

## ROLE DES GROUPES CARBOXYLES DE L'INHIBITEUR DE KUNITZ DANS SON UNION AVEC LA TRYPSINE

Jacqueline CHAUVET et Roger ACHER

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences de Paris, France*

Reçu le 4 Novembre 1968

The blockage of the carboxyl groups of a pancreatic trypsin inhibitor (inhibitor of Kunitz) has been performed with a water-soluble carbodiimide and glycine ethyl ester. The inhibitor has five carboxyl groups located on residues Asp<sup>3</sup>, Glu<sup>7</sup>, Glu<sup>49</sup>, Asp<sup>50</sup> and Ala<sup>58</sup>. When the reaction is carried out on native inhibitor or on inhibitor treated with 8 M urea, approximately 3 moles of glycine ethyl ester are introduced but 4, 3 residues can be incorporated into per-formic acid oxidized inhibitor. Fully active derivatives with a complete substitution of the C-terminal residue can be obtained. It may be concluded that the C-terminal carboxyl group is not involved in the binding with trypsin.

### 1. Introduction

L'union entre la trypsine et un inhibiteur basique présent dans le pancréas (inhibiteur de Kunitz et Northrop) fait intervenir, entre autres facteurs, une attraction ionique [1]. Il a été montré que sur les 5 groupes aminés que possède l'inhibiteur, un seul, le groupe  $\epsilon$ -aminé de la lysine en position no. 15, était masqué dans le complexe trypsine-inhibiteur et participait probablement à l'union des deux molécules [2].

Des recherches ont été entreprises pour déterminer si certains groupes carboxyliques de l'inhibiteur intervenaient également dans l'association. Le blocage de ces groupes par estérification réduit considérablement l'activité inhibitrice ce qui suggère un rôle d'un ou plusieurs résidus acides [3]. Néanmoins il a semblé important de vérifier ce résultat à l'aide d'une méthode plus douce et également de localiser les résidus essentiels. La molécule possède 5 groupes carboxyliques: un groupe  $\alpha$ -carboxylique du résidu d'alanine C-terminal, 2 groupes  $\beta$ -carboxyliques des résidus d'acide aspartique en position 3 et 50, et 2 groupes  $\gamma$ -carboxyliques des résidus d'acide glutamique en position 7 et 49. Le résidu d'acide aspartique en position 3 n'intervient probablement pas puisque l'inhibiteur demeure actif lorsque les trois premiers acides aminés de la chaîne sont éliminés par dégradation récurrente [4].

L'étude des groupes carboxyliques des protéines peut être convenablement abordée en bloquant ces derniers à l'aide d'un carbodiimide hydrosoluble [5]. L'importance du blocage peut être appréciée en faisant réagir le dérivé avec la glycine éthyl ester et en dosant le nombre de résidus de glycine fixé par Mole d'inhibiteur [6]. Nous avons utilisé le 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide-méthyl *p*-toluène-sulfonate (Aldrich). Les conditions expérimentales sont les suivantes: le polypeptide, à la concentration de 10 mg par ml, et la glycine éthyl ester à la concentration M, sont dissous dans l'eau et le pH est ajusté à 4,75. Lorsque l'urée ou la guanidine sont utilisées, l'agent dénaturant est ensuite ajouté à la concentration désirée. La solution est maintenue à 25° et on ajoute le carbodiimide pour obtenir une concentration de 0,1 M en réactif. Le pH est maintenu à 4,75 par addition automatique d'HCl 0,5 M au moyen d'un pH-stat Radiometer. La réaction est finalement stoppée en ajoutant à la solution 10 volumes de tampon acétate M à pH 4,75. Le polypeptide est débarrassé des réactifs par passage sur une colonne de Sephadex G-25 (2 X 70 cm), puis lyophilisé. Un échantillon est alors hydrolysé (HCl 6N, 48 h, 105°) et la teneur en glycine déterminée à l'aide d'un analyseur automatique Spinco [7].

## 2. Inhibiteur natif et inhibiteur dénaturé par oxydation performique

La réaction est effectuée comme précédemment décrit d'une part sur l'inhibiteur natif, purifié selon Sach et al. [8], d'autre part sur l'inhibiteur dénaturé par oxydation au moyen de l'acide performique qui rompt les 3 ponts disulfures de la molécule et inactive la substance [9]. Le dosage de la glycine fixée indique 2,6 résidus dans le cas de l'inhibiteur natif et 4,3 résidus dans le cas de l'inhibiteur oxydé. Ce résultat révèle que la quasi-totalité des carboxyles peuvent réagir lorsque la molécule est complètement dépliée, alors que certains d'entre eux ne sont pas accessibles au réactif lorsqu'elle est intacte. D'autre part le dérivé obtenu avec le produit natrif est pleinement actif (cf. tableau 1), ce qui suggère que certains carboxyles ne sont pas nécessaires à l'activité.

