

## INTERACTIONS SUBSTRAT-FLAVINE-HEMOPROTEINE ET STABILITE THERMIQUE DU CYTOCHROME $b_2$ (L-LACTATE DESHYDROGENASE DE LA LEVURE)

Chantal CAPELLERE-BLANDIN

*Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S., 91, Gif-sur-Yvette, France*

Received 28 July 1969

We studied the thermal inactivation of yeast cytochrome  $b_2$ , the native flavohaemoprotein (FHP<sub>n</sub>) and its derivatives, the haemoprotein (HP) obtained by dissociation of FMN from FHP<sub>n</sub> and the reconstituted flavohaemoprotein (FHP<sub>r</sub>) (haemoprotein + FMN). The initial velocity of inactivation is faster in the presence of FMN. The substrate (L-lactate) or the competitive inhibitor (oxalate) protects only the flavohaemoproteins (FHP<sub>n</sub> and FHP<sub>r</sub>) from thermal inactivation by decreasing this velocity. In each case, the "protection constant",  $K_p$ , is determined.

Several interpretations can be proposed to explain the lack of protection of the haemoprotein by its substrate: 1) the structure of the substrate-binding site depends on the presence of the FMN; 2) the substrate binding site exists, but the affinity is too small to be detected; 3) a hypothetical scheme is proposed, suggesting that the protein can exist under different thermally sensitive forms following whether FMN or substrate is present.

### 1. Introduction

La L-lactate déshydrogénase de la levure (L-LDH) (L-lactate cytochrome  $c$  accepteur, oxydo réductase, E.C.1.1.2.3) identifiée au cytochrome  $b_2$  [1] est une flavohémoprotéine (FHP) qui contient en quantité équimoléculaire un protohème et une flavine mononucléotide [2].

La possibilité d'obtenir une hémoprotéine, apo-enzyme inactif par dissociation réversible de la seule flavine prosthétique, l'hème restant fixé à la protéine, a permis à Baudras [3] de montrer la nécessité du FMN dans la fonction catalytique de l'enzyme : l'absence du FMN entraîne d'une part l'impossibilité du transfert des électrons du L-lactate au ferricyanure, donc l'absence d'activité enzymatique et d'autre part l'impossibilité de réduire l'hème prosthétique par le L-lactate.

Dans ce laboratoire, Baudras [4] et Iwatsubo et al. [5] ont mis en évidence l'existence d'interactions coopératives réciproques entre le substrat et le groupe prosthétique flavinique en étudiant, d'une part la recombinaison du FMN à l'hémoprotéine en présence ou en absence de substrat, et d'autre part les variations de la constante de Michaelis (pour le substrat) avec le

taux variable de recombinaison de l'hémoprotéine au FMN.

Pour apporter des informations complémentaires sur l'importance de la coopérativité entre les sites de fixation du substrat et de la flavine, par une méthode indépendante des méthodes cinétiques, nous avons étudié le rôle du L-lactate et de l'oxalate en tant que protecteur de l'enzyme vis à vis de son inactivation thermique. Dans ces expériences nous avons comparé le comportement de l'hémoprotéine avec celui de la flavohémoprotéine native et celui d'un flavohémoprotéine reconstituée obtenue par saturation de l'hémoprotéine avec la flavine [3]. Nous avons constaté que ces trois formes se comportent différemment au cours d'une incubation à température élevée et que le substrat (L-lactate) protège les flavohémoprotéines native ou reconstituée contre la perte d'activité alors qu'il ne protège pas l'hémoprotéine.

### 2. Matériels et techniques

La L-LDH "native" flavohémoprotéine notée ici FHP<sub>n</sub> est préparée à partir de la levure de boulangerie (Springer) par la méthode d'Appleby et Morton [2]

modifiée selon Spyridakis [6] : les cristaux réduits ainsi obtenus sont dissous et traités selon la méthode de Morton et Shepley [7] qui permet d'obtenir l'enzyme recristallisé sous forme oxydée. Les cristaux sont dissous dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2; cette solution (150  $\mu$ M) gardée à 0°C est utilisée le jour même.

L'hémoprotéine (HP) dérivé sans flavine, est préparée à partir de cristaux réduits de FHP<sub>n</sub> par précipitation en milieu acide avec le sulfate d'ammonium [3]. Le culot obtenu après centrifugation est ensuite dissous dans un tampon 0,1 M phosphate, pH 7,2. La teneur en FMN résiduel, mesurée fluorométriquement après addition de PCMS est généralement comprise entre 7 et 12%.

