

Isolement de glycoprotéides solubilisés par action de la collagénase sur la membrane basale glomérulaire humaine

Depuis les travaux de GOODMAN, GREENSPON et KRAKOWER¹ effectués sur les membranes basales glomérulaires (MBG) de chien, de nombreuses études furent entreprises sur les MBG de différentes espèces animales (SPIRO², KEFALIDES³). C'est en 1970 qu'apparaissent les premiers résultats concernant l'étude des composants de la membrane basale glomérulaire humaine. Les travaux de MAHIEU⁴, BEISSWENGER⁵ et WESTBERG⁶ ont permis d'aborder l'étude des glycoprotéides de la membrane et ainsi de mieux comprendre la physiologie glomérulaire.

Le but de notre travail est de préciser les interactions qui peuvent exister entre les différentes structures glycoprotéidiques au sein de la membrane glomérulaire humaine.

Matériel et méthodes. La technique de préparation des membranes basales que nous avons adoptée est une variante⁷ de celle décrite par SPIRO⁸, modifiée par MAHIEU⁴ et WESTBERG⁶.

Sur cette préparation, on fait agir une collagénase purifiée dépourvue d'activité peptidique contaminante non spécifique⁹. 200 mg de membranes basales lyophilisées sont dissous dans 10 ml de tampon Tris 0,1 M, acétate de calcium (0,05 M, de pH 7,4). Nous adoptons un rapport enzyme/substrat de 1/100 pendant les 24 premières heures de l'hydrolyse. Les recharges en enzyme sont effectuées dans le rapport 1/200 au cours de 48 h qui suivent la première étape de protéolyse.

Nous avons effectué 10 préparations de ce type, ce qui nous a permis d'apprécier la reproductibilité qui est excellente.

Le matériel ainsi solubilisé est soumis à une chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G 200¹⁰ (50 × 2,3 cm) équilibrée en tampon Tris-HCl 0,05 M de pH 8,4. La lecture des densités optiques à deux longueurs d'onde (278 et 260 nm), la courbe de dosage des oses combinés à l'orcinol¹¹ permettent d'individualiser 2 pics au cours de l'élution : une fraction de haut poids moléculaire exclue de la colonne de Sephadex G 200 (I) et une frac-

¹ H. C. GOODMAN, S. A. GREENSPON et C. A. KRAKOWER, J. Immun. 75, 96 (1955).

² R. G. SPIRO, J. biol. Chem. 242, 1923 (1967).

³ N. A. KEFALIDES, Int. Rev. exp. Path. 70, 1 (1970).

⁴ P. MAHIEU et R. J. WINAND, Eur. J. Biochem. 12, 410, (1970).

⁵ P. Y. BEISSWENGER et R. G. SPIRO, Science 168, 596 (1970).

⁶ N. G. WESTBERG et A. F. MICHAEL, Biochemistry 9, 3837 (1970).

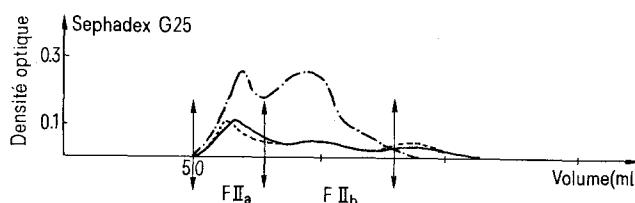
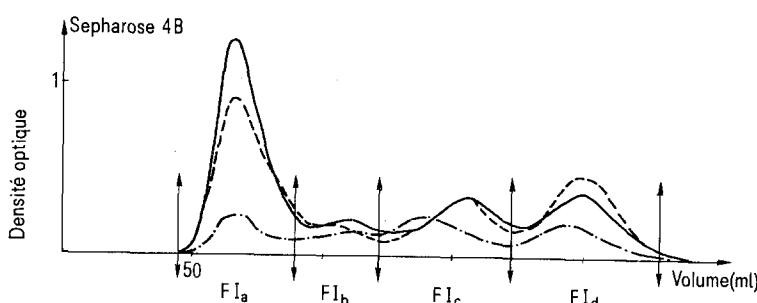
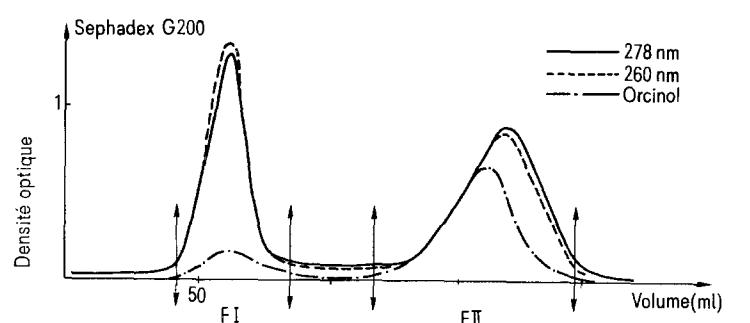
⁷ P. BARDOS, M. LANSOON, P. DEGAND et J. P. MUH, Clin. chim. Acta 48, 27 (1973).

