

MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION D'UN COMPLEXE TERNAIRE ENTRE TRYPSINE, α_2 -MACROGLOBULINE ET INHIBITEUR BASIQUE DE PANCREAS

Y. JACQUOT-ARMAND et G. KREBS

*Laboratoire de Biologie Physico-Chimique, Faculté des Sciences d'Orsay,
91 Orsay, France*

Received 23 May 1969

The complex formed between trypsin and α_2 -macroglobulin retains the whole hydrolytic activity for benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide (DL BAPNA). We have observed that the inhibition of this activity is dependent on the inhibitor used. While soya bean inhibitor (MW = 20 000) is ineffective, the basic pancreatic inhibitor (MW = 6 500) progressively inhibits the complex. In this latter case, we have observed the formation of a very weakly active ternary compound by two methods: kinetic and fluorescence polarization.

Such differences suggest either that the contact site of trypsin for binding is not the same for each inhibitor or that the steric hindrance by macroglobulin prevents large inhibitors from reaching the active site. The pancreatic inhibitor can reach this site but its affinity is lower for the complex than for free trypsin.

1. Introduction

La trypsine peut se lier à une protéine sérique pour former un complexe stable [1]. Cette protéine a été identifiée comme étant une α_2 -macroglobuline [2,3]. Nous avons étudié les conditions de formation de ce complexe [4] et montré qu'il faut $\frac{1}{2}$ mole d' αM^* pour saturer une mole de trypsine. Nous avons trouvé pour la constante d'association une valeur assez élevée ($3 \times 10^8 M^{-1}$).

Certains auteurs et nous-mêmes avons vu que la trypsine liée à αM conserve son activité hydrolytique à l'égard des substrats synthétiques esters ou amides mais devient inactive pour les substrats macromoléculaires tels que caséine, lactoglobuline ou hémoglobine. Par ailleurs, la trypsine liée à αM devient insensible à l'action de certains inhibiteurs protéiques dont l'inhibiteur de soja (STI), mais reste accessible aux inhibiteurs de petite masse molaire (butylamine).

La présente étude est faite avec un autre inhibiteur protéique mais de masse 3 fois plus faible que le STI: l'inhibiteur basique de pancréas (IP).

2. Méthodes

L'activité hydrolytique de l'enzyme a toujours été déterminée en prenant comme substrat le DL. benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA). On suit par spectrophotométrie à 410 m μ (Cary 14) l'apparition de la paranitroaniline; la variation par minute de l'absorbance donne la vitesse d'hydrolyse.

Pour étudier l'interaction entre la trypsine, l' α macroglobuline et l'inhibiteur, on mélange ces protéines et on laisse incuber à 25°; l'activité amidasique est mesurée sur des prises aliquotes prélevées sur ces mélanges pour différents temps d'incubation.

Deux types de mélange ont été réalisés en ajoutant à la trypsine (0,5 μM), soit αM , puis IP (processus a), soit IP d'abord, puis αM (processus b), en respectant les proportions de fixation: une demi mole d' αM et une mole d'IP, pour une mole de trypsine.

* Pour éviter toute confusion avec les coefficients stoechiométriques dans la suite du texte, l' α_2 -macroglobuline que nous isolons du sérum de porc et qui présente de bons critères de pureté sera notée αM .

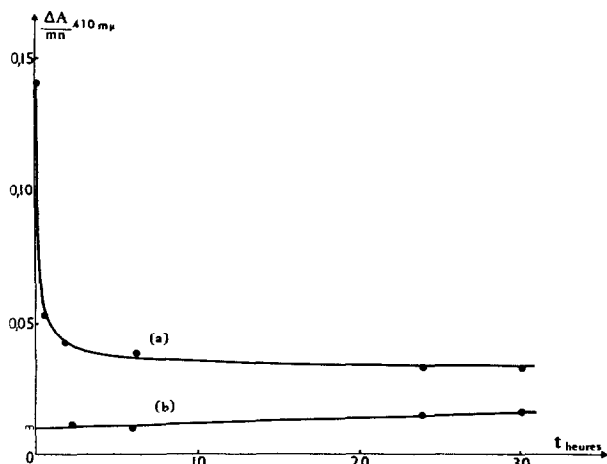


Fig. 1. Vitesse d'hydrolyse du BAPNA par les mélanges (a) et (b), en fonction du temps d'incubation des protéines. (a) T (0,5 μ M) + α M (0,25 μ M) + IP (0,5 μ M); (b) T (0,5 μ M) + IP (0,5 μ M) + α M (0,25 μ M).