La flavohémoprotéine "reconstituée" (FHP<sub>r</sub>) est obtenue par saturation de l'hémoprotéine HP avec le FMN. L'inactivation thermique des trois solutions enzymatiques, FHP<sub>n</sub>, HP et FHP<sub>r</sub> s'opère en ajoutant une aliquote de solution stock (concentration finale 5  $\mu$ M) à 0,3 ml de tampon phosphate 0,1 M, EDTA 0,33 mM, pH 7,2, préalablement équilibré à 50°C. Une aliquote de ce mélange est prélevée au bout d'un temps d'incubation  $t$ , et son activité est mesurée à 30°C.

L'activité enzymatique "a" native et résiduelle (après traitement thermique) est mesurée avec un spectrophotomètre Jobin et Yvon, dans des conditions standard à 30°C; le mélange réactionnel contenu dans les cuves spectrophotométriques équilibrées à 30°C (trajet optique 1 cm, volume de la solution 2 ml) se compose de tampon phosphate 66 mM, EDTA 0,33 mM, DL-lactate 66 mM, ferricyanure de potassium, 0,83 mM (pH 7,2) sans FMN, ou avec FMN (50  $\mu$ M) pour mesurer l'activité "reconstituable" de l'hémoprotéine. "a" est exprimée en "activité molaire" c'est à dire en nombre d'électrons équivalents transférés en une seconde à l'accepteur par une quantité d'enzyme contenant une mole d'hème (élect. sec<sup>-1</sup>, mole.hème<sup>-1</sup>) [2].

Les concentrations des flavohémoprotéines sont mesurées spectrophotométriquement en prenant pour  $\epsilon_{423\text{red}}$  la valeur nouvellement déterminée de 183 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> [8].

### 3. Résultats expérimentaux

Lorsqu'on étudie l'inactivation thermique de FHP<sub>n</sub>,

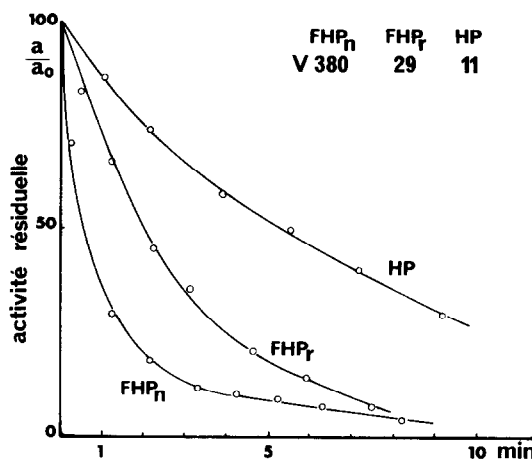


Fig. 1. Comparaison des comportements de FHP<sub>n</sub>, FHP<sub>r</sub>, et HP. Incubation préalable à 50°C d'une solution de phosphate 0,1 M, pH 7,2, EDTA 0,33 mM puis addition, au temps zéro d'une aliquote de la solution enzymatique étudiée (concentration finale de 5  $\mu$ M), en présence de 5 mM de FMN pour obtenir FHP<sub>r</sub>. Au temps  $t$ , on prélève une aliquote dont on mesure l'activité (en présence de FMN 50  $\mu$ M pour la seule hémoprotéine), voir Méthodes.  $V$ , la vitesse initiale d'inactivation représente la variation de l'activité molaire par minute ( $a \cdot \text{min}^{-1}$ ).

on constate qu'elle perd son activité "a" très rapidement selon un processus d'ordre 2 (fig. 1 et 2). La représentation graphique  $\frac{a_0}{a} = f(t)$  est linéaire: la vitesse initiale d'inactivation est donnée par le produit de la pente de la droite, par l'activité molaire initiale  $a_0$  et s'exprime par la variation de l'activité molaire par minute ( $a \cdot \text{min}^{-1}$ ) on obtient ici,  $V_{\text{FHP}_n} = 360 a \cdot \text{min}^{-1}$ . Lorsque le mélange d'incubation contient du L-lactate ou de l'oxalate, les vitesses d'inactivation deviennent notablement plus faibles (fig. 2) atteignant, par exemple, 6  $a \cdot \text{min}^{-1}$  pour 100 mM de L-lactate. Le graphe des variations de la vitesse initiale d'inactivation avec la concentration de ces effecteurs (fig. 3) a un aspect hyperbolique; la concentration donnant le demi-effet de protection, théoriquement égal à la constante de dissociation du complexe enzyme-effecteur, est ici à 50°C, de l'ordre de 500  $\mu$ M pour le lactate et de 30 mM pour l'oxalate. Notons que ces valeurs sont très supérieures à celles obtenues à 20°C dans des expériences fluorométriques de protection de la L-LDH vis à vis de la dénaturation par l'urée où elles deviennent respectivement de 30  $\mu$ M et de 750  $\mu$ M pour le L-lactate et l'oxalate [9].