⁸ R. G. SPIRO, J. biol. Chem. 242, 1915 (1967).

⁹ Clostridiopeptidase A (CLS PA) Worthington (408 unités par mg).

¹⁰ Pharmacia A. B. Stockholm.

¹¹ J. DEMAILLE, M. DAUTREVAUX, R. HAVEZ et G. BISERTE, Bull. Soc. Chim. fr. 12, 3506 (1965).



Fractionnement des glycoprotéides de la membrane basale glomérulaire humaine. —, 278 nm; ---, 260 nm; -·-, Orcinol.

Composition en oses et acides aminés des sous-fractions obtenues par gel filtration des fractions F_I et F_{II} de MBGH^a

Fractions	Ia	Ib	Ic	Id	IIa	IIb
OHPRO ^b	traces	0,94	3,81	traces	—	0,45
ASP	9,47	9,62	8,09	9,97	10,05	11,74
THR	5,37	4,73	4,58	5,69	7,06	5,12
SER	6,73	5,90	5,83	9,30	14,64	14,78
GLU	12,48	12,88	10,96	12,55	11,80	13,33
PRO	6,04	6,18	6,61	6,16	6,60	4,97
GLY	11,95	13,56	19,07	14,46	19,19	21,43
ALA	7,90	8,00	6,03	9,34	10,62	6,82
1/2-CYS	2,04	2,51	1,67	traces	—	—
VAL	5,20	4,79	4,22	4,92	4,70	3,34
MET	1,57	0,94	0,82	1,24	traces	0,77
ILE	3,82	2,77	2,74	3,15	3,36	2,48
LEU	7,77	7,87	6,21	7,08	4,69	3,30
TYR	2,94	2,37	2,29	2,29	traces	1,80
PHE	3,84	2,85	3,00	3,39	traces	1,67
OHLYS	0,53	2,45	4,48	traces	—	2,99
LYS	4,34	3,39	2,54	3,54	2,71	2,25
HIS	2,07	2,00	2,03	2,15	1,55	1,39
ARG	5,82	6,23	4,98	4,75	3,05	1,34
Hexoses ^c	5,3	10,9	13,6	6,9	7,65	15,20
Osamines	2,7	3,3	4,0	3,0	1,75	0,67
Fucose	1,2	1,4	1,2	0,5	0,76	0,88
Acide sialique	0,7	1,2	1,0	0,4	1,20	0

^a 4 Déterminations. ^b Résultats exprimés en nombre de résidus pour 100 résidus. ^c Résultats exprimés en pourcentage du poids sec.

tion retardée de plus faible taille (II). Chacune de ces fractions subit une nouvelle étape de chromatographie de gel-filtration (voire figure).

Sur colonne de Sépharose 4 B¹⁰ (50 × 2,3 cm) équilibrée en tampon Tris 0,1 M NaCl 0,2 M pH 8,0 pour la fraction I. Sur colonne de Sephadex G 25¹⁰ (50 × 2,3 cm) équilibrée dans un tampon acétate de Na 0,01 M de pH 5,0 pour la fraction II. La première fraction se résout en 4 sous-fractions Ia, Ib, Ic et Id) et la seconde en 2 sous-fractions (IIa et IIb). Sur chacune de ces préparations, après dialyse et lyophilisation, on détermine la composition en oses et en acides aminés (Tableau).

Résultats. L'étude de la composition en acides aminés des fractions de haut poids moléculaire obtenues par chromatographie sur Sépharose 4 B à partir de la fraction I de Sephadex G 200 nous permet de distinguer 2 types de glycoprotéines en fonction de la présence ou de l'absence de dérivés hydroxylés de la proline ou de la lysine. Les fractions Ib et Ic sont caractérisées essentiellement par leur richesse en hydroxyproline et hydroxylysine. Le nombre de résidus de glycocolle (19 résidus pour 100 résidus) permet de considérer Ic comme une glycoprotéine de type collagène. Cette classification se trouve vérifiée à l'examen de la composition glucidique où l'on peut noter un pourcentage élevé d'hexoses pouvant correspondre au disaccharide-galactose-glucose.