3. Résultats

On a porté sur la fig. 1 l'activité hydrolytique des mélanges en fonction de la durée d'incubation qui précède la mesure. On voit que les résultats sont très différents selon le processus adopté. Pour (a) l'activité initiale du mélange diminue rapidement; l'inhibition atteint environ 75% au bout de 5 heures de contact entre les protéines et reste ensuite pratiquement constante même si l'on prolonge la durée d'incubation jusqu'à 72 heures. Pour le mélange effectué selon le processus (b) la vitesse d'hydrolyse initiale est nulle, compte tenu d'une faible activité amidasique propre à α M (notée m sur la fig.). Il n'y a ensuite qu'une très légère restauration du pouvoir hydrolytique quelle que soit la durée d'incubation du mélange.

L'allure des courbes permet de penser qu'il s'agit d'un équilibre très lent à s'établir. Pour permettre de l'atteindre plus rapidement, ces expériences ont été reprises à 37° mais l'écart observé entre les courbes (a) et (b) reste le même. Nous avons alors augmenté la concentration d'inhibiteur, les autres facteurs restant inchangés: seul variait donc le rapport IP/T (entre 1 et 5).

Nous avons mesuré l'activité v_i du mélange au bout

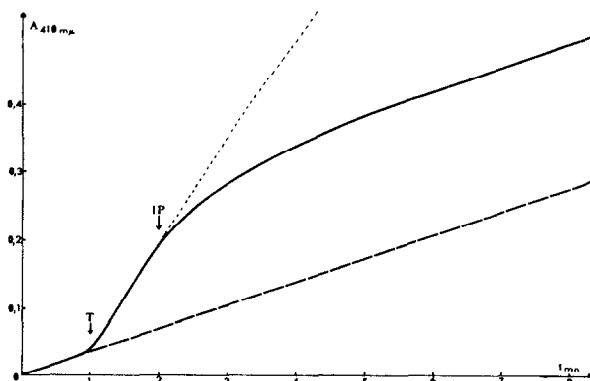


Fig. 2. Cinétique d'hydrolyse du BAPNA par le mélange (a) après 5 h d'incubation.

de 5 h d'incubation pour ces différentes concentrations d'inhibiteur, v_o étant l'activité initiale de la trypsine liée à α M avant l'addition d'inhibiteur. On représente $1/v_o - v_i$ en fonction de $1/(IP)$, l'extrapolation à concentration infinie d'inhibiteur nous donne une vitesse limite d'hydrolyse qui n'est pas nulle ($v \approx 0,007$).

Ce résultat nous a conduit à formuler l'hypothèse de l'existence d'un complexe ternaire qui serait doué de cette faible activité.

Nous avons effectivement pu mettre en évidence la formation de ce complexe $IP_2-T_2-\alpha M$, par deux méthodes.

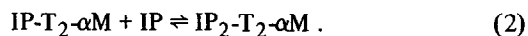
3.1. Etude cinétique

Nous avons cherché à voir, dans le cas du mélange (a), si la fixation d'inhibiteur de pancréas libérait ou non l' α macroglobuline liée à la trypsine.

Pour cela nous avons mesuré la vitesse d'hydrolyse résiduelle de ce mélange après 5 h de contact entre les protéines. Puis au temps $t = 1$ min nous avons introduit dans la cuve de mesure une dose de trypsine (0,5 μ M) et nous avons suivi la cinétique pendant une minute avant d'ajouter une dose identique d'IP. Comme on le voit sur la fig. 2, l'apport final d'IP inhibe complètement l'augmentation d'activité produite par l'addition de trypsine et la courbe de la cinétique d'hydrolyse est parallèle à celle obtenue avec le mélange (a) seul. Cela prouve qu' α M n'a pas été libérée au cours de l'incubation initiale, sinon elle aurait protégé de l'inhibition la trypsine ajoutée dans la cuve (la fixation d' α M sur la trypsine est instantanée).

La fixation de l'inhibiteur de pancréas sur la try-

sine déjà liée à l' α -macroglobuline peut se schématiser par les deux réactions:



On peut admettre que les constantes d'association de ces deux équilibres sont les mêmes: $K_1 = K_2$. En effet d'après la courbe de saturation de la trypsine par l' α -macroglobuline, nous avons vu [4] qu'à une mole d' αM correspondent deux moles de trypsine se fixant avec des constantes identiques (la molécule d' αM serait vraisemblablement constituée de deux sous-unités semblables). On sait par ailleurs que l'inhibiteur de pancréas ne se fixe pas sur la macroglobuline; les 2 molécules d'IP, qui interviennent dans la formation du complexe ternaire se fixeraient donc chacune sur une molécule de trypsine.

En tenant compte des concentrations molaires de trypsine, d' α -macroglobuline et d'inhibiteur de pancréas, il a été possible de calculer cette constante d'association à partir des valeurs expérimentales de l'activité hydrolytique de $T_2\text{-}\alpha\text{M}$, du mélange (a) après 5 h d'incubation et du complexe ternaire $\text{IP}_2\text{-T}_2\text{-}\alpha\text{M}$, cette dernière valeur étant obtenue par l'extrapolation à concentration infinie d'inhibiteur.