La localisation des groupes carboxyliques ayant réagi a été recherchée de la façon suivante: 1  $\mu$  mole d'inhibiteur substitué est oxydée par l'acide performique, puis hydrolysée par la trypsine (milieu bicarbonate d'ammonium 0,1 M, 37°, 80 min) et les peptides obtenus sont séparés par chromatoélectrophorèse dans les conditions antérieures décrites [9]. Les positions des peptides sont décelées à l'aide de la ninhydrine diluée et comparées avec les positions des peptides trypsiques obtenus par hydrolyse de l'inhibiteur non substitué. Les 5 groupes carboxyliques sont situés dans 3 des 9 peptides trypsiques à savoir 2 groupes dans l'unité  $T_1$  (Asp<sup>3</sup> et Glu<sup>7</sup>), 2 groupes dans l'unité  $T_8$  (Glu<sup>49</sup> et Asp<sup>50</sup>) et le carboxyle C-terminal dans l'unité

$T_9$  (Ala<sup>58</sup>). L'apparition de nouveaux peptides ayant la composition en acides aminés de l'une ou l'autre de ces unités avec un ou deux résidus de glycine supplémentaires permet de suivre le blocage des différents groupes carboxyliques.

Dans le cas de l'inhibiteur natif on constate la disparition quasi-complète du peptide  $T_9$  et son remplacement par un peptide possédant la même composition en acides aminés avec 1 résidu de glycine supplémentaire. Le rendement du blocage du carboxyle C-terminal a été calculé en déterminant le pourcentage du nouveau peptide par rapport à la somme peptide intact plus peptide substitué. On constate que cette substitution n'affecte pas le pouvoir inhibiteur (cf. tableau 1).

## 3. Inhibiteur traité par l'urée, la guanidine ou le dodecylsulfate de sodium

L'urée 8 M ou la guanidine 5 M ont été souvent utilisées pour déplier les molécules de protéines et rendre accessibles aux réactifs certains résidus "enfouis" ou engagés dans des liaisons non covalentes. En particulier ces substances ont été employées pour faciliter le blocage des groupes carboxyliques par les carbodiimides [6]. L'inhibiteur n'est inactivé ni par l'urée 8 M, ni par la guanidine 5 M [10], et il est donc possible d'utiliser ces agents pour démasquer certains groupes carboxyliques.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 1. En présence d'urée 8 M, environ 3 résidus de gly-

Tableau 1  
Blocage des groupes carboxyles de l'inhibiteur par la glycine éthyl ester.

Conditions de l'opération	Nombre de résidus Gly fixés par mole	Activité résiduelle (%)	Substitution du carboxyle C-terminal (%)
pH 4,75	2,6	92	93
pH 4,75 + urée 8 M	3,0	95	89
pH 4,75 + urée 8 M + guanidine 5 M	2,8	96	100
pH 4,75 + urée 8 M + dodecylsulfate 0,1%	1,2	68	75
pH 4,75, inhibiteur oxydé + urée 8 M	4,3	0	100

cine sont fixés alors que l'activité résiduelle s'élève à 95% de l'activité initiale. Ce résultat est assez proche de celui observé en présence de guanidine 5 M [11] ou d'un mélange urée 8 M + guanidine 5 M.

La substitution du carboxyle C-terminal est pratiquement complète en présence d'urée ou du mélange urée-guanidine et rend donc compte d'un résidu de glycine. En ce qui concerne l'unité  $T_8$  qui contient les résidus Glu<sup>49</sup> et Asp<sup>50</sup>, la substitution est incomplète aussi bien en présence d'urée 8 M que d'un mélange urée 8 M + guanidine 5 M; on trouve en effet à côté du peptide intact un dérivé monosubstitué et un dérivé disubstitué ce qui indique que les deux résidus acides n'ont pas réagi en totalité. En ce qui concerne l'unité  $T_1$  qui contient les résidus Asp<sup>3</sup> et Glu<sup>7</sup>, à côté du peptide intact, un dérivé monosubstitué a été observé mais la présence du dérivé disubstitué ne peut être exclue, la purification de ces peptides s'avérant assez délicate. On peut donc déduire qu'en dehors du carboxyle C-terminal, aucun des quatre autres n'a été complètement substitué et que deux des trois résidus de glycine supplémentaires trouvés au cours de l'analyse du produit représentent une somme de substitutions partielles.

Des 5 groupes carboxyliques de l'inhibiteur, deux n'interviennent pas dans la liaison avec la trypsine puisqu'il est possible d'éliminer le résidu Asp<sup>3</sup> (réf.

[4]) et de bloquer le carboxyle du résidu Ala<sup>58</sup> sans perdre l'activité. Il est probable qu'au moins 2 des 3 autres ne sont pas non plus impliqués puisqu'une substitution partielle ne s'accompagne d'aucune diminution sensible de l'activité moléculaire.

## Références

- [1] N.M.Green et E.Work, *Biochem. J.* 54 (1953) 347.
- [2] J.Chauvet et R.Acher, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 4274.
- [3] R.Avineri-Goldman, R.Snir, G.Blauer et M.Rigbi, *Arch. Biochem. Biophys.* 121 (1967) 107.
- [4] B.Kassel et R.B.Chow, *Biochemistry* 5 (1966) 3449.
- [5] J.P.Riehm et H.A.Scheraga, *Biochemistry* 5 (1966) 99.
- [6] D.G.Hoare et D.E.Koshland, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 2447.
- [7] D.H.Spackman, N.H.Stein et S.Moore, *Anal. Chem.* 30 (1958) 1190.
- [8] E.Sach, M.Thely et J.Choay, *C.R. Acad. Sci. Paris* 260 (1965) 3491.
- [9] J.Chauvet, G.Nouvel et R.Acher, *Biochim. Biophys. Acta* 115 (1966) 130.
- [10] J.Chauvet et R.Acher, résultats non publiés.
- [11] B.Meloun, I.Frič et F.Šorm, *Abstracts 5th FEBS Meeting Praha* (1968) No. 845.