En ce qui concerne les fractions Ia et Id, la composition en acides aminés se distingue par l'absence ou le taux faible d'hydroxyproline et d'hydroxylysine. Le pourcentage de glycocolle (12 à 14 résidus pour 100 résidus dosés) nous conduit à assimiler ces fractions à des glycoprotéines de structure différente des fractions de type «collagène». La richesse relative en hexosamines et en fucose par rapport aux hexoses dosés nous permet d'envisager l'existence de chaînes de glycanne de nature hétéropolysaccharidique sur l'axe polypeptidique de ces molécules.

Le fractionnement sur Sephadex G 25 de la fraction II retardée sur Sephadex G 200 permet d'obtenir 2 fractions dont la composition chimique diffère par le taux d'hydroxylysine (3 résidus pour 100 résidus dans IIb, 0 dans IIa) (Tableau); IIb peut être considérée comme un glycopeptide «collagene like» riche en hexoses. Toutefois, bien que le taux de glycocolle soit comparable pour IIa et IIb, la composition glucidique de IIa est celle d'une structure glycannique hétérosaccharidique (hexosamines 1,75 p. 100, hexoses 7,65 p. 100 du poids sec).

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide à 6 p. 100 montre que les fractions Ic et II se résolvent en au moins 5 bandes, et les fractions Ib et Id en deux bandes. La fraction Ia ne pénètre pas dans le gel.

Discussion. Au niveau des membranes basales, les données de la littérature permettent actuellement de considérer l'existence d'un matériel de type collagène associé ou lié à des glycoprotéines de structure dont la composition chimique est caractérisée par une teneur faible ou une absence d'hydroxylysine et d'hydroxyproline, par un pourcentage relativement plus faible de glycocolle et par un taux important d'acides aminés dicarboxyliques et d'alanine.

A l'examen des résultats obtenus au cours de ce travail, nous pouvons en fonction de ces hypothèses structurales considérer: la fraction IIb, comme des glycopeptides de type collagène, de poids moléculaire inférieur à 5000, la fraction IIa, comme des glycopeptides contenant des glycannes de nature hétéropolysaccharidique. L'absence de résidus de demi-cystine permet de soulever l'hypothèse de leur libération par la collagénase à partir de l'axe peptidique de structure de type collagène. Le squelette polypeptidique du collagène de la basale serait différencié au niveau des points de branchement des hétéroglycannes. Il y aurait dans ce cas intégration de séquences courtes «non collagènes» dans une structure macromoléculaire «collagene like».

Pour les constituants de haut poids moléculaire isolés sur colonne de Sepharose, les mêmes remarques concernant leur composition chimique, nous autorisent à distinguer des éléments macromoléculaires de type collagène (fraction Ic) ainsi que des fractions glycoprotéiques possédant une copule glycannique constituée de chaînes disaccharidiques et, ou hétérosaccharidiques (Ib, Ia et Id).

Cette notion d'hétérogénéité, le pourcentage variable de ces différentes formes moléculaires plus ou moins sensibles à l'action de la collagénase soulèvent l'aspect du

rôle des éléments de structure hétéropolysaccharidique dans la microphysiologie de la filtration ainsi que dans la pathologie glomérulaire¹².

Zusammenfassung. Beitrag zur chemischen Zusammensetzung der Glykoproteine aus der glomerulären Basalmembran der Menschenniere.

P. BARDOS¹³, M. LANSON¹³, J. P. MUH¹³
et P. DEGAND¹⁴

*Laboratoire de Biochimie Médicale,
Faculté de Médecine, 2 bis, boulevard Tonnellé,
F-37032 Tours Cédex (France), et
Unité de Recherches No 16 de l'INSERM
sur la Biochimie des Protéines,
Place Verdun, F-59045 Lille Cédex (France),
9 juillet 1973.*

¹² Travail réalisé dans le cadre de l'ATP No 10 de l'INSERM (contrat No 72-1-467-10).

¹³ Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, F-37032 Tours Cédex (France).

¹⁴ Unité de Recherches No 16 de l'INSERM sur la Biochimie des Protéines, Place de Verdun, F-59045 Lille Cédex (France).