On trouve $K_{\text{ass}} = 0,5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$, soit une valeur beaucoup plus faible que celle trouvée par Green [6] pour la constante d'association d'IP et de la trypsine seule ($K_{\text{ass}} = 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$). Cette diminution d'affinité de l'inhibiteur de pancréas pour la trypsine lorsque celle-ci est liée à l' α -macroglobuline pourrait être due soit à un changement de conformation soit à un effet d'encombrement stérique.

3.2. Etude fluorimétrique

Cette méthode nous a permis de mettre en évidence la formation d'un complexe ternaire à partir du mélange (b).

L'état de polarisation de la lumière émise par un colorant fluorescent est fonction du volume hydrodynamique de la molécule portant ce colorant [7]. Nous avons choisi le chlorure de sulfonyl-5-méthyl-1-naphtalène (DNS) que nous avons fixé sur l'inhibiteur de pancréas en vérifiant que le pouvoir inhibiteur envers la trypsine n'est pas détruit au cours de cette opération. Les mesures fluorimétriques ont été faites

Tableau 1

Valeurs du taux de polarisation p de l'inhibiteur de pancréas marqué par DNS, avant et après fixation de la trypsine et de l' α -macroglobuline.

	IPd	IPd-T	IPd-T ₂ - αM
$p(\%)$	13,7	20,4	26,7

au moyen d'un appareil mis au point au laboratoire par B.Arrio, qui permet de mesurer à la fois l'intensité totale et le taux de polarisation de la lumière fluorescente. La longueur d'onde d'excitation est 365 m μ et les mesures ont été faites à 25°, et à pH 7,2.

On détermine d'abord le taux de polarisation, p , de l'inhibiteur dansylé (IPd), puis on ajoute dans la cuve de mesure des quantités croissantes de trypsine, on observe une augmentation de p qui atteint une valeur limite lorsque le complexe binaire IPd-T est formé. L'addition ultérieure d' α -macroglobuline provoque une nouvelle élévation du taux de polarisation ce qui traduit une augmentation du volume hydrodynamique de la molécule marquée due à la formation d'un complexe ternaire entre IPd, T et αM .

On a porté dans le tableau 1 les variations de p qu'on vient de décrire. Les corrections relatives à la durée de vie du colorant qui n'est pas la même lorsqu'il est fixé sur ces grosses molécules, accentueraient encore les différences entre le taux de polarisation avant et après la formation du complexe.

Par ailleurs, nous avons testé l'activité amidasique du complexe dansylé et retrouvé une valeur semblable à celle obtenue pour un même mélange (b) sans colorant fixé.

4. Discussion

Le fait que l'inhibiteur de pancréas puisse accéder à son site de fixation sur la trypsine liée à l' α -macroglobuline alors que l'inhibiteur de sojà en est incapable peut s'expliquer de deux façons. Ou bien le site de fixation sur l'enzyme n'est pas le même pour les 2 inhibiteurs ou bien l'encombrement stérique dû à la macroglobuline n'intervient que pour l'inhibiteur de sojà; dans ce cas une molécule ne pourrait avoir accès au site de fixation que si le poids moléculaire est inférieur à une valeur comprise entre 6.500 (IP) et 20.000 (STI).

Néanmoins, l'affinité de l'inhibiteur de pancréas pour la trypsine est fortement réduite lorsque l'enzyme est lié à l' α M comme il ressort de la comparaison des valeurs des constantes d'association.

D'autre part, lorsqu'on fait agir α M sur le complexe T-IP nous n'avons jamais observé la libération de l'inhibiteur de pancréas. Ce résultat est en accord avec les travaux de Dlouha et al. [8]. Ces auteurs ont montré que les liaisons entre trypsine et inhibiteur de pancréas sont si stables qu'elles ne peuvent être rompues même par protéolyse trypsique et chymotrypsique en milieu alcalin.

Remerciements

Ce travail effectué avec la collaboration technique de B.Bocher a bénéficié de l'aide de la DGRST. Il a été poursuivi dans le service du Professeur J.Tonnelat que

nous tenons à remercier pour l'intérêt qu'il a porté à cette étude ainsi que Mlle S.Guinand pour ses précieux conseils.

Références

- [1] B.J.Haverback, B.Dyce, H.F.Bundy, S.K.Wirtschafter et H.A.Edmundson, J. Clin. Inv. 41 (1962) 972.
- [2] J.W.Mehl, W.O'Connell et J.de Groot, Science 145 (1964) 821.
- [3] P.O.Ganrot, Clin. Chim. Acta 14 (1966) 493.
- [4] Y.Jacquot-Armand, Compt. Rend. Acad. Sci.Paris 264 (1967) 2236.
- [5] N.M.Green, Biochem. J. 66 (1957) 407.
- [6] N.M.Green et E.Work, Biochem. J. 54 (1953) 347.
- [7] G.Weber, Advan. Protein Chem. 8 (1953) 415.
- [8] V.Dlouha, B.Keil et F.Sorm. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31 (1968) 66.