻²⁴. Il est responsable de l'inhibition de la désamination par les acides carboxyliques aliphatiques ou aromatiques. La position de la lysine entre les radicaux hydrophobes de la valine et de la tyrosine ou de la phénylalanine, constatée dans les Peptides S III R₂ et S III R₃, cadre bien avec la présence possible d'un de ces résidus à proximité du site hydrophobe de la D-aminoacide oxydase, qui, selon Fonda et Anderson²³, contient un résidu aromatique à l'intérieur d'une région non polaire.

S'il existe enfin, au sein de la D-aminoacide oxydase, plusieurs résidus de lysine de réactivité analogue, comme nos résultats tendent à le prouver, il devient difficile d'expliquer les relations stoechiométriques observées dans la fixation du groupement carboxyéthyle ou dans celle du phosphate de pyridoxal: la solution de ce problème exige de nouvelles investigations.

RESUME

La D-aminoacide oxydase (EC 1.4.3.3) traitée par le NaBH_4 au cours de la réaction enzymatique fixe au niveau de certains résidus de lysine le radical carboné provenant du substrat désaminé. L'isolement de peptides contenant ces résidus de lysine substitués est décrit. Leurs caractéristiques sont discutées en fonction de ce que l'on sait du mécanisme d'action de la D-aminoacide oxydase.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la Fondation pour la Recherche Médicale Française de l'aide matérielle précieuse qu'elle nous a apportée au cours de la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. E. Brumby et V. Massey, *Biochem. Prep.*, 12 (1968) 29.
- 2 H. Kubo, T. Yamano, M. Iwatsubo, H. Watari, T. Soyama, J. Shiraishi, S. Sawada, N. Kawashima, S. Mitani et K. Ito, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 431.
- 3 A. H. Neims et L. Hellerman, *Annu. Rev. Biochem.*, 39 (1970) 867.
- 4 L. Hellerman, D. S. Coffey et A. H. Neims, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 290.
- 5 L. Hellerman et D. S. Coffey, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 582.
- 6 A. Kotaki, M. Harada et K. Yagi, *J. Biochem. Tokyo*, 64 (1968) 537.
- 7 Y. Ichikawa et T. Yamano, *Tokushima J. Exp. Med.*, 10 (1963) 156.
- 8 F. Thome-Beau, Le Thi-Lan, A. Olomucki et Nguyen-Van Thoai, *Eur. J. Biochem.*, 19 (1971) 270.
- 9 M. Dixon, *Biochim. Biophys. Acta*, 226 (1971) 241.
- 10 D. S. Coffey, A. H. Neims et L. Hellerman, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 4058.
- 11 V. Massey, B. Curti, F. Muller et S. G. Mayhew, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 1329.
- 12 J. Mizon, G. Biserte et P. Boulanger, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51 (1969) 419.
- 13 J. Mizon, K. K. Han, M. Dautrevaux et G. Biserte, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 270 (1970) 1275.
- 14 G. Biserte et J. W. Holleman, *Biochim. Biophys. Acta*, 33 (1959) 143.
- 15 K. K. Han, M. Dautrevaux, X. Chaila et G. Biserte, *Eur. J. Biochem.*, 16 (1970) 463.
- 16 G. Bray, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 279.
- 17 R. Plaquet, G. Biserte et P. Boulanger, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 301.
- 18 B. S. Hartley, *Biochem. J.*, 119 (1970) 805.
- 19 C. Gros et B. Labouesse, *Eur. J. Biochem.*, 7 (1969) 463.
- 20 K. Toi, E. Bynum, E. Norris et H. A. Itano, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 3455.
- 21 Y. Miyake et T. Yamano, *Biochim. Biophys. Acta*, 198 (1970) 438.
- 22 M. Dixon et K. Kleppe, *Biochim. Biophys. Acta*, 96 (1965) 357.
- 23 M. L. Fonda et B. M. Anderson, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 1931.
- 24 K. Yagi et A. Kotaki, *J. Biochem. Tokyo*, 68 (1970) 293.

Biochim. Biophys. Acta, 276 (1972) 63-69