Ca²⁺-ATPase Activity in Isolated Secretory Granule Membranes

It is generally believed that the function of secretory (zymogen) granules is to store digestive enzymes within the gland cell and subsequently release these enzymes for secretion. DOUGLAS and POISNER¹ have demonstrated that calcium is a vital requirement for induction of enzyme secretion, and ISHIDA et al.² have shown that release of amylase from secretory granules requires calcium. Although rat parotid glands contain large concentrations of calcium segregated within the zymogen granule³, it is uncertain how calcium ions accumulate in the granules and how calcium is involved in amylase secretion. In this study we have demonstrated the existence of a calcium-activated ATPase (Ca²⁺-ATPase) in isolated zymogen granule membranes, and we speculate as to the function of this enzyme activity.

Materials and methods. Isolated zymogen granule membranes were prepared from rat parotid glands according to the methods of AMSTERDAM et al.⁴, and also by the method of KIRSHNER et al.⁵. ATPase activities, i.e., Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase and (Na⁺ + K⁺)-ATPase were determined as follows: In each flask zymogen granule membranes (approximately 0.04 mg) were incubated with 4 mM ethyleneglycol-bis-(aminoethyl ether), N, N'-tetraacetic acid (EGTA), and 30 mM tris-HCl at pH 7.1. In addition, each incubation flask that was used for Ca²⁺-ATPase determinations contained 95 mM NaCl plus 0 to 1 mM free CaCl; each incubation that was used for (Na⁺ + K⁺)-ATPase determinations contained 3 mM MgCl₂, 80 mM NaCl and 15 mM KCl; and each incubation flask that was used for Mg²⁺-ATPase contained 0.1 mM ouabain, 3 mM MgCl₂, 80 mM NaCl and 15 mM KCl. The final volume was 2 ml and all incubations were performed at 37°C. (Na⁺ + K⁺)-ATPase

was calculated as the difference between activities in the presence and absence of ouabain. Ca²⁺-ATPase was calculated as the difference produced by the addition of calcium when potassium was replaced by sodium (WATSON, et al.⁶) Tris-ATP (3 mM) was added to start the reaction and the mixture was incubated for 60 min. The reaction was terminated by the addition of 1 ml of 15% trichloroacetic acid. The inorganic phosphate produced during incubation was determined using the method of FISKE and SUBBAROW⁷. The membrane preparations were assayed for protein content according to the method of LOWRY et al.⁸, and succinate dehydrogenase (SDH) activity was measured using the method of GREEN et al.⁹. The total SDH activity of isolated zymogen granule membranes was less than 1% of the 250 × g supernatant fraction.

Results and discussion. Isolated zymogen granule membranes contain Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activities. The mean values and standard errors for these activities are given in the Table. Activities are expressed as μmoles of inorganic phosphate liberated per mg protein in 60 min. As shown in the Figure, minimal activation of the Ca²⁺-ATPase was noted at a calcium concentration of 3 × 10⁻⁶ M. As the calcium concentration was increased to 1 mM the Ca²⁺-ATPase activity increased. In 2 of the experiments the calcium concentration was increased to 3 × 10⁻² M. This resulted in a further increase in Ca²⁺-ATPase activity of about 30%. Higher, more unphysiologic concentrations were not tested. All ATPase activities were similar when

ATPase activities of isolated zymogen granule membranes

ATPase	μM P _i /mg protein/h
Ca ²⁺ -ATPase	9.6 ± 3.2
Mg ²⁺ -ATPase	14.1 ± 3.0
(Na ⁺ + K ⁺)-ATPase	5.0 ± 2.7
[Ca] = 1 mM, N = 5.	

¹ W. W. DOUGLAS and A. M. POISNER, J. Physiol., Lond. 165, 528 (1963).

² H. ISHIDA, N. MIKI and H. YOSHIDA, Jap. J. Pharmac. 21, 227 (1971).

³ D. WALLACH and M. SCHRAMM, Eur. J. Biochem. 21, 433 (1971).

⁴ A. AMSTERDAM, M. SCHRAMM, I. OHAD, Y. SOLOMON and Z. SELINGER, J. Cell Biol. 50, 187 (1971).

⁵ R. N. KIRSHNER, D. WALLACH and M. SCHRAMM, Analyt. Biochem. 52, 589 (1973).

⁶ E. L. WATSON, K. T. IZUTSU and I. SIEGEL, Archs. Oral Biol., in press (1974).

⁷ C. H. FISKE and Y. SUBBAROW, J. biol. Chem. 66, 551 (1925).

⁸ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

⁹ D. E. GREEN, S. MII and P. M. KOHOUT, J. biol. Chem. 217, 511 (1955).