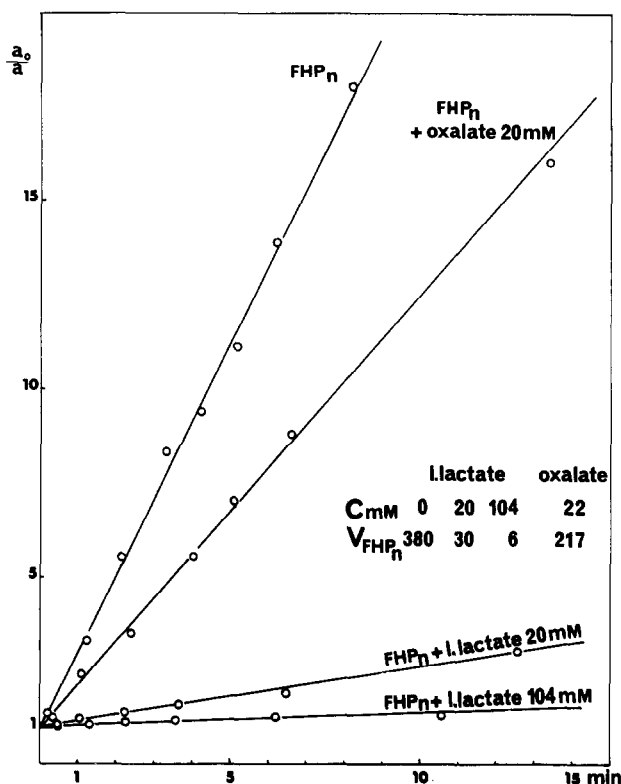


Fig. 2. Cinétiques d'inactivation de la flavohémoprotéine native ( $FHP_n$ ) en présence ou non d'effecteurs (L-lactate ou oxalate) à concentrations variables: représentation d'ordre 2:  $\frac{a_0}{a} = f(t)$ .

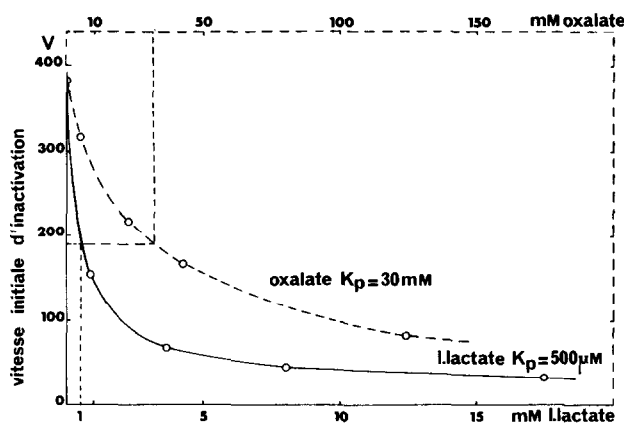


Fig. 3. Protection de  $FHP_n$  par addition de L-lactate ou d'oxalate. En ordonnées: vitesse initiale d'inactivation  $V$ ; en abscisses: concentrations de L-lactate ou d'oxalate ajoutés à l'enzyme pendant l'incubation.

Si l'on fait une étude parallèle sur l'hémoprotéine (HP) c'est à dire sur l'enzyme privé de sa flavine prosthétique, on constate que lorsqu'on suit les variations de son activité "reconstituable" obtenue après lui avoir rajouté la flavine prosthétique, en fonction de la durée d'incubation, la réaction d'inactivation est du premier ordre dans le temps (fig. 1-4) la représentation graphique  $\ln \frac{a_0}{a} = f(t)$  est linéaire; sa pente multipliée par l'activité molaire initiale  $a_0$  donne la vitesse initiale d'inactivation. Celle-ci  $V_{HP} = 11 \text{ a.min}^{-1}$  est beaucoup plus faible que celle correspondant à l'enzyme natif.

La présence d'effecteurs dans le mélange d'incubation (fig. 5a) n'affecte alors pratiquement pas la vitesse d'inactivation, la légère protection observée peut s'interpréter si l'on tient compte de la présence de 12% de FMN résiduel dans la solution d'hémoprotéine utilisée. Si l'on compare les expériences faites sur la flavohémoprotéine native et l'hémoprotéine on constate que la présence de flavine d'une part

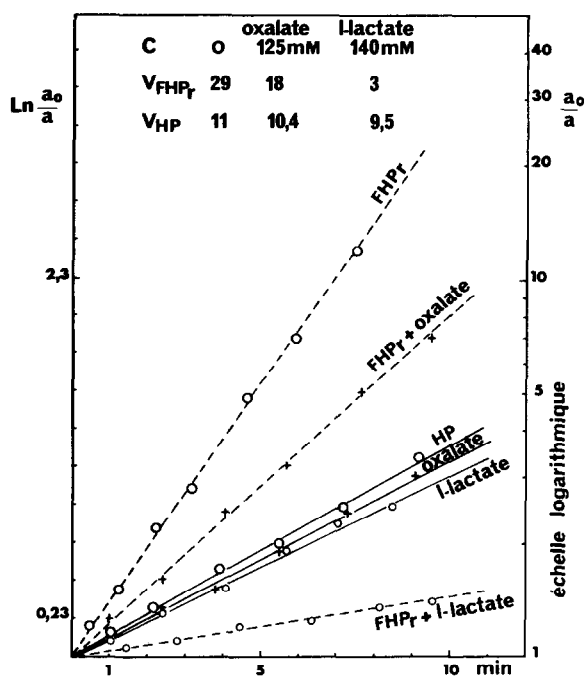


Fig. 4. Cinétiques d'inactivation de l'hémoprotéine (HP) et de la flavohémoprotéine ( $FHP_r$ ) reconstituée en présence ou en absence d'effecteurs (L-lactate 140 mM et oxalate 120 mM).

Représentation d'ordre 1:  $\ln \frac{a_0}{a} = f(t)$ .

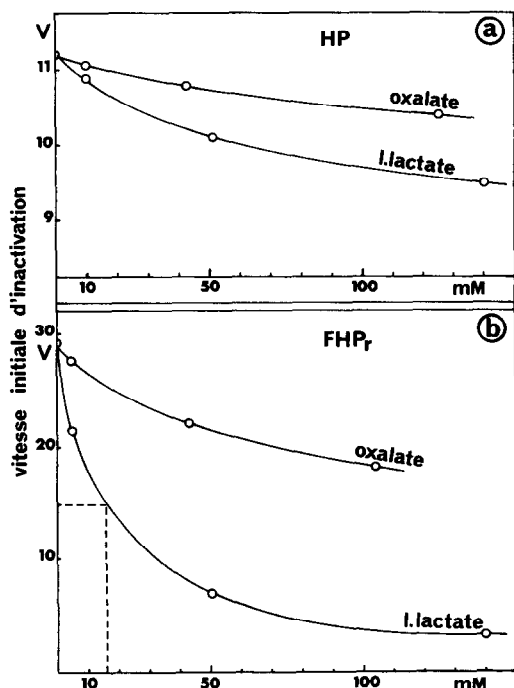


Fig. 5. Protection de HP et de FHP<sub>r</sub> par addition de L-lactate ou d'oxalate. En ordonnées: vitesse initiale d'inactivation  $V$ ; en abscisses: concentrations de L-lactate ou d'oxalate ajoutés à l'enzyme pendant l'incubation.

semble provoquer une plus grande vitesse d'inactivation et d'autre part semble nécessaire à l'action du substrat comme protecteur.

Pour préciser cette interprétation du rôle de la flavine, il nous faut voir si les propriétés manifestées par l'hémoprotéine sont bien dues à la perte de la flavine et non à d'autres modifications provoquées par le traitement acide subi lors de la préparation.

Pour cela nous avons étudié de la même façon le comportement de la flavohémoprotéine reconstituée (FHP<sub>r</sub>) obtenue par addition de flavine (5 mM) saturante à HP.

Les variations de l'activité de FHP<sub>r</sub> avec la durée de l'incubation s'établissent selon un processus d'ordre un (fig. 1 et 4). Nous calculons la vitesse d'inactivation de la même façon que dans le cas de l'apoenzyme. En absence d'effecteurs (L-lactate ou oxalate), elle est de l'ordre de  $30 \text{ a.min}^{-1}$ , alors que leur présence la diminue fortement jusqu'à l'obtention d'une protection quasi totale pour le L-lactate (fig. 4–5b). On peut définir les demi-effets de

protection de 17 et de 200 mM respectivement pour le L-lactate et l'oxalate.

#### 4. Conclusion

Le fait que l'hémoprotéine ( $V_{\text{HP}} = 11 \text{ a.min}^{-1}$ ) résiste mieux à une incubation à  $50^\circ\text{C}$  que les flavo-hémoprotéines native ( $V_{\text{FHP}_n} = 360 \text{ a.min}^{-1}$ ) ou reconstituée ( $V_{\text{FHP}_r} = 30 \text{ a.min}^{-1}$ ) semble indiquer l'effet sensibilisant induit par la présence du FMN. Nous connaissons le rôle essentiel de la flavine dans l'activité catalytique mais ce comportement particulier, qui correspond à une sensibilisation de l'hémoprotéine à la chaleur, est contraire à toute idée de stabilisation de structure par association protéine-groupement prosthétique. Tout se passe comme si la flavine favorisait le passage de l'hémoprotéine d'une forme B "résistante" à une forme A "sensible" à la chaleur.

Cependant, le comportement de FHP<sub>n</sub> étant légèrement différent de celui de FHP<sub>r</sub>, les forces de liaison participant à l'association FMN-hémoprotéine ne doivent donc pas être tout à fait les mêmes.

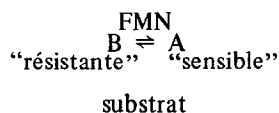
Malgré ces différences, les flavohémoprotéines reconstituée et native sont sensibles à la protection par le L-lactate ou l'oxalate alors que l'hémoprotéine ne l'est pas. Le fait que l'oxalate apporte le même genre de protection que le substrat, suggère que l'effet protecteur est dû à la grande stabilité du complexe substrat-flavohémoprotéine, non parce que les groupes prosthétiques se trouvent à l'état réduit mais plutôt parce que la fixation du substrat (ou de l'inhibiteur compétitif) induit un remaniement conformationnel stabilisant le complexe ternaire.

L'absence d'effet protecteur sur l'hémoprotéine peut s'interpréter de plusieurs façons:

1) Il n'y a pas de site de fixation car sa configuration est dépendante de la fixation préalable de la flavine: nous aurions affaire, en quelque sorte, à une enzyme à deux substrats dont la fixation est nécessairement ordonnée.

2) Le site existe d'un point de vue structural, mais l'affinité de l'hémoprotéine pour le substrat est très abaissée en absence de FMN, ce qui fait que l'on ne détecte pas d'effet protecteur. Ces deux interprétations sont en accord avec les phénomènes de coopérativité observés par Baudras [4] et Iwatsubo [5].

3) En reprenant le modèle précédemment élaboré, qui comporte le passage de l'hémoprotéine de la forme "résistante" B à la forme "sensible" A sous l'influence du FMN, l'effet protecteur que le substrat apporte à la flavohémoprotéine native (forme A) peut s'expliquer par le retour de la protéine à la forme B "résistante". Dans ces conditions si l'on ajoute du L-lactate à l'hémoprotéine sous la forme B "résistante", on ne peut observer d'effet de protection puisque la configuration stable est déjà atteinte.



Ce modèle pourrait expliquer une fixation de substrat sur l'hémoprotéine sans manifestation apparente d'effet protecteur.

Une étude plus directe du problème de la fixation du substrat en présence de FMN est en cours; elle s'appuie sur des expériences de filtration sur gel de l'hémoprotéine et des flavohémoprotéines native et reconstituée en présence d'oxalate radioactif.

## Remerciements

Nous remercions vivement Madame F.Labeyrie, dans le laboratoire de laquelle ce travail a été effectué, et Monsieur M.Iwatsubo pour l'intérêt constant qu'ils ont porté à ce travail.

Ce travail a été rendu possible grâce aux subventions mises à notre disposition par le C.N.R.S. et par la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Comité de Biologie Moléculaire).

## Bibliographie

- [1] S.J.Bach, M.Dixon and D.Keilin, *Nature (London)* 173 (1942) 21.
- [2] C.A.Appleby and R.K.Morton, *Biochem. J.* 71 (1959) 492.
- [3] A.Baudras, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47 (1965) 1143.
- [4] A.Baudras, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47 (1965) 1177.
- [5] M.Iwatsubo et A.di Franco, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47 (1965) 891.
- [6] A.Spyridakis, article en préparation.
- [7] R.M.Morton and K.Shepley, *Biochem. J.* 89 (1963) 257.
- [8] P.Pajot, *European J. Biochem.* (sous presse).
- [9] M.Iwatsubo et C.Capeillère, *Biochim. Biophys. Acta* 146 (1967) 349.